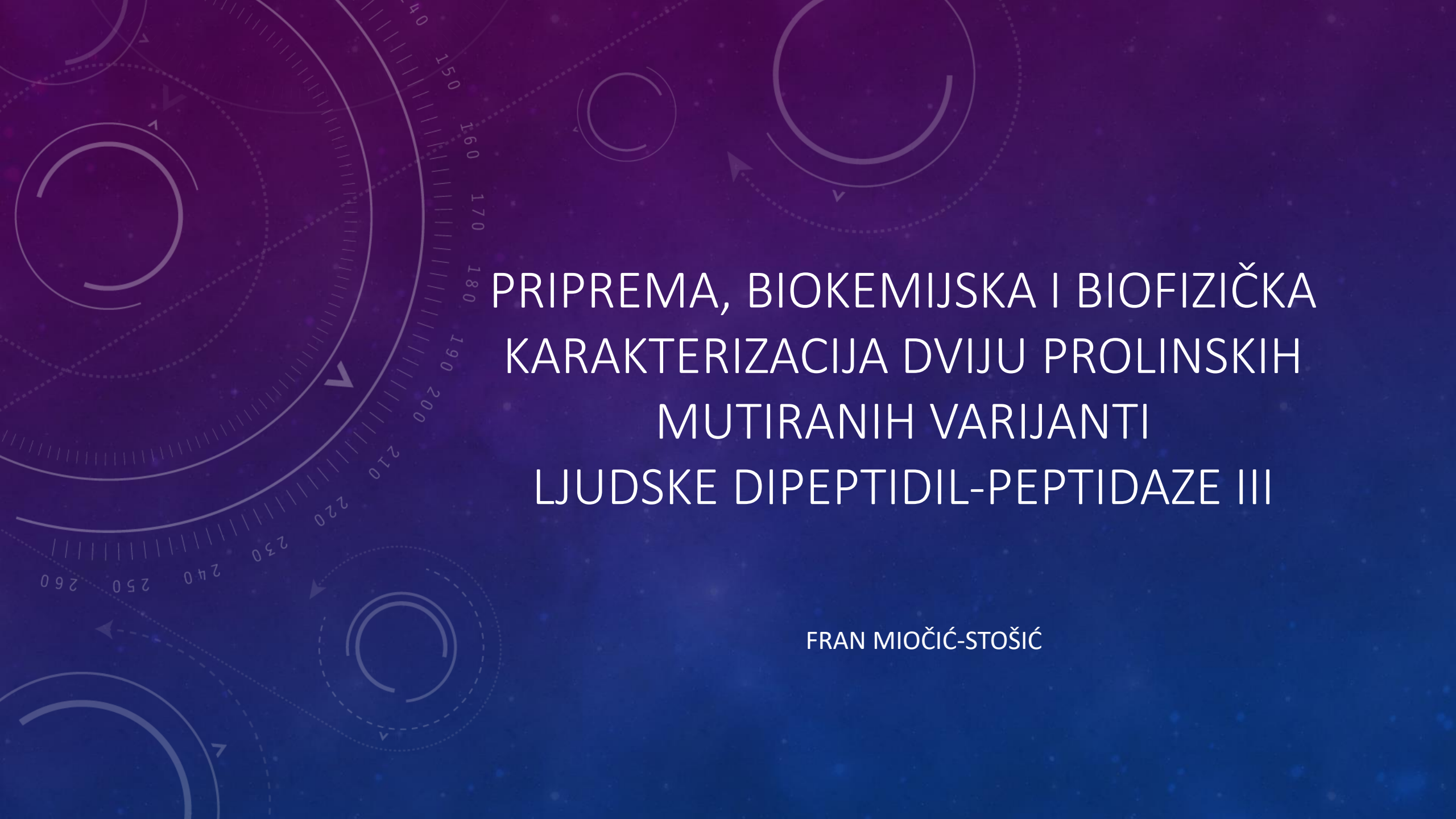


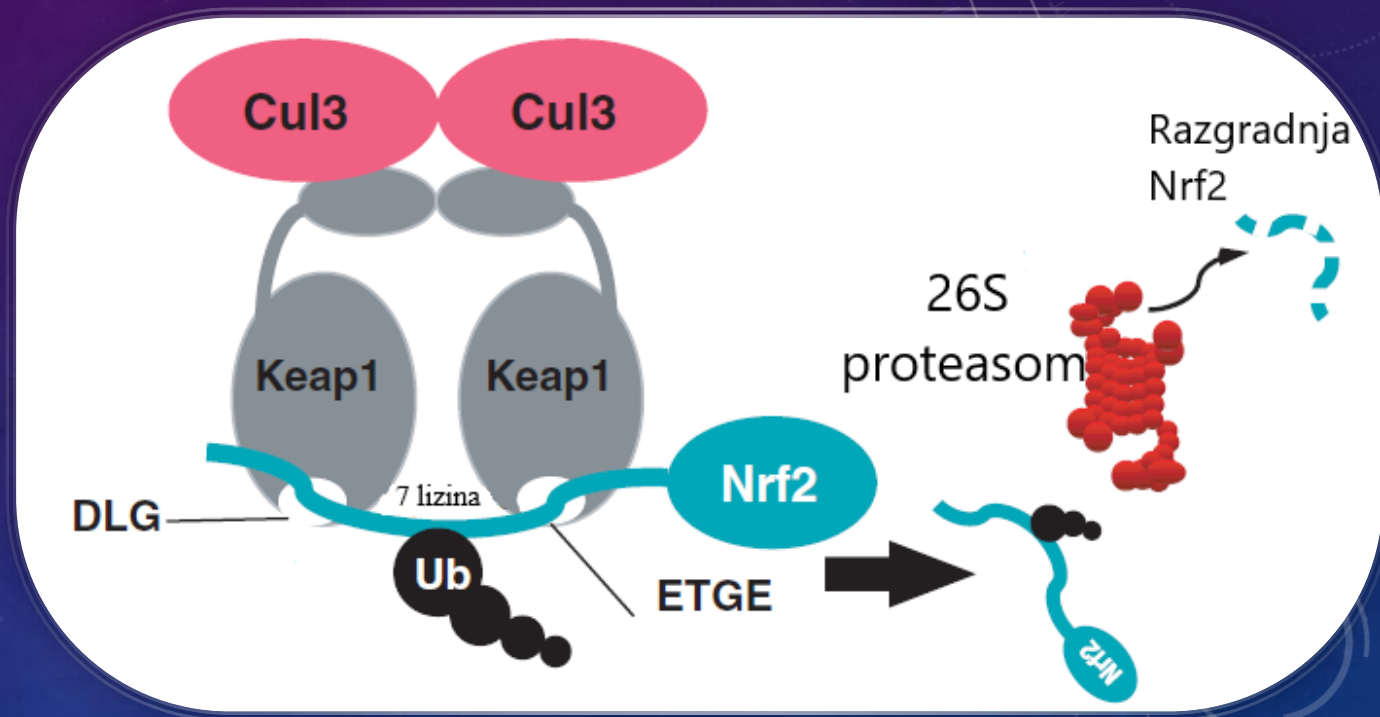
The background is a dark blue gradient with a subtle pattern of small white dots. Overlaid on this are several faint, light blue circular elements. A large circular scale is prominent on the left side, with numerical markings from 140 to 260 in increments of 10. Several concentric circles of varying radii are scattered across the image, some with small arrows indicating a clockwise direction. The overall aesthetic is scientific and technical.

PRIPREMA, BIOKEMIJSKA I BIOFIZIČKA KARAKTERIZACIJA DVIJU PROLINSKIH MUTIRANIH VARIJANTI LJUDSKE DIPEPTIDIL-PEPTIDAZE III

FRAN MIOČIĆ-STOŠIĆ

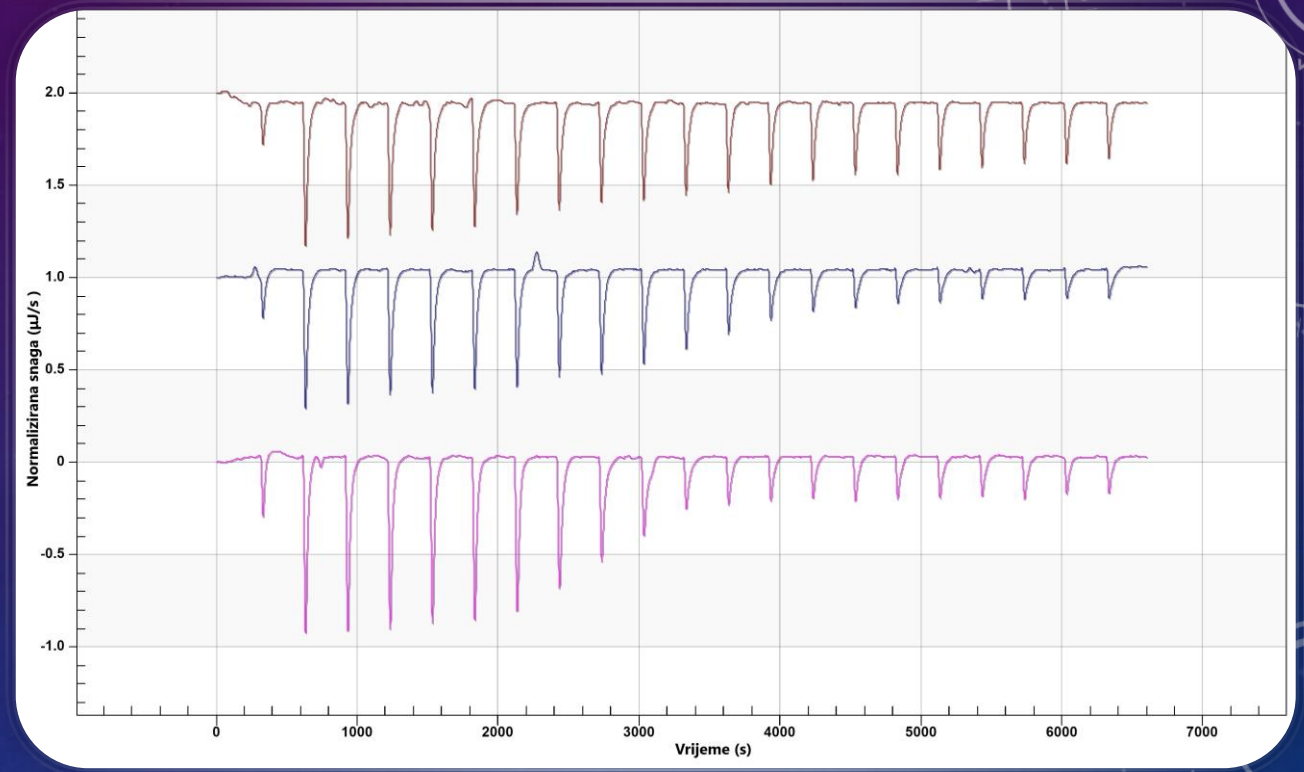
KEAP1-NRF2 SIGNALNI PUT

- Uključen u zaštitu stanica od oksidacijskog oštećenja
- Vezanjem na Keap1-Cul3 kompleks, Nrf2 se razgrađuje
- Razina Nrf2 se održava niskom u bazalnim uvjetima
- DPP III se natječe s Nrf2 za interakciju s Keap1 tako sprječava razgradnju Nrf2



IZOTERMALNA KALORIMETRIJA

- Metoda karakterizacije interakcije proteina na temelju oslobođene topline
- Otopine se miješaju diskretnim injekcijama koncentriranog proteina partnera u otopinu proteina
- Početna mjerenja nisu davala rezultate, te je metoda optimizirana (koncentracije proteina, temperatura, brzina miješanja, protokol...)



REZULTATI

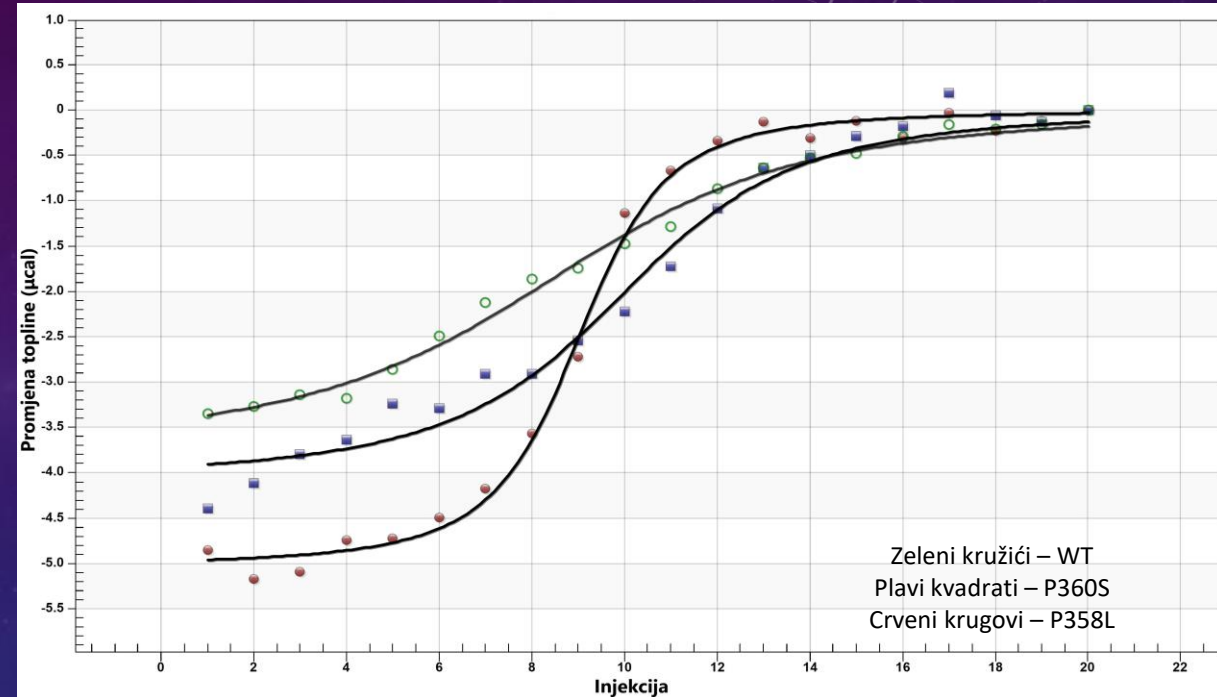
REZULTATI ENZIMSKE KINETIKA

- Dobivene vrijednosti za WT DPP III su istog reda veličine kao literaturni izvori (Matovina et al. 2017.)
- Divlji tip ima najveći obrtni broj i konstantu specifičnosti, te najmanju Michaelisinu konstantu
- Oba mutanta pokazuju nižu konstantu specifičnosti, veće K_M i niže k_{cat}

	k_{cat} / s^{-1}	$K_M / \mu mol L^{-1}$	$k_{cat}/K_M / 10^6$ $mol L^{-1} s$
WT	$13,09 \pm 1,19$	$6,26 \pm 2,94$	$2,09 \pm 1,02$
P360S	$9,12 \pm 0,24$	$13,11 \pm 1,22$	$0,70 \pm 0,05$
P358L	$7,12 \pm 0,21$	$8,61 \pm 2,20$	$0,83 \pm 0,27$

INTERAKCIJE DPP III SA KELCH DOMENOM

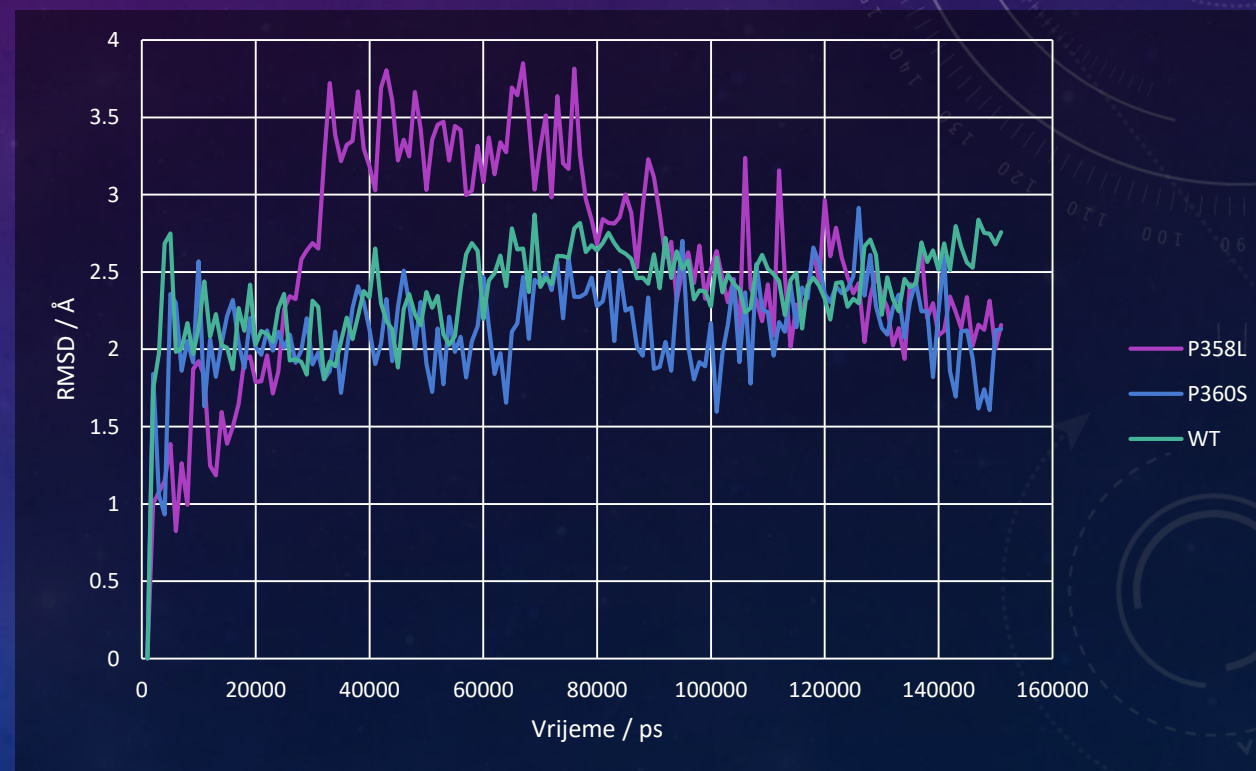
- Konstante disocijacije za WT i mutante P358L i P360S su određene iz titracijskih krivulja
- Zbog precipitacije tijekom mjerenja, termodinamički parametri uz interakciju prikazuju i precipitaciju
- Precipitat je analiziran sa SDS-PAGE-om te je pokazano da precipitira više DPP III nego domene Kelch



	K_d (nM)	n	ΔH (kcal / mol)	ΔS (cal / mol K)
WT/Kelch	693	0,587	-7,25	2,13
	960	0,445	-14,43	-24,35
P360S/Kelch	553	0,567	-18,67	-38,27
	219	0,427	-12,8	-15,54
P358L/Kelch	150	0,572	-22,92	-51,19
	337	0,638	-24,06	-56,89

SIMULACIJE MOLEKULSKE DINAMIKE

- Provedene su simulacije u trajanju od 150 ns
- Analizom RMSD-a fleksibilne petlje (aminokiseline od 460 do 486) nađeno je da mutant P358L pokazuje veću fleksibilnost
- Na temelju analiza R_g , RMSF i RMSD bez fleksibilne petlje zaključujemo da nema značajnih globalnih promjena u strukturi



ANALIZA VODIKOVIH VEZA

- Analiza vodikovih veza daje uvid u ključne interakcije aminokiselina za stabilizaciju petlje
- Analiziran je svaki 100. simulirani okvir
- Mutant P358L pokazuje nižu stopu pojavljivanja Glu483-Ile477 i Gln484-Thr475 veze

Donorska aminokiselina	Akceptorska aminokiselina	WT / %	P360S / %	P358L / %
Glu483	Ile477	62,91	38,41	23,18
Gln484	Thr475	92,72	90,07	16,56
Ile477	Arg623	3,97	38,41	16,56

ZAKLJUČAK

- Mutanti P358L i P360S, te divlji tip (WT) DPP III su uspješno eksprimirani i pročišćeni
- Kinetički parametri pokazuju da WT najbrže i najefikasnije katalizira enzimsku reakciju
- Simulacije molekulske dinamike pokazuju da mutant P358L ima veću fleksibilnost regije fleksibilne petlje od WT i mutanta P360S.
- Ponovljeni rezultati mjerenja interakcije pokazuju jače vezanje oba mutanta od WT. Daljnji pokusi su potrebni za stabilnije podatke.
- Zbog značajnih utjecaja mutacije, daljnja istraživanja na mutantu P358L su potrebna da bi se odredio utjecaj mutacije na biološku ulogu

ZAHVALE

- Članovima Laboratorija za Biokemiju Proteina i Molekulsko Modeliranje na Institutu Ruđer Bošković i Mentoricama prof. Sanja Tomić i dr. sc. Mihaela Matovina
- Imenovanoj mentorici na Kemijskom odsjeku doc. Aleksandra Maršavelski
- Prof. Tea Pavkov-Keller za pomoć pri izradi ITC mjerenja na Karl-Franzens Universität, Sveučilište u Grazu