Strukturna karakterizacija dipeptidil-peptidaze III iz bakterije Bacteroides thetaiotaomicron

Sabljić, Igor

Doctoral thesis / Disertacija

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:889715

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Igor Sabljić

Structural characterization of dipeptidyl peptidase III from the bacterium *Bacteroides thetaiotaomicron*

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Igor Sabljić

Strukturna karakterizacija dipeptidil-peptidaze III iz bakterije *Bacteroides thetaiotaomicron*

DOKTORSKI RAD

Mentorica:
dr. sc. Marija Luić

Zagreb, 2018.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Igor Sabljić

Structural characterization of dipeptidyl peptidase III from the bacterium *Bacteroides thetaiotaomicron*

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Dr. Marija Luić

Zagreb, 2018

Prije svega želim se zahvaliti svojoj mentorici dr. sc. Mariji Luić na podršci, ukazanom povjerenju, neograničenoj potpori, riječima ohrabrenja, susretljivosti i pruženoj slobodi u istraživačkom radu.

Zahvaljujem se dr.sc. Mariji Abramić na izvanrednoj dugogodišnjoj suradnji, na pomoći i usmjeravanju, dostupnosti, te mnogobrojnim sugestijama u osmišljavanju eksperimenata kao i analizi rezultata.

Posebno bih zahvalio prof. dr. sc. Peteru Macherouxu i prof. dr. sc. Karlu Gruberu što sam uvijek dobrodošao u njihov laboratorij, na ukazanom gostoprimstvu, mnogobrojnim savjetima, te svim kolegama iz Graza na savjetima i diskusijama.

Jedno posebno hvala dr. sc. Bojani Vukelić koja je uz mene od samog početka kao i sve ove godine. Hvala Vam što ste mi pojednostavili i olakšali mnoge teške korake.

Zahvaljujem se svim svojim kolegama iz Laboratorija kemijske i biološke kristalografije, Laboratorija za biokemiju proteina i molekulsko modeliranje, Laboratorija za kemijsku biologiju i Laboratorija za spektrometriju masa, kao i kolegama s Prirodoslovno-matematičkog fakulteta i iz Hrvatske udruge kristalografa. Krenuo sam vas poimence zapisivati, ali nakon pola strane sam shvatio da vas je previše... Bez vas izrada ovog rada ne bi bila moguća i zbog toga, iz sveg srca hvala!

Od srca se zahvaljujem Nedi i Liviju na konstruktivnim savjetima i motivaciji u prijelomnim trenucima.

Zahvaljujem se dragim prijateljima na strpljenju i što su sve ove godine navijali i hranili moju ljubav prema kemiji.

Veliko hvala mojim roditeljima i najbližoj obitelji na ljubavi, razumijevanju i potpori.

I na kraju iz sveg srca zahvaljujem mojoj ljubavi Miji što je sve ove godine uz mene.

Mia, hvala ti što činiš moj put lakšim!

Sadržaj

SAŽETAK ..... **VIII**

ABSTRACT ..... **IX**

§ 1. UVOD **1**

1.1. Cilj i opseg rada **2**

§ 2. LITERATURNI PREGLED **3**

2.1. Bakterija *Bacteroides thetaiotaomicron* **3**

2.1.1. Simbioza bakterije Bacteroides thetaiotaomicron *i sisavaca* *3*

2.2. Peptidaze **5**

2.2.1. Uloga i podjela peptidaza *5*

2.2.2. Metalopeptidaze *9*

2.3. Dipeptidil-peptidaza III **10**

2.3.1. Biokemijske značajke i fiziološka funkcija DPP III *12*

2.3.2. Kristalna struktura DPP III *14*

2.3.3. Mehanizam katalize DPP III *19*

2.3.4. DPP III iz bakterije Bacteroides thetaiotaomicron *22*

§ 3. MATERIJALI I METODE **24**

3.1. Materijali **24**

3.2. Metode rada s mikroorganizmima **26**

3.2.1. Uzgoj bakterijskih kultura *26*

3.2.2. Transformacija bakterija plazmidnom DNA *27*

3.3. Metode rada s DNA **28**

3.3.1. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu *28*

3.3.2. Kloniranje gena za DPP III iz bakterije Bacteroides thetaiotaomicron *u plazmidni vektor pET-21b(+)* *28*

3.3.2.1. Umnažanje gena koji kodira enzim Bt*DPP III* *28*

3.3.2.2. Umnažanje i izolacija plazmidnog vektora pET-21b(+) *30*

3.3.2.3. Razgradnja DNA restrikcijskim endonukleazama *30*

3.3.2.4. Ligacija plazmidnog vektora pET-21b(+) i odsječka DNA *31*

3.3.2.5. Umnažanje i izolacija plazimda pET-21b(DPP III-His$_6$) *32*

3.3.3. Ciljana mutageneza kloniranog gena za DPP III *32*

3.4. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje DPP III **34**

3.4.1. Prekomjerna ekspresija DPP III *34*

3.4.2. Liza bakterijskih stanica *36*
3.4.3. Kromatografske metode *37*
3.4.3.1. Afinitetna kromatografija *37*
3.4.3.2. Gel-filtracija *38*
3.4.3.3. Kromatografija na ionskom izmjenjivaču *38*
3.5. Biokemijske i biofizičke metode za karakterizaciju pročišćene DPP III **39**
3.5.1. Određivanje koncentracije proteina *39*
3.5.2. Elektroforetske metode *39*
3.5.3. Određivanje aktivnosti DPP III standardnim testom *41*
3.5.4. Određivanje kinetičkih parametara uz različite sintetske supstrate *41*
3.5.5. Cirkularni dikroizam *42*
3.5.6. Dinamičko raspršivanje svjetlosti *42*
3.5.7. Spektrometrija masa *43*
3.6. Kristalografske metode **43**
3.6.1. Kristalizacija metodom strujanja para *43*
3.6.2. Kokristalizacija proteina i supstrata i/ili inhibitora *45*
3.6.3. Difrakcija rendgenskih zraka na jediničnom kristalu *45*
3.6.4. Procesiranje podataka i rješavanje kristalne strukture *46*
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA **48**
4.1. Divlji tip DPP III iz *Bacteroides thetaiotaomicron* **48**
4.1.1. Kloniranje, ekspresija i pročišćavanje *48*
4.1.2. Analiza spektrometrijom masa *50*
4.1.1. Nativna elektroforeza i izoelektrično fokusiranje pročišćene DPP III *50*
4.1.2. Pokušaji homogenizacije uzoraka DPP III *52*
4.1.3. Pročišćavanje jedne proteinske forme DPP III *52*
4.1.4. Kinetička svojstva *55*
4.1.5. DLS analiza i inicijalni kristalizacijski eksperimenti *57*
4.2. Mutanti proteina DPP III iz *Bacteroides thetaiotaomicron* **58**
4.2.1. Kloniranje, ekspresija i pročišćavanje *58*
4.2.2. Analiza mutanata *58*
4.2.3. Cys-null Bt*DPP III* *60*
4.3. Kristalizacija i određivanje 3D-strukture DPP III **61**
4.3.1. Kristalizacija i pokušaji rješavanja strukture proteina Cys-null DPP III *61*
4.3.2. Kristalizacija i kokristalizacija proteina Se-Met Cys-null i divljeg tipa DPP III *62*
4.3.3. Rješavanje 3D-struktura DPP III *63*
4.4. Analiza dobivenih struktura DPP III **66**

4.4.1. Struktura Se-Met Cys-null i divljeg tipa proteina DPP III *66*
4.4.2. Struktura Bt*DPP III u zatvorenoj konformaciji* *69*
§ 5. ZAKLJUČCI **73**
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA **74**
§ 7. LITERATURNI IZVORI **77**
§ 8. ŽIVOTOPIS ..... **XIX**

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA DIPEPTIDIL-PEPTIDAZE III IZ BAKTERIJE *Bacteroides thetaiotaomicron*

Igor Sabljić
Laboratorij za kemijsku i biološku kristalografiju, Zavod za fizičku kemiju
Institut Ruđer Bošković, Bijenička c. 54, Zagreb, Hrvatska

Dipeptidil-peptidaza III (DPP III) je široko rasprostranjena citosolna metalopeptidaza iz porodice M49, koja odcjepljuje dipeptide s *N*-kraja peptidnih supstrata. Većina istraživanja o DPP III napravljena je na ortolozima iz eukariota koja ukazuju na njenu opću funkciju u intracelularnom katabolizmu proteina, ulogu u regulaciji boli te odgovoru na oksidativni stres.

U ovom radu je strukturno karakterizirana prva prokariotska DPP III, i to iz bakterije *Bacteroides thetaiotaomicron*, ljudskog simbionta koji nastanjuje tanko i debelo crijevo. Kinetičkom analizom utvrđeno je da je Arg_2-2-naftilamid njezin najbolji sintetski supstrat. Elektroforetskim metodama je utvrđeno da pročišćeni proteinski uzorak sadrži tri forme DPP III. Zamjenom svih cisteinskih ostataka u serinske pripremljen je dovoljno homogen uzorak za kristalizaciju bakterijske DPP III. Riješene su strukture u otvorenoj i zatvorenoj konformaciji proteina. Pokazalo se da ovaj protein pripada istoj strukturnoj klasi kao i ljudska i kvaščeva DPP III. S obzirom na gotovo jednako aktivno mjesto može se pretpostaviti i isti mehanizam djelovanja.

(96 stranica, 27 slika, 16 tablica, 112 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: *Bacteroides thetaiotaomicron*/ dipeptidil-peptidaza III/ DPP III/ kristalna struktura/ konformacijska promjena/ metalopeptidaza.

Mentor: dr. sc. Marija Luić, znanstvena savjetnica, 2. izbor, IRB i nasl. red. prof. PMF

Rad prihvaćen: 6. lipnja 2018.

Ocjenitelji:

1. Dr. sc. Marko Močibob, doc., Prirodoslovno-matematički fakultet
2. Dr. sc. Marija Luić, znanstvena savjetnica, 2. izbor, IRB i nasl. red. prof. PMF
3. Dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, red. prof., Prirodoslovno-matematički fakultet
4. Dr. sc. Marija Abramić, znanstvena savjetnica (u mirovini), Institut Ruđer Bošković

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF DIPEPTIDYL PEPTIDASE III FROM THE BACTERIUM *Bacteroides thetaiotaomicron*

Igor Sabljić
Laboratory for Chemical and Biological Crystallography, Division of Physical Chemistry
Ruđer Bošković Institute, Bijenička c. 54, Zagreb, Croatia

Dipeptidyl peptidase III (DPP III) is a widespread cytosolic metalopeptidase of the M49 family, which cleaves dipeptides from the *N*-terminus of its peptide substrates. Previous studies of the DPP III enzyme were focused on eukaryotic orthologs and indicate its general function in the intracellular protein catabolism, pain regulation as well as the response to oxidative stress.

In this work, the first prokaryotic DPP III, that from the human gut symbiont bacterium *Bacteroides thetaiotaomicron*, was structurally characterized. Kinetic analysis showed that Arg_2-2-naphthylamide is the preferred synthetic substrate. Electrophoretic methods revealed that the purified protein sample contains three forms. By replacing all cysteine residues with serines, homogeneity of the sample improved enough to enable successful crystallization of the bacterial DPP III. Structures in open and closed conformations were solved and they have the same protein fold as the human and yeast DPP III. Considering the fact that these three enzymes have almost identical active sites, the same mechanism of action can be assumed.

(96 pages, 27 figures, 16 tables, 112 references, original in Croatian)

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

Keywords: *Bacteroides thetaiotaomicron*/ conformational change/ crystal structure/ dipeptidyl-peptidase III/ DPP III/ metallopeptidase.

Supervisor: Dr. Marija Luić, senior scientist, RBI

Thesis accepted: June 6th, 2018

Reviewers:
1. Dr. Marko Močibob, Asst. Prof., Faculty of Science
2. Dr. Marija Luić, Senior Scientist, Ruđer Bošković Institute
3. Dr. Dubravka Matković-Čalogović, Prof., Faculty of Science
4. Dr. Marija Abramić, Senior Scientist (retired), Ruđer Bošković Institute

§ 1. UVOD

Dipeptidil-peptidaza III (DPP III) je citosolna hidrolaza, pripada grupi egzopeptidaza, a katalizira hidrolitičko odcjepljivanje dipeptida s *N*-terminalnog dijela molekule peptida. Član je porodice M49 (baza MEROPS; http://merops.sanger.ac.uk/; verzija 11.0)[1] koju sačinjavaju metalopeptidaze s dva karakteristična heksapeptidna strukturna motiva: HEXXXH i EEXR(K)AE(D), koji su odgovorni za vezanje iona cinka i katalitičku aktivnost enzima[2]. Pretraživanjem baza podataka po sličnosti sekvenciranih genoma, utvrđeno je da je DPP III rasprostranjena u svim domenama živog svijeta osim arheja. Do danas je pročišćena i biokemijski okarakterizirana iz raznih tkiva sisavaca[3-13], nižih eukariota[14-18], biljaka[19,20] te iz bakterije *Bacteroides thetaiotaomicron*[21]. Fiziološka funkcija DPP III još uvijek nije potpuno razjašnjena. S obzirom na prisutnost proteina u različitim tkivima kod sisavaca, kao i široku specifičnost prema oligopeptidima, smatra se da je DPP III uključena u završne korake proteinske razgradnje u stanici, u obranu od oksidativnog stresa[22,23], a predložena je uloga i u regulaciji boli[24,25]. Zabilježene su patofiziološke uloge u nastajanju očne mrene (kataraktogeneza)[26], rastu malignih tumora[27] i infekciji virusom influence[28]. Najnovija istraživanja pokazala su da je DPP III član „potpisa“ od šest gena koji precizno predviđaju preživljavanje bolesnika s karcinomom dojke[29].

Prva riješena kristalna struktura DPP III je ona iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, kada je otkrivena nova strukturna klasa (*fold*)[30]. Do danas, još je riješena struktura ljudske DPP III bez liganda, te u kompleksu s različitim peptidima (angiotenzin II, Met-enkefalin, Lue-enkefalin, endomorfin 2, tinorfin i peptid IVYPW)[31,32]. DPP III je građena od dvije strukturne domene razdvojene širokim procjepom (otvorena konformacija proteina). U gornjoj domeni je smješten katalitički ion cinka koordiniran s dva histidinska ostatka iz prvog i ostatkom glutaminske kiseline iz drugog očuvanog heksapeptidnog motiva, a na četvrtom položaju je molekula vode. Peptidni supstrat se veže na donju domenu kao dodatni *β*-lanac na središnjoj *β*-ploči. Prilikom vezanja supstrata dolazi do velike konformacijske promjene i zatvaranja procjepa (zatvorena konformacija proteina). Metodama molekulske dinamike je pokazano da se DPP III u otopini može nalaziti u otvorenoj i zatvorenoj konformaciji[33], bez obzira na vezanje supstrata, a u prilog tome ide i riješena struktura ljudske DPP III bez liganda u zatvorenoj konformaciji[32].

Do danas je pročišćena i djelomično okarakterizirana samo jedna bakterijska DPP III i to ona iz bakterije *B. thetaiotaomicron*, ljudskog simbionta koji nastanjuje tanko i debelo crijevo[21].

1.1. Cilj i opseg rada

Kako u literaturi nema strukturnih podataka o prokariotskim ortolozima porodice M49, cilj istraživanja bio je odrediti i analizirati 3D-strukturu DPP III iz bakterije *B. thetaiotaomicron*, kao i njenog kompleksa sa sintetskim supstratom i/ili inhibitorom. Uvidom u njezinu strukturu utvrditi će se pripada li istoj strukturnoj klasi kojoj pripadaju i do sada riješene strukture ljudske i kvaščeve DPP III, a usporedbom struktura će se odrediti sličnosti i razlike među njima. Također, usporedbom strukture sa i bez vezanog supstrata i/ili inhibitora analizirati će se konformacijska promjena proteina uzrokovana njihovim vezanjem. Detaljnom analizom aktivnog mjesta pokušat će se objasniti razlike u supstratnoj specifičnosti i mehanizmu djelovanja među različitim članovima ove porodice enzima.

Tijekom rada metodama molekularne biologije (kloniranje gena, rad s DNA, ciljana mutageneza, prekomjerna ekspresija u bakteriji *Escherichia coli*), prirediti će se rekombinantni protein DPP III iz bakterije *B. thetaiotaomicron* koji sadrži histidinski privjesak za lakše pročišćavanje proteina u velikim količinama neophodnim za kristalizacijske eksperimente. Ciljanom mutagenezom pripremit će se konstrukti koji će olakšati kristalizaciju enzima kao i pripremu kompleksa sa supstratom i/ili inhibitorom. Biokemijskim metodama (pročišćavanje i detekcija aktivnosti enzima), priredit će se velika količina homogenog enzima koji će zatim biti analiziran biofizičkim metodama (UV/VIS spektroskopija, cirkularni dikroizam, fluorimetrija, dinamičko raspršivanje svjetlosti i spektrometrija masa). Nakon pripreme homogenog uzorka biti će provedeni kristalizacijski i kokristalizacijski eksperimenti pomoću robota za kristalizaciju uz komercijalno dostupne kristalizacijske otopine. S dobivenim kristalima proteina DPP III bit će prikupljeni eksperimentalni podaci metodom rendgenske difrakcije na monokristalnom uzorku. Kristalna struktura proteina bit će riješena metodom molekulske zamjene ili metodom anomalne difrakcije na jednoj ili više valnih duljina.

Dio rezultata opisanih u ovoj disertaciji objavljen je u radu *Crystal structure of dipeptidyl peptidase III from the human gut symbiont Bacteroides thetaiotaomicron*, objavljenom u znanstvenom časopisu PlosOne 2017. godine[34].

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Bakterija *Bacteroides thetaiotaomicron*

Procijenjeno je da je ukupan broj bakterija koje koloniziraju ljudsko tijelo 10 puta veći od ukupnog broja somatskih stanica. Njihov je utjecaj najviše izražen u probavnom traktu s obzirom da je u njemu sadržan najveći broj bakterija. Pokazano je da mikroflora probavnog trakta sadrži ukupno 100 puta više gena nego li cijeli naš genom, te se može smatrati postnatalno stečenim organom sastavljenim od bakterijskih stanica koje imaju mogućnost obavljanja različitih funkcija[35]. Veći dio razumijevanja simbiotskog odnosa između bakterije i domaćina proizlazi iz studija bakterije *B. thetaiotaomicron*, istaknutog člana crijevne mikroflore kod miševa i ljudi.

B. thetaiotaomicron je anaerobna Gram-negativna bakterija koja obuhvaća 6 % svih bakterija i 12 % svih bakterija roda *Bacteroides* u ljudskim crijevima[36]. Zbog velike zastupljenosti, koristi se kao model za razumijevanje utjecaja crijevne mikroflore na domaćina. Sekvenciranjem genoma *B. thetaiotaomicron* pronađeno je ukupno 4779 proteina u proteomu, a funkcija je dodijeljena za njih samo 2782 (58 %) na temelju homologije s već poznatim proteinima[37]. Ostalih 848 (18 %) proteina su homologni s poznatim proteinima kojima nije određena funkcija, dok njih 1149 (24 %) nemaju odgovarajuću homologiju ni s jednim proteinom opisanim u bazama podataka. Prema bazi podataka MEROPS (http://merops.sanger.ac.uk/; verzija 11.0)[1], *B. thetaiotaomicron* sadrži 129 peptidaza od čega većina nije funkcionalno ili biokemijski karakterizirana.

2.1.1. Simbioza bakterije Bacteroides thetaiotaomicron *i sisavaca*

Glavni aspekt u simbiozi bakterija i domaćina je mogućnost razgradnje hranjivih tvari za koje drugi partner nema odgovarajuće metaboličke putove. Pokazano je da konvencionalno uzgojeni štakori trebaju unijeti 30 % manje kalorija od štakora bez mikroflore u probavnom traktu (*germ free*), kako bi održali jednaku tjelesnu težinu[38]. *B. thetaiotaomicron* je najviše istraživani primjer ljudskog simbionta i ima mogućnost razgradnje cijelog niza polisaharida koji su inače nerazgradivi od strane domaćina. S druge strane, sisavci imaju razvijeni mehanizam za apsorpciju i korištenje produkata bakterijske fermentacije kao izvor hranjive tvari. Funkcionalne genomske studije pokazale su da genom *B. thetaiotaomicron*, osim gena

koji sudjeluju u metabolizmu polisaharida (*susA-susG*), sadrži i transkripcijske faktore koji reagiraju na prisutnost glukoznih oligomera povećanjem transkripcije metaboličkih gena. Dakle, *B. thetaiotaomicron* troši energiju za ekspresiju gena uključenih u metabolizam hranjivih tvari samo kada je određeni nutrijent dostupan u crijevnom ekosustavu[39]. Također je pokazano da kolonizacijom miševa bez mikroorganizama dolazi do promjene u ekspresiji cijelog niza gena kod domaćina, uključenih u procesiranje i apsorpciju ugljikohidrata kao i u apsorpciju i razgradnju kompleksnih lipida iz hrane[40]. Na primjer, kod odraslih miševa uzgojenih bez mikroorganizama kompleksnost kapilarne mreže podsluznice je prilično primitivna u usporedbi s konvencionalno uzgojenim miševima. Međutim, kad su odrasli miševi bez mikroorganizama kolonizirani bakterijom *B. thetaiotaomicron*, ponovno se pokreće angiogeneza to jest izgradnja kompleksne kapilarne mreže koja završava unutar 10 dana[41]. Na ovaj način *B. thetaiotaomicron* koristi domaćinu na način da osigurava adekvatnu apsorpcijsku sposobnost hranjive tvari koje mikrobi procesiraju. Prisustvo bakterije *B. thetaiotaomicron* utječe i na regulaciju apsorpcije metalnih iona u hrani kao i na detoksikaciju organizma od raznih lijekova[41]. Sve navedeno upućuje na to da je uloga *B. thetaiotaomicron* u metabolizmu hranjive tvari kompleksna i dinamička. Također, uključuje izravno sudjelovanje u metaboličkim aktivnostima, ali utječe i na ekspresiju gena probavnog trakta.

Nadalje, bakterija *B. thetaiotaomicron* ima važnu ulogu u izgradnji crijevne sluzne barijere kao i imunološkog sustava. Sluzna barijera je neophodna za izbjegavanje invazije mikroorganizama iz probavnog trakta, a prilikom njenog poremećaja može doći do raznih upalnih bolesti crijeva[42]. Osjetljivost i otpornost na crijevne infekcije često su povezane s prisutnošću ili odsutnošću prikladno glikoziliranih receptora. Pokazano je da se glikozilacijski uzorak miševa vrlo specifično modificira uz prisustvo bakterije *B. thetaiotaomicron*, mijenjajući razinu ekspresije ili topologiju polisaharida. Ovaj proces ima ključnu ulogu u signalizaciji i provedbi imunološkog odgovora sluznice[43]. Sposobnost mikroflore da u prisutnosti patogena modificira odgovore sluzne barijere nije ograničen samo na fiziološka svojstva, kao što su transport i funkcija barijere, već i na gensku ekspresiju izazvanu kolonizacijom bakterije *B. thetaiotaomicron*. Konkretno, proizvodnja imunoglobulina A povezana je s povećanom ekspresijom polimernog imunoglobulinskog receptora koji transportira imunoglobulin A preko epitela. Drugi važan odgovor na kolonizaciju bakterije *B. thetaiotaomicron* je povećana ekspresija gena koji kodira mali prolinom-bogati protein 2A koji doprinosi barijernoj funkciji skvamoznog epitela[41]. Također, pokazano je da kolonizacija

miševa bez mikroorganizama bakterijom *B. thetaiotaomicron* inducira ekspresiju proteina angiogenin 4 (Ang4), pogotovo u Panethovim stanicama, koji se potom izlučuje u lumen crijeva[44]. Protein Ang4 je baktericid za nekoliko Gram-pozitivnih crijevnih patogena uključujući bakteriju *Listeria monocytogenes*, ali ne i za benignu bakteriju *Listeria innocua*. U ovakvoj simbiozi *B. thetaiotaomicron* štiti domaćina od invazije patogena reguliranjem ekspresije selektivnog endogenog proteinskog antibiotika Ang4, a pretpostavlja se da je njena korist što na isti način kontrolira i sastav mikroba u okolini. Navedena istraživanja upućuju na kompleksnu mrežu mehanizama koji su uključeni u izgradnji i pojačavanju sluzne barijere i imunološkog sustava uz pomoć crijevne mikroflore. Promjena odnosa između crijevne mikroflore i domaćina može utjecati na integritet sluzne barijere, te kao što je već navedeno, pridonosi patogenezi poremećaja kao što su upalne bolesti crijeva.

Iako je bakterija *B. thetaiotaomicron* dio crijevne mikroflore, prepoznat je i kao oportunistički patogen koji može uzrokovati ozbiljne infekcije kao što su intraabdominalna sepsa i bakterijemija[45]. *B. thetaiotaomicron* je drugi najčešći uzročnik infekcija uzrokovanih anaerobnim Gram-negativnim bakterijama (prvi je *B. fragilis*), zbog čega je vrlo važn u kliničkim istraživanjima. Dodatni problem prilikom liječenja infekcija uzrokovanih bakterijom *B. thetaiotaomicron* je njezina otpornost na mnoge antibiotike[46].

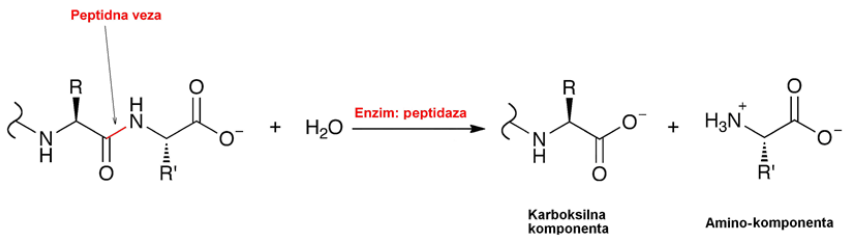
2.2. Peptidaze

2.2.1. Uloga i podjela peptidaza

Proteini imaju esencijalnu ulogu u strukturi i funkciji svih živih organizama. Građeni su od aminokiselina zbog čega je u svakoj stanici neophodan mehanizam za kontinuiranu opskrbu aminokiselinama. Energetski je učinkovitije reciklirati aminokiseline iz već postojećih molekula proteina nego ih *de novo* sintetizirati. Također, mnogi su organizmi izgubili mehanizme za sintezu nekih aminokiselina, te ih stoga dobivaju jedino razgradnjom proteina iz hrane. Peptidaze (proteolitički enzimi) su biološki katalizatori koji razgrađuju molekule proteina i peptida kako bi osigurali slobodne aminokiseline potrebne za sintezu novih proteina. Navedena aktivnost peptidaza je možda najpoznatija u kontekstu razgradnje proteina iz hrane unutar probavnog trakta, ali peptidaze su zapravo evoluirale za obavljanje mnogobrojnih drugih vitalnih funkcija unutar i izvan stanica. Možda najvažnija od ovih funkcija je procesiranje proteina cijepanjem jedne ili više peptidnih veza unutar jednog proteina. Takvom ograničenom proteolizom protein se može aktivirati iz svog latentnog

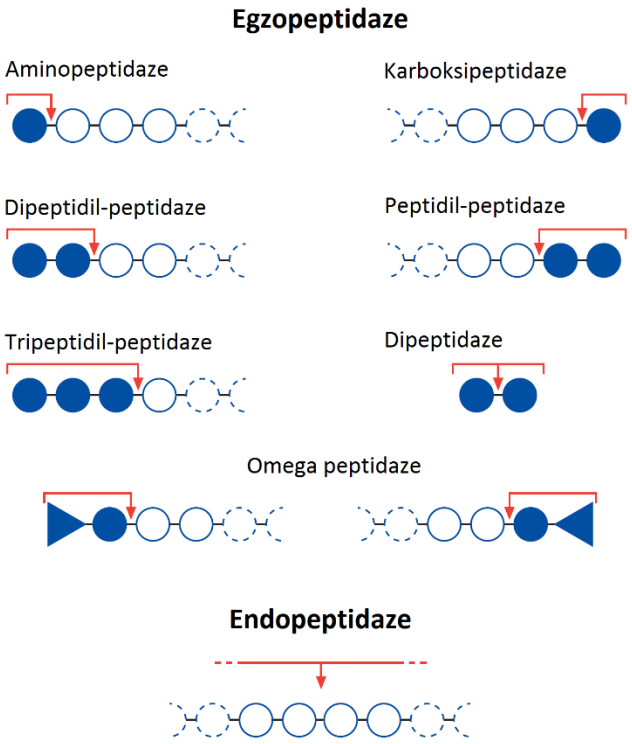
prekursora ili inaktivirati, što je osobito važno za regulaciju aktivnosti enzima, može se utjecati na interakcije između proteina, protein se može preusmjeriti na određenu lokaciju unutar stanice ili izlučiti ili se može proizvesti jedan ili više biološki aktivnih peptida. Utvrđeno je da 2 do 5 % od ukupnog genoma u svim organizmima pripada genima koji kodiraju peptidaze[1]. S obzirom na veliku rasprostranjenost i različite aktivnosti koje peptidaze obavljaju unutar i izvan stanica pokazano je da peptidaze kod viših organizama utječu na replikaciju i transkripciju DNA, rast i diferencijaciju stanice, reorganizacije staničnog skeleta, angiogenezu, neurogenezu, sudionici su u procesima zgrušavanja krvi, fibrinolize, ovulacije, fertilizacije, embrionalnog razvoja, zacjeljivanja rana, upalnih procesa, imunog odgovora, kontrole krvnog pritiska, starenja, programirane smrti stanice (apoptoze) i nekroze[47]. U skladu s navedenim ulogama peptidaza u funkciji stanica, promjene u peptidaznim sustavima su temelj mnogobrojnih patoloških stanja kao što su rast i metastaze malignih tumora, neurodegenerativni poremećaji, te upalne i kardiovaskularne bolesti. Neke peptidaze mogu djelovati kao egzogeni faktor virulencije koji dovode do slabljenja imunološkog sustava i uništavanja tkiva. Takve peptidaze su opažene tijekom mikrobnih infekcija koje uzrokuju tetanus, upalu pluća, tuberkulozu, AIDS, malariju, botulizam, bakterijski meningitis i mnogo drugih, ali i nakon otrovanja uzrokovanog ugrizom zmije[48]. Zbog svega navedenog, u farmaceutskoj industriji peptidaze su jedan od glavnih fokusa za razvijanje ciljanih lijekova ili dijagnostičkih biomarkera. Osim u farmaceutskoj industriji, peptidaze se još koriste i u mnogim drugim industrijama kao što su prehrambena, kožarska, tekstilna i industrija deterdženata.

Peptidaze kataliziraju reakciju hidrolize peptidne veze unutar peptidnih odnosno proteinskih supstrata (slika 2.1). Svrstavamo ih u treći (3.) razred enzima – hidrolaze, gdje pripadaju četvrtoj (4.) grupi enzima – enzimi koji djeluju na peptidnu vezu. Stoga, EC broj (*Enzyme Commission number*) kod svih peptidaza započinje s 3.4., nakon čega slijede dva dodatna broja koja označuju poziciju veze koju peptidaza cijepa i tip supstrata.



Slika 2.1. Shematski prikaz hidrolitičkog cijepanja peptidne veze.

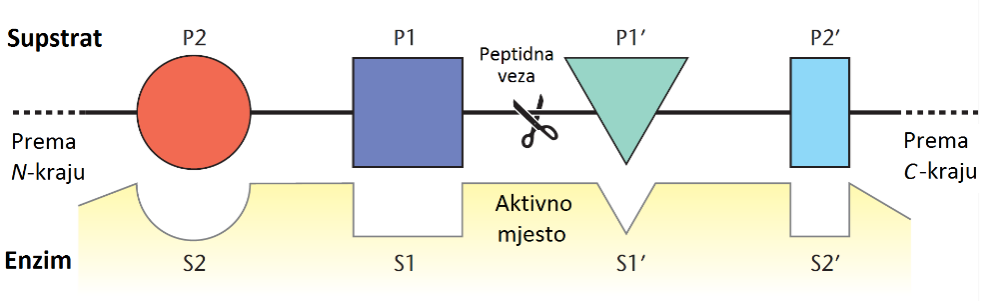
Na prvi pogled bi se moglo zaključiti kako peptidaze nespecifično hidroliziraju peptidnu vezu između bilo kojeg para aminokiselinskih ostataka u polipeptidu i tako pojedinačno razgrađuju bilo koji protein ili peptid, ali to nije slučaj. Stvarnost je da sve poznate peptidaze imaju ograničenu aktivnost, te ih dijelimo na temelju položaja peptidnih veza u supstratnoj molekuli koje hidroliziraju. U takvoj klasifikaciji, razlikujemo peptidaze koje su ograničene na hidrolizu peptidne veze blizu jednog ili drugog kraja polipeptida – egzopeptidaze, i one koje mogu hidrolizirati peptidnu vezu u unutrašnjosti polipeptida – endopeptidaze (slika 2.2).



Slika 2.2. Klasifikacija peptidaza prema supstratnoj specifičnosti. Slika je preuzeta iz publikacije N. D. Rawlings i A. J. Barrett[49] i dorađena.

Sve peptidaze pokazuju specifičnost za određeni aminokiselinski slijed u blizini peptidne veze koju hidroliziraju. Aktivno mjesto, koje je izravno odgovorno za cijepanje peptidne veze, obično se nalazi u kanalu na površini molekule, dok je specifičnost hidrolize diktirana svojstvima veznih podmjesta postavljenih duž žlijeba na jednoj ili obje strane aktivnog mjesta. Prema tome, specifičnost je opisana primjenom modela, kojeg su još 1967. godine predložili Schechter i Berger[50], u kojem je u jedno podmjesto smješten bočni lanac jednog aminokiselinskog ostatka (slika 2.3). Uz već navedenu klasifikaciju peptidaza, pokazalo se korisnim napraviti podjelu na temelju kemijske prirode katalitičkoga mjesta. Tako je

prepoznato šest različitih tipova peptidaza koje su dobile ime po funkcionalnoj grupi u njihovom aktivnom mjestu: serinske (S), treoninske (T), cisteinske (C), aspartatne (A), glutamatne (G) i metalopeptidaze (M).



Slika 2.3. Shematski prikaz vezanja supstrata u aktivno mjesto peptidaze. Aminokiselinski ostaci supstrata smješteni u aktivno mjesto proteina numerirani su od P1 do Pn prema *N*-kraju i od P1' do Pn' prema *C*-kraju supstrata. Položaji u peptidazi koje smještaju aminokiselinske ostatke supstrata su numerirane od aktivnog mjesta sa S1 do Sn prema *N*-kraju i sa S1' do Sn' prema *C*-kraju supstrata. Slika je preuzeta iz publikacije N. D. Rawlings i A. J. Barrett[49] i dorađena.

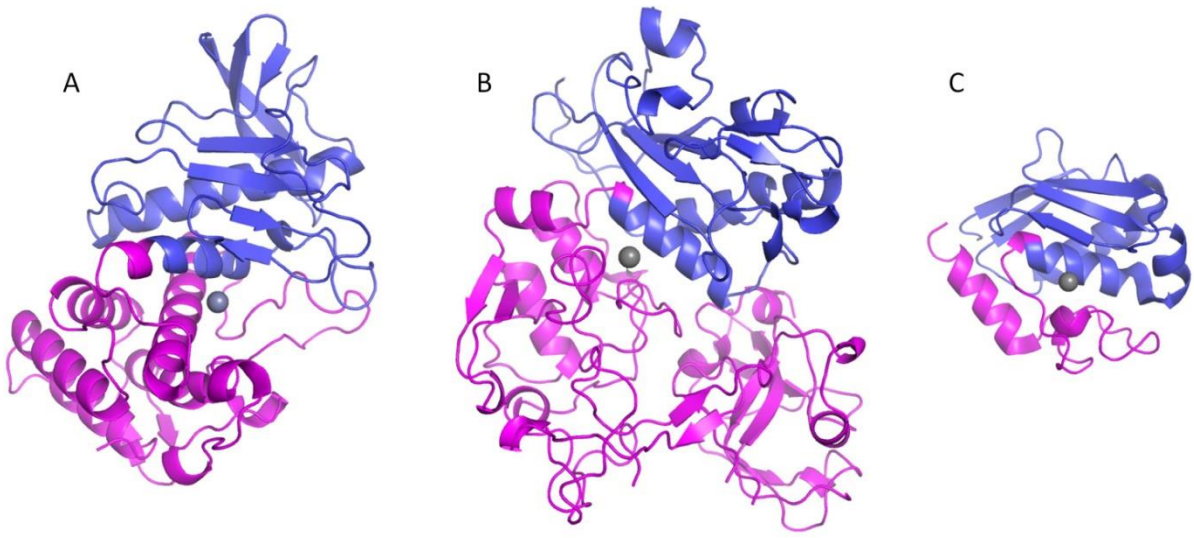
Nedavno je razvijena nova klasifikacija koja se temelji na strukturnim sličnostima peptidaza. Ovakva klasifikacija omogućena je tek nakon što je veliki broj aminokiselinskih sekvenci i trodimenzijskih struktura istražen i postao dostupan u različitim bazama podataka. Sličnosti u strukturama peptidaza odražavaju evolucijsku povezanost i vrlo često funkcionalnu sličnost. Važno je da se ova vrsta klasifikacije može primijeniti na peptidaze kojima je poznata samo primarna struktura, iz koje se mogu predvidjeti svojstava i funkcije enzima u vrlo ranoj fazi ispitivanja. Klasifikaciju su prvi opisali Rawlings i Barrett 1993. godine, ali se stalno razvija sukladno s novim otkrićima[1]. Sadašnji oblik klasifikacije može se pronaći u bazi podataka MEROPS na internetskoj adresi http://merops.sanger.ac.uk/. Prema njoj, peptidaze su podijeljene u porodice i klanove. Svakoj porodici je dodijeljen jednostavan identifikator koji započinje velikim slovom koje označava katalitički tip peptidaza (S, T, C, A, G, M i U; P – označava peptidaze koje mogu biti cisteinske, serinske ili treoninske) nakon čega slijedi sekvencijalno dodijeljen broj – na primjer oznaka M49 označava 49. porodicu metalopeptidaza. Peptidaze su svrstane u jednu porodicu na temelju značajne sličnosti primarne strukture. Iako peptidaze u različitim porodicama nemaju značajnu sličnost u aminokiselinskoj sekvenci, za neke postoje dokazi da dijele zajedničko podrijetlo. To se može pokazati iz sličnih trodimenzijskih struktura ili očuvanih motiva u blizini katalitičkih

aminokiselina. Porodica peptidaza koje prikazuju te udaljene odnose, grupirane su zajedno u klan. Identifikator klana započinje slovom koje označava katalitički tip peptidaza nakon kojeg slijedi sekvencijalno dodijeljeno slovo – na primjer MA označava prvi klan metalopeptidaza. Danas poznajemo 268 porodica peptidaza koje se mogu organizirati u 62 klana (MEROPS)[1].

2.2.2. Metalopeptidaze

Metalopeptidaze su po brojnosti porodica drugi katalitički tip peptidaza, odmah nakon serinskih, i za njih je karakteristično da sadrže atom metala koji je neophodan za njihovu katalitičku aktivnost. U aktivnom mjestu metalopeptidaza smješten je divalentni metalni kation, najčešće cink (Zn^{2+}), a rjeđe kobalt (Co^{2+}), mangan (Mn^{2+}), nikal (Ni^{2+}) ili bakar (Cu^{2+}). Metalopeptidaze se mogu podijeliti u dvije glavne skupine na temelju broja metalnih iona koji su potrebni za katalitičku aktivnost. Prva skupina sadrži samo jedan metalni ion, dok druga sadrži dva i oni djeluju udruženo. Gotovo sve metalopeptidaze s do sada opisanim kokatalitičkim metalnim ionima su egzopeptidaze, dok metalopeptidaze s jednim katalitičkim metalnim ionom mogu biti egzopeptidaze ili endopeptidaze. Aminokiseline čiji ostaci koordiniraju metalni ion najčešće su histidin, asparaginska kiselina, glutaminska kiselina i lizin. Osim aminokiselinskih ostataka koji koordiniraju metalni ion, za katalitičku reakciju je potreban najmanje još jedan aminokiselinski ostatak. Najčešće je to glutaminska kiselina, a u nekim slučajevima može biti i lizin ili arginin[51].

Metalopeptidaze su svrstane u četrnaest klanova od kojih devet pripada prvoj skupini (MA, MC, MD, ME, MJ, MM, MO, MP i MT), a pet drugoj (MF, MG, MH, MN i MQ). Za ovaj doktorski rad važan je prvi klan metalopeptidaza, MA, za koji je karakteristično da enzimi u aktivnom mjestu sadrže ion cinka koordiniran s dva histidinska ostatka iz pentapeptidnog motiva HEXXH. Na drugom mjestu u motivu je uvijek ostatak glutaminske kiseline koji ima katalitičku funkciju. Za nekoliko porodica iz klana MA riješena je barem jedna kristalna struktura proteina – strukturni prototip. Strukturni prototipi svih porodica iz klana MA sadrže dvije strukturne domene s aktivnim mjestom između njih. *N*-terminalna domena je očuvana u svim članovima klana MA, a sadrži HEXXH motiv, α-zavojnice i *β*-nabranu ploču građenu od 6 *β*-vrpci. Građa *C*-terminalne domene varira od vrlo kompleksnih sekundarnih struktura, kao što je u termolizinu i leishmanolizinu, do vrlo jednostavnih kao što je u proteinu snapalizinu (slika 2.4)[51].



Slika 2.4. Primjeri raznolikosti *C*-terminalnih strukturnih domena iz klana peptidaza MA. Termolizin (**A**; PDB kod: 1TLX) i leishmanolizin (**B**; PDB kod: 1LML) su primjeri peptidaza s kompleksnim sekundarnim strukturama u *C*-terminalnoj strukturnoj domeni, dok ista domena u snapalizinu (**C**; PDB kod: 4HX3) sadrži samo jednu α-zavojnicu i kratku petlju. Očuvana *N*-terminalna strukturna domena označena je plavo, a *C*-terminalna purpurnocrveno. Ion cinka prikazan je kao siva kuglica. Slika je pripremljena programom PyMol[52].

S obzirom na treći ligand vezan na ion cinka, klan MA se dalje dijeli u dva podklana. Prvi podklan je *MA(E)*, također poznat kao i „Glu-zincins“ u kojem je treći ligand ostatak glutaminske kiseline udaljene od HEXXH motiva 18 do 72 aminokiseline nizvodno. Obje klase peptidaza, endopeptidaze i egzopeptidaze, pronađene su u podklanu *MA(E)*. Drugi podklan je *MA(M)*, također poznat kao „Met-zincins“ gdje je treći ligand ostatak histidina ili asparaginske kiseline koji se nalaze u proširenom motivu **H**EXX**H**XXGXX**H**(**D**). Očuvni glicin u proširenom motivu je neophodan za *β*-okret (*β-turn*) koji približava sve tri aminokiseline u koordinacijsku sferu cinka[53]. Također, za peptidaze iz ovog podklana je karakterističan očuvani *β*-okret ispod aktivnog mjesta koji sadrži očuvani metioninski ostatak, Met-okret (*Met-turn*)[54]. Podklan *MA(M)* sadrži samo klasu endopeptidaza.

2.3. Dipeptidil-peptidaza III

Enzim dipeptidil-peptidaza III (EC 3.4.14.4) pripada grupi egzopeptidaza, a katalizira odcjepljivanje dipeptida s *N*-terminalnog dijela peptidnog supstrata. Otkrivena je 1967. godine, kao treća u nizu dipeptidil-peptidaza (tablica 2.1), u ekstraktu dobivenom iz prednjeg režnja goveđe hipofize kao enzim koji selektivno hidrolizira Arg-Arg-2-naftilamid[6]. Zbog

afiniteta prema različitim biološki aktivnim peptidima i sintetskim supstratima, kroz povijest se za ovaj enzim u literaturi mogu naći različiti nazivi kao što su: enkafalinaza B, eritrocitna angiotenzinaza, dipeptidi-aminopeptidaza III i dipeptidil-arilamidaza III[55]. Danas je preporučen naziv dipeptidil-peptidaza III, a opće prihvaćena kratica je DPP III.

Tablica 2.1. Dipeptidil-peptidaze i njihove osnovne karakteristike.

Ime proteina	Katalitički tip peptidaze	Lokacija u stanici	Pretpostavljena fiziološka uloga(e)
Dipeptidil-peptidaza I [56]	Cisteinska	Lizosom	Aktivacija serinskih proteaza Imunološki odgovor
Dipeptidil-peptidaza II / Dipepridil-peptidaza VII[57]	Serinska	Lizosom Citoplazmatske vezikule	Hidroliza oligopeptida
Dipeptidil-peptidaza III	Metalopeptidaza	Citoplazma	Opširnije opisano u nastavku teksta
Dipeptidil-peptidaza IV[58]	Serinska	Membrana	Odgovor T-stanica ADA interakcije Degradacija ECM
Dipeptidil-peptidaza V[59]	Serinska	Periplazma	Katabolizam peptida
Dipeptidil-peptidaza VI[60]	Serinska	Citoplazma Jezgra Membrana	Modulacija ekspresije i aktivacije KCND 3
Dipeptidil-peptidaza VIII[61]	Serinska	Citoplazma	Imunološki odgovor
Dipeptidil-peptidaza IX[62]	Serinska	Citoplazma Membrana	Hidroliza dipeptida s proteina
Dipeptidil-peptidaza X[63]	Serinska	Membrana	Nije definirana
Dipeptidil-peptidaza XI[64]	Serinska	Nije definirano	Katabolizam peptida

Do danas DPP III je pročišćena i biokemijski karakterizirana kao citosolni monomerni protein (M_r ~ 80 000, pI kod pH ~ 4,5) iz raznih tkiva sisavaca: ljudske placente[3], eritrocita[4] i leće[5], goveđe hipofize[6], svinjskih mišića[7], štakorskog mozga[8] i jetre[9], te majmunskog[10], zamorčevog[11] i kozjeg[12] mozga. Analizom različitih štakorskih tkiva uočena je široka rasprostranjenost DPP III u nekoliko organa: mozgu, srcu, plućima, jetri, bubrezima,

nadbubrežnoj žlijezdi i u tankom crijevu[9,13]. Osim kod sisavaca, također je izolirana i biokemijski karakterizirana kao membranski protein iz žohara[14] i kao citosolni i membranski protein iz vinske mušice[15]. Pročišćena je i djelomično karakterizirana iz nižih eukariota: plijesni *Dictyostelium discoideum*[16], kvasca[17] (jedini primjer DPP III koji je u otopini smjesa monomera i dimera[65]), gljive grmače[18] i iz biljaka: mahovine, uročnjaka i sjemenki zelenog graha[19,20]. Do 2003. godine smatralo se da je DPP III isključivo eukariotski enzim. Tek nakon što je sekvenciran cijeli genom dviju bakterija, *Bacteroides thetaiotaomicron* i *Porphyromonas gingivalis*, poravnavanjem sekvenci utvrđeno je prisustvo gena koji kodira DPP III u obje bakterije[2]. Nedavno je izolirana i djelomično biokemijski karakterizirana prva prokariotska DPP III iz bakterije *Bacteroides thetaiotaomicron*[21]. Prisustvo DPP III u širokom rasponu organizama i njihovim tkivima naglašava biološko značenje njezine sveprisutne peptidazne aktivnosti.

2.3.1. Biokemijske značajke i fiziološka funkcija DPP III

Prema *MEROPS* bazi podataka, DPP III pripada porodici M49 (porodica DPP III). Svrstana je u zasebnu porodicu zbog jedinstvenog strukturnog heksapeptidnog motiva, HEXXXH, odgovornog za vezanje cinkovog iona i katalitičku aktivnost enzima. Sličan motiv je karakterističan i za druge metalopeptidaze, ali je za jednu aminokiselinu kraći (HEXXH). Fukasawa i suradnici su pokazali na primjeru štakorske DPP III da mutacijom navedenog heksapeptida u pentapeptid, $H^{450}EL\mathbf{L}GH$ u $H^{450}ELGH$, enzim gubi katalitičku aktivnost čime su potvrdili važnost jedinstvenog strukturnog motiva[66]. Kao što je već spomenuto, DPP III je metalopeptidaza i sadrži ion cinka koji je neophodan za katalitičku aktivnost enzima. Atomskom apsorpcijom na nativnoj ljudskoj i rekombinantnoj štakorskoj DPP III, pokazano je da se na jedan mol enzima veže jedan mol cinka[67]. Cinkov ion je tetrakoordiniran s dva histidinska ostatka iz prvog strukturnog motiva (**H**EXXX**H**), ostatkom glutaminske kiseline iz drugog strukturnog motiva (E**E**XR(K)AE(D)) i molekulom vode[30]. Osim dva navedena motiva koja sudjeluju u vezanju cinkovog iona, prepoznajemo još tri očuvana motiva u primarnoj strukturi kojima se pripisuje uloga u selektivnosti i vezanju supstrata[2].

Za ispitivanje aktivnosti enzima DPP III koristi se sintetski supstrat Arg-Arg-2-naftilamid (Arg_2-2NA) pri blago lužnatim uvjetima (pH 8,0-9,0), a pri fiziološkim uvjetima (pH 7,4) DPP III zadržava prema tom supstratu između 45 i 60 % aktivnosti[68]. Osim Arg_2-2NA, testiran je cijeli niz dipeptidil-2-naftilamidnih supstrata od kojih DPP III sporije razgrađuje supstrate Ala-Arg-2NA, Ala-Ala-2NA, Lys-Ala-2NA i Leu-Gly-2NA. Među navedenima,

Ala-Arg-2NA je najbolji supstrat za koji je brzina hidroliza oko 30 % (DPP III iz ljudske placente[3]) ili 69 % (DPP III iz svinjskog mišića[7] i kvasca[17]) brzine razgradnje Arg_2-2NA supstrata. Dipeptidil-2-naftilamidi za koje je pokazano da ih DPP III ne razgrađuje su: Ala-Phe-2NA, Gly-Arg-2NA, Gly-Gly-2NA, Gly-Phe-2NA, Gly-Pro-2NA, His-Ser-2NA, Asp-Arg-2NA, Ser-Tyr-2NA, kao i svi peptidi kojima je blokirana amino skupina[3,7,13,17].

Za razliku od sintetskih supstrata, DPP III ima *in vitro* vrlo široku specifičnost prema oligopeptidima, uzastopno odcjepljujući dipeptide s *N*-kraja mnogih oligopeptida. Tripeptidi nisu dobar supstrat za DPP III. Pokazano je da DPP III iz ljudskih eritrocita sporo hidrolizira samo četiri (Leu-Trp↓Met, Arg-Phe↓Ala, Met-Arg↓Phe i Ala-Ala↓Ala) od sedamnaest testiranih tripeptidnih supstrata[4]. Tetrapeptidi su puno bolji supstrati i dokazana je aktivnost DPP III prema: Ala_4, Lys_4, Phe_4, Val_4, Tyr-Gly↓Gly-Phe, Lys-Lys↓Gly-Glu, Gly-Gly↓Phe-Leu, Met-Arg↓Phe-Ala, His-Phe↓Arg-Trp, Leu-Trp↓Met-Arg, endomorfinu 1 (Tyr-Pro↓Trp-Phe), endomorfinu 2 (Tyr-Pro↓Phe-Phe) i nekim drugima, dok nema hidrolitičke aktivnosti prema Glu4, Gly4, Pro-Leu-Gly-Gly, Tyr-His-Lys-Lys, Thr-Lys-Pro-Arg i Ile-His-Pro-Phe[4,6,11,25]. Neki od primjera oligopeptida koji su supstrati DPP III su: angiotenzin II (Asp-Arg↓Val-Tyr↓Ile-His-Pro-Phe), angiotenzin III (Arg-Val↓Tyr-Ile↓His-Pro-Phe), angiotenzin IV (Val-Tyr↓Ile-His-Pro-Phe), Leu-enkefalin (Tyr-Gly↓Gly-Phe-Leu), Met-enkefalin (Tyr-Gly↓Gly-Phe-Met) i proktolin (Arg-Tyr↓Leu-Pro-Thr)[4,11,14,31]. Oligopeptidi veći od deset aminokiselina (neurotenzin, dinorfini, lanci A i B goveđeg inzulina), polipeptidi i proteini (albumin goveđeg seruma, glukagon, β-lipotropin, proinzulin i aprotinin) nisu supstrati DPP III[4,8]. Ukratko, na temelju dosadašnjih istraživanja supstratne specifičnosti, DPP III je oligopeptidaza koja preferira supstrat od 4 do 8 aminokiselinskih ostataka s prikladnim slijedom aminokiselina.

Kako je već navedeno, DPP III je metalopeptidaza, a sukladno tome inhibiraju je metalni kelatori kao što su 1,10-fenantrolin, EDTA i EGTA[4,13,67]. Disocijacija metalnog iona iz DPP III dovodi do potpunog gubitka aktivnosti koja se može vratiti dijaliziranjem apoenzima s puferom koji sadrži niske koncentracije iona Zn^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+} ili Co^{2+}. Međutim, ioni Zn^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+} u visokoj koncentraciji inhibiraju enzimsku aktivnost[69]. Pokazano je da su ioni Hg^{2+} i Cd^{2+} vrlo potentni inhibitori, a Ca^{2+} i Mg^{2+} nemaju efekta na enzimsku aktivnost[7]. S druge strane, dodatkom Co^{2+} iona u reakcijsku smjesu, koncentracije između 10 i 500 μmol L^{-1}, aktivnost enzima se povećava 2,5 do 11 puta[7,9,13]. Osim metalnih iona, izraziti inhibitorni utjecaj na aktivnost DPP III imaju sulfhidrilni reagensi poput: *para*-hidroksi-

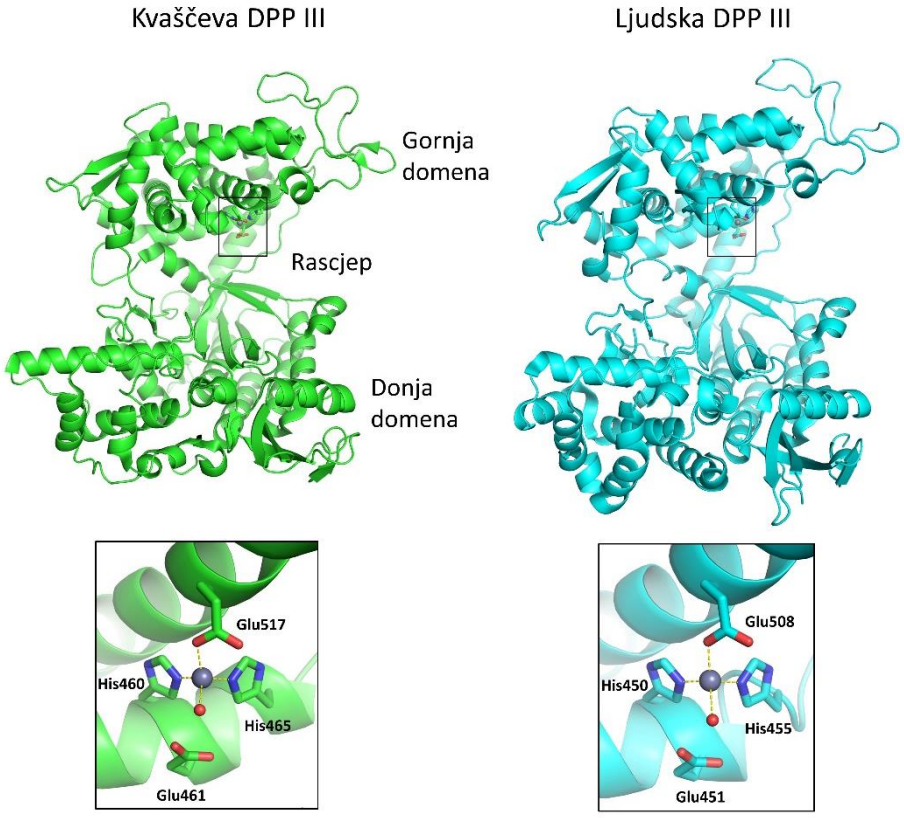
merkuribenzoat (*p*HMB), *para*-kloromerkurifenilsulfat (pCMBS), 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina) (DTNB), *N*-etilmaleimid (NEM) i jodoacetamid[68]. Utjecaj navedenih inhibitora različit je za DPP III iz različitih organizama. Iako DPP III ne sadrži evolucijski očuvane cisteine, sve do danas poznate DPP III sadrže nekoliko cisteinskih ostataka na koje se mogu vezati sulfhidrilni reagensi i tako inhibirati enzimsku aktivnost. Zanimljivo je da DPP III inhibiraju i tiolni spojevi kao što su ditiotreitol (DTT), 2-merkaptoetanol i cistein[7,70], a inhibicija se objašnjava vezanjem tiolne skupine inhibitora na ion cinka[68]. Osim navedenih inhibitora poznati su još peptidni inhibitori kao što su: spinorfin (LVVYPWT) i njegov skraćeni oblik tinorfin (VVYPW)[71], valorfin (VVYPWTQ)[25], hispropfen (His-Pro-Phe-His-Leu-D-Leu-Val-Tyr)[72] i hidroksamska kiselina Tyr-Phe-NHOH[73,74].

Fiziološka funkcija DPP III još uvijek nije potpuno razjašnjena. S obzirom na prisutnost DPP III u različitim tkivima kod sisavaca, kao i široku specifičnost prema oligopeptidima, smatra se da je uključena u završnim koracima proteinske razgradnje u stanici. Osim u katabolizmu proteina, smatra se da je uključena i u obranu od oksidativnog stresa, kao aktivator u signalnom putu Keap1-Nrf2[22,23]. Još jedna od mogućih uloga DPP III je u regulaciji boli, a predložena je s obzirom na visoku koncentraciju enzima u neuronima dorzalnog roga leđne moždine štakora[24] i veliki *in vitro* afinitet prema biološki aktivnim neuropeptidima[25] kao što su enkefalini i endomorfini. Također, zabilježene su patofiziološke uloge DPP III u nastajanju očne mrene (kataraktogeneza)[26], rastu malignog tumora[27] i infekciji virusom influence[28]. Najnovija istraživanja pokazala su da je DPP III član „potpisa" od šest gena koji precizno predviđaju preživljavanje bolesnika s karcinomom dojke[29].

2.3.2. Kristalna struktura DPP III

Prva riješena kristalna struktura DPP III je DPP III iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (PDB kod: 3CSK), a dobivena je iz proteinskog uzorka s točkastom mutacijom C130S[30]. Uvođenjem točkaste mutacije onemogućena je dimerizacija proteina, čime je postignut homogen proteinski uzorak neophodan za kristalizaciju. Rješavanjem kristalne strukture kvaščeve DPP III otkrivena je nova strukturna klasa koja se sastoji od dvije strukturne domene odvojene širokim procjepom (slika 2.5). Dobivena struktura predstavlja strukturni prototip porodice M49 i svrstana je u klan *MA(E)*, jer sadrži sve strukturne motive koji su karakteristični za taj klan metalopeptidaza. Dogovoreno je, da kao gornju domenu definiramo onu domenu koja je građena pretežito od α-zavojnica dok donja domena u središnjem dijelu sadrži dvije paralelne *β*-nabrane ploče, sastavljene od pet *β*-vrpci, okružene α-zavojnicama.

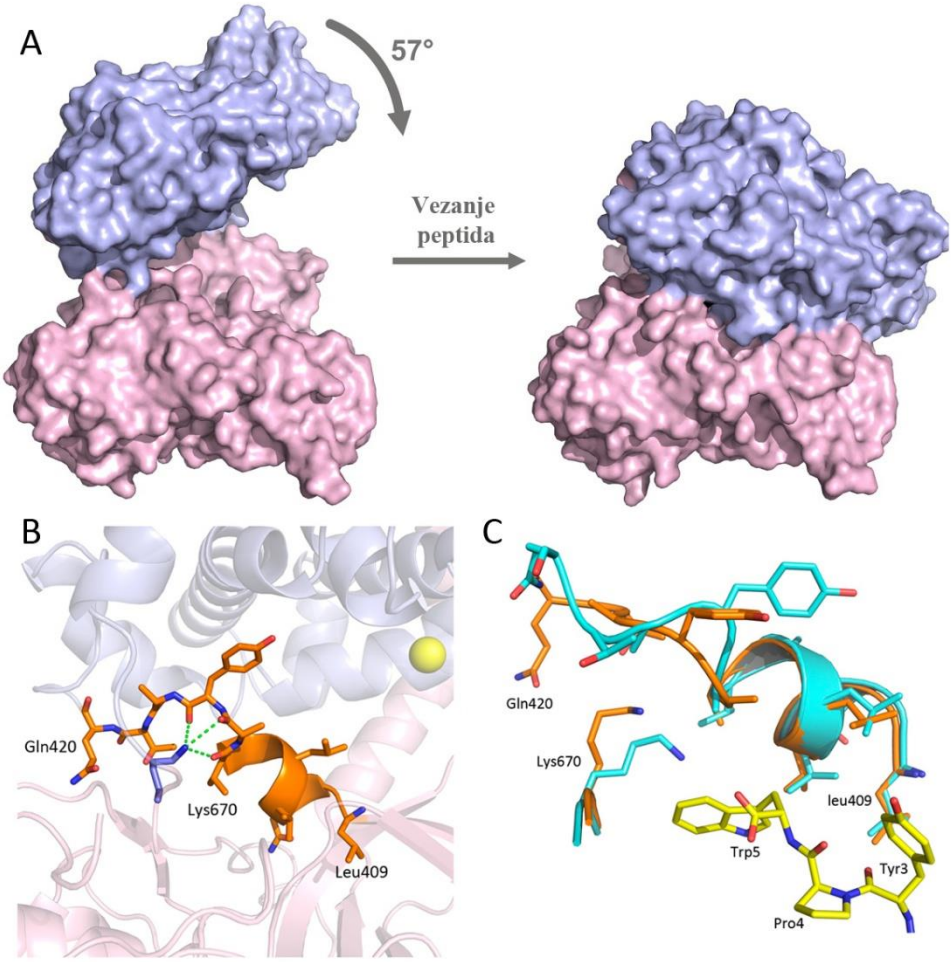
Također, na donjoj strani donje domene nalazi se još jedna *β*-nabrana ploča, građena od pet *β*-vrpci. Katalitički ion cinka smješten je na donjem dijelu gornje domene. Uvidom u 3D-strukturu potvrđena je, na temelju primarne strukture enzima, predložena koordinacija iona cinka (slika 2.5). Osim kvaščeve DPP III, riješena je i struktura ljudske DPP III bez liganda (PDB kod: 3FVY; slika 2.5), te u kompleksu sa šest peptida: angiotenzinom II, Met-enkefalinom, Lue-enkefalinom, endomorfinom 2, tinorfinom i peptidom IVYPW (PDB kodovi: 5E2Q, 5E33, 5E3A, 5EHH, 3T6B i 5E3C)[31,32]. Unatoč niskoj identičnosti primarne strukture ljudske i kvaščeve DPP III (36 %), kristalne su im strukture vrlo slične (RMSD okosnica proteina iznosi 1,38 Å).



Slika 2.5. Kristalna struktura kvaščeve i ljudske DPP III s prikazom koordinacije iona cinka. Koordinacije cinkovih iona prikazane su u sivim kvadratima. Štapićima su prikazane aminokiseline koje koordiniraju cinkove ione i ostatak glutaminske kiseline bitne za enzimsku aktivnost. Sivim kuglicama prikazani su ioni cinka, a crvenim molekule vode. Slika je pripremljena programom PyMol[52] koristeći pohranjene kristalne strukture kvaščeve (PDB kod: 3CSK) i ljudske DPP III (PDB kod: 3FVY).

Na temelju trenutno dostupnih trodimenzionalnih struktura DPP III razlikujemo dvije konformacije proteina: otvorenu i zatvorenu. Otvorena konformacija, opisana ranije, uočena

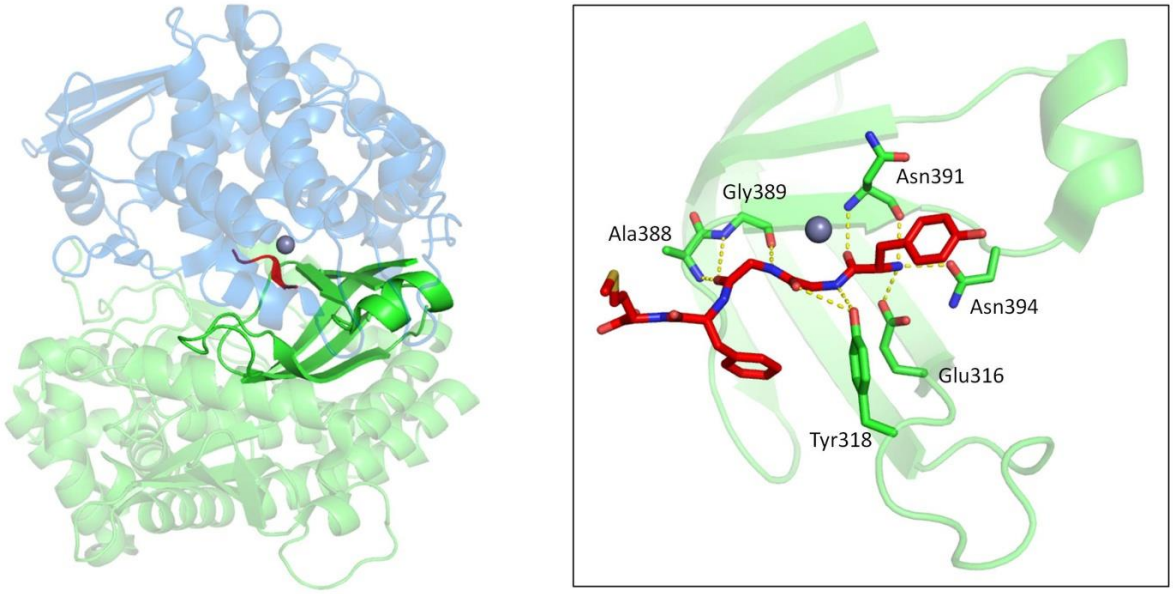
je u strukturama kvaščeve i ljudske DPP III bez vezanog supstrata (slika 2.5). Zatvorena konformacija je prvi put definirana strukturom ljudske DPP III u kompleksu s tinorfinom[31], a kasnije je uočena u svim strukturama ljudske DPP III koje su u kompleksu s peptidom[32]. Naime, vezanjem supstrata dolazi do konformacijske promjene prilikom koje se domene proteina međusobno približe te zatvore procjep među njima, čineći protein više globularnim (slika 2.6A).



Slika 2.6. Konformacijska promjena ljudske DPP III prilikom vezanja peptida. Ružičasto je označena donja domena, a plavo gornja domena proteina. **(A)** Površinski prikaz strukture bez supstrata i strukture u kompleksu sa supstratom. **(B)** Uvećani prikaz zglobne regije obojane narančasto i aminokiselinskog ostatka Lys670 obojanog plavo. Zelenim isprekidanim linijama označeni su polarni kontakti između aminokiselinskog ostatka Lys670 i U-dijela zglobne regije **(C)**. Preklapanje zglobne regije strukture bez supstrata (narančasto) i strukture u kompleksu s tinorfinom (tirkizno). Tinorfin (VVYPW) je prikazan žutom bojom. Slika je preuzeta iz publikacije G. A. Bezerre i suradnika[31] i dorađena.

Ovakva konformacijska promjena se može opisati rotacijom od 57° između dva kruta tijela, gornje i donje domene, sa zanemarivim translacijskim pomakom. Preklapanjem odgovarajućih gornjih i donjih domena u strukturama sa i bez vezanog tinorfina izmjeren je RMSD okosnice proteina između 0,4 i 0,6 Å, što ukazuje na rigidnost domena[31]. Za konformacijsku promjenu odgovorna je zglobna regija (*hinge region*) koja je evolucijski očuvana u DPP III proteinima, posebno na početnom dijelu regije gdje se formira sekundarna struktura[2]. U ljudskoj DPP III zglobna regija definirana je pomoću programa DynDom[75,76] i čine ju aminokiseline od pozicije 409 do 420 (slika 2.6B). *C*-terminalni dio zglobne regije zauzima konformaciju u obliku slova U koja je stabilizirana vodikovim vezama s aminokiselinskim ostatkom Lys670. Prilikom vezanja tinorfina, aminokiselinski ostatak Lys670 se pomiče prema *C*-terminalnom triptofanu u ligandu tinorfinu, što dovodi do konformacijske promjene u zglobnoj regiji (slika 2.6C).

U strukturama DPP III koje su u kompleksu s peptidom, *N*-terminalni dio supstrata nalazi se u ispruženoj konformaciji čija je okosnica povezana antiparalelno vodikovim vezama sa središnjom *β*-nabranom pločom (slika 2.7). Ovaj tip vezanja peptidnog supstrata na protein je vrlo uobičajen i pojavljuje se u cijelom nizu različitih proteina[77]. Amino-skupina peptidnog supstrata u ljudskoj DPP III je usidrena duboko u unutrašnjost proteina i ostvaruje tri polarne interakcije, dvije s aminokiselinskim ostacima Glu316 i Asn394 i jednu s okosnicom aminokiseline Asn391. Navedene tri interakcije objašnjavaju činjenicu da peptidi s modificiranim amino krajem nisu supstrati DPP III[6]. Pretpostavljeno je da se ispravno smještanje supstrata određuje vodikovim vezama ostvarenim sa središnjom *β*-nabranom pločom, tri polarne interakcije koje ostvaruje amino-skupina supstrata i vodikovom vezom s aminokiselinskim ostatkom Tyr318 (slika 2.7)[31]. Ovu pretpostavku podupire činjenica da su četiri navedena aminokiselinska ostatka očuvana u svim DPP III enzimima[2,70] i da je 125 puta manji k_{cat}/K_m u varijanti ljudske DPP III koja sadrži točkastu mutaciju Tyr318→Phe[74].



Slika 2.7. Struktura ljudske DPP III u kompleksu s Met-enkefalinom. Gornja domena označena je plavom bojom, donja zelenom, Met-enkefalin crvenom a ion cinka kao siva kuglica. Lijevo je prikaz cijele DPP III na kojoj je tamnije zeleno istaknuta središnja *β*-nabrana ploča na koju je vezan supstrat kao antiparalelna *β*-vrpca. Desno je uvećani prikaz središnje *β*-nabrane ploče i svih polarnih interakcija (žute isprekidane linije) koje ostvaruje supstrat s proteinom. Slika je pripremljena programom PyMol[52] koristeći koordinate pohranjene kristalne strukture ljudske DPP III (PDB kod: 5E33).

Polarne interakcije koje supstrat ostvaruje s proteinom su gotovo isključivo s aminokiselinskim ostacima donje domene proteina, što rezultira vezanjem supstrata s gornje strane na donju domenu proteina (slika 2.7). Katalitički ion cinka je vezan na gornju domenu gdje je u otvorenoj konformaciji 15 Å udaljen od položaja gdje se veže supstrat. Velika konformacijska promjena je neophodna kako bi se formiralo aktivno mjesto enzima. Iako je promjena konformacije endoterman proces, ukupna promjena Gibbsove energije je negativna zbog entropijskog doprinosa otpuštanja molekula vode iz procjepa koji se zatvori prilikom promjene konformacije[31]. Također, molekulskom dinamikom je pokazano da su otvorena i zatvorena konformacija DPP III u ravnoteži, dok prisustvo liganda pomiče ravnotežu prema zatvorenoj konformaciji[33,78]. Opisana velika fleksibilnost proteina je u skladu sa širokom supstratnom specifičnosti enzima i objašnjava mogućnost vezanja peptida različite duljine i sastava.

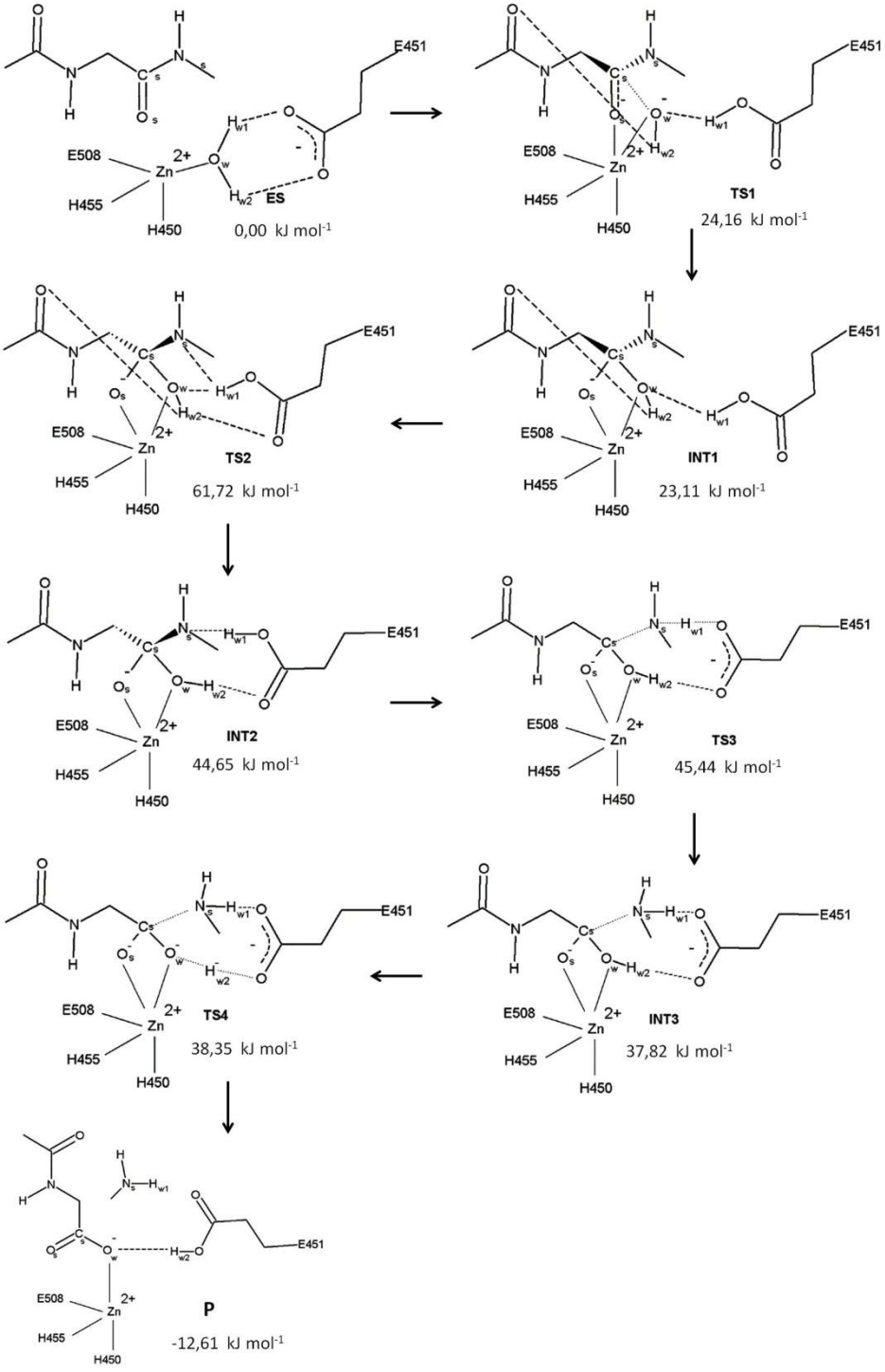
Riješena je jedna kristalna struktura ljudske DPP III u zatvorenoj konformaciji koja ne sadrži supstrat u aktivnom mjestu (PDB kod: 5EGY). S obzirom da su i kvaščeva i ljudska DPP III bez supstrata uvijek kristalizirale u otvorenoj konformaciji, smatra se da je ova struktura dobivena u zatvorenoj konformaciji kao posljedica kristalizacijskog eksperimenta. Naime, prilikom kristalizacije su kao klice za rast kristala korišteni mikrokristali ljudske DPP III u kompleksu sa supstratom što je vjerojatno potaknulo kristalizaciju proteina u zatvorenoj konformaciji[32].

2.3.3. Mehanizam katalize DPP III

Mehanizam katalize DPP III prvi put je predložen nakon što je riješena struktura DPP III iz kvasca. Temelji se na bazičnoj aktivaciji molekule vode koordinirane na cinkov ion nakon čega slijedi nukleofilni napad na peptidnu vezu[30]. Predloženi mehanizam je baziran na kinetičkim podacima kao i rezultatima računalnih simulacija dobivenih za cink-endopeptidazu termolizin[79]. Iako strukture termolizina i DPP III nisu slične i ne pripadaju istoj strukturnoj klasi, koordinacija i okruženje cinkovog iona su im jednake. U termolizinu aminokiselinski ostatak glutaminske kiseline, Glu143, ima funkciju baze koja deprotonira molekulu vode koordiniranu na cinkov ion. Iz strukture kvaščeve DPP III vidljivo je da aminokiselinski ostatak glutaminske kiseline, Glu461, ostvaruje vodikovu vezu s molekulom vode koordiniranom na cinkov ion (slika 2.5) i nalazi se u ekvivalentnom položaju kao i Glu143 u termolizinu, stoga vrlo vjerojatno ima istu ulogu i u katalitičkom mehanizmu. U prilog navedenom mehanizmu idu i rezultati kinetičkih mjerenja na kvaščevoj DPP III kojima je pokazano da mutant E461Q ima 15 000 puta manju aktivnost od divljeg tipa[30]. Također, sličan rezultat je dobiven i sa štakorskom DPP III gdje mutacija odgovarajućeg glutaminskog ostatka, Glu451, u alanin ili asparagin, potpuno inaktivira enzim[66].

Nedavno je objavljen mehanizam hidrolize peptidne veze kataliziran ljudskom DPP III dobiven kvantno-mehaničkim – molekulsko mehaničkim pristupom (slika 2.8)[80]. Polazni minimalni model pripremljen je na temelju optimizirane strukture enzima u kompleksu s tinorfinom (PDB kod: 3FVY). Prvi korak reakcije (slika 2.8; ES→INT1) je usklađeno deprotoniranje molekule vode pomoću aminokiselinskog ostatak Glu451 i nukelofilni napad nastale hidroksilne skupine na karbonilni ugljik peptidne veze C_s. U dobivenom međuproduktu formira se nova kemijska veza između iona cinka i karbonilnog kisika O_s prilikom čega se koordinacija cinkovog iona mijenja iz četiri u pet. Kako bi se formirala dobra izlazeća skupina, dušični atom N_s mora primiti proton od aminokiselinskog ostatka

Glu451. Konfiguracija atoma N_s u prvom međuproduktu (tetraedarski intermedijer, INT1) nije prikladna za prijenos protona s obzirom da je slobodni elektronski par koji bi trebao vezati proton udaljen od aminokiselinskog ostatka Glu451. U sljedećem koraku reakcije (slika 2.8; INT1→INT2) dolazi do prijenosa protona H_{w1} s molekule vode na aminokiselinski ostatak Glu451 kao i inverzije konfiguracije na amidnom dušiku koja omogućuje nastajanje vodikove veze između amidnog dušika N_s i H_{w1}–O_{e1}. Osim prijenosa protona i nastajanja opisane vodikove veze, relaksacija u međuprodukt INT2 popraćena je i reorijentacijom O_w–H_{w2} grupe koja formira novu vodikovu vezu, O_w–H_{w2}···O_{e2}, s aminokiselinskim ostatkom Glu451. U sljedećem koraku (slika 2.8; INT2→INT3) proton H_{w1} prelazi s aminokiselinskog ostatka Glu451 na atom N_s iz izlazeće skupine. Navedeni prijelaz rezultira produljenjem peptidne veze C_s–N_s. U posljednjem koraku (slika 2.8; INT3→P) proton H_{w2} prelazi sa supstratne molekule na aminokiselinski ostatak Glu451 prilikom čega dolazi do pucanja peptidne veze i nastajanja produkta reakcije. S energetskog gledišta, brzina kemijske reakcije određena je s dva uzastopna koraka, nukeofilnim napadom i inverzijom amidne skupine. Također, utvrđeno je da kada sustav prijeđe drugo prijelazno stanje više nema energetskih barijera i sustav ide samo prema nastajanju produkta, onemogućujući povratnu reakciju. Na temelju dobivenih podataka predložena je dvostruka katalitička funkcija enzima DPP III: smanjiti energetsku barijeru hidrolize peptidne veze i onemogućiti povratnu reakciju.



Slika 2.8. Katalitički mehanizam ljudske DPP III. ES označava kompleks enzima sa supstratom, TS1-4 označava prijelazna stanja, INT1-3 označava međuprodukte, a P označava produkt. Ispod svakog koraka navedena je pripadna relativna Gibbsova energija. Vodikove veze su označene kao crtkane linije, a veze koje se formiraju ili pucaju tijekom hidrolize prikazane su kao točkaste linije. Slika je preuzeta iz publikacije A. Tomić i suradnika[80] i dorađena.

2.3.4. DPP III iz bakterije Bacteroides thetaiotaomicron

Objavljen je jedan znanstveni rad i jedan diplomski rad o DPP III iz bakterije *Bacteroides thetaiotaomicron* (*Bt*DPP III), čineći je prvom pročišćenom i biokemijski karakteriziranom DPP III iz prokariotskog organizma[21,81]. *Bt*DPP III prekomjerno je eksprimirana u stanicama bakterije *Escherichia coli* i pročišćena pomoću kromatografije na stupcu hidroksiapatita, gel-filtracijom na Sephacrylu S-200 i anionskom izmjenom brzom tekućinskom kromatografijom proteina. Elektroforetskim metodama određena je molekulska masa od 72 kDa i pI kod pH 4,6. Eksperimentalno je utvrđeno da su optimalni uvjeti hidrolize sintetskog supstrata Arg_2-2NA pri temperaturi od 37°C i pH 8,0. Kao i kod DPP III iz eukariota, dodatkom 50 μmol L^{-1} Co^{2+} iona enzimska aktivnost se povećala 2-3 puta. Od deset testiranih sintetskih dipeptidil-2-naftilamidnih supstrata, *Bt*DPP III je pokazala najveću specifičnu aktivnost prema Arg_2-2NA, a sporije je razgrađivala Phe-Arg-2NA, Lys-Ala-2NA i Ala-Ala-2NA[21].

Za razliku od svih do danas karakteriziranih eukariotskih DPP III, *Bt*DPP III sadrži cisteinski ostatak u očuvanom heksapeptidnom motivu čiji histidinski ostaci vežu cinkov ion, $H^{448}E$**C**LGH. Pretraživanjem sličnih primarnih struktura prema primarnoj strukturi *Bt*DPP III, pronađena je 81 bakterijska sekvenca s velikom vjerojatnošću homologije. Višestrukim poravnavanjem pokazano je da 68 primarnih struktura bakterijskih DPP III sadrže cisteinski ostatak u očuvanom heksapeptidu (HECLGH), u 11 primarnih struktura cisteinski ostatak je zamijenjen valinskim ostatkom (HEVLGH), a homolog iz bakterija *S. usitatus* sadrži HEIIGH motiv. Zanimljivo je da gotovo sve primarne strukture koje ne sadrže cisteinski ostatak u očuvanom motivu potječu iz aerobnih bakterija. Mutacijom navedenog cisteinskog ostatka, Cys450, u serinski ostatak, ne dolazi do velike promjene K_m vrijednosti za supstrat Arg_2-2NA, dok se vrijednost k_{cat} značajno smanjuje što ujedno smanjuje katalitičku efikasnost enzima k_{cat} / K_m (tablica 2.2).

Tablica 2.2. Kinetička analiza divljeg tipa *Bt*DPP III i mutanta C450S uz Arg_2-2NA. Tablica je preuzeta iz publikacije B. Vukelić i suradnika[21] i dorađena.

Enzim	K_m/μmol L^{-1}	k_{cat}/s^{-1}	k_{cat}/K_m /μmol^{-1} L s^{-1}
Divlji tip	2,5 ± 0,9	5,0 ± 2,9	2,0 ± 0,7
C450S	3,5 ± 0,6	0,6 ± 0,1	0,17 ± 0,02

Testirana je aktivnost divljeg tipa i mutanta C450S *Bt*DPP III uz različite inhibitore koji su pokazali inhibicijsko djelovanje na DPP III iz eukariotskih organizama. Pokazano je da je *Bt*DPP III, kao i sve ostale DPP III, vrlo osjetljiva na kelatore metalnih iona kao što su 1,10-fenantrolin i EDTA. Inhibitori serinskih peptidaza fenilmetansulfonil fluorid (PMSF) i 3,4-dikloroizokumarin nisu imali utjecaj na aktivnost *Bt*DPP III, dok isti smanjuju aktivnost ljudske DPP III. Sulfhidrilni reagensi *p*HMB, NEM, DTDP i oksidirani glutation (GSSG) značajno su smanjivali aktivnost divljeg tipa *Bt*DPP III, a nisu utjecali na aktivnost mutanta C450S. Nadalje si dobiveni rezultati pokazali da od pet cisteniskih ostataka koje sadrži *Bt*DPP III, Cys450 je jedini odgovoran za inaktivaciju enzima sulfhidrilnim reagensima. Na primjeru inhibitora *p*HMB pokazano je da je nakon inaktivacije enzima na 7,5 % ukupne aktivnosti, moguće je ponovno reaktivirati enzim dodatkom reduciranog glutationa do 82 % ukupne aktivnosti. Dobiveni rezultati sugeriraju moguću redoks regulaciju enzima *in vivo*.

Nedavno je objavljeno istraživanje u kojem su ispitana tri novosintetizirana hidroksamatna dipeptida: H-Phe-Phe-NHOH, H-Phe-Leu-NHOH i H-Phe-Gly-NHOH[82]. Inhibicijsko djelovanje sintetiziranih spojeva testirano je na ljudskoj i bakterijskoj DPP III, te uspoređeno s inhibicijskim djelovanjem već poznatog kompetitivnog inhibitora ljudske DPP III, H-Tyr-Phe-NHOH[73]. Pokazano je da od navedena četiri spoja, tri imaju vrlo jako inhibicijsko djelovanje na *Bt*DPP III (tablica 2.3).

Tablica 2.3. Inhibicija ljudske i bakterijske DPP III s hidroksamatnim dipeptidima pri pH 7.4*. Tablica je preuzeta iz publikacije A. Cvitešić i suradnika[82].

Inhibitor	Ljudska DPP III K_i / μmol L^{-1}	*Bt*DPP III K_i / μmol L^{-1}
H-Phe-Phe-NHOH	0,028 ± 0,013	0,049 ± 0,006
H-Phe-Leu-NHOH	0,65 ± 0,23	0,075 ± 0,018
H-Phe-Gly-NHOH	4,63 ± 0,58	0,795 ± 0,088
H-Tyr-Phe-NHOH	0,030 ± 0,001	0,062 ± 0,002

* Vrijednosti K_i određene su uz supstrat Arg_2-2NA.

§ 3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Standardne kemikalije: Tris-baza, etidijev bromid, pojedinačne aminokiseline, selenometionin, biotin, tiamin-hidroklorid, D-glukoza monohidrat, natrijev dodecilsulfat (SDS), Tween 80, Akrilamid/bisakrilamid, NaH_2PO_4, Na_2HPO_4, $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4, K_2HPO_4, $MgSO_4$, $CaCl_2$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $ZnCl_2$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $(NH_4)_2MoO_4$, fosfatna kiselina, natrijev acetat, borna kiselina (Sigma-Aldrich); agaroza (Invitrogen); ampicilin, izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG) (Fermentas); N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED), amonijev persulfat (APS), β-naftilamin (Serva); β-merkaptoetanol (GE Healthcare); NaCl, imidazol (Carl Roth); tekući dušik (Messer); agar, Luria-Bertani medij (Difco Laboratories); EDTA, etanol, metanol i octena kiselina (Kemika).

Proteinski i DNA standardi: standardi za duljinu DNA odsječaka - 500 bp DNA Ladder (Invitrogen); otopina proteina poznate molekulske mase za određivanje molekularne mase i izoelektrične točke (GE Healthcare).

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

Kompleti: kompleti za pročišćavanje DNA iz agaroznog gela - NucleoSpin® Extract II kit (Macherey-Nagel) i Plasmid Miniprep Kit (QIAGEN); komplet za izolaciju plazmidne DNA - GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich); komplet za usmjerenu mutagenezu - QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies); kompleti kristalizacijskih otopina - Morpheus, Midas, JCSG+, PGA (Molecular Dimensions), Indeks, PEG/Ion (Hampton Research) i PACT Suite (Qiagen).

Genomska DNA bakterije Bacteroides thetaiotaomicron, soj VPI-5482 (ATCC 29148), dobivena je kao poklon od dr. Jeffrey I. Gordona i dr. Janaki L. Guruge[37].

Početnice: sve početnice su servisno sintetizirane u tvrtci Invitrogen.

Proteini i enzimi: restrikcijski enzimi *Nhe*I, *Xho*I i *Dpn*I, Platinum®*Taq* DNA polimeraza, *PfuUltra* DNA-polimeraza, T4 DNA-ligaza (Invitrogen); lizozim iz bjelanjaka jajeta, DNaza I (Sigma-Aldrich), albumin iz goveđeg seruma (Sigma-Aldrich).

Stanice: *Escherichia coli*, sojevi: TOP10, B834(*DE3*), BL21-CodonPlus(*DE3*)RIL i XL10-Gold® Ultracompetent Cells (Agilent Technologies).

Plazmidni vektor - pET21-b(+) (Darmstadt).

Kolone i punila za kolone: Ni-NTA agaroza (Qiagen); HisTrap™ HP 5 mL, PD-10 (Sephadex G-25), HiPrep 16/600 ili 26/600, Sephacryl S-200 HR, Mono Q 5/50 GL, HiPrep Q FF 16/100 (GE Healthcare).

Derivati peptida: Arg_2-2NA; Ala-Arg-2NA; Phe-Arg-2NA; Tyr-Phe-NHOH (Bachem).

Materijali korišteni u kristalizaciji: okrugla silikonizirana pokrovna stakalca promjera 22 mm, VDX ploče s 24 spremnika, ploče za 3 kapi s 96 pozicija - Swissci, keramičke kuglice - Seed Bead (Hampton Research).

Oprema:

- uređaji za elektroforezu: vodoravna elektroforeza - RunOne™ Electrophoresis Cell (Embi Tec); Mini Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad); PhastSystem (Pharmacia)
- uređaj za vizualizaciju DNA: G:Box (Syngene)
- spektrofotometri: NanoDrop 1000 i NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific); BioSpec nano (Shimatzu); CamSpec M-501 UV/VIS spektrofotometar (Camspec Ltd.); Fluorimetar - Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies); spektropolarimear J-715 (JASCO)
- uređaj za dinamičko raspršenje svjetlosti: Zetasizer Nano ZS (Malvern)
- uređaj za elektroporaciju: Gene Pulser Xcell (Bio-Rad)

- pribor za filtriranje: filtri za injekcije veličine pora 0,22 μm i 0,45 μm (Carl Roth); nitrocelulozne membrane za filtriranje, veličine pora 0,45 μm - Whatman (GE Healtcare)
- centrifugalni sistemi za koncentriranje: Vivaspin II (Sartorius) i Amicon Ultra-15 (Merc Millipore Ltd.)
- uređaji za autoklaviranje: Vapour-Line (VWR)
- termoblok: Eppendorf® Thermomixer® R (Thermo Fisher Scientific)
- uređaj za lančanu reakciju polimerazom (*Polymerase Chain Reaction*, PCR): PCR Applied Biosystem 2700 (Applied Biosystems Inc)
- rotacijske platforme: InnOva 4300 (Marshall scientific) i Shaking incubator (Shel Lab)
- centrifuge: Sorvall RC-5B (Sorvall), Eppendorf Centrifuge 5415 R (Eppendorf)
- ultrazvučni dezintegrator: Labsonic M (B. Braun Biotech International)
- uređaju za ljuljanje VIBROMIX 203 EVT (Tehtnica)
- sustavu za brzu tekućinsku kromatografiju proteina: ÄKTAFPLC (GA Healthcare)
- pumpa korištena za kromatografiju (GE Healthcare)
- vrtložna miješalica (Fisher Scientific)
- vodena kupelj (Köttermann)
- robot za kristalizaciju: Oryx8 (Douglas Instruments)

3.2. Metode rada s mikroorganizmima

3.2.1. Uzgoj bakterijskih kultura

Za uzgoj bakterijskih kultura korištene su tekuće i krute hranjive podloge. Tekući hranjivi medij LB (Luria-Bertani) pripremljena je otapanjem 25 g *Difco* praha (baktotripton γ = 10 g L^{-1}, ekstrakt kvasca γ = 5 g L^{-1} i NaCl γ = 10 g L^{-1} pH 7,0) u 1 L destilirane vode. Sterilizacija podloge postignuta je autoklaviranjem 20 minuta pri 120 °C i 1,5 atm. U svrhu selekcije bakterija s otpornošću na antibiotik ampicilin, u sterilnu tekuću hranjivu podlogu dodan je ampicilin do koncentracije 100 μg mL^{-1} (LB/amp). Otopina antibiotika, koncentracije 100 mg mL^{-1}, priređena je otapanjem ampicilina u mili Q vodi i sterilizacijom kroz filtar veličine pora 0,22 μm. Ovako priređena otopina ampicilina čuva se na -20 °C. Kruta hranjiva podloga LB pripremljena je istim postupkom kao i tekuća, a nakon sterilizacije, u vruću podlogu (~60 °C) je dodan agar do koncentracije 15 g L^{-1} i amipicilin do koncentracije 100 μg mL^{-1}.

Uzgoj bakterija na krutoj hranjivoj podlozi proveden je u Petrijevoj zdjelici nacjepljivanjem bakterija koje su potom razmazane sterilnim štapićem te inkubirane preko noći na 37 °C. Uzgoj u tekućoj hranjivoj podlozi uslijedio je nakon nacjepljivanja pojedinačne bakterijske kolonije s krute hranjive podloge ili iz tekuće bakterijske kulture. Inkubacija se provodila na 37 °C uz miješanje pri 250 rpm na rotacijskoj platformi, a duljina inkubacije ovisila je o svrsi uzgoja bakterija.

3.2.2. Transformacija bakterija plazmidnom DNA

U svrhu transformacije bakterija plazmidnom DNA korištene su dvije metode: transformacija temperaturnim šokom i elektrotransformacija.

Transformacija temperaturnim šokom je provedena s 50 do 100 µL kemijski kompetetnih stanica *E. coli* (sojevi: TOP10, B834(*DE3*) ili XL10-Gold). U stanice je dodano 2 µL plazmidne DNA (ili ligacijske smjese), nakon čega su inkubirane 30 minuta na ledu. Nakon inkubacije, stanice su izložene temperaturnom šoku na 42 °C u trajanju od 2 minute, a potom su relaksirane 1 minutu na ledu. Nakon relaksacije, u stanice je dodano 900 µL tekuće LB podloge i dobivena suspenzija je inkubirana u termobloku 45 do 60 minuta na 37 °C uz miješanje pri 300 rmp. Nakon inkubacije, uslijedilo je centrifugiranje te je uklonjeno približno 800 µL tekuće LB podloge iznad taloga stanica. Talog stanica je ponovno resuspendiran u preostaloj LB podlozi i dobivena suspenzija stanica nacijepljena je u Petrijevu zdjelicu na krutu selektivnu LB/amp podlogu.

Elektrotransformacija stanica je napravljena s 40 µL elektrokompetentnih stanica *E. coli,* soj BL21-CodonPlus(*DE3*)RIL. U stanice je dodano 1-2 µL plazmidne DNA i cijeli sadržaj je prenesen u ohlađenu sterilnu kivetu za elektroporaciju (*Gene Pulser Cuvette* za *E. coli*) s razmakom elektroda od 0,2 cm. Elektroporacija je napravljena na uređaju *Gene Pulser Xcell* uz napon od ~ 2500 V u trajanju od 5 milisekundi. Nakon elektroporacije u kivetu je dodan 1 mL tekuće LB podloge i cijeli sadržaj je prebačen u sterilnu epruvetu. Dobivena suspenzija je potom inkubirana u termobloku 45 do 60 minuta na 37 °C uz miješanje pri 300 rpm. Nakon inkubacije, 300 do 500 µL suspenzije stanica je nacijepljeno u Petrijevu zdjelicu na krutu selektivnu LB/amp podlogu.

3.3. Metode rada s DNA

3.3.1. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

Agarozni gel (γ = 10 g L^{-1}) pripremljen je otapanjem 1 g agaroze u TBE puferu (89 mmol L^{-1} Tris, 89 mmol L^{-1} borna kiselina i 2 mmol L^{-1} EDTA, pH 8,0) zagrijavanjem do vrenja u mikrovalnoj pećnici. Dobivena otopina je ohlađena na približno 60 °C i izlivena u kalup za gel u koji je zatim postavljen češalj za formiranje jažica. Hlađenjem na sobnoj temperaturi u trajanju od 30-45 minuta tekuća otopina prelazi u gel, i nastali gel je stavljen u uređaj za vodoravnu elektroforezu, te nadslojen TBE puferom. Uzorci su pomiješani s 1/6 ili 1/2 volumena boje (6x ili 2x *Loading Dye*) zbog lakšega praćenja tijeka elektroforeze. Osim uzoraka, na gel su naneseni DNA standardi pomoću kojih je procijenjena veličina uzoraka DNA. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu provođena je 30 minuta uz napon od 100 V. Nakon završetka elektroforeze, gel je uronjen u otopinu etidijevog bromida koncentracije 0,5 μg mL^{-1} oko 10 minuta. Suvišak etidijevog bromida je uklonjen uranjanjem gela u vodu u trajanju od oko 10 minuta. Etidij bromid se snažno veže na nukleinske kiseline, a njegovo svojstvo da fluorescira nakon što je obasjan ultraljubičastim svjetlom omogućava vizualizaciju uzoraka DNA na gelu. Vizualizacija je postignuta pomoću uređaja za snimanje gelova pod UV svjetlom valne duljine 302 nm.

U svrhu izolacije i pročišćavanja DNA odsječaka i plazmidne DNA napravljena je preparativna elektroforeza. Gel i uzorci za preparativnu elektroforezu pripremljeni su istim postupkom kao i za elektroforezu DNA u agaroznom gelu, osim što je korišten veći češalj koji formira jažice većeg volumena. Elektroforeza je provođena 50 minuta uz niži napon, 50 V, što rezultira boljim razdvajanjem uzorka. Nakon elektroforeze, uzorci DNA su izrezani iz gela pomoću sterilnog skalpela pod UV svjetlom. DNA je izolirana iz gela pomoću kompleta za pročišćavanje DNA iz agaroznog gela prema uputama proizvođača. Koncentracija izoliranih produkata DNA određena je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri λ = 260 nm.

3.3.2. Kloniranje gena za DPP III iz bakterije Bacteroides thetaiotaomicron *u plazmidni vektor pET-21b(+)*

3.3.2.1. Umnažanje gena koji kodira enzim Bt*DPP III*

Gen BT_1846 koji kodira protein DPP III, umnožen je lančanom reakcijom polimeraze (PCR) koristeći kao kalup genomsku DNA iz soja VPI-5482 (ATCC 29148) bakterije *Bacteroides thetaiotaomicron*. U svrhu umnažanja gena BT_1846 kreirane su početnice koje sadrže slijed

za cijepanje restrikcijskim enzimima *Nhe*I i *Xho*I (tablica 3.1). Početnice su otopljene u sterilnoj mili Q vodi do koncentracije 100 pmol μL^{-1} i pohranjene na -20 °C do upotrebe.

Tablica 3.1. Početnice DPP III-*Nhe*I i DPP III-*Xho*I. Crveno su označeni slijedovi baza koje prepoznaju restrikcijski enzimi.

Početnica	Nukleotidni slijed početnica
DPP III-*Nhe*I	5′-GCACTAGCTAGCATGGCAGTTACCGCTACGATCC-3′
DPP III-*Xho*I	5′-CCGGCTCGAGCTATTAATTATTTACGGAAGGCAACGGAGAA-3′

Umnažanje gena BT_1846 napravljeno je korištenjem Platinum *Taq* DNA polimeraze na uređaju *PCR Applied Biosystem*. Sastav reakcijske smjese i tijek reakcije su navedeni u tablicama 3.2. i 3.3. Dobiveni produkt reakcije je pročišćen preparativnom elektroforezom i izoliran iz gela prema prethodno opisanom postupku.

Tablica 3.2. Sastav reakcijske smjese za umnažanje DNA.

Sastav otopine	Radna koncentracija	*V* / μL
Mili Q voda		61
PCR pufer	10x	10
$MgCl_2$	50 mmol μL^{-1}	3
Genomska DNA	25 ng μL^{-1}	1
Početnica DPP III-*Nhe*I[a]	10 pmol μL^{-1}	8
Početnica DPP III-*Xho*I[a]	10 pmol μL^{-1}	8
Smjesa dNTP	2,5 mmol L^{-1}	8
Platinum Tag DNA polimeraza[b]	5 j μL^{-1}	1
Σ		100

[a] radne otopine početnica pripremljene su razrjeđivanjem otopine početnica sterilnom mili Q vodom.
[b] jedna jedinica (j) polimeraze definirana je kao količina enzima koja će ugraditi 10 nmol dNTP u 30 minuta na 74 °C.

Tablica 3.3. Tijek lančane reakcije polimerazom za umnažanje DNA.

Stupanj reakcije	Broj ciklusa	*T* / °C	*t* / s
Denaturacija kalupa	1	94	150
Denaturacija	29	94	30
Sparivanje početnica i kalupa	29	60	60
Produljivanje lanca DNA	29	72	150
Završno produljivanje lanca DNA	1	72	420

3.3.2.2. Umnažanje i izolacija plazmidnog vektora pET-21b(+)

Plazmidni vektor pET-21b(+) umnožen je u ultra-kompetentnim stanicama bakterije *E. coli*, soj XL10-Gold. U 20 µL suspenzije stanica dodan je 1 µL *β*-merkaptoetanola nakon čega su inkubirane na ledu 10 minuta uz povremeno miješanje. Zatim je dodan 1 µL plazmidnog vektora pET21-b(+) i stanice su ponovno inkubirane 30 minuta na ledu. Nakon inkubacije napravljena je transformacija stanica temperaturnim šokom po prethodno opisanom postupku. Transformirane stanice su nacijepljene na krutu LB/amp podlogu u Petrijevoj zdjelici i inkubirane preko noći na 37 °C. Sljedeći dan, 10 mL LB/amp tekuće podloge nacijepljeno je s jednom bakterijskom kolonijom s krute LB/amp podloge. Takva suspenzija inkubirana je preko noći na 37 °C uz miješanje pri 250 rpm. Sljedeći dan, plazmidni vektor je izoliran pomoću kompleta za izolaciju plazmidne DNA prema uputama proizvođača s iznimkom u zadnjem koraku – elucija plazmidne DNA nije napravljena s predviđenim puferom već je eluirana s mili Q vodom zbog lakše obrade s restrikcijskim endonukleazama. Uspješnost izolacije provjerena je elektroforezom u agaroznom gelu. Pročišćen plazmidni vektor pohranjen je na -20 °C do upotrebe.

3.3.2.3. Razgradnja DNA restrikcijskim endonukleazama

Za razgradnju DNA korištene su dvije endonukleaze, *Nhe*I i *Xho*I, koje prepoznaju specifične nukleotidne slijedove dvolančane DNA molekule i zatim cijepaju na mjestima kako je navedeno:

*Nhe*I 5'…G↓CT AGC…3' *Xho*I 5'…C↓TC GAG…3'
3'…CGA TC↑G…5' 3'…GAG CT↑C…5'

Plazmidni vektor pET-21b(+) prvo je obrađen restrikcijskim enzimom *Xho*I u reakcijskoj smjesi ukupnog volumena 100 µL sljedećeg sastava: 86 µL plazmidnog vektora, 10 µL 10x pufera za razgradnju (0,5 mol L^{-1} Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mol L^{-1} NaCl i 0,1 mol L^{-1} $MgCl_2$),

4 μL restrikcijskog enzima *Xho*I. Reakcijska smjesa je inkubirana na 37 °C preko noći, a uspješnost digestije je provjerena elektroforezom u agaroznom gelu. Dobiveni produkt pročišćen je preparativnom elektroforezom i izoliran iz gela prema prethodno opisanom postupku. Izolirani plazmid podvrgnut je obradi s restrikcijskim enzimom *Nhe*I u reakcijskoj smjesi ukupnog volumena 100 μL koja sadrži: 36 μL plazmidnog vektora, 10 μL 10x pufera za razgradnju, 4 μL restrikcijskog enzima *Nhe*I i 50 μL sterilne mili Q vode. Reakcijska smjesa je inkubirana na 37 °C preko noći, a uspješnost digestije je provjerena elektroforezom u agaroznom gelu. Dobiveni produkt je ponovno pročišćen preparativnom elektroforezom i izoliran iz gela. Obrađeni i pročišćeni plazmidni vektor pohranjen je na -20 °C.

Istim postupkom je obrađen i odsječak DNA koji sadrži gen za DPP III dobiven postupkom opisanim u poglavlju 3.3.2.1.

3.3.2.4. Ligacija plazmidnog vektora pET-21b(+) i odsječka DNA

Spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije pri λ = 260 nm, je određena koncentracija plazmidnog vektora pET-21b(+) i odsječka DNA koji sadrži gen za DPP III. Omjer množine slobodnih krajeva plazmidnog vektora i odsječka DNA u reakcijskoj smjesi za ligaciju mora biti 1:3. Množina slobodnih krajeva izračunata je prema sljedećoj jednadžbi:

$$n(slobodnih\ krajeva) = \frac{2m(DNA)}{N(parova\ baza) \cdot 660 \cdot\ g\ mol^{-1}}$$

Reakcijska smjesa (tablica 3.4) je inkubirana na sobnoj temperaturi 4 sata i 20 minuta te preko noći na 4 °C. Ligacijska smjesa je pohranjena na -20 °C do daljnje upotrebe.

Tablica 3.4. Sastav reakcijskih smjesa za ligaciju.

	Konačna količina	V / μL
5 x reakcijski pufer[a]		4
Odsječak DNA	90 fmol	9
Plazmidni vektor	29 fmol	2
T4 DNA ligaza[b]	1 j μL^{-1}	1
Sterilna mili Q voda		4
Σ		20

[a] Sastav reakcijskog pufera: 250 mM Tris-HCl (pH 7,6), 50 mM $MgCl_2$, 5 mM ATP, 5 mM DTT i 25 % w/v PEG 8000.
[b] jedna jedinica (j) ligaze definirana je kao količina enzima koja katalizira izmjenu 1 nmol ^{32}PPi u [γ/β-^{32}P]ATP u 20 minuta na 37 °C.

3.3.2.5. Umnažanje i izolacija plazimda pET-21b(DPP III-His_6)

Bakterijske stanice XL10-Gold transformirane su temperaturnim šokom s ligacijskom smjesom. Sljedeći dan, s krute LB/amp podloge odabrano je osam bakterijskih kolonija. Svaka kolonija je sterilnim nastavkom prenesena u 20 µL sterilne mili Q vode i resuspendirana. Dio suspenzije nacijepljen je na krutu LB/amp podlogu i inkubiran na 37 °C preko noći. Ostatak suspenzije je inkubiran 10 minuta na 95 °C nakon čega je centrifugirana 5 minuta pri 11 700 *g*. Supernatant (2 µL) je korišten kao DNA predložak za PCR. Reakcijska smjesa i metoda za PCR je ista kao što je opisano u poglavlju 3.3.2.1. (tablice 3.2. i 3.3). Produkti reakcije vizualizirani su elektroforezom u agaroznom gelu.

Bakterijske kolonije kojima je opisanom metodom potvrđeno da sadrže plazmid pET-21b(DPP III-His_6), nacijepljene su u 5 mL LB/amp tekuće podloge i inkubirane su na 37 °C pri 250 rpm preko noći. Iz dobivenih bakterijskih kultura, plazmid je izoliran pomoću kompleta za izolaciju plazmidne DNA prema uputama proizvođača s iznimkom u zadnjem koraku – plazmidna DNA eluirana je s mili Q vodom, a ne sa za to predviđenim puferom. Uspješnost izolacija plazmida analizirana je elektroforezom u agaroznom gelu. Uzorci izoliranih plazmida predani su na servis za sekvenciranje Instituta Ruđer Bošković.

3.3.3. Ciljana mutageneza kloniranog gena za DPP III

Ciljana mutageneza provedena je koristeći komplet *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* prema uputama proizvođača. Početnice koje sadrže željenu mutaciju (tablica 3.5) su otopljene u sterilnoj mili Q vodi do koncentracije 1 µg μL^{-1} i pohranjene na -20 °C do upotrebe. Sastav reakcijske smjese i tijek lančane reakcije polimerazom navedeni su u tablicama 3.6. i 3.7.

Tablica 3.5. Nukleotidni slijed početnica za provođenje ciljane mutageneze. Crvenim slovima su prikazani kodoni mutiranog aminokiselinskog ostatka.

Točkasta mutacija	Nukleotidni slijed početnica
E449A	5'-CTT CAT ACA GAC TTA CAT GCA TGT CTG GGA CAT GGT TCG-3' 5'-CGA ACC ATG TCC CAG ACA TGC ATG TAA GTC TGT ATG AAG-3'
C11S	5'-GCT ACG ATC CTT GCA TCC TCT GGT GGG GCC AAA ACA AC-3' 5'-GT TGT TTT GGC CCC ACC AGA GGA TGC AAG GAT CGT AGC-3'
C158S	5'-CAG ACT GCC GAA CAA CTC TCT GAT GAG CTC TTC CCG G-3' 5'-C CGG GAA GAG CTC ATC AGA GAG TTG TTC GGC AGT CTG-3'
C189S	5'-C TTG GTG CTG ACT TCT GCC TCC AAT TAT TAC GAC GGA G-3' 5'-C TCC GTC GTA ATA ATT GGA GGC AGA AGT CAG CAC CAA G-3'
C425S	5'-GGA TTC AAT GAA GAG TTT GTC TCC AAT GAC GAA GAG AGA CAG-3' 5'-CTG TCT CTC TTC GTC ATT GGA GAC AAA CTC TTC ATT GAA TCC-3'
C450S	5'-CA GAC TTA CAT GAA AGC CTG GGA CAT GGT TCG G-3' 5'-C CGA ACC ATG TCC CAG GCT TTC ATG TAA GTC TG-3'

Tablica 3.6. Sastav reakcijske smjese za uvođenje usmjerene mutageneze.

Sastav otopine	Radna koncentracija	*V* / μL
PCR pufer	10x	5
Plazmid pET-21(DPP III-His_6)	10 ng μL^{-1}	1
Početnica I[a]	125 ng μL^{-1}	1,25
Početnica II[a]	125 ng μL^{-1}	1,25
Smjesa dNTP	10 mmol L^{-1}	1
PfuUltra DNA polimeraza[b]	2,5 j μL^{-1}	1
Quick solution		3
Mili Q voda		36,5
Σ		50

[a] radne otopine početnica pripremljene su razrjeđivanjem otopine početnica sterilnom mili Q vodom.
[b] jedna jedinica (j) polimeraze definirana je kao količina enzima koja će ugraditi 10 nmol dNTP u 30 minuta na 74 °C.

Tablica 3.7. Tijek lančane reakcije polimerazom za provođenje usmjerene mutageneze.

Stupanj reakcije	Broj ciklusa	T / °C	t / s
Prva denaturacija plazmida	1	95	60
Denaturacija plazmida	18	95	50
Sparivanje početnica i plazmida	18	60	50
Produljivanje lanca DNA	18	68	480
Završno produljivanje lanca DNA	1	68	420

Nakon završetka reakcije produkti su tretirani restrikcijskom endonukleazom *Dpn*I. Prema uputama proizvođača u reakcijsku smjesu je dodan 1 μL enzima *Dpn*I (10 j μL^{-1}) koja je potom inkubirana na 37 °C dva sata. Enzim *Dpn*I prepoznaje potpuno ili djelomično metilirane slijedove DNA i zatim ih cijepa na mjestima kako je navedeno:

5'…GA^{m6}↓TC…3'

3'…CT↑^{m6}AG…5'

Metilacija DNA je proces koji se isključivo odvija *in vivo* tako da produkti PCR reakcije nisu metilirani i enzim *Dpn*I ih ne razgrađuje. Umnažanje i izolacija plazmida provedena je isto kao što je opisano u poglavlju 3.3.2.2, ali za transformaciju XL10-Gold stanica korišteno je 2 μL PCR smjese tretirane enzimom *Dpn*I. Za potvrdu uvođenja ciljane mutacije izolirani plazmidi su predani na servis za sekvenciranje Instituta Ruđer Bošković.

3.4. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje DPP III

3.4.1. Prekomjerna ekspresija DPP III

Prekomjerna ekspresija DPP III napravljena je u elektrokompetentnim bakterijama *E. coli*, soj BL21-CodonPlus(*DE3*)RIL. Transformacija bakterija s plazmidom pET21-b(+) koji sadrži gen za DPP III provedena je elektrotransformacijom kao što je opisano u poglavlju 3.2.2. S jednom bakterijskom kolonijom s krute LB podloge nacijepljeno je 10-100 mL LB/amp tekuće podloge, ovisno o konačnom volumenu uzgoja, koja je potom inkubirana preko noći na 37 °C pri 250 rpm. Idući dan, LB/amp podloga je nacijepljena s prekonoćnom kulturom u omjeru 1:50 te je inkubirana na 37 °C pri 250 rpm. Rast bakterija praćen je spektrofotometrijski mjerenjem turbiditeta pri λ = 600 nm. Nakon što turbiditet dosegne vrijednost između 0,6 i 0,8, započeta je prekomjerna ekspresija dodavanjem IPTG-a do koncentracije 0,5 mmol L^{-1}. Ekspresija traje 4 sata pri istim uvjetima kao i rast bakterija.

Nakon završetka ekspresije, kultura stanica je centrifugirana 20 minuta na 5860 *g* pri 4 °C. Talog stanica je pohranjen na -20 °C.

U svrhu pripreme proteina s ugrađenim selenometioninom umjesto metionina, korištene su kemijski kompetentne bakterije *E. coli* soj B834(DE3). Bakterije su transformirane temperaturnim šokom s plazmidom pET21-b(+) koji sadrži gen za DPP III u kojoj su svi cisteinski ostaci zamijenjeni serinskim (Cys-null DPP III). Za uzgoj stanica korišten je tekući hranjivi medij MM (*minimal media*) koja je pripremljena prema prilagođenom protokolu iz publikacije N. Budiše i suradnika[83]. Sve komponente podloge MM su pojedinačno otopljene u destiliranoj vodi. Otopine ampicilina, biotina i tiamina su sterilizirane kroz filtar veličine pora 0,22 μm dok su ostale komponente sterilizirane autoklaviranjem 20 minuta pri 120 °C i 1,5 atm. Nakon sterilizacije sve komponente su pomiješane i razrijeđene do željenog volumena (tablica 3.8). Uzgoj bakterija u podlozi MM napravljen je nacjepljivanjem bakterija iz prekonoćne bakterijske kulture te inkubacijom na 37 °C uz miješanje pri 150 rpm. Inkubacija je završena nakon što se turbiditet mjeren pri λ = 600 nm više ne mijenja (8-10 sati), to jest kada se potroši sav metionin iz podloge MM i bakterije se prestanu dijeliti. Tada je inducirana prekomjerna ekspresija dodavanjem IPTG-a do koncentracije 0,5 mmol L^{-1} i selenometionina do koncentracije 0,125 mmol L^{-1}. Ekspresija traje 3 sata pri istim uvjetima kao i rast bakterija. Nakon završetka ekspresije, kultura stanica je centrifugirana 20 minuta na 5860 *g* pri 4 °C. Talog stanica je pohranjen na -20 °C.

Prije i nakon svih prekomjernih ekspresija uzeti su alikvoti od 200 μL bakterijskih kultura koji su potom centrifugirani 5 minuta na 5000 *g* pri 4 °C. Dobiveni talozi bakterijskih stanica su spremljeni na -20 °C za daljnju analizu ekspresije proteina elektroforezom u 12,5 % poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima.

Tablica 3.8. Sastav hranjive podloge MM.

Komponente hranjive podloge	Konačna koncentracija
$(NH_4)_2SO_4$	7,5 mmol L^{-1}
NaCl	8,5 mmol L^{-1}
KH_2PO_4	22 mmol L^{-1}
K_2HPO_4	50 mmol L^{-1}
Mg^{2+} ($MgSO_4$)	1 mmol L^{-1}
D-glukoza monohidrat	20 mmol L^{-1}
Aminokiseline[a]	50 mg L^{-1}
Ca^{2+} ($CaCl_2$)	1 μg mL^{-1}
Fe^{2+} ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	1 μg mL^{-1}
Cu^{2+} ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0,01 μg mL^{-1}
Zn^{2+} ($ZnCl_2$)	0,01 μg mL^{-1}
Mn^{2+} ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,01 μg mL^{-1}
Mo^{6+} ($(NH_4)_2MoO_4$)	0,01 μg mL^{-1}
Tiamin hidroklorid	10 μg mL^{-1}
Biotin[b]	10 μg mL^{-1}
Ampicilin	100 μg mL^{-1}
Metionin	40 μmol L^{-1}

[a] sve aminokiseline osim metionina otopljene su u vodenoj otopini kojoj je podešen pH iznad 10 zbog lakšeg otapanja.
[b] zbog lakšeg otapanja dodana je jedna kap koncentrirane otopine NaOH.

3.4.2. Liza bakterijskih stanica

Talog stanica je postepeno odmrznut na ledu i resuspendiran u puferu za lizu, 5 mL pufera na 1 g staničnog taloga, sastava: 50 mmol L^{-1} NaH_2PO_4, 300 mmol L^{-1} NaCl, 10 mmol L^{-1} imidazol, pH 8,0. U suspenziju stanica dodan je lizozim do koncentracije 100 μg mL^{-1} i ona je potom inkubirana 30 minuta na ledu uz povremeno miješanje. Nakon obrade s lizozimom, suspenzija stanica je obrađena ultrazvučnim dezintegratorom sa sondom promjera 3 mm u 6 ciklusa. Jedan ciklus se sastoji od obrade suspenzije stanica u trajanju od 30 sekundi i pauze od 60 sekundi. Suspenzija stanica je tijekom cijelog postupka držana na ledu. U dobivenu suspenziju je dodana DNaza I do konačne koncentracije 10 μg mL^{-1}, nakon čega je inkubirana na sobnoj temperaturi uz ljuljanje pri 600 rpm na uređaju za ljuljanje. Ovako obrađen stanični

lizat je centrifugiran 45 min na 14 500 *g* pri 4 °C, a dobiveni supernatant je filtriran kroz filtar veličine pora 0,45 μm i čuvan na ledu ili 4 °C do pročišćavanja proteina.

Prije centrifugiranja uzet je alikvot od 100 μL staničnog lizata koji je zasebno centrifugiran u istim uvjetima kao i ostatak staničnog lizata. Nadtalog je uklonjen, a talog je resuspendiran u 100 μL sterilne mili Q vode. Nadtalog i resuspendirani talog su korišteni za analizu topljivosti proteina elektroforezom u 12,5 % poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima.

3.4.3. Kromatografske metode

Proteinski uzorak koji je bio korišten u kristalizacijskim eksperimentima pročišćen je u dva koraka korištenjem dvije kromatografske metode: afinitetne kromatografije i gel-filtracije. Kromatografija na ionskom izmjenjivaču je korištena tijekom analize proteina u svrhu razdvajanja različito nabijenih proteinskih formi. Uspješnost pročišćavanja proteina, nakon svake kromatografske metode, provjerena je elektroforezom u poliakrilamidnom gelu pri denaturirajućim uvjetima i određivanjem enzimske aktivnosti standardnim testom. Proteinske otopine su po potrebi ugušćivane u centrifugalnim sistemima za koncentriranje *Vivaspin II* i *Amicon Ultra-15* s gornjom granicom prolaska molekula 10 000 Da. Ugušćivanje je provedeno prema uputama proizvođača na 4 °C.

Puferi korišteni za pročišćavanja proteina su filtrirani kroz filtar veličine pora 0,45 μm i odzračeni u vakuumu.

3.4.3.1. Afinitetna kromatografija

Kloniranjem DPP III u vektor pET-21b(+) na opisani način omogućena je ekspresija rekombinantnog proteina s privjeskom od šest histidina na *C*-kraju proteina. S obzirom da protein sadrži histidinski privjesak, u prvom koraku pročišćavanja korištena je afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozi.

Pročišćavanje proteina iz malih volumena staničnog lizata provedeno je na koloni promjera 9 mm prethodno napunjenoj s Ni-NTA agarozom do ukupnog volumena nosača između 1 i 5 mL, ovisno o volumenu staničnog lizata. Kapacitet vezanja proteina DPP III na Ni-NTA nosač iznosi 15-20 mg proteina po mL nosača. Prije nanošenja staničnog lizata, kolona je isprana s destiliranom vodom i uravnotežena puferom za lizu sastava: 50 mmol L^{-1} NaH_2PO_4, 300 mmol L^{-1} NaCl, 10 mmol L^{-1} imidazol, pH 8,0. Nakon nanošenja staničnog lizata, kolona je isprana s 5 volumena stupca s puferom za ispiranje sastava: 50 mmol L^{-1} NaH_2PO_4, 300 mmol L^{-1} NaCl, 20 mmol L^{-1} imidazol, pH 8,0. Protein je ispran s kolone s

puferom za eluciju sastava: 50 mmol L^{-1} NaH_2PO_4, 300 mmol L^{-1} NaCl, 300 mmol L^{-1} imidazol, pH 8,0. Pročišćavanje je napravljeno uz pomoć pumpe s konstantnim protokom 0,5 mL min^{-1} na sobnoj temperaturi, dok su frakcije sakupljane u epruvete ohlađene na ledu.

Pročišćavanje proteina iz velikog volumena staničnog lizata provedeno je na sustavu za brzu tekućinsku kromatografiju proteina (*Fast Protein Liquid Chromatography*, FPLC), s tvornički napunjenom kolonom od 5 mL (His-Trap™ HP). Prije nanošenja staničnog lizata, kolona je isprana s destiliranom vodom i uravnotežena s puferom za lizu. Nakon nanošenja staničnog lizata, kolona je isprana s 25 mL pufera za ispiranje. Protein je eluiran s kolone linearnim gradijentom imidazola koncentracije 20 do 500 mmol L^{-1} u 50 mmol L^{-1} NaH_2PO_4 i 300 mmol L^{-1} NaCl puferu pH 8,0. Pročišćavanje je provedeno na 8 °C s konstantnim protokom 1 mL min^{-1}, a tijek pročišćavanja praćen je UV detektorom pri valnoj duljini 280 nm. Dobivene proteinske frakcije su spojene i ugušćene do volumena koji je bio definiran idućim korakom pročišćavanja, gel-filtracijom.

3.4.3.2. Gel-filtracija

Pročišćavanje proteina gel-filtracijom provedeno je na sustavu FPLC korištenjem HiPrep Sephacryl S-200 HR kolone, 16/600 za manje volumene uzorka (do 5 mL) i 26/600 za veće volumene uzorka (do 13 mL). Prije nanošenja uzorka kolona je isprana s destiliranom vodom i ekvilibrirana s puferom sastava: 50 mmol L^{-1} Tris-HCl, 100 mmol L^{-1} NaCl, pH 7,4. Gel-filtracija je provedena na 8 °C uz konstantan protok 0,5 mL min^{-1} (kolona 16/600) ili 2 mL min^{-1} (kolona 26/600). Tijek pročišćavanja praćen je UV detektorom pri valnoj duljini 280 nm. Dobivene proteinske frakcije su spojene i ugušćene do određene koncentracije, ovisno o svrsi pročišćavanja.

Metoda gel-filtracije je korištena i za izmjenu pufera u proteinskim uzorcima. U tu svrhu korištena je kolona PD-10 prema uputama proizvođača.

3.4.3.3. Kromatografija na ionskom izmjenjivaču

Pročišćavanje proteina kromatografijom na ionskom izmjenjivaču provedeno je na sustavu FPLC pri 8 °C. Teoretska izoelektrična točka proteina *Bt*DPP III izračunata pomoću programa ProtParm[84], iznosi 5,11, zbog čega je korišten anionski izmjenjivač Mono Q 5/50 GL. Kolona je isprana s destiliranom vodom i ekvilibrirana s puferom sastava: 50 mmol L^{-1} Tris-HCl, 1 mmol L^{-1} NaCl, pH 7,4. Prije nanošenja na kolonu, proteinskom uzorku je uklonjena sol izmjenom pufera s puferom za ekvilibraciju. Nakon nanošenja proteinskog uzorka, kolona je

isprana s 5 mL pufera za ekvilibraciju. Proteini vezani na kolonu su eluirani s linearnim gradijentom NaCl koncentracije 1 do 1000 mmol L^{-1} u 50 mmol L^{-1} Tris-HCL puferu pH 7,4. Protok tijekom cijelog postupka je iznosio 1 mL min^{-1}, a tijek pročišćavanje je praćen UV detektorom pri valnoj duljini 280 nm. Uspješnost pročišćavanja proteina provjerena je izoelektričnim fokusiranjem.

3.5. Biokemijske i biofizičke metode za karakterizaciju pročišćene DPP III

3.5.1. Određivanje koncentracije proteina

U ovom radu korištene su dvije metode za određivanje koncentracije proteina: mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini 280 nm i metoda po Bradfordu[85]. Metoda po Bradfordu korištena je za određivanje koncentracije smjese proteina tijekom pročišćavanja, a metodom apsorbancije pri 280 nm određivana je koncentracija pročišćenih proteinskih uzorka.

Apsorbancija proteina pri valnoj duljini 280 nm mjerena je spektrofotometrom *NanoDrop* u uzorku volumena 1-2 μL. Prije mjerenja apsorbancije proteina izmjerena je apsorbancija slijepe probe (pufer bez proteina), koja je potom oduzeta od ukupne apsorbancije proteinskog uzorka. Za računanje koncentracije proteina korišten je ekstincijski koeficijent proteina *Bt*DPP III, 99380 M^{-1} cm^{-1}, izračunat pomoću programa ProtParm[84].

Metoda po Bradfordu temelji se na mjerenju apsorbancije pri valnoj duljini 595 nm kompleksa proteina i boje Coomassie Brilliant Blue G-250. Reakcijska smjesa sastoji se od 0,1 mL proteinskog uzorka i 1 mL Bradford reagensa sastava: Coomassie Brilliant Blue G-250 (γ = 0,1 g L^{-1}), etanola (φ = 0,047) i fosfatne kiseline (φ = 0,085). Reakcijska smjesa je snažno promiješana na vrtložnoj miješalici te inkubirana 45 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije spektrofotometrijski je izmjerena apsorbancija uzoraka od koje je oduzeta apsorbancija slijepe probe. Za računanje koncentracije proteina potrebno je načiniti baždarnu krivulju korištenjem nekoliko koncentracija proteinskog standarda albumina iz goveđeg seruma.

3.5.2. Elektroforetske metode

U svrhu analize i vizualizacije proteinskih frakcija tijekom i nakon pročišćavanja korištene su različite elektroforetske metode. Elektroforeza proteina u poliakrilamidnom gelu (PAGE), u denaturirajućim i nativnim uvjetima, korištena je za analizu čistoće proteinskih uzoraka tijekom pročišćavanja kao i za analizu homogenosti pročišćenih proteinskih uzoraka. Za

dodatnu provjeru homogenosti proteinskih uzoraka korišteno je izoelektričnog fokusiranje (IEF).

Elektroforeza proteina u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima, izvedena je metodom po Laemmli-ju[86] na vertikalnom sustavu za elektroforezu *Mini Protean II Electrophoresis Cell*. Pripremljeni su gelovi dimenzija 80 x 70 x 0,75 mm, a sastojali su se od dva dijela: gela za sabijanje visine oko 20 mm i gela za razdvajanje visine oko 60 mm. Za pripremu gela za razdvajanje pipetirano je 2,08 mL otopine akrilamid/bisakrilamida u omjeru 29:1 (φ = 0,30), 1,25 mL 1,5 mol L^{-1} Tris-HCl pufera pH 8,8, 50 µL SDS-a (γ = 100 g L^{-1}), 25 µL APS-a (γ = 100 g L^{-1}), 1 mL TEMED-a i 1,6 mL deionizirane vode. Otopina pripremljena na opisan način izlivena je između dvije staklene ploče i nadslojena destiliranom vodom. Nakon polimerizacije gela (30-45 minuta), uklonjena je destilirana voda iznad gela i povrh gela za razdvajanje izliven je gel za sabijanje pripremljen pipetiranjem 0,268 mL akrilamid:bisakrilamida u omjeru 29:1 (φ = 0,30), 0,5 mL 0,5 mol L^{-1} Tris-HCl pufera pH 6,8, 20 µL SDS-a (γ = 100 g L^{-1}), 10 µL APS-a (γ = 100 g L^{-1}), 1 µL TEMED-a i 1,2 mL deionizirane vode. U izliveni gel za sabijanje umetnut je češalj za oblikovanje jažica. Uzorci su prije nanošenja na gel pomiješani u omjeru 1:1 s otopinom sastava: 0,5 mol L^{-1} Tris-HCl pufer pH 6,8, SDS (γ = 100 g L^{-1}), 2-ME (φ = 0,05), glicerol (φ = 0,10) i bromfenol modrilo (γ = 0,02 g L^{-1}) nakon čega su inkubirani 5 minuta na 95 °C. Nakon inkubacije uzorci su kratko centrifugirani te naneseni u jažice gela. Elektroforeza je provedena u puferu sastava: 0,025 mol L^{-1} Tris-HCl pH 8,3, 0,192 mol L^{-1} glicin i SDS (γ = 1 g L^{-1}), pri stalnom naponu struje od 150 do 180 V. Za vizualizaciju proteinskih vrpca gelovi su bojani 10 minuta na 50 °C uz lagano ljuljanje u otopini sastava: boja Coomassie Brilliant Blue R-250 (γ = 1 g L^{-1}), metanol (φ = 0,30) i octena kiselina (φ = 0,10). Višak boje je uklonjen inkubiranjem gela na 50 °C uz lagano ljuljanje u otopini sastava: metanol (φ = 0,30) i octena kiselina (φ = 0,1).

Aparatura *PhastSystem* korištena je za horizontalnu elektroforezu u nativnim i denaturirajućim uvjetima kao i za IEF. Elektroforeze na *PhastSystem*-u izvode se na gotovim pločicama od poliakrilamidnog gela, dimenzija 5 x 4,5 cm i debljine 0,45 mm, prema uputama proizvođača (*PhastSystem, Separation Technique, File No.* 110 za SDS-PAGE, *File No.* 120 i 121 za elektroforezu nativnih uzoraka i *File No.* 100 za IEF). Elektroforeza nativnih uzoraka provedena je na gelovima gradijenta 8-25 %. Uzorci su prethodno obojani bromfenol plavilom (φ = 0,01) zbog lakšeg praćenja toka elektroforeze. Elektroforeza je provođena uz jakost struje 10 mA i napona 400 V te stalnu temperaturu od 15 °C. IEF proveden je na

homogenim gelovima u rasponu pH 3,0-9,0 ili 4-6,5, uz stalnu temperaturu od 15 °C, jakost struje od 2,5 mA i napon od 2000 V. Gelovi nakon IEF i PAGE su bojani prema uputama proizvođača (*PhastSystem, Separation Technique, File No.* 200) inkubacijom 10 minuta na 50 °C uz lagano ljuljanje u otopini sastava: boja Coomassie Brilliant Blue R-250 (γ = 0,2 g L^{-1}), metanol (φ = 0,30) i octena kiselina (φ = 0,10). Višak boje uklonjen je u otopini sastava: metanol (φ = 0,30) i octena kiselina (φ = 0,10), također na 50 °C uz lagano ljuljanje.

U svim elektroforetskim metodama, uz uzorke, na gel su naneseni i proteinski standardi poznate veličine ili naboja. Prije nanošenja, proteinski standardi su obrađeni na isti način kao i uzorci.

3.5.3. Određivanje aktivnosti DPP III standardnim testom

Standardni test za određivanje aktivnosti DPP III temelji se na kalorimetrijskoj metodi prema Nagatsu-u i suradnicima[87] uz sintetski naftilamidni supstrat Arg_2-2NA. DPP III razgrađuje Arg_2-2NA na dipeptid Arg_2 i 2-naftilamin. Reakcija se prekida zakiseljavanjem dodatkom otopine soli Fast Blue BN (FBB; tetrazonijeva sol *o*-dianisidina), prilikom čega dolazi do spajanja 2-naftilamina i FBB soli u diazo spoj. Nastali produkt je ružičasto-crvene boje čiji je intenzitet proporcionalan aktivnosti enzima.

Reakcijska smjesa, volumena 1 mL, za određivanje aktivnosti DPP III sadrži: 50 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 8.0, 50 μmol L^{-1} $CoCl_2$ i enzim DPP III. Takva smjesa je predinkubirana 2 minute u vodenoj kupelji uz lagano miješanje na 37 °C nakon čega je dodan supstrat konačne koncentracije 40 μmol L^{-1}. Enzimska reakcije traje 15 minuta te je prekinuta dodatkom 200 μL svježe priređene otopine FBB soli sastava: 1,5 mg FBB soli otopljene u 2 mol L^{-1} Na-acetatnom puferu pH 4,2 s Tweenom 80, φ = 0,10. Nakon prekida reakcije, boja se razvija 10 minuta na sobnoj temperaturi. Paralelno s enzimskom reakcijom pripremljena je slijepa proba koja je sadržavala sve komponente osim enzima. Intenzitet obojenja određen je spektrofotometrijski, pri valnoj duljini 530 nm, uz dužinu puta svjetlosti 1 cm. Baždarni pravac konstruiran je na osnovi mjerenja provedenih u istim uvjetima s otopinama poznatih koncentracija 2-naftilamina.

3.5.4. Određivanje kinetičkih parametara uz različite sintetske supstrate

Kinetički parametri k_{cat} i K_m su određeni na osnovu mjerenja početne brzine hidrolize naftilamidnog supstrata[88]. Početna brzina određena je mjerenjem fluorescencije

($\lambda_{pobuđenja}$ = 332 nm i $\lambda_{emisije}$ = 420 nm) produkta reakcije 2-naftilamina pri stalnoj temperaturi od 25 °C. Fluorescencija je mjerena ukupno 1 minutu u intervalima od 0,1 sekunde. Za određivanje kinetičkih parametara provedeno je minimalno 3x po 7 mjerenja s različitim koncentracijama supstrata do maksimalne koncentracije supstrata 10x veće od K_m. Također, od navedenih 7 mjerenja, 3 mjerenja su bila s koncentracijom supstrata manjom od K_m, a tri s koncentracijom supstrata većom od K_m.

Prije početka mjerenja, pročišćeni enzim konačne koncentracije između 0,4 i 1,34 nmol L^{-1} je predinkubiran na 25 °C, 2 minute, u 20 mmol L^{-1} Tris-HCl puferu pH 8,0. Nakon predinkubacije, mjerenje je započeto dodavanjem supstrata u reakcijsku smjesu u rasponu koncentracija od 0,05 do 40 μmol L^{-1}. Volumen reakcijske smjese iznosio je 3 mL. Za konstrukciju baždarnog pravca u istim uvjetima je mjerena fluorescencija 2-naftilamina u rasponu koncentracija od 0 do 1 μmol L^{-1}. Kinetički parametri su izračunati nelinearnom regresijom koristeći program GraphPad Prism 7[89].

3.5.5. Cirkularni dikroizam

Cirkularni dikroizam (CD) korišten je za analizu sekundarne strukture divljeg tipa *Bt*DPP III kao i svih pripremljenih mutanata. CD spektri snimljeni su na spektropolarimetru J-715, koristeći kvarcnu kivetu optičkog puta 0,1 mm. Spektri su snimani u rasponu valnih duljina od 190 do 260 nm pri sobnoj temperaturi između 20-25 °C. Parametri snimanja su bili: razlučivanje 0,2, širina puta zrake 1,0 nm, vrijeme mjerenja u jednoj točci 1 s, brzina snimanja 50 nm min^{-1}, a konačan spektar je bio rezultat usrednjavanja 3 spektra. Prije snimanja CD spektara svi uzorci su odsoljeni u 50 mmol L^{-1} fosfatni pufer pH 7,4 te razrijeđeni do koncentracije između 0,40 i 1,0 g L^{-1}. Analiza dobivenih CD spektara provedena je upotrebom programa DichroWeb[90,91].

3.5.6. Dinamičko raspršivanje svjetlosti

Za utvrđivanje homogenosti proteinskih uzoraka prije kristalizacije je korištena metoda dinamičkog raspršivanje svjetlosti (DLS, *dynamic light scattering*). Veličina molekula proteina je određena mjerenjem dinamičkog raspršenja svjetlosti na foton korelacijskom spektrofotometru, *Zetasizer Nano ZS*, sa „zelenim“ laserom (λ = 532 nm) pri temperaturi 18 °C. Za određivanje veličine čestica, intenzitet raspršene svjetlosti je mjeren pri kutu 170°. Prije mjerenja proteinski uzorci koncentracije 5 mg mL^{-1} bili su centrifugirani 5 minuta na 13 800 g. Uzorci su zatim prebačeni u polistirol/polistiren kivetu (d = 10 mm) i inkubirani 30

minuta na 18 °C. Dobivene korelacijske funkcije analizirane su algoritmima u *Zetasizer* programskom paketu. Mjerenja su vršena 10 puta, a veličina molekula izražena je kao prosječna vrijednost položaja maksimuma pika raspodjele veličine molekula po intenzitetu.

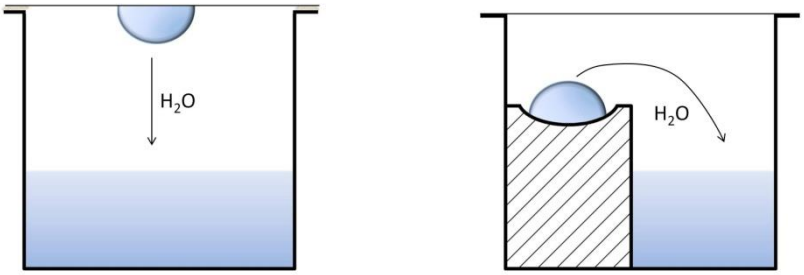
3.5.7. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je korištena za utvrđivanje ukupne mase divljeg tipa *Bt*DPP III. Pročišćeni uzorci proteina predani su na servis spektrometrije masa u Laboratorij za spektrometriju masa, Institut Ruđer Bošković.

3.6. Kristalografske metode

3.6.1. Kristalizacija metodom strujanja para

Metoda strujanja para je najčešće korištena metoda u kristalizaciji proteina. U ovom doktorskom radu korištene su dvije izvedbe te metode: viseće kapi i sjedeće kapi (slika 3.1). Kod obje izvedbe u kapi se nalazi protein pomiješan s kristalizacijskom otopinom, najčešće u omjeru 1:1. S obzirom da je sustav zatvoren i koncentracija otopljenih kemijskih tvari je manja u kapi nego li u spremniku u kojem se nalazi samo kristalizacijska otopina, dolazi do procesa difuzije tijekom koje voda prelazi iz kapi u spremnik kako bi se postiglo ravnotežno stanje. Zbog difuzije vode volumen kapi se smanjuje što rezultira povećanjem koncentracije proteina dovodeći ga u zasićeno stanje u kojem je moguće stvaranje kristalizacijskih klica.



Slika 3.1. Shematski prikaz kristalizacije proteina metodom strujanja para. Prikazane su dvije izvedbe: tehnika viseće kapi (lijevo) i tehnika sjedeće kapi (desno).

Kako nije moguće predvidjeti uvjete kristalizacije proteina, testiraju se različiti komercijalno dostupni kompleti od kojih se najčešće svaki sastoji od 96 različitih otopina. Korišteni kompleti su: Index, Morpheus, Midas, JCSG+, PGA, PEG/Ion i PACT Suite. Kristalizacijski eksperimenti postavljani su pri 20 °C, tehnikom sjedeće kapi koristeći robot za kristalizaciju Oryx8. Korištene su *Swissci* ploče koje su nakon postavljanja kristalizacije zatvorene prozirnom samoljepljivom trakom. Volumen otopine za kristalizaciju u spremniku

iznosio je 35 μL, a volumen kapi 1 μL (0,5 μL otopine za kristalizaciju + 0,5 μL proteinskog uzorka). Za pretraživanje početnih uvjeta kristalizacije korišteni su sljedeći proteinski konstrukti: divlji tip DPP III (14,5 i 18,5 mg mL^{-1}), inaktivni mutant E449A (23,5 mg mL^{-1}), Cys-null DPP III (15,0 mg mL^{-1}) i Se-Met Cys-null DPP III (29,1 mg mL^{-1}). Svi korišteni proteinski uzorci su bili u puferu sastava: 50 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 7,4 i 100 mmol L^{-1} NaCl. Nakon postavljanja kristalizacijskih eksperimenata, ploče su čuvane pri konstantnoj temperaturi od 18 °C. Rast kristala je praćen jednom dnevno prva tri dana, nakon toga 1-2 puta tjedno sljedećih tri tjedna, te 1-4 puta mjesečno dok se kapi ne osuše.

Za pronalaženje dodatnih kristalizacijskih uvjeta upotrjebljena je metoda mikrosijanja (*microseeding*). Mikrokristali proteina Cys-null DPP III, dobiveni u kristalizacijskom uvjetu Midas H4 (0,2 mol L^{-1} amonijev klorid, 0,1 mol L^{-1} HEPES pH 7,5, 25 % v/v glicerol etoksilat), prebačeni su zajedno s kapi u kojoj su narasli u čistu polipropilensku mikroepruvetu od 1,5 mL. U istu mikroepruvetu dodano je 35 μL kristalizacijske otopine iz spremnika i u nju je ubačena keramička kuglica (*seed bead*). Sadržaj mikroepruvete snažno je pomiješan na vrtložnoj miješalici oko 10 sekundi. Za pripremu radne otopine, otopina dobivena nakon snažnog miješanja je razrijeđena 20x s kristalizacijskom otopinom Midas H4. Postavljen je kristalizacijski eksperiment u ploče *Swissci* pomoću kristalizacijskog robota, koristeći kristalizacijske komplete Midas i JCSG+. Volumen otopine za kristalizaciju u spremniku iznosio je 35 μL, a volumen kapi 1,25 μL. Kap se sastojala od 0,5 μL otopine za kristalizaciju, 0,5 μL proteinskog uzorka (Se-Met Cys-null, c = 29,1 g L^{-1}) i 0,25 μL radne otopine koja sadrži mikrokristale. Nakon postavljanja kristalizacijskog eksperimenta ploče su čuvane na konstantnoj temperaturi od 18 °C, a rast kristala je praćen kao što je prethodno opisano.

Nakon što su pronađeni početni uvjeti kristalizacije uslijedila je dodatna optimizacija tih uvjeta. Optimizacija je napravljena u VDX pločama tehnikom viseće kapi. Kapi su ručno pripremane na silikoniziranim pokrovnim stakalcima koja su potom postavljena iznad spremnika i izolirana silikonskom masti (slika 3.1). Volumen otopine za kristalizaciju u spremniku iznosio je između 500 i 1000 μL, a volumen kapi od 2 do 4 μL u kojoj je variran omjer proteina i otopine za kristalizaciju. Osim omjera proteina i kristalizacijske otopine te volumena spreminka, optimizacija kristalizacijskih uvjeta je uključivala variranje koncentracije proteina, precipitanta, soli, pH pufera u otopini za kristalizaciju i temperature (18 i 4 °C).

3.6.2. Kokristalizacija proteina i supstrata i/ili inhibitora

U svrhu dobivanja kompleksa, protein DPP III se pokušalo kokristalizirati sa supstratom Arg_2-2NA ili s inhibitorom Tyr-Phe-NHOH. Supstrat i inhibitor su otopljeni u istom puferu u kojem su se nalazili proteinski uzorci (50 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 7,4 i 100 mmol L^{-1} NaCl) do koncentracija: 106 mmol L^{-1} Arg_2-2NA i 25,0 mmol L^{-1} Tyr-Phe-NHOH. Različiti proteinski konstrukti pomiješani su sa supstratom i inhibitorom (tablica 3.9), te inkubirani 20 minuta na ledu. Nakon inkubacije postavljen je kristalizacijski eksperiment s otopinama za kristalizaciju za koje je u prethodnim kristalizacijskim eksperimentima utvrđeno da su povoljne za rast kristala proteina DPP III: Midas G7 (0,2 mol L^{-1} amonijev acetat, 0,1 mol L^{-1} MES pH 6,5 i 30 % v/v glicerol etoksilat), JCSG+ E2 (0,2 mol L^{-1} NaCl, 0,1 mol L^{-1} natrijev kakodilat pH 6,5 i 2,0 mol L^{-1} $(NH_4)_2SO_4$), JCSG+ C10 (0,1 mol L^{-1} bicine, 10 % w/v PEG 20 000 i 2 % v/v dioksan, pH 9,0) i JCSG+ G11 (0,1 mol L^{-1} Bis-Tris pH 5,5 i 2,0 mol L^{-1} $(NH_4)_2SO_4$). Kristalizacijski eksperiment je postavljen korištenjem robot za kristalizaciju u ploče *Swissci*, tako da je u prvu kap dodan proteinski uzorak bez supstrata, u drugu proteinski uzorak sa supstratom, a u treću proteinski uzorak s inhibitorom. Volumen otopine za kristalizaciju u spremniku iznosio je 35 μL, a volumen kapi 1 μL (0,5 μL otopine za kristalizaciju + 0,5 μL proteinskog uzorka). Opisanim postupkom postavljene su dvije ploče od kojih je jedna čuvana na konstantnoj temperaturi od 18 °C, a druga na 20 °C.

Tablica 3.9. Sastav otopina za postavljanje kokristalizacijskih eksperimenata.

Enzimski konstrukt	c(E) / μmol L^{-1}	V(E) + V(S) / μL	Molarni omjer	V(E) + V(I) / μL	Molarni omjer
Divlji tip	242	18,65 + 1,35	1:31	14,2 + 5,8	1:23
Mutant E449A	307	18,28 + 1,72	1:31	12,6 + 7,4	1:20
Se-Met Cys-null	95,4	19,49 + 0,51	1:34	17,8 + 2,2	1:31
Se-Met Cys-null	379	17,88 + 2,12	1:30	10,9 + 9,1	1:18

* Kratice: E – enzimski konstrukt, S – supstrat Arg_2-2NA (c = 106 mmol L^{-1}), I – inhibitor Tyr-Phe-NHOH (c = 25,0 mmol L^{-1})

3.6.3. Difrakcija rendgenskih zraka na jediničnom kristalu

Prilikom izlaganja kristala rendgenskom zračenju dolazi do oštećenja proteina što rezultira smanjenjem kvalitete eksperimentalnih podataka. Također, s obzirom da proteinski kristali sadrže otapalo na bazi vode (30-70 % kristala čini otapalo), izlaganje kristala zraku može uzrokovati isparivanje vode i raspadanje kristala. Kako bi izbjegli navedene negativne efekte,

svi kristali su ohlađeni u tekućem dušiku odmah nakon što su izvađeni iz kapljica. Tijekom čuvanja i transporta, kristali su držani u Dewar-ovoj posudi na temperaturi od približno 78 K.

Dobiveni kristali DPP III snimljeni su na sinkrotronu Elettra (Trst, Italija) na liniji 5.2R. Sva snimanja napravljena su u struji dušika na temperaturi od 100 K. Kristal dobiven s uzorkom proteina Cys-null DPP III snimljen je pri valnoj duljini 1,28216 Å. Odabrana valna duljina, odnosno energija zračenja, se nalazi na apsorpcijskom maksimumu atoma cinka što je neophodno za mjerenje anomalnog signala. Snimljeno je 180 difrakcijskih slika, pri oscilacijskom kutu 1°. Kristal dobiven s uzorkom proteina Se-Met Cys-null DPP III snimljen je pri valnoj duljini 0,97180 Å. Odabrana valna duljina se nalazi na apsorpcijskom maksimum atoma selenija. Kako bi se osigurala velika redundantnost refleksa, snimljeno je 720 difrakcijskih slika pri oscilacijskom kutu 1°. Ostali skupovi podataka snimljeni su pri valnoj duljini 0,9760 Å, ukupno 95 difrakcijskih slika za divlji tip i 200 difrakcijskih slika za kristal dobiven u kokristalizacijskom eksperimentu, pri oscilacijskom kutu 1°. Za svaku strukturu je sakupljen čitav skup podataka na jednom kristalu.

3.6.4. Procesiranje podataka i rješavanje kristalne strukture

Tijekom izrade ovog doktorskog rada korištene su dvije metode za rješavanje strukture iz podataka dobivenih difrakcijom na jediničnom kristalu: metoda molekulske zamjene i metoda anomalne difrakcije s jednom valnom duljinom (*Single-wavelength anomalous dispersion*, SAD). Metoda molekulske zamjene je računalna metoda koja kao model za izračun faza koristi riješenu strukturu sličnog proteina. Za uspješno rješavanje strukture metodom molekulske zamjene potrebno je imati model s identičnosti sekvenci > 25 % i RMSD između C^{α} atoma < 1,5 Å[92]. S druge strane, metoda SAD je eksperimentalna metoda za koju je potrebno u protein ugraditi atom s jakim anomalnim raspršenjem. U našem slučaju metionini su zamijenjeni selenometioninima, jer sadrži atom selenija koji ima relativno jako anomalno raspršenje koje se koristi za rješavanje faznoga problema.

Difrakcijske slike svih skupova podataka prvo su indeksirane i integrirane programom XDS[93]. Dobiveni podaci su potom sjedinjeni i skalirani programom Aimless[94]. Skup od 5 % slučajno odabranih refleksa isključen je iz daljnjeg utočnjavanja i korišten za računanje vrijednosti R_{free}.

Za rješavanje problema faza metodom SAD, korišten je skup podataka dobiven na kristalu proteina Se-Met Cys-null DPP III i programski paket SHELX[95]. Program SHELXD pronašao je položaje devet atoma selenija u asimetričnoj jedinici jedinične ćelije. Dobivene pozicije

atoma selenija su tada korištene za određivanje početnih faza pomoću kojih je napravljena prva mapa elektronske gustoće. Za izgradnju početnog modela od poli-alaninskog lanca korišten je program SHELXE. Prije izgradnje modela s ispravnim aminokiselinama, mapa elektronske gustoće je modificirana programom Parrot[96]. Za izgradnju prvog modela Se-Met Cys-null DPP III korišten je program BUCCANEER[97]. Dobiveni model je utočnjen programima REFMAC[98,99] i PHENIX[100]. Program COOT[101] je korišten za ručno utočnjavanje modela, kao i za pojedinačno dodavanje molekula vode, otapala, metalnih iona i inhibitora. Tijekom utočnjavanja, kvaliteta modela je praćena programom Molprobity[102].

Nakon što je riješen problem faza, ostale strukture su riješene metodom molekulske zamjene pomoću programa MOLREP[103], koristeći strukturu Se-Met Cys-null DPP III kao model. Utočnjavanje je napravljeno isto kao i za strukturu Se-Met Cys-null DPP III. U zadnjim koracima utočnjavanja korištena je TLS parametrizacija (*Translation, libration, and screw-rotation*)[104]. TLS parametrizacija služi za simulaciju anizotropnog pomaka velikih grupa aminokiselina koje se smatraju krutim tijelom. U zadnjem koraku utočnjavanja strukture *Bt*DPP III definirane su četiri TLS grupe: 24-328, 329-414, 415-623 i 624-675, na temelju TLS parametara koji su korišteni u utočnjavanju ljudske DPP III[32]. Zbog lošeg razlučivanja, TLS parametrizacija nije korištena u utočnjavanju zatvorene strukture *Bt*DPP III.

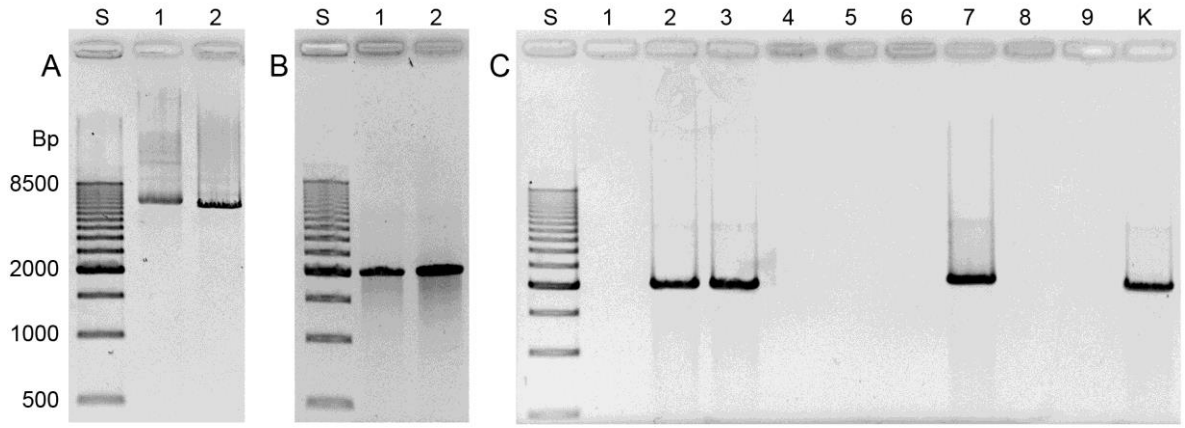
Programi Parrot, BUCCANEER, REFMAC i MOLREP su dio programskog paketa CCP4[105]. Za vizualizaciju kristalnih struktura i izradu slika korišteni su programi COOT[101] i PyMol[52].

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Divlji tip DPP III iz *Bacteroides thetaiotaomicron*

4.1.1. Kloniranje, ekspresija i pročišćavanje

Gen Bt_1846 (2025 parova baza) koji kodira enzim *Bt*DPP III umnožen je metodom PCR s početnicama dizajniranim tako da na 3' i 5' krajevima sadrže nukleotidne slijedove koji su specifični za vezanje i cijepanje restrikcijskim enzima *Nhe*I i *Xho*I. Tako umnoženi gen i plazmidni vektor pET-21b(+) (5442 parova baza) obrađeni su restrikcijskim enzimima i pročišćeni (slika 4.1. A i B). Nakon ligacije gena i plazmidnog vektora, ligacijskom smjesom su transformirane bakterijske stanice XL10-Gold i nacijepljene na krutu LB/amp podlogu. Nasumično je odabrano 8 kolonija s krute LB/amp podloge na kojima je metodom PCR testirano sadrže li uklonirani gen za *Bt*DPP III. Od osam testiranih kolonija, tri su imale uklonirani željeni gen (slika 4.1. C). Iz sve tri kolonije izoliran je plazmid, a sekvenciranjem je utvrđeno da je u samo dva plazmidna uzorka ispravno uklonirani željeni gen za *Bt*DPP III.

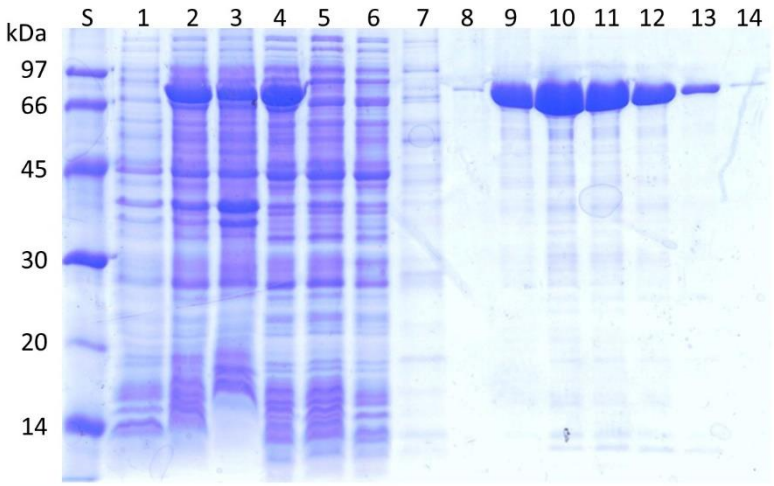


Slika 4.1. Elektroforeza DNA na agaroznom gelu. S – standardi za duljinu DNA odsječaka. (**A**) Plazmid pET-21b(+) prije obrade restrikcijskim enzimima (1) i nakon obrade (2). (**B**) Gen Bt_1846 koji kodira enzim DPP III prije obrade restrikcijskim enzimima (1) i nakon obrade (2). (**C**) 1 – negativna kontrola (mili Q voda); 2-9 – produkti PCR nasumično odabranih bakterijskih kolonija; K – pozitivna kontrola (Gen Bt_1846 koji kodira enzim DPP III).

Ligacijom gena u restrikcijsko mjesto *Nhe*I/*Xho*I omogućena je priprema ekspresijskog vektora pET-21b(DPP III-His6) i ekspresija DPP III s privjeskom od 6 histidinskih ostataka

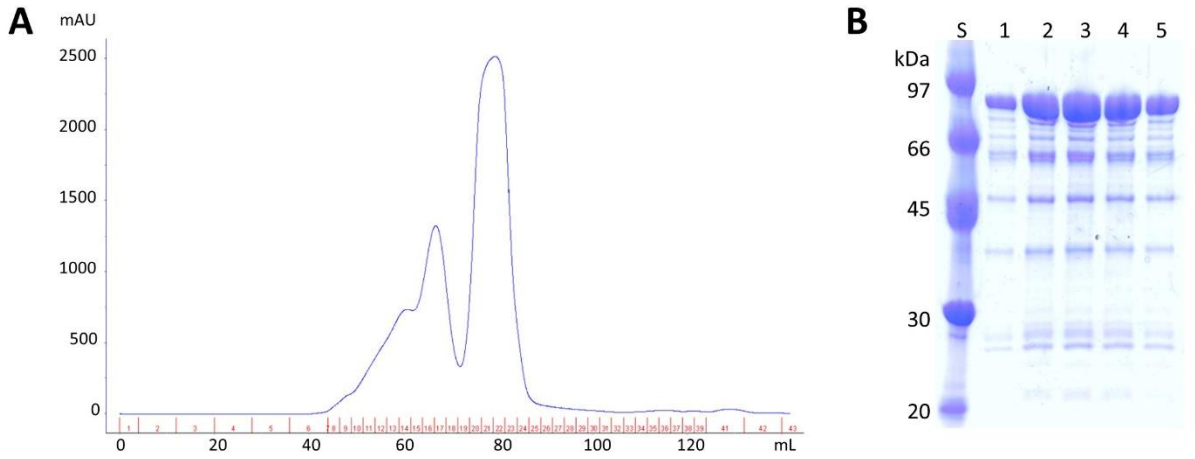
na *C*-kraju proteina. Kao posljedica korištenja navedenih restrikcijskih mjesta, rekombinantni protein sadrži tri dodatne aminokiseline (metionin, alanin i serin) na *N*-kraju i dvije dodatne aminokiseline (leucin i glutaminsku kiselinu), prije histidinskog privjeska na *C*-kraju.

Tijekom izrade ovog rada, napravljeno je nekoliko uzgoja i pročišćavanja rekombinantne *Bt*DPP III. Prilikom svakog uzgoja rekombinantni protein je prekomjerno eksprimiran i pročišćen korištenjem afinitetne kromatografije na Ni-NTA agarozi, a uzorci su analizirani SDS-elektroforezom (slika 4.2). Prosječan prinos proteina *Bt*DPP III iznosio je 15 mg po 1 g biomase. Specifična aktivnost *Bt*DPP III uz Arg_2-2NA nakon pročišćavanja afinitetnom kromatografijom iznosila je 1,92 μmol min^{-1} mg^{-1}.



Slika 4.2. SDS-elektroforeza frakcija dobivenih ekspresijom i pročišćavanjem proteina *Bt*DPP III afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozi. S – proteinski standardi; 1 – uzorak bakterijskih stanica prije poticanja ekspresije dodatkom IPTG-a; 2 – uzorak stanica nakon ekspresije; 3 – stanični lizat, netopiva frakcija; 4 – stanični lizat, topiva frakcija (početni uzorak nanesen na Ni-NTA kolonu); 5 – nevezana frakcija; 6 i 7 – prva i zadnja frakcija ispiranja kolone; 8-14 – frakcije eluirane s kolone.

Za postavljanje kristalizacijskih eksperimenata, uzorci proteina dobiveni nakon afinitetne kromatografije su dodatno pročišćeni gel-filtracijom (slika 4.3). Tijekom pročišćavanja gel-filtracijom, utvrđeno je da uzorak proteina pročišćen samo afinitetnom kromatografijom sadrži visok udio agregata *Bt*DPP III koji su uklonjeni gel-filtracijom. Nakon pročišćavanja gel-filtracijom specifična aktivnost *Bt*DPP III uz Arg_2-2NA se povećala i iznosila je 2,72 μmol min^{-1} mg^{-1}. Dobivene aktivne frakcije su spojene i ugušćene do željene koncentracije.



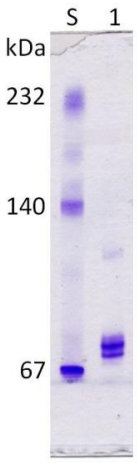
Slika 4.3. (A) Kromatogram pročišćavanja *Bt*DPP III gel-filtracijom. (B) SDS-elektroforeza frakcija nakon gel-filtracije. S – proteinski standardi; 1-5 – frakcije 20-24 (desni maksimum).

4.1.2. Analiza spektrometrijom masa

Analizom uzorka divljeg tipa *Bt*DPP III spektrometrijom masa izmjerena je molarna masa proteina od 75 809 Da. Međutim, teoretska masa rekombinantnog proteina s dodatnim aminokiselinama ugrađenim kao posljedicom kloniranja, iznosi 77 445 Da. Daljnjom analizom masa peptida, dobivenih kemijskim cijepanjem CNBr-om, utvrđeno je da na *N*-kraju proteina nedostaje 19 aminokiselina.

4.1.1. Nativna elektroforeza i izoelektrično fokusiranje pročišćene DPP III

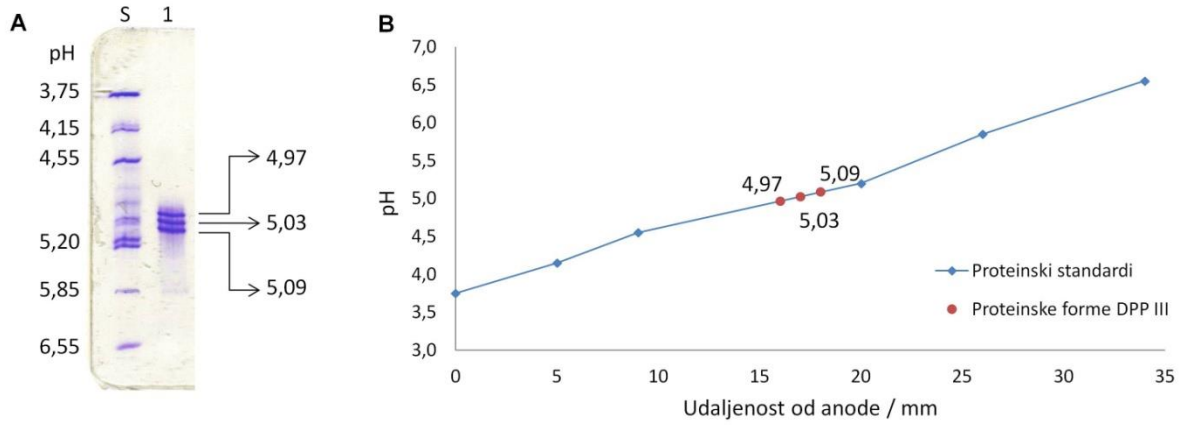
Proteinski uzorak divljeg tipa *Bt*DPP III, pročišćen afinitetnom kromatografijom i gel-filtracijom, analiziran je elektroforezom u nativnim uvjetima (slika 4.4).



Slika 4.4. Nativna elektroforeza proteina *Bt*DPP III. S – proteinski standardi; 1 – proteinski uzorak *Bt*DPP III pročišćen afinitetnom kromatografijom i gel-filtracijom.

Na gelu dobivenom nativnom elektroforezom, uočeno je postojanje dviju vrlo bliskih proteinskih vrpci što je ukazivalo na nehomogenost pročišćenog proteinskog uzorka.

Metodom IEF određena je približna izoelektrična točka, te dodatno analizirana homogenost proteinskog uzoraka. Potvrđeno je da proteinski uzorak divljeg tipa *Bt*DPP III nije homogen i da sadrži tri proteinske vrpce (slika 4.5). Izoelektrične točke proteinskih vrpci procijenjene su na temelju prijeđenog puta u gelu, a iznose: 4,97, 5,03 i 5,09. S obzirom da se na gelu nakon SDS-elektroforeze pojavljuje samo jedna proteinska vrpca koja odgovara proteinu *Bt*DPP III (slika 4.3), možemo pretpostaviti da sve tri proteinske vrpce razdvojene IEF-om pripadaju istom proteinu (ili njegovim formama bliske molekulske mase), s različitim ukupnim nabojem.



Slika 4.5. Određivanje izoelektrične točke proteina *Bt*DPP III. (**A**) Razdvajanje proteina IEF-om u gradijentu pH od 4 do 6,5. 1 – Proteinski standardi; 2 – proteinski uzorak *Bt*DPP III pročišćen afinitetnom kromatografijom i gel-filtracijom. (**B**) Grafički prikaz određivanja izoelektrične točke, pI, pomoću položaja proteinskih vrpci na gelu IEF-a.

Ukupna razlika u naboju proteinskih formi razdvojenih s IEF određena je pomoću programa ProtParm[84]. U primarnoj strukturi DPP III zamijenjena je jedna neutralna aminokiselina s nabijenom, te je izračunat pI. Zamjenom neutralne aminokiseline s asparaginskom kiselinom ili glutaminskom kiselinom pI se smanjuje za 0,03. Zamjenom neutralne aminokiseline s histidinom, pI se povećava za 0,03, a zamjenom s lizinom ili argininom pI se povećava za 0,04. Na temelju dobivenih podataka možemo pretpostaviti da se proteinske forme proteina *Bt*DPP III međusobno razlikuju u 2 do 4 elementarna naboja. Do razlike u naboju proteina može doći zbog oksidacije jednog ili više cisteinskih ostataka. *Bt*DPP III sadrži 5 cisteinskih ostataka. Ovisno o stupnju oksidacije može nastati sulfenski (-SOH), sulfinski (-SO_2H) ili

sulfonski (-SO_3H) cisteinski ostatak. Sulfenski cisteinski ostatak je kratkoživući te se reducira nazad u cisteinski ili se dalje oksidira u sulfinski ili sulfonski oblik. Sulfinski i sulfonski cisteinski ostaci će pri pH 7,4 biti u deprotoniranom obliku te promijeniti ukupni naboj proteina[106].

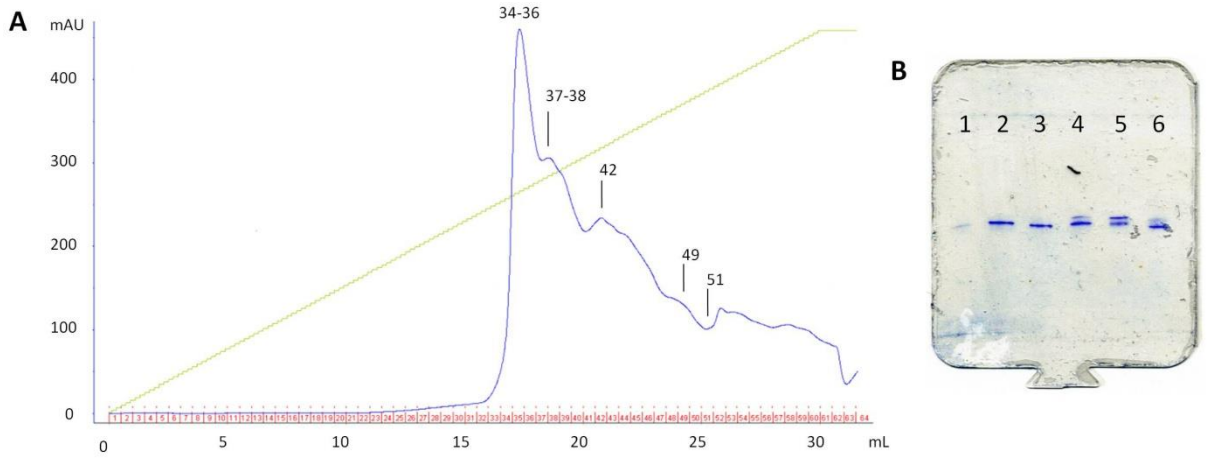
4.1.2. Pokušaji homogenizacije uzoraka DPP III

Opisana heterogenost pročišćenog proteinskog uzorka *Bt*DPP III prvi put je uočena analizom pročišćene rekombinantne *Bt*DPP III bez histidinskog privjeska[81]. U navedenom diplomskom radu, proteinski uzorak je sadržavao dvije forme, a uspješno je homogeniziran obradom s reducirajućim reagensom DTT i alkiliranjem jodoacetamidom. Prema istom postupku obrađena je i *Bt*DPP III s histidinskim privjeskom, ali uzorak se nije uspjelo homogenizirati. Također, varijacijom koncentracije DTT-a, jodoacetamida i vremena inkubacije, nije dobiven homogen uzorak.

Kako pročišćeni uzorak nije bilo moguće homogenizirati, napravljeno je ponovno pročišćavanje *Bt*DPP III s puferima koji sadrže β-merkaptoetanol (c = 5 mmol L^{-1}), koji djeluje kao antioksidans. Također, s obzirom da je spektrometrijom masa pokazano da je divlji tip *Bt*DPP III nakon ekspresije i pročišćavanja kraći za 19 aminokiselina, napravljeno je pročišćavanje proteina s puferima koji sadrže PMSF (c = 5 mmol L^{-1}), inhibitor serinskih proteaza. U tu svrhu napravljen je novi uzgoj i ekspresija *Bt*DPP III, a dobivena biomasa je podijeljena na dva dijela. Prvi dio je pročišćen afinitetnom kromatografijom s puferima koji sadrže β-merkaptoetanol, a drugi dio s puferima koji sadrže PMSF. Pročišćeni uzorci su analizirani SDS-elektroforezom i IEF-om. U oba slučaja na gelu SDS-elektroforeze je uočena jedna proteinska vrpca, a na gelu IEF-a tri proteinske vrpce. Dakle, dobiveni su potpuno isti rezultati kao i kod pročišćavanju bez β-merkaptoetanola i PMSF-a.

4.1.3. Pročišćavanje jedne proteinske forme DPP III

Kako bi izolirali samo jednu proteinsku formu *Bt*DPP III, uzorak iza afinitetne kromatografije dodatno je pročišćen kromatografijom na anionskom izmjenjivaču Mono Q. Prvo je napravljeno probno pročišćavanje na maloj koloni (Mono Q 5/50 GL; V(nosača) = 1 mL) s vrlo blagim gradijentom soli, od 0 do 150 mmol L^{-1} NaCl u 30 mL. Na kolonu je naneseno ukupno 6 mg proteina prethodno pročišćenog afinitetnom kromatografijom. Dobivene frakcije su analizirane IEF-om (slika 4.6).



Slika 4.6. (**A**) Kromatogram pročišćavanja 7,5 mg proteina *Bt*DPP III anionskom izmjenom. Zelenom linijom je označen gradijent soli NaCl od 0 do 150 mmol L^{-1}. Povrh maksimuma označeni su brojevi frakcija. (**B**) Analiza frakcija IEF-om. 1-3 – proteinske frakcije od 34 do 36; 4-5 – proteinske frakcije 37 i 38; 6 – proteinska frakcija 42.

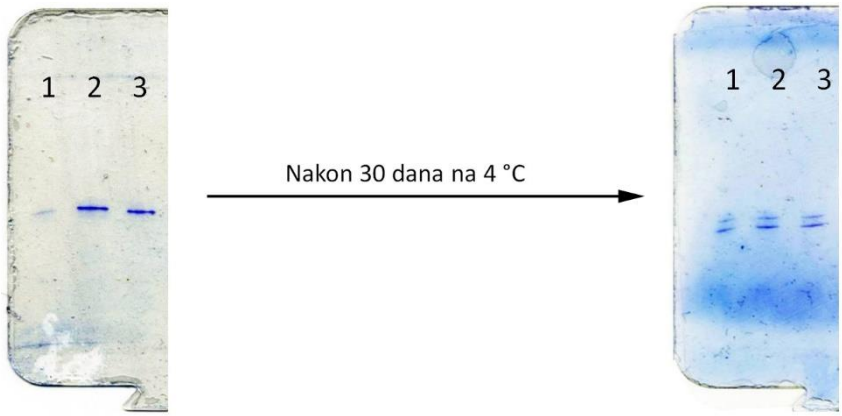
Iako razdvajanje proteinskih formi ovim postupkom nije bilo potpuno, dobivene su tri frakcije koje sadrže samo jednu proteinsku formu, dok su ostale sadržavale dvije proteinske forme. Pročišćenim frakcijama određena je specifična aktivnost uz Arg_2-2NA (tablica 4.1). Specifična aktivnost proteinskih frakcija prvog i drugog maksimuma (frak. 34-38) se povećala u usporedbi s početnim uzorkom. Na temelju povećanja specifične aktivnosti možemo zaključiti da proteinska forma koja je uklonjena nije aktivna ili ima manju aktivnost. Iako proteinske frakcije prvog maksimuma (frak. 34-36) sadrže samo jednu proteinsku formu, a frakcije drugog maksimuma (frak. 37-38) sadrže dvije proteinske forme, među njima nema velike razlike u specifičnoj aktivnosti. Nadalje, frakcije trećeg maksimuma (frak. 41-44) imaju dvostruko manju specifičnu aktivnost od prethodnih i sadrže dvije proteinske forme. Udaljenije frakcije (49 i 51) imaju gotovo jednaku specifičnu aktivnost kao i frakcije s jednom proteinskom formom. Na temelju dobivenih podataka ne može se sa sigurnošću odrediti koja proteinska je aktivnija.

Tablica 4.1. Specifična aktivnost proteinskih frakcija divljeg tipa *Bt*DPP III nakon anionske izmjene, određene uz Arg_2-2NA.

Uzorak	Specifična aktivnost / μmol min^{-1} mg^{-1}
Početni uzorak	1,58
Frakcija 34	2,55
Frakcija 35	1,96
Frakcija 36	2,70
Frakcija 37	2,36
Frakcija 41	1,03
Frakcija 42	1,04
Frakcija 43	1,21
Frakcija 44	1,32
Frakcija 49	2,46
Frakcija 51	2,18

Stajanjem proteinskih frakcija 30 dana na 4 °C ponovno se pojavljuju dvije forme u frakcijama koje su imale samo jednu formu nakon anionske izmejne (slika 4.7). Proteinske frakcije su stajale u puferu u kojem su pročišćene, sastava: 50 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 7,4 i ~80 mmol L^{-1} NaCl. Dobiveni rezultat upućuje na oksidaciju ili neku drugu modifikaciju proteina tijekom stajanja na 4 °C. Također, moglo bi se zaključiti da protein sam sebe razgrađuje, ali je to vrlo malo vjerojatno jer u 50 godina istraživanja proteina DPP III iz različitih organizama, nije zabilježena njihova proteinazna aktivnost. Osim navedenog, razdvajanje u dvije forme bi se moglo objasniti i disocijacijom iona cinka iz aktivnog mjesta proteina. Za utvrđivanje utjecaja iona cinka na pojavljivanje proteinskih formi prvo je određena specifična aktivnost enzima u reakcijskoj smjesi koja sadrži 0,1 i 1 mmol L^{-1} EDTA. Pri obje koncentracije EDTA enzim potpuno gubi aktivnost. Test aktivnosti je ponovljen uz dodatak $CoCl_2$, koncentracije između 50 i 200 μmol L^{-1}, pri čemu je aktivnost gotovo potpuno vraćena pri svim ispitanim koncentracijama $CoCl_2$. Dobiveni rezultati ukazuju da prilikom obrade enzima s EDTA dolazi do uklanjanja cinkovog iona iz aktivnog mjesta i gubitka aktivnosti enzima, dok se dodatkom kobaltovih iona enzim reaktivira. Isti utjecaj EDTA je uočen i kod ljudske DPP III[4]. Nakon što je utvrđeno da obrada s EDTA uklanja ion cinka iz aktivnog mjesta, alikvot pročišćenog uzorka afinitetnom kromatografijom je obrađen s

0,1 mmol L^{-1} EDTA i analiziran IEF-om. Uočene su sve tri proteinske forme isto kao i u proteinu koji nije bio tretiran s EDTA. Dobiveni rezultat ukazuje da disocijacija iona cinka nema utjecaj na nastajanje proteinskih formi.



Slika 4.7. Analiza proteinskih frakcija IEF-om odmah nakon pročišćavanja *Bt*DPP III anionskom izmjenom, te nakon 30 dana stajanja na 4 °C. 1-3 – proteinske frakcije od 34 do 36.

Za postavljanje kristalizacijskih eksperimenata potrebna je visoka koncentracija proteina, minimalno 100 µL uzorka koncentracije od oko 10 mg mL^{-1}. Opisanim probnim pročišćavanjem na Mono Q dobiveno je oko 0,35 mg proteina po jednoj proteinskoj frakciji, što nije dovoljno za kristalizaciju. Kako bi pripremili veću količinu homogenog uzorka pročišćavanje na Mono Q je ponovljeno u istim uvjetima, ali s 4 puta više proteina. S obzirom da je povećana količina proteina koja je vezana na kolonu, smanjeno je razlučivanje kolone te nije dobivena ni jedna homogena frakcija. Pročišćavanje je napravljeno i na većoj koloni (HiPrep Q FF 16/100 *V*(nosača) = 20 mL), ali zadovoljavajuća homogenost uzorka nije dobivena.

4.1.4. Kinetička svojstva

U svrhu dodatne karakterizacije hidrolitičke aktivnosti *Bt*DPP III, određeni su kinetički parametri divljeg tipa *Bt*DPP III, pročišćenog afinitetnom kromatografijom i gel-filtracijom, uz tri supstrata: Arg_2-2NA, Ala-Arg-2NA i Phe-Arg-2NA (tablica 4.2). Supstrati su odabrani na temelju prijašnjih rezultata objavljenih na *Bt*DPP III, ljudskoj i kvaščevoj DPP III[21,107,108]. Pokazali su se korisnima u diskriminaciji supstratne specifičnosti ljudskog i kvaščevog ortologa. Naime, pokazano je da kvaščeva DPP III, za razliku od ljudske, ne preferira sintetski supstrat kojem je aminokiselinski ostatak arginina na položaju P2[107]. Također, pokazano je da

Asp496, smješten u podmjestu S2 ljudske DPP III, ima vrlo važnu ulogu u selektivnosti Arg_2-2NA supstrata. Poravnavanjem struktura kvaščeve i ljudske DPP III, utvrđeno je da se na položaju aminokiselinskog ostatka Asp496 u kvaščevoj DPP III nalazi aminokiselinski ostatak Gly505[108]. Sravnjivanjem primarnih struktura ljudske i *Bt*DPP III, utvrđeno je da *Bt*DPP III sadrži aminokiselinski ostatak Asp465, koji odgovara aminokiselinskom ostatku Asp496 u ljudskoj DPP III. Određivanjem kinetičkih parametara u ovom doktorskom radu potvrđeno je da *Bt*DPP III preferira Arg_2-2NA (tablica 4.2). Katalitička efikasnost (k_{cat}/K_m) *Bt*DPP III bila je za taj supstrat 8 puta veća od Ala-Arg-2NA i 29 puta veća od katalitičke efikasnosti za hidrolizu Phe-Arg-2NA.

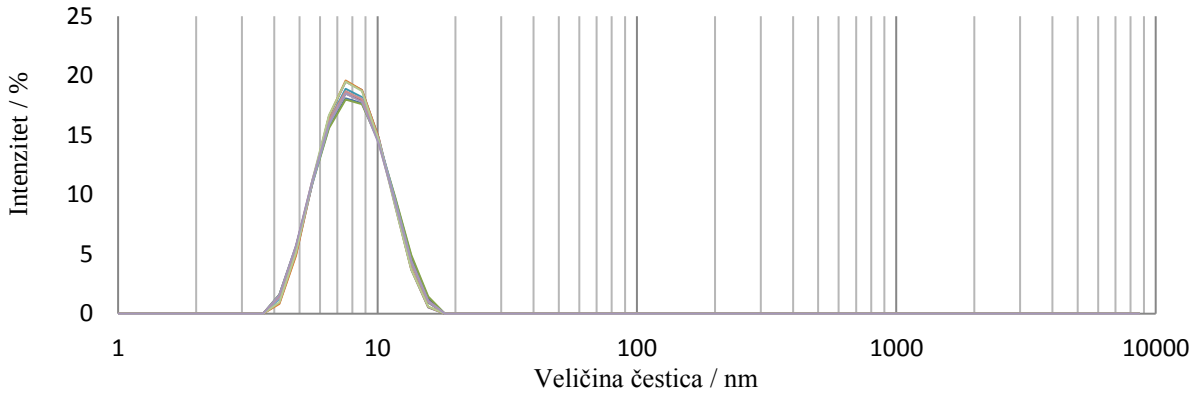
Tablica 4.2. Rezultati kinetičke analize divljeg tipa *Bt*DPP III.

Supstrat	K_m / μmol L^{-1}	k_{cat} / s^{-1}	k_{cat} / K_m / $mmol^{-1}$ L s^{-1}
Arg_2-2NA	0,359 ± 0,030	0,384 ± 0,009	1070
Ala-Arg-2NA	3,87 ± 0,20	0,537 ± 0,008	139
Phe-Arg-2NA	4,85 ± 0,37	0,178 ± 0,004	36,8

Katalitička efikasnost *Bt*DPP III je 9 puta manja od ljudske DPP III uz supstrat Arg_2-2NA (k_{cat}/K_m = 521,5 $mmol^{-1}$ L s^{-1}), 14 puta manja uz Phe-Arg-2NA (k_{cat}/K_m = 9318,2 $mmol^{-1}$ L s^{-1}) i podjednaka uz Ala-Arg-2NA (k_{cat}/K_m = 180,9 $mmol^{-1}$ L s^{-1})[107]. U oba slučaja veći utjecaj na katalitičku efikasnost ima Michaelisova konstanta K_m. Iako oba enzima najefikasnije kataliziraju hidrolizu supstrat Arg_2-2NA, što se može objasniti već spomenutim aminokiselinskim ostatkom asparaginske kiseline u podmjestu S2, ljudska DPP III od ostala dva supstrata preferira Phe-Arg-2NA, dok *Bt*DPP III preferira Ala-Arg-2NA. Navedena razlika proizlazi iz razlike u aminokiselinskim ostacima podmjesta S2 ljudske i bakterijske DPP III[82]. S druge strane, kvaščeva DPP III ne preferira Arg_2-2NA (k_{cat}/K_m = 15,0 $mmol^{-1}$ L s^{-1}) i katalitička efikasnost joj je 71 puta manja od *Bt*DPP III uz taj supstrat. Iako kavščeva DPP III preferira Phe-Arg-2NA (k_{cat}/K_m = 32,5 $mmol^{-1}$ L s^{-1}), katalitička efikasnost joj je gotovo jednaka kao i za *Bt*DPP III, a 2,2 puta je manja uz Ala-Arg-2NA (k_{cat}/K_m = 16,7 $mmol^{-1}$ L s^{-1})[107]. Ukratko, može se zaključiti da s ispitanim sintetskim supstratima najveću katalitičku efikasnost ima ljudska DPP III nakon koje je bakterijska, dok kvaščeva DPP III ima značajno manju katalitičku efikasnost.

4.1.5. DLS analiza i inicijalni kristalizacijski eksperimenti

Prije početka kristalizacije, afinitetnom kromatografijom i gel-filtracijom pročišćeni proteinski uzorak *Bt*DPP III analiziran je metodom DLS (slika 4.8). Utvrđeno je da je proteinski uzorak homogen s obzirom na veličinu čestica, prosječnog promjera molekule od 83 Å. Dobivena veličina molekula se može usporediti sa kristalnim strukturama otvorene konformacije ljudske[31] i kvaščeve[30] DPP III koje su opisane kao izdužene molekule dimenzija 75 Å x 60 Å x 50 Å.



Slika 4.8. Raspodjela veličine molekula proteina DPP III po intenzitetu na 18 °C. Različitim bojama je prikazano deset uzastopnih mjerenja na istom uzorku. Vrijednosti na apscisi su prikazane logaritamskom skalom.

Početni kristalizacijski eksperimenti dizajnirani su na temelju objavljenih kristalizacijskih eksperimenata ljudske[31] i kvaščeve[30] DPP III. Kristali ljudske DPP III dobiveni su u kristalizacijskom uvjetu sastava: 20 % w/v PEG 3350 i 0,2 mol L^{-1} magnezijev formijat, a kristali kvaščeve DPP III u 20 % w/v PEG 3350, 0,9 mol L^{-1} $MgCl_2$ i 0,1 mol L^{-1} Tris-HCl pH 7,0. S obzirom da su kristalizacijski uvjeti ljudske i kvaščeve DPP III slični, pripremljene su kristalizacijske otopine koje sadrže $MgCl_2$ koncentracije od 0,2 do 1,1 mol L^{-1}, 10-30 % w/v PEG 3350 i 0,1 mol L^{-1} Tris-HCl pH 7,0. Kristalizacijski eksperiment napravljen je s uzorkom *Bt*DPP III koncentracije 14,5 mg mL^{-1}. Kristalizacija je postavljena ručno u VDX ploče tehnikom viseće kapi. Volumen kapi iznosio je 3 µL (1,5 µL proteinskog uzoraka i 1,5 µL kristalizacijske otopine), a volumen otopine za kristalizaciju u spremniku iznosio je 1 mL. Međutim, u tim uvjetima nisu dobiveni kristali proteina *Bt*DPP III.

S obzirom da početnim kristalizacijskim eksperimentom nisu dobiveni kristali *Bt*DPP III, sljedeći kristalizacijski eksperiment je proveden pomoću robota za kristalizaciju s istim proteinski uzorkom. Korišteni su kristalizacijski kompleti: Index, Morpheus, JCSG+ i

PEG/Ion. Korištenjem navedenih kompleta testirano je ukupno 386 različitih kristalizacijskih uvjeta, ali nije dobiven kristal proteina *Bt*DPP III.

4.2. Mutanti proteina DPP III iz *Bacteroides thetaiotaomicron*

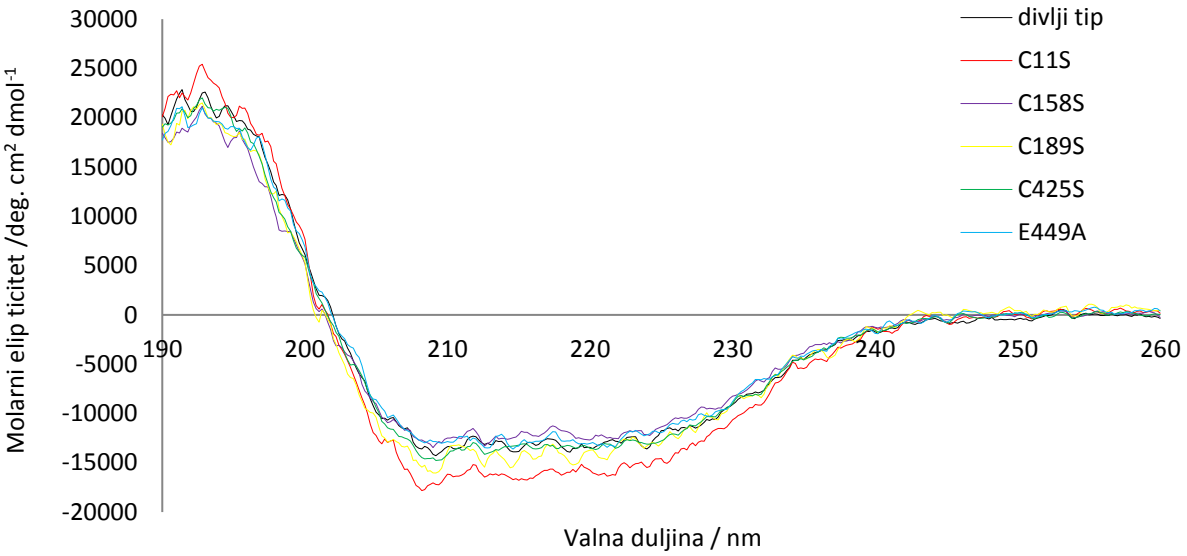
4.2.1. Kloniranje, ekspresija i pročišćavanje

Analiza izoelektričnim fokusiranjem pokazala je postojanje tri oblika proteina *Bt*DPP III (slika 4.5) za koje smo pretpostavili da se razlikuju u stupnju oksidacije. Kako bi odredili koji cisteinski ostaci su odgovorni za nastajanje tri proteinske forme, usmjerenom mutagenezom priređeni su mutirani oblici *Bt*DPP III u kojima je svaki ostatak cisteina pojedinačno zamijenjen aminokiselinom serin. Priređeni su: C11S, C158S, C189S, C425S i C450S. Osim cisteinskih mutanata, priređen je i mutirani oblik *Bt*DPP III u kojem je Glu449 zamijenjen alaninom. Navedena glutaminska kiselina nalazi se u prvom strukturnom motivu (H^{448}**E**CLGH) i po analogiji s ljudskom[31] i kvaščevom[30] DPP III pretpostavljeno je da ima esencijalnu funkciju u katalitičkoj aktivnosti enzima, pa bi uvođenje navedene mutacije trebalo inaktivirati *Bt*DPP III.

Prekomjerna ekspresija svih mutiranih oblika proteina izvedena je isto kao i za divlji tip *Bt*DPP III. Pročišćavani su afinitetnom kromatografijom, a tijek pročišćavanja praćen je SDS-elektroforezom. Svi pročišćeni cisteinski mutanti su odsoljeni u puferu sastava: 50 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 7,4, 100 mmol L^{-1} NaCl i glicerol (φ = 0,22), te su pohranjeni na -8 °C. Mutant E449A je dodatno pročišćen gel-filtracijom zbog korištenja u kristalizacijskim eksperimentima. Dobivene frakcije su ugušćene do 23,5 mg L^{-1} i pohranjene na -80 °C.

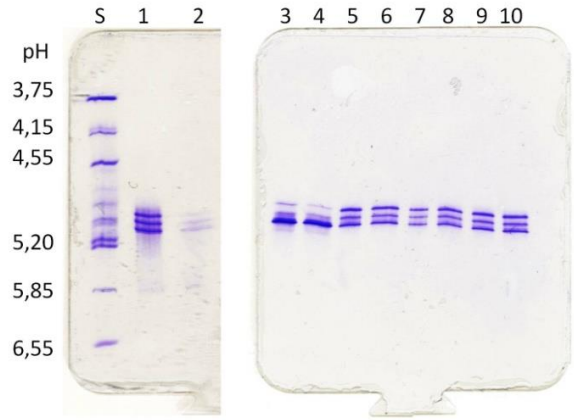
4.2.2. Analiza mutanata

CD analiza korištena je za određivanje i uspoređivanje sekundarne strukture divljeg tipa *Bt*DPP III i njenih mutanata. Dobiveni su gotovo jednaki CD spektri za divlji tip enzima i mutante C158S, C189S, C425S i E449A (slika 4.9). Uočena je vrlo mala razlika u CD spektru mutanta C11S. Analizom sekundarne strukture proteina iz dobivenih CD spektara, određen je udio α-zavojnica i β-nabranih ploča za svaki uzorak. Divlji tip i svi mutanti osim C11S sadrže između 40 i 43 % α-zavojnica i 10 do 13 % β-nabranih ploča. Mutant C11S sadrži veći udio α-zavojnica, 53 %, a manji udio β-nabranih ploča, 8 %.



Slika 4.9. CD spektar divljeg tipa i mutanata *Bt*DPP III.

Homogenost uzoraka pročišćenih mutanata proteina *Bt*DPP III analizirana je IEF-om (slika 4.10). Uočeno je da je uzorak mutanta C11S manje heterogen od divljeg tipa. Sadrži jednu proteinsku formu (pI 5,09) u većoj koncentraciji, ali su i ostale dvije još uvijek prisutne. Također, mala razlika je uočena u slučaju mutanta C450S, gdje su dvije proteinske forme (pI 5,09 i 5,03) prisutne u većim koncentracijama. Ostali mutanti sadrže sve tri proteinske forme u omjeru koji je gotovo jednak divljem tipu. Dobiveni rezultat ukazuje da heterogenost uzorka divljeg tipa *Bt*DPP III nije uzrokovana oksidacijom samo jednog cisteinskog ostatka već vjerojatno oksidacijom više njih.



Slika 4.10. Analiza pročišćenih cisteinskih mutanata proteina *Bt*DPP III IEF-om. S – proteinski standardi; 1 – divlji tip *Bt*DPP III; 2 – mutant C450S; 3-4 – mutant C11S; 5-6– mutant C158S; 7-8–mutant C189S; 9-10 – mutant C425S.

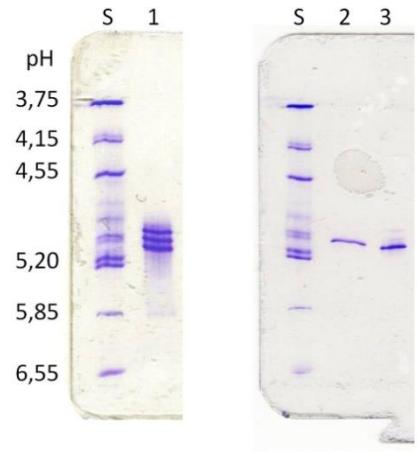
Svim pripremljenim mutantima proteina *Bt*DPP III određena je specifična aktivnost standardnim testom (tablica 4.3). Kao što je bilo očekivano, mutant E449A je gotovo potpuno izgubio enzimsku aktivnost što ukazuje na istu funkciju tog ostatka glutaminske kiseline kao i u ljudskoj i kvaščevoj DPP III. Cisteinski mutant C450S ima 17 puta manju aktivnost od divljeg tipa. Smanjena aktivnost C450S mutanta već je od prije poznata iz rada B. Vukelić i suradnika[21]. Navedeni cisteinski ostatak pozicioniran je u aktivnom mjestu, u prvom očuvanom motivu ($H^{448}E$**C**LGH), koji veže cinkov ion, ali nije utvrđen točan mehanizam njegovog sudjelovanja u enzimskoj reakciji. Ostali cisteinski mutanti imaju sličnu specifičnu aktivnost kao i divlji tip *Bt*DPP III, te se može pretpostaviti da nemaju direktan utjecaj na aktivnost enzima.

Tablica 4.3. Specifična aktivnost mutanata proteina *Bt*DPP III.

Uzorak	Specifična aktivnost /μmol min^{-1} mg^{-1}
C11S	1,71
C158S	1,36
C189S	1,22
C425S	1,48
C450S	0,11
E449A	0,0012

4.2.3. Cys-null Bt*DPP III*

S obzirom da svim dosad opisanim postupcima nije priređen homogen proteinski uzorak, pripremljen je novi mutant proteina *Bt*DPP III u kojem je svih pet cisteinskih ostataka zamijenjeno serinskim ostacima – Cys-null DPP III. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje su izvedeni isto kao i za divlji tip *Bt*DPP III. Frakcije nakon gel-filtracije su spojene i ugušćene do 15,0 mg mL^{-1}, te pohranjene na - 80 °C. Dobiveni uzorak analiziran je IEF-om (slika 4.11). Kao što je vidljivo na gelu nakon IEF-a, uzorak Cys-null DPP III je gotovo homogen i sadrži jednu dominantnu proteinsku vrpcu s izoelektričnom točkom na pH 5,09 iznad koje su vrlo slabo vidljive još dvije proteinske vrpce. S obzirom da uzorak sadrži sve tri proteinske vrste, bez obzira što nisu više istog intenziteta, možemo zaključiti da oksidacija cisteinskih ostataka nije razlog zbog kojeg nastaju tri proteinske forme. Ipak, omjer proteinskih formi ovisi o cisteinskim ostacima, ali nije utvrđeno na koji način.



Slika 4.11. Analiza Cys-null mutanta proteina *Bt*DPP III IEF-om. S – proteinski standardi; 1 – divlji tip *Bt*DPP III; 2-3 – Cys-null DPP III.

4.3. Kristalizacija i određivanje 3D-strukture DPP III

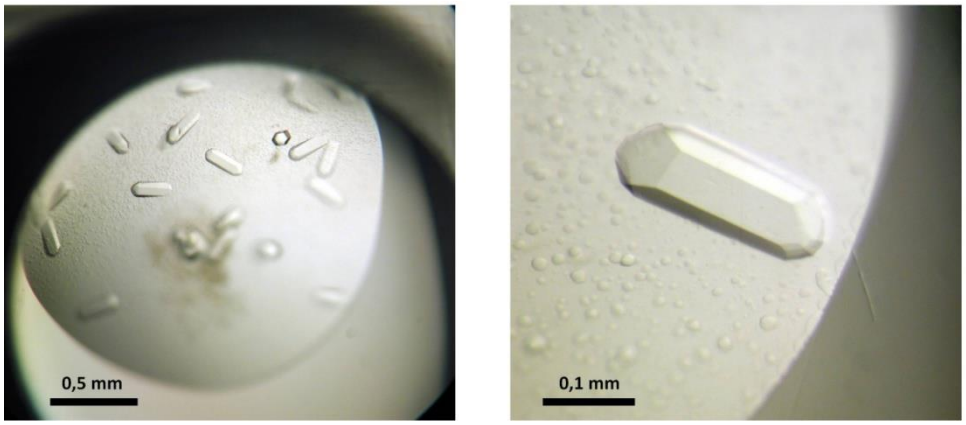
4.3.1. Kristalizacija i pokušaji rješavanja strukture proteina Cys-null DPP III

Postavljena je kristalizacija pomoću robota za kristalizaciju s proteinskim uzorkom Cys-null DPP III. Korišteni su kristalizacijski kompleti: Index, Morpheus, Midas i PEG/Ion. Nakon tri tjedna, narasla su dva proteinska kristala u kristalizacijskom uvjetu Midas G7 sastava: 0,2 mol L^{-1} amonijev acetat, 0,1 mol L^{-1} MES pH 6,5 i 30 % v/v glicerol etoksilat. S jednim od njih snimljen je skup podataka do razlučivanja 1,9 Å pri valnoj duljini 1,28216 Å. Odabrana valna duljina se nalazi na apsorpcijskom maksimum atoma cinka što je neophodno za mjerenje anomalnog signala. Određena je prostorna grupa, $P3_121$, s parametrima jedinične ćelije: a = 103,61 Å, b = 103,61 Å, c = 141 Å, $\alpha = \beta = 90°$ i $\gamma = 120°$. Nakon obrade podataka utvrđeno je da intenzitet anomalnog signala nije dovoljno velik za rješavanje kristalne strukture pomoću metode SAD. Dobiveni rezultat nije iznenađujući s obzirom da DPP III sadrži samo jedan ion cinka na 675 aminokiselina.

S obzirom da podaci nisu bili dovoljno dobri za rješavanje strukture metodom SAD, pokušalo ju se riješiti metodom molekulske zamjene. U pokušajima rješavanja su korišteni modeli pripremljeni na temelju kristalnih struktura ljudske[31] i kvaščeve[30] DPP III (PDB kodovi: 3FVY, 3T6B i 3CSK), pomoću servera Phyre2[109] i SWISS-MODEL[110]. Kristalnu strukturu Cys-null DPP III nije bilo moguće riješiti metodom molekulske zamjene zbog nedostatka dovoljno sličnog modela. Programom Clustal Omega[111] je određena identičnost sekvence *Bt*DPP III s ljudskom (20,6 %) i s kvaščevom (17,4 %) DPP III.

4.3.2. Kristalizacija i kokristalizacija proteina Se-Met Cys-null i divljeg tipa DPP III

Budući da se uspjelo kristalizirati Cys-null mutant *Bt*DPP III, a računalnom metodom nije bilo moguće riješiti strukturu, prišlo se ugradnji Se-Met u protein. Uzgoj i prekomjerna ekspresija proteina Se-Met Cys-null napravljena je kao što je opisano u poglavlju 3.4.1. Protein je pročišćen afinitetnom kromatografijom i gel-filtracijom. Dobivene frakcije su spojene i ugušćene do koncentracije 29,1 mg mL^{-1}. S tako pripremljenim uzorkom je postavljena kristalizacija pomoću robota za kristalizaciju. Korišteni su kristalizacijski kompleti: Index, Morpheus, Midas, JCSG+, PACT i PEG/Ion. Kao i za uzorak Cys-null, nakon nekoliko tjedana kristali su narasli u uvjetu Midas G7. Također su dobiveni mikrokristali u uvjetu Midas H4 sastava: 0,2 mol L^{-1} amonijev klorid, 0,1 mol L^{-1} HEPES pH 7,5, 25 % v/v glicerol etoksilat. Za pronalaženje novih kristalizacijskih uvjeta upotrebljena je metoda mikrosijanja kao što je opisano u poglavlju 3.6.1. Kristali proteina Se-Met Cys-null DPP III narasli su u tri nova uvjeta (slika 4.12). Pronađeni novi kristalizacijski uvjeti bili su: JCSG+ E2 (0,2 mol L^{-1} NaCl, 0,1 mol L^{-1} natrijev kakodilat pH 6,5 i 2,0 mol L^{-1} $(NH_4)_2SO_4$), JCSG+ C10 (0,1 mol L^{-1} bicine, 10 % w/v PEG 20 000 i 2 % v/v dioksan, pH 9,0) i JCSG+ G11 (0,1 mol L^{-1} Bis-Tris pH 5,5 i 2,0 mol L^{-1} $(NH_4)_2SO_4$).



Slika 4.12. Kristali proteina Se-Met Cys-null DPP III dobiveni u kristalizacijskom uvjetu JCSG+ E2. Lijevo je slika cijele kapi, a desno je uvećani prikaz jednog kristala.

Kristalizacija divljeg tipa proteina DPP III i kokristalizacija su napravljene na način opisan u poglavlju 3.6.2. Kristali divljeg tipa proteina dobiveni su u kristalizacijskom uvjetu JCSG+ E2. Iako je postavljeno ukupno 48 kapi s kristalizacijskim uvjetima u kojima su prethodno dobivani kristali proteina Se-Met Cys-null DPP III (Midas G7, JCSG+ E2, C10 i G11), kristali divljeg tipa proteina su dobiveni samo u jednoj kapi. Dobiveni kristali imali su sličan

habitus kao i kristali Se-Met Cys-null DPP III. Pokušaji kokristalizacije rezultirali su jednim jedinim štapićastim kristalom naraslim ponovno u uvjetu JCSG+ E2 i to s konstruktom proteina Se-Met Cys-null DPP III i inhibitorom Tyr-Phe-NHOH. Od svih ostalih kombinacija (tablica 3.9), koje su postavljene u ukupno 191 kapi, nije dobiven niti jedan kristal.

Kako je dobiven samo jedan kristal u kokristalizacijskom eksperimentu i samo nekoliko kristala divljeg tipa DPP III, nadalje je provedena optimizacija kristalizacijskih uvjeta. Tijekom optimizacije varirani su: volumen spremnika, volumen kapi, koncentracija proteina, koncentracija inhibitora, temperatura i koncentracija svih tvari u kristalizacijskoj otopini. Bez obzira na opsežno variranje uvjeta, kristali divljeg tipa kao i kompleksa nisu dobiveni.

4.3.3. Rješavanje 3D-struktura DPP III

Rendgenska difrakcija je testirana na nekoliko kristala proteina Se-Met Cys-null DPP III, te je odabran kristal koji najbolje difraktira i s kojim su sakupljeni podaci do razlučivanja 1,7 Å pri valnoj duljini 0,97180 Å. Analizom dobivenih podataka programom XDS[93] utvrđeno je da je snažan signal anomalnog raspršenje prisutan do razlučivanja 2,8 Å. Navedeni signal je bio dovoljan za rješavanje kristalne strukture metodom SAD kako je opisano u poglavlju 3.6.4. Dobiveni model je utočnjen programima REFMAC[98,99] i PHENIX[100]. Program COOT[101] je korišten za ručno utočnjavanje modela, kao i za pojedinačno dodavanje molekula vode, cinkovog iona te molekula iz kristalizacijske otopine koje su se vezale na protein: Tris, acetat, PEG i ion natrija. U zadnjim koracima utočnjavanja korištena je TLS parametrizacija s četiri TLS grupe: 24-328, 329-414, 415-623 i 624-675. Zbog nedostatka elektronske gustoće u završnom modelu nedostaju 23 aminokiseline na *N*-kraju i aminokiseline Glu227, Asp228, Gly229 i Lys230. Zbog istog razloga u sljedećim aminokiselinama nije modeliran bočni ogranak: Lys92, Gln144, Gln177, Lys208, Lys211, Glu213, Lys226, Lys234, Lys282, Lys326, Arg333, Lys352, Lys358, Lys360, Val362, Ser363, Lys365, Glu442, Glu571, Lys606, Lys641 i Asp642.

Od nekoliko dobivenih kristala divljeg tipa DPP III, za snimanje je odabran onaj s najboljom difrakcijom. Snimljeni su eksperimentalni podaci do razlučivanja 2,4 Å. S obzirom da je prethodno riješena struktura Se-Met Cys-null DPP III, ona je korištena kao model za rješavanje strukture divljeg tipa metodom molekulske zamjene. Dobiveni model je utočnjen na isti način kao i Se-Met Cys-null DPP III. Molekule koje su nađene vezane na molekulu DPP III, a potiču iz kristalizacijske otopine su: sulfatni ioni i ion klora. Zbog nedostatka elektronske gustoće u završnom modelu nedostaju 23 aminokiseline na *N*-kraju i

aminokiseline Asp228, Gly229, Gly361, Val362 i Ser363. Isti je razlog izostavljanju bočnih ogranaka sljedećih aminokiselina: Lys101, Glu181, Gln198, Glu213, Lys230, Lys234, Lys282, Lys358, Lys360, His395, Glu571, Lys641 i Asp642.

Jedini kristal dobiven kokristalizacijom snimljen je do razlučivanja 3,29 Å. Struktura je riješena metodom molekulske zamjene, a kao model je korištena struktura proteina Se-Met Cys-null DPP III. Utočnjavanje dobivenog modela je napravljeno isto kao i za divlji tip, ali zbog lošeg razlučivanja nije korištena TLS parametrizacija. Također, zbog lošeg razlučivanja u model nije ugrađena ni jedna molekula vode. Zbog nedostatka elektronske gustoće u završnom modelu nedostaju 24 aminokiselina na *N*-kraju, te bočni ogranci sljedećih aminokiselina: Lys40, Lys92, Lys94, Lys101, Gln136, Glu150, Gln177, Asp179, Gln198, Lys208, Asp209, Lys211, Glu213, Lys230, Lys234, Lys282, Lys352, Lys356, Lys358, Lys360, Lys457, Lys468, Lys552, Glu594, Lys606, Lys620, Lys641 i Asp642.

Za sve tri strukture statistika sakupljenih podataka i utočnjavanja modela prikazana je u tablici 4.4.

Tablica 4.4. Statistika sakupljenih podataka i točnosti modela riješenih struktura. Vrijednosti u zagradama odnose se na ljusku s najvećim razlučivanjem.

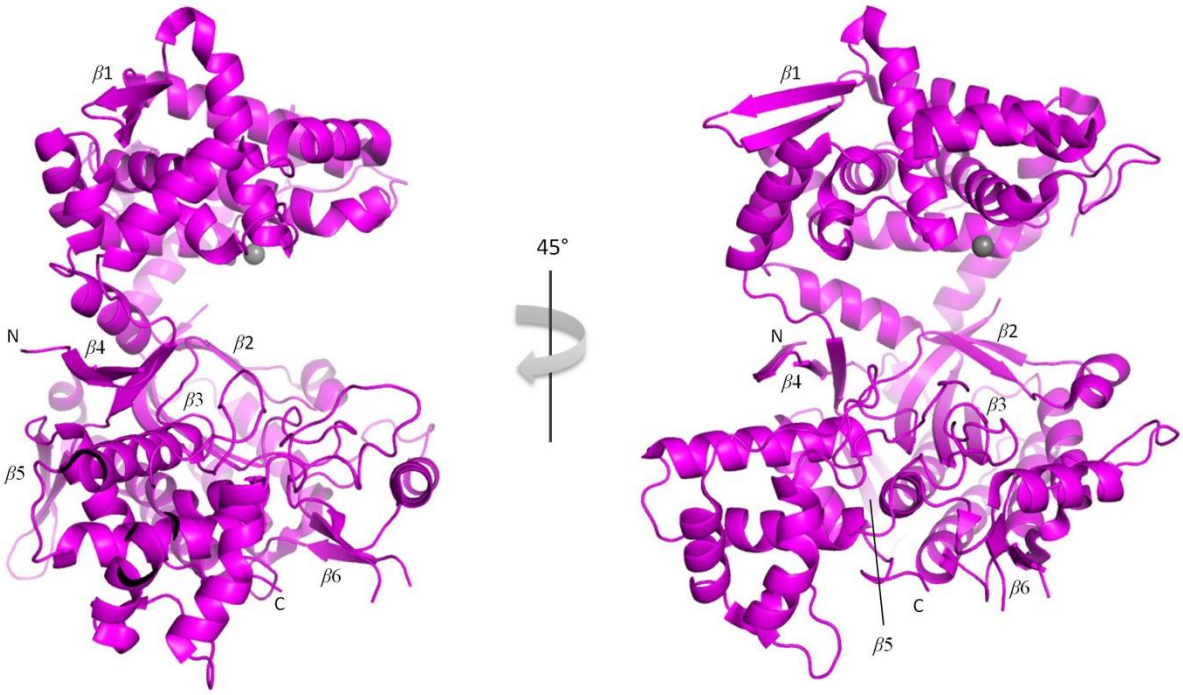
	Divlji tip *Bt*DPP III	Se-Met Cys-null	Zatvorena struktura*
PDB identifikacijski kod	5NA7	5NA6	5NA8
Kristalni parametri			
Razlučivanje / Å	2,4	1,9	3,29
Prostorna grupa	$P3_121$	$P3_121$	$P2_12_12$
Parametri jedinične ćelije			
a, *b*, *c* / Å	103,5, 103,5, 141,0	103,4, 103,4, 141,2	123,6, 176,3, 74,1
α, β, γ / °	90, 90, 120	90, 90, 120	90, 90, 90
Matthews-ov koeficijent / $Å^3Da^{-1}$	2,81	2,83	2,62
Udio otapala / %	56,4	56,5	53,0
Svojstva podataka			
Kompletnost / %	99,9 (99,5)	99,7 (96,6)	99,0 (87,1)
Broj neovisnih refleksa	34694	69127	25217
$I/\sigma(I)$	8,4 (2,8)	15,7 (2,5)	7,8 (3,0)
R_{merge}	0,161 (0,594)	0,087 (0,724)	0,229 (0,592)
$CC_{1/2}$	0,99 (0,822)	0,998 (0,846)	0,974 (0,871)
Redundantnost	5,30 (5,50)	6,90 (6,70)	5,30 (4,50)
Wilson-ov B-faktor / $Å^2$	25,3	25,8	47,3
Utočnjavanje			
R / R_{free}	0,202/0,244	0,173/0,200	0,207/0,251
RMSD duljine veza / Å	0,005	0,008	0,002
Prosječan *B* faktor	29,3	31,3	41,0
Broj molekula u AJ	1	1	2
Broj atoma			
Protein	5173	5154	5100/5098
Cinkov ion	1	1	2
Molekule vode	382	575	0
Ramachandran-ov dijagrama			
Najpovoljnija područja / %	98	98	98
Dopuštena područja / %	2	2	2
Nedopuštena područja / %	0	0	0

* struktura opisana u poglavlju 4.4.2, kristal priređen kokristalizacijom s Tyr-Phe-NHOH.

4.4. Analiza dobivenih struktura DPP III

4.4.1. Struktura Se-Met Cys-null i divljeg tipa proteina DPP III

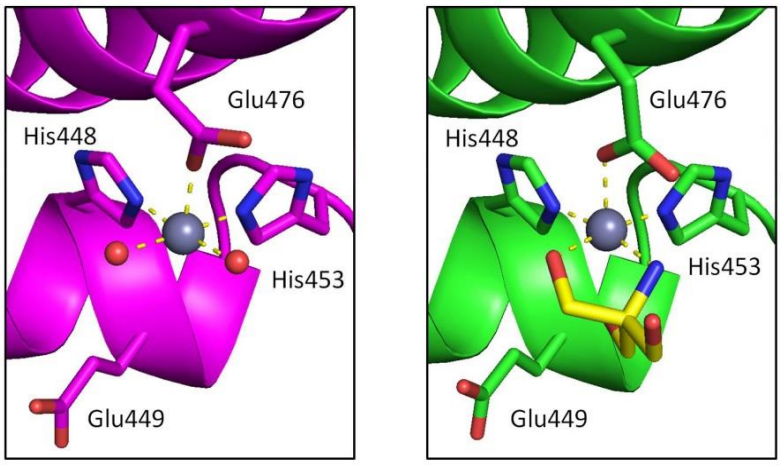
Struktura *Bt*DPP III pripada istoj strukturnoj klasi (isti *fold*) kao ljudska i kvaščeva DPP III. Građena je od dvije strukturne domene odvojene širokim procjepom (slika 4.13). Gornja domena je građena pretežito od α-zavojnica i jedne *β*-nabrane ploče (*β*1). Donju domenu čine dvije paralelne *β*-nabrane ploče u središnjem dijelu (*β*2 i *β*3), okružene α-zavojnicama. U donjoj domeni se nalaze još tri *β*-nabrane ploče (*β*3-*β*6). Ukupni udio α-zavojnica je 46 %, a *β*-nabranih ploča 12 %, što se vrlo dobro slaže s podacima dobivenim CD spektroskopijom.



Slika 4.13. Struktura divljeg tipa *Bt*DPP III. Cinkov ion je prikazan kao siva kuglica. Oznakama *β*1-*β*6 označene su *β*-nabrane ploče. C i N označavaju *C*-kraj i *N*-kraj proteina.

Katalitički ion cinka nalazi se na donjem dijelu gornje domene koordiniran s aminokiselinskim ostacima His448, His453 i Glu476. Dva histidinska ostatka su dio prvog očuvanog heksapeptidnog motiva, **H**^{448}ECLG**H**, a ostatak glutaminske kiseline drugog, E^{475}**E**ARAD. Koordinacijski broj cinkovog iona je pet s geometrijom kvadratne piramide. Na preostala dva mjesta u strukturi divljeg tipa su koordinirane dvije molekule vode, a u strukturi Se-Met Cys-null na ta mjesta je bidetantno vezana molekula Tris-a (slika 4.14). Osim razlike u aktivnom mjestu, strukture proteina Se-Met Cys-null i divljeg tipa gotovo su jednake (RMSD okosnice proteina iznosi 0,15 Å), te će u daljnjem tekstu naglasak biti na strukturi

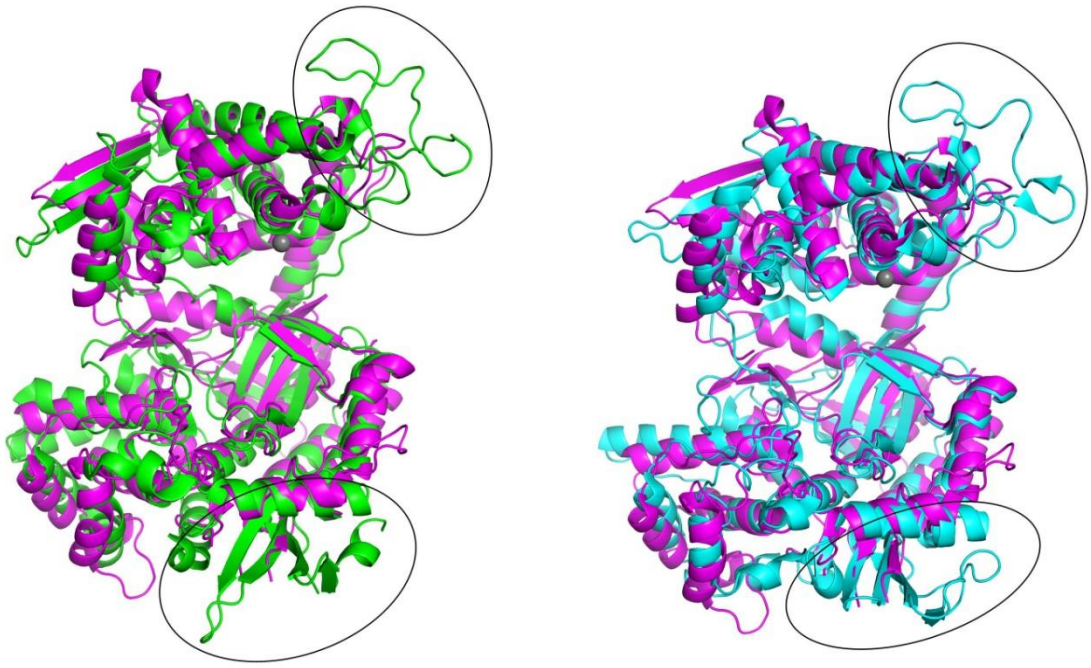
divljeg tipa *Bt*DPP III. Interesantno je da je ion cinka u strukturama proteina *Bt*DPP III pentakoordiniran, s tri aminokiselinska ostatka i dvije molekule vode ili molekulom Tris-a. S druge strane, u strukturama ljudske i kvaščeve DPP III ion cinka je tetrakoordiniran s ista tri aminokiselinska ostatka ali samo s jednom molekulom vode. Također, ostatak glutaminske kiseline koji služi kao baza u aktivaciji molekule vode u strukturi *Bt*DPP III nije usmjeren prema molekulama vode kao u strukturama ljudske i kvaščeve DPP III (slike 2.5 i 4.14). Bez obzira na usmjerenost ostatka glutaminske kiseline, njegova uloga u mehanizmu katalitičke reakcije je vrlo vjerojatno jednaka kao i u ljudskoj DPP III, što je pokazano mutacijom E449A pri kojoj enzim gotovo potpuno gubi aktivnost.



Slika 4.14. Mjesto za vezanje cinkovog iona u proteinu divljeg tipa (lijevo) i Se-Met Cys-null (desno). Štapićima su prikazane aminokiseline koje koordiniraju cinkove ione, ostatak glutaminske kiseline bitne za enzimsku aktivnost i molekula Tris-a obojena žuto. Sivom kuglicom je označen ion cinka, a crvenim molekule vode.

Kako bi dodatno analizirali utjecaj Tris-a na aktivnost proteina (s obzirom da je vezan na katalitički ion cinka), napravljeni su standardni testovi aktivnosti s divljim tipom *Bt*DPP III. Jedan alikvot proteina je dijaliziran u fosfatni pufer sastava: 50 mmol L^{-1} NaH_2PO_4 pH 8,0 i 100 mmol L^{-1} NaCl, a drugi alikvot u pufer HEPES sastava: 50 mmol L^{-1} HEPES pH 8,0 i 100 mmol L^{-1} NaCl. Utvrđeno je da sastav pufera u kojem se nalazi protein ne utječe na aktivnost, ali pufer u kojem je napravljen test aktivnosti utječe. Aktivnost proteina *Bt*DPP III je 3,5 puta veća u puferu HEPES i 2 puta veća u fosfatnom puferu nego što je u Tris-u. Dobiveni podaci ukazuju da se zbog vezanja molekule Tris-a na katalitički ion cinka smanjuje efikasnost hidrolize sintetskog supstrata Arg_2-2NA.

Za nalaženje sličnih struktura, PDB baza podataka je pretražena uz pomoć servera PDBeFold[112] i strukture divljeg tipa *Bt*DPP III. Nije pronađena ni jedna nova struktura osim već spomenutih, ljudske[31,32] i kvaščeve[30] DPP III, ortologa iz porodice metalopeptidaza M49. Preklapanjem divljeg tipa *Bt*DPP III s ljudskom, dobivena je vrijednost RMSD okosnica proteina 4,41 Å. Ovako visoka vrijednost je posljedica razlike u veličini rascijepa između dviju domena ljudske i bakterijske DPP III. Naime, u ljudskoj DPP III domene su više razmaknute čineći veći procjep među njima. Kako bi se izbjegao taj problem i bolje preklopile strukture, korišten je program PyMol[52] u kojem je *Bt*DPP III podijeljena na gornju (aminokiseline: 328-364 i 404-626) i donju (aminokiseline: 24-327, 365-403 i 627-675) domenu. Tretirajući svaku domenu kao zaseban objekt, gornja i donja domena su preklopljene s odgovarajućim domenama ljudske i kvaščeve DPP III (slika 4.15). Preklapanjem domena na opisan način dobivene su znatno manje vrijednosti RMSD okosnica proteina, 3,0 Å za gornje i 2,0 Å za donje domene.



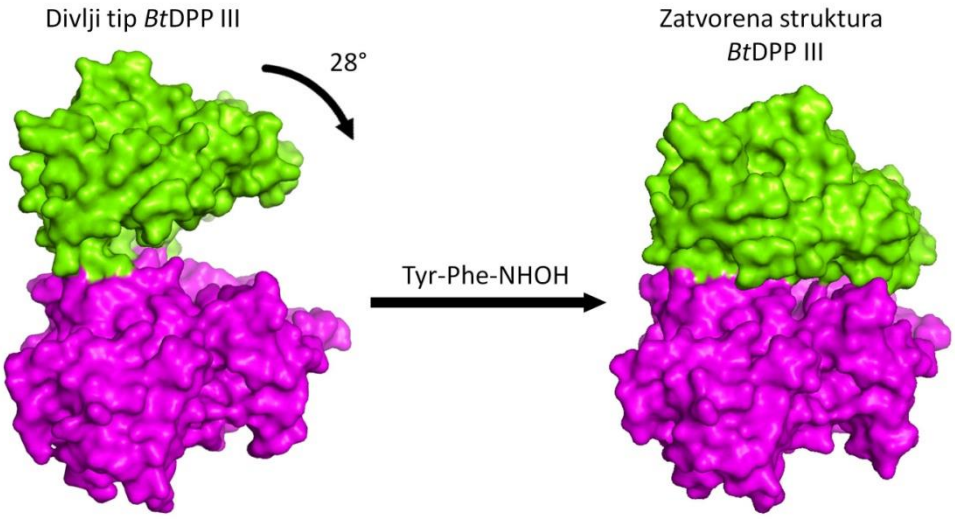
Slika 4.15. Preklopljene strukture divljeg tipa proteina *Bt*DPP s ljudskom (lijevo) i kvaščevom DPP III (desno). Purpurnocrvenom bojom je obojana struktura *Bt*DPP III, zelenom ljudska, a tirkiznom kvaščeva DPP III. Crne elipse ukazuju na područja dviju glavnih razlika između preklopljenih struktura.

Preklapanjem struktura otkrivene su dvije značajne razlike između bakterijske i ljudske DPP III. Prva razlika je u petlji u gornjoj domeni koju čine aminokiseline između dva

očuvana motiva koja vežu katalitički ion cinka. U strukturi *Bt*DPP III navedena petlja je za 30 aminokiselina kraća u usporedbi s ljudskom. U ljudskoj DPP III opisana petlja je vrlo fleksibilna i sadrži E^{480}TGE motiv koji se smatra vrlo važnim za interakciju s Keap1 proteinom i aktivaciju signalnog puta Keap1-Nrf2[23]. *Bt*DPP III ne sadrži takvu petlju ni ETGE motiv. Druga razlika je u donjoj domeni u *β*6-nabranoj ploči. Navedena *β*-nabrana ploča u *Bt*DPP III je građena od tri antiparalelne *β*-vrpce (aminokiseline: 221-242), dok je u ljudskoj DPP III građena od četiri antiparalelne *β*-vrpce i α-zavojnice (aminokiseline: 197-251). Razlika u ukupnoj duljini između *Bt*DPP III (675 aminokiselina) i ljudske DPP III (737 aminokiselina) iznosi 62 aminokiseline, što odgovara razlici u duljinama dviju navedenih regija. S obzirom da su ljudska i kvaščeva DPP III vrlo slične (RMSD okosnica proteina iznosi 1,36 Å), uočene su iste razlike i između *Bt*DPP III i kvaščeve DPP III.

4.4.2. Struktura Bt*DPP III u zatvorenoj konformaciji*

Struktura u zatvorenoj konformaciji dobivena je kokristalizacijom proteina Se-Met Cys-null DPP III s inhibitorom Tyr-Phe-NHOH (slika 4.16). Prilikom zatvaranja proteina DPP III gornja i donja domena se međusobno približavaju smanjujući procjep među njima čime struktura postaje globularnija.

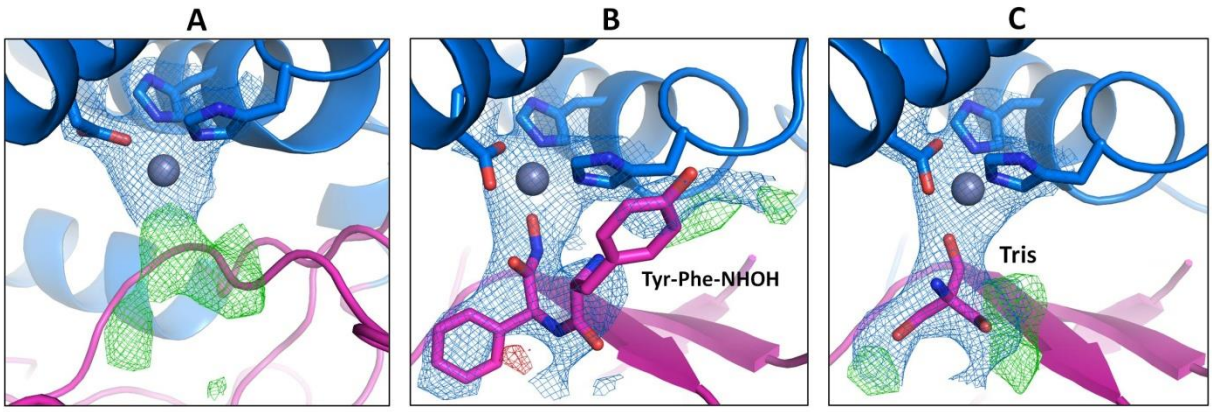


Slika 4.16. Prikaz konformacijske promjene između divljeg tipa i zatvorene strukture *Bt*DPP III. Purpurnocrvenom je označena donja domena, a zeleno gornja domena proteina.

Pomoću programa DynDom[75,76] je opisana konformacijska promjena kao rotacija od 26° između dva kruta tijela, gornje i donje domene, sa zanemarivim translacijskim pomakom.

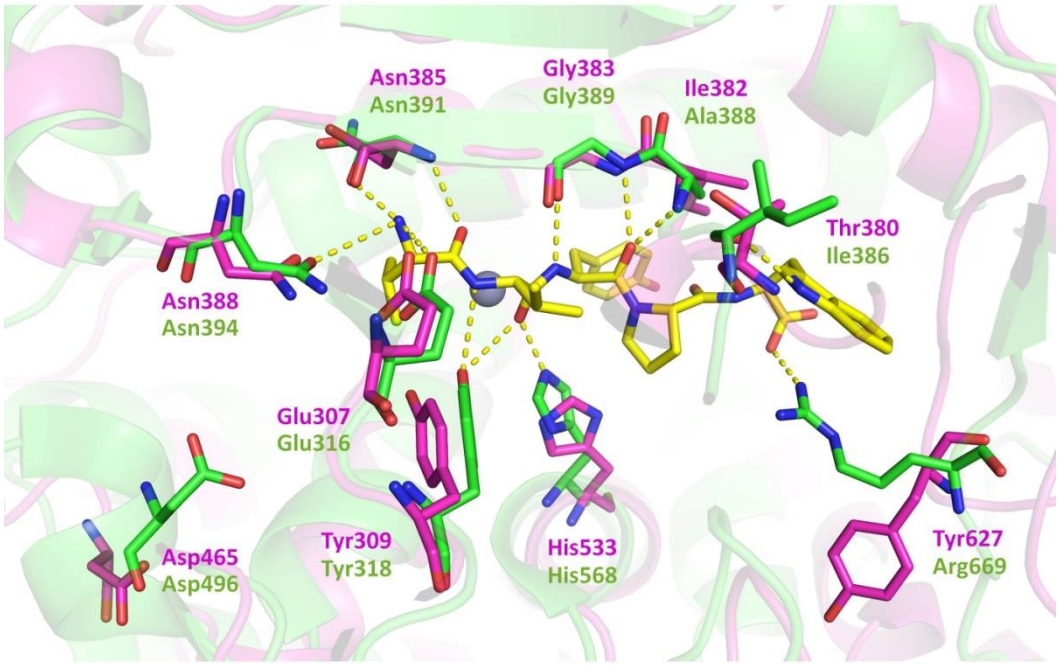
Preklapanjem odgovarajućih domena divljeg tipa i zatvorene strukture izmjeren je RMSD okosnice proteina. Za gornje domene iznosi 0,40 Å, a za donje 0,25 Å, što ukazuje na rigidnost domena. Programom DynDom je određena i zglobna regija: aminokiseline 330-334, 357-366, 414-418, i 618-623. Dobiveni rezultati su vrlo slični onima uočenim kod konformacijske promjene u ljudskoj DPP III nakon vezanja peptidnog supstrata[31,32]. Za razliku od *Bt*DPP III, rotacija prilikom konformacijske promjene u ljudskom enzimu je znatno veća i iznosi 57°. Navedena razlika u konformacijskim promjenama, posljedica je razlike u fleksibilnosti otvorenih struktura bakterijske i ljudske DPP III, bez vezanog liganda. Naime, ljudska otvorena struktura je „otvorenija“ (ima širi procjep) od bakterijske, dok su zatvorene strukture vrlo slične.

U zatvorenoj strukturi kao i u divljem tipu *Bt*DPP III cinkov ion je također koordiniran s aminokiselinama His448, His453 i Glu476. Umjesto dvije molekule vode koje su koordinirane na cinkov ion u divljem tipu, u zatvorenoj strukturi je opažena velika nedefinirana elektronska gustoća (slika 4.17A). Kako su kristali proteina sa zatvorenom strukturom dobiveni u kokristalizacijskom eksperimentu s inhibitorom Tyr-Phe-NHOH, ta je molekula modelirana u postojeću elektronsku gustoću u aktivnom mjestu. Međutim, nakon nekoliko ciklusa utočnjavanja i testiranja različitih orijentacija inhibitora, utvrđeno je da je elektronska gustoća premala za smještaj cijelog inhibitora (slika 4.17B). Čak ni uz pretpostavku djelomične zaposjednutosti inhibitora u aktivnom mjestu nije dobiven zadovoljavajući rezultat. S obzirom da je u strukturi proteina Se-Met Cys-null DPP III pronađena molekula Tris-a vezana na ion cinka, u nedefiniranu elektronsku gustoću pokušalo se i nju ugraditi. Nakon nekoliko ciklusa utočnjavanja i to se pokazalo neadekvatnim (slika 4.17C). Pokušaji s ostalim kemijskim tvarima prisutnim u kristalizacijskoj otopini (natrijev kakodilat i amonijev sulfat) također nisu dali rezultata. S obzirom da je razlučivanje zatvorene strukture samo 3,3 Å, te da elektronska gustoća nije dobro definirana, nije bilo moguće utvrditi što je prisutno u aktivnom mjestu proteina.



Slika 4.17. Prikaza aktivnog mjesta u zatvorenoj strukturi *Bt*DPP III. Plavo je prikazana diferencijalna mapa $2mF_o$ - DF_c (na razini 1,0 σ), a zeleno je prikazana diferencijalna mapa $2mF_o$ - DF_c (na razini 3,0 σ). Gornja domena je prikazana plavo, a donja purpurnocrveno. Štapićima su prikazane aminokiseline koje vežu cinkov ion (siva kuglica), Tyr-Phe-NHOH i molekula Tris-a. (**A**) Elektronska gustoća u aktivnom mjestu. (**B**) Elektronska gustoća nakon nekoliko ciklusa utočnjavanja s inhibitorom. (**C**) Elektronska gustoća nakon nekoliko ciklusa utočnjavanja s molekulom Tris-a.

Nedavno su objavljene kristalne strukture neaktivnog mutanta E451A ljudske DPP III u kompleksu s tri opoidna peptida (Met- i Leu-enkafalin i endomorfin) i vazokonstriktorom angiotenzinom II[32]. Na temelju struktura tih kompleksa, autori su predložili generalni način vezanja peptida na ljudsku DPP III[32]. *N*-kraj supstrata ostvaruje višestruki polarni kontakt s proteinom kao i nekoliko kontakata s *β*-vrpcom iz *β*2-nabrane ploče enzima. Kako u zatvorenoj strukturi *Bt*DPP III nije vidljiv Tyr-Phe-NHOH, nije moguće analizirati interakcije između ovog bakterijskog proteina i tog inhibitora. Zbog toga je uspoređena zatvorena struktura *Bt*DPP III s ljudskom DPP III u kompleksu s pentapeptidom tinorfinom (slika 4.18). Preklapanjem tih struktura uočeno je da je većina aminokiselina koje ostvaruju kontakt s pentapeptidom strukturno očuvana u bakterijskoj DPP III. Iznimke su aminokiselinski ostaci: Ile386, Ala388 i Arg669 kojima odgovaraju Thr380, Ile382 i Tyr627 u *Bt*DPP III. Na temelju ove analize se može zaključiti da *Bt*DPP III također ima potencijal vezanja oligopeptida. U kvaščevoj DPP III, u usporedbi s ljudskom, sve navedene aminokiseline su strukturno očuvane osim aminokiselinskog Asp496, kojem u kvaščevom enzimu odgovara Gly505. Preklapanjem ljudske i bakterijske DPP III (slika 4.18), utvrđeno je da aminoksielinski ostatak Asp465 u *Bt*DPP III je na istom položaju kao i Asp496 u ljudskoj DPP III za koji je poznato da određuje selektivnost DPP III prema supstratu Arg_2-2NA[107].



Slika 4.18. Preklopljeno aktivno mjesto zatvorene strukture enzima *Bt*DPP III (obojana purpurnocrveno) i ljudske DPP III (obojana zeleno) u kompleksu s tinorfinom (obojan žuto). Štapićima su prikazane aminokiseline koje ostvaruju vodikove veze (žuta crtkana linija) s peptidnim supstratom kao i aminokiselinski ostatak Asp496 važan za supstratnu selektivnost.

Na temelju strukture divljeg tipa i zatvorene strukture *Bt*DPP III, utvrđeno je da je velika konformacijska promjena također očuvana u *Bt*DPP III što indicira da je velika fleksibilnost proteina očuvana u svim članovima porodice M49. S obzirom na dobivene podatke može se pretpostaviti da enzim DPP III nema katalitičku aktivnost u otvorenoj konformaciji. Tek zatvaranjem strukture, ion cinka se približava supstratu vezanom na donju domenu i formira se aktivno mjesto u središtu proteina. Iako postoje male strukturne razlike između *Bt*DPP III i ljudske ili kvaščeve DPP III, na temelju gotovo jednakog aktivnog mjesta može se pretpostaviti da su i mehanizam vezanja supstrata kao i mehanizam same reakcije isti.

§ 5. ZAKLJUČCI

Dipeptidil-peptidaza III iz bakterije *Bacteroides thetaiotaomicron* (*Bt*DPP III) prekomjerno je eksprimirana u stanicama bakterije *Escherichia coli*, s privjeskom His_6, te je pročišćena afinitetnom kromatografijom i gel-filtracijom.

Ustanovljeno je da *Bt*DPP III preferira supstrat Arg_2-2NA s 8 puta većom katalitičkom efikasnosti od Ala-Arg-2NA i 29 puta većom katalitičkom efikasnosti od Phe-Arg-2NA. Prema supstratnoj specifičnosti sličniji je ljudskoj DPP III nego li kvaščevoj.

Elektroforezom pročišćene *Bt*DPP III u denaturirajućim uvjetima vizualizirana je samo jedna proteinska vrpca. Izoelektričnim fokusiranjem utvrđeno je postojanje tri proteinske forme s izoelektričnim točkama kod pH 4,97, 5,03 i 5,09.

U svrhu pripreme homogenog uzorka *Bt*DPP III za pokuse kristalizacije, ciljanom mutagenezom priređeno je sedam mutiranih oblika *Bt*DPP III, koji su bili prekomjerno eksprimirani i pročišćeni. Mutant kojem su svi cisteini bili zamjenjeni u serin, Cys-null *Bt*DPP III, pokazao se najpogodniji za kristalizaciju.

Priređeni su kristali i riješene su tri strukture *Bt*DPP III, dvije u otvorenoj konformaciji i jedna u zatvorenoj konformaciji. Analizom dobivenih struktura potvrđeno je da *Bt*DPP III pripada istoj strukturnoj klasi kao ljudska i kvaščeva DPP III. Usporedbom strukture divljeg tipa i zatvorene strukture, utvrđeno je da je velika konformacijska promjena također očuvana u *Bt*DPP III, što indicira da je velika fleksibilnost proteina očuvana u svim članovima porodice M49.

Iako postoje strukturne razlike između *Bt*DPP III i ljudske ili kvaščeve DPP III, one se ne nalaze u blizini aktivnog mjesta koja su gotovo jednaka u sva tri proteina te se može pretpostaviti da je mehanizam vezanja supstrata kao i mehanizam katalizirane reakcije vrlo sličan.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

2NA	2-naftilamid (β-naftilamid)
2-ME	2-merkaptoetanol, *β*-merkaptoetanol
Å	ångström je fizikalna jedinica za duljinu; 1 Å = 10^{-10} m
ADA	adenozin deaminaza
APS	amonijev persulfat
ATP	adenozin trifosfat
AJ	asimetrična jedinica unutar jedinične ćelije
*Bt*DPP III	dipeptidil-peptidaza III iz bakterije *Bacteroides thetaiotaomicron*
Bisakrilamid	*N*,*N*'-metilenbisakrilamid
Cys-null DPP III	DPP III kojoj su svi cisteinski ostaci zamijenjeni serinskim ostacima
DLS	Dinamičko raspršivanje svjetlosti (*dynamic light scattering*)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DNaza I	deoksiribonukleaza I iz goveđe gušterače tip IV
dNTP	deoksinukleozid trifosfat
DPP III	dipeptidil-peptidaza III
DTNB	5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina)
DTT	ditioteitrol
ECM	izvanstanični matriks (*extracellular matrix*)
EDTA	etilendiaminotetraoctene kiseline
EGTA	etilen-glikol-bis(*β*-aminoetil eter)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetraoctena kiselina
FBB	"Fast Blue B" sol – tetrazonijev o-dianisidin x ZnCl2
GSSG	oksidirani glutation
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina
IEF	izoelektrično fokusiranje
IPTG	izopropil-*β*-D-1-tiogalaktopiranozid
KCND 3	kalijev naponski usmjeren kanal, podporodica D, član 3 (*potassium voltage-gated channel subfamily D member 3*)
LB	Luria-Bertani hranjiva podloga
LB/amp	LB hranjiva podloga s ampicilinom koncentracije 100 μg mL^{-1}

MES	2-(*N*-morfolino)etansulfonska kiselina
mili Q	deionizirana voda niske vodljivosti (< 10 μS) proizvedena na sustavu za proizvodnju deionizirane vode *Millipore*
NEM	*N*-etilmaleimid
PAGE	elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (*polyacrylamide gel electrophoresis*)
pCMBS	*para*-kloromerkurifenilsulfat
PCR	lančana reakcija polimerazom (*Polymerase Chain Reaction*)
PDB	proteinska baza podataka (*Protein Data Bank*)
PEG	polietilen-glikol
*p*HMB	*para*-hidroksi-merkuribenzoat
PMSF	fenilmetansulfonil-fluorid
RMSD	korijen srednjeg kvadrata odstupanja (*root mean square deviation*)
rpm	broj okretaja po minuti (*revolutions per minute*)
SDS	natrijev dodecilsulfat (*sodium dodecyl sulphate*)
Se-Met DPP III	protein DPP III obilježen selenijom, metioninski ostaci su zamijenjeni selenometioninom.
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	Asp (D)
glutaminska kiselina	Glu (E)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. N.D. Rawlings, A.J. Barrett i R. Finn, *Nucleic Acids Res.* **44** (2016) str. D343-D350.
2. M. Abramić, J. Špoljarić i S. Šimaga, *Period. Biol.* **106** (2004) str. 161-168.
3. Y. Shimamori, Y. Watanabe i Y. Fujimoto, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **34** (1986) str. 3333-3340.
4. M. Abramić, M. Zubanović i L. Vitale, *Bio. Chem. Hoppe-Seyler* **369** (1988) str. 29-38.
5. A.A. Swanson, R.M. Davis i J.K. Mcdonald, *Curr. Eye Res.* **3** (1984) str. 287-291.
6. S. Ellis i J.M. Nuenke, *J. Biol. Chem.* **242** (1967) str. 4623-4629.
7. M.A. Sentandreu i F. Toldra, *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) str. 3977-3984.
8. C.M. Lee i S.H. Snyder, *J. Biol. Chem.* **257** (1982) str. 2043-2050.
9. I. Ohkubo, Y.H. Li, T. Maeda, Y. Yamamoto, T. Yamane, P.G. Du i K. Nishi, *Biol. Chem.* **380** (1999) str. 1421-1430.
10. T. Hazato, M. Shimamura, A. Ichimura i T. Katayama, *The Journal of Biochemistry* **95** (1984) str. 1265-1271.
11. M. Smyth i G. O'Cuinn, *J. Neurochem.* **63** (1994) str. 1439-1445.
12. S. Dhanda, H. Singh, J. Singh i T.P. Singh, *Protein Expr. Purif.* **52** (2007) str. 297-305.
13. M. Abramić, D. Schleuder, L. Dolovčak, W. Schroder, K. Strupat, D. Šagi, J. Peter-Katalinić i L. Vitale, *Biol. Chem.* **381** (2000) str. 1233-1243.
14. C. Mazzocco, K.M. Fukasawa, A.A. Raymond i J. Puiroux, *Eur. J. Biochem.* **268** (2001) str. 4940-4949.
15. C. Mazzocco, K.M. Fukasawa, P. Auguste i J. Puiroux, *Eur. J. Biochem.* **270** (2003) str. 3074-3082.
16. S.A.T. Chan, T.H.D. Jones, J.P. Sweeney i K. Toursarkissian, *Exp. Mycol.* **11** (1987) str. 27-35.
17. Y. Watanabe, Y. Kumagai i Y. Fujimoto, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **38** (1990) str. 246-248.
18. T. Xu, C. Xie, D. Yao, C.-Z. Zhou i J. Liu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2017) str. 621-625.

19. D. Jodha, P. Attri, T.P. Khaket i J. Singh, *Process Biochem.* **48** (2013) str. 730-737.
20. Z. Karačić, B. Vukelić, G.H. Ho, I. Jozić, I. Sučec, B. Salopek-Sondi, M. Kozlović, S.E. Brenner, J. Ludwig-Müller i M. Abramić, *Biol. Chem.* **398** (2017) str. 101-112.
21. B. Vukelić, B. Salopek-Sondi, J. Špoljarić, I. Sabljić, N. Mestrović, D. Agić i M. Abramić, *Biol. Chem.* **393** (2012) str. 37-46.
22. Y. Liu, J.T. Kern, J.R. Walker, J.A. Johnson, P.G. Schultz i H. Luesch, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104** (2007) str. 5205-5210.
23. B.E. Hast, D. Goldfarb, K.M. Mulvaney, M.A. Hast, P.F. Siesser, F. Yan, D.N. Hayes i M.B. Major, *Cancer Res.* **73** (2013) str. 2199-2210.
24. T. Chiba, Y.H. Li, T. Yamane, O. Ogikubo, M. Fukuoka, R. Arai, S. Takahashi, T. Ohtsuka, I. Ohkubo i N. Matsui, *Peptides* **24** (2003) str. 773-778.
25. M. Baršun, N. Jajčanin, B. Vukelić, J. Špoljarić i M. Abramić, *Biol. Chem.* **388** (2007) str. 343-348.
26. H. Zhang, Y. Yamamoto, S. Shumiya, M. Kunimatsu, K. Nishi, I. Ohkubo i K. Kani, *Histochem. J.* **33** (2001) str. 511-521.
27. S. Šimaga, D. Babić, M. Osmak, J. Ilić-Forko, L. Vitale, D. Miličić i M. Abramić, *Eur. J. Cancer* **34** (1998) str. 399-405.
28. V.A. Meliopoulos, L.E. Andersen, P. Brooks, X. Yan, A. Bakre, J.K. Coleman, S.M. Tompkins i R.A. Tripp, *PLoS One* **7** (2012) str. e37169.
29. M. He, D.P. Mangiameli, S. Kachala, K. Hunter, J. Gillespie, X. Bian, H.-C.J. Shen i S.K. Libutti, *Clin. Cancer Res.* **16** (2010) str. 249-259.
30. P.K. Baral, N. Jajčanin-Jozić, S. Deller, P. Macheroux, M. Abramić i K. Gruber, *J. Biol. Chem.* **283** (2008) str. 22316-22324.
31. G.A. Bezerra, E. Dobrovetsky, R. Viertlmayr, A. Dong, A. Binter, M. Abramic, P. Macheroux, S. Dhe-Paganon i K. Gruber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109** (2012) str. 6525-6530.
32. P. Kumar, V. Reithofer, M. Reisinger, S. Wallner, T. Pavkov-Keller, P. Macheroux i K. Gruber, *Scientific reports* **6** (2016) str. 23787.
33. A. Tomic, M. Gonzalez i S. Tomic, *J. Chem. Inf. Model.* **52** (2012) str. 1583-1594.
34. I. Sabljić, N. Meštrović, B. Vukelić, P. Macheroux, K. Gruber, M. Luić i M. Abramić, *PLoS One* **12** (2017) str. e0187295.

35. F. Bäckhed, R.E. Ley, J.L. Sonnenburg, D.A. Peterson i J.I. Gordon, *Science* **307** (2005) str. 1915-1920.
36. M.A. Zocco, M.E. Ainora, G. Gasbarrini i A. Gasbarrini, *Dig. Liver Dis.* **39** (2007) str. 707-712.
37. J. Xu, M.K. Bjursell, J. Himrod, S. Deng, L.K. Carmichael, H.C. Chiang, L.V. Hooper i J.I. Gordon, *Science* **299** (2003) str. 2074-2076.
38. B.S. Wostmann, C. Larkin, A. Moriarty i E. Bruckner-Kardoss, *Lab. Anim. Sci.* **33** (1983) str. 46-50.
39. M.K. Bjursell, E.C. Martens i J.I. Gordon, *J. Biol. Chem.* **281** (2006) str. 36269-36279.
40. F. Bäckhed, H. Ding, T. Wang, L.V. Hooper, G.Y. Koh, A. Nagy, C.F. Semenkovich i J.I. Gordon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101** (2004) str. 15718-15723.
41. L.V. Hooper, M.H. Wong, A. Thelin, L. Hansson, P.G. Falk i J.I. Gordon, *Science* **291** (2001) str. 881-884.
42. P.G. Falk, L.V. Hooper, T. Midtvedt i J.I. Gordon, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62** (1998) str. 1157-1170.
43. M. Freitas, L.-G. Axelsson, C. Cayuela, T. Midtvedt i G. Trugnan, *Histochem. Cell Biol.* **124** (2005) str. 423-433.
44. L.V. Hooper, T.S. Stappenbeck, C.V. Hong i J.I. Gordon, *Nat. Immunol.* **4** (2003) str. 269.
45. K.E. Aldridge i M. O'Brien, *J. Clin. Microbiol.* **40** (2002) str. 4349-4352.
46. I. Brook, *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **5** (2007) str. 991-1006.
47. C. López-Otín i J.S. Bond, *J. Biol. Chem.* **283** (2008) str. 30433-30437.
48. N. Cerda-Costa i F.X. Gomis-Ruth, *Protein Sci.* **23** (2014) str. 123-144.
49. N.D. Rawlings i A.J. Barrett, u John Wiley and Sons Ltd (ur.), *eLS*, 2014, str. 1-9.
50. I. Schechter i A. Berger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27** (1967) str. 157-162.
51. N.D. Rawlings i A.J. Barrett, u N. D. Rawlings and G. Salvesen (eds.), *Handbook of proteolytic enzymes*. Elsevier Ltd, Vol. 1, 2013, str. 325-370.
52. https://sourceforge.net/projects/pymol (preuzeto 2017. god.)
53. W. Bode, F.X. Gomis-Rüth, R. Huber, R. Zwilling i W. Stöcker, *Nature* **358** (1992) str. 164-167.

54. W. Stöcker, F. Grams, P. Reinemer, W. Bode, U. Baumann, F.X. Gomis-Rüth i D.B. Mckay, *Protein Sci.* **4** (1995) str. 823-840.

55. S.C. Prajapati i S.S. Chauhan, *FEBS J.* **278** (2011) str. 3256-3276.

56. J.M.S. Clair, C.T. Pham, S.A. Villalta, G.H. Caughey i P.J. Wolters, *J. Clin. Investig.* **113** (2004) str. 628.

57. M.-B. Maes, A.-M. Lambeir, K. Gilany, K. Senten, P.V. der VEKEN, B. Leiting, K. Augustyns, S. Scharpé i I. De Meester, *Biochem. J.* **386** (2005) str. 315-324.

58. D.M. Yu, T.W. Yao, S. Chowdhury, N.A. Nadvi, B. Osborne, W.B. Church, G.W. McCaughan i M.D. Gorrell, *FEBS J.* **277** (2010) str. 1126-1144.

59. Y. Ohara-Nemoto, S.M. Rouf, M. Naito, A. Yanase, F. Tetsuo, T. Ono, T. Kobayakawa, Y. Shimoyama, S. Kimura, K. Nakayama *et al.*, *J. Biol. Chem.* **289** (2014) str. 5436-5448.

60. S. Radicke, D. Cotella, E.M. Graf, U. Ravens i E. Wettwer, *J. Physiol.* **565** (2005) str. 751-756.

61. J. Park, K. Ajami, M. Denise i M.D. Gorrell, *Dipeptidyl Aminopeptidases*. Springer, 2006, str. 93-102.

62. J.R. Bjelke, J. Christensen, P.F. Nielsen, S. Branner, A.B. Kanstrup, N. Wagtmann i H.B. Rasmussen, *Biochem. J.* **396** (2006) str. 391-399.

63. S.Y. Qi, P.J. Riviere, J. Trojnar, J.-L. Junien i K.O. Akinsanya, *Biochem. J.* **373** (2003) str. 179-189.

64. Y. Ohara-Nemoto, Y. Shimoyama, S. Kimura, A. Kon, H. Haraga, T. Ono i T.K. Nemoto, *J. Biol. Chem.* **286** (2011) str. 38115-38127.

65. N. Jajčanin-Jozić, S. Deller, T. Pavkov, P. Macheroux i M. Abramić, *Biochimie* **92** (2010) str. 89-96.

66. K. Fukasawa, K.M. Fukasawa, H. Iwamoto, J. Hirose i M. Harada, *Biochemistry* **38** (1999) str. 8299-8303.

67. K. Fukasawa, K.M. Fukasawa, M. Kanai, S. Fujii, J. Hirose i M. Harada, *Biochem. J.* **329** (1998) str. 275-282.

68. A.J. Barrett i J.-M. Chen, u N. D. Rawlings and G. Salvesen (eds.), *Handbook of proteolytic enzymes*. Elsevier Ltd, Vol. 1, 2013, str. 1285-1289.

69. J. Hirose, H. Iwamoto, I. Nagao, K. Enmyo, H. Sugao, N. Kanemitu, K. Ikeda, M. Takeda, M. Inoue, T. Ikeda *et al.*, *Biochemistry* **40** (2001) str. 11860-11865.

70. M. Abramić, S. Šimaga, M. Osmak, L. Čičin-Šain, B. Vukelić, K. Vlahoviček i L. Dolovčak, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36** (2004) str. 434-446.

71. Y. Yamamoto, J. Hashimoto, M. Shimamura, T. Yamaguchi i T. Hazato, *Peptides* **21** (2000) str. 503-508.

72. J. Hirose, H. Kamigakiuchi, H. Iwamoto, H. Fujii, M. Nakai, M. Takenaka, R. Kataoka, M. Sugahara, S. Yamamoto i K.M. Fukasawa, *Arch. Biochem. Biophys.* **431** (2004) str. 1-8.

73. J. Špoljarić, B. Salopek-Sondi, J. Makarević, B. Vukelić, D. Agić, S. Šimaga, N. Jajčnin-Jozić i M. Abramić, *Bioorg. Chem.* **37** (2009) str. 70-76.

74. B. Salopek-Sondi, B. Vukelić, J. Špoljarić, S. Šimaga, D. Vujaklija, J. Makarević, N. Jajčanin i M. Abramić, *J. Biol. Chem.* **389** (2008) str. 163-167.

75. S. Hayward, A. Kitao i H.J.C. Berendsen, *Proteins-Structure Function and Genetics* **27** (1997) str. 425-437.

76. S. Hayward i H.J.C. Berendsen, *Proteins-Structure Function and Genetics* **30** (1998) str. 144-154.

77. N. London, D. Movshovitz-Attias i O. Schueler-Furman, *Structure* **18** (2010) str. 188-199.

78. A. Tomic, M. Berynskyy, R.C. Wade i S. Tomic, *Mol. BioSyst.* **11** (2015) str. 3068-3080.

79. V. Pelmenschikov, M.R. Blomberg i P.E. Siegbahn, *J. Biol. Inorg. Chem.* **7** (2002) str. 284-298.

80. A. Tomić, B. Kovačević i S. Tomić, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18** (2016) str. 27245-27256.

81. I. Sabljić, Dipeptidil-peptidaza III iz bakterije *Bacteroides thetaiotaomicron*: izolacija i karakterizacija, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2010., str. 25-40.

82. A. Cvitešić, I. Sabljić, J. Makarević i M. Abramić, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **31** (2016) str. 40-45.

83. N. Budiša, B. Steipe, P. Demange, C. Eckerskorn, J. Kellermann i R. Huber, *Eur. J. Biochem.* **230** (1995) str. 788-796.

84. E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M.R. Wilkins, R.D. Appel i A. Bairoch, u J. M. Walker (ur.), *The proteomics protocols handbook*. Springer, 2005, str. 571-607.
85. M.M. Bradford, *Anal. Biochem.* **72** (1976) str. 248-254.
86. U.K. Laemmli, *Nature* **227** (1970) str. 680.
87. I. Nagatsu, T. Nagatsu, T. Yamamoto, G.G. Glenner i J.W. Mehl, *Biochim. Biophys. Acta* **198** (1970) str. 255-270.
88. L.J. Greenberg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **9** (1962) str. 430-435.
89. https://www.graphpad.com (preuzeto 1. rujna 2017. god.)
90. L. Whitmore i B. Wallace, *Nucleic Acids Res.* **32** (2004) str. W668-W673.
91. L. Whitmore i B.A. Wallace, *Biopolymers* **89** (2008) str. 392-400.
92. G. Scapin, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **69** (2013) str. 2266-2275.
93. W. Kabsch, *Acta Crystallogr D* **66** (2010) str. 133-144.
94. P.R. Evans i G.N. Murshudov, *Acta Crystallogr D* **69** (2013) str. 1204-1214.
95. G.M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66** (2010) str. 479-485.
96. K. Cowtan, *Acta Crystallogr D* **66** (2010) str. 470-478.
97. K. Cowtan, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **62** (2006) str. 1002-1011.
98. G.N. Murshudov, A.A. Vagin i E.J. Dodson, *Acta Crystallogr D* **53** (1997) str. 240-255.
99. G.N. Murshudov, P. Skubak, A.A. Lebedev, N.S. Pannu, R.A. Steiner, R.A. Nicholls, M.D. Winn, F. Long i A.A. Vagin, *Acta Crystallogr D* **67** (2011) str. 355-367.
100. P.D. Adams, P.V. Afonine, G. Bunkoczi, V.B. Chen, I.W. Davis, N. Echols, J.J. Headd, L.W. Hung, G.J. Kapral, R.W. Grosse-Kunstleve *et al.*, *Acta Crystallogr D* **66** (2010) str. 213-221.
101. P. Emsley, B. Lohkamp, W.G. Scott i K. Cowtan, *Acta Crystallogr D* **66** (2010) str. 486-501.
102. D.C. Richardson, V.B. Chen, W.B. Arendall, J.J. Headd, D.A. Keedy, R.M. Immormino, G.J. Kapral, L.W. Murray i J.S. Richardson, *Acta Crystallogr D* **66** (2010) str. 12-21.
103. A. Vagin i A. Teplyakov, *J. Appl. Crystallogr.* **30** (1997) str. 1022-1025.
104. J. Painter i E.A. Merritt, *Acta Crystallogr D* **62** (2006) str. 439-450.

105. M.D. Winn, C.C. Ballard, K.D. Cowtan, E.J. Dodson, P. Emsley, P.R. Evans, R.M. Keegan, E.B. Krissinel, A.G.W. Leslie, A. McCoy *et al.*, *Acta Crystallogr D* **67** (2011) str. 235-242.

106. K.G. Reddie i K.S. Carroll, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12** (2008) str. 746-754.

107. N. Jajčanin-Jozić i M. Abramić, *Biol. Chem.* **394** (2013) str. 767-771.

108. M. Abramić, Z. Karačić, M. Šemanjski, B. Vukelić i N. Jajčanin-Jozić, *Biol. Chem.* **396** (2015) str. 359-366.

109. L.A. Kelley, S. Mezulis, C.M. Yates, M.N. Wass i M.J.E. Sternberg, *Nat. Protoc.* **10** (2015) str. 845-858.

110. M. Biasini, S. Bienert, A. Waterhouse, K. Arnold, G. Studer, T. Schmidt, F. Kiefer, T.G. Cassarino, M. Bertoni i L. Bordoli, *Nucleic Acids Res.* **42** (2014) str. W252-W258.

111. F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T.J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert i J. Söding, *Mol. Syst. Biol.* **7** (2011) str. 539-545.

112. E. Krissinel i K. Henrick, *Acta Crystallogr D* **60** (2004) str. 2256-2268.

§ 8. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Igor Sabljić

Datum rodenja: 3. ožujka, 1985.

Mjesto rodenja: Zagreb, Hrvatska

Radno iskustvo

2017.-	Institut Ruđer Bošković, viši stručni suradnik, Zavod za fizičku kemiju, Laboratorij za kemijsku i biološku kristalografiju.
2010.-2017.	Institut Ruđer Bošković, stručni suradnik, Zavod za fizičku kemiju, Laboratorij za kemijsku i biološku kristalografiju.

Školovanje:

2011.-	Student na poslijediplomskom studiju, smjer biokemija Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2010. dipl. ing. kemije	Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu Diplomski rad: Dipeptidil-peptidaza III iz bakterije *Bacteroides thetaiotaomicron*: izolacija i karakterizacija, Mentorica: dr. sc. Marija Abramić

Sudjelovanje u nastavi:

2011. - 2017.	Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (Asistent u laboratoriju za opću kemiju)

Znanstveno usavršavanje izvan Hrvatske:

Srpanj 2012.	Institute of Biochemistry, Graz University of Technology, Austrija; Bilateralni projekt: Raznolikost metalopeptidaza porodice M49

Studeni 2013.	Institute of Biochemistry, Graz University of Technology, Austrija; Bilateralni projekt: Raznolikost metalopeptidaza porodice M49
Lipanj 2014.	Institute of Biochemistry, Graz University of Technology, Austrija; projekt: InnoMol
Ožujak 2015.	Institute of Biochemistry, Graz University of Technology, Austrija; projekt: InnoMol

Strani jezici:

Engleski

Članstva:

Hrvatsko kemijsko društvo
Hrvatska kristalografska zajednica
Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju
Hrvatska udruga kristalografa

Nagrade i stipendije:

2017.	Godišnja nagrada Instituta Ruđer Bošković za najbolji znanstveni rad (kategorija doktoranda).
2017.	Stipendija za pohađanje radionice Integrative Structural Biology, Erice, Italija.
2016.	Stipendija za pohađanje škole 3rd European Crystallography School, Bol, Hrvatska.
2014.	Stipendija za pohađanje škole 1st European Crystallography School, Pavia, Italija.

Dodatna usavršavanja na školama i radionicama:

02.-11.06.2017.	Integrative Structural Biology, Erice, Italija.
22.-26.04.2017.	Hot Topics in Contemporary Crystallography 2, Poreč, Hrvatska.
25.09-02.10.2016.	3rd European Crystallography School, Bol, Hrvatska.
28.08-06.09.2014.	1st European Crystallography School, Pavia, Italija.

Organizacije konferencija i skupova:

1. Hot Topics in Contemporary Crystallography 3, Bol, Hrvatska, 23.-27.09.2018., član organizacijskog odbora.
2. Hot Topics in Contemporary Crystallography 2, Poreč, Hrvatska. 22.-26.04.2017., član organizacijskog odbora.
3. The 29th European Crystallographic Meeting, Rovinj, Hrvatska, 23.-28.08.2015., član organizacijskog odbora.

Publikacije:

1. Kazazić S., Karačić Z., **Sabljić I.**, Agić D., Tomin M., Abramić M., Dadlez M., Tomić A. i Tomić, S., Conservation of the conformational dynamics and ligand binding within M49 enzyme family, *RSC Advances*, 2018, **8**, 13310-13322.
2. **Sabljić I.**, Tomin M., Matovina M., Sučec I., Paić A. T., Tomić A., Abramić M. i Tomić, S., The first dipeptidyl peptidase III from a thermophile: Structural basis for thermal stability and reduced activity, *PLoS One*, 2018, **13**, e0192488.
3. **Sabljić I.**, Meštrović N., Vukelić B., Macheroux P., Gruber K., Luić M. i Abramić M., Crystal structure of dipeptidyl peptidase III from the human gut symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron*. *PLoS One*, 2017, **12**(11), e0187295.
4. Lalić J., Posavec Marjanović M., Palazzo L., Perina D., **Sabljić I.**, Žaja R., Colby T., Pleše B., Halasz M., Jankevicius G., Bucca G., Ahel M., Matić I., Cetkovic H., Luić, M., Mikoč A. i Ahel, I., Disruption of Macrodomain Protein SCO6735 Increases Antibiotic Production in Streptomyces coelicolor, *J. Biol. Chem.* **291**, 2016, 23175-23187.
5. Cvitešić A., **Sabljić I.**, Makarević J. i Abramić M., Novel dipeptidyl hydroxamic acids that inhibit human and bacterial dipeptidyl peptidase III. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*,2016, 1-6.
6. Kovač V., Čakić Semenčić M., Molčanov K., **Sabljić I.**, Iveković D., Žinić M. i Rapić V., Synthesis and structure of bis- and tris-ferrocene containing N-methylimide foldamers. *Tetrahedron*, 2012, **68**, 7884-7891.
7. Vukelić B., Salopek-Sondi B., Špoljarić J., **Sabljić I.**, Mestrović N., Agić D. i Abramić M., Reactive cysteine in the active-site motif of Bacteroides thetaiotaomicron

dipeptidyl peptidase III is a regulatory residue for enzyme activity. *Biol. Chem.*, 2012, **393**, 37-46.

8. Molčanov K., **Sabljić I.** i Kojić-Prodić B., Face-to-face π-stacking in the multicomponent crystals of chloranilic acid, alkali hydrogenchloranilates, and water. *CrystEngComm*, 2011, **13**, 4211-4217.

Priopćenja na znanstvenim skupovima:

1. DPP III minisymposium, Austria, Graz, 23.1.2015, usmeno: Dipeptidyl-peptidase III from the prokaryotic organisms.
2. The 29th European Crystallographic Meeting, Croatia, Rovinj, 23.-28.08.2015., poster: The first X-ray structure of prokaryotic dipeptidyl peptidase III, **Sabljić I.**, Gruber K., Macheroux P., Abramić M., Luić M.
3. Croatian meeting of chemists and chemical engineers, Croatia, Osijek, 21.-24.04.2013., poster: Synthesis and structure of novel Bis- and Trans- ferrocenyl imide foldamers, Kovač V., Čakić-Semenčić M., Molčanov K., **Sabljić I.**, Iveković D., Žinić M., Rapić V.
4. FEBS 3+ Meeting - From molecules to life and back, Croatia, Opatija, 13.-16.06.2012., poster: Characterization of the first prokaryotic M49 metallopeptidase reveals a regulatory cysteine residue in the active-site motif, Vukelić B., **Sabljić I.**, Meštrović N., Salopek-Sondi B. and Abramić M.
5. The 5th Central European Conference - Chemistry towards Biology, Croatia, Primošten, 8.-11.09.2010., poster: Dipeptidyl peptidase III from human symbiont Bacteroides thetaiotaomicron: isolation and characterization, Vukelić B., Salopek-Sondi B., **Sabljić I.**, Špoljarić J., Agić D., Abramić M.