

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

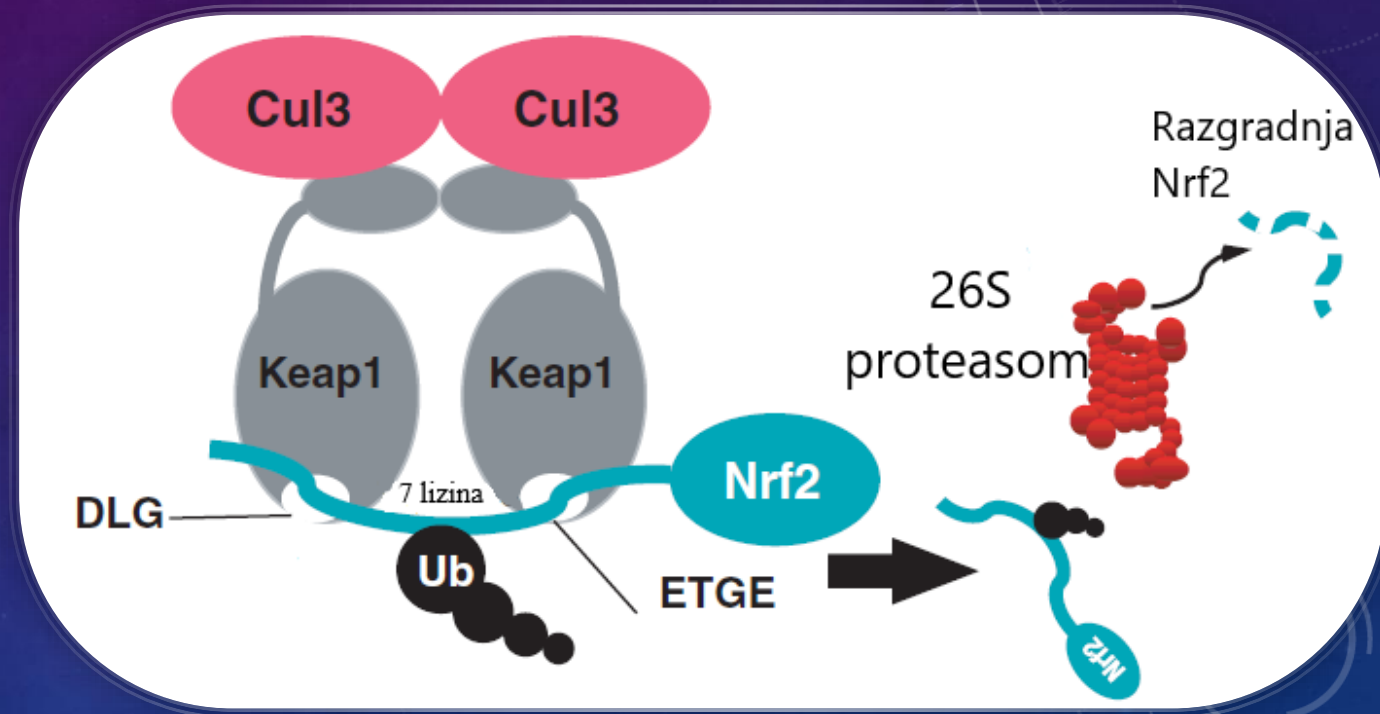


IP-2018-01-2936

FRAN MIOČIĆ-STOŠIĆ

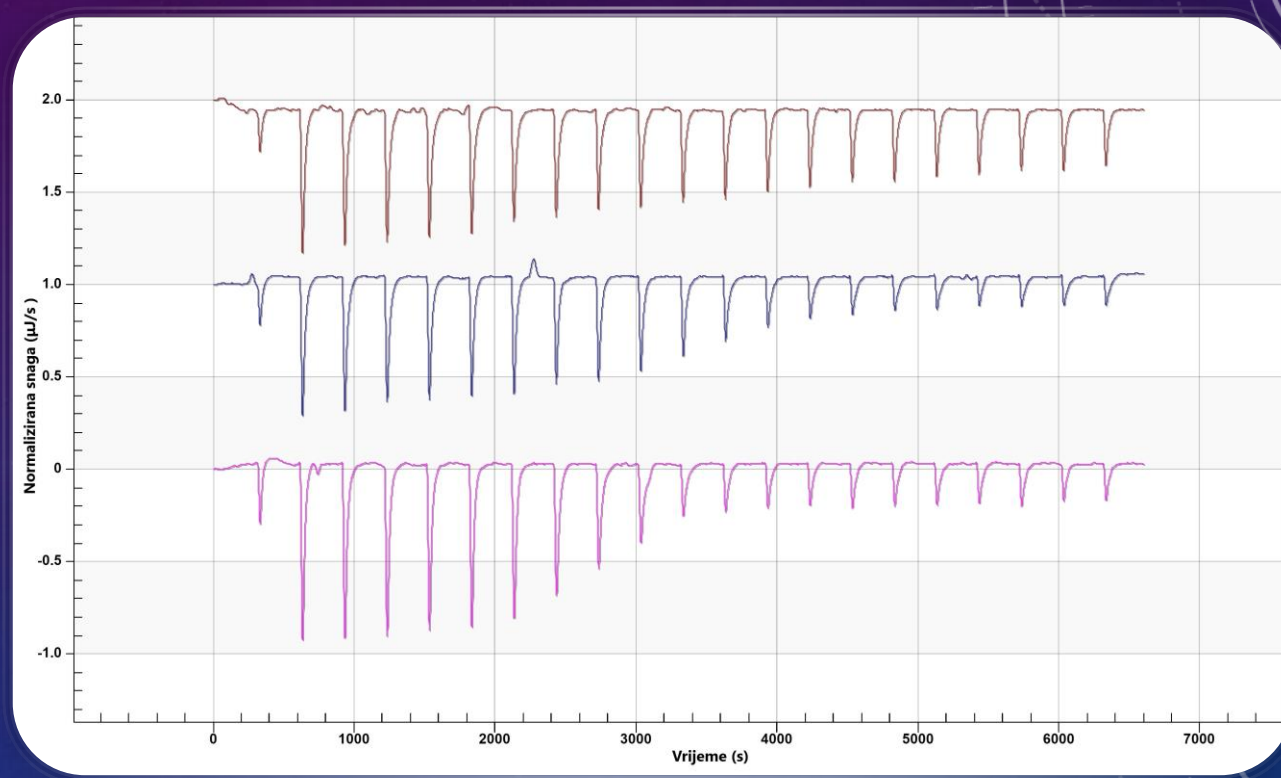
KEAP1-NRF2 SIGNALNI PUT

- Uključen u zaštitu stanica od oksidacijskog oštećenja
- Vežanjem 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

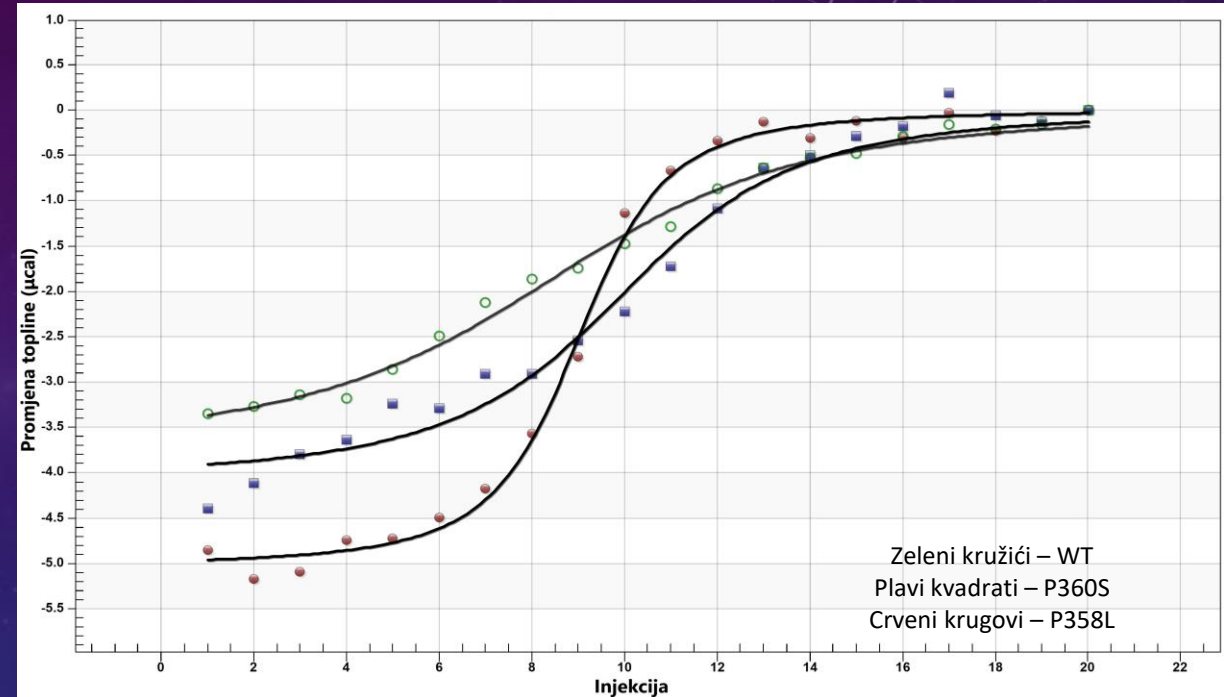
REZULTATI ENZIMSKE KINETIKA

- 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}	$K_M / \mu\text{mol L}^{-1}$	$k_{cat}/K_M / 10^6$ $\text{mol L}^{-1} \text{s}$
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

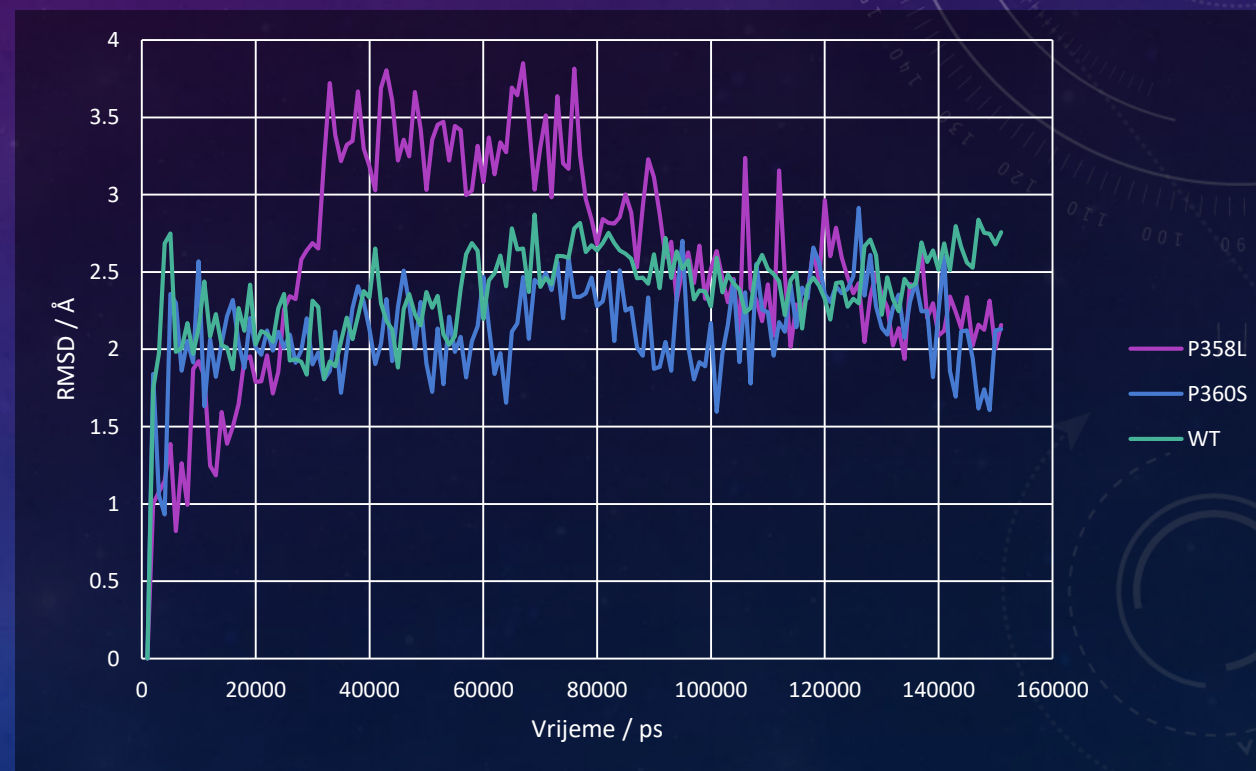
- Konstante disocijacije za WT i mutante P358L i P360S su određene iz titracijskih krivulja
- Zbog precipitacije tijekom mjerenja, termodinamički parametri uz interakciju prikazuju i precipitaciju
- Precipitat je analiziran sa SDS-PAGE-om te je pokazano da precipitira više DPP III nego domene Kelch



	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