

Utjecaj mutacija proteina Keap1 na interakciju s dipeptidil-peptidazom III

Kolak, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:130918>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-31**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2022.

Martina Kolak

**Utjecaj mutacija proteina Keap1 na
interakciju s dipeptidil-peptidazom
III**

Rad je izrađen pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Kristine Radošević i komentorstvom doc. dr. sc. Mihaele Matovina te uz pomoć dr. sc. Ane Tomašić Paić na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za biokemiju proteina i molekularno moduliranje.

Rad je izrađen u sklopu projekta „Biološka važnost dipeptidil peptidaze III i njezin utjecaj na zdravlje čovjeka“, IP-2018-01-2936, Hrvatska zaklada za znanost, voditeljice prof. dr. sc. Sanje Tomić.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Institut Ruđer Bošković

Laboratorij za biokemiju proteina i molekulsko modeliranje

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

Utjecaj mutacija proteina Keap1 na interakciju s dipeptidil-peptidazom III

Martina Kolak, univ. bacc. ing. biotechn. 0058204942

Sažetak:

Dipeptidil-peptidaza III osim cijepanja dipeptida s N-terminalnog kraja oligopeptida ima i ulogu u regulaciji signalnog puta Keap1-Nrf2. Nrf2 je transkripcijski faktor koji je ključan u odgovoru stanice na oksidacijska oštećenja, a vežući se na protein Keap1 usmjerava se ka ubikvitinaciji i razgradnji. DPP III, kao i Nrf2, sadrži motiv ETGE preko kojeg se ostvaruju interakcije s domenom Kelch proteina Keap1. Na internetskom portalu za genomiku raka cBioPortal nalaze se genomske sekvence mutanata Keap1 pronađene u uzorcima zloćudnih tumora. U ovom radu su proučavane dvije mutacije Keap1 proteina, G333C i G480W, te njihov utjecaj na interakciju s proteinom DPP III. Istraživanje je provedeno primjenom stanične linije HEK293T.

Ključne riječi: *dipeptidil-peptidaza III, signalni put Keap1-Nrf2, mjesno-specifična mutageneza, kulture stanica, western blot analiza, koimunoprecipitacija*

Rad sadrži: 38 stranica, 12 slika, 13 tablica, 45 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević

Komentor: doc. dr. sc. Mihaela Matovina, viša znanstvena suradnica, IRB

Pomoć pri izradi: dr. sc. Ana Tomašić Paić, IRB

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Igor Stuparević (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević (mentor)
3. doc. dr. sc. Mihaela Matovina, IRB (član)
4. prof. dr. sc. Igor Slivac (zamjenski član)

Datum obrane: 27. srpnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Organic Chemistry and Biochemistry, Ruder Bošković Institute
Laboratory for Protein Biochemistry and Molecular Modelling

Scientific area: Biotechnological Sciences
Scientific field: Biotechnology
Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

Influence of Keap1 mutations on dipeptidyl peptidase III interaction

Martina Kolak, univ. bacc. ing. biotechn. 0058204942

Abstract:

Dipeptidyl-peptidase III, in addition to cleaving dipeptides from the N-terminal end of oligopeptides, also plays a role in the regulation of the Keap1-Nrf2 signaling pathway. Nrf2 is a transcription factor that is crucial in the cell response to oxidative damage, and binding to the Keap1 protein directs it toward ubiquitination and degradation. Both Nrf2 and DPP III contain an ETGE motif through which the interactions with the Kelch domain of the Keap1 protein are achieved. The cancer genomics web portal cBioPortal contains genomic sequences of Keap1 mutants found in cancer samples. In this work, two mutations of the Keap1 protein, G333C and G480W, their influence on the interaction with the DPP III protein were studied. The study was performed using the HEK293T cell line.

Keywords: *dipeptidyl-peptidase III, Keap1-Nrf2 signaling pathway, site-directed mutagenesis, cell culture, Western blot, co-immunoprecipitation*

Thesis contains: 38 pages, 12 figures, 13 tables, 45 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Kristina Radošević; PhD, Associate professor

Co-mentor: Mihaela Matovina; PhD, *Senior Research Associate*

Technical support and assistance: dr. sc. Ana Tomašić Paić, IRB

Reviewers:

1. Igor Stuparević; PhD, Associate professor
2. Kristina Radošević; PhD, Associate professor
3. Mihaela Matovina; PhD, *Senior Research Associate*
4. Igor Slivac; PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: July 27th, 2022

Sadržaj

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | UVOD..... | 1 |
| 2 | TEORIJSKI DIO..... | 3 |
| 2.1 | PEPTIDAZE..... | 3 |
| 2.1.1 | Dipeptidil-peptidaza III..... | 3 |
| 2.2 | SIGNALNI PUT KEAP1-NRF2..... | 6 |
| 2.2.1 | Interakcija DPP III s proteinom Keap1..... | 9 |
| 2.3 | PRIMJENA KULTURE STANICA..... | 10 |
| 3 | EKSPERIMENTALNI DIO..... | 12 |
| 3.1 | MATERIJALI..... | 12 |
| 3.1.1 | Kemikalije..... | 12 |
| 3.1.2 | Otopine i puferi..... | 13 |
| 3.1.3 | Markeri veličine i boje..... | 14 |
| 3.1.4 | Enzimi..... | 14 |
| 3.1.5 | Plazmidi, bakterijski sojevi i stanične linije..... | 14 |
| 3.1.6 | Komercijalni kompleti..... | 14 |
| 3.1.7 | Antitijela..... | 14 |
| 3.1.8 | Uređaji i oprema..... | 15 |
| 3.2 | METODE..... | 15 |
| 3.2.1 | Mjesno-specifična mutageneza..... | 15 |
| 3.2.2 | Transformacija XL10-Gold ultrakompetentih stanica bakterije <i>E. Coli</i> | 19 |
| 3.2.3 | Izolacija i pročišćavanje plazmida..... | 20 |
| 3.2.4 | Rad sa stanicama..... | 21 |
| 3.2.4.1 | Transfekcija HEK293T stanica..... | 21 |
| 3.2.4.2 | Transfekcija stanica za koimunoprecipitaciju..... | 22 |
| 3.2.4.3 | Koimunoprecipitacija s anti-HA agaroznim kuglicama..... | 24 |
| 3.2.5 | SDS-PAGE elektroforeza..... | 24 |
| 3.2.5.1 | Priprema gela..... | 25 |
| 3.2.6 | Western analiza..... | 26 |
| 4 | REZULTATI I RASPRAVA..... | 27 |
| 4.1 | MUTAGENEZA I IZOLACIJA PLAZMIDA..... | 27 |
| 4.2 | OPTIMIZACIJA TRANSFEKCIJE HEK293T STANICA..... | 28 |
| 4.3 | ANALIZA INTERAKCIJE PROTEINA DPP III i KEAP1..... | 31 |
| 5 | ZAKLJUČCI..... | 35 |
| 6 | LITERATURA..... | 36 |

1 UVOD

Enzime, proteine koji kataliziraju biološke reakcije, možemo podijeliti u 6 glavnih skupina: oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze. Enzimi koji hidroliziraju peptidnu vezu su peptidaze ili proteolitički enzimi. S obzirom na to cijepaju li peptidnu vezu unutar ili na krajevima polipeptidnog lanca, peptidaze dijelimo na endopeptidaze i egzopeptidaze. Peptidaze koje u svom aktivnom mjestu sadrže metalni ion svrstavaju se u metalopeptidaze.

Dipeptidil-peptidaza III (DPP III) je o cinku ovisna metalopeptidaza koja djeluje kao egzopeptidaza te odcjepljuje dipeptide s N-terminalnog kraja supstrata koji se sastoje od 3 do 10 aminokiselina. Osim što sudjeluje u regulaciji proteina u stanici, DPP III ima i ulogu u signalnom putu Keap1-Nrf2.

Signalni put Keap1-Nrf2 štiti stanične proteine i DNA od oksidacijskog oštećenja uzrokovanog ROS česticama i elektrofilima. Prepoznat je kao bitan terapijski cilj u liječenju karcinoma, neurodegenerativnih, autoimunih i inflamatornih bolesti. U homeostatskim uvjetima, transkripcijski faktor Nrf2 je konstantno ubikvitiniran pomoću Cul3 – Keap 1 ubikvitin E3 ligaznog kompleksa nakon čega se degradira u proteasomu, čime se održava niska razina Nrf2 u stanici. Pri uvjetima oksidacijskog stresa, dolazi do kovalentne modifikacije proteina Keap1 i promjene konformacije Cul3 – Keap 1 ubikvitin E3 ligaznog kompleksa čime se onemogućava ubikvitinacija i degradacija Nrf2 proteina. Novonastali Nrf2 se translocira u jezgru te se u kompleksu sa sMaf proteinima veže na ARE sekvence u promotorima gena koji kodiraju za brojne proteine s antioksidacijskim i detoksifikacijskim učinkom (1).

Uloga DPP III u regulaciji oksidacijskog stresa povezana je s njezinom mogućnošću vezanja proteina Keap1, staničnog senzora oksidacijskog stresa koji je dio signalnog puta Keap1-Nrf2.

DPP III se kompetitivno veže na Kelch domenu proteina Keap1 preko ETGE motiva koji je smješten na fleksibilnoj petlji i pritom narušava vezanje Nrf2 na Keap1 preko DLG motiva koji ima manji afinitet od ETGE motiva. Time se mijenja konformacija kompleksa i onemogućuje ubikvitinacija i posljedična degradacija proteina Nrf2 (2).

U cBioPortal bazi podataka naveden je niz mutacija koje su nađene u uzorcima raka u kodirajućoj regiji gena za Keap1. Odabrane su dvije mutacije za ispitivanje interakcije s DPP III, G333C i G480W. Pripremljene su mutirane varijante proteina koje su analizirane

primjenom kulture stanica. Mutacija G333C pronađena je u više tumorskih uzoraka adenokarcinoma pluća i karcinomu pločastih stanica pluća, a mutacija G480W pronađena je u melanomu, adenokarcinomu pluća i karcinomu pločastih stanica pluća (3). Obje mutacije se smatraju mutacijama koje se nalaze u tzv. *hot spot* mjestima u genomu na kojima je frekvencija mutacija češća od očekivane. Takve mutacije nađene u uzorcima zloćudnih tumora bi mogle biti uključene u proces kancerogeneze te ih je zbog toga važno proučavati.

Cilj ovog rada je bio ispitati mogućnost vezanja dviju izabranih mutanata proteina Keap1 na DPP III kako bismo ispitali utjecaj navedenih mutacija na interakciju proteina Keap1 s DPP III.

2 TEORIJSKI DIO

2.1 PEPTIDAZE

Ovisno o tipu kemijske reakcije koju kataliziraju, enzimi se dijele na šest glavnih skupina: oksidoreduktaze (EC 1), transferaze (EC 2), hidrolaze (EC 3), liaze (EC 4), izomeraze (EC 5) i ligaze (EC 6) (4). Oznaka EC (engl. *Enzyme Commission*) označava svaki pojedini enzim, a sastoji se od četiri broja od kojih prvi označava glavnu skupinu enzima, drugi podskupinu, treći podpodskupinu, a četvrti serijski broj (5).

Peptidaze (proteolitički enzimi) pripadaju hidrolaznoj skupini (EC 3) jer hidroliziraju peptidnu vezu što ih smješta u podskupinu EC 3.4. S obzirom na to cijepaju li peptidnu vezu unutar ili na krajevima polipeptidnog lanca, peptidaze dijelimo na endopeptidaze i egzopeptidaze. Ukoliko egzopeptidaze odcjepljuju aminokiseline s N-terminalnog kraja, nazivamo ih aminopeptidazama, a karboksipeptidazama nazivamo one egzopeptidaze koje odcjepljuju aminokiseline s C-terminalnog kraja.

Prema hijerarhijskom sustavu podjele peptidaza koji se koristi u bazi MEROPS, peptidaze se grupiraju u porodice i klanove. Istoj porodici pripadaju homologne peptidaze čija se homologija očituje značajnom sličnosti u aminokiselinskom slijedu u dijelovima proteina odgovornima za peptidaznu aktivnost. Ukoliko homolog nije poznat, porodica može sadržavati samo jedan enzim. Prvo slovo imena porodice označava katalitički tip peptidaze s njenim jedinstvenim brojem. Klanu pripadaju peptidaze koje su se razvile iz jednog evolucijskog izvora, a klan predstavlja jednu ili više porodica koje su evolucijski povezane prema sličnostima tercijarnih struktura. Kada tercijarne strukture nisu poznate, pripadnost klanu se određuje prema sličnosti aminokiselinskih ostataka unutar katalitičke podjedinice (6).

2.1.1 Dipeptidil-peptidaza III

Treća otkrivena od osam trenutno poznatih dipeptidil-peptidaza prikazanih u tablici 1 je dipeptidil-peptidaza III (DPP III, EC 3.4.14.4.) (7). DPP III je o cinku ovisna aminopeptidaza koja odcjepljuje dva aminokiselinska ostatka s N-terminalnog kraja peptida duljine 3 do 10 aminokiselina. Prema MEROPS bazi podataka pripada klanu MA, podklanu MA(E) te M49 porodici metalopeptidaza. Za proteine klana MA karakteristično je da je kation cinka koordiniran s dva histidina iz motiva HEXXH, dok je glutamat katalitički ostatak. Porodice

klana MA ujedinjene su zbog postojanja HEXXH motiva (8,9).

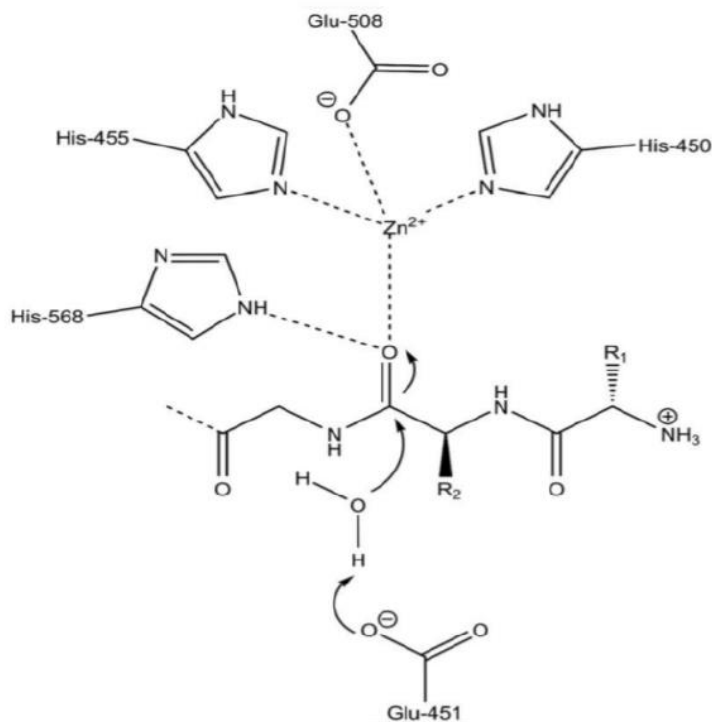
Zbog specifičnosti HEXXGH motiva, DPP III je jedina poznata peptidaza koja pripada M49 porodici.

Tablica 1. Vrste dipeptidil-peptidaza i njihove karakteristike (*prema* Prajapati i Chauhan, 2011)

| Predloženo ime | Swiss-Prot kod | Klasa peptidaza | Lokacija unutar stanice | Aktivnost | Implikacije/ Fiziološka uloga |
|---|----------------|----------------------|-------------------------------------|--|---|
| Dipeptidil-peptidaza 1/ DPP I/ kathesin C i J | P53634 | Cisteinska peptidaza | Lizosom | Egzo/ endopeptidaza | Serinska aktivacija peptidaze / Imunološki odgovor |
| Dipeptidil-peptidaza 2/ DPP II/ DPP VII/ QPP | Q9UHL4 | Serinska peptidaza | Lizosom, citoplazmatske vezikule | Dipeptidil-aminopeptidaza, serinski tip | Hidroliza oligopeptida |
| Dipeptidil-peptidaza 3/ DPP III | Q9NY33 | Metalopeptidaza | Citoplazma | Dipeptidil-aminopeptidaza | Razgradnja proteina, regulacija boli, oksidativnog stresa |
| Dipeptidil-peptidaza 4/ DPP IV/ CD26 | P27487 | Serinska peptidaza | Membrana | Dipeptidil-aminopeptidaza | T-stanice odgovor, izvanstanična razgradnja |
| Dipeptidil-aminopeptidaza 5/ a-nalik 6, DPP VI | P42658 | Serinska peptidaza | Citoplazma, membrana, jezgra | Dipeptidil-aminopeptidaza | Regulacija ekspresije i aktivacije KCND2 |
| Dipeptidil-peptidaza 8/ DPP VIII | Q6V1X1 | Serinska peptidaza | Citoplazma, membrana | Dipeptidil-aminopeptidaza | Imunološki odgovor |
| Dipeptidil-peptidaza 9/ DPP IX | Q86TI2 | Serinska peptidaza | Citoplazma | Dipeptidil-aminopeptidaza | Hidroliza dipeptida proteina |
| Dipeptidil-peptidaza 10 | B4DKB5 | Serinska peptidaza | Membrana | Proteoliza | Nedefinirana |

Kako bi došli do kristalne strukture proteina DPP III, a time i katalitičkog mehanizma i načina vezanja supstrata, Baral i sur. (2008) su proučavali ortolog iz kvasca *S.cerevisiae* koji pokazuje ~40 % sličnosti s DPP III sisavaca po redosljedu aminokiselina, dok su im tercijarne strukture gotovo identične. DPP III je monomerni protein molekulske mase 80-85 kDa i izoelektrične točke $pI \sim 4,5$ čiju strukturu čine dvije domene razdvojene velikom pukotinom. Gornja domena bogata je α -uzvojnicaama te sadrži motive 450-HELLGH-455 (His-Glu-Leu-Leu-Gly-His) i 507-EECRAE-512 (Glu-Glu-Cys-Arg-Ala-Glu), a na njezinom dnu je smješten ion cinka. Uz molekulu vode, histidini (His450 i His455) iz prvog i glutamat (Glu508) iz drugog motiva koordiniraju ion cinka, dok glutamat (Glu451) iz prvog motiva ima bitnu katalitičku funkciju hidrolize dipeptida s N-terminalnog kraja oligopeptida koji se sastoji od 3 ili više aminokiselina. Donju domenu čini kombinacija α -uzvojnica i β -nabranih ploča, a domene su međusobno povezane fleksibilnim petljama (10).

U početku reakcijskog mehanizma koji je prikazan na slici 1, Zn^{2+} stvara interakcije s karbonilnim kisikom supstrata, a Glu451 stvara vodikove veze s molekulom vode koja se nalazi uz karbonilni ugljik. Budući da raste nukleofilnost vode, ona nukleofilno napada karbonilni ugljik što dovodi do pucanja peptidne veze i otcjepljivanja dipeptida. Karbonilni je kisik stabiliziran ionom cinka i His568, dok dušik peptidne veze stabilizira Glu451 i Tyr 318 (11).



Slika 1. Mehanizam katalitičkog djelovanja humane DPP III (Baral i sur., 2008)

DPP III je prvi puta izolirana 1967. iz goveđe hipofize te je nazvana dipeptidil-arilamidaza III (12), poslije dipeptidil-aminopeptidaza III (13), a tek 1992. dobiva današnje ime. Zbog pretpostavke o njezinoj fiziološkoj ulozi, nazivala se i enkefalinaza B (13) i angiotenzinaza crvenih krvnih stanica (14). Ortolozi su pronađeni i u više od 50 vrsta, uključujući kvasce (lat. *Saccharomyces cerevisiae*), bakterije, sluzavu plijesan (lat. *Dictyostelium discoideum*) (15) i vinsku mušicu (lat. *Drosophila melanogaster*) (16). Izolirana je iz mozga (13), jetre (17) i bubrega štakora (18), sjemene plazme (19), tkiva leće (20) i eritrocita čovjeka (14), goveđe hipofize (12) i brojnih drugih tkiva.

Iako još uvijek nije jasna fiziološka uloga enzima DPP III, zbog njene peptidazne aktivnosti smatra se da sudjeluje u završnim stadijima razgradnje proteina u stanici, dok se zbog afiniteta prema pojedinim bioaktivnim peptidima smatra da bi mogla imati ulogu u regulaciji krvnog tlaka i boli (7). Analizom cerebrospinalne tekućine osoba koje pate od akutne boli, ustanovljene su niske razine aktivnosti DPP III (21). Uz to, pronađene su i visoke koncentracije DPP III u površinskoj lamini leđnog roga leđne moždine štakora (22), kao i visoki *in vitro* afinitet humane DPP III prema važnim neuropeptidima poput enkefalina i endomorfinu (23). DPP III ima ulogu i u kataraktogenezi (24). Ova otkrića su zaslužna za shvaćanje DPP III kao potencijalnog ciljnog mjesta djelovanja lijekova (25).

DPP III je zadobila pozornost zbog prekomjerne ekspresije u malignim tkivima endometrija i jajnika (26,27) dok je u novije vrijeme nađena povećana ekspresija u raku pločastih stanica pluća (2), dojke (28) i kolorektalnom karcinomu (29). Potencijalna uloga DPP III u raku pluća i dojke povezana je s aktivacijom signalnog puta Keap1-Nrf2. Naime, utvrđeno je da je DPP III jedan od kompetitivnih interaktora proteina Keap1 koji vezanjem dovode do narušavanja kompleksa Keap1-Nrf2 i nemogućnosti ubikvitinacije i razgradnje transkripcijskog faktora Nrf2 te translokacije novonastalog Nrf2 u jezgru i aktivacije niza gena uključenih u odgovor na oksidacijski stres (2, 28). Uloga DPP III u regulaciji oksidacijskog stresa potvrđena je proučavanjem miša kojem je izbačen gen za DPP III (DPP III KO, engl. *knock out*) kod kojeg je utvrđen poremećaj u razvoju kosti povezan s povišenim razinama oksidacijskog stresa (30).

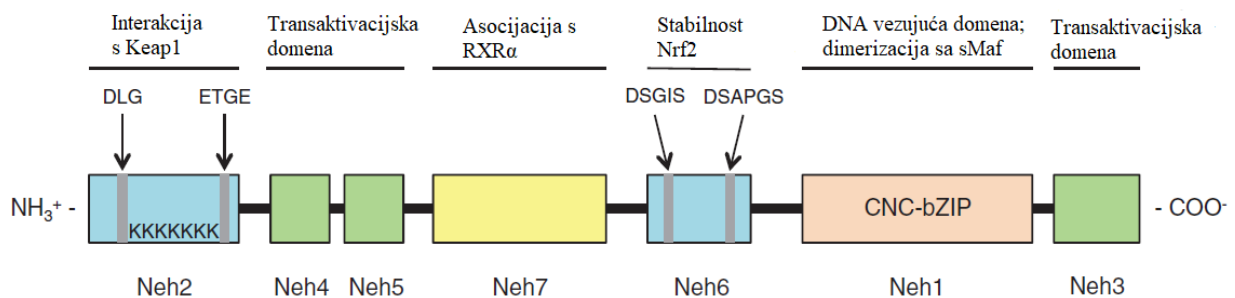
2.2 SIGNALNI PUT KEAP1-NRF2

Različiti vanjski čimbenici poput zagađivača okoliša, lijekova, prehrambenih aditiva, ultraljubičastog i ionizirajućeg zračenja, kao i slobodni radikali i reaktivne oksidacijske vrste (ROS, engl. *reactive oxygen species*) glavni su toksikanti koji uzrokuju oštećenja proteina,

lipida i DNA.

Jedan od najbitnijih mehanizama kojim se stanica bori s oksidacijskim stresom je signalni put Keap1-Nrf2. Aktivirani transkripcijski faktor Nrf2 (engl. *nuclear factor erythroid E2-related factor 2*) sudjeluje u regulaciji gena koji kodiraju za brojne antioksidacijske i detoksifikacijske enzime čija je ekspresija regulirana preko antioksidacijskog reagirajućeg elementa ARE (engl. *antioxidant response element*). Sekvenca ARE (5'-TGACXXXG-3') je cis-djelujući regulatorni element koji se nalazi u promotorima spomenutih gena (31).

Nrf2 pripada porodici CNC (engl. *Cap 'N' Collar*) transkripcijskih faktora koju karakterizira struktura osnovnog leucin zatvarača (bZIP), a sastoji se od sedam domena Neh1-7 (engl. *Nrf2-ECH homology domains*) prikazanih na slici 2. Neh1 domena sadrži regiju CNC-bZIP bitnu za vezanje na DNA i za dimerizaciju s proteinima sMaf (engl. *small masculoaponeurotic fibrosarcoma*). Domena Neh2 sadrži dva visoko konzervirana motiva, DLG i ETGE, koji su bitni za interakciju s negativnim regulatorom Keap1 (engl. *Kelch-like ECH-associated protein 1*) i sedam aminokiselinskih ostataka lizina koji su bitni za ubikvitinaciju i degradaciju Nrf2. Zajedno s Neh4 i Neh5, C-terminalna Neh3 domena sudjeluje u transaktivaciji ciljnih gena proteina Nrf2. Za negativnu regulaciju Nrf2 neovisnu o Keap1 proteinu odgovorna je Neh6 domena. Također, Neh7 domena s RXR α (engl. *retinoid X receptor α*) zaslužna je za represiju Nrf2 (32).

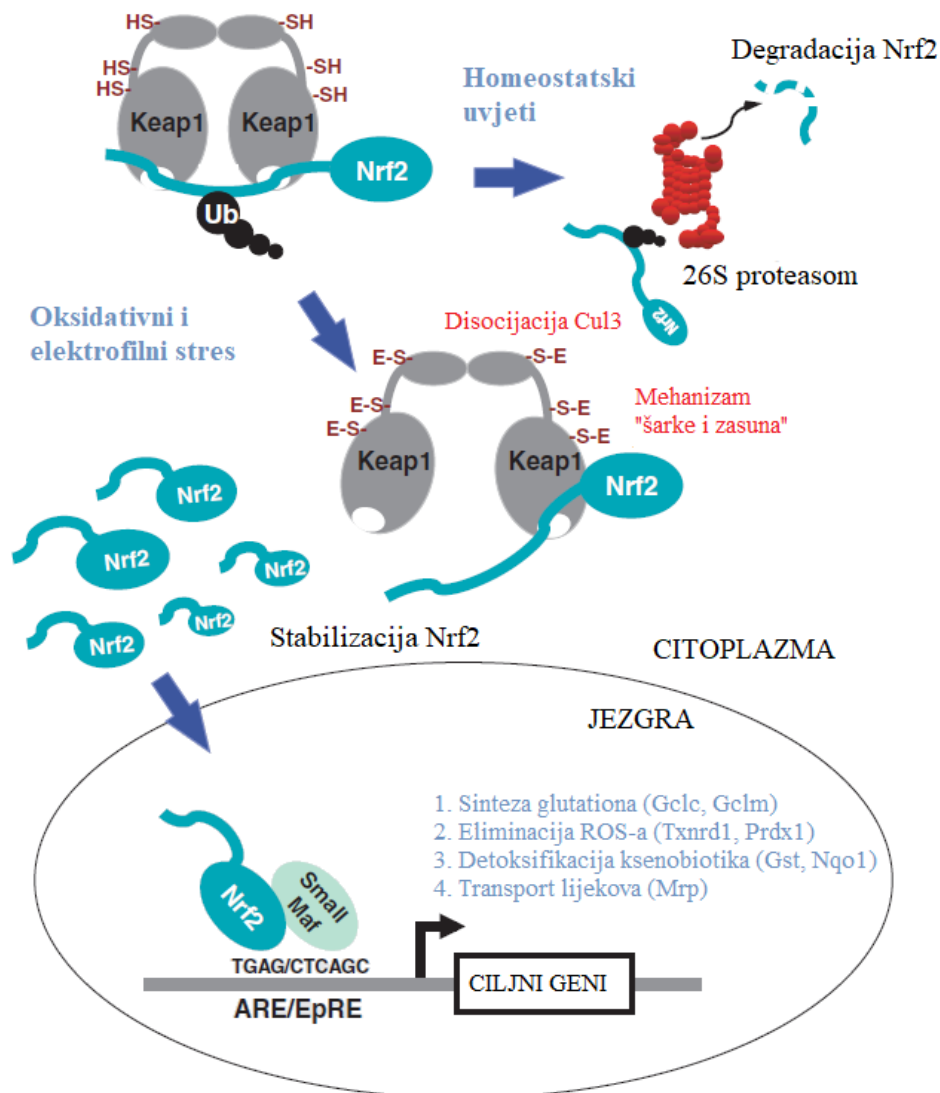


Slika 2. Struktura humanog proteina Nrf2 (prema Tonelli i sur., 2018)

U homeostatskim uvjetima za nisku razinu Nrf2 bitan je Keap1 koji veže E3 ubikvitin ligazu koja sadrži Cul3 (Cullin 3). Protein Keap1 sastoji se od domene BTB (engl. *broad complex/tramtrack/bric-a-brac*), domene IVR (intervenirajuće domene) i domene Kelch ili domene DGR (engl. *double glycine repeat*) (33). Budući da je Keap1 dimerni protein za čiju je dimerizaciju zaslužna domene BTB koja veže Cul3, protein-protein interakcije s Nrf2

ostvaruju se preko domene Kelch monomera i motiva ETGE i DLG domene Neh2 faktora Nrf2. Motiv ETGE se veže jače od motiva DLG te su na temelju toga Tong i sur. 2007. godine razvili model „šarke i zasuna“ (engl. *hinge and latch*) koji se koristi za opisivanje prepoznavanja supstrata na dva mjesta. Keap1 veže Nrf2 preko motiva ETGE (šarka) te nakon toga motiv DLG (zasun) sjeda na susjednu domenu Kelch.

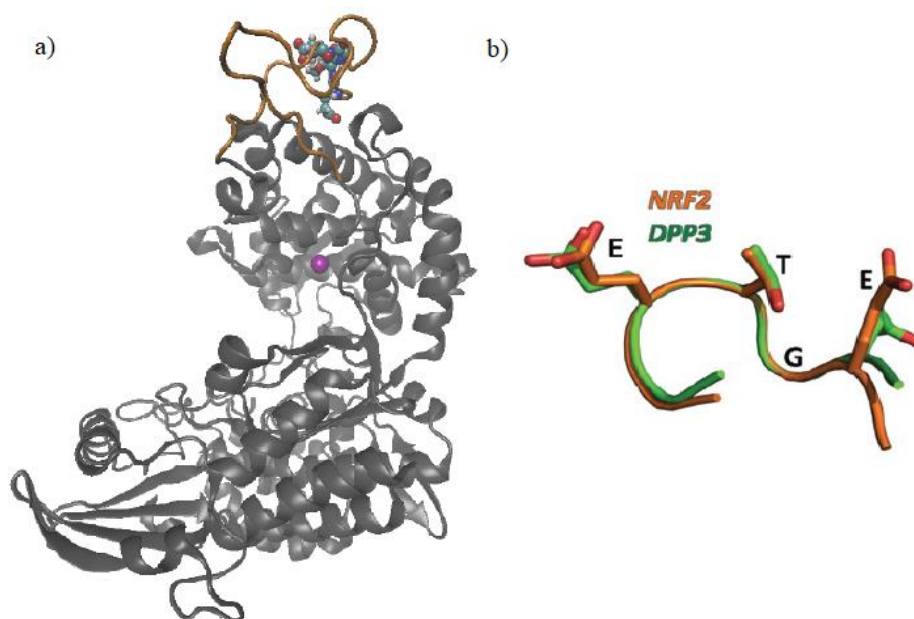
Humani Keap1 sadrži 27 cisteinskih ostataka (34) koji imaju funkciju senzora za ROS čestice i ksenobiotike. Pri uvjetima oksidacijskog stresa dolazi do njegove kovalentne modifikacije i otpuštanja Nrf2 s DLG motiva zbog čega Nrf2 nije moguće ubikvitinirati i degradirati. Novosintetizirani Nrf2 premiješta se u jezgru gdje dimerizira s proteinima sMaf, a nastali se kompleks veže na sekvencu ARE (slika 3). U konačnici, dolazi do aktivacije gena koji kodiraju za antioksidacijske i detoksifikacijske enzime i ostale proteine bitne za odgovor stanice na stres (35).



Slika 3. Shematski prikaz signalnog puta Keap1-Nrf2 (prema Taguchi i sur., 2011)

2.2.1 Interakcija DPP III s proteinom Keap1

Osim brojnih somatskih mutacija u genima koji kodiraju ubikvitin ligazu Keap1 i njezin supstrat Nrf2, do deregulacije signalnog puta Keap1-Nrf2 dolazi putem staničnih proteina koji sadrže motiv ETGE te imaju mogućnost vezanja na protein Keap1. Vezanjem na druge proteine, onemogućeno je vezanje Keap1 na transkripcijski faktor Nrf2 što dovodi do manjeg udjela ubikvitiniranog Nrf2, tj. do povećane koncentracije Nrf2 u stanici. Hast i sur. su 2013. godine identificirali jedan takav protein, DPP III. Uspoređivanjem aktivnosti divljeg tipa DPP III i katalitički inaktivnog mutanta Y318F, utvrđena je podjednaka aktivacija Nrf2 ovisne transkripcije, odnosno da katalitička aktivnost DPP III nije potrebna za vezanje s Keap1. Također, mutanti DPP III s delecijom motiva ETGE, kao i oni s mutacijom ETGE→AAGE, nemaju mogućnost vezanja na Keap1. Uz to, utvrđeno je da je prekomjerna ekspresija DPP III povezana s visokom aktivnosti Nrf2 u pločastom karcinomu pluća (2).



Slika 4. a) 3D struktura hDPP III (prema Gundić, 2016); narančasto - ETGE motiv fleksibilne petlje, ljubičasto - ion cinka), b) Shematski prikaz konformacija peptida ETGE DPP III i Nrf2 kad su vezani na Keap1 (Hast i sur., 2013)

Motiv ETGE se nalazi na nestrukturiranoj petlji na površini katalitičke domene i najpokretniji je dio humane DPP III (slika 4a) (36). Kada su vezani na protein Keap1, motivi ETGE DPP III i Nrf2 zauzimaju gotovo jednaku konformaciju (slika 4b) (37). Mehanizam vezanja DPP III i Keap1 odvija se u dva koraka: endergona translokacija petlje koja sadrži

ETGE i egzergona interakcija DPP III s Kelch domenom. Istraživanjem afiniteta vezanja, utvrđeno je da mutirana varijanta proteina DPP III, R623W, čija je genomska sekvenca nađena u genomu uzorka karcinoma endometrija, ima više od 100 puta veći afinitet prema proteinu Keap1 od divljeg tipa te da bi mogao uslijed jačeg vezanja na Keap1 aktivirati signalni put Keap1-Nrf2 (38).

2.3 PRIMJENA KULTURE STANICA

Tehnologija kulture stanica je relativno mlada eksperimentalna metoda prihvaćena tek 1952. g. dok njezini počeci sežu u 1880. g. kada je Roux u otopini soli održavao pileće embrije te 1890. g. kada je Harrison uzgajao stanice živaca embrija žabe. Ključan događaj u razvoju tehnologije životinjskih stanica dogodio se 1952. g. kada je Gey uzgojio HeLa stanice, prvu humanu staničnu liniju.

Kulturu životinjskih stanica definiramo kao pojedinačne stanice izdvojene iz tkiva ili organa, koje je moguće održavati u umjetnom okolišu i smatrati zasebnim organizmom u uvjetima *in vitro*. Prijenos stanica iz kontroliranih uvjeta u kojima su bile diferencirane i obično se nisu dijelile rezultira njihovom prilagodbom na nove uvjete okoliša i brzim rastom. Posljedica navedene prilagodbe je dediferencijacija, tj. gubitak njihovih visokospecijaliziranih funkcija.

Prvi korak je uspostavljanje primarne kulture životinjskih stanica, odnosno izolacija stanica iz željenog organa ili organizma i njihovo nacjepljivanje u hranjivom mediju te održavanje kulture u optimalnim uvjetima. Primarna kultura najbolje odražava *in vivo* uvjete jer stanice zadržavaju većinu specifičnih funkcija i svojstva tkiva iz kojeg su potekle te je stoga najprikladnija za ispitivanje svojstava i odgovora koje daju diferencirane stanice. Postupkom subkultiviranja, precjepljivanja ili pasažiranja primarne kulture razvija se sekundarna stanična kultura te dolazi do nastanka velike količine jednolikog materijala pogodnog za dugotrajnu uporabu. Nakon nekoliko precjepljivanja, stanična kultura ulazi u fazu replikativne senescencije čija je završna faza karakterizirana odumiranjem stanica te takve stanice nazivamo konačnom ili smrtnom staničnom linijom.

Spontane mutacije, tretman stanica fizikalnim i kemijskim agensima, stvaranje hibridnih stanica, transfekcija virusnim genima ili transdukcija virusima i prekomjerna ekspresija gena regulatora staničnog ciklusa su načini kojim se uspostavljaju besmrtno stanice, a taj postupak pretvorbe u kontinuiranu ili beskonačnu staničnu liniju nazivamo imortalizacijom.

Svojstva koja su nužna za rad s kulturama stanica i jamče potrebnu stabilnost i predvidljivost u ponašanju kulture su besmrtnost i klonalnost stanica što znači da sve stanice imaju svojstvo neograničenog broja dioba i sve su stanice iz jedne stanične linije genotipski identične. Dvije najveće banke stanica koje obuhvaćaju preko 3000 različitih staničnih linija su: *American Type Cell Culture (ATCC)* i *European Collection of Animal Cell Culture (ECACC)*, a velika većina staničnih linija jesu besmrtne i klonalne.

Kulture životinjskih stanica danas imaju široku primjenu u toksikološkim ispitivanjima novih lijekova, kozmetičkih pripravaka, industrijskih spojeva i onečišćenja okoliša s ciljem smanjenja broja pokusnih životinja, a u biotehnologiji se koriste za dobivanje rekombinantnih proteina, monoklonskih protutijela i cjepiva. Koriste se i u staničnoj i molekularnoj biologiji kao modelni sustavi te u farmakologiji za ispitivanje djelovanja lijekova i metaboliziranje istih. Brojne su prednosti testova na kulturama stanica poput relativno brze i rutinske analize, visoke razine standardizacije, smanjenje varijabilnosti između eksperimenata, nastajanje manje količine potencijalno toksičnog otpada te u konačnici i smanjenje broja pokusnih životinja.

Ono što razlikuje rad s kulturama stanica i tkiva od ostalih laboratorijskih tehnika su aseptični uvjeti kojima se osigurava sprječavanje kontaminacije najčešće bakterijama, virusima i plijesnima. Najveći problem predstavljaju bakterije kojima je vrijeme udvostručavanja otprilike 30 min, dok za stanice iznosi 24h, stoga je pri radu s kulturama stanica potrebno obratiti pozornost na to da se predviđeni prostor nalazi u području gdje nema prašine i velikog kretanja ljudi, da ima dovoljno mjesta za pripremu i sterilizaciju pribora i svu potrebnu opremu koju čine: komora za sterilan rad (laminar), CO₂ inkubator, autoklav, svjetlosni mikroskop, hladnjaci, zamrzivači, centrifuge itd. Prvi pokazatelj kontaminacije je nagli pad pH vrijednosti medija, zbog čega dolazi do promjene boje indikatora fenol-crveno u narančastu pa žutu ako medij za uzgoj stanica sadrži indikator te dolazi do zamućenja kulture.

Prema načinu uzgoja, kulture životinjskih stanica možemo podijeliti na adherentne stanice ili stanice koje rastu jedino ako su prihvaćene na površinu i suspenzijske stanice ili stanice koje mogu rasti neovisno o površini (39).

3 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Kemikalije

- β -merkaptoetanol (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka)
- Luria-Bertani medij (LB medij) (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka)
- 20%-tna glukoza (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka)
- magnezijev klorid heksahidrat ($\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$)
- ampicilin (Amp) (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka)
- (96%-tni) etanol (Kefo, Sisak, Hrvatska)
- DMEM medij (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- 0,5 % tripsin-EDTA (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka)
- natrijev azid (NaN_3) (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka)
- Lipofectamin 2000 (Termo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- Opti-MEM (Termo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- miliporirana voda (mQ)
- Bradford reagens (0,01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7 % (w/v) etanol, 8,5 % (w/v) fosfatna kiselina (H_3PO_4))
- HALT inhibitori proteaza (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- Tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris) (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka)
- Izopropil-1-tio- β -D-galaktopiranozid (IPTG) (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka)
- Natrijev klorid (NaCl) (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka)
- Klorovodična kiselina (HCl) (T.T.T., Novaki, Hrvatska)

3.1.2 Otopine i puferi

PBS pufer

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
10 mM Na₂HPO₄
1,8 mM KH₂PO₄

Pufer za lizu (pH 7,5)

50 mM Tris-HCl
150 mM NaCl
0,5 % NP-40
1 mM EDTA

10X Transfer pufer

192 mM glicin
25 mM Tris

1X Transfer pufer

192 mM glicin
25 mM Tris
10 % metanol

10X TBS (pH=7,4)

200 mM Tris
1500 mM NaCl

1X TBS (pH=7,5)

20 mM Tris
150 mM NaCl

TBS-T

0,1 % Tween-20 u TBS-u

5 %-tno mlijeko u TBS-T

0,5 g mlijeka u prahu
10 mL TBS-T

2X TB

0,125 M Tris-HCl pH 6
4 % SDS (natrij dodecil-sulfat)
20 % β-merkaptioetanol
0,03 mM Bromfenol Blue

3.1.3 Markeri veličine i boje

Za SDS-poliakrilamid gel elektroforezu korištene su boje bromfenol-plavo, *Coomassie Brilliant Blue G-250* (CBB) i marker *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Za bojanje nitrocelulozne membrane u Western blot-u korištena je 0,1 % (w/v) *Ponceau S* u 5 %-tnoj octenoj kiselini. 0,4 % *Trypan Blue Solution* (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) korišten je za određivanje broja HEK293T stanica.

3.1.4 Enzimi

- *PfuUltra* DNA polimeraza (Agilent, Santa Clara, Kalifornija, SAD)
- restrikcijski enzim *Dpn I* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)

3.1.5 Plazmidi, bakterijski sojevi i stanične linije

- plazmidni vektor pFLAG-CMV2-KEAP1
- bakterije XL10-Gold Ultrakompetentne *E.coli* (Agilent, Santa Clara, Kalifornija, SAD)
- HEK293T stanice

3.1.6 Komercijalni kompleti

- Za ciljanu *in vitro* mutagenezu korišten je *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent, Santa Clara, Kalifornija, SAD). Za izolaciju i pročišćavanje plazmida iz bakterija korišten je *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD).

3.1.7 Antitijela

- *mouse* anti-HA-agarozna (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- primarno antitijelo *rabbit* anti-FLAG (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- sekundarno antitijelo *goat* anti-*rabbit*-HRP (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)

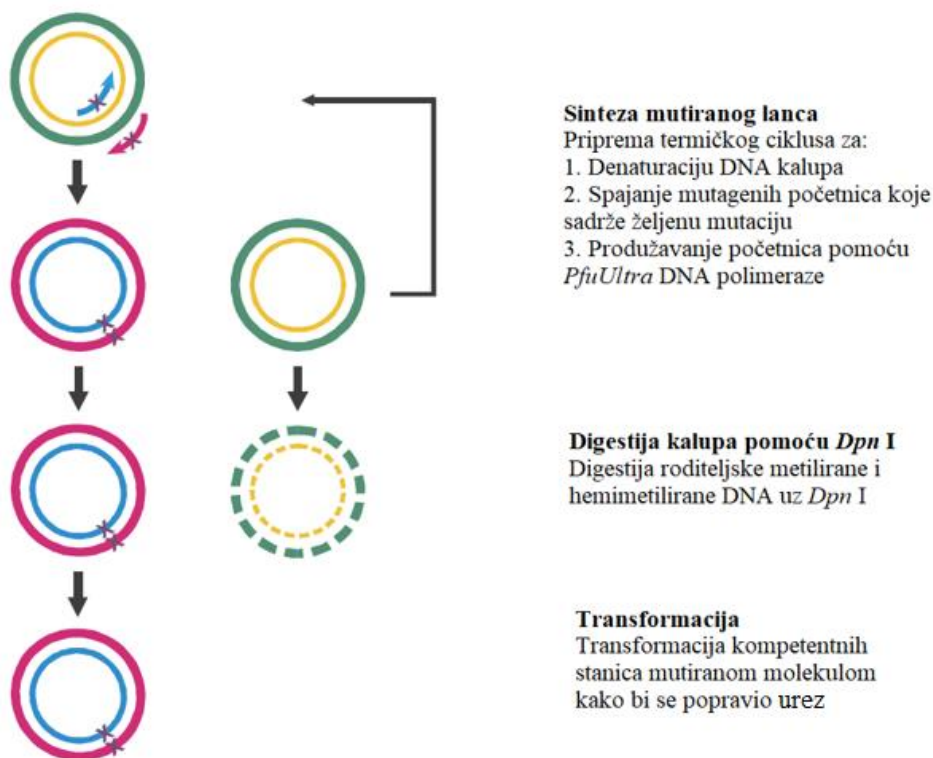
3.1.8 Uređaji i oprema

- PCR uređaj, GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD)
- automatski brojač stanica Luna II (Logos Biosystems, Dongan-gu Anyang-si, Gyeonggi-do, Južna Koreja)
- Stakalce Luna Reusable Slide L12008 (Logos Biosystems, Dongan-gu Anyang-si, Gyeonggi-do, Južna Koreja)
- Inkubator (Heracell, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- Inverzni mikroskop (BOECO, Hamburg, Njemačka)
- sistem za western analizu - Mini Protean Tetra System (BioRad, Hercules, Kalifornija, SAD)
- mikrovolumni spektrofotometar BioDrop (BioChrom, Cambridge, UK)
- sistem za detekciju kemiluminiscencije i fluorescencije Alliance Q9 Mini (Uvitec, Cambridge, UK)

3.2 METODE

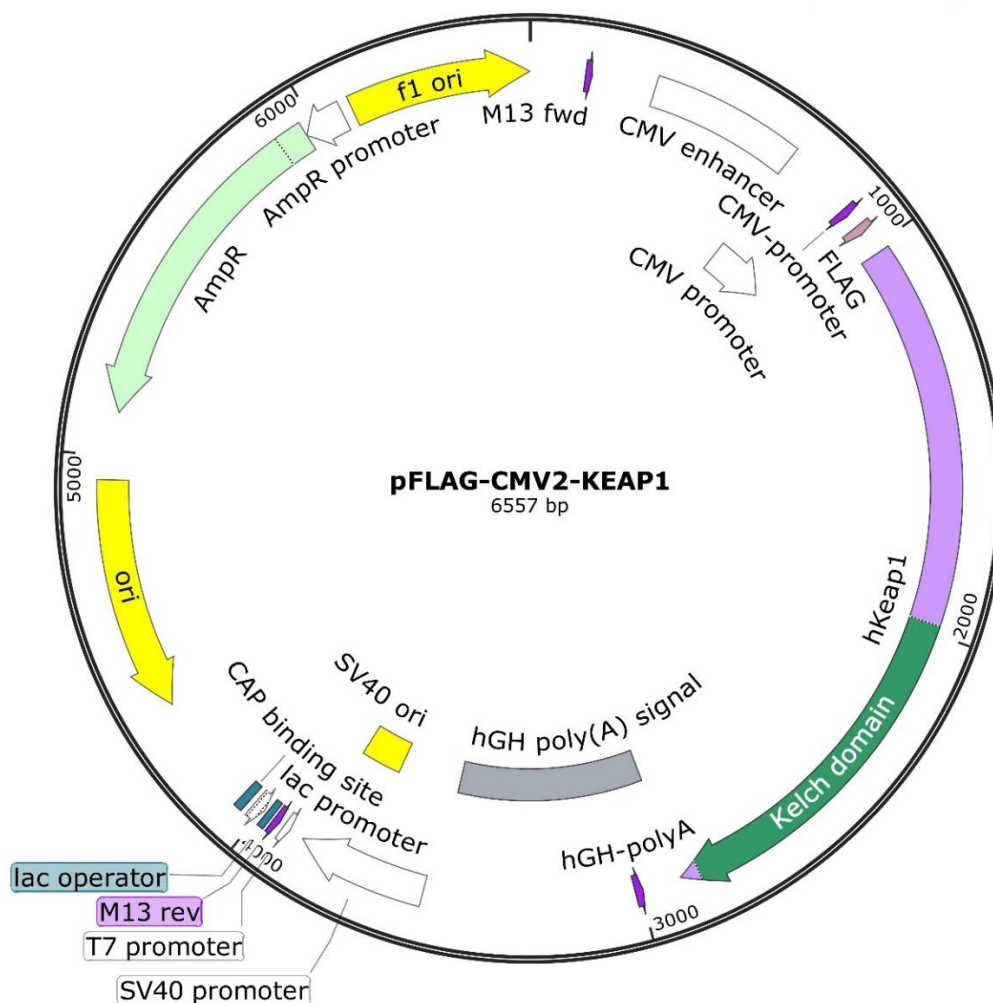
3.2.1 Mjesno-specifična mutageneza

Mjesno-specifična *in vitro* mutageneza je metoda koja se temelji na umnažanju sljedova DNA lančanom reakcijom polimerazom (eng. *Polymerase chain reaction*, PCR) pomoću enzima DNA-polimeraze i para početnica (slika 5). Potrebne početnice sadrže točno određenu mutaciju u sekvenci koja se uvodi u DNA odsječak te dijelove koji su komplementarni sekvenci odsječka uzvodno i nizvodno od mutacije. Metoda se provodi uz polimerazu visoke vjernosti, odnosno polimerazu koja posjeduje 3'→5' egzozonukleaznu aktivnost koja joj omogućuje izrezivanje krivo ugrađenih nukleotida u novosintetiziranom lancu. Zatim se restriksijskom endonukleazom iz reakcijske smjese uklanjaju metilirani slijedovi DNA, odnosno plazmid koji je korišten kao kalup za sintezu mutiranog slijeda koji ne sadrži željenu mutaciju. Restriksijski enzimi nemaju mogućnost cijepanja umnožene nemetilirane DNA čime ona ostaje nerazgrađena u reakcijskoj smjesi. Novosintetizirana se DNA metodom transformacije zatim uvodi u kompetentne bakterije *E.coli* gdje se replicira.



Slika 5. Postupak mjesno-specifične mutageneze (prema *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit*, Agilent)

Kako bi se dobile mutirane varijante Keap1 proteina, korišten je *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent). Kalup DNA potreban za provođenje lančane reakcije polimerazom je plazmidni vektor pFLAG-CMV2-KEAP1 (slika 6) uz *PfuUltra* DNA polimerazu. Za razliku od uobičajene PCR metode koju karakterizira eksponencijalno umnažanje produkata, produljenjem mutiranih oligonukleotidnih početnica nastaje plazmid koji sadrži urez (engl. *nick*) te novosintetizirani lanci ne mogu poslužiti kao kalupi u sljedećem elongacijskom ciklusu što ovu metodu čini linearnom (40). U tablici 2 su prikazane dizajnirane početnice potrebne za ciljane mutacije KEAP1 proteina.



Slika 6. Mapa pFLAG-CMV2-KEAP1 plazmida

Tablica 2. Nukleotidni slijed dizajniranih početnica za mjesno-specifičnu mutagenezu

| Mutacija | GC / % | T _m / °C | Nukleotidni slijed 5'→3' |
|-------------------|--------|---------------------|---|
| Nemutirani slijed | | | CACCGCGGGCGGCTACTTCCGACAG |
| G333C | 68 | 78,4 | (F) CACCGCGGGCTGCTACTTCCGACAG (R) CTGTCGGAAGTAGCAGCCCGCGGTG |
| Nemutirani slijed | | | GGGGGGCTTTGACGGGACAAACCGCC |
| G480W | 65 | 78,4 | (F) GGGGGGCTTTGACTGGACAAACCGCC (R) GGCGGTTTGTCCAGTCAAAGCCCCC |

*podcrtani su kodoni u koje se uvode mutacije

U reakcijsku smjesu dodaju se svi sastojci iz tablice 3 izuzimajući plazmid, *PfuUltra* i početnica. Nakon što su dodani plazmid, *PfuUltra* i početnica, smjesa se centrifugira te se provodi linearna amplifikacija prema tablici 4.

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese za provedbu PCR reakcije

| Reagens | Volumen ishodne otopine / μ L |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| mQ H ₂ O | 14,1 |
| 10X rxn pufer | 2,5 |
| dNTP mix | 0,5 |
| Quik sol. Reagens | 1,5 |
| 10 μ L primer-F | 0,7 |
| 10 μ L primer-R | 0,7 |
| 10 ng/ μ L pFLAG-CMV2-KEAP1 | 5 |
| PfuUltra | 0,5 |
| UKUPNI VOLUMEN SMJESE | 25 |

Tablica 4. Program provedbe linearne amplifikacije

| Temperatura / °C | Vrijeme | Broj ciklusa |
|------------------|----------|--------------|
| 95 | 1' | 1 |
| 95 | 50" | |
| 60 | 50" | 18 |
| 68 | 7' | |
| 68 | 7' | 1 |
| 16 | ∞ | / |

Nakon što je dovršena linearna amplifikacija, u reakcijsku smjesu je dodano 0,5 μ L restriktivnog enzima *Dpn* I i inkubirano 1 sat i 20 min na 37 °C nakon čega je reakcijska smjesa prebačena na led.

3.2.2 Transformacija XL10-Gold ultrakompetentnih stanica bakterije *E. Coli*

Nakon što su umnoženi plazmidi koji sadrže željenu mutaciju, potrebno je izvršiti transformaciju bakterija, odnosno unos plazmidne DNA u XL10-Gold ultrakompetentne *E.coli*. Selekcija pozitivnih transformanata provodi se na LB ploči s antibiotikom ampicilinom. Naime, vektor pFLAG-CMV2-KEAP1 sadrži gen za rezistenciju na ampicilin te će na podlozi narasti samo one bakterijske kolonije koje su transformirane navedenim plazmidom.

XL10-Gold ultrakompetentne *E.coli* specifične su zbog posjedovanja fenotipa Hte koji povećava učinkovitost transformacije. Također, ovaj soj karakterizira delecija gena koji kodira za endonukleazu (*endA1*) te delecija gena koji kodira za enzim potreban u rekombinaciji (*recA*), a sve kako bi se povećala stabilnost inserta.

Metoda transformacije provedena je na način da je u alikvot od 20 μ L XL10-Gold ultrakompetentnih stanica dodano 0,9 μ L β -merkaptetoetanol nakon čega je smjesa lagano promiješana i inkubirana na ledu 10 minuta. Zatim je dodano 0,9 μ L *Dpn* I tretiranih amplifikacijskih reakcija, lagano promiješano te inkubirano na ledu 30 minuta. Pripremljeno je 0,4 mL LB+ medija (0,4 LB + 8 μ L 20% glukoze + 10 μ L 0,5 M $MgCl_2$) te zagrijano na 42 °C na termobloku. Bakterijske stanice izlažu 30 sekundi toplinskom šoku na 42 °C nakon čega se prebacuju na led 2 minute kako bi se regenerirale. Pripremljeni LB+ medij se dodaje na stanice te se sve zajedno inkubira 1 sat na 37 °C na termobloku pri 400 rpm (engl. *rotation per minute*). Suspenzija volumena 200 μ L se nakon procesa inkubacije nasadila na LB ploče s antibiotikom ampicilinom i ostavila preko noći na 37 °C kako bi bakterijske kolonije mogle narasti.

Budući da imamo dva mutanta, imamo dvije LB ploče prikazane na slici 7 s otprilike 50 do 100 bakterijskih kolonija s kojih su izabrane zasebne kolonije koje su prenesene u prethodno pripremljenih 4 mL LB medija s ampicilinom za prekonoćni uzgoj.



Slika 7. Transformirane kolonije XL10-Gold ultrakompetentnih *E. coli*

3.2.3 Izolacija i pročišćavanje plazmida

Postupak izolacije plazmida provodi se na sobnoj temperaturi, a započinje centrifugiranjem prekonoćne kulture na 6800 g u trajanju od 2 minute nakon čega je supernatant odliven. Daljnji tijek postupka opisan je u protokolu *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* proizvođača Thermo Fischer Scientific.

Talog zaostao nakon centrifugiranja bakterijskih kultura resuspendiran je u 250 μ L otopine za resuspendiranje (engl. *Resuspension solution*) te je prebačen u tubice od 2 mL. Jako je bitno da je talog u potpunosti resuspendiran. Zatim je u suspenziju dodano 250 μ L otopine za lizu (engl. *Lysis solution*). Suspenzija se razbistrila nakon okretanja epruvete 5 do 6 puta. Otopina za lizu sadrži natrijev hidroksid (NaOH) i natrijev dodecil-sulfat (SDS) koji cijepaju staničnu membranu bakterija i dovode do denaturacije genomskog materijala. Kako bi plazmidna DNA izbjegla denaturaciju, bitno je da se liza uzorka ne provodi dulje od 5 minuta. U nastali lizat dodano je 350 μ L otopine za neutralizaciju (engl. *Neutralization solution*), a nakon miješanja okretanjem, neutralizirani bakterijski lizat je postao zamućen. Potom je provedeno centrifugiranje u stolnoj centrifugi Eppendorf u trajanju od 5 minuta pri brzini od 16000 g, izdvojen je supernatant i prebačen u *GeneJET spin* kolonice te je ponovljeno centrifugiranje u trajanju od 1 minute. *GeneJET spin* kolonice su isprane s 500 μ L otopine za ispiranje (engl. *Wash solution*) uz centrifugiranje 1 minutu. Filtrat je izliven, a

ispiranje je ponovljeno još jednom. Potom je izvršeno centrifugiranje same kolonice u trajanju od 1 minute kako bi se uklonio eventualni ostatak otopine za ispiranje s etanolom, a na kolonici ostala samo plazmidna DNA. Kako bi se plazmidna DNA eluirala, kolonica je prebačena u novu tubicu od 1,5 mL te je dodano 50 μ L elucijskog pufera (engl. *Elution buffer*) točno iznad membrane kolonice. Provedena je inkubacija na sobnoj temperaturi 2 minute te potom centrifugiranje 2 minute. Koncentracija pročišćene plazmidne DNA određena je na mikrovolumnom spektrofotometru *BioDrop* (41).

Kako bi se provjerila uspješnost provedenih mutacija, pripremljene su reakcijske smjese plazmidne DNA s početnicama hGH-polyAR, CMV for i hKeap1-489F i poslane na sekvenciranje u tvrtku *Macrogen*.

3.2.4 Rad sa stanicama

Za potrebe ovog rada korištena je stanična linija HEK293T koja potječe iz bubrega humanog embrija te pripada skupini adherentnih staničnih kultura. Jednostavne su za uzgoj i transfekciju te su česte u biološkim istraživanjima.

HEK293T stanice uzgojene su u T75-boci (engl. *T75-flask*) na temperaturi od 37 °C u Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM mediju) u inkubatoru s kontroliranom atmosferom od 95 % zraka i 5 % CO₂. Na uređaju *Luna II* (Logos) određen je broj stanica nanošenjem 10 μ L suspenzije stanica i 10 μ L *Tripan Blue* otopine na stakalce *Luna Reusable Slide L12008* (Logos), a iznosio je $1,68 \cdot 10^7$ st mL⁻¹. Budući da je potrebno nasaditi oko 150000 stanica po jažici, u ploču sa šest jažica nasadili smo po 60 μ L stanične suspenzije nakon razrjeđenja 10⁻¹. Nacjepljivanje stanica provodi se u komori za sterilni rad uz sterilni laboratorijski pribor, a prije početka eksperimenta radnu plohu i ruke je potrebno je obrisati 70 %-tnim etanolom.

3.2.4.1 Transfekcija HEK293T stanica

Kako bismo provjerili ekspresiju divljeg tipa proteina KEAP1 i njegovih mutanata G333C i G480W, provedena je kemijska transfekcija HEK293T stanica uz *Lipofectamin 2000* (Termo Fisher Scientific) koji se sastoji od pozitivno nabijene polarne glave na koju je posredno vezan nezasićeni alkilni lanac. Transfekcija je postupak uvođenja strane DNA u jezgru eukariotskih stanica, a zasniva se na miješanju otopine DNA i transfekcijskih čestica i stvaranju kompleksa koji se zatim dodaje staničnoj kulturi. Isprobana su dva različita omjera

DNA:Lipo kako bi se ispitalo pri kojem je omjeru jača ekspresija proteina.

Tablica 5. Protokol prema kojem je izvedena transfekcija za provjeru ekspresije proteina

| Jažica | Plazmid | Omjer DNA:lipo | DNA [μL] | Optimem [μL] | Lipo [μL] | Optimem [μL] |
|--------|----------------------------|-------------------|-------------|-----------------|--------------|-----------------|
| 1 | pFLAG-CMV2-KEAP1 | 1:2,5 | 1,9 | 248 | 2,5 | 248 |
| 2 | pFLAG-CMV2-KEAP1 | 2:5 | 3,8 | 246 | 5 | 245 |
| 3 | pFLAG-CMV2-KEAP1- G333C | 1:2,5 | 5 | 245 | 2,5 | 248 |
| 4 | pFLAG-CMV2-KEAP1- G333C | 2:5 | 10 | 240 | 5 | 245 |
| 5 | pFLAG-CMV2-KEAP1- G480W | 1:2,5 | 3,7 | 247 | 2,5 | 248 |
| 6 | pFLAG-CMV2-KEAP1- G480W | 2:5 | 7,4 | 243 | 5 | 245 |

Prema prethodno izračunatom protokolu prikazanom u tablici 5, u 12 tubica je dodan odgovarajući volumen Optimem medija. Zatim je u prvih 6 tubica dodan Lipofectamin 2000, a u drugih 6 tubica divlji tip plazmida za ekspresiju divljeg tipa (WT, engl. *wild type*) proteina Keap1, odnosno njegovih mutiranih varijanti. Prva tubica s Lipofectaminom spojena je s prvom tubicom s plazmidom i tako redom, a potom je uslijedila inkubacija na sobnoj temperaturi 5 minuta. Sadržaj iz 6 tubica nakapan je na stanice prethodno nacijepljene na ploču s 6 jažica koje su zatim vraćene u inkubator. Proteini su izolirani iz stanica 24 sata nakon transfekcije. Stanice su prvo isprane s 1 mL PBS-a nakon čega je na stanice dodano 400 μL pufera za lizu u koji su neposredno prije korištenja dodani HALT inhibitori proteaza (Thermo Fisher Scientific). Zatim su stanice inkubirane na ledu 10 minuta nakon čega je suspenzija prebačena u tubice od 2 mL i centrifugirana na 4 °C 30 minuta. Supernatant je odvojen u tubice od 1,5 mL, a koncentracija proteina je određena pomoću metode po Bradfordu (42). Proteini su zatim analizirani western analizom.

3.2.4.2 Transfekcija stanica za koimunoprecipitaciju

Nakon analize ekspresije proteina Keap1 s različitim omjerima DNA:lipoftamin i određivanje optimalnog omjera napravljena je ko-transfekcija HEK293T stanica s plazmidom za ekspresiju proteina DPP III (pcDNA4.TO*.HA-hDPP3) i WT proteina KEAP1, odnosno

mutanata G333C i G480W kako bismo provjerili interakciju humane dipeptidil-peptidaze III s WT proteinom KEAP1 i njegovim mutiranim varijantama. Za negativnu kontrolu su HEK293T stanice transfecirane samo s plazmidima za ekspresiju proteina KEAP1 (tablica 6).

Tablica 6. Protokol prema kojem je izvršena transfekcija za koimunoprecipitaciju

| Jažica | Plazmid [ng/ μ L] | Omjer DNA:lipo | DNA [μ L] | Optimem [μ L] | Lipo [μ L] | Optimem [μ L] |
|---------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| 1 | pFLAG-CMV2-KEAP1 | 1+1:5 | 1,9 | 246 | 5 | 245 |
| WT | pcDNA4.TO*.HA- hDPP3-C20 | | 2,1 | | | |
| 2 | pFLAG-CMV2-KEAP1- G333C | 1+1:5 | 2,9 | 247 | 5 | 245 |
| G333C | pcDNA4.TO*.HA- hDPP3-C20 | | 2,1 | | | |
| 3 | pFLAG-CMV2-KEAP1- G480W | 2+1:7,5 | 4,2 | 240 | 7,5 | 243 |
| G480W | pcDNA4.TO*.HA- hDPP3-C20 | | 2,1 | | | |
| 4 | pFLAG-CMV2-KEAP1 | 1:2,5 | 1,9 | 240 | 2,5 | 247 |
| WT NK | | | | | | |
| 5 | pFLAG-CMV2-KEAP1- G333C | 1:2,5 | 2,9 | 245 | 2,5 | 247 |
| G333C NK | | | | | | |
| 6 | pFLAG-CMV2-KEAP1- G480W | 2:5 | 4,2 | 243 | 5 | 245 |
| G480W NK | | | | | | |

* NK – negativna kontrola

Postupak transfekcije izveden je na prethodno opisani način.

3.2.4.3 Koimunoprecipitacija s anti-HA agaroznim kuglicama

Imunoprecipitacija je metoda kojom iz smjese izdvajamo određeni protein koristeći visoko-specifičnu reakciju protein-protutijelo. Protutijelo je dizajnirano na način da se veže na točno određeni slijed aminokiselina na proteinu zvan epitop. Kako bi se nastali kompleks izdvojio iz otopine, na protutijelo su vezane netopljive čestice, najčešće agarozne kuglice (engl. *agarose beads*), koje omogućuju precipitaciju proteina.

Nakon inkubacije u trajanju od 24 sata, stanice su prebačene na led, uklonjen im je medij te je svaka jažica isprana s 1 mL PBS-a. Prethodno pripremljeni pufer za lizu (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0,5 % NP-40, 1 mM EDTA, pH 7,5), u koji je dodan HALT inhibitor proteaza, nanesen je na stanice u volumenu od 400 μ L koje su potom inkubirane na ledu 10 minuta. Suspenzija stanica je prebačena u tubice od 2 mL te dodatno inkubirana 5 minuta na ledu uz povremeno okretanje nakon čega je uslijedilo centrifugiranje na 16000 x g u trajanju od 30 minuta na 4 °C. Supernatant je potom prebačen u tubice od 1,5 mL te je izdvojeno 54 μ L lizata, 4 μ L za određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu, a 50 μ L za provedbu SDS-PAGE u koju je dodano 50 μ L 2X TB i zagrijano 7 minuta na 98 °C pa spremljeno na -20 °C do nanošenja na gel.

Suspenzija anti-HA agaroznih kuglica dodana je u stanične lizate koji su potom inkubirani 3 sata na rotatoru na 4 °C. Nakon inkubacije, kuglice su prebačene na Mobispin F kolonice (MoBiTec) te isprane s 600 μ L pufera za lizu s HALT inhibitorom proteaza okretanjem kolonice 10 puta. Kolonice su centrifugirane 1 minutu pri 1000 g nakon čega je odliven filtrat, a ispiranje ponovljeno još tri puta, ali s puferom za lizu bez HALT-a. Nakon četvrtog ispiranja kuglice su prebačene u čistu tubicu od 1,5 mL te je na njih dodano 25 μ L 2X TB pufera i 25 μ L pufera za lizu. Uzorci su spremljeni na -20 °C do nanošenja na gel.

3.2.5 SDS-PAGE elektroforeza

Elektroforeza pruža izvrstan način odjeljivanja molekula s neto-nabojem koje se kreću u električnom polju kroz gel koji služi kao molekulsko sito. SDS-poliakrilamidna elektroforeza (SDS-PAGE) je elektroforeza u denaturirajućim uvjetima jer anionski detergent natrijev dodecil-sulfat (SDS) razara gotovo sve nekovalentne interakcije u nativnom proteinu. Kompleks SDS-a i denaturiranog proteina ima veliki negativni naboj koji je otprilike proporcionalan masi proteina, a kreće se prema anodi koja se nalazi na dnu gela. Manje se molekule proteina kreću brže kroz gel te imaju veću elektroforetsku pokretljivost (43).

3.2.5.1 Priprema gela

Gel za SDS-PAGE sastoji se od dva dijela: gel za razdvajanje (tablica 7) i gel za sabijanje (tablica 8), a razlikuju se u pH vrijednosti i veličini pora. Kako bismo pripremili gel za elektroforezu, u epruvetu smo redom dodali mQ vodu, 1,5 M Tris-HCl, 30 % akrilamid/bisakrilamid te 10 %-tni SDS. Kako je APS zaslužan za polimerizaciju gela, nakon njegovog dodavanja je bitno što prije dodati TEMED te pripremljenu smjesu izliti između stakalaca za pripremu gela. Nakon 1 sat, istim je redoslijedom izvršena priprema i gela za sabijanje koji je nanešen na gel za razdvajanje između stakalaca.

Tablica 7. Sastav gela za razdvajanje

| | 10 % |
|---|-------------|
| mQ H₂O | 4 mL |
| 1,5 M Tris-HCL, pH=8,8 | 2,5 mL |
| 30 % akrilamid/bisakrilamid (AA) | 3,3 mL |
| 10 % SDS | 100 µL |
| 10 % APS | 100 µL |
| TEMED | 8 µL |

Tablica 8. Sastav gela za sabijanje

| | 5 % |
|---|------------|
| mQ H₂O | 4,05 mL |
| 0,5 M Tris-HCL, pH=6,8 | 0,75 mL |
| 30 % akrilamid/bisakrilamid (AA) | 1,005 mL |
| 10 % SDS | 60 µL |
| 10 % APS | 60 µL |
| TEMED | 12 µL |

3.2.6 Western analiza

Imunološka tehnika koja se zove Western analiza je metoda kojom se mogu detektirati vrlo male količine proteina. Nakon što je uzorak podvrgnut SDS-PAGE-u, razdvojeni se proteini prenose s gela na membranu. Analiza je bazirana na reakciji specifičnog protutijela za promatrani protein te on reagira s antigenom. Nastali kompleks protutijelo-antigen se detektira dodatkom drugog (sekundarnog) protutijela koje je specifično za ono prvo. U početku se koristilo radioaktivno obilježavanje sekundarnog protutijela, ali danas se većinom koriste sekundarna antitijela na koje su vezani enzimi (peroksidaza iz hrena ili alkalna fosfataza) i kemiluminiscentni supstrat (44).

Kazeta za prijenos proteina s gela na membranu sadrži: spužvu, filter papir, nitroceluloznu membranu, gel, filter papir i spužvu. Prilikom slaganja kazete bitno je obratiti pažnju da je sav zrak istisnut. Transfer proteina izveden je u kadici za elektroforezu na magnetnoj mješalici i ledu oko 1 sat i 15 minuta na 350 mA nakon čega je membrana obojena Ponceau S bojom oko 5 minuta. Membrana je zatim odbojana u mQ vodi 2 puta po 10 minuta. Membrana je blokirana u 5 % otopini *non-fat* mlijeka u prahu u TBS-T puferu 1 sat na 37 °C, a nakon toga inkubirana u otopini 1 µg mL⁻¹ primarnog anti-FLAG antitijela (Sigma) u puferu za blokiranje preko noći na 4 °C na orbitalnoj mješalici. Potom je membrana isprana 4 puta po 10 minuta u TBS-T puferu. Membrana je zatim inkubirana sa sekundarnim antitijelom 1 sat na sobnoj temperaturi te isprana 2 puta po 10 minuta u TBS-T puferu i 2 puta po 10 minuta u TBS puferu nakon čega je membrana spremna na detekciju kemiluminiscencijom.

Detekcija je izvršena na Q9 Alliance Mini (Uvitec) aparatu. Membrane su inkubirane s kemiluminiscencijskim reagensom ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) koji se sastoji od otopina A i B. Po 500 µL otopine A i B se pomiješa neposredno prije nanošenja na membranu i zatim se dobivena otopina nakapa na membranu i nakon 1 min inkubacije membrana se stavlja u aparat na prozirnoj foliji i zatim se prema uputama proizvođača fotografira.

4 REZULTATI I RASPRAVA

4.1 MUTAGENEZA I IZOLACIJA PLAZMIDA

Tablica 9. Reakcijske smjese za sekvencioniranje mutiranih plazmida pFLAG-CMV2-Keap1 s početnicama hGH-polyAR, hKeap1-489F i CMV-for

| Plazmid/mutacija | Γ [ng/ μ L] | V(DNA) | V(H ₂ O) | 5 μ M hGH-polyAR |
|------------------|------------------------|--------|---------------------|----------------------|
| G333C-1 | 319 | 3 | 2 | 5 |
| G333C-2 | 200 | 5 | / | 5 |
| G480W-1 | 347 | 3 | 2 | 5 |
| G480W-2 | 274 | 4 | 1 | 5 |

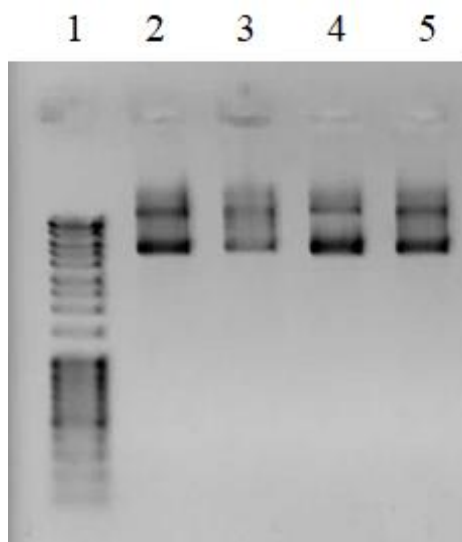
| Plazmid/mutacija | Γ [ng/ μ L] | V(DNA) | V(H ₂ O) | 10 μ M hKeap1-489F |
|------------------|------------------------|--------|---------------------|------------------------|
| G333C-2 | 319 | 5 | 2,5 | 2,5 |
| G480W-2 | 247 | 4 | 3,5 | 2,5 |

| Plazmid/mutacija | Γ [ng/ μ L] | V(DNA) | V(H ₂ O) | 10 μ M CMV-for |
|------------------|------------------------|--------|---------------------|--------------------|
| G333C-2 | 319 | 5 | 2,5 | 2,5 |
| G480W-2 | 247 | 4 | 3,5 | 2,5 |

| Plazmid/mutacija | Γ [ng/ μ L] | V(DNA) | V(H ₂ O) | 10 μ M hKeap1-489F |
|------------------|------------------------|--------|---------------------|------------------------|
| G333C-3 | 214 | 5 | 2,5 | 2,5 |

| Plazmid/mutacija | Γ [ng/ μ L] | V(DNA) | V(H ₂ O) | 10 μ M hGH-polyAR |
|------------------|------------------------|--------|---------------------|-----------------------|
| G480W-3 | 243 | 4 | 3,5 | 2,5 |

U tablici 9 prikazane su reakcijske smjese poslane na sekvenciranje u tvrtku *Macrogen*. Rezultati sekvenciranja potvrdili su uspješnost provedene mutageneze na sekvencama plazmida G333C-3 i G480W-2 koje smo koristili u daljnjim eksperimentima. Mutacijom kodona GGC u TGC, glicin na položaju 333. zamijenjen je cisteinom, a mutacijom kodona GGG u TGG, glicin na položaju 480. zamijenjen je triptofanom.



Slika 8. Gel elektroforeza uzoraka mutiranih plazmida pFLAG-CMV2-Keap1 (1.marker, 2.G333C-1, 3.G333C-2, 4.G480W-1, 5.G480W-2)

Gel elektroforezom uzoraka mutiranih plazmida pFLAG-CMV2-Keap1 potvrdili smo uspješnost provedene izolacije plazmida (slika 8).

4.2 OPTIMIZACIJA TRANSFEKCIJE HEK293T STANICA

Kako bismo dobili što bolju ekspresiju divljeg tipa proteina Keap1 i njegovih mutanata, radili smo probnu transfekciju stanica s dva različita omjera DNA i lipofektamina. U tablici 10 su prikazane koncentracije proteina koje su dobivene metodom po Bradfordu.

Tablica 10. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

| Slijepa proba | A ₉₅₇ | A ₉₅₇ -srednja |
|---------------|------------------|---------------------------|
| SP1 | 0,457 | 0,475 |
| SP2 | 0,484 | |
| SP3 | 0,484 | |

Tablica 10. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu - *nastavak*

| Uzorak | A ₉₅₇ | ΔA ₉₅₇ | A ₉₅₇ -srednja | Γ [mg/mL] | V (10 μg) |
|------------------------------------|------------------|-------------------|---------------------------|-----------|-----------|
| pFLAG-CMV-KEAP1 (1:2,5) | 0,647 0,632 | 0,172 0,157 | 0,1645 | 1,17 | 17,1 |
| pFLAG-CMV-KEAP1 (2:5) | 0,57 0,612 | 0,095 0,137 | 0,116 | 0,82 | 24,3 |
| pFLAG-CMV-KEAP1 G333C-3 (1:2,5) | 0,638 0,634 | 0,163 0,159 | 0,161 | 1,14 | 17,5 |
| pFLAG-CMV-KEAP1 G333C-3 (2:5) | 0,647 0,665 | 0,172 0,19 | 0,181 | 1,28 | 15,6 |
| pFLAG-CMV-KEAP1 G480W-2 (1:2,5) | 0,699 0,655 | 0,224 0,18 | 0,202 | 1,43 | 14,0 |
| pFLAG-CMV-KEAP1 G480W-2 (2:5) | 0,629 0,614 | 0,154 0,166 | 0,16 | 1,13 | 17,6 |

Kako bismo proveli test ekspresije divljeg tipa Keap1 proteina i njegovih mutanata, u 50 μL staničnog lizata dodano je 50 μL 2X TB te zagrijano 10 minuta na 97 °C te zamrznuto na -20 °C do nanošenja na gel. U tablici 11 je prikazan redoslijed uzoraka na gelu, a kao marker se u analizi koristio *PageRuler Prestained Protein Ladder* s rasponom veličina fragmenata od 25 do 180 kDa.

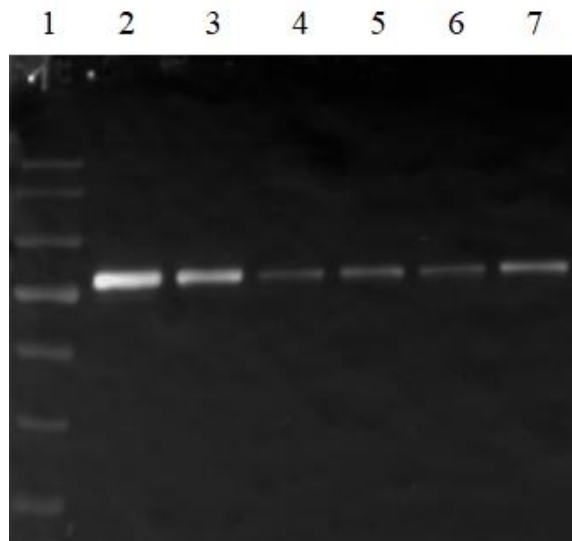
Tablica 11. Redoslijed uzoraka za SDS-PAGE elektroforezu

| Jažica | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|----------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Uzorak | Page | WT | WT | G333C | G333C | G480W | G480W |
| | Ruler | KEAP1 | KEAP1 | (1:2,5) | (2:5) | (1:2,5) | (2:5) |
| | | (1:2,5) | (2:5) | SL | SL | SL | SL |
| | | SL | SL | (10 μg) | (10 μg) | (10 μg) | (10 μg) |
| | | (10 μg) | (10 μg) | | | | |
| Uzorak+ | 2 | 17,1 | 24,3 | 17,5 | 15,6 | 14 | 17,6 |
| 2X TB/μL | | | | | | | |

Nakon što je provedena SDS-PAGE elektroforeza, uzorci su preneseni na nitroceluloznu membranu (slika 9).



Slika 9. Nitrocelulozna membrana obojana Ponceau bojom



Slika 10. Detekcija anti-FLAG imunoblota kemiluminiscencijom: 1. Page Ruler, 2. WT Keap1 (1:2,5), 3. WT Keap1 (2:5), 4. G333C mutant (1:2,5), 5. G333C mutant (2:5), 6. G480W mutant (1:2,5), 7. G480W mutant (2:5)

Na uređaju Uvitec Q9 Alliance Mini smo fotografirali membranu u kemiluminiscencijskom načinu (slika 10) s duljinom ekspozicije 8 sekundi te smo detektirali jaču ekspresiju divljeg tipa Keap1 proteina i njegovog mutanta G333C pri omjeru DNA:Lipo 1:2,5, dok je jača ekspresija mutanta G480W bila pri omjeru 2:5. Navedene omjere smo koristili u daljnjem tijeku eksperimenta.

4.3 ANALIZA INTERAKCIJE PROTEINA DPP III i KEAP1

Metodom koimunoprecipitacije s anti-HA agaroznim kuglicama koje specifično vežu protein HA-DPP III ispitali smo prisutnost protein-protein interakcija između divljeg tipa Keap1 proteina i njegovih mutanata G333C i G480W s proteinom DPP III. Kako bi se ostvarila ekspresija oba proteina, uz plazmid pFLAG-CMV2-Keap1 stanice HEK293T su transficirane i plazmidom pcDNA4.TO*.HA-hDPP3-C20, a kao negativna kontrola izvršena je transfekcija samo plazmidima za ekspresiju FLAG-obilježenih proteina. U tablici 12 su prikazane koncentracije proteina koje su dobivene metodom po Bradfordu, a u tablici 13 prikazan je redosljed uzoraka na gelu.

Tablica 12. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

| Slijepa proba | A_{957} | A_{957} -srednja | | | |
|---------------|-----------|--------------------|--|--|--|
| SP1 | 0,470 | | | | |
| SP2 | 0,471 | 0,468 | | | |
| SP3 | 0,463 | | | | |

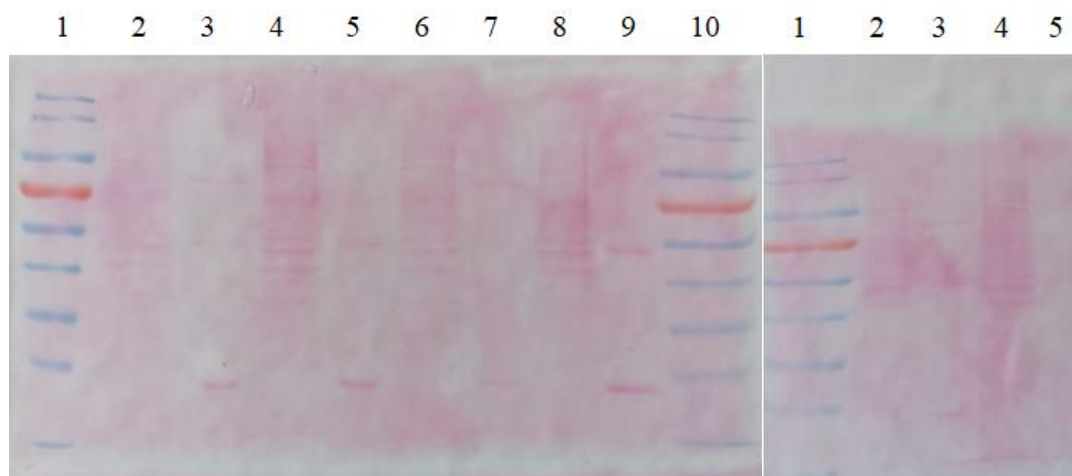
| Uzorak | A_{957} | ΔA_{957} | A_{957} -srednja | Γ [mg/mL] | V (10 μ g) |
|-----------|-----------|------------------|--------------------|------------------|----------------|
| WT | 0,717 | 0,249 | 0,255 | 1,60 | 12,5 |
| | 0,729 | 0,261 | | | |
| G333C | 0,613 | 0,145 | 0,1535 | 1,089 | 18,37 |
| | 0,630 | 0,162 | | | |
| G480W | 0,646 | 0,178 | 0,1850 | 1,312 | 15,24 |
| | 0,660 | 0,192 | | | |
| WT neg | 0,673 | 0,250 | 0,1995 | 1,415 | 14,14 |
| | 0,662 | 0,194 | | | |
| G333C neg | 0,718 | 0,250 | 0,227 | 1,610 | 12,42 |
| | 0,672 | 0,204 | | | |
| G480W neg | 0,663 | 0,195 | 0,1895 | 1,344 | 14,88 |
| | 0,652 | 0,184 | | | |

Tablica 13. Redoslijed uzoraka za SDS-PAGE elektroforezu

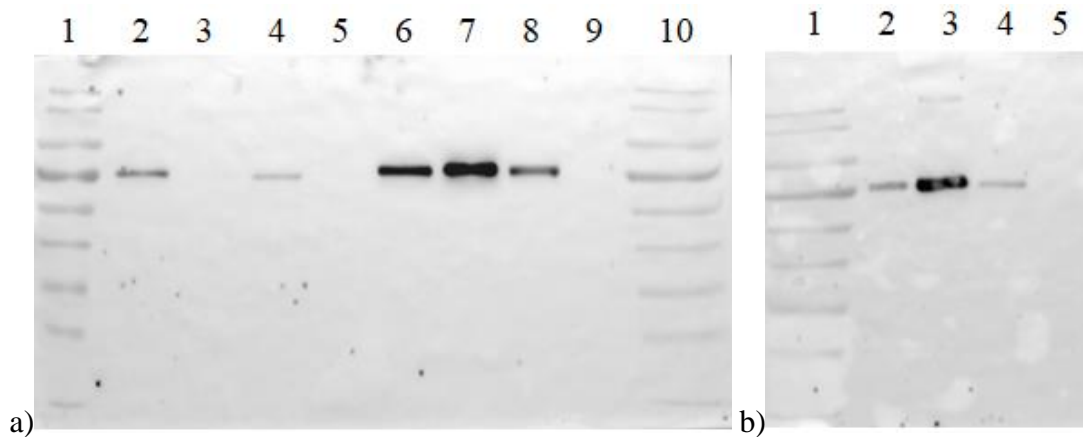
| Jažica | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--------------------------|------------|----------------------------|----------------------------|---------------------|-------------|---------------------------|-------------------|---------------------|-------------|------------|
| Uzorak | Page Ruler | DPPP3/ G333C Input (10 µg) | DPPP3/ G333C Co-IP (10 µg) | G333C Input (10 µg) | G333C Co-IP | DPP3/G 480W Input (10 µg) | DPP3/G 480W Co-IP | G480W Input (10 µg) | G480W Co-IP | Page Ruler |
| Uzorak + 2X TB/µL | 2 | 18 | 8 | 18 | 8 | 18 | 8 | 18 | 8 | 2 |

| Jažica | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------------------------|------------|-------------------------|-------------------------|------------------|----------|
| Uzorak | Page Ruler | DPPP3/ WT Input (10 µg) | DPPP3/ WT Co-IP (10 µg) | WT Input (10 µg) | WT Co-IP |
| Uzorak+ 2X TB/µL | 2 | 18 | 8 | 18 | 8 |

Nakon što je provedena SDS-PAGE elektroforeza, uzorci su preneseni na nitroceluloznu membranu (slika 11).



Slika 11. Nitrocelulozna membrana obojana Ponceau bojom



Slika 12. Detekcija anti-FLAG imunoblota kemiluminiscencijom: a) 1. Page Ruller, 2. lizat DPP3/G333C, 3. Co-IP DPP3/G333C, 4. lizat G333C, 5. Co-IP G333C, 6. lizat DPP3/G480W, 7. Co-IP DPP3/G480W, 8. G480W, 9. Co-IP G480W, 10. Page Ruler; b) 1. Page Ruler, 2. lizat DPP3/WT, 3. Co-IP DPP3/WT, 4. lizat WT, 5. Co-IP WT

Na uređaju Uvitec Q9 Mini smo slikali membranu u kemiluminiscencijskom načinu (slika 12) s duljinom ekspozicije: a) 1 minuta i 12 sekundi, b) 32 sekunde. Koimunoprecipitacija uzorka mutanta G333C dala je negativan rezultat (jažica 3a). Pozitivan rezultat koimunoprecipitacije detektirali smo na mutantu G480W (jažica 7a) čiji bend odgovara veličinom inputu dok negativna kontrola u jažici 9 pokazuje negativan signal. Uz to, detektirali smo i pozitivan rezultat koimunoprecipitacije divljeg tipa Keap1 proteina (jažica 3b).

Za koimunoprecipitaciju smo koristili anti-HA agarozne kuglice koje na sebe vežu HA-DPP3 protein. Ukoliko je DPP3 u kompleksu s Keap1 proteinom, dobit ćemo pozitivan rezultat koimunoprecipitacije, tj. prisutan je bend u pripadajućoj jažici. Iz naših rezultata možemo zaključiti da je protein DPP3 u interakciji s divljim tipom Keap1 proteina i njegovom mutiranom varijantom G480W, dok s mutantom G333C ne ostvaruje interakciju.

DPP III/Keap1 kompleks sudjeluje u deregulaciji signalnog puta Keap1-Nrf2 povećavajući razinu transkripcijskog faktora Nrf2 u stanici čime dolazi do povećane ekspresije antioksidacijskih i detoksifikacijskih proteina čija transkripciju je regulirana putem Nrf2. Hast i sur. su utvrdili pozitivnu korelaciju između razine mRNA koja kodira za DPP III i ekspresije ciljnih gena Nrf2 kod tumora pluća (2).

Zbog važnosti signalnog puta Keap1-Nrf2 u razvoju raka, Hast i sur. su klonirali i usporedili utjecaj 18 mutacija Keap1 proteina u karcinomu skvamoznih stanica pluća. Mutanti R554Q, W544C, N469fs, P318fs i G333C nisu vezali Nrf2, kao i nekoliko poznatih interaktora Keap1 proteina koji posjeduju ETGE motiv poput DPP3, SLK, WTX, MCM3 i

IKBKB. Mutanti G480W i S224Y pokazuju smanjenu mogućnost vezanja na DPP3, SLK i MCM2 u odnosu na vezanje na Nrf2. Mutante R320Q, R470C, G423V, D422N, G186R, S243C i V155F nazvali su „*superbinders*“ jer se vežu na Nrf2 bolje od divljeg tipa proteina Keap1.

Analizirane mutante su klasificirali u 3 skupine: mutanti koji nemaju utjecaj na interakciju Nrf2-Keap1 i aktivnost Nrf2 (L231V, S224Y, P318L i R71L), mutanti koji ne vežu Nrf2 te ne utječu ili slabo utječu na aktivnost Nrf2 (N469fs, P318fs, G333C, R554Q i W544C) i hipomorfni mutanti (mutanti koji imaju smanjenu aktivnost) koji suprimiraju Nrf2 u rasponu od 30 % do 60 % u odnosu na divlji tip Keap1 (R320Q, R470C, G423V, G480W, D422N, G186R, S243C, V167F, V155F) (45).

Budući da je prethodno utvrđeno da je količina mRNA DPP III povećana u tumorima u kojima su nađene hipomorfne mutacije u odnosu na tumore s WT Keap1 te da je pojačana ekspresija DPP III dodatno aktivira Nrf2 u stanicama koje eksprimiraju hipomorfne mutante Keap1 (2), mutant G480W koji slabije suprimira Nrf2, a veže se na DPP III kao i WT je zanimljiviji za daljnja istraživanja od mutanta G333C koji se ne veže na DPP III. Također je utvrđeno da je količina mRNA DPP III povećana u tumorima u kojima su nađene sekvence hipomofrnih mutanata u odnosu na tumore s WT Keap 1, što bi značilo da je u takvim tumorima Nrf2 vjerojatno dodatno aktiviran uslijed povećane količine DPP III.

5 ZAKLJUČCI

1. Metodom ciljane mutageneze uspješno su dobiveni plazmidi pFLAG-CMV2-Keap1 za ekspresiju mutiranih varijanti G333C i G480W proteina Keap1 u HEK293T stanicama.
2. Uspješno je provedena transfekcija HEK293T stanica i eksprimirani su „divlji tip“ proteina Keap1 i mutirane varijante G333C i G480W.
3. Uspješno je provedena ko-transfekcija HEK293T stanica i eksprimirani su „divlji tip“ proteina Keap1 i mutirane varijante G333C i G480W zajedno s proteinom DPP III.
4. Metodama koimunoprecipitacije i western blot analize, pokazali smo da se mutant G333C ne veže na protein DPP III što je u skladu s dosadašnjim rezultatima.
5. Metodama koimunoprecipitacije i western blot analize također smo pokazali da se mutant G480W veže na protein DPP III slično kao i „divlji tip“ proteina Keap1 što nije u potpunosti u skladu s dosadašnjim rezultatima po kojima se taj protein slabije veže na DPP III. Moguće je da je ova razlika rezultat različitih uvjeta u kojima je rađena koimunoprecipitacija.
6. Vezanje G480W mutanta na DPP III je naročito zanimljivo jer se radi o hipomorfnoj mutaciji koja smanjuje inhibiciju proteina Nrf2, a utvrđeno je da je u tumorima s hipomorfnim mutacijama nađena povećana količina DPP III mRNA koja bi mogla dodatno povećati aktivnost Nrf2.

6 LITERATURA

1. Baird L, Llères D, Swift S & Dinkova-Kostova AT (2013) Regulatory flexibility in the Nrf2-mediated stress response is conferred by conformational cycling of the Keap1-Nrf2 protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 15259–15264. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305687110>
2. Hast BE, Goldfarb D, Mulvaney KM, Hast MA, Siesser PF, Feng Y, i sur. (2013) Proteomic analysis of ubiquitin ligase KEAP1 reveals associated proteins that inhibit NFR2 ubiquitination. *Cancer Res* **73**, 2199-2210. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4400>
3. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, i sur. (2012) The cBio Cancer Genomics Portal: An open platform for exploring multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discov* **2**, 401–404. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>
4. <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/> (pristupljeno 15.1.2022.)
5. Barrett AJ (1997) Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme Nomenclature. Recommendations 1992. Supplement 4: corrections and additions. *Eur J Biochem* **250**, 1-6. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.001_1.x
6. [MEROPS - the Peptidase Database \(ebi.ac.uk\)](http://merops.ebi.ac.uk/) (pristupljeno 15.1.2022.)
7. Prajapati SC & Chauhan SS (2011) Dipeptidyl peptidase III: A multifaceted oligopeptide N-end cutter. *FEBS J* **278**, 3256–3276. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08275.x>
8. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A (2010) MEROPS: the peptidase database, *Nucleic Acids Res* **38**, D227-D233. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm954>
9. Rawlings ND, Barrett AJ (2004) Introduction: metallopeptidases and their clans in: Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*, (second edition) Vol. 1, Elsevir, Academic Press, London, pp. 231-268.
10. Baral PK, Jajčanin-Jozić S, Deller S, Macheroux P, Abramić M, Gruber K (2008) The first structure of dipeptidyl-peptidase III provides insight into the catalytic mechanism and mode of substrate binding. *J Biol Chem* **283**, 22316-22324. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803522200>
11. Tomić A, Kovačević B, Tomić S (2016) Concerted nitrogen inversion and hydrogen

- bonding to Glu451 are responsible for protein-controlled suppression of the reverse reaction in human DPP III. *Phys Chem Chem Phys* **18**, 27245–27256. <https://doi.org/10.1039/C6CP04580D>
12. Ellis S, Nuenke JM (1967) Dipeptidyl arylamidase III of pituitary: purification and characterization. *J Biol Chem* **242**, 4623-4629. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)99503-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(18)99503-7)
 13. Lee CM, Snyder SH (1982) Dipeptidyl-aminopeptidase III of rat brain. Selective affinity for enkephalin and angiotensin. *J Biol Chem* **257**, 12043-12050. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)33674-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)33674-3)
 14. Abramić M, Zubanović M, Vitale L (1988) Dipeptidyl aminopeptidase III from human erythrocytes. *Biol Chem* **369**, 29-38. <https://doi.org/10.1515/BCHM3.1988.369.1.29>
 15. Huang J, Kim J, Ramamurthy P, Jones THD (1992) The purification, specificity, and role of dipeptidyl peptidase III in *Dictyostelium discoideum*. *Exp Mycol* **16**, 102-109. [https://doi.org/10.1016/0147-5975\(92\)90016-K](https://doi.org/10.1016/0147-5975(92)90016-K)
 16. Mazzocco C, Gillibert-Duplantier J, Neaud V, Fukasawa KM, Claverol S, Bonneu M, Puiroux J (2006) Identification and characterization of two dipeptidyl-peptidase III isoforms in *Drosophila melanogaster*. *FEBS J* **273**, 1056-1064. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05132.x>
 17. Ohkubo I, Li YH, Maeda T, Yamamoto Y, Yamane T, Du PG, Nishi K (1999) Dipeptidyl peptidase III from rat liver cytosol: purification, molecular cloning and immunohistochemical localization. *Biol Chem* **380**, 1421-1430. <https://doi.org/10.1515/BC.1999.182>
 18. Abramić M, Šimaga Š, Osmak M, Čičin-Šain L, Vukelić B, Vlahoviček K, Dolovčak Lj (2004) Highly reactive cysteine residues are part of the substrate binding site of mammalian dipeptidyl peptidases III. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 434-446. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(03\)00267-x](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(03)00267-x)
 19. Vanha-Perttula T (1988) Dipeptidyl peptidase III and alanyl aminopeptidase in the seminal plasma: Origin and biochemical properties. *Clin Chim Acta* **177**, 179-195. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(88\)90140-4](https://doi.org/10.1016/0009-8981(88)90140-4)
 20. Swanson AA, Davis RM, McDonald JK (1984) Dipeptidyl peptidase III of human cataractous lenses. Partial purification. *Curr Eye Res* **3**, 287-291. <https://doi.org/10.3109/02713688408997211>
 21. Sato H, Kimura K, Yamamoto Y, Hazato T (2003) Activity of DPP III in human cerebrospinal fluid derived from patients with pain. *Masui* **52**, 257-263.

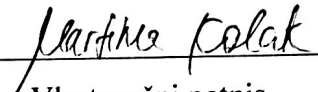
22. Chiba T, Li YH, Yamane T, Ogikubo O, Fukuoka M, Arai R, i sur. (2003) Inhibition of recombinant dipeptidyl peptidase III by synthetic hemorphin-like peptides. *Peptides* **24**, 773-778. [https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(03\)00119-0](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(03)00119-0)
23. Baršun M, Jajčanin N, Vukelić B, Špoljarić J, Abramić M (2007) Human dipeptidyl peptidase III acts like a post-proline-cleaving enzyme on endomorphins. *Biol Chem* **388**, 343-348. <https://doi.org/10.1515/bc.2007.039>
24. Zhang H, Yamamoto Y, Shumiya S, Kunimatsu M, Nishi K, Ohkubo I, i sur. (2001) Peptidases play an important role in cataractogenesis: an immunohistochemical study on lenses derived from Shumiya cataract rats. *Histochem J* **33**, 511–521. <https://doi.org/10.1023/a:1014943522613>
25. Agić D, Hranjec M, Jajčanin N, Starčević K, Karminski-Zamola G, Abramić M (2007) Novel amidino-substituted benzimidazoles: Synthesis of compounds and inhibition of dipeptidyl peptidase III. *Bioorg Chem* **35**, 153-169. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2006.11.002>
26. Šimaga Š, Babić D, Osmak M, Šprem M, Abramić M (2003) Tumor cytosol dipeptidyl peptidase III activity is increased with histological aggressiveness of ovarian primary carcinomas. *Gynecol Oncol* **91**, 194-200. [https://doi.org/10.1016/S0090-8258\(03\)00462-1](https://doi.org/10.1016/S0090-8258(03)00462-1)
27. Šimaga Š, Babić D, Osmak M, Ilić-Forko J, Vitale Lj, Miličić D, i sur. (1998) Dipeptidyl peptidase III in malignant and non-malignant gynaecological tissue. *Eur J Cancer* **34**, 399–405. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(97\)00401-2](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(97)00401-2)
28. Lu K, Alcivar AL, Ma J, Foo TK, Zywea S, Mahdi A, i sur. (2017) NRF2 induction supporting breast cancer cell survival is enabled by oxidative stress-induced DPP3-KEAP1 interaction. *Cancer Res* **77**, 2881–2892. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2204>
29. Tong Y, Huang Y, Zhang Y, Zeng X, Yan M, Xia Z, i sur. (2021) DPP3/CDK1 contributes to the progression of colorectal cancer through regulating cell proliferation, cell apoptosis, and cell migration. *Cell Death Dis* **12**, 529. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03886-3>
30. Menale C, Robinson LJ, Palagano E, Rigoni R, Erreni M, Almarza AJ, i sur. (2019) Absence of dipeptidyl peptidase 3 increases oxidative stress and causes bone loss. *J Bone Miner Res* **34**, 2133–2148. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3829>
31. Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA (2018) Transcriptional regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal* **29**, 1721-1745. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342>

32. Emanuele S, Celesia A, D'Anneo A, Lauricella M, Carlisi D, De Blasio A, Giuliano M (2021) The good and bad of Nrf2: An update in cancer and new perspectives in COVID-19. *Int J Mol Sci* **22**, 7963. <https://doi.org/10.3390/ijms22157963>
33. Canning P, Sorrell FJ, Bullock AN (2015) Structural basis of Keap1 interaction with Nrf2. *Free Radic Biol Med* **88**, 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.034>
34. Jaramillo MC, Zhang DD (2013) The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes Dev* **27**, 2179-2197. <https://doi.org/10.1101/gad.225680.113>
35. Taguchi K, Hozumi M, Yamamoto M (2011) Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells* **16**, 123-140. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01473.x>
36. Tomić A, Gonzalez M, Tomić S (2012) The large scale conformational change of the human DPP III-substrate prefers the „closed“ form. *J Chem I Model* **52**, 1586-1594. <https://doi.org/10.1021/ci300141k>
37. Gundić M, Tomić A, Wade RC, Matovina M, Karačić Z, Kazazić S, Tomić S (2016) Human DPP III- Keap1 interactions: a combined experimental and computational study. *Croat Chem Acta* **89**, 217-228. <http://dx.doi.org/10.5562/cca2916>
38. Matic S, Kekez I, Tomin M, Bogar F, Šupljika F, Kazazić S, i sur (2020) Binding of dipeptidyl-peptidase III to the oxidative stress cell sensor Kelch-like ECH-associated protein 1 is a two-step process. *J Biomol Struct Dyn* **39**, 6870-6881. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1804455>
39. Slivac I, Gaurina Srček V, Radošević K (2016) Osnove tehnologije životinjskih stanica. Interna skripta Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, str. 26-35.
40. Agilent, QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual
41. Thermo Fisher Scientific, GeneJET Plasmid Miniprep Kit
42. Bradford, MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254. 1976.
43. Stryer L, Tymoczko JL i Berg JM, Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 2013.
44. Sambrook, Joseph. & Russell, David W. & Cold Spring Harbor Laboratory. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y : Cold Spring Harbor Laboratory
45. Hast BE, Cloer EW, Goldfarb D, Li H, Siesser PF, Yan F, i sur. (2014) Cancer-derived mutations in KEAP1 impair NRF2 degradation but not ubiquitination. *Cancer Res* **74**,

808-817. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-13-1655>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, MARTINA KOLAK, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.


Vlastoručni potpis