

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković

Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
Molekularne bioznanosti

Emilija Zapletal

**Dipeptidil-peptidaza 9 (DPP9) u mišjim stanicama
makrofagnog i limfocitnog porijekla**

Doktorska disertacija

Osijek, 2014.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni
doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorska disertacija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

**DIPEPTIDIL-PEPTIDAZA 9 (DPP9) U MIŠJIM STANICAMA MAKROFAGNOG I LIMFOCITNOG
PORIJEKLA**

Emilija Zapletal

Rad je izrađen u: Laboratoriju za eksperimentalnu hematologiju, imunologiju i onkologiju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu

Mentor: dr. sc. Jelka Gabrilovac

Kratki sažetak doktorske disertacije:

Ispitana je ekspresija dipeptidil-peptidaze 9 (DPP9), novog člana obitelji DPP4 enzima, u mišjim hematopoetskim i limfatičnim tkivima kao i u stanicama makrofagnog i limfocitnog porijekla, te uspoređena s ekspresijom DPP4, glavnog predstavnika DPP4 obitelji. U stanicama makrofagne linije J774 ispitana je lokalizacija i sublokalizacija DPP9, kao i lokalizacija enzimske aktivnosti slične DPP4. Enzimska aktivnost slična DPP4 u J774 stanicama lokalizirana je većinom u citoplazmatskoj frakciji te u manjem udjelu u sadržaju vezikula/organela i frakciji ukupnih staničnih membrana što je bilo u skladu s dobivenom proteinskom lokalizacijom DPP9. Nadalje, korištenjem modelne linije J774, ispitana je moguća uloga DPP9 u endocitozi, adheziji, proliferaciji i aktivaciji makrofaga. Ovalbuminom potaknuta endocitoza izazvala je promjenu lokalizacije DPP9, koja se nakuplja u endosomima i kolokalizira s ovalbuminom. Utišavanje DPP9 u J774 stanicama bilo je povezano sa smanjenom proliferacijom stanica međutim nije imalo učinka na njihova adhezijska svojstva. *In vivo* i *in vitro* aktivacija makrofaga smanjila je ekspresiju DPP9. Rezultati ukazuju na moguću ulogu DPP9 u proliferaciji i aktivaciji stanica makrofagnog porijekla, kao i u preradi izvanstaničnih antigena.

Broj stranica: 136

Broj slika: 34

Broj tablica: 6

Broj literaturnih navoda: 126

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: dipeptidil-peptidaza 9 (DPP9), dipeptidil-peptidaza 4 (DPP4), makrofagi, limfociti, enzimska aktivnost slična DPP4, endocitoza ovalbumina, aktivacija makrofaga

Datum obrane: 18. srpnja 2014.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, viša znanstvena suradnica Instituta Ruđer Bošković
2. dr. sc. Jelka Gabrilovac, znanstvena savjetnica Instituta Ruđer Bošković
3. prof. dr. sc. Vera Cesar, redovita profesorica Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjela za biologiju
4. dr. sc. Tihomir Balog, znanstveni savjetnik Instituta Ruđer Bošković (zamjena).

Rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Natural sciences

Scientific Field: Biology

DIPEPTIDYL-PEPTIDASE 9 (DPP9) IN MURINE CELLS OF MACROPHAGE AND LYMPHOCYTIC ORIGIN

Emilija Zapletal

Thesis performed at: Ruđer Bošković Institute, Division of Molecular Medicine, Laboratory of Experimental Hematology, Immunology and Oncology, Zagreb

Supervisor: Jelka Gabrilovac, PhD

Short abstract:

Expression of dipeptidyl-peptidase 9 (DPP9), a new member of the DPP4 enzyme family was examined in murine hematopoietic and lymphatic tissues as well as in cells of macrophage and lymphocyte origin, and compared to the expression of DPP4, a main member of DPP4 family. The macrophage cell line J774 was used to study DPP9 localization and sub-localization, as well as localization of the DPP4-like enzymatic activity. DPP4-like enzymatic activity in J774 cells was localized mainly in the cytoplasmic fraction and to a smaller extent also in isolated cellular fractions containing vesicles/organelles or total cell membranes, which was in accordance with observed localization of DPP9 protein. Using a model cell line J774, possible roles of DPP9 in endocytosis, adhesion, activation and proliferation of macrophages were also examined. Ovalbumin-induced endocytosis was associated with re-localization of DPP9, which accumulated in endosomes and co-localized with ovalbumin. DPP9 gene silencing in J774 cells was associated with decreased cell proliferation, whereas had no effect on their adhesion properties. *In vivo* and *in vitro* activation of macrophages decreased the expression of DPP9. Collectively, the results suggest possible roles of DPP9 in activation and proliferation of cells of macrophage origin, as well as in processing of extracellular antigens.

Number of pages: 136

Number of figures: 34

Number of tables: 6

Number of references: 126

Original in: Croatian

Key words: dipeptidyl-peptidase 9 (DPP9), dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4), macrophages, lymphocytes, DPP4-like enzymatic activity, ovalbumin endocytosis, macrophage activation

Date of the thesis defense: 18th July 2014

Reviewers:

1. Andreja Ambriović Ristov, PhD, Senior Associated Researcher, Ruđer Bošković Institute
2. Jelka Gabrilovac, PhD, Senior Researcher, Ruđer Bošković Institute
3. Prof. Vera Cesar, PhD, Professor, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
4. Tihomir Balog, PhD, Senior Researcher, Ruđer Bošković Institute (substitute).

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek.

Doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za eksperimentalnu hematologiju, imunologiju i onkologiju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, pod mentorstvom dr. sc. Jelke Gabrilovac, u sklopu znanstvenog projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta RH „Uloga membranskih peptidaza na tumorskim i normalnim stanicama“ (098-0982464-2520).

Zahvala

Najviše bih zahvalila svojoj mentorici dr. sc. Jelki Gabrilovac na pomoći i savjetima, strpljenju i razumijevanju, a posebno na tome što mi je omogućila da i u ovim teškim uvjetima uspijem izraditi doktorat.

Zahvaljujem i članovima Zavoda za molekularnu medicinu kao i članovima susjednog Zavoda za molekularnu biologiju na pomoći u obliku savjeta, ali i neophodnim posudbama bez kojih ne bi bilo moguće napraviti ono što sam zamislila. Posebno bih zahvalila dr. sc. Nedi Slade, dr. sc. Maji Herak Bosnar, dr. sc. Mariji Abramić i dr. sc. Mariji-Mary Sopta na ustupljenim reagensima.

Velika hvala kolegici Barbari za tehničku i psihološku podršku.

Hvala Marini, Anđeli i Jeleni na utješnim riječima u svakoj prilici.

I napokon hvala mojoj užoj i široj obitelji na podršci i zanimanju za moj rad; mojim roditeljima i suprugu na strpljivosti i razumijevanju.

POPIS KRATICA

ADA	(engl. <i>adenosine deaminase</i>) – adenzin deaminaza
ak.	aminokiselina
AML	akutna mijeloična leukemija
ANOVA	(engl. <i>analysis of variance</i>) – analiza varijance
BCA	(engl. <i>bicinchoninic acid</i>) – bicinkoninična kiselina
bFGF	(engl. <i>basic fibroblast growth factor</i>) – bazični čimbenik rasta fibroblasta
BLAST	(engl. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>) – alat za poravnanje i usporedbu sljedova
BSA	(engl. <i>bovine serum albumine</i>) – goveđi serumski albumin
CCR5	C-C kemokinski receptor 5
CD	(engl. <i>cluster of differentiation</i>) – diferencijacijski biljeg
cpm	(engl. <i>counts per minute</i>) – broj otkucaja u minuti pri scintilacijskom mjerenju radioaktivnosti
CR	(engl. <i>complement receptor</i>) – receptor za ulomke komplementa
C_t	(engl. <i>cycle threshold</i>) – ciklus pri kojem količina PCR produkta dosegne određeni prag
CXCR4	C-X-C kemokinski receptor 4
DAMP	(engl. <i>damage-associated molecular patterns</i>) – molekularni obrasci otpušteni oštećenjem tkiva i stanica
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DASH	(engl. <i>DPP4 activity and/or structure homologues</i>) – DPP4 homolozi po aktivnosti i/ili strukturi
ddH₂O	redestilirana voda
DDR1	(engl. <i>discoidin domain receptor 1</i>) – neintegrinski kolagenski receptor
DMEM	(engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>) – Dulbeccov modificirani Eagle-ov medij
DPP4	dipeptidil-peptidaza 4
DPP9	dipeptidil-peptidaza 9
DQ-OVA	ovalbumin obilježen flouoroforom BODIPY FL
EGF	(engl. <i>epidermal growth factor</i>) – epidermalni čimbenik rasta
ER	endoplazmatski retikulum
EST	(engl. <i>expressed sequence tag</i>) – kratki sljedovi, dijelovi cDNA
FAP-α	(engl. <i>fibroblast activation protein-α</i>) – fibroblastni aktivatorski protein- α ; sepraza
FBS	(engl. <i>fetal bovine serum</i>) – fetalni goveđi serum
FcR	(engl. <i>Fc receptor</i>) – receptor za Fc-ulomak protutijela

FL-1	zelena fluorescencija mjerena na kanalu 1
GIP	(engl. <i>gastric inhibitory peptide</i>) – želučani inhibicijski peptid
GLP-1/2	(engl. <i>glukagon-like peptide-1/2</i>) – glukagonu slični peptidi 1 i 2
HIV	(engl. <i>human immunodeficiency virus</i>) – virus ljudske imunodeficijencije
HLA	(engl. <i>human leukocyte antigen</i>) – ljudski leukocitni antigeni
i/p	intraperitonealno
IC₅₀	koncentracija koja izaziva 50% inhibicije (enzimske aktivnosti)
IFN-γ	interferon- γ
IL	interleukin
I-TAC	(engl. <i>interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant</i>) – kemokin CXCL11
kDa	kilodalton
KO	(engl. <i>knock-out</i>) – postupak izbacivanja ili onesposobljavanja određenog gena u genomu
LPS	lipopolisaharid; endotoksin
MCP-1	(engl. <i>macrophage chemoattractant protein 1</i>) – makrofagni kemotaksijski protein 1
MDC	(engl. <i>macrophage-derived chemokine</i>) – kemokin CCL22
MFI	(engl. <i>mean fluorescence intensity</i>) – srednji intenzitet fluorescencije
MHC	(engl. <i>major histocompatibility complex</i>) – glavni kompleks tkivne podudarnosti
MIP-1β	(engl. <i>macrophage inflammatory protein 1β</i>) – makrofagni upalni protein 1 β
MMP	matriks metaloproteinaza
MR	manozni receptor
NCBI	(engl. <i>National Center for Biotechnology Information</i>) – skup baza podataka
NK	(engl. <i>natural killer</i>) – (stanice) prirodne ubojice
NLR	(engl. <i>NOD-like receptor</i>) – receptor sličan proteinu NOD
NPY	neuropeptid Y
OD	(engl. <i>optical density</i>) – optička gustoća
OVA	ovalbumin
PAMP	(engl. <i>pathogen-associated molecular patterns</i>) – molekularni obrasci patogena
pb	parovi baza
PBS	(engl. <i>phosphate buffered saline</i>) – fosfatni pufer
PCR	(engl. <i>polymerase chain reaction</i>) – lančana reakcija polimerazom
PDGF	(engl. <i>platelet-derived growth factor</i>) – trombocitni čimbenik rasta
PGE₂	prostaglandin E2

PHA	(engl. <i>phytohaemagglutinin</i>) – fitohemaglutinin
pNA	para-nitroanilin
PRR	(engl. <i>pattern recognition receptors</i>) – receptori za prepoznavanje obrazaca
RANTES	(engl. <i>regulated on activation normal T-cell expressed and secreted</i>) – kemokin CCL5
RGD	aminokiselinski slijed arginin-glicin-aspartat
RLR	(engl. <i>RIG1-like helicase receptor</i>) – receptor/helikaza slična proteinu RIG-1
ROS	(engl. <i>reactive oxygen species</i>) – reaktivne kisikove vrste
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (medij)
RT	reverzna transkriptaza
RT-PCR	(engl. <i>real-time polymerase chain reaction</i>) – lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu
SDF-1α	(engl. <i>stromal derived factor 1α</i>) – kemokin CXCL12
si-	siRNA negativna kontrola
siDPP9	ciljna siRNA za DPP9
siRNA	(engl. <i>small interfering RNA</i>) – male interferirajuće RNA
SSC	(engl. <i>side scatter</i>) – bočno raspršenje, mjera granuliranosti stanica
SUBA	(engl. <i>SUMO1 binding arm</i>) – regija za vezanje SUMO1
SUMO1	(engl. <i>small ubiquitin-related modifier 1</i>) – mali ubikvitinu sličan modifikator 1
TAILS	(engl. <i>terminal amine isotopic labeling of substrates</i>) – metoda obilježavanja N-kraja supstrata pomoću izotopa
TAP	(engl. <i>transporter associated with antigen processing</i>) – transporter vezan uz procesiranje antigena
TGF-β	(engl. <i>transforming growth factor β</i>) – transformirajući čimbenik rasta β
T_H1/2	pomoćnički (engl. <i>helper</i>) limfociti T tip 1 i 2
TIMP2	tkivni inhibitor metaloproteinaza 2
TLR	(engl. <i>Toll-like receptor</i>) – receptor sličan proteinu Toll
TNF-α	(engl. <i>tumor necrosis factor-α</i>) – čimbenik tumorske nekroze α
T_{reg}	regulatorni limfociti T
Tris	tris (hidroksimetil)aminometan
UniProtKB	(engl. <i>Universal Protein Resource Knowledgebase</i>) – proteinska baza podataka
VEGF	(engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>) – čimbenik rasta vaskularnog endotela
βNA	β-naftilamid
ΔC_t	razlika C _t vrijednosti ciljnog i referentnog gena

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Peptidaze	2
1.1.1. <i>Prolil-peptidaze</i>	3
1.2. Obitelj enzima dipeptidil-peptidaze 4 (DPP4)	3
1.3. Dipeptidil-peptidaza 4 (DPP4)	4
1.3.1. <i>Enzimski aktivnost DPP4</i>	6
1.3.1.1. <i>Prirodni supstrati DPP4</i>	7
1.3.1.2. <i>Inhibitori DPP4 u kliničkoj primjeni</i>	8
1.3.2. <i>DPP4 – multifunkcionalni protein</i>	8
1.4. DPP9 – noviji član DPP4 obitelji enzima	10
1.4.1. <i>Karakteristike DPP9 – usporedba s DPP4</i>	11
1.4.2. <i>Lokalizacija DPP9</i>	13
1.4.3. <i>Prirodni supstrati DPP9</i>	14
1.4.4. <i>Enzimski aktivnost DPP9</i>	16
1.4.5. <i>Ostale funkcije DPP9</i>	17
1.4.6. <i>DPP9 na tumorskim stanicama</i>	18
1.4.7. <i>Uloga DPP9 u imunskom sustavu</i>	20
1.4.8. <i>Inhibitori DPP9</i>	21
1.4.9. <i>Dosadašnji modeli za istraživanje DPP9</i>	23
1.5. Makrofagi i njihova uloga u organizmu	25
1.5.1. <i>Prepoznavanje opasnosti putem receptora</i>	26
1.5.2. <i>Prezentacija antigena</i>	26
1.5.3. <i>Aktivacija makrofaga</i>	29
1.5.3.1. <i>Aktivirani makrofagi u patološkim stanjima</i>	31
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	32
3. MATERIJALI I METODE	34
3.1. Materijali	35
3.1.1. Primarne stanice hematopoetskog i limfatičnog porijekla	35
3.1.2. Stanične linije makrofagnog i limfocitnog porijekla	35
3.1.2.1. <i>Priprema uzoraka stanica</i>	36
3.1.3. Pufferi	36
3.2. Metodologije i plan istraživanja	37

3.2.1. Mjerenje transkripcijske ekspresije DPP4 i DPP9	37
3.2.1.1. <i>Izolacija ukupne RNA</i>	37
3.2.1.2. <i>Mjerenje koncentracije i čistoće RNA</i>	37
3.2.1.3. <i>Reverzna transkripcija</i>	38
3.2.1.4. <i>Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR)</i>	38
3.2.2. Mjerenje ekspresije DPP9 proteina	39
3.2.2.1. <i>Unutarstanično obilježavanje DPP9 proteina</i>	40
3.2.2.2. <i>Obilježavanje DPP9 proteina na staničnoj membrani</i>	40
3.2.3. Određivanje lokalizacije DPP9 proteina – imunocitokemijska analiza	41
3.2.4. Mjerenje enzimske aktivnosti slične DPP4	43
3.2.4.1. <i>Priprema lizata stanica</i>	43
3.2.4.2. <i>Mjerenje koncentracije proteina u lizatu stanica</i>	43
3.2.4.3. <i>Priprema frakcija staničnog lizata</i>	44
3.2.4.4. <i>Mjerenje enzimske aktivnosti slične DPP4</i>	45
3.2.4.5. <i>Inhibicija enzimske aktivnosti slične DPP4</i>	46
3.2.5. Poticanje endocitoze u stanicama makrofagne linije J774	46
3.2.5.1. <i>Praćenje lokalizacije endocitiranog ovalbumina i DPP9 proteina</i>	47
3.2.6. Aktivacija makrofaga	47
3.2.6.1. <i>Aktivacija peritonealnih makrofaga in vivo</i>	47
3.2.6.2. <i>Aktivacija stanica makrofagne linije J774 in vitro</i>	48
3.2.7. Utišavanje DPP9 gena u J774 stanicama	48
3.2.8. Funkcionalni testovi nakon utišavanja DPP9 u J774 stanicama	49
3.2.8.1. <i>Test proliferacije</i>	49
3.2.8.2. <i>Test adhezije</i>	50
3.2.8.3. <i>Ekspresija aktivacijskog markera CCR5</i>	51
3.2.9. Statistička obrada podataka	51
4. REZULTATI	52
4.1. Transkripcijska ekspresija DPP9: usporedba s ekspresijom DPP4	53
4.1.1. <i>Stanične linije makrofagnog i limfocitnog porijekla</i>	53
4.1.2. <i>Tkiva i stanice hematopoetskog porijekla</i>	53
4.2. Proteinska ekspresija DPP9 na stanicama makrofagne linije J774	55
4.3. Lokalizacija DPP9 proteina na J774 stanicama	55
4.4. Enzimska aktivnost slična DPP4 na J774 stanicama	59

4.4.1.	Enzimska aktivnost slična DPP4 u frakcijama staničnog lizata	59
4.4.2.	Inhibicija enzimske aktivnosti slične DPP4	61
4.5.	Lokalizacija DPP9 proteina na J774 stanicama nakon endocitoze ovalbumina	65
4.6.	Ekspresija DPP9 nakon aktivacije makrofaga	70
4.6.1.	<i>In vivo</i> aktivacija peritonealnih makrofaga	70
4.6.2.	<i>In vitro</i> aktivacija stanica makrofagne linije J774	71
4.7.	Utišavanje DPP9 gena u J774 stanicama	76
4.8.	Funkcionalne promjene J774 stanica nakon utišavanja DPP9 gena	77
4.8.1.	Enzimska aktivnost slična DPP4	77
4.8.2.	Proliferacija	78
4.8.3.	Adhezija	79
4.8.3.1.	Adhezijska svojstva J774 stanica	79
4.8.3.2.	Adhezija J774 stanica nakon utišavanja DPP9 gena	82
4.8.4.	Ekspresija aktivacijskog markera CCR5	84
4.8.5.	Ekspresija DPP4	84
5.	RASPRAVA	85
5.1.	Ekspresija DPP9 – usporedba s DPP4	87
5.2.	Lokalizacija DPP9	89
5.3.	Lokalizacija enzimske aktivnosti slične DPP4	90
5.4.	Uloga DPP9 lokalizirane u vezikulama	93
5.5.	Ekspresija DPP9 na aktiviranim stanicama	94
5.6.	Utišavanje gena kao metodološki pristup za proučavanje funkcija DPP9	96
5.7.	Uloga DPP9 u proliferaciji	97
5.8.	Uloga DPP9 u adheziji	98
5.9.	Uloga DPP9 u aktivaciji makrofaga	100
5.10.	Kompenzacija smanjenja ekspresije DPP9	101
5.11.	DPP inhibitori kao lijekovi: DPP9 poželjna ili nepoželjna meta	102
6.	ZAKLJUČCI	103
7.	LITERATURA	106
8.	SAŽETAK	116
9.	SUMMARY	119
10.	ŽIVOTOPIS	122

1.1. Peptidaze

Enzimi koji hidroliziraju peptidnu vezu nazivaju se peptidazama (proteazama, proteinazama, proteolitičkim enzimima) (Mentlein 2004). Peptidaze su u početku opisivane isključivo kao enzimi uključeni u razgradnju hranom unesenih proteina. Osim te nespecifične uloge sve je jasnije da peptidaze imaju i visoko selektivnu ulogu u cijepanju specifičnih supstrata te da kao oblik posttranslacijske regulacije djeluju na mnoge biološke procese. Dokazano je da proteolitičko procesiranje ima ključnu ulogu u kontroli embrionalnog razvoja, remodeliranju tkiva, cijeljenju rana i angiogenezi, migraciji i aktivaciji stanica uključenih u imunski odgovor, prezentaciji antigena, regulaciji staničnog ciklusa te apoptozi (Puente i sur. 2003). Promjene u proteolitičkom cijepanju povezane su s patološkim stanjima koje uključuju nastanak tumora te upalne i neurodegenerativne bolesti iz čega proizlazi i veliki farmaceutski interes za njihovo proučavanje (Turk 2006). Ljudski genom sadrži 553 gena koji kodiraju za peptidaze (proteaze), dok mišji unatoč tome što je manji kodira za čak 628 peptidaza (Puente i sur. 2003).

Peptidaze se klasificiraju prema: (a) mjestu rezanja (egzopeptidaze – režu nekoliko aminokiselina od kraja peptida, endopeptidaze – režu unutar peptida); (b) dužini supstrata (oligopeptidaze – optimalno djeluju na male peptide, proteaze – cijepaju proteine); (c) vrsti katalitičkog mjesta (serinske, treoninske, cisteinske, aspartatne i metalopeptidaze); (d) položaju katalitičkog dijela (endoenzimi – unutarstanični, ektoenzim – izvanstanični) i (e) orijentaciji C-kraja kod membranskih peptidaza (tip I – unutar stanice, II – izvan stanice) (Mentlein 2004).

Na osnovi homologije peptidaze se svrstavaju u odgovarajuće obitelji. Obitelj peptidaza čine članovi koji pokazuju statistički značajnu homologiju u aminokiselinskom slijedu prema barem jednom članu obitelji. Više obitelji peptidaza čini tzv. klan peptidaza za čije je članove karakteristično da su svi potekli od jednog zajedničkog proteina pretka (Lambeir i sur. 2003).

1.1.1. Prolil-peptidaze

Prolil-peptidaze su enzimi posebni po svojoj, u prirodi relativno rijetkoj, supstratnoj specifičnosti prema peptidima koji sadrže prolin. Primarna uloga peptidil-peptidaza je katabolizam proteina jer peptidi s prolinom pokazuju otpornost na razgradnju ostalim peptidazama. Peteročlani pirolidinski prsten prolina naime predstavlja steričku smetnju cijepanju peptidnog lanca drugim vrstama enzima (Vanhoof i sur. 1995).

Prolil-dipeptidil-peptidaze su posebna skupina peptidaza koje odcijepljuju X-Pro dipeptide s N-kraja. Ovi enzimi imaju važnu regulatornu ulogu budući da svojim djelovanjem dovode do inaktivacije, aktivacije ili promjene specifičnosti vezanja malih biološki aktivnih peptida (Mentlein 2004). Naime, iznenađujuće je veliki broj čimbenika rasta, hormona, citokina i neuropeptida koji imaju konzervirani prolin na drugom mjestu u aminokiselinskom slijedu, a koji predstavlja regulatorni element njihovog proteolitičkog cijepanja (Vanhoof i sur. 1995).

1.2. Obitelj enzima dipeptidil-peptidaze 4 (DPP4)

Prema Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProtKB; <http://www.uniprot.org/>) bazi obitelji enzima dipeptidil-peptidaze 4 (DPP4) čine DPP4, DPP8, DPP9 i DPP10. Ova obitelj peptidaza prema MEROPS klasifikaciji pripada SC klanu serinskih peptidaza i S9B podobitelji koji karakterizira struktura α/β -hidrolaza (Lambeir i sur. 2003). Glavni član DPP4 obitelji je peptidaza DPP4 koja je lokalizirana na staničnoj membrani (ektoenzim, tip II integralnih proteina) (Mentlein 2004). Kako među članovima DPP4 obitelji enzima ima enzimski neaktivnih članova, te kako postoje enzimi s enzimskom aktivnošću sličnom DPP4, a koji ne pripadaju DPP4 obitelji uveden je pojam „DPP4 homologa po aktivnosti i/ili strukturi“ tzv. *DASH* (engl. *DPP4 activity and/or structure homologues*) (Sedo i Malik 2001; Mentlein 2004). DPP4 homolozi po aktivnosti su u vezikulama lokalizirana peptidaza DPP2 (DPP7; aktivna pri pH 5,5) (Maes i sur. 2005) i novootkrivene citosolne peptidaze DPP8 i DPP9 (aktivne pri neutralnom pH, visoke međusobne homologije) (Abbott i sur. 2000; Olsen i Wagtmann 2002). DPP4 homolozi po strukturi su slično DPP4 membranski proteini, te većinom enzimski

neaktivni (Mentlein 2004). FAP- α (engl. *fibroblast activation protein- α* ; sepraza) je protein homologan DPP4, ali sa slabijom dipeptidil-peptidaznom aktivnošću. FAP- α djeluje i kao endopeptidaza za proteine izvanstaničnog matriksa, te mu se pripisuje uloga u cijeljenju rana. Ova peptidaza prisutna je na fetalnim stanicama, dok je u odraslom zdravom organizmu eksprimirana samo na melanocitima i aktiviranim fibroblastima (Mentlein 2004). FAP- α nađen je također na stromalnim fibroblastima unutar tumora (Park i sur. 1999). Za atraktin (engl. *attractin*) prisutan na monocitima i aktiviranim limfocitima T, također je pretpostavljena enzimska aktivnost slična DPP4 (Friedrich i sur. 2007), uz već predloženu ulogu u regulaciji kemotaksije (Duke-Cohan i sur. 1998). Strukturni homolozi DPP4 su i membranske DPP6 i DPP10 – enzimski neaktivne i eksprimirane većinom u mozgu (Mentlein 2004).

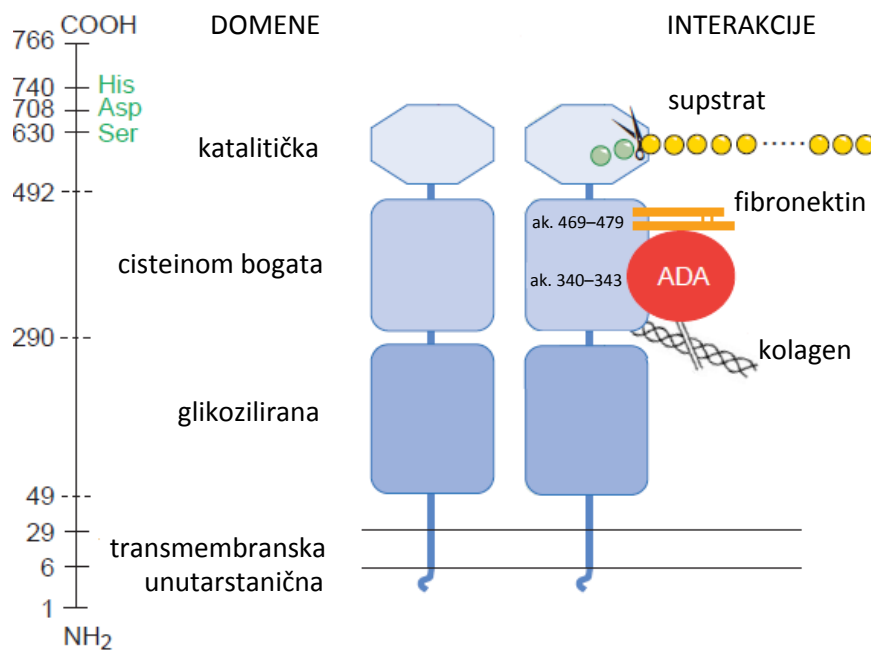
1.3. Dipeptidil-peptidaza 4 (DPP4)

Dipeptidil-peptidaza 4 (DPP4; EC 3.4.14.5; CD26; *adenosine deaminase (ADA)-binding protein*) otkrivena je 1966. godine kao glicil-prolil- β -naftilamidaza (Hopsu-Havu i Glenner 1966). Redosljed aminokiselina u katalitičkom centru DPP4 (Ser, Asp, His) obrnut je od onoga u klasičnim serinskim peptidazama tipa tripsina i kimotripsina (His, Asp, Ser) pa DPP4 pripada skupini neklasičnih serinskih peptidaza. Gen za ljudsku DPP4 nalazi se na lokusu 2q24.3 (kod miša na lokusu 2:62330073), a sastoji se od 26 eksona. Članovi katalitičke trijade nalaze se na različitim eksonima, a konsenzus slijed serinskih peptidaza GX SXG (Gly-X-Ser-X-Gly) u DPP4 je slijed GWSYG (Abbott i sur. 1994).

Ljudska DPP4 je protein od 110 kDa (glikoziliran 120 kDa) (Lambeir i sur. 2003) poznate kristalne strukture (Engel i sur. 2003). DPP4 se sastoji od 766 aminokiselina, a u stanicama je prisutno mnogo izoformi zahvaljujući različitom stupnju glikozilacije proteina (Lambeir i sur. 2003).

U proteinskoj strukturi DPP4 razlikuje se nekoliko domena (De Meester i sur. 1999). Na N-kraju nalazi se kratka citoplazmatska domena (6 ak., Slika 1) koja ne može samostalno prenositi signal, ali sudjeluje u prijenosu signala preko adaptorskih proteina. Na nju se

nastavlja transmembranska domena (22 ak., Slika 1) i tri izvanstanične domene: glikozilirana domena, cisteinom bogata vezna domena i jako konzervirana katalitička domena (Slika 1). Unutar cisteinom bogate regije postoje aminokiselinski ostaci kojima DPP4 veže ADA (aminokiselinama na pozicijama 340–343), kolagen tipa I i III (ak. 238–495) te fibronektin (ak. 469–479). DPP4 je katalitički aktivna samo u obliku dimera (ili heterodimera s FAP- α) (Lambeir i sur. 2003).



Slika 1. Shematski prikaz strukture i interakcija DPP4.

ADA = adenzin deaminaza, ak. = aminokiselina. Preuzeto i prilagođeno iz De Meester i sur. (1999).

Lokalizacija DPP4 je pretežito na staničnoj membrani iako je prisutna i kao slobodna (oblik kojem nedostaju aminokiseline na N-kraju) u tjelesnim tekućinama (serumu, sjemenoj tekućini, slini i žuči) (Gorrell 2005). DPP4 je široko rasprostranjena u tkivima, a najjače je ekspimirana na stanicama proksimalnih kanalića bubrega, epitela crijeva, endotela krvnih žila, na fibroblastima te aktiviranim limfocitima T (Mentlein 2004).

1.3.1. Enzimaska aktivnost DPP4

Supstratna specifičnost odnosno selektivnost DPP4 očituje se u cijepanju peptida s prolinom ili alaninom na položaju dva u slijedu, uz uvjet da treća aminokiselina nije prolin ili hidroksiprolin (Xaa-Pro/Ala-Yaa; Yaa≠Pro, Hyp) i uz optimalni pH djelovanja od 7,8. Niz je potencijalnih supstrata DPP4 čije je cijepanje pokazano *in vitro*, ali tek je za dio njih dokazano i *in vivo* cijepanje. Najčešći učinak cijepanja su inaktivacija (primjerice članova glukagonske obitelji peptida) te promjena receptorske specifičnosti peptida (npr. neuropeptida i kemokina, Tablica 1) (Mentlein 2004).

Tablica 1. Prirodni peptidni supstrati DPP4.

Peptid	Slijed N-kraja	Učinak cijepanja	Značajnost	Referenca
Glukagonska obitelj				
GLP-1	His- Ala -Glu-Gly-	inaktivacija	<i>in vitro, in vivo</i>	[1–4]
GLP-2	His- Ala -Asp-Gly-	inaktivacija	<i>in vitro, in vivo</i>	[1–4]
GIP	Tyr- Ala -Glu-Gly-	inaktivacija	<i>in vitro, in vivo</i>	[1–4]
Neuropeptidi				
Supstanca P	Arg- Pro -Lys-Pro-	inaktivacija/pr. spec.	<i>in vitro, in vivo</i>	[1] [2] [4]
Endomorfín 2	Tyr- Pro -Phe-PheNH ₂	inaktivacija	<i>in vivo</i>	[1] [2]
Obitelj pankreatičkih polipeptida				
Neuropeptid Y	Tyr- Pro -Ser-Lys-	pr. spec.	<i>in vitro, in vivo</i>	[1–4]
Peptid YY	Tyr- Pro -Ile-Lys-	pr. spec.	<i>in vitro, in vivo</i>	[1–4]
Kemokini				
RANTES (CCL5)	Ser- Pro -Tyr-Ser-	pr. spec.	<i>in vitro</i>	[1] [2] [4]
SDF-1 α (CXCL12)	Lys- Pro -Val-Ser-	inaktivacija/pr. spec.	<i>in vitro, in vivo</i>	[1–4]
Eotaxin (CCL11)	Gly- Pro -Ala-Ser-	inaktivacija/pr. spec.	<i>in vitro</i>	[1] [2] [4]
MDC (CCL22)	Gly- Pro -Tyr-Gly-	inaktivacija/pr. spec.	<i>in vitro</i>	[1] [2] [4]
I-TAC (CXCL11)	Phe- Pro -Met-Phe-	inaktivacija/pr. spec.	<i>in vitro</i>	[2] [4]

[1] De Meester i sur. (1999), [2] Mentlein (2004), [3] Lambeir i sur. (2008), [4] Yazbeck i sur. (2009).

GIP (engl. *gastric inhibitory peptide*) = želučani inhibicijski peptid, GLP-1/2 (engl. *glukagon-like peptide-1/2*) = glukagonu sličan peptid 1/2, I-TAC (engl. *interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant*) = kemokin CXCL11, MDC (engl. *macrophage-derived chemokine*) = kemokin CCL22, pr. spec. = promjena receptorske specifičnosti, RANTES (engl. *regulated on activation normal T-cell expressed and secreted*) = kemokin CCL5, SDF-1 α (engl. *stromal derived factor 1 α*) = kemokin CXCL12.

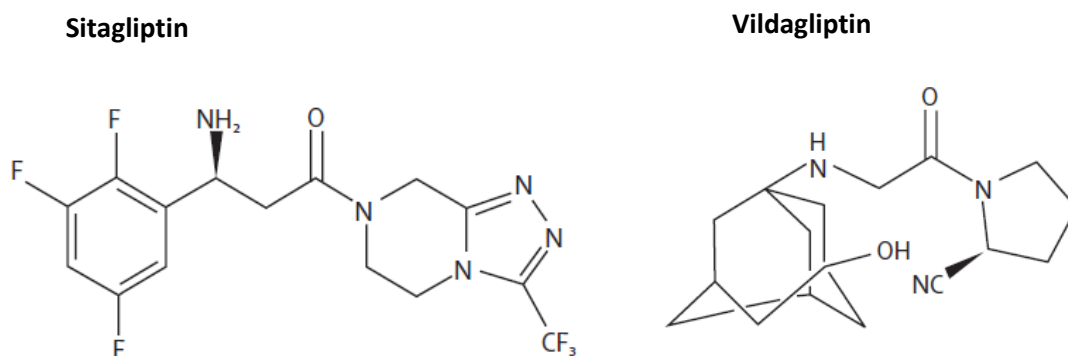
1.3.1.1. Prirodni supstrati DPP4

Važan primjer promjene receptorske specifičnosti kemokina cijepanjem putem DPP4 je cijepanje kemokina RANTES (engl. *regulated on activation normal T-cell expressed and secreted*; CCRL5) dok je cijepanje kemokina SDF-1 α (engl. *stromal derived factor 1 α*) primjer inaktivacije. Svojim djelovanjem DPP4 može utjecati na podložnost stanica infekciji HIV-om (engl. *human immunodeficiency virus*) jer su receptori navedenih kemokina – CCR5 i CXCR4 koreceptori za HIV. Cijepanjem kemokina putem DPP4 mijenja se njihov afinitet za receptore te se time mijenja i njihova sposobnost blokiranja ulaska HIV-a u stanicu. Cijepanje RANTES-a ima protektivno djelovanje jer se on nakon cijepanja preferentno veže na CCR5 čime sprečava ulazak virusa putem CCR5 receptora u makrofage (kod tzv. M-tropnih sojeva virusa). Dvojna uloga DPP4 kod infekcije HIV-om očituje se u tome što se cijepanjem SDF-1 α koji prestaje biti ligand za receptor CXCR4 olakšava ulaz HIV-a u limfocite T putem tog receptora (kod T-tropnih sojeva virusa) (De Meester i sur. 1999). Te se spoznaje pokušavaju i praktično primjeniti u terapiji bolesnika oboljelih od HIV-a modulacijom DPP4 aktivnosti u različitim fazama infekcije (Boonacker i Van Noorden 2003).

Jedan od najistaknutijih DPP4 supstrata za koje je pokazano *in vivo* cijepanje je GLP-1 (engl. *glukagon-like peptide-1*). GLP-1 je inkretinski hormon dugačak 30 aminokiselina. Nakon jela se otpušta iz enterocita, putuje krvotokom te u beta stanicama gušterače potiče lučenje inzulina čime snižava glukozu u krvi. GLP-1 također djeluje i na alfa stanice gušterače u kojima inhibira lučenje glukagona čime dodatno djeluje na regulaciju koncentracije glukoze u krvi. GLP-1 se uklanja u bubregu putem urina. Njegova aktivnost regulirana je enzimskom aktivnošću DPP4, prije svega slobodnom DPP4 koji se nalazi u plazmi, ali i membranskom koja se nalazi na stanicama epitela crijeva i bubrega (Mentlein 2004). Poluživot GLP-1 u plazmi zahvaljujući velikoj aktivnosti DPP4 iznosi tek 2–3 min (Koivisto 2008).

1.3.1.2. Inhibitori DPP4 u kliničkoj primjeni

Zbog učinka DPP4 na razgradnju inkretinskih hormona postoji veliki interes farmaceutske industrije za primjenu DPP4 inhibitora kao lijekova za dijabetes tipa 2 (Drucker 2003; Koivisto 2008). Od 2006. godine u kliničkoj primjeni su DPP4 inhibitori (Slika 2) popularno nazvani gliptini – sitagliptin (komercijalni naziv Januvia®, spoj MK-0431 tvrtke Merck) i vildagliptin (Galvus®, LAF-237 tvrtke Novartis) (Lambeir i sur. 2008; Kirby i sur. 2010). Ovi su spojevi u terapijski primjenjenim koncentracijama selektivni za DPP4, te njezinim inhibiranjem produžuju poluživot GLP-1 koji posljedično može jače stimulirati stanice gušterače na lučenje inzulina te time sniziti glukozu u krvi bolesnika s dijabetesom tipa 2 (Demuth i sur. 2005).



Slika 2. Strukture DPP4 inhibitora u kliničkoj primjeni. Preuzeto iz Drucker i Nauck (2006).

1.3.2. DPP4 – multifunkcionalni protein

Kako je DPP4 relativno velik enzim primjerice u usporedbi s tripsinom (120 vs 23 kDa) dijelovi proteina koji nisu uključeni u enzimsku aktivnost mogu ostvarivati i druge uloge (Mentlein 2004). DPP4 je multifunkcionalni protein, koji svoje brojne funkcije ostvaruje različitim mehanizmima: enzimskom aktivnošću, receptorskom funkcijom (vezanjem ADA, kolagena i fibronektina), te interferiranjem sa signalizacijskim putevima (kao kostimulatorna

molekula limfocita T (Boonacker i Van Noorden 2003). Funkcije DPP4 ovise o tipu stanica na kojima se ekspimiraju.

Ekspimirana na stanicama imunskog sustava DPP4 ostvaruje regulatornu ulogu u aktivaciji limfocita T te aktivaciji/inaktivaciji nekih citokina i kemokina. *In vitro* inhibicija DPP4 enzimске aktivnosti limfocita T uzrokuje pojačano lučenje protuupalnog transformirajućeg čimbenika rasta β (TGF- β ; engl. *transforming growth factor β*). Na ulogu DPP4 u modulaciji humoralnog imunskog odgovora upućuje smanjenje proizvodnje imunoglobulina, te inhibicija imunskog odgovora na aloantigene kod miševa i štakora tretiranih DPP4 inhibitorima (De Meester i sur. 1999).

Osim važne uloge u imunskom sustavu, sve je jasnije da DPP4 kao i mnoge druge peptidaze ima ulogu u nastanku tumora (Pro i Dang 2004). Ekspimirana na stanicama tumora i okolnog tkiva DPP4 ima ulogu kako u nastanku tako i u metastaziranju tumora. Navedene učinke ostvaruje mehanizmima modulacije proliferacije i apoptoze, te adhezije i migracije stanica. Učinak DPP4 na proliferaciju i apoptozu pokazao se ovisan o tipu stanica (Boonacker i Van Noorden 2003). Pojačana ekspresija DPP4 na limfocitima T sprečava njihovu apoptozu, dok na tumorskoj liniji hepatocelularnog karcinoma HepG2 pojačana ekspresija DPP4 potiče apoptozu stanica. Protutumorsko djelovanje DPP4 očituje se i u činjenici da je gubitak DPP4 često povezan s malignom transformacijom što je osobito karakteristično za melanome (Lambeir i sur. 2003). Ponovna ekspresija DPP4 u takvim stanicama dovodi do reverzije fenotipa u normalni. Ipak u nekim slučajevima DPP4 može djelovati prometastatski i to kao „*homing*“ receptor za metastaze. To je pokazano na štakorskom modelu metastaziranja stanica raka dojke koje na sebe u cirkulaciji vežu fibronektin pomoću kojeg se mogu vezati na DPP4 prisutnu na endotelnim stanicama plućnih kapilara (Lambeir i sur. 2003). Dualni protumorski i protutumorski učinak DPP4 može se očitovati čak i u istoj vrsti tumora primjerice u tumorima prostate (Boonacker i Van Noorden 2003). Veća ekspresija DPP4 u tumorima prostate korelira s manjim metastatskim potencijalom što se tumači jačom adhezijom stanica na mjestu primarnog tumora. Ipak kod visokoinvazivnih staničnih linija tumora prostate pokazano je da se vezanjem plazminogena na DPP4 ekspimiranu na stanicama tumora, pokreće signalni put koji potiče ekspresiju matriks metaloproteinaze 9 (MMP9) te time pojačava invazivni potencijal stanica (Boonacker i Van Noorden 2003).

1.4. DPP9 – noviji član DPP4 obitelji enzima

Dipeptidil-peptidaza 9 (DPP9) je noviji član DPP4 obitelji enzima. Na postojanje drugih enzima sličnih DPP4 prva je upućivala ostatna DPP4 enzimaska aktivnost nađena u tkivima Fisher-344 štakora s mutiranom, enzimski neaktivnom DPP4 (Smith i sur. 1992), kao i učinak DPP4 inhibitora na imunosne funkcije koji je bio jednak u miševa divljeg tipa i miševa s izbačenim genom za DPP4 (*DPP4 KO*) (Tanaka i sur. 1997; Gorrell 2005). Otkrića drugih DPP otvorila su mogućnost da se neke funkcije koje su prije bile pripisivane DPP4 odnose i na druge enzime, jer se pokazalo da supstrati kao i mnogi inhibitori koji su prije bili u upotrebi nisu specifični isključivo za DPP4 (Gorrell 2005). Jedan od tih novootkrivenih enzima je DPP9. Otkrićem novih DPP također su se postavila pitanja o mogućem preklapanju funkcija DPP4 sa srodnim enzimima (Rosenblum i Kozarich 2003) kao i kompenzira li se nedostatak DPP4 djelovanjem ostalih DPP (Yu i sur. 2009).

DPP9 je otkrivena *in silico* pristupom pretraživanjem EST (engl. *expressed sequence tag*) baza podataka u potrazi za sljedovima sličnim DPP4 cDNA (Olsen i Wagtmann 2002). Otkrivena su dva moguća transkripta za ljudsku (isto tako i za mišju) DPP9 gdje kraći transkript (GenBank mRNA AY374518) ljudske DPP9 sadrži 2589 pb dok duži transkript (AF542510) sadrži 3006 pb (Olsen i Wagtmann 2002; Ajami i sur. 2004).

Kasnije otkriveni gen za DPP9 u čovjeka se nalazi na lokusu 19p13.3 (kod miša na lokusu 17:56186682) i sastoji od 22 eksona (Olsen i Wagtmann 2002). Strukturna razlika DPP9 gena u odnosu na DPP4 je u tome što se konsenzus slijed serinskih proteaza (GWSYG) nalazi unutar jednog eksona, dok je kod DPP4 podijeljen između dva susjedna eksona. Iako DPP9 kodira za duži protein, njezin gen je kraći od gena za DPP4 i to na račun kraćih intronskih slijedova. Postotak identičnih aminokiselina s DPP4 iznosi 26%, dok postotak sličnih iznosi 47% (Ajami i sur. 2004). Paralelno s otkrićem DPP9 otkrivena je i njoj visokohomologna DPP8 (Abbott i sur. 2000) s kojom DPP9 dijeli 79% sličnih i 61% identičnih aminokiselina (Ajami i sur. 2004).

Na temelju *Northern hibridizacija* na velikom broju uzoraka različitih tkiva i stanica DPP9 se pokazala slična DPP4 i po svojoj širokoj tkivnoj rasprostranjenosti (Olsen i Wagtmann 2002;

Ajami i sur. 2004). Ekspresija DPP9 pokazana je u limfocitima te epitelnim stanicama različitih organa (čovjeka, miša i majmuna) – slezene, timusa, limfnih čvorova, jetre, pluća, crijeva, gušterače (Yu i sur. 2009). Sličan obrazac ekspresije DPP9 dobiven je i na temelju najnovijih analiza na tkivima majmuna i štakora (Harstad i sur. 2013). Najviša ekspresija DPP9 pronađena je u jetri, srcu i skeletnim mišićima, dok je selektivna ekspresija DPP9 u odnosu na DPP4 pokazana u živčanim stanicama u mozgu, testisima i endotelu karotidne arterije (Yu i sur. 2009; Matheussen i sur. 2011). Duži DPP9 transkripti pronađeni su pretežito u tumorskim i leukemijskim stanicama, dok je njihova ekspresija u normalnim tkivima pronađena u skeletnim mišićima, jajnicima, testisima i placenti te u normalnim leukocitima (Ajami i sur. 2004). Prvi DPP9 protein izoliran iz prirodnog uzorka bio je iz testisa goveda (Dubois i sur. 2010).

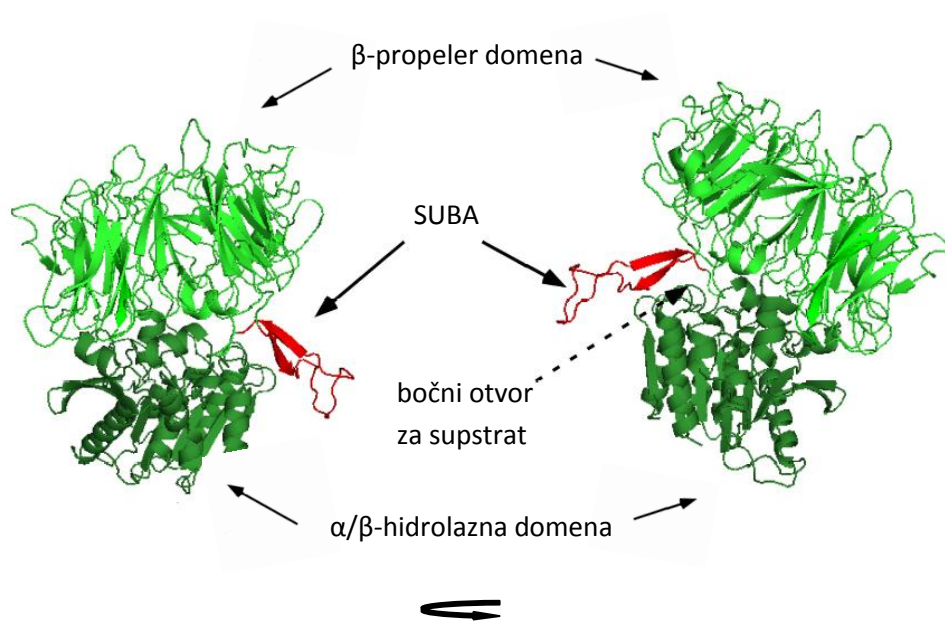
1.4.1. Karakteristike DPP9 – usporedba s DPP4

Većina istraživanja DPP9 odvijala se na *in vitro* sintetiziranom pročišćenom DPP9 proteinu, te su na temelju njih određeni osnovni enzimski parametri i opća svojstva DPP9 proteina (Olsen i Wagtmann 2002; Qi i sur. 2003; Ajami i sur. 2004; Bjelke i sur. 2006; Tang i sur. 2009).

Kao produkti kraćih i dužih transkripata DPP9 *in vitro* su translatirane kraće varijante ljudskog DPP9 proteina duljine 863 aminokiseline (Olsen i Wagtmann 2002; Ajami i sur. 2004) te duže varijante duljine 971 i 892 aminokiseline (Ajami i sur. 2004; Bjelke i sur. 2006). Navedene varijante DPP9 proteina produkti su različitih start kodona i razlikuju se u svom N-kraju. U dosad objavljenim radovima postoje određene nesuglasice oko pitanja jesu li sve varijante DPP9 enzimski aktivne (Ajami i sur. 2004). Ipak, čini se da su i duže i kraće varijante enzimski aktivne, a da je enzimski neaktivnost uočena u pojedinim istraživanjima posljedica uvođenja heksahistidinskog slijeda (*His-tag*) na C-kraj proteina gdje se nalazi katalitička domena (Tang i sur. 2009).

Kristalna struktura DPP9 još uvijek nije razriješena, ali su na temelju homologije sa srodnom DPP4, te pomoću metoda modeliranja napravljeni strukturni modeli DPP9 (Rummey i Metz 2007). Na osnovi homologije s drugim proteinskim sljedovima za C-kraj DPP9 proteina

predložena je struktura karakteristična za motiv α/β -hidrolaza koju tvori jedna β -ploča okružena s nekoliko α -uzvojnica (Slika 3). Za N-kraj DPP9 proteina predložena je β -propeler struktura od osam β -ploča od kojih je svaka građena od četiri antiparalelna β -lanca (Rummeij i Metz 2007). Aktivno mjesto DPP9 nalazi se na mjestu dodira ovih dvaju domena (Slika 3).



Slika 3. 3-D struktura monomera DPP9 dobivena modeliranjem.

SUBA (engl. *SUMO1 binding arm*) = regija za vezanje SUMO1. Preuzeto iz Pilla i sur. (2012).

Slično DPP4, i za DPP9 je pokazano da je enzimski aktivna isključivo u obliku dimera (Tang i sur. 2011). Postoji li mogućnost heterodimerizacije između DPP9 i srodnih proteina kao primjerice u slučaju DPP4 i FAP- α još uvijek je nepoznato i to uglavnom zato što su istraživanja rađena na čistom DPP9 proteinu. Uz dimerizaciju i enzimsku aktivnost vezana je i bitna strukturno-funkcionalna razlika DPP9 u odnosu na DPP4. Tako u slučaju DPP4 mutacije u ključnim aminokiselinskim ostacima u petlji na C-kraju proteina dovode do nemogućnosti dimerizacije te posljedično i do gubitka enzimске aktivnosti (Tang i sur. 2011). Nasuprot tome, mutacije u istoj regiji DPP9 dovode do gubitka enzimске aktivnosti, ali bez gubitka sposobnosti stvaranja dimera (Tang i sur. 2011). Te razlike upućuju na različitu ulogu

navedene regije u ova dva proteina. Ipak ključnom za enzimsku aktivnost oba enzima pokazala se prisutnost dva glutamata u blizini petlje koja se pruža iz β -propeler domene i okružuje mjesto ulaska supstrata (Abbott i sur. 1999; Rummey i Metz 2007).

Usporedbom s DPP4 utvrđeno je da DPP9 ima sličnu specifičnost prema supstratima (sintetskim i prirodnim) (Bjelke i sur. 2006; Tang i sur. 2009), te da je najveća homologija između dva proteina upravo u konzerviranoj katalitičkoj domeni na C-kraju proteina (Rummey i Metz 2007). Međutim, bitna razlika između ova dva proteina je u transmembranskoj domeni, koja je prisutna u DPP4, a odsutna u DPP9. Na temelju izostanka transmembranske domene u DPP9 predložena je njezina citoplazmatska lokalizacija (Ajami i sur. 2004).

1.4.2. Lokalizacija DPP9

Osim citoplazmatske lokalizacije DPP9 dosadašnja istraživanja upućuju i na njezinu prisutnost unutar Golgijevog aparata (Ajami i sur. 2004; Yu i sur. 2006), kao i na mogućnost lokalizacije DPP9 na staničnoj membrani (Bank i sur. 2011).

Većina istraživanja lokalizacije DPP9 napravljena je na modelu stanica transfeciranih konstruktima za ekspresiju kraće varijante ljudskog DPP9 proteina od 863 aminokiselina, te su pokazala samo citoplazmatsku lokalizaciju DPP9 (Ajami i sur. 2004; Yu i sur. 2006; Wilson i sur. 2013). Ipak zbog postojanja RGD slijeda (Arg-Gly-Asp; najpoznatijeg motiva za vezanje na integrine) na N-kraju ljudskog DPP9 proteina postavilo se intrigantno pitanje o njegovoj ulozi na citosolnom proteinu, te pitanje o mogućoj membranskoj lokalizaciji DPP9 (Ajami i sur. 2004; Yu i sur. 2006).

Ekspresija DPP9 na staničnoj membrani nije se sustavno ispitivala, ali je mjerenjem enzimске aktivnosti slične DPP4 na stanicama koje nemaju eksprimiranu DPP4 pokazana enzimska aktivnost na staničnoj membrani (Bank i sur. 2011). Opažena enzimska aktivnost ispiranjem stanica se našla u supernatantu, te bila inhibirana selektivnim inhibitorom DPP9/DPP8. Isti su autori (Bank i sur. 2011) pronašli slabu membransku ekspresiju DPP9 na mišjim splenocitima te ju objasnili nekovalentnim interakcijama DPP9 s nepoznatim

komponentama na membrani stanica. Stoga je pitanje lokalizacije DPP9 na staničnoj membrani otvoreno, kao i njezina mogućnost djelovanja na izvanstanične supstrate.

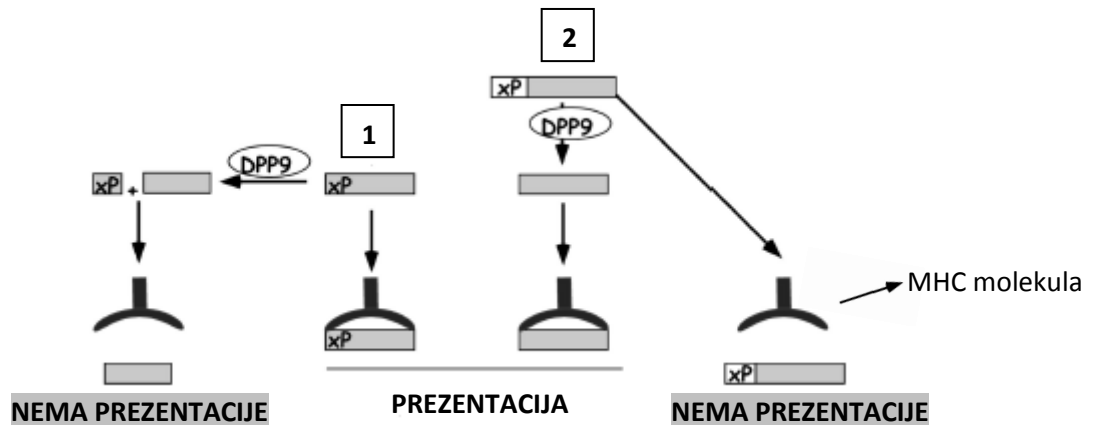
1.4.3. Prirodni supstrati DPP9

Supstratna specifičnost DPP9 prema *in vitro* ponuđenim sintetskim supstratima (npr. Gly-Pro-pNA) slična je onoj DPP4 (Ajami i sur. 2004; Bjelke i sur. 2006). Optimalni pH djelovanja DPP9 je u neutralnom području i kreće se oko 7,5 (za Gly-Pro-pNA) što je također slično optimumu enzimske aktivnosti DPP4 (Tang i sur. 2009). Ipak dok DPP4 ne pokazuje značajno preferiranje određenih aminokiselina na mjestu prve aminokiseline u peptidu, DPP9 pokazuje izrazitu preferenciju prema peptidima čija je prva aminokiselina bazična, aromatska ili razgranata (Geiss-Friedlander i sur. 2009; Tang i sur. 2009). Ove razlike proizlaze iz različite konfiguracije veznih mjesta DPP4 i DPP9 (Rummey i Metz 2007).

Unatoč detaljno istraženju supstratnoj specifičnosti/selektivnosti DPP9 na temelju *in vitro* cijepanja sintetskih peptida, o prirodnim supstratima DPP9 još uvijek se relativno malo zna. Od ispitanih poznatih supstrata DPP4 *in vitro* pokusima je pokazano da bi i DPP9 u fiziološki značajnim koncentracijama mogla cijepati peptide GLP-1, GLP-2, peptid YY i neuropeptid Y (NPY) (Bjelke i sur. 2006). Biološki značajan učinak DPP9 na cijepanje NPY pokazali su i pokusi na stanicama sarkoma, pri čemu cijepanje NPY putem DPP9 ima ključnu ulogu u njihovom preživljavanju jer sprečava učinak intaktnog NPY peptida na smrt stanica. Pokazano je da DPP9 uzrokuje lučenje skraćenog NPY peptida, ali ne i u kojem staničnom odjeljku se cijepanje NPY događa (Lu i sur. 2011). U prilog uključenosti DPP9 u *in vivo* cijepanju NPY govori i odgradnja NPY u ekstraktima mozga štakora, kao i smanjena odgradnja u prisutnosti inhibitora DPP9/DPP8 (Frerker i sur. 2007).

Kao prvi prirodni supstrat DPP9 opisan je citoplazmatski antigeni peptid RU1₃₄₋₄₂ (VPYGSFKHV) (Geiss-Friedlander i sur. 2009). Nakon cijepanja putem DPP9 peptid RU1₃₄₋₄₂ gubi sposobnost vezanja na MHC (engl. *major histocompatibility complex*) molekulu HLA-B51 te DPP9 time negativno djeluje na njegovu prezentaciju (Slika 4, pod 1). Pretpostavlja se da bi DPP9 mogla djelovati i na regulaciju prezentacije drugih tumorskih antigena, a u prilog

tome govori i postojanje drugih tumorskih antigenih peptida (npr. mutirane kaspaze 8) koji imaju prolin kao drugu aminokiselinu u slijedu. Osim negativnog djelovanja na sposobnost prezentacije antigenih peptida DPP9 bi svojom enzimskom aktivnošću na prezentaciju nekih peptida mogla djelovati i pozitivno primjerice u slučaju da X-Pro dipeptid ometa njihovo vezanje na MHC molekulu (Slika 4, pod 2).



Slika 4. Shematski prikaz mogućeg ishoda prezentacije antigenog peptida nakon cijepanja putem DPP9.

Molekula MHC (engl. *major histocompatibility complex*) = molekula glavnog kompleksa tkivne podudarnosti. Preuzeto i prilagođeno iz Geiss-Friedlander i sur. (2009).

Kao novi pristup otkrivanju mogućih supstrata DPP9 pokazale su se metode degradomike (Wilson i sur. 2013). Ovaj pristup temelji se na metodi masene spektrometrije kojom se metodom TAILS (engl. *terminal amine isotopic labeling of substrates*) analiziraju na N-kraju obilježeni produkti dobiveni izolacijom ukupnog staničnog proteoma (degradoma) nastalog u prisutnosti enzimski aktivne, odnosno neaktivne DPP9. Analizom staničnih degradoma kao mogući kandidati za razgradnju putem DPP9 predloženi su ne samo citoplazmatski proteini, već i oni prisutni u staničnim organelima (npr. lizosomima). Kao glavni i ujedno *in vivo* potvrđeni supstrati pokazali su se šaperon kalretikulin i adenilat kinaza 2. Kalretikulin se može naći u nekoliko staničnih odjeljaka primjerice endoplazmatskom retikulumu (ER), citoplazmi, jezgri i mitohondrijima, a bitan je za prezentaciju peptida unutar MHC klase I (Michalak i sur. 2009; Gold i sur. 2010). Među drugim potencijalnim supstratima DPP9 našli su se i proteini uključeni u procese adhezije te metabolizam ugljikohidrata i nukleotida

(Wilson i sur. 2013). Signali kojim ti proteini postaju metom za cijepanje putem DPP9 još uvijek su nepoznati, iako bi jedan od mehanizama mogla biti sumoilacija putem proteina SUMO1 (Pilla i sur. 2012).

1.4.4. Enzimska aktivnost DPP9

SUMO1 prvi je opisani alosterički aktivator DPP9. Naime, pokazano je da DPP9 veže SUMO1 (engl. *small ubiquitin-related modifier 1*) – mali protein koji vežući se na ciljni protein mijenja njegova svojstva poput lokalizacije, aktivnosti, stabilnosti i interakcije s drugim proteinima. Vezanje SUMO1 na DPP9 događa se u regiji SUBA (engl. *SUMO1 binding arm*, Slika 3) koja se nalazi u β -propeler domeni blizu prilaza katalitičkom mjestu (Pilla i sur. 2012). Kako je interakcija između DPP9 i SUMO1 nekovalentna, moguće je da SUMO1 zapravo posreduje interakciji između DPP9 i sumoiliranog proteina-partnera (Geiss-Friedlander i Melchior 2007). Još je međutim nejasno čini li sumoilacija putem SUMO1 protein metom za razgradnju putem DPP9, ili je uloga takvog hipotetskog proteina-partnera isključivo regulacija aktivnosti peptidaze (Pilla i sur. 2012). Ipak, ova istraživanja regulacije enzimske aktivnosti DPP9 otvorila su nove mogućnosti za primjenu malih peptida, koji slične interakcijskoj površini SUMO1 s DPP9, kao alosteričkih inhibitora DPP9 (Pilla i sur. 2013).

Osim interakcijom sa SUMO1 enzimska aktivnost DPP8 i DPP9 može biti regulirana i pomoću tiolnih spojeva, te vodikovim peroksidom (Park i sur. 2008). Ti spojevi uzrokuju oksidaciju i dimerizaciju slobodnih cisteinskih ostataka što za posljedicu ima smanjenje fleksibilnosti strukture enzima te gubitak njegove enzimske aktivnosti. U većini proteina takve promjene cisteina se ne događaju jer su one pri neutralnom pH u protoniranim stanju, pa je pretpostavka da se na ovaj način promijenjeni cisteini nalaze u kiselom okruženju. DPP8 i DPP9 imaju 12 odnosno 14 slobodnih cisteinskih ostataka (u β -propeler domeni, Slika 3) slično kao i DPP4 i FAP- α (također 12). Međutim položaj tih cisteina nije konzerviran, te se razlikuje među članovima DPP4 obitelji.

Pretpostavku da cisteini u DPP9 i DPP8 imaju različitu ulogu od onih u DPP4 i FAP- α potvrđuje i opažanje da cisteini u FAP- α i DPP4 nisu osjetljivi na oksidaciju te da enzimska

aktivnost ovih proteina nakon tretmana tiolnim spojevima ostaje nepromijenjena. Zbog navedenog svojstva DPP9 bi mogla biti protein koji je osjetljiv na redoks status stanice (engl. *redox-sensing protein*) te bi mogla biti uključena u signalizaciju uzrokovanu oksidacijskim stresom (Park i sur. 2008).

Mehanizam regulacije funkcija DPP9 mogla bi biti i glikozilacija pojedinih aminokiselina. Dva su potencijalna N-glikozilacijska mjesta na DPP9 proteinu u odnosu na devet mjesta prisutnih u DPP4. Ipak na temelju dosadašnjih radova nema dokaza da uistinu i dolazi do glikozilacije na ovim mjestima (Olsen i Wagtmann 2002; Ajami i sur. 2004; Tang i sur. 2009). Na DPP9 proteinu također su pronađena i moguća acetilacijska mjesta (Choudhary i sur. 2009), ali ni ove modifikacije nisu potvrđene *in vivo*.

1.4.5. Ostale funkcije DPP9

Uvid u moguće funkcije DPP9 dale su stanične linije s prekomjerno eksprimiranim DPP9 proteinom. Na modelima transfekcije konstruktima za kraću varijantu DPP9 proteina u HepG2 i HEK293T stanicama pokazana je moguća uloga DPP9 u adheziji, migraciji, proliferaciji i apoptozi stanica (Yu i sur. 2006; Yao i sur. 2011).

Prekomjerna ekspresija DPP9 bila je povezana sa smanjenom adhezijom na kolagen tipa I, fibronektin i Matrigel (komercijalno dostupnu mješavinu molekula izvanstaničnog matriksa bazalne membrane) (Yu i sur. 2006). Smanjena adhezija praćena je i smanjenjem ekspresije DDR1 (engl. *discoidin domain receptor 1*) neintegrinskog kolagenskog receptora, te smanjenjem ekspresije drugih molekula uključenih u adheziju, međustanične kontakte i interakcije s međustaničnim matriksom (β -katenina, E-kadherina i TIMP2). Iznenadujuće, pokazano je da RGD slijed na ljudskom DPP9 proteinu nema ulogu u smanjenoj adheziji stanica na ispitivane podloge (kolagen tipa I, fibronektin i Matrigel) (Yu i sur. 2006). Utjecaj DPP9 na adhezijska svojstva stanica, apoptozu i migraciju također se pokazao neovisnim o enzimskoj aktivnosti DPP9 (Yu i sur. 2006). Međutim, za učinak DPP9 na povećanje apoptoze i smanjenje migracije stanica ne može se sa sigurnošću utvrditi je li uzrokovan promjenom

ekspresije DPP9, ili je primarno posljedica gubitka sposobnosti adhezije stanica na podlogu (Yu i sur. 2006).

DPP9 je, slično kao i DPP4 uključena i u modulaciju signalnih puteva. Naime, pokazano je da DPP9 interferira sa signalizacijom potaknutom epidermalnim čimbenikom rasta (EGF; engl. *epidermal growth factor*) (Yao i sur. 2011). Mehanizam inhibitornog djelovanja DPP9 na prijenos signala putem EGF receptora je inhibicija fosforilacije kinaze Akt, čemu čini se prethodi interakcija DPP9 s malom GTP-azom H-Ras. U istom signalnom putu DPP9 ima učinak i na spontanu apoptozu jer prekomjerna ekspresija DPP9 uzrokuje cijepanje kaspaza 3 i 9. U ovom slučaju učinak na signalizaciju i poticanje apoptoze pokazao se ovisan o DPP9 enzimskoj aktivnosti (Yao i sur. 2011).

1.4.6. DPP9 na tumorskim stanicama

Osim već spomenute široke rasprostranjenosti DPP9 u stanicama normalnih tkiva (Yu i sur. 2009) sve se više govori o mogućoj ulozi DPP9 u razvoju tumora (Slika 5) (Kotackova i sur. 2009; Yu i sur. 2010). Na moguću važnost ekspresije DPP9 na tumorskim stanicama upućuju nalazi da DPP9 utječe na adheziju, migraciju i apoptozu stanica (Yu i sur. 2006). Također, uloga u svim fazama nastanka tumora, kao i promjenjena ekspresija na tumorskim stanicama u odnosu na normalne stanice normalnog tkiva iz kojeg potječu, već je opisana za srodnu peptidazu DPP4 (Pro i Dang 2004).

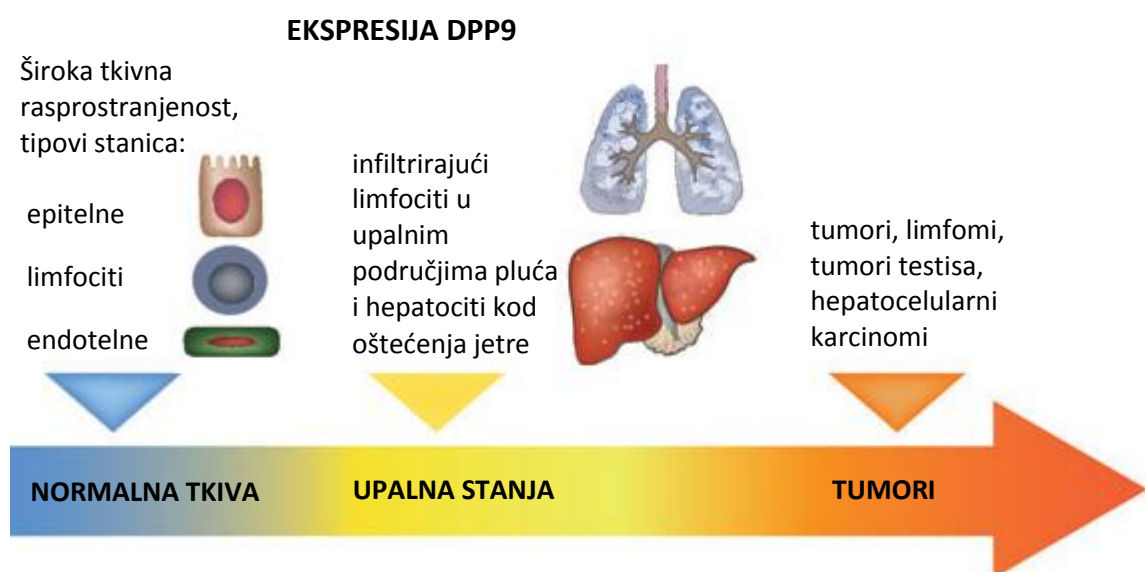
DPP9 se pokazala visoko eksprimirana u nizu tumorskih staničnih linija različitog porijekla, primjerice leukemijskim, melanomskim (EB81-MEL, LB373-MEL), linijama karcinoma dojke (MDA-MB-231 i MDA-MB-453), liniji karcinoma bubrega (BB64-RCC) te poznatim modelnim tumorskim linijama HeLa i 293-EBNA (Geiss-Friedlander i sur. 2009; Wilson i Abbott 2012).

Ekspresija DPP9 proučavana je i u mnogim ljudskim tumorima kao što su leukemije, meningiomi, neuroblastomi, gliomi, melanomi, te u tumorima jetre i testisa. DPP9 je nađena kao jače eksprimirana u odnosu na DPP4 u meningiomima (Stremenova i sur. 2010), gliomima (Busek i sur. 2012) i kroničnoj limfocitnoj leukemiji B stanica (Sulda i sur. 2010).

Nadalje, za neke tumore (leukemije, melanome i neuroblastome) karakteristična je ekspresija duže varijante DPP9 transkripta (Ajami i sur. 2004).

Povećana ekspresija DPP9 opažena je u jetri oboljelih od hepatocelularnog karcinoma (Kurokawa i sur. 2003), ali i u drugim ne-tumorskim patološkim promjenama jetre (Yu i sur. 2009; Chowdhury i sur. 2013). Povišena ekspresija DPP9 mRNA u usporedbi sa zdravim stanicama opažena je također i u tumorima testisa (Yu i sur. 2009). U prilog hipotezi da povišena ekspresija DPP9 može predstavljati važan čimbenik preživljavanja tumorskih stanica, je i već opisani primjer djelovanja DPP9 na cijepanje peptida NPY, te dokidanja njegovog letalnog učinka na stanice Ewingovog tipa sarkoma (Lu i sur. 2011). Značenje i ulogu DPP9 na stanicama različitih tumora treba tek utvrditi, no na temelju dosadašnjih podataka u literaturi moglo bi se očekivati da djeluje protumorski, mehanizmom pojačane proliferacije. Međutim, rezultati dobiveni na staničnim linijama, ukazuju da je pojačana ekspresija DPP9 povezana sa smanjenjem adhezije i migracije kao i s povećanjem spontane apoptoze (Yu i sur. 2006; Yao i sur. 2011), što je u suprotnosti s navedenom hipotezom.

Zaključno, na temelju dosadašnjih nalaza, pojačana ekspresija DPP9 na nekim tipovima tumora mogla bi biti meta za primjenu DPP9 inhibitora kao protutumorskih lijekova u slučaju da se učinak DPP9 na tumorske stanice pokaže ovisan o njezinoj enzimskoj aktivnosti.



Slika 5. Ekspresija DPP9 u stanicama normalnih i patološki promijenjenih tkiva. Preuzeto i prilagođeno iz Yu i sur. (2010).

1.4.7. Uloga DPP9 u imunosnom sustavu

Podaci o mogućim ulogama DPP9 u imunosnom sustavu još su uvijek relativno oskudni. Dosadašnji rezultati ukazuju na mogući utjecaj DPP9 na proliferaciju i apoptozu stanica, uključenost DPP9 u upalne i imunosne procese, te sudjelovanje DPP9 u prezentaciji antigena.

O mogućem utjecaju DPP9 na proliferaciju stanica govore podaci da inhibicija DPP9/DPP8 smanjuje proliferaciju aktiviranih limfocita T, što je opaženo nakon upotrebe selektivnih inhibitora DPP9/DPP8 (Reinhold i sur. 2009) kao i neselektivnih DPP4 inhibitora u *DPP4 KO* miševa (Tanaka i sur. 1997; Reinhold i sur. 2009). Nadalje, nedavno je pokazano da primjena selektivnog inhibitora DPP9/DPP8 potiče spontanu apoptozu makrofaga (Matheussen i sur. 2013).

U prilog uključenosti DPP9 u imunosne i upalne procese govori ekspresija DPP9 na leukocitima (Maes i sur. 2007), kao i povišena ekspresija DPP9 na aktiviranim limfocitima (Chowdhury i sur. 2013). Uključenost DPP9 u regulaciju imunosnog odgovora *in vivo* pokazana je na animalnom modelu astme. Na štakorskom modelu alergijskog odgovora u plućima koji je izazvan inhalacijom ovalbumina (OVA) pokazana je povećana ekspresija DPP9 lokalizirana u bronhima (Schade i sur. 2008), što je u skladu s kasnije pronađenom ekspresijom DPP9 u infiltrirajućim limfocitima u upalnim područjima pluća (Yu i sur. 2009).

O mogućoj povezanosti ekspresije DPP9 s upalnim i reumatskim bolestima govori smanjenje enzimске aktivnosti slične DPP4 (vezane za staničnu membranu kao i unutarstanične) nađene u mononuklearnim stanicama iz sinovijalne tekućine pacijenata s reumatoidnim artritisom (upalni oblik artritisa) u odnosu na pacijente s osteoartritisom (Balaziová i sur. 2006).

Nadalje, *in vitro* pokusi sugeriraju da bi DPP9 mogla sudjelovati u odgradnji citoplazmatskih peptidnih antigena za prezentaciju unutar MHC klase I (Geiss-Friedlander i sur. 2009). Na taj način DPP9 bi mogla djelovati i u regulaciji imunosnog odgovora na tumorske i virusne antigene.

1.4.8. Inhibitori DPP9

Selektivni inhibitori predstavljaju pogodan alat za ispitivanje mogućih funkcija određenog enzima. Međutim, kao što je ranije rečeno, postoji velika sličnost u strukturi DPP9 i DPP8, posebice u dijelu koji predstavlja vezno mjesto za supstrat (Rummey i Metz 2007). Upravo ta sličnost osnovna je prepreka za dizajn inhibitora koji selektivno djeluju samo na jedan od navedenih enzima.

Postojeći inhibitori, imaju visoku selektivnost prema DPP9/DPP8, u odnosu na DPP4 (Van der Veken i sur. 2008; Van Goethem i sur. 2008), međutim, vrlo je mala (zanemariva) selektivnost prema jednom od citosolnih enzima (Van Goethem i sur. 2011). Stoga se isti smatraju dvojnim inhibitorima. Dakle, nepostojanje inhibitora koji bi selektivno djelovali na DPP9, odnosno DPP8, ne omogućava razlikovanje njihovog pojedinačnog doprinosa u obavljanju određenih funkcija.

Osim navedenog, inhibitori DPP9/DPP8 morali bi zadovoljiti još jednu bitnu osobinu, a to je da ulaze u stanicu, s obzirom na dominantno unutarstaničnu lokalizaciju navedenih enzima. Neki od postojećih inhibitora, međutim ne prolaze, ili samo slabo prolaze staničnu membranu, što bitno ograničava njihovu primjenu *in vivo* (Wu i sur. 2009).

Na temelju *in vivo* primjene inhibitora DPP9/DPP8 doneseni su oprečni zaključci o mogućim neželjenim popratnim učincima inhibicije enzimske aktivnosti DPP8 odnosno DPP9. Tako je korištenjem selektivnog inhibitora DPP9/DPP8 *allo*-Ile-izoindolina pokazana njegova izuzetna toksičnost na štakorima nakon dva tjedna primjene, koja se očitovala u alopeciji, trombocitopeniji, retikulocitopeniji, povećanju slezene, histopatološkim promjenama u više organa i smrtnosti (Lankas i sur. 2005). Nasuprot nalazima dobivenim s *allo*-Ile-izoindolinom kasniji pokusi na štakorima s drugim izrazito penetrabilnim i potentnim (IC₅₀ 53 nM) inhibitorom DPP9/DPP8, 1G244, nisu pokazali prethodno opisanu toksičnost (Wu i sur. 2009). Prethodno istraživanje koje je pokazalo izrazitu toksičnost selektivnog inhibitora DPP9/DPP8 *allo*-Ile-izoindolina objašnjeno je nespecifičnim učinkom za koji je bila odgovorna struktura samog inhibitora, a ne inhibicija aktivnosti DPP9/DPP8 (Burkey i sur. 2008).

Ipak, na iznimnu važnost enzimske aktivnosti DPP9 ukazao je nedavni rad Gall i sur. (2013). Ovi su autori pokazali da miševi s enzimski neaktivnom DPP9 nemaju nikakvih poremećaja u embrionalnom i fetalnom razvoju. Međutim u novookoćenih miševa izostanak enzimske aktivnosti DPP9 imao je letalni učinak. Mehanizam opaženog letalnog učinka gubitka enzimske aktivnosti DPP9 nije objašnjen. Razlog iznimno velike važnosti DPP9 za preživljavanje u prvim satima samostalnog života životinja možda bi se mogao objasniti na temelju prethodno predloženih supstrata DPP9, među kojima su i proteini uključeni u metabolizam purina, pirimidina i folata te održavanje stanične homeostaze (adenilat kinaza 2) (Wilson i sur. 2013).

Na temelju novijih nalaza čini se da bi se kao inhibitori enzimske aktivnosti DPP9/DPP8 mogli primjeniti i inhibitori DPP4 koji su već u kliničkoj upotrebi – primjerice vildagliptin, koji je u odnosu na sitagliptin manje selektivan za DPP4. Naime, K_i vrijednosti za DPP4, DPP9 i DPP8 iznose redom 3, 95 i 810 nM (Burkey i sur. 2008), što omogućuje inhibiciju DPP9 (i DPP8) u farmakološki primjenjivim koncentracijama. Na primjeru tumorskih stanica pacijenata s akutnom mijeloičnom leukemijom (AML) pokazano je da vildagliptin povećava citotoksičnost konvencionalnog kemoterapeutika partenolida (Spagnuolo i sur. 2013). Vildagliptin selektivno pojačava citotoksičnost partenolida prema leukemijskim stanicama dok nema toksični učinak na normalne hematopoetske stanice. Iznenadjuće je da je opaženi učinak vezan uz inhibiciju DPP8 i DPP9, a ne DPP4. Iako je mehanizam kojim inhibicija DPP9/DPP8 djeluje sinergistički s partenolidom za sada nepoznat, dobiveni rezultati ukazuju da je za dio učinka važna inhibicija DPP9. Također je poznato da partenolid uzrokuje antioksidativni odgovor stanice koji može spriječiti njegov citotoksični učinak (Spagnuolo i sur. 2013). Istodobno, DPP9 i DPP8 su enzimi osjetljivi na redoks status stanice (Park i sur. 2008), te su njihova enzimska aktivnost kao i mogući učinak na staničnu proliferaciju najveći u uvjetima smanjene oksidacije. Za konačni citotoksični učinak partenolida na leukemijske stanice očito je ključno vildagliptinom dokinuti i enzimsku aktivnost DPP9/DPP8.

Zadnjih nekoliko godina intenzivno se radi na dizajniranju novih inhibitora temeljenih na različitim strukturama (analozi glutamata, izoindolinski derivati, metil-piperazinski analozi 1G244, strukture temeljene na boroPro) te ispitivanju njihove selektivnosti prema članovima DPP4 obitelji enzima (Jiaang i sur. 2005; Lu i sur. 2005; Kang i sur. 2007; Van der Veken i sur.

2008; Van Goethem i sur. 2008; Kuhn-Wache i sur. 2011; Van Goethem i sur. 2011; Wu i sur. 2012). Osim velikog interesa za razvojem selektivnog inhibitora DPP9, za moguću terapijsku primjenu bilo bi od interesa istražiti i modulatore njezine ekspresije.

1.4.9. Dosadašnji modeli za istraživanje DPP9

Većina dosadašnjih istraživanja DPP9 temeljila se na modelima staničnih linija transfeciranih konstruktima za ekspresiju kraće varijante DPP9 proteina, unatoč nedovoljnom poznavanju razlika i biološke značajnosti dosad opisanih varijanti DPP9 proteina (Ajami i sur. 2004; Yu i sur. 2006; Yao i sur. 2011). Dopuna ovoj vrsti istraživanja trebala bi biti istraživanja DPP9 u stanicama koje ju eksprimiraju endogeno uz mogućnost detekcije svih varijanti koje su u stanicama normalno prisutne.

Dosad je istraživana uloga većinom ljudskog DPP9 proteina. Međutim, unatoč visokom stupnju homologije između ljudskog i mišjeg DPP9 proteina (92% identičnih i 95% sličnih aminokiselina) (Ajami i sur. 2004), na N-kraju DPP9 proteina postoji bitna razlika – mišji DPP9 je mutacijom izgubio RGD slijed (Slika 6). Zasad je nepoznato utječe li izostanak RGD slijeda na lokalizaciju DPP9 u mišjim stanicama. Također, nešto manji stupanj homologije između ljudske i mišje DPP9 postoji u središnjem dijelu tih proteina (Slika 7). Upravo u tom dijelu su i najveće razlike u homologiji ljudske i mišje DPP4, koje se očituju i razlikom u receptorskim funkcijama DPP4 – ljudska DPP4 veže, a mišja ne veže ADA (Lambeir i sur. 2003). Na temelju navedenog moglo bi se pretpostaviti da razlike u središnjem dijelu DPP9 proteina miša i čovjeka mogu imati i funkcionalne posljedice u njihovim svojstvima vezanja drugih proteina i prosljedično različitoj ulozi u staničnim procesima. Zanimljivo je napomenuti i da su najveće razlike između ljudskih i mišjih peptidaza zabilježene upravo kod serinskih peptidaza uključenih u imunski sustav (Puente i sur. 2003; Murray i Wynn 2011).

Kada je u pitanju istraživanje uloge DPP9 u imunskom sustavu, većina radova bavila se ekspresijom i mogućim funkcijama DPP9 na limfocitima (Lankas i sur. 2005; Reinhold i sur. 2009; Bank i sur. 2011; Chowdhury i sur. 2013), dok su rijetki radovi o ekspresiji DPP9 i njezinoj mogućoj funkciji na stanicama makrofagnog porijekla (Matheussen i sur. 2013).

```

Ljudski   1 MRKVKKLRD KENTGSRWF SLNSEGAERM ATTGTPTADR GDAAATDDPA ARFQVQKHSW
DPP9     61 DGLRSIIHGS RKYSGLIVNK APHDFQFVQK TDESGPHSHR LYLLGMPYGS RENSLLYSEI

Mišji    1 MCSGVSPVEQ VAGDMDDTA ARFCVQKHSW DGLRSIIHGS RKSSGLIVSK APHDFQFVQK
DPP9     61 PDESGPHSHR LYLLGMPYGS RENSLLYSEI PKKVRKEALL LLSWKQMLDH FQATPHHGVS

```

Slika 6. Razlika u N-kraju ljudskog i mišjeg DPP9 proteina.

U aminokiselinskom slijedu sivo označena nehomologna regija na N-kraju ljudskog (51 aminokiselina, NCBI referentni slijed NP_631898.3) i mišjeg DPP9 proteina (21 aminokiselina, NP_766212.2). Podebljano označen početni metionin, crveno označen RGD slijed, odnosno mutirani AGD slijed. Izvor aminokiselinskih sljedova je NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) baza.

```

22  RFCVQKHSWDGLRSIIHGSRKSSGLIVSKAPHDFQFVQKPDESGPHSHRLYLLGMPYGSR 81
52  ..Q.....Y.....N.....T..... 111

82  ENSLLYSEIPKKVRKEALLLSWKQMLDHFQATPHHGVSSreeellrerkrlGVFGITSY 141
112 ..... 171

142 DFHSEGLFLFQASNSLFHCRDGGKNGFMVSPMKPLEIKTQCSGPRMDPKICPADPAFFS 201
172 ..... 231

202 FINNSDLWVANIETGEERRLTFCHQGSAGVLDNPKSAGVATFVIQEEFDRFTGCWWCPTA 261
232 .....LSN...D.....Y..... 291

262 SWEGSEGLKTLRILYEEVDESEVEVIHVSPALEERKIDSRYRPRTGSKNPKIALKLAEL 321
292 .....F 351

322 QTDHQKIVSSCEKELVQPFSSLFPKVEYIARAGWTRDGKYAWAMFldrpqqrlqlvllp 381
352 .....S.....TQ.....W..... 411

382 palFIPaveseaqrqaaaravPKNVQPFVIYEEVTNVWVNHDIFHPFPQAEGQQDFCFL 441
412 .....ST.N.E..L.S.....R.....Y.V.....Y.....S..EDEL.. 471

442 RANECKTGFCHLYRVTVELKTKDYDWTEPLSPTEDEFKCPIKEEVALTSGEWEVLSRHGS 501
472 .....K..AV..SQG..S..F..G.....I.....A..... 531

502 KIWVNEQTKLVYFQGTKDTPLEHHLVVSYESAGEIVRLTTLGFSHSCSMSQSFDMFVSH 561
532 .....E.....A.....P.....N..... 591

562 YSSVSTPPCVHVYKLSGPDDDDPLHKQPRFWASMEAANCPPDYVPEIFHFHTRADVQLY 621
592 .....S.....S..R.. 651

622 GMIYKPHTLQPGRKHTVLFVYGGPQVQLVNNSFKGIKYLRLNTLASLGYAVVIDGRGS 681
652 .....A..K..... 711

682 CQRGLHFEGALKNQMGQVEIDQVEGLQYVAEKYGFIDLSRVAIHGSYGGFLSMGLIH 741
712 .....R.....F..... 771

742 KPQVFKVAIAGAPVTVWMAYDTGYTERYMDVPENNQQGYEAGSVALHVEKLPNEPNRLLI 801
772 .....H..... 831

802 LHGFLDENVHFFHTNFLVSQLIRAGKPYQLQIYPNERHSIRCRESGEHYEVTLLHFLQEH 861
832 .....P.....Y 891

862 L 862 Mišji DPP9
892 . 892 Ljudski DPP9

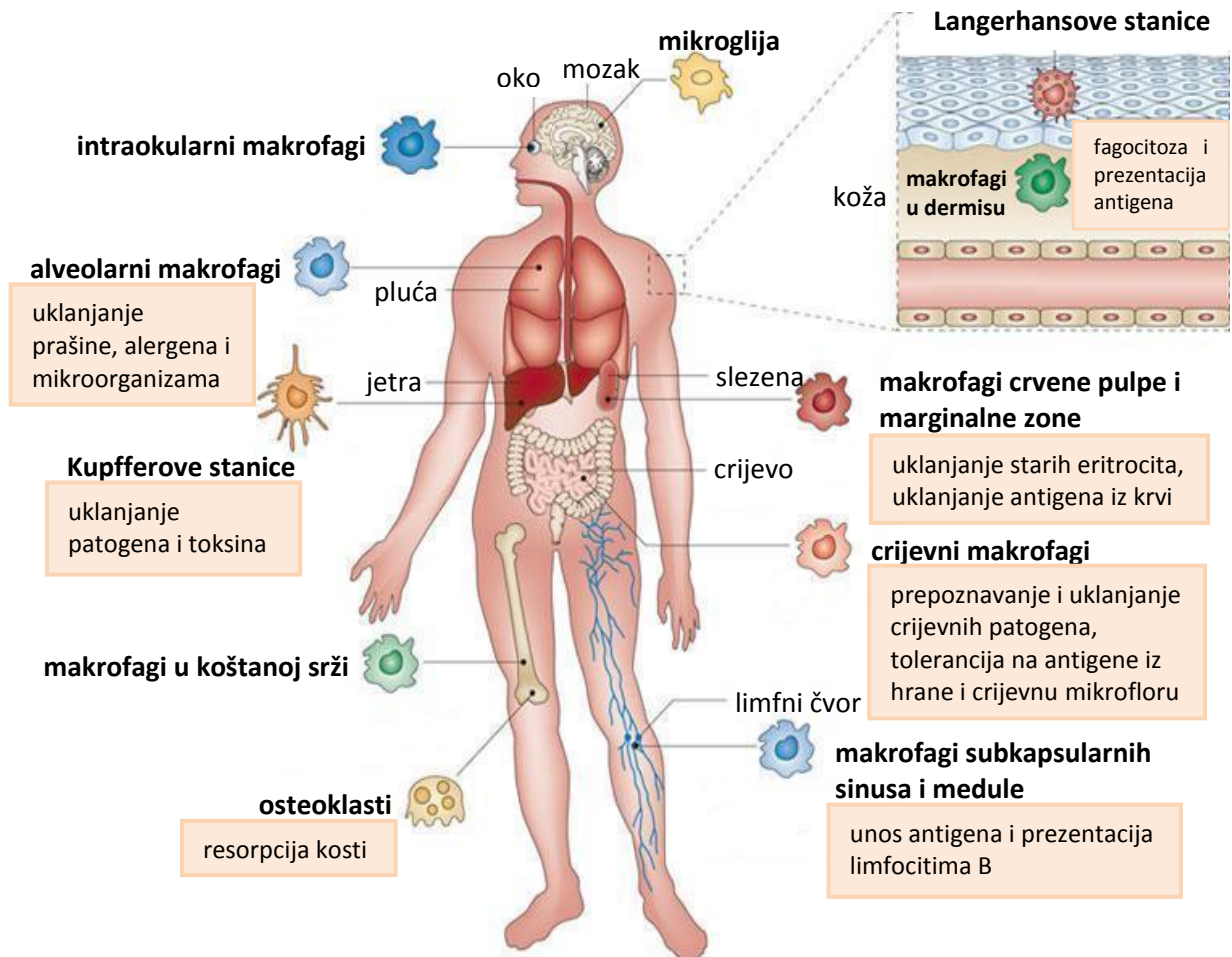
```

Slika 7. NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) poravnanje aminokiselinskih sljedova mišjeg (NP_766212.2) i ljudskog (NP_631898.3) DPP9 proteina.

Crveno označene aminokiseline koje se razlikuju u ljudskom DPP9 proteinu.

1.5. Makrofagi i njihova uloga u organizmu

Monociti pripadaju bijelim krvnim stanicama (leukocitima) koje u koštanoj srži nastaju iz hematopoetske matične stanice, odnosno preteča mijeloidne loze. Monociti iz krvi odlaze u tkiva gdje se diferenciraju u makrofage i preuzimaju različite uloge ovisno o tkivu (Slika 8). Među najvažnijim ulogama makrofaga su prepoznavanje, ubijanje i uklanjanje patogena, uklanjanje starih i apoptotičnih stanica, unos i prezentacija antigena, te lučenje proupalnih ili protuupalnih posrednika (Murray i Wynn 2011).



Slika 8. Tkivni makrofagi i njihove uloge. Preuzeto iz Murray i Wynn (2011).

1.5.1. Prepoznavanje opasnosti putem receptora

Za prepoznavanje „opasnosti“ i „stranog“ makrofagima služe posebni receptori. Makrofagni receptori dijele se na opsoninske (koji olakšavaju fagocitozu) i ne-opsoninske receptore. Među opsoninske receptore ubrajaju se receptori za Fc-ulomak protutijela (FcR) i receptori za ulomke komplementa (CR) (Čulo i Batinić 2010). Skupinu ne-opsoninskih receptora čine lektinski, TLR (engl. *Toll-like receptor*), NLR (engl. *NOD-like receptor*), RLR (engl. *RIG1-like helicase receptor*) i receptori čistači (engl. *scavenger*) (Murray i Wynn 2011). Ovoj skupini receptora zajedničko je da prepoznaju konzervirane molekularne obrasce patogena (engl. *pathogen-associated molecular patterns*; PAMP), ali i molekularne obrasce otpuštene oštećenjem vlastitih tkiva i stanica (engl. *damage-associated molecular patterns*; DAMP) (Kono i Rock 2008), te se zbog toga nazivaju receptorima za prepoznavanje obrazaca (engl. *pattern recognition receptors*; PRR) (Čulo i Batinić 2010). Lektinski receptori tako prepoznaju šećerne ostatke stijenke mikroorganizama (npr. manozu) dok različiti TLR prepoznaju različite produkte bakterija, plijesni, virusa (Čulo i Batinić 2010), kao i vlastitih oštećenih stanica (Kono i Rock 2008). Osim različitih liganada ovi receptori razlikuju se i po svojoj ulozi. Dok su TLR, NLR i RLR uključeni u prijenos signala, lektinski receptori i receptori čistači uključeni su u proces fagocitoze (Murray i Wynn 2011). Signalizacija putem TLR (npr. potaknuta lipopolisaharidom) tako potiče sintezu antimikrobnih proteina i proupalnih citokina te je važan dio urođene imunosti (Čulo i Batinić 2010). Receptorima inducirana fagocitoza pak omogućava unos stranih antigena, njihovu prezentaciju limfocitima T, te time i poticanje specifičnog imunosnog odgovora.

1.5.2. Prezentacija antigena

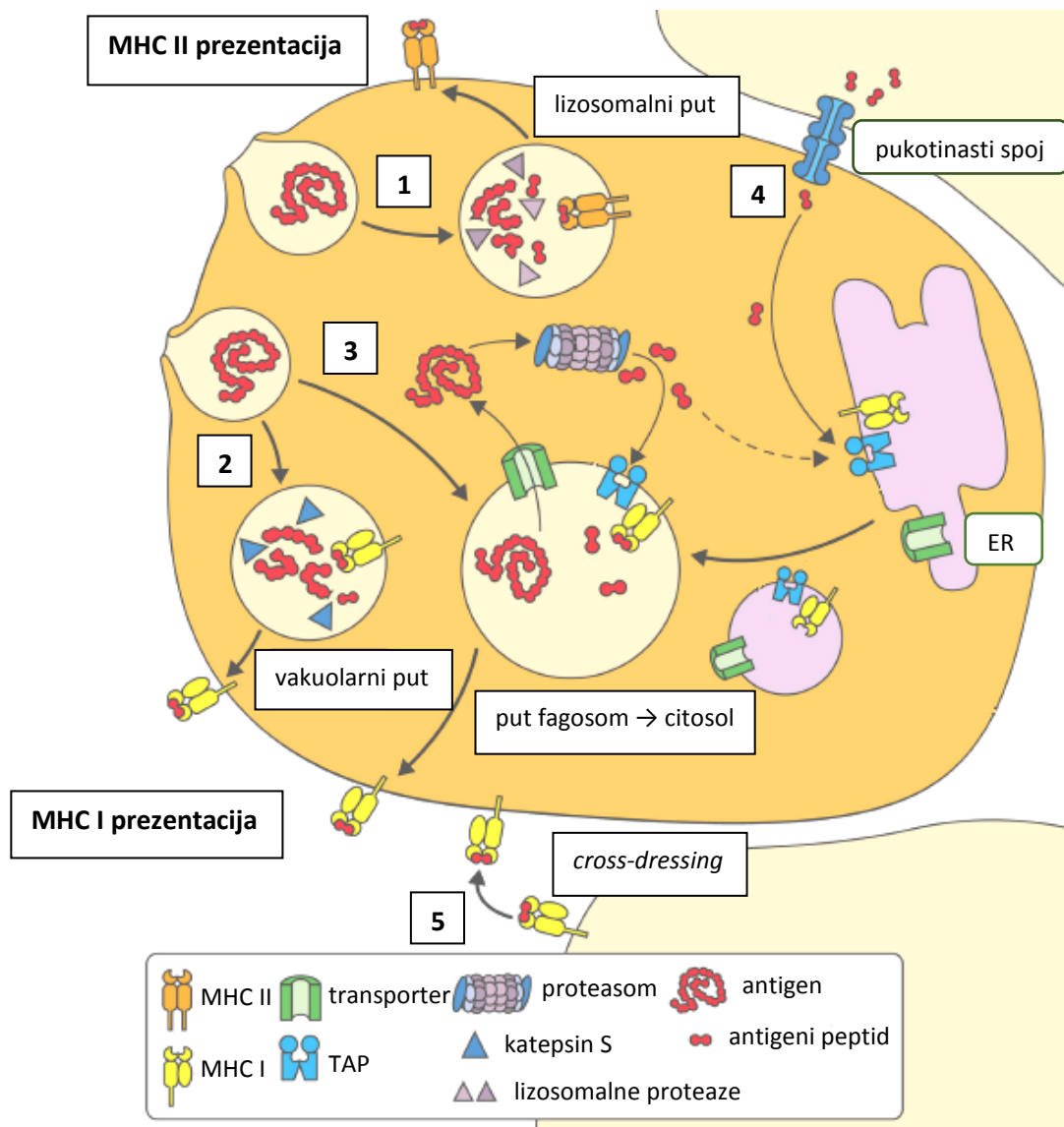
Unutarstanični i izvanstanični antigeni limfocitima T prezentiraju se u sklopu molekula glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*; MHC). MHC molekule kod čovjeka su produkti gena HLA (engl. *human leukocyte antigen*) lokusa, dok su kod miša to produkti homolognog lokusa H-2. Molekule MHC klase I eksprimirane su

na svim stanicama s jezgrom. Na molekule MHC klase I vežu se peptidi nastali u citosolu razgradnjom staničnih proteina, te prezentiraju citotoksičnim limfocitima T ($CD8^+$). Kako ovim načinom prezentacije mogu biti prezentirani i promijenjeni proteini u tumorskim stanicama te virusni proteini u zaraženim stanicama ovaj način prezentacije ima važnost u poticanju specifičnog protutumorskog i protuvirusnog imunonosnog odgovora (Kreer i sur. 2011).

Molekule MHC klase II na svojoj staničnoj membrani imaju samo profesionalne antigen prezentirajuće stanice: dendritičke stanice, makrofagi i limfociti B. Ove stanice u kontekstu molekula MHC klase II prezentiraju antigene peptide nastale unosom i razgradnjom izvanstaničnih antigena (Slika 9) te ih prezentiraju pomoćničkim limfocitima T ($CD4^+$) (Kreer i sur. 2011).

Osim izvanstaničnih antigena profesionalne antigen prezentirajuće stanice mogu prezentirati i virusne i tumorske antigene drugih stanica izravnim prijenosom antigena iz citosola jedne stanice u drugu preko pukotinastih spojeva, kao i preuzimanjem MHC molekula klase I s već vezanim peptidom s površine drugih stanica (Slika 9). Ovaj tip prezentacije putem profesionalnih antigen prezentirajućih stanica ima prednost u tome što one citotoksičnim limfocitima T pružaju i potrebne kostimulacijske signale (npr. putem CD86) (Kreer i sur. 2011).

U novijoj literaturi opisan je i treći način prezentacije antigena, a to je tzv. križna prezentacija (engl. *cross-presentation*). Križna prezentacija je put prezentacije izvanstaničnih peptidnih antigena putem molekula MHC klase I, nasuprot uobičajenoj prezentaciji putem MHC klase II, a karakteristična je za profesionalne antigen prezentirajuće stanice (većinom dendritičke). Za unos antigena na putu križne prezentacije karakteristično je i da se odvija putem makrofagnih manoznih receptora (MR) te da se procesiranje unešenog antigena događa bez spajanja endosoma/fagosoma s lizosomima. Procesiranje antigena se događa izravno u endosomalnim vezikulama ili pak putem proteasoma i citosolnih proteaza nakon prijenosa antigena u citosol (Slika 9) (Kreer i sur. 2011). Osim protektivne uloge u borbi organizma protiv virusa i tumora za križnu prezentaciju se pretpostavlja i uključenost u reakcije odbacivanja transplantata i razvoj autoimunskih bolesti (Amigorena i Savina 2010).



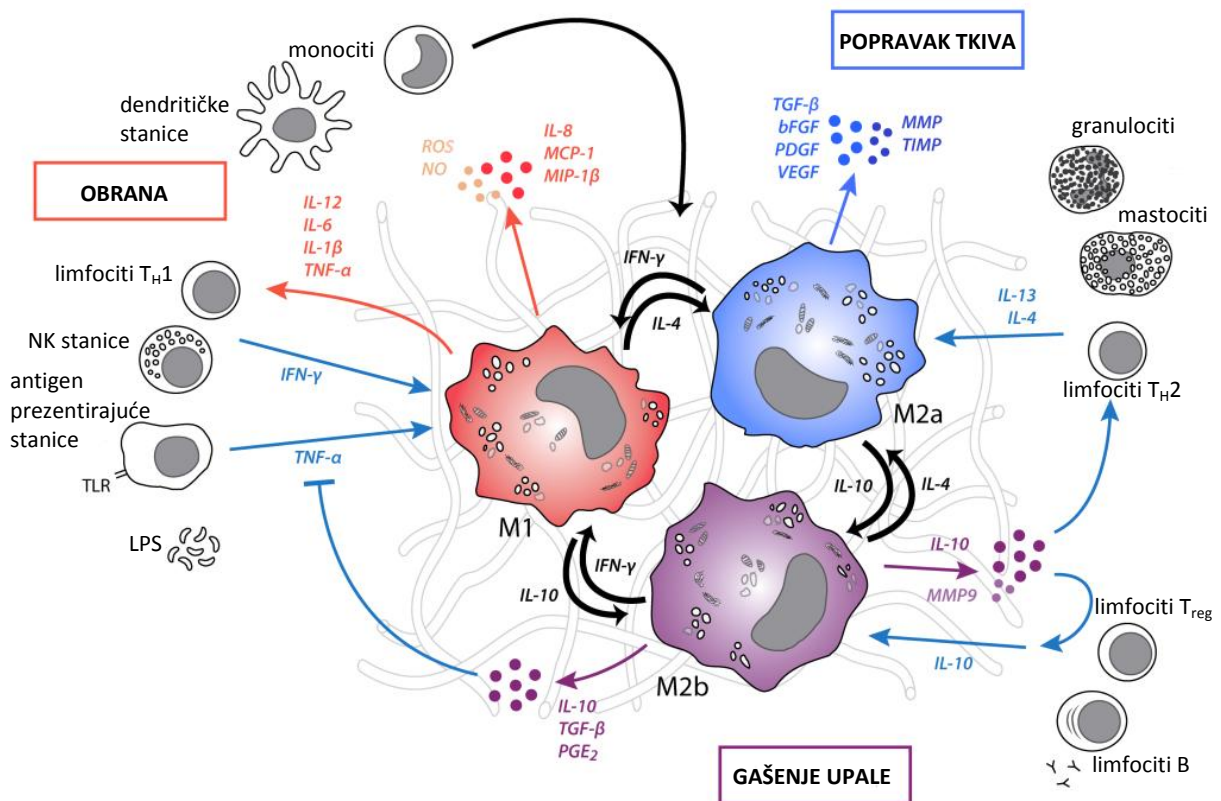
Slika 9. Shematski prikaz prezentacije izvanstaničnih antigena putem molekula MHC klase I i II.

(1) klasični lizosomalni put kojim se izvanstanični peptidni antigeni prezentiraju unutar MHC klase II. (2) proces križne prezentacije koji se u potpunosti odvija u endosomima (bez spajanja s lizosomima), gdje se uneseni antigeni razgrađuju i vežu na MHC molekule klase I. (3) put križne prezentacije u kojem se antigeni iz endosoma prenose u citosol gdje se razgrađuju u peptide te ponovo unose u endosome u kojima se spajaju s MHC I molekulama. (4) proces kojim peptidi iz drugih stanica mogu ući u citosol preko pukotinastih spojeva, nakon čega bivaju uključeni u MHC I put prezentacije. (5) proces *cross-dressinga* – izravno preuzimanje MHC molekula s vezanim antigenim peptidima s drugih stanica. ER = endoplazmatski retikulum, MHC (engl. *major histocompatibility complex*) = glavni kompleks tkivne podudarnosti, TAP (engl. *transporter associated with antigen processing*) = transporter vezan uz procesiranje antigena. Preuzeto i prilagođeno iz Kreer i sur. (2011).

1.5.3. Aktivacija makrofaga

Iz monocita nastali tkivni makrofagi mogu zadobiti različite fenotipove što ovisi o mikrookolišu u kojem se nađu odnosno o tome jesu li migrirali u normalno tkivo ili područje upale (Mantovani i sur. 2004). Klasični tzv. M1 put aktivacije makrofaga dobro je opisan, a pokreće ga aktivacija putem interferona gamma (IFN- γ) u kombinaciji sa sastavnicom bakterijske stijenke gram negativnih bakterija – bakterijskim lipopolisaharidom (LPS). Osim M1 puta postoji i nekoliko alternativnih puteva aktivacije makrofaga (M2; Slika 10) koji su nešto slabije definirani. M2 putevi aktivacije mogu biti potaknuti različitim kombinacijama citokina (IL-4 i IL-13 kod M2a, IL-10 kod M2b i M2c), imunokompleksima i LPS-om (M2b) te glukokortikoidima (M2c). Iako su u početku alternativni putevi aktivacije makrofaga opisivani kao inhibitorni putevi u odnosu na M1, kasnije je pokazano da svaki od njih ima za njega karakteristične posrednike koji se luče kao i posebnu ulogu u organizmu (Mantovani i sur. 2004). Klasično aktivirani M1 makrofagi opisuju se kao proupalni zbog lučenja palete proupalnih citokina (IL-6, IL-12, IL-1 β , TNF- α) te reaktivnih kisikovih vrsta i dušikovog oksida (NO) (van Loon i sur. 2013). Uloga M1 makrofaga primarno je u obrani organizma u slučaju ozlijede i/ili infekcije, unutarstaničnih patogena i tumorskih stanica, a osim toga M1 makrofagi su i snažne antigen prezentirajuće stanice (Mantovani i sur. 2004). Alternativno aktivirani M2 makrofagi zbog lučenja posrednika koji pospješuju angiogenezu (bFGF, VEGF), diobu endotelnih stanica (bFGF) i sintezu sastavnica izvanstaničnog matriksa (TGF- β) djeluju na popravak tkiva (van Loon i sur. 2013). Ipak, kako molekule koje luče mogu potaknuti rast tumora (osim prethodno spomenutih posrednika luče i matriks metaloproteinaze) ovi makrofagi nazivaju se i tumoru pridruženi makrofagi (Murray i Wynn 2011). M2 tip makrofaga ima slabu sposobnost prezentacije antigena, ali eksprimira veliki broj neopsoninskih receptora (npr. manoznih receptora) (Mantovani i sur. 2004). M2a tip makrofaga uključen je i u borbu protiv parazita (npr. nematoda), a zbog aktivacije bazofilnih granulocita uključen je također i u alergijski odgovor. Makrofagi M2b pak imaju ključnu imunoregulacijsku ulogu. Ovaj tip makrofaga lučenjem protuupalnog citokina IL-10 pridonosi smirivanju odnosno gašenju upale te je važan za uspostavljanje homeostaze (Mantovani i sur. 2004).

Na kraju, treba naglasiti da usmjeravanje u određeni put aktivacije ne predstavlja oblik terminalne diferencijacije, te da svi tipovi aktiviranih makrofaga pokazuju veliku plastičnost i mogućnost usmjeravanja u druge tipove aktivacije ovisno o molekulama i stanicama u svom mikrookolišu (Mantovani i sur. 2004).



Slika 10. Shematski prikaz različitih tipova aktivacije makrofaga.

Prikaz M1, M2a i M2b tipova aktivacije makrofaga kao i njihove uloge u organizmu putem lučenja različitih posrednika te međudjelovanja s drugim imunim stanicama. bFGF (engl. *basic fibroblast growth factor*) = bazični čimbenik rasta fibroblasta, IFN- γ = interferon- γ , IL = interleukin, LPS = lipopolisaharid, MCP-1 (engl. *macrophage chemoattractant protein 1*) = makrofagni kemotaksijski protein 1, MIP-1 β (engl. *macrophage inflammatory protein 1 β*) = makrofagni upalni protein 1 β , MMP = matriks metaloproteinaza, NK (engl. *natural killer*) stanice = stanice prirodne ubojice, TGF- β (engl. *transforming growth factor β*) = transformirajući čimbenik rasta β , limfociti T_H1/2 = pomoćnički (engl. *helper*) limfociti T tip 1 i 2, TIMP = tkivni inhibitor metaloproteinaza, TLR (engl. *Toll-like receptor*) = receptor sličan proteinu Toll, TNF- α (engl. *tumor necrosis factor- α*) = čimbenik tumorske nekroze α , limfociti T_{reg} = regulatorni limfociti T, PDGF (engl. *platelet-derived growth factor*) = trombocitni čimbenik rasta, PGE₂ = prostaglandin E2, ROS (engl. *reactive oxygen species*) = reaktivne kisikove vrste, VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) = čimbenik rasta vaskularnog endotela. Preuzeto iz van Loon i sur. (2013).

1.5.3.1. *Aktivirani makrofagi u patološkim stanjima*

S obzirom na uključenost makrofaga u svim fazama upalne reakcije njihova neprimjerena aktivacija može dovesti do niza poremećaja i bolesti (Murray i Wynn 2011). Primjer kako i fiziološko djelovanje makrofaga može utjecati na patološke promjene je uključenost M2 tipa makrofaga u nastanku raka dojke. Naime, ovaj tip makrofaga povezan je s povećanim rizikom od pojave tumora dojke kod žena neposredno nakon prestanka dojenja. Tumori dojke koji se pojave u tom razdoblju često metastaziraju te su povezani s lošijom prognozom, a za njihov nastanak ključni su makrofagi koji inače imaju ulogu u normalnoj involuciji tkiva. Takvo djelovanje M2 makrofaga posljedica je lučenja posrednika koji mogu pospješiti tumorski rast što je pokazano na mišjem modelu i retrospektivnim istraživanjima pacijentica oboljelih od raka dojke (O'Brien i sur. 2010).

Osim s tumorima, disregulacija djelovanja M2 makrofaga povezuje se i s fibrozom tkiva u slučaju njihove pretjerane aktivacije, ali i s nemogućnošću gašenja upalne reakcije u slučaju njihovog manjka (Bosurgi i sur. 2011; Herold i sur. 2011; Murray i Wynn 2011).

Nasuprot M2 tipu, M1 tip makrofaga povezuje s bolestima koje karakterizira kronična upala primjerice aterosklerozom, artritismom i multiplom sklerozom (Murray i Wynn 2011). Kronična upalna stanja posredovana su i održavana dominantno prisutnošću proupalnih makrofaga, a posljedično dovode do oštećenja tkiva (van Loon i sur. 2013).

Zbog velike plastičnosti makrofaga kao mogući pristup liječenju gore navedenih patoloških stanja nameću se modulatori njihove aktivacije. Za neke DPP4 inhibitore osim učinka na regulaciju razine glukoze u krvi pokazani su i drugi povoljni učinci među ostalim i na funkcije makrofaga (Shah i sur. 2011; Matsubara i sur. 2012; Zhao i sur. 2014). Zbog svega navedenog sve se više govori o mogućoj budućoj primjeni inhibitora DPP4 obitelji enzima u liječenju upalnih, krvožilnih i drugih bolesti (Rosenblum i Kozarich 2003; Reinhold i sur. 2009; Yazbeck i sur. 2009; Deacon i Holst 2013; Zhao i sur. 2014).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja su ispitati:

1. ekspresiju DPP9 (novijeg člana obitelji DPP4 enzima) u mišjim hematopoetskim i limfatičnim tkivima kao i u stanicama makrofagnog i limfocitnog porijekla, te ju usporediti s ekspresijom DPP4, glavnog predstavnika DPP4 obitelji.
2. valjanost hipoteze o mogućoj lokalizaciji DPP9 proteina na staničnoj membrani, kao i unutarstaničnoj sublokalizaciji DPP9 proteina u mišjoj modelnoj makrofagnoj liniji J774, te ju poduprijeti mjerenjem odgovarajuće enzimске aktivnosti u pojedinim staničnim frakcijama.
3. valjanost hipoteze o mogućim funkcijama DPP9 u stanicama makrofagnog porijekla, kao što su:
 - povezanost s procesima aktivacije i endocitoze
 - utjecaj na proliferaciju i adheziju stanica.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Primarne stanice hematopoetskog i limfatičnog porijekla

Primarne stanice hematopoetskog i limfatičnog porijekla dobivene su iz slezene, limfnih čvorova i koštane srži, te peritonealnog ispirka miševa. Korišteni su miševi srođenih sojeva BALB/c i C57BL, muškog spola, starosti 6–14 tjedana, uzgojeni u Pogonu laboratorijskih životinja Instituta „Ruđer Bošković“, Zagreb. Navedene primarne stanice izolirane su u aseptičnim uvjetima standardnim postupkom. Obavljanje pokusa na eksperimentalnim životinjama odobreno je u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta „Uloga membranskih peptidaza na tumorskim i normalnim stanicama“ Rješenjem dobivenim od Uprave za veterinarstvo Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva Republike Hrvatske (Klasa: UP/I 322-01/07-01/58, Urbroj: 525-6-07-2 Lj.Z.). Provedeni pokusi bili su u skladu s bioetičkim standardima o provođenju pokusa na eksperimentalnim životinjama te u skladu s osnovama tzv. 3R pristupa.

3.1.2. Stanične linije makrofagnog i limfocitnog porijekla

Za istraživanje mogućih funkcija enzima DPP9 u makrofagima korištene su stanice mišje makrofagne linije J774. Radi se o modelnoj liniji makrofaga koja se koristi za istraživanje funkcija (fagocitoze/endocitoze) (Ralph i Nakoinz 1975; Van Bambeke i sur. 2004), kao i aktivacije makrofaga (Murphy i sur. 2008). Za usporedbu ekspresije DPP4 i DPP9 u makrofagima i limfocitima uz stanice J774 korištene su i stanice mišje stanične linije T limfocitnog porijekla – R1.1. Stanične kulture uzgajane su u RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640; Sigma, kat. br. R0883) mediju s dodatkom 2 mM L-glutamina (Gibco, kat. br. 25030), 50 jedinica/mL penicilina i 50 µg/mL streptomicina (Gibco, kat. br. 15070) te 10%-tnog fetalnog goveđeg seruma (engl. *fetal bovine serum*; FBS; Gibco, kat. br. 10270). Stanice su kultivirane u 25 cm² bočicama za stanične kulture (Sarstedt) i održavane u inkubatoru na 37 °C uz 5% CO₂.

Semi-adherentne stanice J774 rasađivane su u prosjeku dva puta tjedno nakon mehaničkog struganja s podloge. Nasađivano je 1x10⁶ stanica/bočici. Stanicama je medij mijenjan svaki

drugi dan, a po potrebi i češće. Suspenzijske stanice R1.1 razrijeđivane su medijem svaki dan u omjeru 1:3 (do koncentracije od 6×10^5 stanica/mL medija).

3.1.2.1. Priprema uzoraka stanica

Stanice su za potrebe određenih analiza dignute s podloge, odcentrifugirane ($210 \times g$, 6 minuta), te prebačene u manji volumen medija. Iz dobivene suspenzije stanica uzeo se uzorak za brojanje. Nakon brojanja u Neubauerovoj komorici (Brand), broj stanica po mililitru suspenzije izračunat je prema formuli:

$$\text{Koncentracija stanica (br. st./mL)} = \frac{\text{ukupni broj izbrojanih stanica} \times \text{razrijeđenje} \times 10\,000}{\text{broj kvadrata}}$$

Nakon što je izdvojen za određenu metodu potreban broj stanica, stanice su dva puta isprane u fosfatnom puferu s dodatkom Ca^{2+} i Mg^{2+} čime su uzorci bili pripremljeni za daljnji postupak (izolaciju RNA, obilježavanje i mjerenje proteina ili mjerenje enzimске aktivnosti).

3.1.3. Puferi

Uz komercijalno dostupne kemikalije i kompletne različitih proizvođača u nizu metoda korišteni su i u laboratoriju pripremljeni puferi koji se temelje na osnovnom fosfatnom puferu (PBS, engl. *phosphate buffered saline*). Sastav korištenih pufera naveden je u Tablici 2, a kemikalije potrebne za njihovo pripremanje kao i kemikalije potrebne za pripremu ostalih otopina nabavljene su od proizvođača Kemika, Sigma, Merck i Fluka.

Tablica 2. Popis korištenih pufera i njihov sastav.

PUFER	SASTAV
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,2 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 1,8 mM KH_2PO_4 , pH 7,4
PBS sa Ca^{2+} , Mg^{2+}	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 1,5 mM KH_2PO_4 , 0,34 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,25 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, pH 7,4
Pufer A	PBS + 2% formaldehid

PUFER	SASTAV
Pufer B	PBS + 2% FBS, 0,1% Na-azid
Fix-pufer	PBS (FACSFlow *) + 1% formaldehid
Pufer 1	PBS sa Ca ²⁺ , Mg ²⁺ + 5 mM Tris HCl, 300 mM saharoza, pH 7,4
Pufer 2	PBS sa Ca ²⁺ , Mg ²⁺ + 5 mM Tris HCl, pH 7,4
Pufer 3	PBS sa Ca ²⁺ , Mg ²⁺ + 0,5% NP-40

(*nastavak Tablice 2*). PBS (engl. *phosphate buffered saline*) = fosfatni pufer, Tris = tris(hidroksimetil) aminometan. * Becton Dickinson, kat. br. 342003.

3.2. Metodologije i plan istraživanja

3.2.1. Mjerenje transkripcijske ekspresije DPP4 i DPP9

3.2.1.1. Izolacija ukupne RNA

Iz pripremljenih uzoraka primarnih stanica kao i stanica navedenih staničnih linija izolirana je ukupna RNA. Korišten je komercijalno dostupni komplet za izolaciju ukupne RNA (High Pure RNA Isolation Kit; Roche, kat. br. 11828665001) prema uputama proizvođača. Ukupna RNA je izolirana iz 1–1,3x10⁶ stanica J774/uzorku odnosno iz 2–2,5x10⁶ stanica R1.1/uzorku. Broj stanica upotrebljenih za izolaciju ukupne RNA iz tkiva miševa varirao je ovisno o tkivu iz kojih su izolirane. Iz neaktiviranih peritonealnih makrofaga ukupna RNA izolirana je iz 0,3–0,7x10⁶ stanica/uzorku, dok je iz aktiviranih makrofaga ukupna RNA izolirana iz 1,3x10⁶ stanica/uzorku. Nadalje, ukupna RNA izolirana je iz 5x10⁶ stanica slezene/uzorku, iz 4–5x10⁶ stanica limfnih čvorova/uzorku te iz 3x10⁶ stanica koštane srži/uzorku. Svaki uzorak izoliran iz stanica slezene bio je porijeklom iz jedne životinje dok su uzorci limfnih čvorova, koštane srži i peritonealnih makrofaga bili prikupljeni iz više životinja.

3.2.1.2. Mjerenje koncentracije i čistoće RNA

Koncentracija (ng/μL) i čistoća (OD₂₆₀/OD₂₈₀) izolirane RNA mjerena je na spektrofotometru BioSpec-nano (Shimadzu Biotech) nanošenjem 2 μL uzorka izolirane ukupne RNA.

3.2.1.3. Reverzna transkripcija

Za reakciju reverzne transkripcije korišten je komercijalno dostupni komplet za reverznu transkripciju (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Applied Biosystems, kat. br. 4374966). Reakcijska smjesa je sadržavala 0,4 µg ukupne RNA u volumenu od 10 µL te dodanu mješavinu od: 2 µL pufera za reverznu transkripciju, 0,8 µL mješavine dNTP (100 mM), 2 µL smjese nasumičnih početnica, 1 µL MultiScribe RT (reverzna transkriptaza; 50 U/µL), 1 µL inhibitora RNaza te 3,2 µL H₂O bez nukleaza. Sama reakcija provodila se prema uputama proizvođača u uređaju GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) uz uvjete navedene u Tablici 3.

Tablica 3. Uvjeti odvijanja reakcije reverzne transkripcije.

	Sparivanje početnica	Produljenje lanca	Inaktivacija enzima RT	Hlađenje
Temperatura	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Vrijeme	10 min	120 min	5 s	∞

RT = reverzna transkriptaza.

3.2.1.4. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR)

Ekspresija ciljnih gena (DPP4, DPP9) u izoliranim uzorcima RNA određena je koristeći metodu lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR, prema engl. *real-time polymerase chain reaction*). Pri tome su korištene komercijalno dostupne predizajnirane početnice i probe za mišje DPP4 i DPP9 (TaqMan Gene Expression Assays; Applied Biosystems, Mm00494549_m1 i Mm00841122_m1). Ubikvitin C (UbC; Mm01201237_m1) korišten je kao referentni gen za normalizaciju uzoraka. Ukupni volumen reakcijske smjese bio je 10 µL, a sadržavao je 1 µL pripremljene cDNA, 5 µL reagensa TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, kat. br. 4304437) i 0,5 µL odgovarajućih početnica i proba. Reakcija se odvijala u uređaju 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) pri uvjetima navedenim u Tablici 4. Dobiveni rezultati analizirani su u programu 7300 System Software (Applied Biosystems). Za određivanje relativne mRNA ekspresije korištena je komparativna C_t metoda, gdje C_t (engl. *threshold cycle*) označava ciklus pri kojem količina umnoženog PCR

produkta dosegne određeni prag. Ekspresija ciljnih gena izražavana je kao ΔC_t vrijednost (razlika ciljnog i referentnog gena). Promjena transkripcijske ekspresije izražavana je kao relativna ekspresija (engl. *fold change*) u odnosu na kontrolni uzorak prema formuli $2^{-\Delta\Delta C_t}$ gdje je $\Delta\Delta C_t$ razlika ΔC_t vrijednosti promatranog i kontrolnog uzorka.

Tablica 4. Uvjeti odvijanja lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu.

	Predinkubacija	Aktivacija polimeraze	40 ciklusa PCR	
			denaturacija	sparivanje/produljenje
Temperatura	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Vrijeme	2 min	10 min	15 s	1 min

PCR (engl. *polymerase chain reaction*) = lančana reakcija polimerazom.

3.2.2. Mjerenje ekspresije DPP9 proteina

Za mjerenje ekspresije DPP9 na proteinskoj razini korištena je metoda protočne citometrije i komercijalno dostupno primarno protutijelo na DPP9 (neobilježeno poliklonalno protutijelo porijeklom iz kunića; Abcam, ab42080), koje prepoznaje katalitičku domenu mišje DPP9, te sekundarno protutijelo obilježeno fluoroforom Alexa 488 (anti-kunić-IgG protutijelo konjugirano s Alexa Flour 488, porijeklom iz koze; Molecular probes, kat. br. A11008). Za određivanje DPP9 proteina primjenjeno je membransko i unutarstanično obilježavanje stanica. Obilježavanje proteina na staničnoj membrani provedeno je na vitalnim stanicama, a unutarstanično na fiksiranim stanicama nakon permeabilizacije saponinom. Kao izotipska kontrola korištena je ukupna imunoglobulinska frakcija iz seruma kunića (DakoCytomation, kat. br. X0936). Uzorci su mjereni na aparatu FACSCalibur (Becton Dickinson). Mjerena je zelena floescencija na kanalu FL-1, te je analizirano 10 000 stanica po uzorku. Rezultati su prikazani kao vrijednosti srednjeg intenziteta fluorescencije (MFI; engl. *mean fluorescence intensity*) dobivene s protutijelom na DPP9, nakon oduzimanja vrijednosti MFI dobivene korištenjem izotipske kontrole. Rezultati mjerenja dalje su analizirani u programima Cell Quest (Becton Dickinson Software) i WinMDI 2.8 (dizajnirao J. Trotter, 1993–1998).

3.2.2.1. Unutarstanično obilježavanje DPP9 proteina

Svaki uzorak stanica bio je razdijeljen u dvije epruvete (BD Falcon, kat. br. 352052) koje su sadržavale $0,5 \times 10^6$ stanica u 40 μL PBS-a. Stanice su prvo fiksirane sa 150 μL pufera A (Tablica 2) te inkubirane 30 minuta na 4 °C. Ovako fiksirane stanice bilo je moguće pohraniti na 4 °C te kasnije nastaviti s postupkom obilježavanja od idućeg koraka. Fiksirane stanice su u nastavku postupka isprane dodavanjem 1 mL pufera B (Tablica 2), te centrifugirane (6 minuta na 210 x g). Supernatant je dekantiran, a talog resuspendiran u 2 mL 0,2% saponina (u PBS-u) te inkubiran 15 minuta na 37 °C u vodenoj kupelji. Nakon te inkubacije u epruvete je dodano po 2 mL pufera B te su ponovo centrifugirane. Na talog stanica dodana su protutijela: u jedan uzorak je dodano protutijelo na DPP9, a u drugi izotipska kontrola oba u količini od 1,5 μg /uzorku. Nakon 60 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, višak protutijela je uklonjen ispiranjem stanica s 2 mL otopine saponina. Na talog stanica je dodano sekundarno protutijelo obilježeno s Alexa Fluor 488 (0,5 μg u 10 μl u PBS-a) te inkubirano 60 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Po isteku inkubacije uzorci su dva puta isprani s 1 mL 0,2% saponina te fiksirani u 400 μL fix-puferu (Tablica 2). Uzorci su zatim prebačeni na led, zaštićeni od svjetla te u roku od dva sata izmjereni na protočnom citometru.

3.2.2.2. Obilježavanje DPP9 proteina na staničnoj membrani

Uzorak stanica raspodijeljen je u dvije epruvete i to u svaku po $0,5 \times 10^6$ stanica u 40 μL 2% BSA (engl. *bovine serum albumine* – albumin govedeg seruma; u PBS-u sa Ca^{2+} , Mg^{2+}). Da bi se izbjeglo nespecifično membransko vezanje protutijela putem Fc-receptora, Fc- γ receptori blokirani su specifičnim protutijelima (Mouse BD Fc Block; BD Pharmingen, kat. br. 553142; 1 μg po uzorku, 30 minuta na 4 °C). Potom je u jedan uzorak dodano protutijelo na DPP9, a u drugi izotipska kontrola jednako kao u postupku za unutarstanično obilježavanje DPP9 proteina. Nakon 60 minuta inkubacije na 4 °C, višak protutijela je uklonjen ispiranjem stanica s 2 mL 2% BSA u PBS-u. Na talog stanica je potom dodano sekundarno protutijelo obilježeno s Alexa Fluor 488 (0,5 μg u 10 μl 2% BSA) te inkubirano 60 minuta na 4 °C u mraku. Po isteku inkubacije uzorci su dva puta isprani s 1 mL 2% BSA te fiksirani u 400 μL fix-puferu. Uzorci su zatim do mjerenja na protočnom citometru držani u mraku na 4 °C.

3.2.3. Određivanje lokalizacije DPP9 proteina – imunocitokemijska analiza

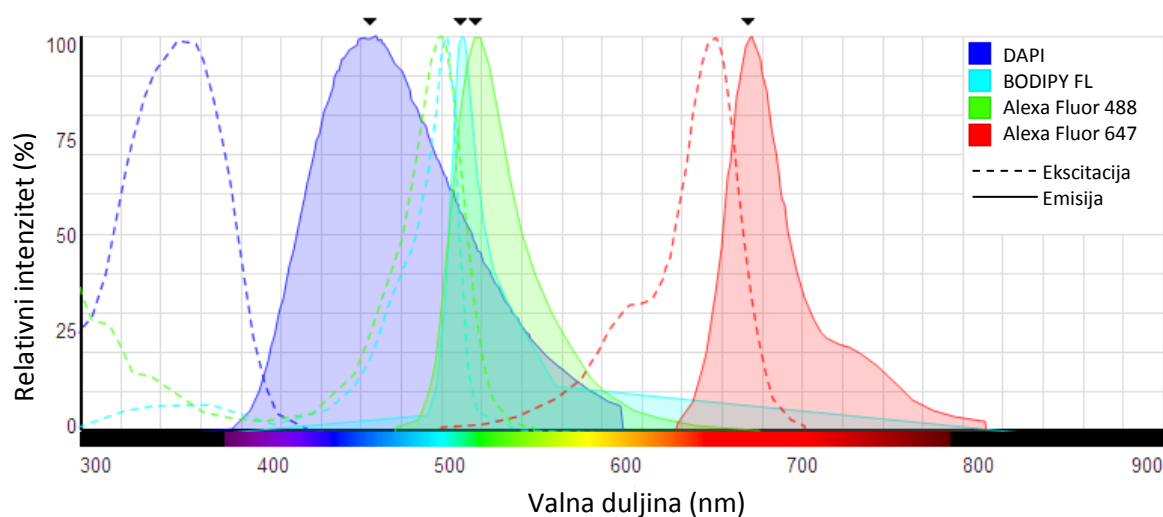
Lokalizacija DPP9 (na staničnoj membrani vs unutarstanična), kao i unutarstanična sublokalizacija u stanicama J774 linije analizirana je na konfokalnom mikroskopu (TCS SP2 AOBIS; Leica Microsystems). Pri tome je korišteno obilježavanje stanica u suspenziji, kao i obilježavanje stanica koje su adherirale na staklo. Za detekciju DPP9 proteina korištena su sekundarna protutijela obilježena fluoroformima Alexa 488 ili Alexa 647 (anti-kunić-IgG protutijelo konjugirano s Alexa Flour 647, porijeklom iz koze; Molecular probes, kat. br. A21244).

Stanice bojane u suspenziji (postupkom kao za obilježavanje DPP9 za protočnu citometriju) su nakon zadnjeg koraka fiksiranja odcentrifugirane te je na talog dodano 8 μ L medija za uklapanje (Mounting Medium with DAPI /4',6-diamidino-2-fenilindol/; Vector Laboratories, kat. br. H-1200). Potom je 4 μ L stanične suspenzije stavljeno na predmetno staklo (Thermo Scientific) te prekriveno okruglom pokrovnicom (Marienfeld GmbH & Co. KG). Nakon uklanjanja viška medija za uklapanje, rubovi pokrovnice su zalakirani na predmetno staklo. Uzorci su do mikroskopiranja držani u mraku na 4 °C.

Za *in situ* obilježavanje stanice su dva dana ranije nasađene na okrugle pokrovnice stavljene u pločicu s 24 bunarića (5×10^4 stanica/pokrovnici u 2 mL medija). Za svaki uzorak stanica predviđene su dvije pokrovnice: za obilježavanje s protutijelom na DPP9 i za obilježavanje s pripadajućom izotipskom kontrolom. Stanice su s protutijelima inkubirane na način da je pokrovnica sa stanicama pincetom stavljena (stranom na kojoj su stanice prema dolje) na kapljicu razrijeđenog protutijela nanešenog na komadić parafilma. Nakon inkubacije nevezano protutijelo je isprano na način da je pokrovnica sa stanicama pincetom prenešena u bunarić pločice (stranom na kojoj su stanice prema gore) i ispirana dodavanjem i uklanjanjem otopine 0,2% saponina. Sam postupak obilježavanja je bio sličan bojanju stanica u suspenziji, uz razliku što su prilagođeni volumeni potrebni da se u potpunosti prekriju stanice na pokrovnici (50 μ L) kao i volumeni potrebni za ispiranje stanica na pokrovnici u pločici s 24 bunarića (maksimalno 1 mL). Stanice na pokrovnicama u pločici prvo su fiksirane dodavanjem 150 μ L pufera A (inkubacija 30 minuta na sobnoj temperaturi da se stanice ne bi odlijepile). Nakon fiksacije pufer A je uklonjen i bunarići su isprani s 1 mL pufera B. Nakon

toga je dodano po 1 mL 0,2% saponina te je pločica sa stanicama inkubirana u kupelji 15 minuta na 37 °C. Po isteku inkubacije otopina saponina je uklonjena i bunarići su isprani s 1 mL pufera B. Slijedila je inkubacija s primarnim protutijelom/izotipskom kontrolom (1,5 µg/50 µL 2% BSA) nanešenim na parafilm, 60 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon te inkubacije stakalca sa stanicama su isprana dva puta s 1 mL 0,2% saponina. Stanice su zatim inkubirane sa fluorescentno obilježenim sekundarnim protutijelom (1 µg/50 µL 2% BSA). Po isteku inkubacije od 60 minuta na sobnoj temperaturi stanice su dva puta isprane s 1 mL otopine saponina te fiksirane s 200 µL fix-pufera. Nakon inkubacije od 30 minuta pri sobnoj temperaturi, a neposredno prije uklapanja na predmetno staklo stanice su isprane s 1 mL ddH₂O. Na kraju postupka obilježavanja jezgre stanica su obojane stavljanjem pokrovnice sa stanicama na 5 µL medija za uklapanje s dodatkom DAPI. Pokrovnica je lakiranjem fiksirana na predmetno staklo i uzorci su time bili spremni za mikroskopiranje.

Ekscitacijski i emisijski spektri svih korištenih fluorofora prema kojima su namješteni laser za pobudu fluorescencije kao i filteri na konfokalnom mikroskopu prikazani su na Slici 11.



Slika 11. Ekscitacijski i emisijski spektri fluorofora.

Prikaz je napravljen korištenjem alata Fluorescence SpectraViewer (<http://www.lifetechnologies.com/hr/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>). DAPI = 4',6-diamidino-2-fenilindol.

Svako odabrano vidno polje snimano je dva puta: (1) uz istovremenu ekscitaciju plave (DAPI) i crvene (Alexa Fluor 647) svjetlosti, (2) te potom uz ekscitaciju zelene svjetlosti (Alexa Fluor 488, odnosno BODIPY FL). Snimke staničnih presjeka snimljenih na konfokalnom mikroskopu

dalje su obrađene i preklopljene korištenjem programa Adobe Photoshop Elements 7.0 (Adobe).

3.2.4. Mjerenje enzimske aktivnosti slične DPP4

Enzimi DPP4, DPP8 kao i DPP9 preklapaju se u svojoj supstratnoj specifičnosti, te je njihov pojedinačni doprinos u slučaju koekspresije nemoguće razlikovati bez specifičnih inhibitora. Stoga je uveden pojam enzimske aktivnosti slične DPP4. Za određivanje enzimske aktivnosti slične DPP4, korišten je sintetski supstrat Gly-Pro- β NA (Bachem, kat. br. K-1335) čijim cijepanjem nastaje produkt koji dodatkom boje Fast Blue (Fast Blue B Salt; Sigma, kat. br. D-3502) daje obojenje koje se može mjeriti kolorimetrijski. Enzimska aktivnost slična DPP4 mjerena je u staničnim lizatima kao i u pojedinim staničnim frakcijama.

3.2.4.1. Priprema lizata stanica

U pripremi staničnog lizata korišten je omjer od 3×10^5 stanica/50 μ L pufera za lizu. Na talog stanica u mikroepreveti dodan je potrebni volumen 0,1% Tritona X-100 (u PBS-u sa Ca^{2+} , Mg^{2+}) uzorak je potom promiješan 5 sekundi na vrtložnoj mješalici, te inkubiran 30 minuta na ledu. Nakon isteka inkubacije uzorak je još jednom promiješan na mješalici, nakon čega je slijedilo homogeniziranje pomoću sonikatora Labsonic M (B. Braun Biotech International) 3x20 sekundi (uz korištenje sonde promjera 1 mm i amplitudu namještenu na 80%). Tako pripremljeni uzorci su zatim centrifugirani 20 minuta na 14 000 x g kako bi se dobili bistri supernatanti (stanični lizati) koji su potom prebačeni u nove epruvete. Koncentracije proteina u različitim uzorcima staničnih lizata su potom ujednačene na osnovi mjerenja ukupnih proteina.

3.2.4.2. Mjerenje koncentracije proteina u lizatu stanica

Koncentracija proteina mjerena je korištenjem kompleta za mjerenje koncentracije proteina (Pierce BCA Protein Assay Kit; Thermo Scientific, kat. br. 23227) koji se temelji na biuret reakciji (redukciji bakrovih iona Cu^{2+} u Cu^+ u lužnatom mediju). Nastali reducirani bakrovi

ioni reagiraju sa sastojkom kompleta bicinkoniničnom kiselinom (engl. *bicinchoninic acid*; BCA) dajući ljubičasto obojenje koje se može mjeriti kolorimetrijski.

Reakcija je provedena u mikrotitarskim pločicama s 96 bunarića (Falcon), a svi uzorci su na pločicu nanošeni u duplikatu u volumenu od 10 μL . Kao slijepa proba služila je redestilirana voda (ddH_2O). Na pločicu su zatim nakapavani standardi (otopine goveđeg serumskog albumina u koncentracijama od 125, 250, 500, 750, 1000 i 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) i uzorci staničnih lizata (tri puta razrijeđeni u ddH_2O). Na sve uzorke u pločici je zatim nakapano 200 μL pripremljene mješavine radnog reagensa. Mješavina radnog reagensa je pripremljena iz sastojaka kompleta dodavanjem reagensa B u reagens A u omjeru 1:50. Pločica s uzorcima je nakon toga mješana 1 minutu, te inkubirana 30 minuta u vodenoj kupelji na 37 °C. Nakon isteka inkubacije vrijednosti apsorbancije pri 570 nm očitane su na čitaču mikrotitarskih pločica (MultiskanMS, Labsystems). Apsorbancija slijepa probe oduzela se od apsorbancije mjerenog uzorka. Koncentracija proteina u mjerenom uzorku staničnog lizata izračunata je iz krivulje ovisnosti apsorbancije standarda o njihovoj koncentraciji.

3.2.4.3. Priprema frakcija staničnog lizata

U svrhu lokalizacije enzimske aktivnosti, enzimska aktivnost je određena i u pojedinim staničnim frakcijama. Stanično frakcioniranje provedeno je na dva načina koji se razlikuju nakon zajedničkih početnih koraka: postupkom frakcioniranja prema Wrenger i sur. (2006; frakcioniranje nastavljeno slijedeći Postupak 1 na Slici 12) i modificiranim postupkom koji uključuje korištenje ultracentrifuge (Optima XL-100K, Beckman Coulter) za dodatno taloženje membrana (prikazano u Postupku 2 na Slici 12).

U pripremi uzorka za izolaciju pojedinih staničnih frakcija omjer stanica i pufera za homogenizaciju bio je $7,5 \times 10^5$ stanica/50 μL pufera. Konačni volumeni svih frakcija bili su jednaki, a sastav pufera korištenih za njihovo izdvajanje (Puferi 1, 2 i 3) naveden je u Tablici 2. Sve izdvojene frakcije su do postupka mjerenja enzimske aktivnosti držane na ledu.

1. soniciranje uzorka stanica 3x5 s u homogenizacijskom puferu (Pufer 1), na ledu

2. centrifugiranje uzorka 10 min na 1000 x g, na 4 °C

 **SUPERNATANT 1** = stanični lizat

 **TALOG 1** = jezgre i nelizirane stanice

3. centrifugiranje **SUPERNATANTA 1** 30 min na 16 000 x g, na 4 °C

 **SUPERNATANT 2**

 **TALOG 2**

4. resuspendiranje **TALOGA 2** u hipotoničnom homogenizacijskom puferu (Pufer 2),
inkubacija 30 min na ledu (da bi se oslobodio sadržaj istaloženih vezikula/organela)



POSTUPAK 1

 **SUPERNATANT 2** = **CITOPLAZMA**

5. centrifugiranje liziranog uzorka (otopljeni **TALOG 2**)
45 min na 16 000 x g, na 4 °C

 **SUPERNATANT 3** = **SADRŽAJ VEZIKULA/ORGANELA**

 **TALOG 3** = **UKUPNE STANIČNE MEMBRANE**

6. otapanje **TALOGA 3** u 0,5% NP-40 (Pufer 3)



POSTUPAK 2

5. centrifugiranje oba uzorka (**SUPERNATANT 2** i otopljeni **TALOG 2**) 60 min na 100 000 x g, na 4 °C (ultracentrifuga)

 **SUPERNATANT 3** = **CITOPLAZMA**

 **SUPERNATANT 4** = **SADRŽAJ VEZIKULA/ORGANELA**

 **TALOZI 3 + 4** = **UKUPNE STANIČNE MEMBRANE**

6. otapanje **TALOGA 3 i 4** u 0,5% NP-40 i njihovo spajanje

Slika 12. Shematski prikaz dvaju korištenih postupaka izdvajanja staničnih frakcija.

3.2.4.4. Mjerenje enzimske aktivnosti slične DPP4

Za mjerenje enzimske aktivnosti korišteni su uvijek svježije pripremljeni uzorci staničnih lizata/frakcija zbog mogućeg gubitka enzimske aktivnosti smrzavanjem. Svi uzorci su mjereni u triplikatima. Za svaki uzorak staničnog lizata/frakcije na jedan triplikat uzoraka je dodan supstrat, dok je na drugi triplikat uzoraka dodan samo PBS (sa Ca^{2+} , Mg^{2+}) kako bi se izmjerilo pozadinsko bojanje samog uzorka. Nakon što je u bunariće stavljeno po 50 μL staničnog lizata/frakcije, odnosno za slijepu probu odgovarajućeg pufera u kojem je uzorak

lizata/frakcije bio pripremljen, pločica je inkubirana 5 minuta na 37 °C u vodenoj kupelji. Potom je na uzorke je dodano po 50 µL supstrata tako da je konačna koncentracija supstrata u bunariću bila 1 mM. Na uzorke na koje nije dodan supstrat dodano je 50 µL PBS-a. Pločica je zatim inkubirana 60 minuta u vodenoj kupelji (na 37 °C). Po isteku inkubacije pločica je stavljena na led i u sve je bunariće dodano po 150 µL na ledu ohlađenog PBS-a. Nakon toga pločica je centrifugirana 6 minuta na 210 x g, nakon čega je po 200 µL supernatanta iz svakog bunarića prebačeno u bunarić na novoj mikrotitarskoj pločici. Na sve uzorke u novoj pločici je zatim dodano po 40 µL boje Fast Blue (0,15% otopina boje u acatnom puferu /2M CH₃COONa + 10% Tween 20 u ddH₂O, pH 4,4/), nakon čega je slijedila inkubacija 10 minuta na sobnoj temperaturi. Po isteku inkubacije na čitaču pločica izmjerena je apsorbancija pri 540 nm. Apsorbancija slijepe probe oduzela se od apsorbancije mjenjenog uzorka.

3.2.4.5. *Inhibicija enzimske aktivnosti slične DPP4*

Korištenjem DPP4 inhibitora sitagliptina (Sigma, kat. br. S8576) u diskriminacijskim koncentracijama, pokušalo se zaključiti o prirodi enzima u pojedinim izoliranim staničnim frakcijama. U tu svrhu iskorišten je podatak da je IC₅₀ vrijednost za DPP4 18 nM, dok je za ostale DPP oko 5000 puta viša (Kirby i sur. 2010). Niža koncentracija sitagliptina (0,5 µM) korištena je za selektivnu inhibiciju DPP4, dok je viša koncentracija inhibitora (500 µM) korištena za inhibiciju ostalih DPP (DPP9/DPP8).

U slučaju korištenja inhibitora postupak mjerenja enzimske aktivnosti razlikovao se u koraku koji je prethodio dodatku supstrata. To je bila predinkubacija s 25 µL inhibitora odgovarajuće koncentracije (PBS-a u netretiranim uzorcima). Nakon predinkubacije od 20 minuta na sobnoj temperaturi dodan je supstrat u volumenu od 25 µL nakon čega je slijedio uobičajeni postupak.

3.2.5. **Poticanje endocitoze u stanicama makrofagne linije J774**

Endocitoza u makrofagima J774 inducirana je pomoću ovalbumina. Ovalbumin obilježen flouorom BODIPY FL (DQ-OVA; Molecular Probes, kat. br. D-12053) nakon cijepanja u

endosomima počinje fluorescirati u zelenom dijelu spektra, te tako omogućava vizualizaciju endocitoznih vezikula na konfokalnom mikroskopu. Korišteni flouorfor je neosjetljiv na pH i posebno je dizajniran u svrhu proučavanja procesiranja i prezentacije antigena.

3.2.5.1. Praćenje lokalizacije endocitiranog ovalbumina i DPP9 proteina

Koristeći metodu inducirane endocitoze, ispitana je moguća promjena lokalizacije DPP9, kao i moguća kolokalizacija DPP9 i DQ-OVA. U tu svrhu vitalne stanice su izložene DQ-OVA radi poticanja endocitoze. Stanice su za ovaj postupak prethodno nasađene na pokrovnice jednako kao za postupak *in situ* obilježavanja DPP9 proteina. Tretman s DQ-OVA rađen je na način da su stanice na pokrovnici inkubirane s 50 μ L medija s dodatkom DQ-OVA (5 μ g/uzorku). Netretirane stanice inkubirane su s 50 μ L samog medija. Po isteku 60 minutne inkubacije na 37 °C (u kupelji u mraku) pokrovnice sa stanicama su prebačene u pločicu i isprane s 1 mL 2% BSA. Stanice su potom fiksirane sa 150 μ L pufera A te je u njima imunocitokemijski fluorescentno obilježen DPP9 protein koristeći već opisani postupak *in situ* obilježavanja. Promjena lokalizacije DPP9 inducirana s DQ-OVA, kao i njihova moguća kolokalizacija, praćena je potom na konfokalnom mikroskopu. Ekscitacijski i emisijski spektar flouorfora DQ-OVA (BODIPY FL) prikazan je na Slici 11. Budući da BODIPY FL flouescira u zelenom dijelu spektra za detekciju DPP9 proteina korišteno je sekundarno protutijelo obilježeno s Alexa Fluor 647 koji fluorescira u crvenom dijelu spektra.

3.2.6. Aktivacija makrofaga

3.2.6.1. Aktivacija peritonealnih makrofaga *in vivo*

Nakon utvrđivanja ekspresije i lokalizacije DPP9 u stanicama J774 ispitan je i mogući utjecaj aktivacije makrofaga na ekspresiju DPP9. Za *in vivo* aktivaciju peritonealnih makrofaga korišten je glikogen. Peritonealni ispirak koji sadrži aktivirane makrofage sakupljen je pet dana nakon intraperitonealne (i/p) injekcije 0,5 mL 0,12% otopine glikogena (Merck). Kontrolni ispirak sakupljen je iz miševa koji nisu bili injicirani glikogenom. Peritonealne stanice prikupljene su standardnim postupkom, a za samo ispiranje peritoneuma korišteno je 5 mL RPMI medija s dodatkom heparina (Krka; 1 i. j./1 mL medija) injiciranog u trbušnu

šupljinu miša. Nakon masiranja trbuha miša, iglom je izvučen ispirak stanica te prebačen u epruvetu. Stanice prikupljene na ovaj način su dva puta isprane sa sterilnim PBS-om te resuspendirane u mediju i nasađene u 25 cm² bočice za stanične kulture. Za kultiviranje izoliranih stanica korišten je medij s dodatkom 1% otopine antibiotika-antimikotika (Anti-Anti; Gibco, kat. br. 15240) kako bi se spriječila kontaminacija stanica u toku kultivacije. Stanice su ostavljene da adheriraju na plastičnoj podlozi na 37 °C, kako bi se populacija stanica obogatila adherentnim makrofagima. Nakon adherencije na 37 °C koja je bila potrebna da prema morfološkim kriterijima preko 90% stanične populacije budu makrofagi (dva sata za aktivirane odnosno sedam dana za neaktivirane) iz pročišćenih populacija aktiviranih i neaktiviranih makrofaga izolirana je potom ukupna RNA i pomoću metode lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu odredila ekspresija DPP9 mRNA.

3.2.6.2. Aktivacija stanica makrofagne linije J774 *in vitro*

Za *in vitro* aktivaciju makrofagne linije J774 korišteni su poznati aktivatori interferon-gamma (mišji rekombinantni IFN- γ ; Sigma, kat. br. I-4777) i bakterijski lipopolisaharid (LPS; Sigma, L-4391) pojedinačno, i u kombinaciji. Stanice su nasađivane u pločice za stanične kulture sa 6 bunarića (TPP) u 5 mL medija u gustoći koja je ovisila o duljini tretmana. Za 24, 48 i 72 satne tretmane to su bile redom gustoće od 1×10^6 , $0,5 \times 10^6$ i $0,3 \times 10^6$ stanica/bunariću. Nakon nasađivanja stanice su inkubirane 30 minuta na 37 °C kako bi se prilijepile za podlogu. Nakon toga dodavani su IFN- γ i LPS pojedinačno ili u kombinaciji u količinama potrebnim da bi se dobile željene konačne koncentracije (navedene u poglavlju Rezultati). Na netretirane stanice dodan je samo medij. Stanice su dalje kultivirane u inkubatoru na 37 °C, a za vrijeme trajanja tretmana medij nije bio mijenjan.

3.2.7. Utišavanje DPP9 gena u J774 stanicama

Za daljnje istraživanje uloge DPP9 u makrofagima primjenjena je metoda utišavanja DPP9 gena. Za utišavanje DPP9 gena korištena je metoda lipofekcije pomoću reagensa Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, kat. br. 13778; posebno namijenjenog za metodu utišavanja gena) i komercijalno dostupna predizajnirana siRNA (engl. *small interfering RNA*; mala interferirajuća RNA) za mišju DPP9 (Silencer Select siRNA; Ambion, s104973). Kao

negativna kontrola samog postupka utišavanja korištena je odgovarajuća siRNA negativna kontrola istog proizvođača (Silencer Select Negative Control #1 siRNA; kat. br. 4390843).

Prvo je bilo potrebno odrediti optimalnu količinu transfekcijskog reagensa i siRNA, optimalnu gustoću stanica u vrijeme transfekcije kao i odrediti najučinkovitiji postupak transfekcije. Daljnjim pokusima ispitano je vrijeme potrebno za maksimalno utišavanje na mRNA i proteinskoj razini. Mjera učinkovitosti utišavanja DPP9 gena utvrđena je na mRNA i proteinskoj razini koristeći prethodno opisanu metodologiju.

Za utišavanje DPP9 gena u stanicama J774 odabran je takozvani „*forward protokol*“ u kojem se stanice nasade dan prije samog tretmana za utišavanje. Utišavanje je rađeno u pločicama sa 6 bunarića u ukupnom volumenu medija od 3 mL. Stanice su nasađene u RPMI mediju s dodatkom L-glutamina i seruma, ali bez dodatka antibiotika (4×10^5 stanica/bunariću u 2,5 mL medija). Idući dan neposredno prije tretmana, stanicama je promjenjen medij. Otopine siRNA odgovarajućih koncentracija (konačne koncentracije 100 nM; 300 pmola/uzorku) kao i otopina odgovarajuće količine Lipofectamina (5 μ L/uzorku) pripremljene su razrijeđivanjem u 250 μ L medija Opti-MEM I (Gibco, kat. br. 31985). Kompleksi lipofekcijskog reagensa i odgovarajuće siRNA pripremljeni su mješanjem pojedinačno pripremljenih otopina, te su nakon 15 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi nakapani na stanice. Na netretirane stanice nakapan je Opti-MEM. Pločica sa stanicama promješana je laganim naginganjem naprijed-natrag te inkubirana na 37 °C do idućeg dana. Idući dan stanicama se mogao promijeniti medij odnosno staviti medij s dodatkom antibiotika. Stanice su dalje kultivirane uz svakodnevnu promjenu medija te dizane s podloge i korištene za analize po potrebi.

3.2.8. Funkcionalni testovi nakon utišavanja DPP9 u J774 stanicama

3.2.8.1. Test proliferacije

Proliferacijski potencijal J774 nakon utišavanja DPP9 gena ispitan je pomoću ^3H -timidinskog testa, koji se temelji na mjerenju ugradnje radioaktivnog timidina u DNA stanica u diobi. Za potrebe timidinskog testa stanice su nasađene u pločice s 96 bunarića (5×10^4 stanica/bunariću u 200 μ L medija). Za svaki uzorak nasađeno je 6 bunarića. Stanice su 22

sata inkubirane s radioaktivnim timidinom ($[6\text{-}^3\text{H}]\text{Thymidine}$; Amersham Pharmacia Biotech, kat. br. TRK61; $0,25\ \mu\text{Ci}/10\ \mu\text{L}$ po bunariću). Po isteku inkubacije stanice su isprane u sustavu za ispiranje stanica (Cell Harvester, Skatron) i prebačene na diskove filter papira od staklenih mikrovlakana (Skatron). Na osušene diskove dodano je po $1\ \text{mL}$ scintilacijske tekućine ($0,5\%$ 2,5-difeniloksazol, $0,03\%$ 1,4-bis(2-(4-metil-5-fenil)oksazolil)benzen u toluenu). Ugradnja radioaktivnog timidina u uzorcima je zatim mjerena na scintilacijskom β -brojaču (Beckman LS600 liquid scintillator counter, Beckman Instruments).

3.2.8.2. Test adhezije

Promjena adhezijskih svojstava J774 makrofaga nakon utišavanja DPP9 gena ispitana je prateći moguće promjene na adheziju na kolagen tipa IV (Sigma).

Svaki uzorak stanica nasađen je na tri različite podloge: kolagen tipa IV (+ denaturirani BSA), denaturirani BSA i netretiranu plastiku. Adhezija je ispitivana u pločicama s 96 bunarića, a svaki uzorak je bio mjeran u triplikatu. U bunariće je prvo nakapano $100\ \mu\text{L}$ otopine kolagena ($0,04\ \text{mg}/\text{mL}$ u PBS-u sa Ca^{2+} , Mg^{2+}) i ostavljeno u inkubatoru dva sata na $37\ ^\circ\text{C}$. Nakon toga otopina kolagena je uklonjena, a u pločicu je zatim dodano po $200\ \mu\text{L}$ otopine 1% denaturiranog BSA (u PBS-u, denaturiranog 10 minuta na $80\ ^\circ\text{C}$). Nakon isteka inkubacije od 60 minuta pri $37\ ^\circ\text{C}$ otopina je uklonjena, a bunarići su isprani dva puta s po $200\ \mu\text{L}$ PBS-a. U bunariće je zatim dodano $100\ \mu\text{L}$ suspenzije stanica koncentracije 8×10^5 stanica/mL. Stanice su nasađene u mediju bez seruma osim ako nije naznačeno drugačije. Kao slijepa proba (za svaku pojedinu podlogu) korišten je medij upotrebljen za nasađivanje stanica. Kao pozitivna kontrola postupka adhezije korišteni su ljudski dermalni fibroblasti uzgajani u DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium; Sigma, kat. br. D5648) mediju s dodatkom $2\ \text{mM}$ L-glutamina, 50 jedinica/mL penicilina, $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ streptomicina i 10% -tnog fetalnog goveđeg seruma. Nakon nasađivanja pločica sa stanicama stavljena na 90 minuta u inkubator. Nakon 90 minuta adhezije stanice su slikane na invertnom mikroskopu (ID 03 Invertoskop, Zeiss) koristeći fotoaparat Cyber-shot DSC-W1 (Sony), nakon čega je slijedilo uklanjanje nevezanih stanica te ispiranje PBS-om dva puta. Zalijepljene stanice su zatim fiksirane sa $100\ \mu\text{L}$ apsolutnog etanola (inkubacija 15 minuta na $37\ ^\circ\text{C}$ u inkubatoru), te su svi uzorci još dva puta isprani s PBS-om. Nakon toga je na sve uzorke dodano $100\ \mu\text{L}$ 1% otopine

kristal ljubičastog (u ddH₂O) te inkubirano 60 minuta na sobnoj temperaturi. Po isteku inkubacije otopina boje je uklonjena iz bunarića te je pločica ispirana pod vodovodnom vodom. Nakon što se pločica osušila u bunariće je dodano po 100 µL 1% Tritona X-100 (u PBS-u) i ostavljeno preko noći da bi se boja oslobodila iz stanica. Idući dan na čitaču pločica očitana je apsorbancija pri 595 nm. Apsorbancija odgovarajuće slijepe probe oduzeta je od apsorbancije odgovarajućeg mjerenog uzorka.

3.2.8.3. Ekspresija aktivacijskog markera CCR5

Aktivacijski status J774 stanica nakon utišavanja DPP9 gena ispitan je praćenjem transkripcijske ekspresije C-C kemokinskog receptora 5 (CCR5; TaqMan Gene Expression Assays; Mm01216171_m1) kao pokazatelja aktivacije makrofaga (Fleming i Mosser 2011).

3.2.9. Statistička obrada podataka

Prije odabira statističkog testa (parametrijske ili neparametrijske varijante) u programu MedCalc Statistical Software 13.0 (MedCalc Software) testirani su normalnost raspodjele (Shapiro-Wilkovim testom) i homogenost varijanci (Laveneovim testom) ispitivanih varijabli. Rezultati su dalje statistički obrađeni koristeći program GraphPad Prism 5.00 (Graph-Pad Software). Granična razina značajnosti postavljena je na 95% (granična P-vrijednost=0,05). Za testiranje razlika između dviju nezavisnih skupina rezultata korišten je Mann Whitney U test, dok su za testiranje razlika između tri ili više skupina korištene jednosmjerna (*one-way*) ANOVA (engl. *analysis of variance*; analiza varijance) i ANOVA za ponovljena mjerenja (*repeated measures*) u kombinaciji s *post hoc* analizom (Bonferronijevim testom).

4.1. Transkripcijska ekspresija DPP9: usporedba s ekspresijom DPP4

4.1.1. Stanične linije makrofagnog i limfocitnog porijekla

Transkripcijska ekspresija DPP9 određena je u staničnim linijama limfocitnog (R1.1) i makrofagnog porijekla (J774), te je potom uspoređena s transkripcijskom ekspresijom DPP4, ključnog člana obitelji DPP4 enzima. Stanice R1.1 pokazuju visoku ekspresiju DPP9 mRNA koja je podjednaka ekspresiji DPP4 mRNA (Tablica 5). Stanice J774 također pokazuju visoku transkripcijsku ekspresiju DPP9, ali za razliku od stanica R1.1 ne ekspimiraju DPP4 mRNA (Tablica 5). Dakle, i limfocitna i makrofagna stanična linija ekspimiraju visoku i podjednaku razinu DPP9 mRNA, dok samo limfocitna linija R1.1. uz to ekspimiraju i DPP4 mRNA.

Tablica 5. Transkripcijska ekspresija DPP9 i DPP4 u staničnim linijama J774 i R1.1.

Stanice	ΔC_t DPP9	ΔC_t DPP4
J774	3,27±0,17	–
R1.1	4,57±0,50	4,85±0,22

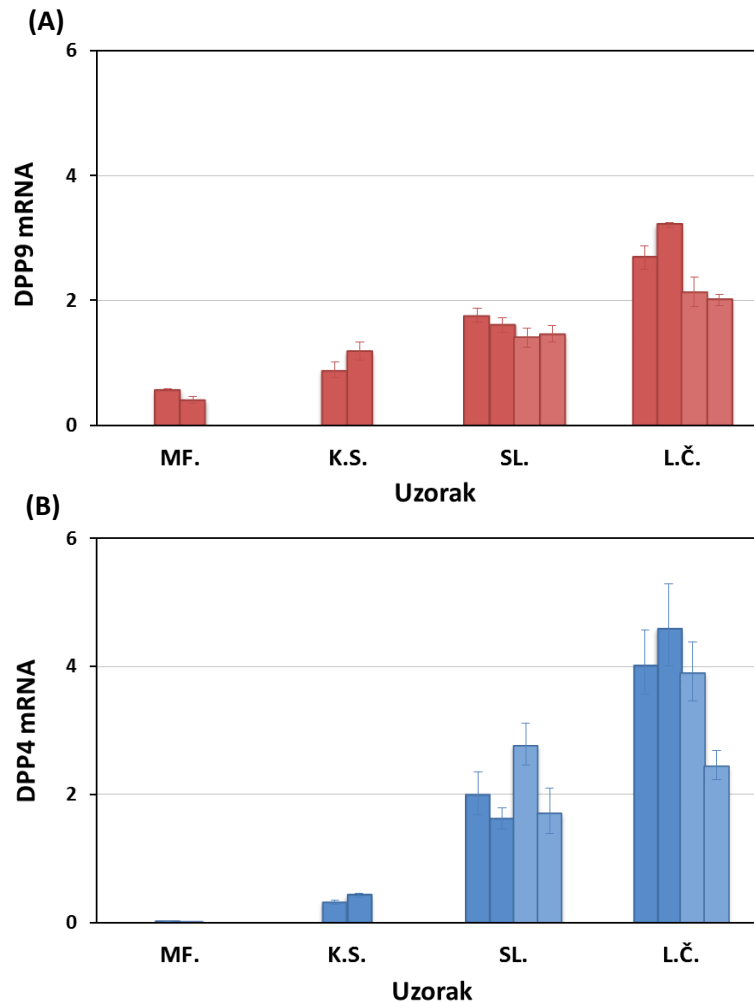
Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SE rezultata nezavisnih pokusa (N=3). – nema ekspresije transkripta. ΔC_t = razlika C_t vrijednosti ciljnog i referentnog gena.

4.1.2. Tkiva i stanice hematopoetskog porijekla

Transkripcijska ekspresija DPP9 određena je potom u stanicama mišjih limfatičnih (limfni čvorovi, slezena) i hematopoetskih (slezena i koštana srž) tkiva, kao i u uzorku peritonealnih makrofaga, te uspoređena s ekspresijom DPP4 mRNA. Analiza je pokazala ekspresiju DPP9 mRNA u svim ispitivanim uzorcima. Razina ekspresije DPP9 mRNA bila je različita ovisno o uzorku, kako slijedi: makrofagi (ΔC_t 5,41±0,29; N=2) < koštana srž (4,37±0,22; N=2) < slezena (3,63±0,05; N=4) < limfni čvorovi (3,03±0,12; N=4) (Slika 13A).

Ekspresija DPP4 mRNA također je nađena u svim ispitivanim uzorcima, a obrazac razine ekspresije DPP4 mRNA sličan je onom dobivenom s DPP9: makrofagi (ΔC_t 11,19±0,83; N=2) <

koštana srž ($6,16 \pm 0,07$; $N=2$) < slezena ($3,44 \pm 0,20$; $N=4$) < limfni čvorovi ($2,69 \pm 0,12$; $N=4$)
(Slika 13B).



Slika 13. Transkripcijska ekspresija DPP9 (A) i DPP4 (B) u mišjim stanicama limfatičnih (limfni čvorovi, slezena) i hematopoetskih (slezena i koštana srž) tkiva, te peritonealnih makrofaga.

Rezultati su prikazani kao relativna ekspresija u odnosu na ekspresiju dobivenu na stanicama limfocitne stanične linije R1.1, koje ekspimiraju i DPP4 i DPP9 mRNA na približno jednakoj razini. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD triplikata. Svaki prikazani uzorak stanica ili tkiva predstavlja nezavisni izolat ukupne RNA. MF. = peritonealni makrofagi, K.S. = koštana srž, SL. = slezena, L.Č. = limfni čvorovi. DPP9 i DPP4 mRNA određene su paralelno u istim uzorcima. Tamnijom bojom prikazani su uzorci izolirani iz BALB/c miševa, svjetlijom bojom prikazani su uzorci iz izolirani iz C57BL miševa.

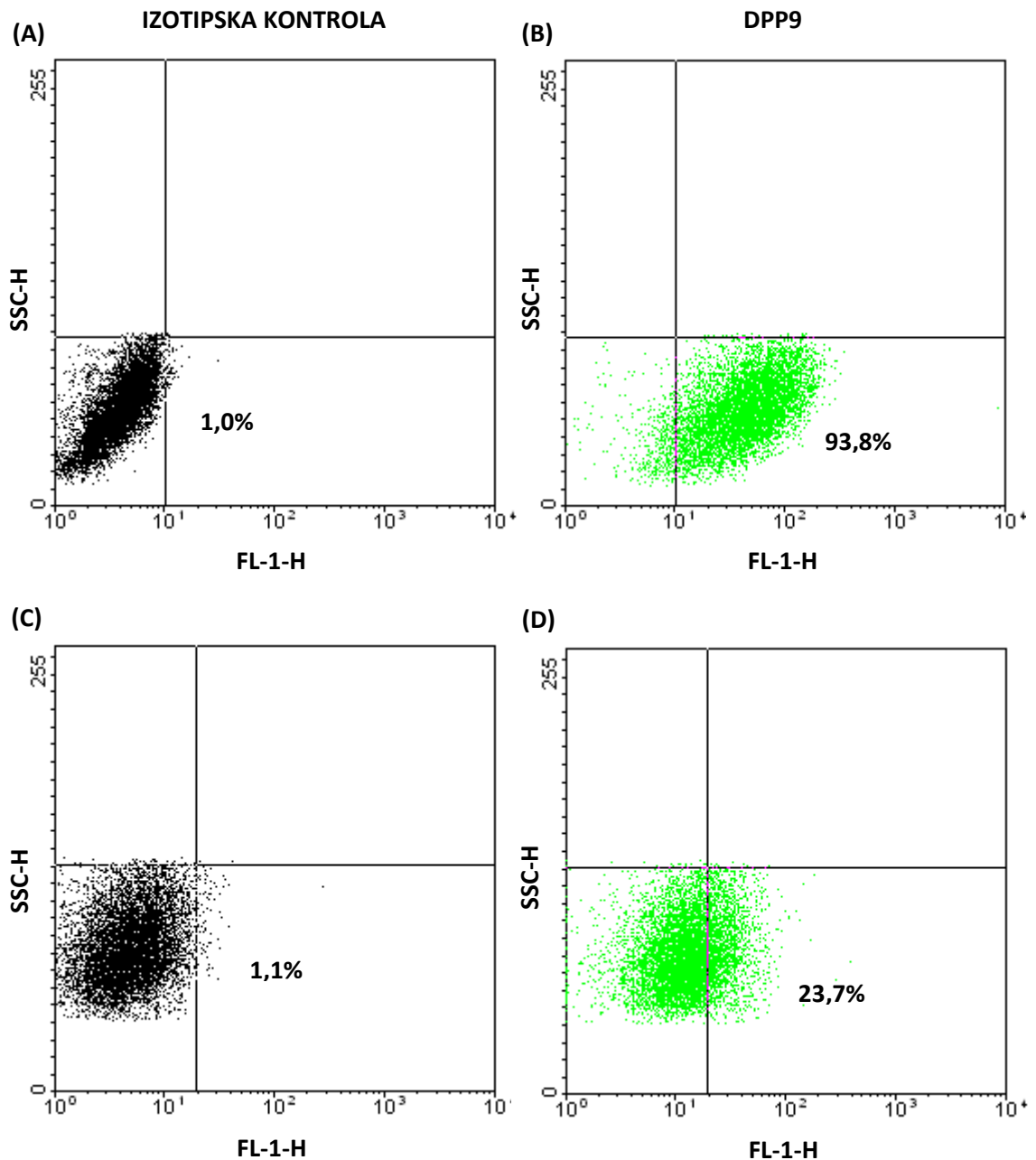
4.2. Proteinska ekspresija DPP9 na stanicama makrofagne linije J774

Proteinska ekspresija DPP9 analizirana je pomoću protutijela na DPP9 koristeći protočnu citometriju. Primjenjene su metode bojanja za unutarstanične kao i za membranske proteine. Rezultati su pokazali da većina J774 stanica eksprimira DPP9 protein unutar stanice ($89,47 \pm 2,71\%$, $N=3$, Slika 14A i B). Također, manji dio stanica ($22,74 \pm 0,12\%$, $N=2$), pokazuje prisutnost DPP9 i na staničnoj membrani (Slika 14C i D).

4.3. Lokalizacija DPP9 proteina na J774 stanicama

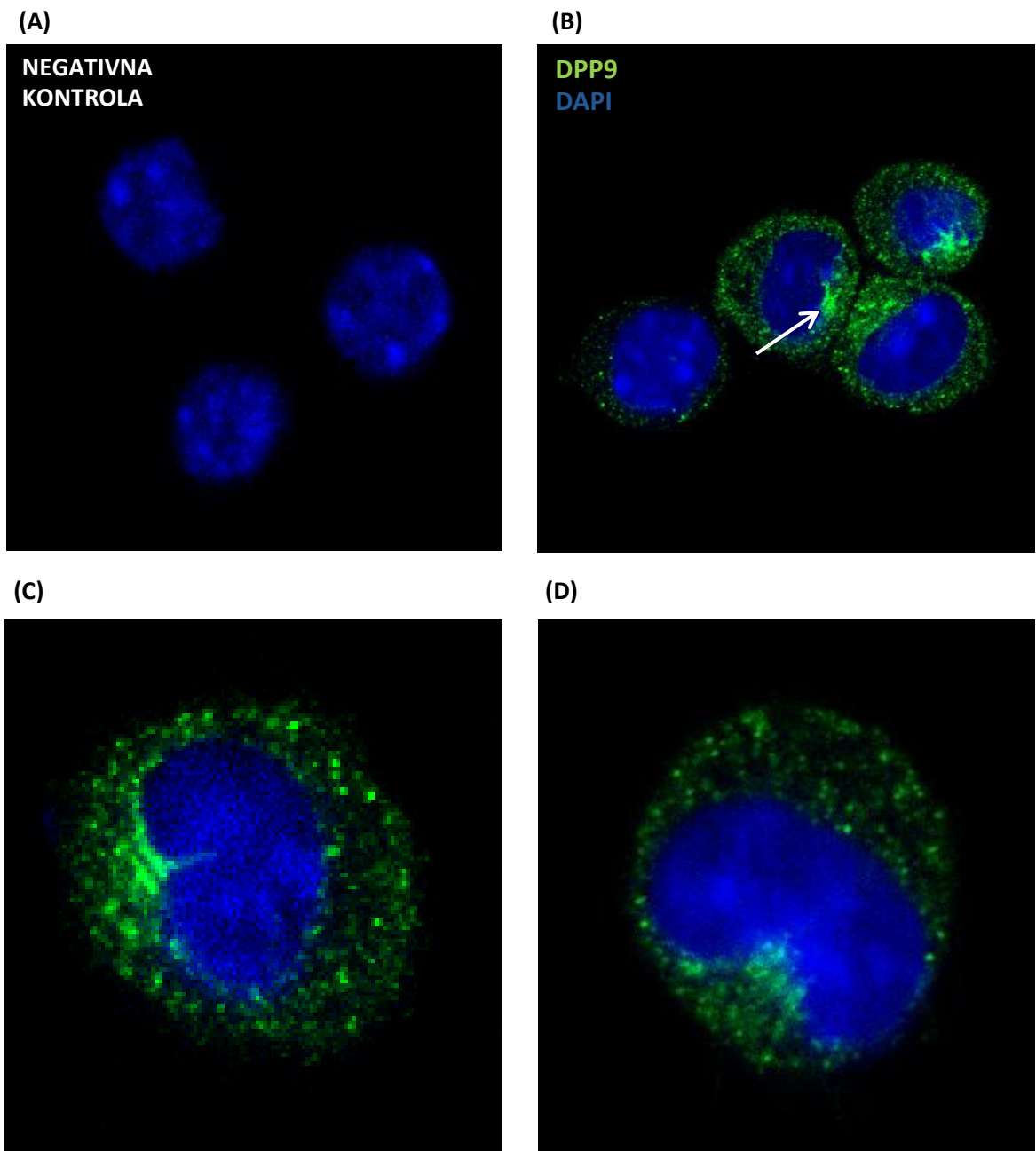
Imunocitokemijskom analizom lokalizacije DPP9 u stanicama J774 potvrđena je unutarstanična lokalizacija DPP9, što je u skladu s ranije pokazanom unutarstaničnom ekspresijom u većini J774 stanica izmjerenom pomoću protočne citometrije. Unutarstaničnu lokalizaciju DPP9 karakterizira difuzno obojenje u citoplazmi i intenzivnije obojenje u području uz jezgru (Slika 15).

Imunocitokemijska analiza pokazala je da DPP9 nije prisutna na staničnoj membrani svih J774 stanica. Membranska lokalizacija DPP9 karakterizirana je diskretnim točkastim obojenjem cijele stanične membrane ili intenzivnijim obojenjem samo jednog njezinog dijela (Slika 16B–D).



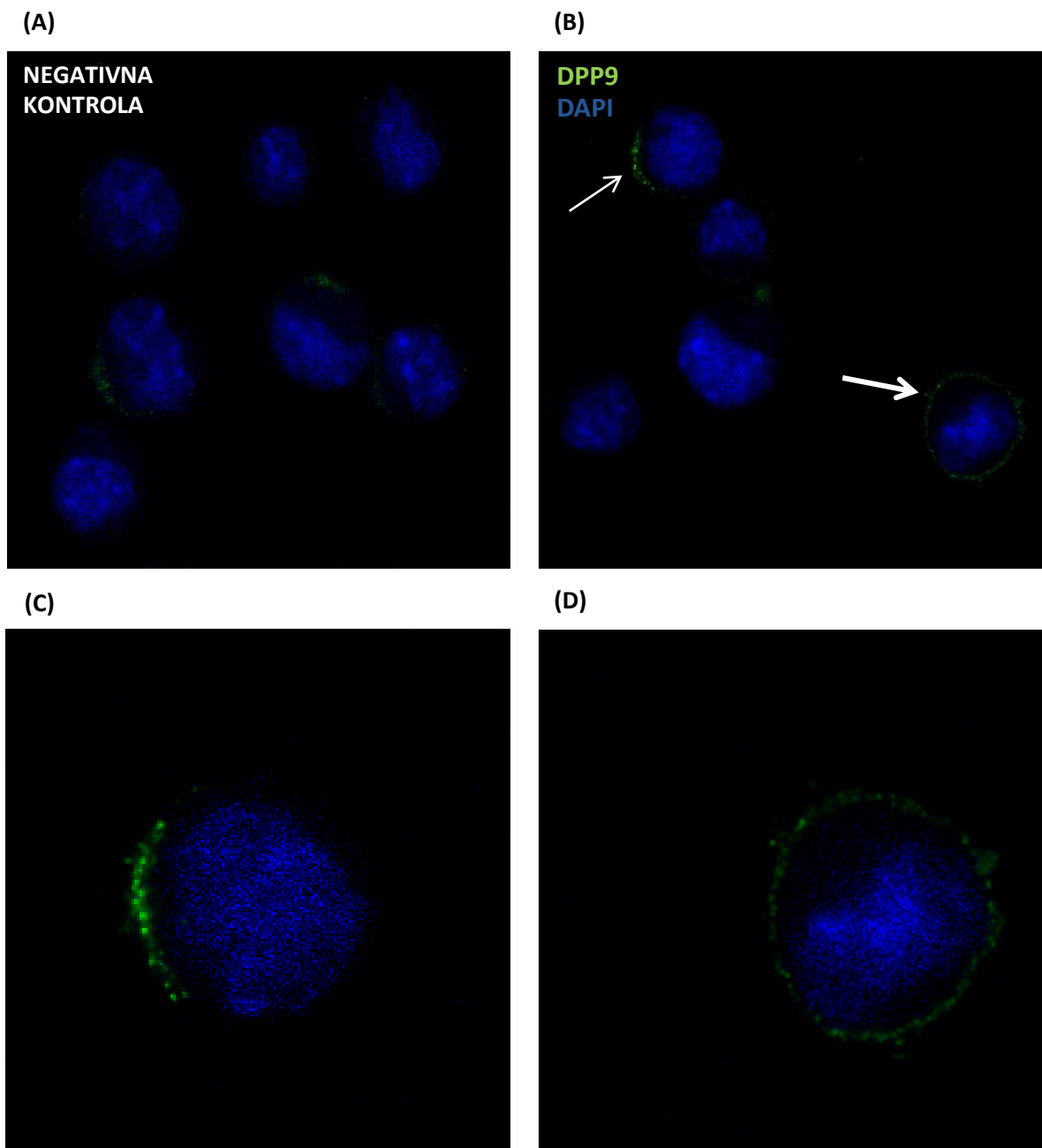
Slika 14. Proteinska ekspresija DPP9 na stanicama makrofagne linije J774.

Rezultati mjerenja unutarstanične ekspresije DPP9 proteina (A i B) i mjerenja ekspresije DPP9 proteina na staničnoj membrani (C i D). Prikazani su točkasti grafovi (FL-1-H vs SSC-H) reprezentativnih pokusa uz navedeni postotak FL-1 (odnosno DPP9) pozitivnih stanica. Distribucija stanica dobivena s izotipskom kontrolom (negativna kontrola) prikazana je crnom bojom, dok je distribucija stanica dobivena s DPP9 protutijelom prikazana zeleno. FL-1 = zelena fluorescencija mjerena na kanalu 1, SSC (engl. *side scatter*) = bočno raspršenje; mjera granularnosti stanica.



Slika 15. Unutarstanična lokalizacija DPP9 u stanicama makrofagne linije J774.

Stanice bojane u suspenziji nakon prethodne fiksacije i permeabilizacije 0,2% saponinom: (A) izotipska kontrola (negativna kontrola); (B–D) protutijelo na DPP9. Detekcija DPP9 sekundarnim protutijelom konjugiranim s Alexa Fluor 488; jezgre stanica bojane s 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). Slikano na konfokalnom mikroskopu. Unutarstaničnu lokalizaciju DPP9 karakterizira difuzno obojenje u citoplazmi uz nešto jače obojenje u području uz jezgru (strelica slika B). Slike C i D prikazuju uvećane pojedinačne stanice.



Slika 16. Lokalizacija DPP9 na staničnoj membrani stanica makrofagne linije J774.

Nativne stanice bojane u suspenziji: (A) izotipska kontrola (negativna kontrola); (B–D) protutijelo na DPP9. Detekcija DPP9 sekundarnim protutijelom konjugiranim s Alexa Fluor 488; jezgre stanica bojane s DAPI. Slikano na konfokalnom mikroskopu. Membransku lokalizaciju DPP9 karakterizira diskretno točkasto obojenje cijele stanične membrane (tanka strelica slika B, uvećano slika C) ili intenzivnije obojenje samo dijela stanične membrane (debeli strelica slika B, uvećano slika D).

4.4. Enzimsko aktivnost slična DPP4 na J774 stanicama

Pojam enzimske aktivnosti slične DPP4 uveden je jer se enzimi DPP4, DPP8 i DPP9 preklapaju u svojoj supstratnoj specifičnosti. U svrhu određivanja lokalizacije enzima sličnih DPP4, mjerila se enzimsko aktivnost u pojedinim staničnim frakcijama. Stanični lizati su frakcionirani na citoplazmatsku frakciju, frakciju vezikula/organela (sadržaj organela/mitohondrija, peroksisoma i lizosoma/ i vezikula /npr. endosoma/) i membransku frakciju (koja uključuje dijelove stanične membrane i membrana endoplazmatskog retikuluma kao i membrane organela i vezikula).

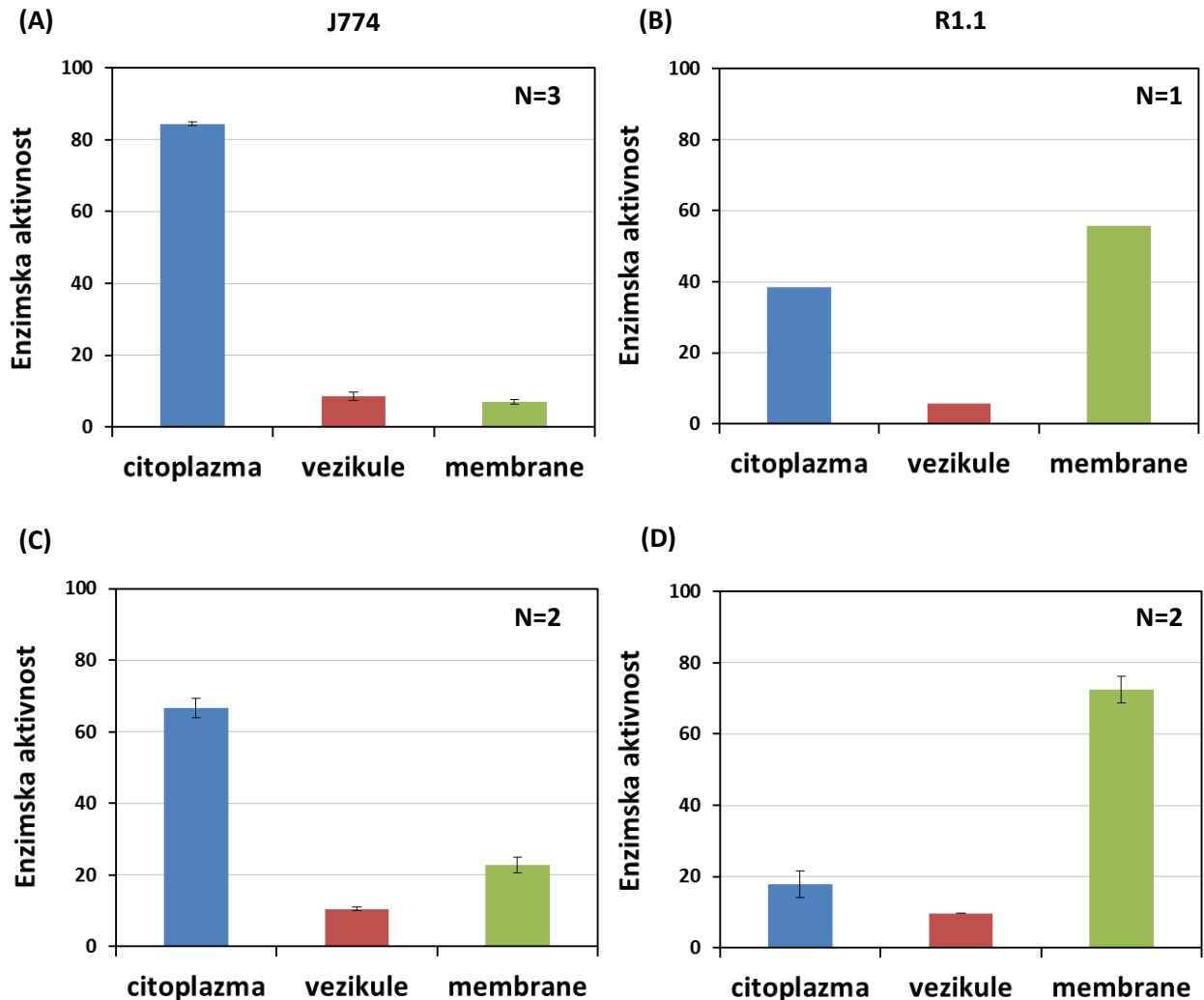
4.4.1. Enzimsko aktivnost slična DPP4 u frakcijama staničnog lizata

Rezultati mjerenja enzimske aktivnosti na stanicama J774 dobiveni koristeći sintetski supstrat Gly-Pro- β NA i postupak frakcioniranja Wrenger i sur. (2006) pokazali su da je postupak frakcioniranja ponovljiv te da rezultira reproducibilnom raspodjelom enzimske aktivnosti u ispitivanim frakcijama staničnog lizata: $84,4 \pm 0,5\%$ u citoplazmi, $8,5 \pm 1,1\%$ u sadržaju vezikula/organela i $7,0 \pm 0,7\%$ na membranama (Slika 17A).

Stanično frakcioniranje je zatim provedeno i prema modificiranom postupku uz razliku da su membrane taložene silom od 100 000 g, umjesto od 16 000 g. Koristeći isti supstrat Gly-Pro- β NA na stanicama J774 dobivena je enzimsko aktivnost slična DPP4 opet većinom u citoplazmatskoj frakciji ($66,7 \pm 2,8\%$, Slika 17C), dok je manji postotak bio prisutan u sadržaju vezikula/organela ($10,5 \pm 0,5\%$, Slika 17C) i membranskoj frakciji ($22,8 \pm 2,3\%$, Slika 17C). Prednost ovog postupka frakcioniranja u odnosu na onaj Wrenger i sur. (2006) je veći prinos membranske frakcije na račun mikrosomalne frakcije (manjih dijelova membrana) koja je nakon ultracentrifugiranja prešla iz citoplazmatske frakcije. To se očituje i u nižem pozadinskom obojenju (*backgroundu*) citoplazmatske frakcije koja je ultracentrifugiranjem pročišćena od manjih dijelova membrana.

Za potvrdu postupka frakcioniranja udjeli enzimskih aktivnosti u frakcijama određeni su i na R1.1 stanicama koje eksprimiraju i membranski lokalizani enzim DPP4. Ukupna enzimsko aktivnost slična DPP4 u stanicama R1.1 imala je očekivano drugačiju raspodjelu zbog

prisutnosti membranske DPP4: $17,8 \pm 3,8\%$ u citoplazmi, $9,7 \pm 0,1\%$ u vezikulama/organelima i $72,5 \pm 3,8\%$ na membranama (Slika 17D).



Slika 17. Enzimska aktivnost slična DPP4 – usporedba dvaju postupaka staničnog frakcioniranja.

Enzimska aktivnost u frakcijama lizata stanica J774 (A i C) i frakcijama lizata stanica R1.1 (B i D), dobivenim pomoću dva postupka frakcioniranja: postupkom Wrenger i sur. (2006) (A i B) i modificiranim postupkom (C i D). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SE udjela enzimskih aktivnosti pojedinih frakcija staničnog lizata dobivenih u ponovljenim postupcima frakcioniranja. N = broj izvođenja postupaka frakcioniranja.

Za usporedbu gore navedenim rezultatima, rezultati mjerenja enzimске aktivnosti u frakcijama R1.1 stanica dobiveni postupkom frakcioniranja Wrenger i sur. (2006) iznosili su: 38,5% enzimске aktivnosti u citoplazmi, 5,7% u vezikulama/organelima, 55,8% na membranama (Slika 17B).

Slično dobivenom na stanicama J774, i na stanicama R1.1 je korištenjem postupka za stanično frakcioniranje koji uključuje korak ultracentrifugiranja dobiven veći prinos membranske frakcije na račun manjeg prinosa citoplazmatske frakcije, potvrđujući bolje izdvajanje frakcije koja sadrži ukupne stanične membrane.

4.4.2. *Inhibicija enzimske aktivnosti slične DPP4*

DPP4 inhibitor sitagliptin upotrebljen je za zaključivanje o prirodi enzima u pojedinim izdvojenim staničnim frakcijama. U tu svrhu iskorištena je činjenica da je IC_{50} vrijednost za DPP4 18 nM, dok je za ostale DPP oko 5000 puta viša (Kirby i sur. 2010). Nižim koncentracijama sitagliptina, u nM području, moguće je dakle selektivno inhibirati DPP4, dok viša koncentracija inhibitora u μ M području može inhibirati i ostale DPP. Stoga je u svrhu razlikovanja enzimske aktivnosti koja se ostvaruje pomoću DPP4 od enzimske aktivnosti ostalih članova DPP4 obitelji korišten inhibitor sitagliptin u koncentracijama od 0,5 μ M (selektivna inhibicija DPP4) i 500 μ M (inhibicija DPP9/DPP8).

Rezultati su pokazali da niža koncentracija sitagliptina ne uzrokuje smanjenje enzimske aktivnosti niti u ukupnom lizatu J774 stanica (Slika 18A), kao niti u jednoj od frakcija staničnog lizata (Slika 19A, C i E). Naime, ostatna enzimska aktivnost u staničnim lizatima s nižom koncentracijom inhibitora iznosila je $96,3 \pm 1,4\%$ (Slika 18A). Dobiveni su rezultati u skladu s izostankom ekspresije DPP4 na J774 stanicama.

Međutim, visoka koncentracija sitagliptina (500 μ M) uzrokovala je pad enzimske aktivnosti u ukupnom lizatu ($38,5 \pm 3,0\%$ ostatna enzimska aktivnost; Slika 18A), kao i u svim frakcijama lizata. Ostatna enzimska aktivnost u frakcijama staničnog lizata iznosila je $33,7 \pm 4,0\%$ u citoplazmi, $52,8 \pm 4,0\%$ u vezikulama/organelima, te $53,8 \pm 1,0\%$ u membranama, u odnosu na enzimsku aktivnost u odgovarajućim kontrolnim frakcijama bez inhibitora (Slika 19A, C i E).

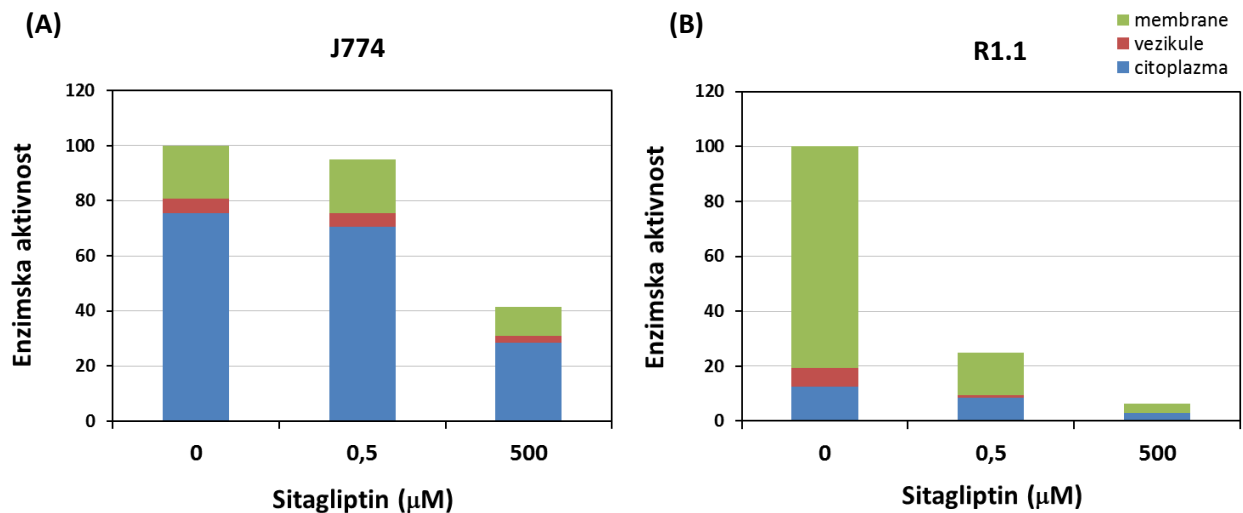
Postotak inhibicije u frakcijama koje sadrže ukupne stanične membrane odnosno sadržaj vezikula/organela nešto je manji nego u citoplazmatskoj frakciji, što upućuje na prisutnost enzima koji su otporni na djelovanje sitagliptina. Zaključno, rezultati inhibicije enzimske

aktivnosti slične DPP4 dobiveni u lizatu J774 stanica, kao i u frakcijama lizata u skladu su s opaženom lokalizacijom DPP9 u citoplazmi i na staničnoj membrani.

Sposobnost sitagliptina da u odabranim koncentracijama selektivno inhibira DPP4 enzimsku aktivnost, te ju razlikuje od one ostalih članova DPP4 obitelji, provjerena je korištenjem stanične linije R1.1 koja eksprimira i DPP4 i DPP9 mRNA na podjednakoj razini.

Sitagliptin u nižoj koncentraciji (0,5 μ M) značajno je inhibirao enzimsku aktivnost i u ukupnom lizatu (26,2 \pm 1,3% ostatne aktivnosti u odnosu na netretiranu kontrolu; Slika 18B) kao i u svim frakcijama staničnog lizata (Slika 19B, D i F). Ostatna enzimaska aktivnost u frakcijama staničnog lizata R1.1 stanica iznosila je 65,9 \pm 0,7% u citoplazmi, 15,9 \pm 0,2% u vezikulama/organelima, te 18,4 \pm 0,8% u membranama, u odnosu na enzimsku aktivnost u odgovarajućim kontrolnim frakcijama bez inhibitora (Slika 19B, D i F). Dakle snažna inhibicija niskom koncentracijom sitagliptina (0,5 μ M) postignuta je u frakciji koja sadrži membrane, što je u skladu s dominantnom ekspresijom DPP4 na membrani R1.1 stanica. Učinci visoke koncentracije sitagliptina (500 μ M) u ukupnom lizatu R1.1 stanica, kao i u svima frakcijama lizata bili su jači u usporedbi s onima dobivenim s niskom koncentracijom (0,5 μ M). Ostatna enzimaska aktivnost u prisutnosti 500 μ M sitagliptina u frakcijama staničnog lizata R1.1 stanica iznosila je 23,7 \pm 0,8% u citoplazmi, 5,4 \pm 2,7% u vezikulama/organelima, te 4,4 \pm 0,4% u membranama (Slika 19B, D i F). Dobiveni rezultati pokazuju da niske koncentracije sitagliptina (0,5 μ M) selektivno inhibiraju DPP4 (smještenu na staničnoj membrani; Slika 19F), dok visoka koncentracije uz to inhibira i DPP9 (pretežno smještena u citoplazmi; Slika 19A)

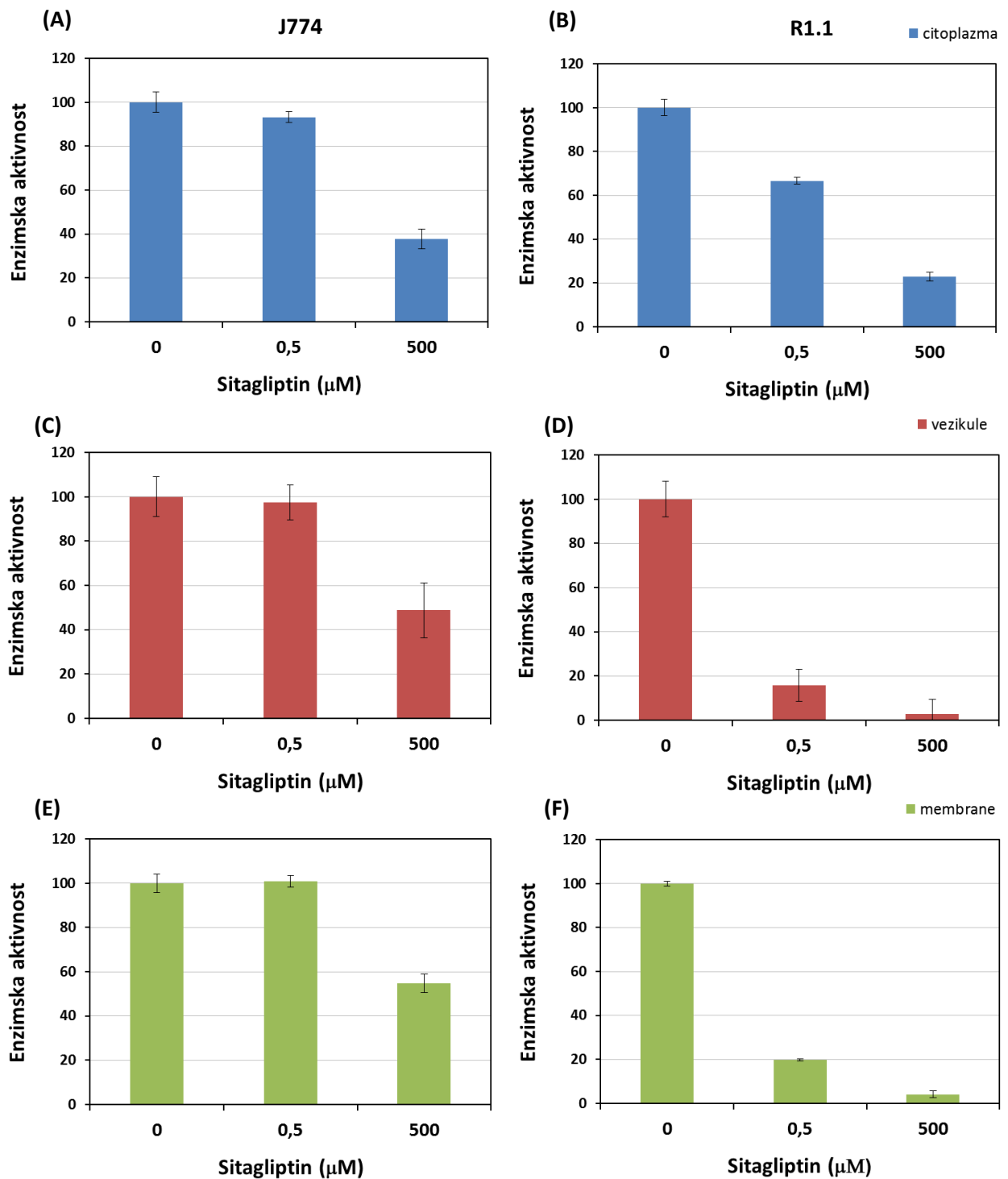
Ekspresija DPP4 i DPP9 u stanicama R1.1 na mRNA razini približno je jednaka. Omjer membranske (dominantno DPP4) i citoplazmatske (dominantno DPP9/DPP8) enzimске aktivnosti slične DPP4 u R1.1 stanicama, međutim iznosi 6,4:1 i to vjerojatno na račun veće enzimске učinkovitosti DPP4 koja se nalazi na membrani. Naime poznato je da DPP4 u odnosu na DPP9 bolje cijepa ponuđene supstrate (Bjelke i sur. 2006).



Slika 18. Inhibicija enzimske aktivnosti slične DPP4 pomoću sitagliptina u ukupnim lizatima i pojedinim frakcijama lizata J774 (A) i R1.1 (B) stanica.

Rezultati su prikazani kao udio (%) enzimske aktivnosti u pojedinačnim frakcijama u odnosu na enzimsku aktivnost u ukupnom lizatu bez inhibitora. Različito obojeni dijelovi stupića predstavljaju udjele enzimskih aktivnosti pojedinih staničnih frakcija. Prikaz jednog od dva pokusa sa sličnim rezultatima.

U ukupnom lizatu J774 stanica enzimska aktivnost slična DPP4 otporna je na sitagliptin u niskoj koncentraciji (0,5 μM) (Slika 18A), dok je u ukupnom lizatu R1.1 stanica, smanjena na 26% u odnosu na onu u odsutnosti inhibitora (Slika 18B). Rezultati ukazuju da sitagliptin u niskoj koncentraciji (0,5 μM) selektivno inhibira DPP4 (ekspimiranu na R1.1 stanicama), dok ne djeluje na DPP9 (ekspimiranu u J774 stanicama u odsutnosti DPP4).



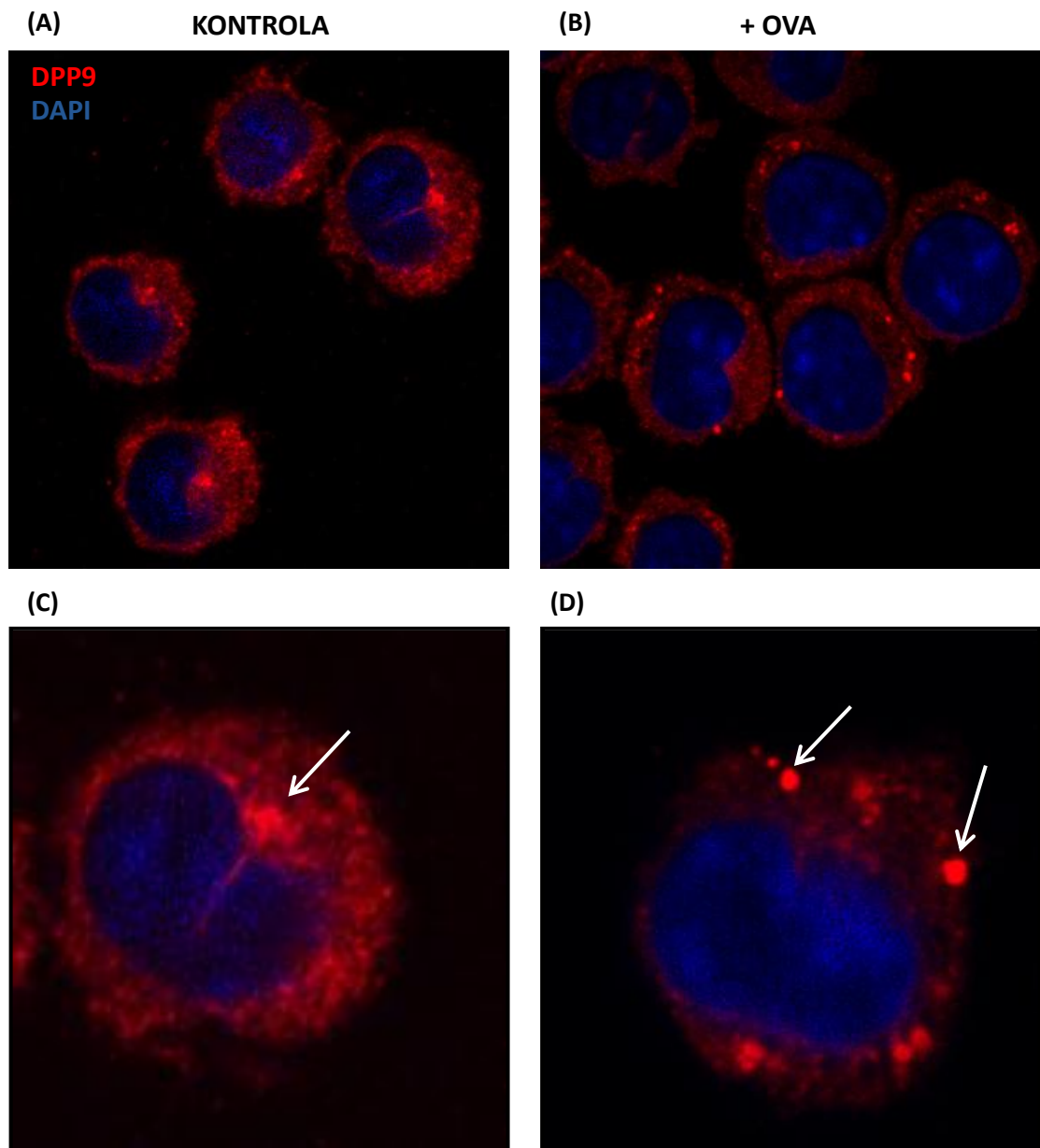
Slika 19. Inhibicija enzimske aktivnosti slične DPP4 pomoću sitagliptina u frakcijama lizata J774 (A, C i E) i R1.1 (B, D i F) stanica.

Rezultati su u svakoj frakciji prikazani kao udio (%) enzimske aktivnosti u prisutnosti inhibitora u odnosu na enzimsku aktivnost u odsutnosti inhibitora. Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD triplikata jednog od dva pokusa sa sličnim rezultatima.

4.5. Lokalizacija DPP9 proteina na J774 stanicama nakon endocitoze ovalbumina

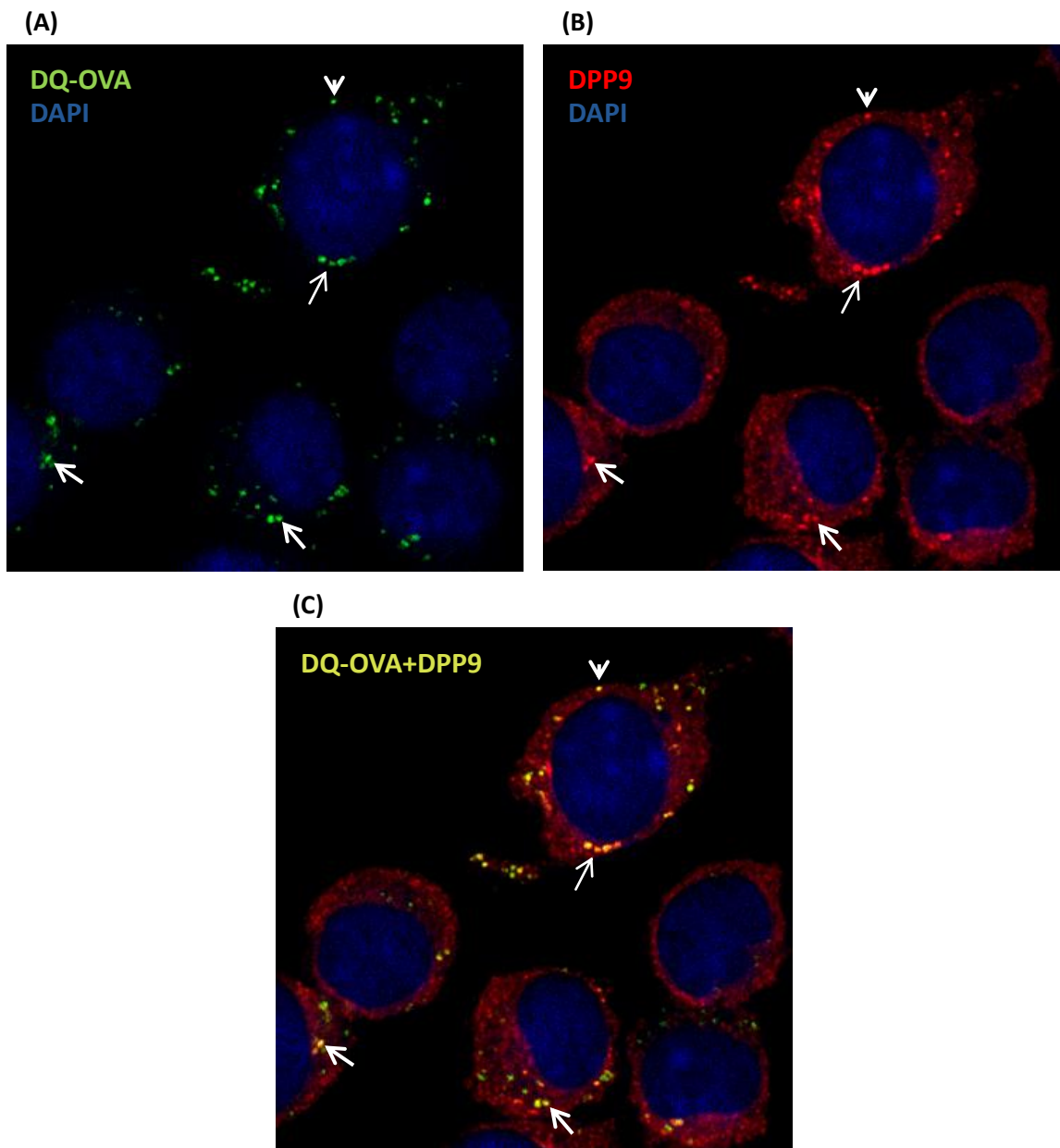
Ranije zapažena lokalizacija DPP9 na plazmatskoj membrani J774 stanica kao i njezino pojačano nakupljanje u području uz jezgru ostavlja pitanje njezine moguće uloge s obzirom na opaženu lokalizaciju. Pretpostavljeno je da bi DPP9 mogla sudjelovati u razgradnji peptidnih liganada i/ili antigena koji putem receptorski inducirane endocitoze ulaze u stanicu. U tu svrhu praćena je moguća promjena lokalizacije DPP9 nakon poticanja endocitoze ovalbumina. Pretpostavka je bila da će DPP9 kolokalizirati s endocitiranim ovalbuminom u endosomima. Za praćenje endocitoze ovalbumina korišten je obilježeni DQ-ovalbumin (DQ-OVA), a DPP9 je potom fluorescentno obilježena protutijelima. Očekivana redistribucija DPP9 i njezina moguća kolokalizacija s DQ-OVA potom su praćene na konfokalnom mikroskopu. Rezultati su pokazali da nakon endocitoze ovalbumina dolazi do promjene lokalizacije DPP9 koja se očituje u gubitku intenzivnijeg bojanja u području uz jezgru i pojavi intenzivno obojenih vezikula u citoplazmi (Slika 20).

DPP9 nakon endocitoze lokalizirana u vezikulama, kolokalizira s endocitiranim ovalbuminom (Slika 21). Kolokalizacija nije ograničena na određeno područje stanice već je prisutna u vezikulama u svim dijelovima citoplazme (Slike 21 i 22).



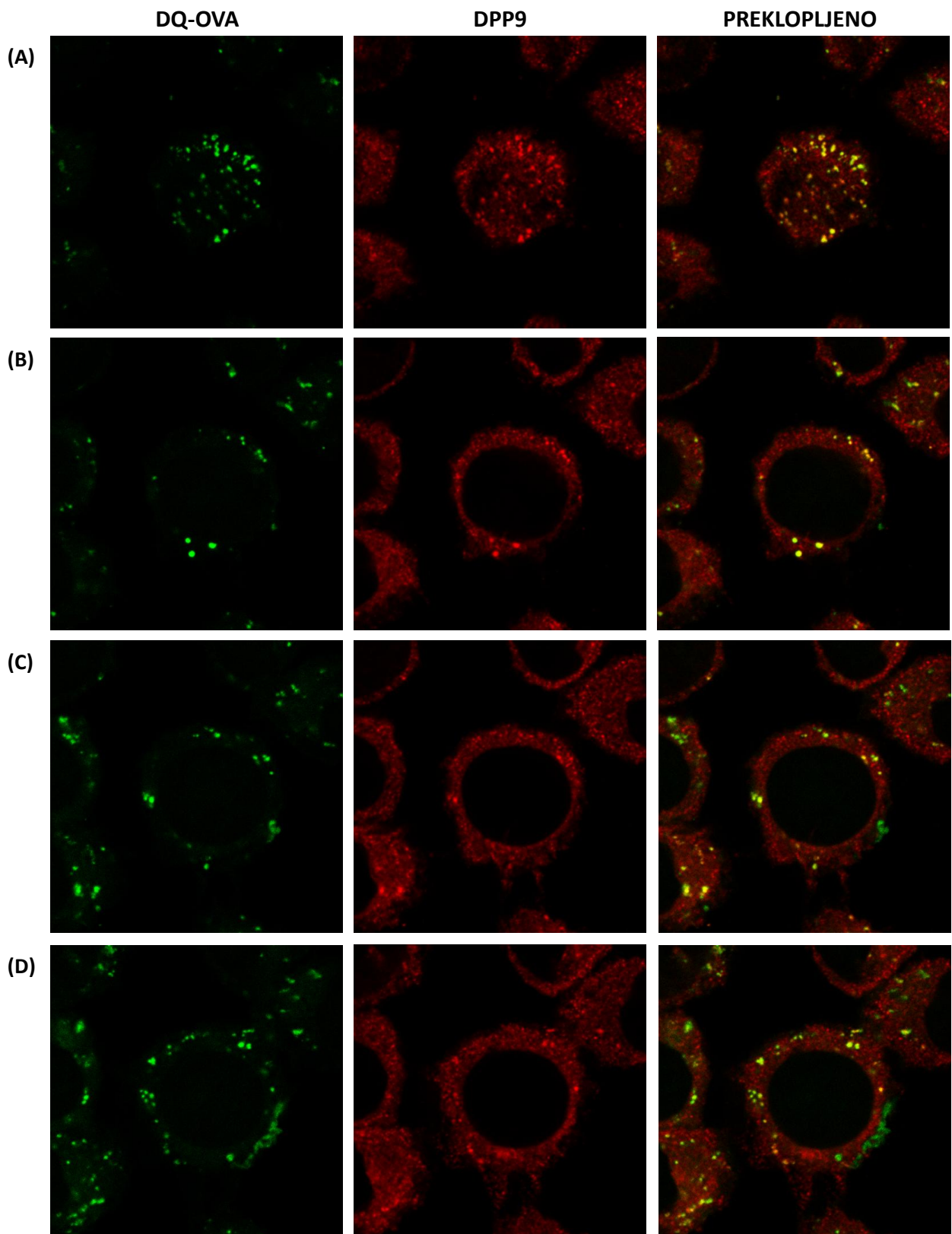
Slika 20. Promjena lokalizacije DPP9 nakon endocitoze ovalbumina u stanicama J774.

(A) i (C) netretirane stanice, (B) i (D) stanice tretirane ovalbuminom (OVA). *In situ* bojanje stanica nakon fiksacije i permeabilizacije: protutijelo na DPP9 (izotipska kontrola nije prikazana, sve stanice negativne), detekcija DPP9 sekundarnim protutijelom konjugiranim s Alexa Fluor 647, jezgre stanica bojane s DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Slikano na konfokalnom mikroskopu. Promjenu lokalizacije DPP9 karakterizira gubitak intenzivnog bojanja u području uz jezgru (inače prisutnog u kontroli; slika A, strelica slika C) i pojavi intenzivno obojenih vezikula u citoplazmi (slika B, strelice slika D). Slike C i D prikazuju uvećane pojedinačne stanice.

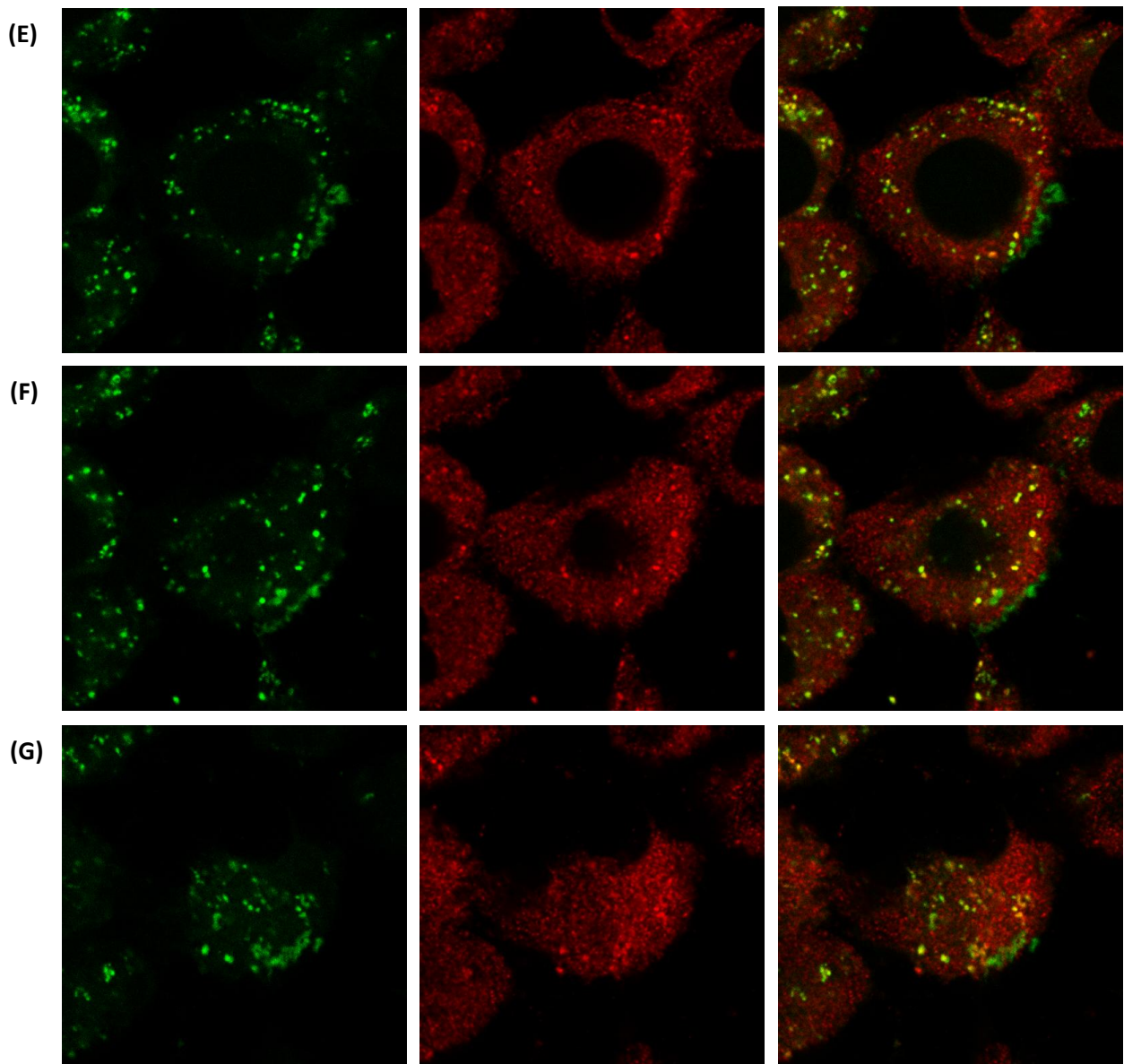


Slika 21. Kolokalizacija DPP9 s endocitiranim DQ-OVA u stanicama J774.

Stanice nasađene na stakalca tretirane su s DQ-OVA (ovalbumin obilježen flouoroforom BODIPY FL). *In situ* bojanje stanica nakon fiksacije i permeabilizacije: protutijelo na DPP9 (izotipska kontrola nije prikazana, sve stanice negativne), detekcija DPP9 sekundarnim protutijelom konjugiranim s Alexa Fluor 647, jezgre stanica bojane s DAPI. Slikano na konfokalnom mikroskopu. Endocitirani DQ-OVA fluorescira zeleno (slika A). DPP9 kolokalizira s endocitiranim ovalbuminom (slika C, žuto obojenje) u pojedinačnim (vrh strelice) i grupiranim vezikulama (tanka strelica) koje se nalaze neposredno uz površinu stanice kao i u vezikulama koje se nalaze dublje u citoplazmi (deblje strelice).



Slika 22. (nastavak na idućoj stranici).



Slika 22. Kolokalizacija DPP9 s endocitiranim DQ-OVA po slojevima J774 stanica. (nastavak s prethodne stranice).

Stanice nasađene na stakalca tretirane su s DQ-OVA (endocitiran fluorescira zeleno). *In situ* bojanje stanica nakon fiksacije i permeabilizacije: protutijelo na DPP9 (izotipska kontrola nije prikazana, sve stanice negativne), detekcija DPP9 sekundarnim protutijelom konjugiranim s Alexa Fluor 647 (crvena fluorescencija). Slikano na konfokalnom mikroskopu. Kolokalizacija DPP9 s endocitiranim ovalbuminom (žuto obojenje) prisutna je u svim staničnim slojevima počevši od gornje strane stanice do donje strane kojom je stanica zalijepljena za podlogu (redom slike A do G).

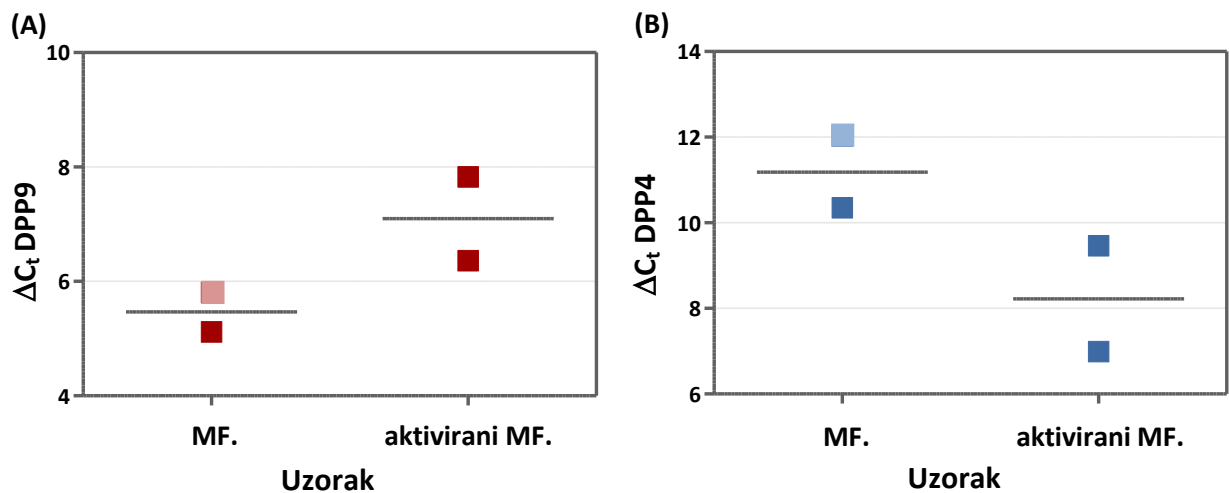
4.6. Ekspresija DPP9 nakon aktivacije makrofaga

4.6.1. *In vivo* aktivacija peritonealnih makrofaga

Idućim pokusima ispitano je utječe li aktivacija makrofaga na ekspresiju DPP9. U tu svrhu određena je transkripcijska ekspresija DPP9 u peritonealnim makrofagima BALB/c i C57BL miševa. Uspoređena je DPP9 mRNA aktiviranih makrofaga, s DPP9 mRNA kontrolnih, neaktiviranih makrofaga. Aktivirani makrofagi izdvojeni su iz peritonealnog ispirka miševa koji su primili i/p injekciju od 0,5 mL 0,12% glikogena pet dana prije žrtvovanja. Kontrolni, neaktivirani makrofagi izdvojeni su iz peritonealnog ispirka miševa koji nisu bili tretirani glikogenom. Makrofagi su izdvojeni iz peritonealnog ispirka postupkom adherencije na plastici u mediju s 10% seruma. Na osnovi morfoloških kriterija tako pročišćena populacija adheriranih stanica sadržavala je više od 90% makrofaga. Svaki uzorak peritonealnog ispirka iz kojeg su izdvojeni makrofagi prikupljen je iz više miševa, tj. iz tri miša u slučaju aktiviranih, odnosno iz deset miševa, u slučaju neaktiviranih makrofaga.

Ovim postupkom izdvojena su dva uzorka aktiviranih i dva uzorka neaktiviranih makrofaga. Iz navedenih uzoraka stanica izolirana je ukupna RNA, te je potom određena ekspresija DPP9 mRNA i uspoređena s ekspresijom DPP4 mRNA.

Dobiveni rezultati su pokazali da neaktivirani makrofagi eksprimiraju visoku razinu DPP9 mRNA (ΔC_t 5,47±0,35; Slika 23A) i nisku razinu DPP4 mRNA (ΔC_t 11,19±0,84; Slika 23B). Kod aktiviranih makrofaga ekspresija DPP9 bila je trostruko manja (7,01±7,40; Slika 23A), dok je ekspresija DPP4 bila 8 puta veća (8,23±1,24; Slika 23B), u odnosu na odgovarajuće bazalne razine nađene u neaktiviranih makrofaga. Dakle, rezultati upućuju da *in vivo* aktivacija makrofaga različito utječe na ekspresiju DPP9 i DPP4, tj. smanjuje ekspresiju DPP9, a pojačava ekspresiju DPP4.

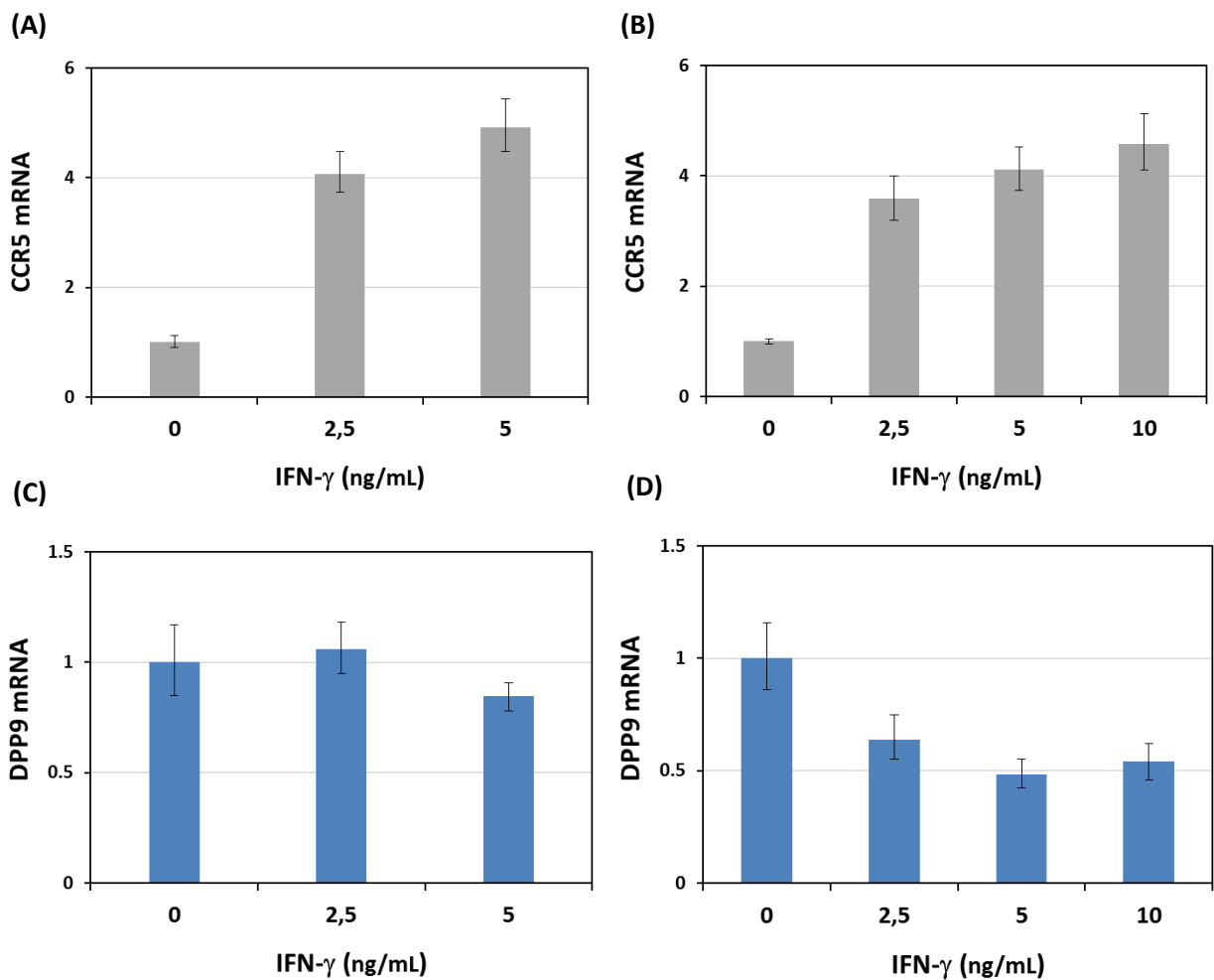


Slika 23. Transkripcijska ekspresija DPP9 (A) i DPP4 (B) neaktiviranih i aktiviranih mišjih peritonealnih makrofaga (MF).

Rezultati su prikazani kao ΔC_t vrijednosti (viši ΔC_t – manja ekspresija) pojedinačnih nezavisnih uzoraka (RNA izolata); srednje vrijednosti ΔC_t aktiviranih odnosno neaktiviranih makrofaga naznačene su vodoravnim linijama. Tamnijom bojom prikazani su uzorci makrofaga izolirani iz BALB/c miševa, svjetlijom bojom je prikazan uzorak izoliran iz C57BL miševa.

4.6.2. *In vitro* aktivacija stanica makrofagne linije J774

Kao ključni aktivator J774 stanica makrofagnog porijekla korišten je IFN- γ . U tu svrhu J774 stanice su tretirane IFN-om 24 (2,5 i 5 ng/mL) i 48 sati (2,5, 5 i 10 ng/mL), te je potom određena ekspresija aktivacijskog markera CCR5. Rezultati su pokazali da IFN- γ povećava ekspresiju CCR5 mRNA i to podjednako nakon 24 i 48 sati tretmana (Slika 24A i B). Povećanje ekspresije CCR5 ovisilo je o koncentraciji IFN-a, a maksimalno je iznosilo 4,9 puta nakon 24 sata (5 ng/mL; Slika 24A), odnosno 4,6 puta nakon 48 sati (10 ng/mL; Slika 24B). U tako aktiviranim J774 stanicama određena je potom ekspresija DPP9 mRNA. Pokazalo se da IFN- γ nakon 24 sata nema učinka, dok nakon 48 sati smanjuje ekspresiju DPP9 mRNA na J774 stanicama (Slika 24D). Maksimalno smanjenje (2 puta) postignuto je koncentracijom IFN-a od 5 ng/mL (Slika 24D). Dakle, *in vitro* aktivacija J774 stanica makrofagnog porijekla pomoću IFN-a rezultirala je smanjenjem ekspresije DPP9 mRNA nakon 48 sati tretmana.



Slika 24. Transkripcijska ekspresija kemokinskog receptora 5 (CCR5) (A i B) i DPP9 (C i D) u J774 stanicama makrofagnog porijekla nakon 24 i 48 sati tretmana interferonom- γ (IFN- γ).

Rezultati su prikazani kao relativna transkripcijska ekspresija u odnosu na ekspresiju u kontrolnim, netretiranim stanicama. Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD triplikata.

LPS se smatra aktivatorom upalnih reakcija. U literaturi je pokazano da upalni procesi i/ili LPS mogu modulirati ekspresiju CCR5 na stanicama makrofagnog porijekla kao i na mikroglia stanicama u mozgu (Trebst i sur. 2008). Ovisno o eksperimentalnim uvjetima, pokazana je i smanjena (Franchin i sur. 2000), ali i povišena ekspresija CCR5 na ljudskim monocitima (Munsaka i sur. 2009) nakon aktivacije LPS-om.

Stoga je najprije ispitan učinak LPS-a (1, 10, 100 i 1000 ng/mL) na ekspresiju CCR5 mRNA u J774 stanicama makrofagnog porijekla, nakon 24 i 48 sati tretmana. Nakon 24 sata tretmana ekspresija CCR5 bila je podjednako smanjena (oko 2 puta) najnižom (1 ng/mL) i najvišom (1000 ng/mL) koncentracijom LPS-a, dok su ostale koncentracije (10 i 100 ng/mL) bile bez

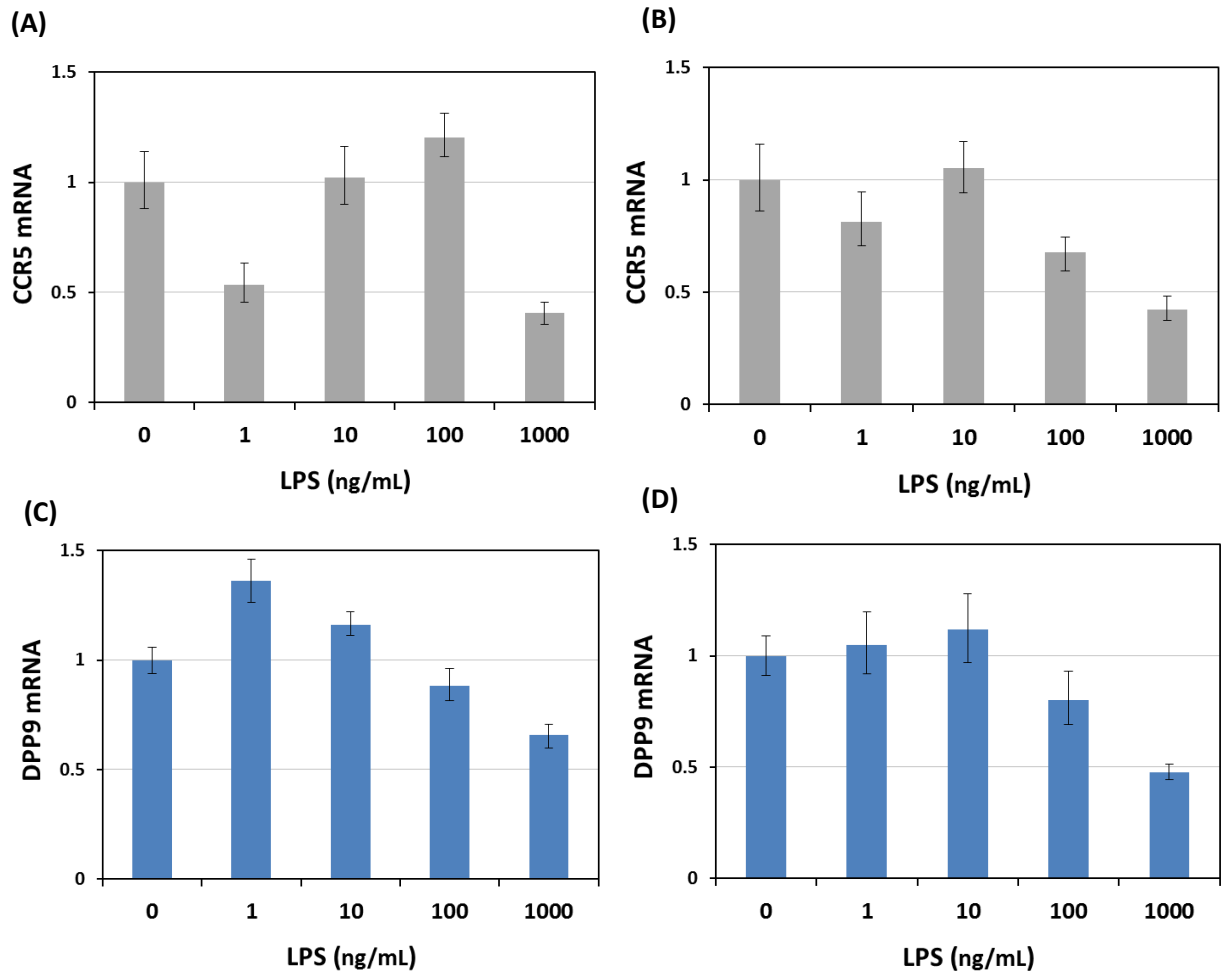
učinka (Slika 25A). Nakon 48 sata tretmana ekspresija CCR5 bila je smanjena samo višim koncentracijama LPS-a (100 i 1000 ng/mL; Slika 25B). Maksimalno smanjenje postignuto je s 1000 ng/ml i bilo je podjednako onome nakon 24 sata tretmana istom koncentracijom (Slika 25A i B).

U J774 stanicama koje su bile tretirane LPS-om 24 i 48 sati određena je potom ekspresija DPP9 mRNA. Nakon 24 sata tretmana došlo je do blagog povećanja ekspresije s najnižom koncentracijom LPS-a (1 ng/mL) za 1,4 puta i do sniženja od 1,5 puta s najvećom koncentracijom (1000 ng/mL) (Slika 25C). Ekspresija DPP9 mRNA u J774 stanicama bila je smanjena (oko 2 puta) nakon 48 sati tretmana najvišom koncentracijom LPS-a (1000 ng/mL), dok su ostale koncentracije (1 i 10 i 100 ng/mL) bile bez učinka (Slika 25D). Dakle, *in vitro* aktivacija J774 stanica makrofagnog porijekla visokom koncentracijom LPS-a rezultirala je smanjenjem ekspresije DPP9 mRNA nakon 24 i 48 sati tretmana.

Na kraju je ispitan mogući sinergistički učinak aktivacije J774 stanica niskim koncentracijama oba opisana aktivatora, kako bi se izbjegao neželjeni popratni učinak na vijabilnost stanica. U tu svrhu korišten je IFN- γ u koncentraciji od 2,5 ng/mL, te LPS u koncentraciji od 10 ng/mL. J774 stanice tretirane su svakim aktivatorom zasebno, i s kombinacijom oba. Postignuta aktivacija provjerena je nakon 24 i 48 sati tretmana, određivanjem aktivacijskog markera CCR5. Potom je u istim uzorcima određena ekspresija DPP9 mRNA. Rezultati su pokazali da je IFN- γ sam izazvao snažno povećanje CCR5 mRNA nakon 24 i 48 sati tretmana (oko 4 puta; Slika 26A i B), dok je LPS samo blago povećao CCR5 mRNA (oko 1,5 puta, Slika 26A i B). Kombinirani tretman s oba aktivatora također je rezultirao snažnim povećanjem CCR5 mRNA (7,5 odnosno 6,5 puta; Slika 26A i B).

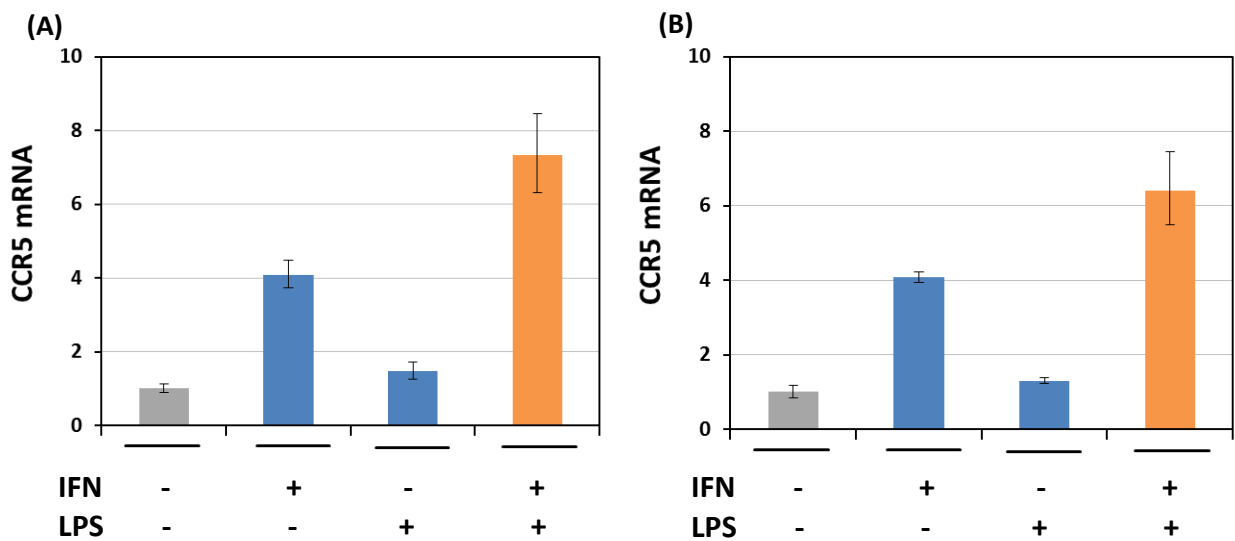
U tako aktiviranim J774 stanicama određena je potom ekspresija DPP9 mRNA. Rezultati su pokazali da nijedan aktivator sam nije bitno promijenio DPP9 mRNA ekspresiju (Slika 27). Međutim, kombinirani tretman nakon 24 i 48 sati rezultirao je smanjenjem ekspresije DPP9 mRNA u J774 stanicama (2,5 odnosno 2,2 puta; Slika 27). Dakle, snažna *in vitro* aktivacija J774 stanica makrofagnog porijekla pomoću kombiniranog tretmana niskim koncentracijama IFN-a i LPS-a rezultirala je smanjenjem ekspresije DPP9 mRNA već nakon 24 sata tretmana.

Ekspresija DPP9 u tretiranim stanicama nakon 24 i 48 sati bila je statistički značajno različita od ekspresije DPP9 u netretiranim stanicama ($P=0,029$).



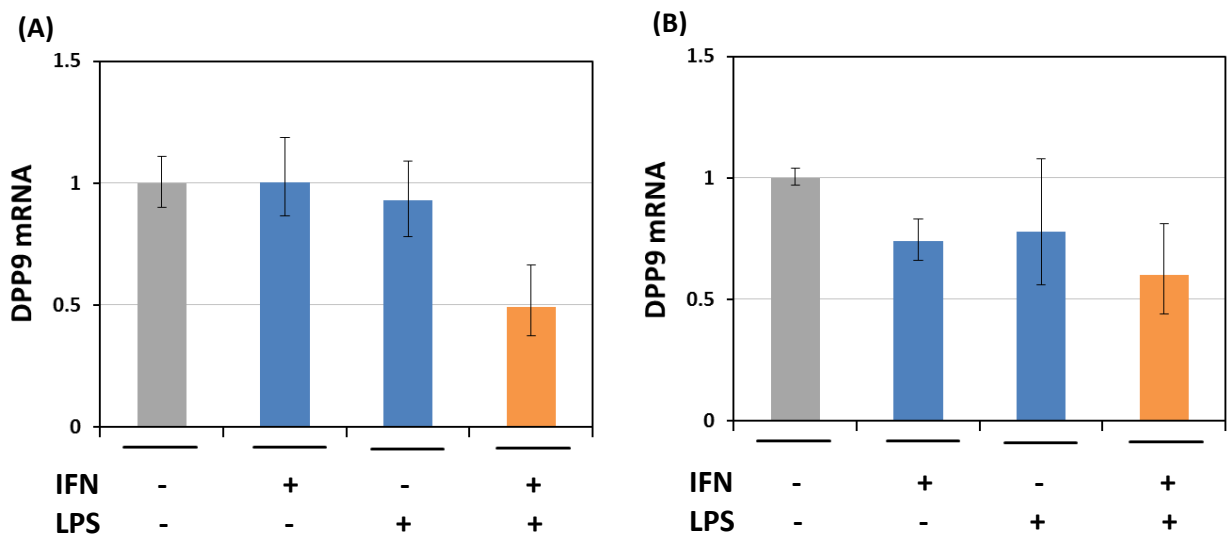
Slika 25. Transkripcijska ekspresija CCR5 (A i B) i DPP9 (C i D) u J774 stanicama makrofagnog porijekla nakon 24 i 48 sati tretmana lipopolisaharidom (LPS).

Rezultati su prikazani kao relativna transkripcijska ekspresija u odnosu na ekspresiju u kontrolnim, netretiranim stanicama. Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD triplikata.



Slika 26. Transkripcijska ekspresija CCR5 u J774 stanicama makrofagnog porijekla nakon 24 (A) i 48 (B) sati tretmana niskim koncentracijama IFN-a (2,5 ng/mL) i LPS-a (10 ng/mL) pojedinačno, kao i njihovom kombinacijom.

Rezultati su prikazani kao relativna transkripcijska ekspresija u odnosu na ekspresiju u kontrolnim, netretiranim stanicama. Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD triplikata jednog od dva pokusa sa sličnim rezultatima.



Slika 27. Transkripcijska ekspresija DPP9 u J774 stanicama makrofagnog porijekla nakon 24 (A) i 48 (B) sati tretmana niskim koncentracijama IFN-a (2,5 ng/mL) i LPS-a (10 ng/mL) pojedinačno, kao i njihovom kombinacijom.

Rezultati su prikazani kao relativna transkripcijska ekspresija u odnosu na ekspresiju u kontrolnim, netretiranim stanicama. Prikazane su srednje vrijednosti \pm SE dva (kombinirani tretman) ili tri pokusa (pojedinačni tretman).

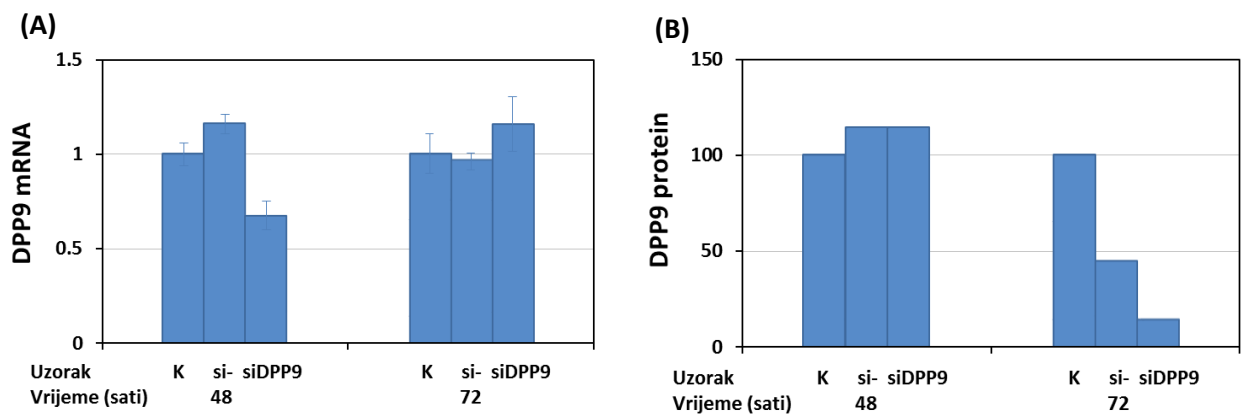
4.7. Utišavanje DPP9 gena u J774 stanicama

Na temelju preliminarnih pokusa ispitivanja učinka utišavanja na transkripcijsku ekspresiju DPP9 za daljnje pokuse odabrana je koncentracija siRNA od 100 nM. Maksimalno utišavanje DPP9 na transkripcijskoj razini sa 100 nM siRNA opaženo je nakon 48 sata (Slika 28A).

Učinak utišavanja DPP9 koristeći 100 nM siRNA ispitan je zatim i na proteinskoj razini. DPP9 protein određen je u permeabiliziranim J774 stanicama koristeći protutijela na DPP9 i protočnu citometriju. Rezultati su pokazali da je 48 sati nakon tretmana sa siRNA razina DPP9 proteina nepromijenjena, dok nakon 72 sata dolazi do pada ekspresije u odnosu na ekspresiju u kontrolnim stanicama, bez tretmana (Slika 28B). Međutim, i kontrolna siRNA, također je pokazala inhibitorni učinak na proteinsku DPP9 ekspresiju. Zbog navedenog u svim su pokusima prikazane obje kontrole, tj. negativna siRNA kontrola (si-) i kontrola bez tretmana.

Sumarno, utišavanje DPP9 gena u J774 stanicama mjereno na transkripcijskoj razini, bilo je umjerenog intenziteta (oko 50% u optimiziranim uvjetima), te kratkotrajno (48 sati). Mjereno na proteinskoj razini utišavanje DPP9 gena u J774 stanicama bilo je podjednako onom dobivenom na transkripcijskoj razini. Međutim, razina utišavanja je bila varijabilna između različitih pokusa. Negativna siRNA kontrola također je imala učinak na utišavanje DPP9 proteinske ekspresije, ali on je uvijek bio manji od učinka ciljne siRNA. Razlika u učinku na utišavanje DPP9 negativne siRNA kontrole u odnosu na ciljnu siRNA bila je u rasponu od 30 do 42% u korist jačeg utišavanja s ciljnom siRNA.

Kako je maksimalno utišavanje na proteinskoj razini bilo 72 sata nakon tretmana sa siRNA isto vrijeme odabrano je i za daljnje analize.



Slika 28. Transkripcijska (A) i proteinska (B) ekspresija DPP9 nakon 48 odnosno 72 sati utišavanja DPP9 gena.

U slučaju transkripcijske ekspresije rezultati su prikazani kao relativna transkripcijska ekspresija u odnosu na onu u kontrolnim stanicama, bez tretmana; srednja vrijednost \pm SD triplikata. Proteinska ekspresija određena je pomoću protutijela na DPP9 koristeći protočnu citometriju. Prikaz jednog od dva pokusa sa sličnim rezultatima. Rezultati su prikazani kao relativne vrijednosti u odnosu na one dobivene u kontrolnim uzorcima, bez tretmana. si- = stanice tretirane siRNA negativnom kontrolom, siDPP9 = stanice tretirane ciljnom siRNA za DPP9.

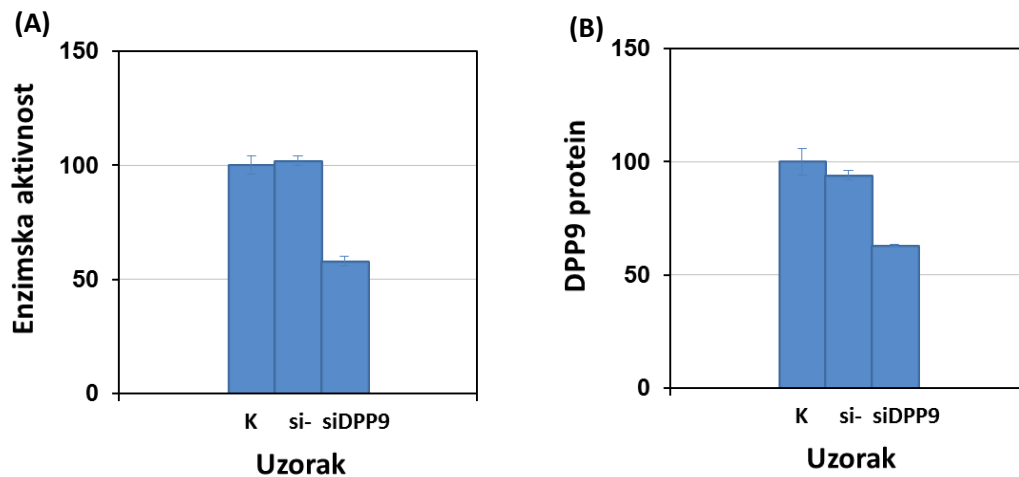
4.8. Funkcionalne promjene J774 stanica nakon utišavanja DPP9 gena

Idućim pokusima ispitano je dovodi li utišavanje DPP9 gena u J774 stanicama do promjene enzimske aktivnosti DPP9, te do popratnih promjena u ekspresiji nekih gena i funkcija J774 stanica kao posljedica toga. Ispitana je enzimska aktivnost slična DPP4, proliferacija i adhezija J774 stanica, ekspresija aktivacijskog markera CCR5, kao i moguća indukcija ekspresije DPP4.

4.8.1. Enzimska aktivnost slična DPP4

Provjereno je u kojoj je mjeri postupak utišavanja DPP9 rezultirao smanjenjem njezine enzimske aktivnosti. U tu svrhu, ispitana je enzimska aktivnost slična DPP4 u lizatu J774 stanica 72 sata nakon utišavanja pomoću 100 nM DPP9 siRNA, te uspoređena s učinkom utišavanja na proteinskoj razini. Rezultati su pokazali da je enzimska aktivnost smanjena na 60% one nađene kod netretiranih stanica (Slika 29A). Kontrolna siRNA (si-) nije imala učinka na enzimsku aktivnost. Utišavanje DPP9 rezultiralo je smanjenom ekspresijom DPP9

proteina na 60% razine u usporedbi s ekspresijom dobivenom na netretiranim stanicama, dok kontrolna siRNA nije imala učinka (Slika 29B). Dakle razina utišavanja DPP9 proteina bila je usporediva s razinom utišavanja enzimske aktivnosti slične DPP4.

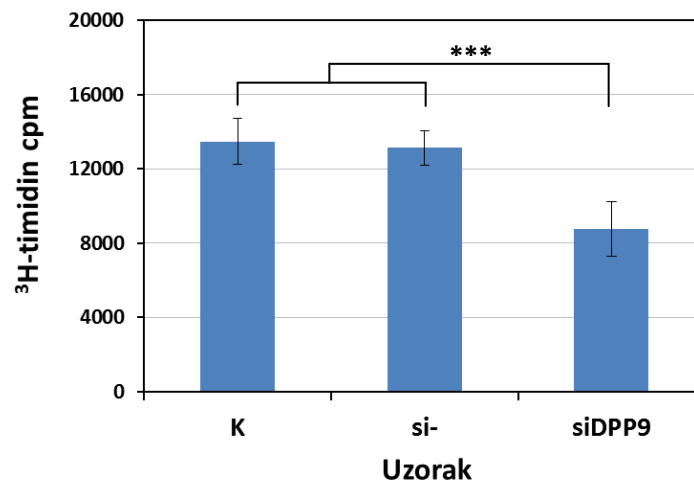


Slika 29. Enzimska aktivnost slična DPP4 (A) i proteinska ekspresija (B) nakon 72 sata utišavanja DPP9 gena.

Enzimska aktivnost izražena je kao relativna vrijednost u odnosu na onu dobivenu u kontrolnom lizatu iz netretiranih stanica; rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD triplikata. Proteinska ekspresija prikazana je kao relativna vrijednost u odnosu na onu dobivenu u kontrolnim uzorcima bez tretmana; rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD dva mjerenja. Prikaz jednog od dva pokusa sa sličnim rezultatima.

4.8.2. Proliferacija

O mogućem utjecaju DPP9 na proliferaciju stanica govori podatak da inhibicija DPP9/DPP8 smanjuje proliferaciju aktiviranih ljudskih limfocita T, te djeluje na poticanje apoptoze makrofaga. Mogući utjecaj utišavanja DPP9 na proliferaciju J774 stanica mjeren je ^3H -timidinskim testom. Nakon 72 sata utišavanja dobiveno je statistički značajno smanjenje ugradnje radioaktivnog timidina u stanicama s utišanom DPP9 u odnosu na kontrolu (netretirane stanice) i siRNA negativnu kontrolu (35 odnosno 33% smanjenja, Slika 30). Stanice s utišanom DPP9 morfološki se nisu razlikovale od kontrole, te nije bilo vidljivih znakova apoptoze.



Slika 30. Proliferacija J774 stanica makrofagnog porijekla nakon 72 sata utišavanja DPP9 gena.

Rezultati su prikazani kao cpm (engl. *counts per minute*; broj otkucaja u minuti pri mjerenju radioaktivnosti); srednje vrijednosti \pm SD. Prikaz jednog od dva pokusa sa sličnim rezultatima. *** $P < 0,001$.

4.8.3. Adhezija

4.8.3.1. Adhezijska svojstva J774 stanica

Prije ispitivanja učinka utišavanja DPP9 gena na adheziju makrofaga ispitana su adhezijska svojstva J774 stanica makrofagnog porijekla. Pokazalo se da stanice J774 u manjoj mjeri adheriraju na kolagen tipa IV dok na podlogu s denaturiranim BSA adheriraju dobro, ali ipak nešto slabije nego na plastiku (Tablica 6 i Slika 31). Na podlozi s kolagenom tipa IV stanice J774 stvaraju nakupine, dok su nasuprot tome na podlozi s BSA stanice ravnomjerno raspoređene i slične onima adheriranim na plastiku (Slika 32A–C). U prisustvu seruma u mediju za vrijeme adhezije stanice J774 na kolagenu bivaju ravnomjernije raspoređene i u konačnici ih više adherira na podlogu (Slika 32D–F i Tablica 6). Prisutnost seruma također povećava vezanje stanica i na ostale podloge (Slika 31).

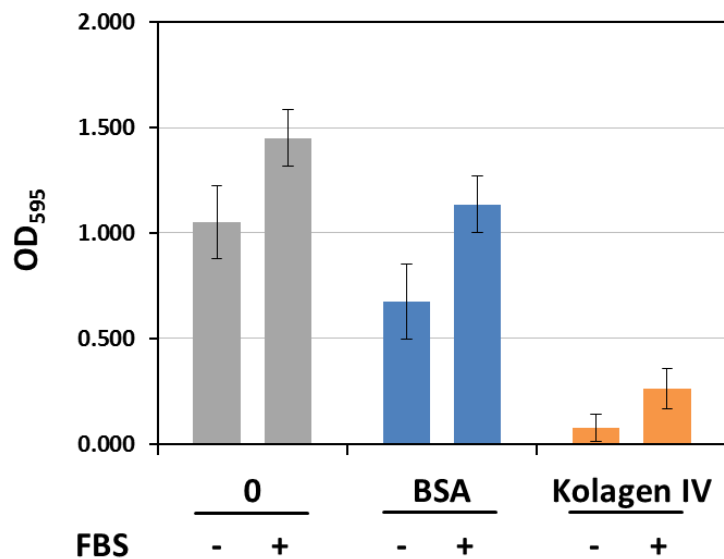
Za provjeru samog postupka adhezije ispitana je adhezija ljudskih dermalnih fibroblasta na spomenute podloge. Suprotno stanicama J774, ali u skladu s očekivanjima fibroblasti se ne vežu na podlogu s BSA (nego međusobno sljepljuju u nakupine) što govori da su sva mjesta nespecifičnog vezanja blokirana s BSA (Slika 32H). Također nasuprot rezultatima sa

stanicama J774, fibroblasti na kolagen adheriraju u jednakoj mjeri kao i na plastiku (modificiranu za adherentne stanice) (Tablica 6). Fibroblasti na kolagenu stvaraju neprekinuti monosloj što govori da je kolagen ravnomjerno raspoređen, jer bi u protivnom BSA koji se nakon njega nanosi kao blokada nespecifičnog vezanja ometao njihovo ravnomjerno adheriranje na podlogu (Slika 32G).

Tablica 6. Adhezivna svojstva J774 stanica u usporedbi s dermalnim fibroblastima.

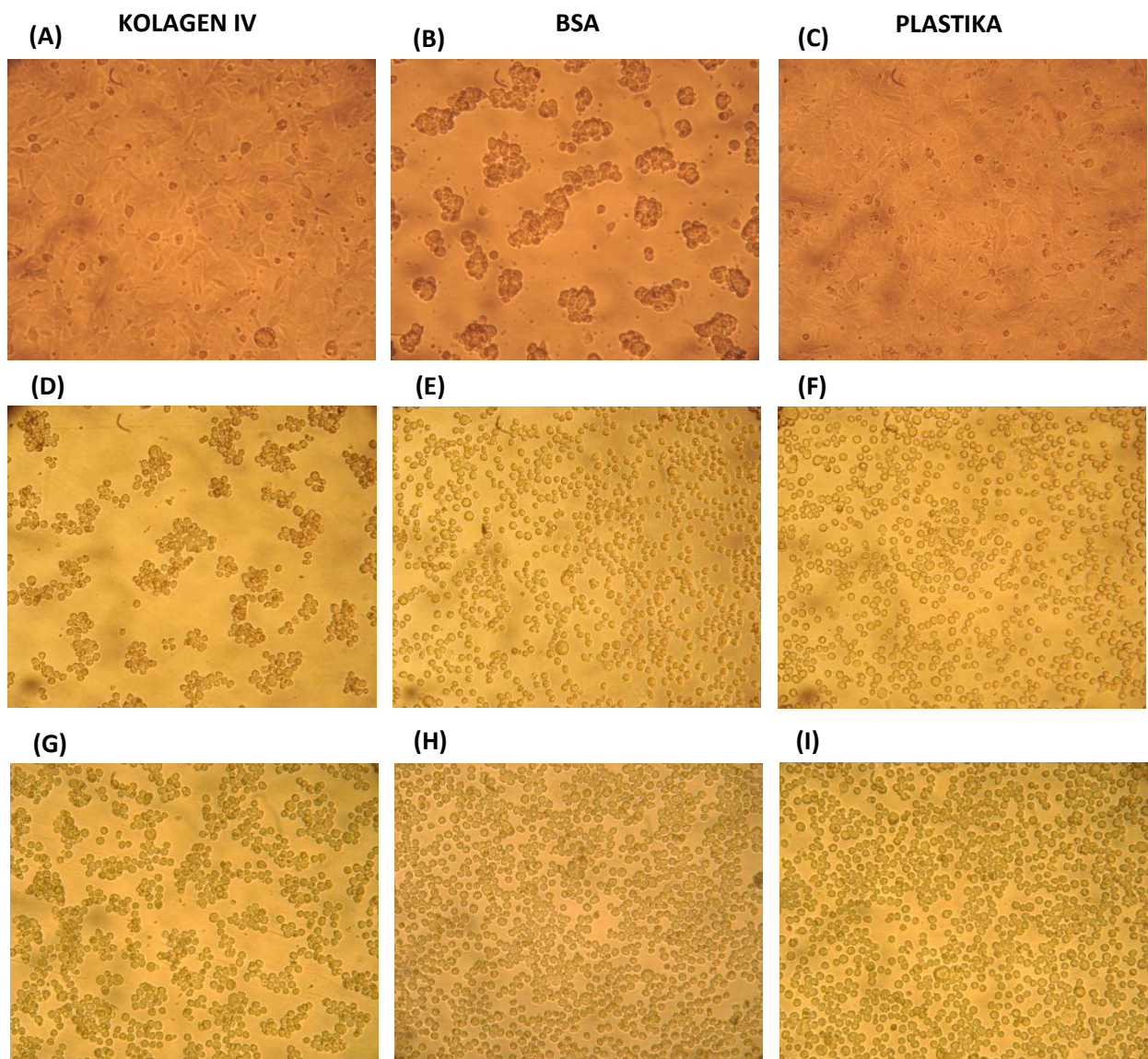
Stanice	Adhezija BSA/plastika	Adhezija kolagen IV/BSA
J774	74,3±11,5%	11,0±4,6%
J774 uz 10%-tni serum	77,3±1,3%	24,7±6,6%
Fibroblasti	4,5±1,5%*	101,0±3,0%*

Rezultati prikazuju adhezivna svojstva J774 stanica i dermalnih fibroblasta na denaturiranom BSA (engl. *bovine serum albumine*; goveđi serumski albumin; relativiziran u odnosu na adheziju na plastiku) odnosno na kolagenu tipa IV (relativiziran u odnosu na BSA). Prikazane srednje vrijednosti ± SE rezultata nezavisnih pokusa (N=3). *N=2



Slika 31. Adhezija stanica J774 sa i bez prisutnosti 10%-tnog fetalnog goveđeg seruma (FBS) na netretiranu plastiku, denaturirani goveđi serumski albumin (BSA) i kolagen tipa IV.

Nakon bojanja adheriranih stanica bojom kristal ljubičasto mjerena je apsorbancija pri 595 nm. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti OD₅₉₅ ± SE nezavisnih pokusa (N=2).



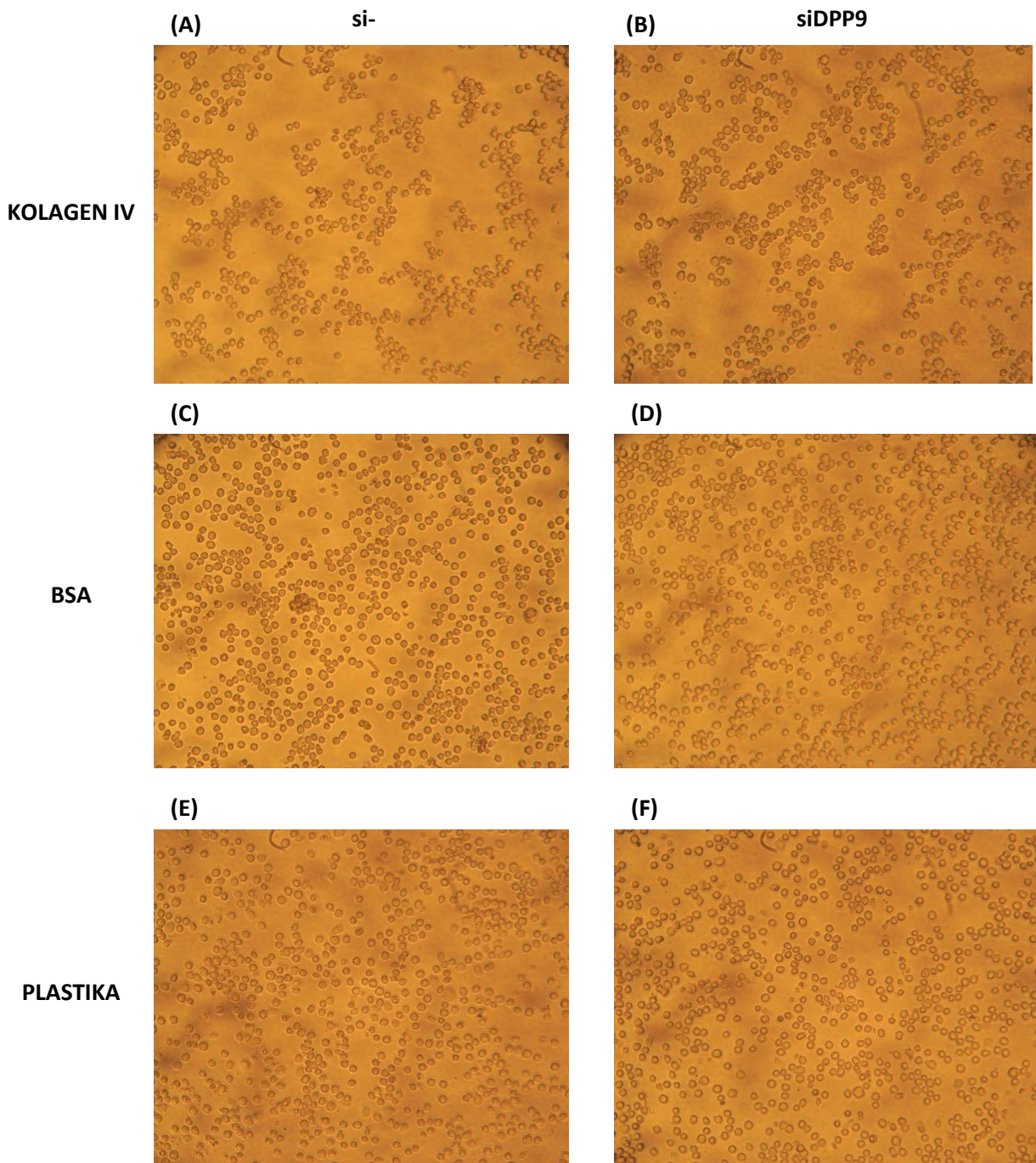
Slika 32. Izgled makrofaga J774 i fibroblasta na kolagenu tipa IV, denaturiranom goveđem serumskom albuminu (BSA) i plastici.

(A–C) ljudski dermalni fibroblasti u mediju bez seruma, (D–F) stanice J774 u mediju bez seruma i (G–I) stanice J774 u mediju s 10% seruma. Slikano na invertnom svjetlosnom mikroskopu.

4.8.3.2. Adhezija J774 stanica nakon utišavanja DPP9 gena

U ponovljenim pokusima adhezije stanica J774 na kolagen tipa IV postojale su varijacije između očitanih vrijednosti apsorbancije (Slika 31). Vjerojatni uzrok tome jest činjenica da su stanice J774 semi-adherentne, te da odnos plivajućih vs adherentnih stanica prije nasadivanja za pokuse adhezije varira i utječe na varijabilnost vezanja na podlogu između ponovljenih pokusa. Zbog toga su osim kvantitativnih odnosno mjerenih vrijednosti adhezije praćene i razlike u vezanju koje se očituju kao drugačije grupiranje stanica na različitim podlogama.

Provjereno je utječe li utišavanje DPP9 gena na promjene u adhezijskim svojstvima stanica J774 na sve dosad ispitivane podloge. Kako se utišavanjem DPP9 gena očekivala pojačana adhezija očekivalo se da će se pretpostavljena promjena u vezanju na kolagen očitovati i u promjeni rasporeda stanica na podlozi kao što je opaženo u slučaju dodatka seruma. Međutim nakon utišavanja DPP9 gena nisu dobivene razlike u adheziji stanica J774 ni na jednu ispitivanu podlogu koje bi se očitovale i bile vidljive kao drugačiji raspored stanica (Slika 33). Također nije bilo značajnih razlika ni u kvantitativnim podacima među različitim tretmanima. Vezanje stanica s utišanom DPP9 na plastiku bilo je tek nešto jače (za $19,0 \pm 1,0\%$, N=2) u usporedbi s netretiranim stanicama i siRNA negativnom kontrolom. Ovakve blage promjene bile su u skladu s opažanjem da nakon utišavanja nije bilo očitih promjena u adheziji stanica na plastiku tijekom cijelog vremena utišavanja.

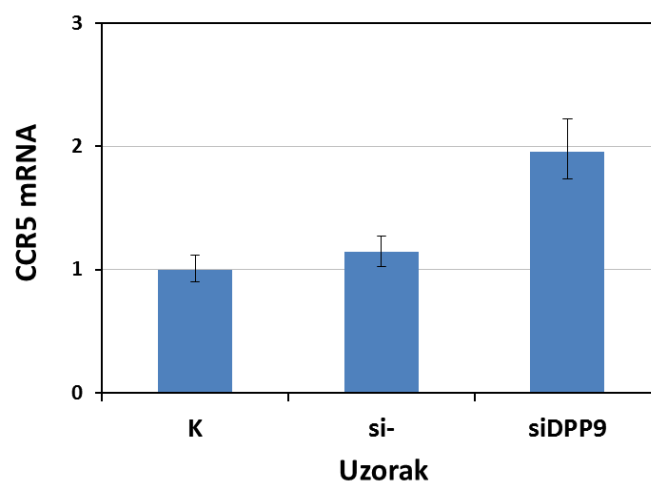


Slika 33. Raspored stanica J774 na kolagenu tipa IV (A i B), denaturiranom goveđem serumskom albuminu (BSA; C i D) i plastici (E i F) nakon utišavanja DPP9 gena.

(A, C i E) stanice tretirane siRNA negativnom kontrolom (si-), (B, D i F) stanice tretirane ciljnom siRNA za DPP9 (siDPP9). Adhezija je rađena u mediju bez seruma. Slikano na invertnom svjetlosnom mikroskopu.

4.8.4. Ekspresija aktivacijskog markera CCR5

U ranijim pokusima opažena je smanjena ekspresija DPP9 nakon aktivacije makrofaga *in vivo* i *in vitro*. Stoga je u sljedećim pokusima ispitana moguća povezanost niže razine ekspresije DPP9 (specifično dobivene utišavanjem DPP9 gena) s aktivacijom makrofaga. Kao marker aktivacije služila je ekspresija CCR5. Nakon 72 sata specifičnog utišavanja DPP9 utvrđeno je da dolazi do porasta ekspresije CCR5 (Slika 34). Srednja vrijednost povećanja ekspresije CCR5 u odnosu na kontrolu iznosila je $1,96 \pm 0,22$ puta (N=3, P=0,003). Negativna siRNA kontrola nije imala utjecaja na ekspresiju CCR5 (promjena ekspresije u odnosu na kontrolu $1,09 \pm 0,04$; N=3). Promjena ekspresije CCR5 uslijed utišavanja DPP9 mogla bi upućivati na izravnu povezanost razine ekspresije DPP9 i aktivacijskog statusa makrofaga.



Slika 34. Transkripcijska ekspresija CCR5 nakon 72 sata utišavanja DPP9 gena.

Rezultati jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima prikazani su kao relativna ekspresija u odnosu na onu dobivenu u kontrolnim uzorcima bez tretmana; srednja vrijednost \pm SD triplikata.

4.8.5. Ekspresija DPP4

Kako bi se ispitala hipoteza kompenzira li se nedostatak jedne peptidaze pojačavanjem ekspresije druge ispitana je mogućnost pojave ekspresije DPP4 nakon utišavanja DPP9. Nakon 72 sata utišavanja DPP9 provjereno je dolazi li do kompenzatorne pojave ekspresije DPP4 što je ispitano na transkripcijskoj razini. Rezultati su pokazali da nakon utišavanja DPP9 ne dolazi do indukcije ekspresije DPP4 (rezultati nisu prikazani).

U ovom radu ispitana je ekspresija DPP9, novog člana obitelji DPP4 enzima, u mišjim hematopoetskim i limfatičnim tkivima kao i u stanicama makrofagnog i limfocitnog porijekla, te uspoređena s ekspresijom DPP4, glavnog predstavnika DPP4 obitelji. Obrazac razine ekspresije DPP9 mRNA bio je sličan onom dobivenom za DPP4 mRNA: peritonealni makrofagi < koštana srž < slezena < limfni čvorovi. Mišja makrofagna linija J774 eksprimira visoku razinu DPP9 mRNA, dok ne eksprimira inače dominantnu DPP4 što je čini dobrim modelom za proučavanje DPP9. U stanicama J774 ispitana je lokalizacija i sublokalizacija DPP9, kao i lokalizacija enzimske aktivnosti slične DPP4. Većina J774 stanica eksprimira DPP9 protein unutar stanice, dok tek manji dio stanica pokazuje prisutnost DPP9 i na staničnoj membrani. Enzimska aktivnost slična DPP4 u J774 stanicama lokalizirana je većinom u citoplazmatskoj frakciji te u manjem udjelu u sadržaju vezikula/organela i frakciji ukupnih staničnih membrana što je u skladu s opaženom proteinskom lokalizacijom DPP9. Nadalje, korištenjem makrofagne linije J774, ispitana je moguća uloga DPP9 u endocitozi, adheziji, proliferaciji i aktivaciji makrofaga. Endocitoza ovalbumina potaknula je promjenu lokalizacije DPP9 proteina u vezikule, gdje kolokalizira s endocitiranim ovalbuminom. *In vivo* i *in vitro* aktivacija makrofaga smanjila je ekspresiju DPP9. Utišavanje DPP9 u J774 stanicama bilo je povezano sa smanjenom proliferacijom stanica i povećanjem ekspresije aktivacijskog markera CCR5. Utišavanje DPP9 međutim nije imalo učinka na ispitivana adhezijska svojstva J774 stanica i nije uzrokovalo kompenzatornu pojavu ekspresije DPP4.

Na postojanje i drugih enzima koji dijele sličnu supstratnu specifičnost s DPP4 najprije su upućivala istraživanja na eksperimentalnim životinjama u kojih je izbačen (*DPP4 KO*) ili mutiran gen za DPP4. Naime, u tkivima *DPP4 KO* miševa nađena je znatna ostatna enzimska aktivnost prema supstratima koji su smatrani specifičnim za DPP4 (Smith i sur. 1992). Ova se ostatna enzimska aktivnost slična DPP4 mogla dodatno smanjiti pomoću inhibitora koji su se smatrali selektivnim za DPP4 (Reinhold i sur. 2009).

Kasniji su radovi pokazali da se ostatna enzimska aktivnost slična DPP4 u *DPP4 KO* eksperimentalnih životinja može pripisati drugim dipeptidil-prolil peptidazama (Yu i sur. 2009). Ovo otkriće postavilo je pitanje reevaluacije uloge DPP4 s obzirom na nepoznat udio uključenosti novootkrivenih enzima u ranije opisanim učincima, do tada isključivo pripisivanim DPP4 (Gorrell 2005). Dakle, otkrićem novih članova DPP4 obitelji enzima

postavilo se pitanje o preklapanju funkcija DPP4 sa srodnim enzimima (Rosenblum i Kozarich 2003), kao i kompenzira li se nedostatak DPP4 djelovanjem sličnih enzima (Yu i sur. 2009).

5.1. Ekspresija DPP9 – usporedba s DPP4

S obzirom na preklapanje supstratne specifičnosti DPP4 i DPP9 (i DPP8) pretpostavljeno je da se radi o redundantnim enzimima. U tom bi se slučaju očekivalo da će smanjena ekspresija DPP4 biti povezana s višom ekspresijom DPP9 (i DPP8), i obrnuto (Yu i sur. 2009). Međutim, usporednih podataka o ekspresiji DPP4 i DPP9 (i DPP8) u literaturi je relativno malo. Pokazana je prisutnost DPP4 i DPP9 u različitim uzorcima stanica i tkiva i to na temelju *Northern* (Olsen i Wagtmann 2002; Ajami i sur. 2004) i *in situ hibridizacija* (Yu i sur. 2009) te na temelju mjerenja enzimske aktivnosti (Yu i sur. 2009). Oba enzima pokazala su široku tkivnu distribuciju (Yu i sur. 2009). *In vivo* usporedno ispitivanje distribucije DPP4 i DPP9 na osnovi enzimske aktivnosti slične DPP4 ukazivalo je na sličnu distribuciju ovih enzima u ispitivanim tkivima, te uglavnom veći udio DPP4. S obzirom na poznatu veću katalitičku učinkovitost DPP4 u odnosu na onu DPP9 (i DPP8) (Bjelke i sur. 2006) nije moguće precizno zaključivati o pojedinačnom doprinosu svake od njih, međutim relativna prevalencija DPP4 opažena je u slezeni, jetri i bubregu (Yu i sur., 2009).

Dosad objavljena istraživanja dala su uvid u postojanje ekspresije DPP9 i u imunskim organima i stanicama (Yu i sur. 2009), međutim bez relativnih odnosa ekspresije između ispitivanih srodnih enzima bilo u pojedinim organima ili stanicama. Podaci o paralelnoj ekspresiji DPP4 i DPP9 na mišjim stanicama makrofagnog i limfocitnog porijekla i mišjim hematopoetskim i limfatičnim tkivima dosad nisu objavljeni. Međutim, profil enzimske aktivnosti koji je opažen u tkivima *DPP4 KO* miševa, može se pripisati DPP9/DPP8 (Yu i sur. 2009; Zhang i sur. 2013), te je u dobroj korelaciji s ekspresijskim profilom DPP9 dobivenim u ovom radu na transkripcijskoj razini pokazujući sljedeći redoslijed razine ekspresije: koštana srž < slezena < limfni čvorovi. Nalaz ekspresije DPP9 u koštanoj srži nađen u ovom radu važan je jer je u koštanoj srži prethodno pokazana zanemariva enzimska aktivnost pripisana DPP9/DPP8 (Yu i sur. 2009; Zhang i sur. 2013). Ekspresija DPP9 mRNA u koštanoj srži zanimljiva je i zbog pokazanog učinka neselektivnog inhibitora DPP4 Val-boroPro na

poticanje hematopoeze u koštanoj srži i u odsutnosti ekspresije DPP4, koji je do sada pripisivan isključivo FAP- α (Jones i sur. 2003).

Harstad i sur. (2013) nedavno su objavili rezultate istraživanja usporedne ekspresije DPP4, DPP8 i DPP9 (mRNA, proteinske ekspresije i enzimске aktivnosti) u tkivima štakora i majmuna. Međutim u navedenom radu rezultati nisu prikazani na način kojim bi se ekspresije ispitivanih enzima ili njihove enzimске aktivnosti mogle međusobno uspoređivati. Pored toga, navedeno istraživanje nije obuhvatilo tkiva koja su predmet ovog istraživanja, poput limfnih čvorova, hematopoetskih stanica koštane srži, kao ni peritonealne makrofage.

Nadalje, rezultati istraživanja Harstad i sur. (2013) su pokazali relativno nisku varijabilnost enzimске aktivnosti DPP9/DPP8 među različitim tkivima (do tri puta). Naši rezultati ekspresije mRNA DPP9 pokazali su sličan raspon ekspresijske varijabilnosti između stanica koje ju najjače i najslabije ekspimiraju. Opažena stabilnost ekspresije DPP9 u skladu je njezinom važnom ulogom u razgradnji citosolnih peptida (Geiss-Friedlander i sur. 2009).

Dakle, rezultati usporedne transkripcijske ekspresije DPP4 i DPP9 u tkivima miševa dobiveni u ovom radu u skladu su s ranije opisanom širokom tkivnom distribucijom i DPP4 i DPP9 (nađenom u čovjeka, miša i majmuna) (Yu i sur. 2009). Nadalje, rezultati ovoga rada po prvi puta u literaturi pokazuju da je transkripcijski ekspresijski obrazac DPP4 podjednak onom u DPP9, te ne podupiru hipotezu o redundantnosti DPP9, koja bi predvidivo bila povezana s recipročnim obrascem ekspresije DPP4 i DPP9.

Sumarno, rezultati usporednog ekspresijskog profila DPP4 i DPP9 dobiveni u ovom radu pokazuju da ne postoji recipročnost bazalne ekspresije DPP9 i DPP4 u ispitivanim tkivima: imunosna tkiva i stanice s višom ekspresijom DPP4 imaju i višu ekspresiju DPP9, i obrnuto.

Izuzetak ovom nalazu predstavljaju rezultati dobiveni na makrofagnoj liniji J774. Naime, J774 stanice ne ekspimiraju DPP4 mRNA, ali snažno ekspimiraju DPP9 mRNA. Slično je opaženo i kod karcinoma dojke (Wilson i Abbott 2012): linije koje su imale najvišu ekspresiju DPP9 nisu ekspimirale DPP4.

Može se stoga pretpostaviti da povezanost ekspresije DPP9 vs DPP4 ovisi o tkivu, odnosno tipu stanica na kojima se ekspimiraju.

5.2. Lokalizacija DPP9

Rezultati ovog istraživanja, dobiveni pomoću protočne citometrije i imunocitokemije, pokazali su dominantno citoplazmatsku ekspresiju DPP9 u stanicama makrofagne linije J774. Unutarstaničnu lokalizaciju DPP9 karakteriziralo je difuzno obojenje u citoplazmi i intenzivnije obojenje u području uz jezgru (ER/Golgijev aparat). Ovi rezultati podupiru dosadašnje podatke o lokalizaciji DPP9 koji su dobiveni na staničnim modelima transfeciranim konstruktima za ekspresiju DPP9 (Ajami i sur. 2004; Yu i sur. 2006; Wilson i sur. 2013). Rezultati ovog istraživanja dobiveni su na J774 stanicama makrofagnog porijekla koje endogeno eksprimiraju DPP9.

Pitanje mogućnosti lokalizacije DPP9 na staničnoj membrani postavilo se nakon što je u slijedu aminokiselina pronađen RGD motiv – najpoznatiji motiv za vezanje na integrine (Ajami i sur. 2004). Odmah je postavljeno intrigantno pitanje o ulozi tog slijeda na proteinu koji je opisan kao citoplazmatski (Ajami i sur. 2004; Yu i sur. 2006). Međutim, RGD motiv bi mogao dati objašnjenje za prisutnost ljudske DPP9 na membrani, ali ne i mišje, u kojoj je RGD mutiran (promjena u AGD). Ipak postojanje RGD motiva u ljudskoj DPP9 (UniProtKB oznaka Q86T12) ne čini se slučajno jer je sačuvan u nizu drugih vrsta (goveda, *Bos taurus*/E1B131; konja, *Equus caballus*/F6RKN6; psa, *Canis familiaris*/E2R8Z1; gorile, *Gorilla gorilla gorilla*/G3QK41; čimpanze, *Pan troglodytes*/H2QF24). Isto tako ni mišja DPP9 (Q8BVG4) nije iznimka jer su mutacije RGD opažene i u drugim vrstama (npr. kod štakora, *Rattus norvegicus*/MOR781; zamorca, *Cavia porcellus*/HOWCC0; žabe, *Xenopus laevis*/Q6GR22; izvor proteinskih sljedova za usporedbu bila je baza UniProt: <http://www.uniprot.org/align/>).

Rezultati određivanja proteinske ekspresije i lokalizacije DPP9 na J774 stanicama prikazani u ovom radu upućuju na ekspresiju DPP9 i na staničnoj membrani, te su u skladu s nalazima Bank i sur. (2011) dobivenim s mišjim splenocitima. Membransku ekspresiju DPP9 karakterizira diskretno točkasto obojenje cijele stanične membrane ili intenzivnije obojenje samo jednog njezinog dijela. Međutim, relativno niska ekspresija DPP9 na staničnoj membrani i prisutnost samo na subpopulaciji stanica upućuje na ulogu DPP9 koja se javlja tek pri određenim uvjetima. Vizualizacija endogene DPP9 lokalizirane na membrani pomoću

imunocitokemije predstavlja prvi takav nalaz u literaturi, koji nije bio nađen korištenjem modela stanica s transfeciranom DPP9 (Ajami i sur. 2004).

Rezultati ovoga istraživanja ukazuju da mišja DPP9, unatoč mutaciji unutar RGD, može lokalizirati na plazmatskoj membrani. Bank i sur. (2011) membransku ekspresiju DPP9 pripisuju njezinim nekovalentnim interakcijama s nepoznatim komponentama na membrani stanica. Moguće objašnjenje pojave DPP9 na membrani bila bi njezina heterodimerizacija s nekim od ostalih *DASH* kao što je opisano za DPP4 i FAP- α (Ghersi i sur. 2002) ili putem već opisane interakcije s malom GTP-azom H-Ras koja se među ostalim u manjoj mjeri može naći na staničnoj membrani (Jiang i Sorkin 2002).

Ipak, dominantna ekspresija u citoplazmi uz tek manju ekspresiju na staničnoj membrani sugerira da membranski prisutna DPP9 vjerojatno ne može zamijeniti DPP4 u cijepanju izvanstaničnih biološki aktivnih peptida.

Rezultati ovoga rada u skladu su s dosadašnjim rezultatima iz literature o dominantno citoplazmatskoj lokalizaciji DPP9 te potkrepljuju hipotezu o nezavisnoj ulozi DPP9, a ne kao „rezervnoj“ varijanti DPP4.

5.3. Lokalizacija enzimske aktivnosti slične DPP4

Podataka o *in vivo* razgradnji prirodnih supstrata pomoću DPP9 u literaturi je još uvijek relativno malo. Primjenom najnovijih metoda degradomike nedavno su predloženi prirodni supstrati DPP9. Mogući kandidati za razgradnju putem DPP9 nalaze se ne samo u citoplazmi, već su prisutni i u staničnim organelima (Wilson i sur. 2013).

U ovom radu je u svrhu određivanja lokalizacije enzima sličnih DPP4, mjerena enzimska aktivnost u pojedinim frakcijama lizata J774 stanica. Nađena je većinom u citoplazmatskoj frakciji (67%) dok je manji postotak prisutan u sadržaju vezikula/organela (10%) i frakciji ukupnih staničnih membrana (23%). Dobiveni rezultati su u skladu s podacima Wrenger i sur. (2006) koji su na ljudskim monocitima iz periferne krvi pokazali sličan obrazac raspodjele enzimske aktivnosti po frakcijama lizata stanica (u citoplazmi preko 80%, unutar vezikula/organela oko 4%, te u frakciji koja sadrži membrane oko 12% enzimske aktivnosti).

Ukupna enzimaska aktivnost slična DPP4 mjerena u R1.1 stanicama mišje linije T limfocitnog porijekla, koje eksprimiraju membransku DPP4, imala je očekivano drugačiju raspodjelu: 18% u citoplazmi, 10% u vezikulama/organelima i 72% u frakciji koja sadrži membrane. Rezultati drugačije raspodjele enzimske aktivnosti slične DPP4 dobiveni na R1.1 stanicama potvrđuju valjanost postupka frakcioniranja stanica.

DPP inhibitor sitagliptin upotrebljen je za zaključivanje o prirodi enzima u pojedinim izdvojenim staničnim frakcijama. Razlika u IC_{50} vrijednostima za DPP4 i za ostale DPP (Kirby i sur. 2010) omogućila je selektivnu inhibiciju DPP4 i DPP9/DPP8.

U ukupnom lizatu J774 stanica enzimaska aktivnost slična DPP4 bila je otporna (neosjetljiva) na sitagliptin u niskoj koncentraciji (0,5 μ M), dok je u ukupnom lizatu R1.1 stanica, bila smanjena na 26% u odnosu na onu u odsutnosti inhibitora. Dakle, sitagliptin u niskoj koncentraciji (0,5 μ M) selektivno inhibira DPP4 (eksprimiranu na R1.1 stanicama), dok ne djeluje na DPP9 (eksprimiranu u J774 stanicama u odsutnosti DPP4).

Kako stanice J774 nemaju eksprimiranu DPP4 inhibicija je bila i očekivana samo s većom koncentracijom sitagliptina u svim frakcijama. Doista, viša koncentracija sitagliptina inhibirala je enzimsku aktivnost sličnu DPP4 u svim frakcijama, a sličan postotak inhibicije mogao bi upućivati i na sličan sastav enzima u pojedinim frakcijama. Ipak, postotak inhibicije u frakcijama koje sadrže ukupne stanične membrane odnosno sadržaj vezikula/organela bio je nešto manji nego u citoplazmatskoj frakciji što može upućivati na postojanje i drugih enzima koji su slični po supstratnoj specifičnosti, ali su manje osjetljivi (ili neosjetljivi) na sitagliptin. DPP2 bi teoretski mogla doprinijeti enzimskoj aktivnosti u frakciji sa sadržajem vezikula budući da je njezina lokalizacija upravo u vezikulama (Maes i sur. 2005). Međutim, doprinos DPP2 je vjerojatno vrlo malen s obzirom da bi pri pH 7,4 pri kojem je obavljeno mjerenje, enzimaska aktivnost DPP2 predvidivo bila vrlo niska, budući da joj je optimum aktivnosti pri nižim pH vrijednostima (5.5) (Maes i sur. 2005).

Rezultati inhibicije aktivnosti slične DPP4 na stanicama J774 u skladu su s očekivanjima i podupiru ranije opaženu lokalizaciju DPP9 u citoplazmi i na staničnoj membrani (dobivenu protočnom citometrijom i vizualiziranu imunocitokemijski). Rezultati inhibicije enzimske aktivnosti slične DPP4 dobiveni na stanicama R1.1 također su bili u skladu s očekivanjima.

Zbog prisutnosti DPP4 na tim stanicama već s nižom koncentracijom sitagliptina došlo je do inhibicije enzimske aktivnosti, što potvrđuje da je upotrijebljena koncentracija sitagliptina (0,5 μ M) bila selektivna, razlikujući DPP4 od DPP9/DPP8.

Međutim, iako je ekspresija DPP4 i DPP9 u stanicama R1.1 na mRNA razini približno jednaka, omjer membranske (dominantno DPP4) i citoplazmatske (dominantno DPP9/DPP8) enzimske aktivnosti slične DPP4 u R1.1 stanicama iznosio je 6,4:1. Ovaj nalaz vjerojatno odražava veću aktivnost DPP4 u odnosu na DPP9. Naime, pokazano je da DPP4 u odnosu na DPP9 ima veću katalitičku učinkovitost prema supstratu Gly-Pro-pNA (Bjelke i sur. 2006).

Sitagliptin u nižoj koncentraciji inhibirao je neočekivano i enzimsku aktivnost u citoplazmi R1.1 stanica (36% u odnosu na onu u odsutnosti inhibitora). Dobivena bi se inhibicija mogla pripisati citoplazmatskoj DPP4. Naime, iako primarno eksprimirana na membrani DPP4 je nađena i unutarstanično u stanicama jetre (Harstad i sur. 2013). Međutim, stvarni udio DPP4 u citoplazmi je vjerojatno znatno manji od opaženog stupnja inhibicije, zbog već spomenute veće katalitičke aktivnosti DPP4 vs DPP9/DPP8.

Dakle, rezultati ovoga rada pokazuju enzimsku aktivnost sličnu DPP4, koja se na osnovi selektivne osjetljivosti na inhibitor sitagliptin može pripisati DPP9/DPP8 na različitim lokalizacijama u stanici, uključujući citoplazmu, staničnu membranu i membrane organela, kao i unutar organela i vezikula. Rezultati ovog rada zajedno s nedavnim rezultatima Wilson i sur. (2013) da se mogući supstrati DPP9 također nalaze u citosolu i organelima (npr. lizosomima) upućuju na moguće fiziološko značenje DPP9 u cijepanju opisanih endogenih supstrata. Ranije dokazani prirodni supstrat DPP9, NPY također je prisutan u nekoliko odjeljaka stanice (citosol, nukleoplazma, mitohondriji) gdje bi mogao doći u kontakt s DPP9 (Lu i sur. 2011).

Nalaz DPP9 u frakciji sa sadržajem organela i vezikula otvara pitanje o mogućem fiziološkom značenju, tj. o učinku DPP9 na peptidne supstrate koji se nalaze unutar vezikula. DPP9 bi npr. mogla sudjelovati u regulaciji biološke aktivnosti peptida pohranjenih u vezikulama prije njihove sekrecije.

DPP9 bi također mogla imati pristup i drugim, primjerice antigenim peptidima s kojima se nađe u istom odjeljku. Posljednja je hipoteza u skladu s rezultatima Geiss-Friedlander i sur.

(2009) koji predlažu da bi DPP9 mogla imati ulogu u konačnoj odgradnji peptida prije vezanja za MHC molekule klase I u tijeku prezentacije antigena. Pri tome bi uloga DPP9 bila regulatorna, tj. ovisno o slijedu i duljini peptida, DPP9 bi mogla omogućiti ili onemogućiti prezentaciju antigena, te tako utjecati na specifični imunosni odgovor.

5.4. Uloga DPP9 lokalizirane u vezikulama

DPP9 je dosad većinom opisivana kao citoplazmatski enzim (Ajami i sur. 2004; Yu i sur. 2006; Wilson i sur. 2013) te se postavlja pitanje njezine pojačane prisutnosti u Golgijevom aparatu (Golgiju). S obzirom na pokazanu lokalizaciju DPP9 proteina u području ER/Golgi (Ajami i sur. 2004; Yu i sur. 2006) gdje se nalaze sastavnice mašinerije za prezentaciju antigena (Kreer i sur. 2011) u ovom je radu ispitano utječe li receptorski inducirana endocitoza ovalbumina na relokalizaciju DPP9 proteina.

Rezultati ovoga rada pokazali su da nakon endocitoze ovalbumina dolazi do promjene lokalizacije DPP9 proteina koja se očitovala u gubitku intenzivnijeg bojanja u području uz jezgru i pojavi intenzivno obojenih vezikula u citoplazmi. Dakle, nakon endocitoze ovalbumina DPP9 lokalizirana u vezikulama, kolokalizirajući s endocitiranim ovalbuminom, ukazuje na moguću ulogu DPP9 u procesiranju ovalbumina u endosomima. Opažena kolokalizacija nije bila ograničena samo na područje uz vezikule/endosome pri unutarnjoj strani plazmatske membrane, već je bila prisutna i u vezikulama u dubljim dijelovima citoplazme.

Poznato je da se ovalbumin u stanicu unosi putem manoznih receptora (Amigorena i Savina 2010; Kreer i sur. 2011). Manozni receptori se povezuju s putem križne prezentacije antigena kojim se izvanstanični antigeni prezentiraju putem MHC klase I, a ne klase II (Kreer i sur. 2011). Križna prezentacija odvija se u endosomima/vezikulama koji su zaustavljeni u sazrijevanju te u njima ne dolazi do zakiseljavanja (Amigorena i Savina 2010). U takvim bi uvjetima neutralnog pH DPP9 mogla biti enzimski aktivna, što govori u prilog hipotezi da bi DPP9 unutar endosoma/vezikula mogla biti uključena u križnu prezentaciju putem svoje enzimске aktivnosti. Dakle, rezultati ovog rada govore da bi DPP9 mogla biti uključena u preradu antigena za prezentaciju i to unutar (specijaliziranih) endosoma/vezikula, a ne

isključivo unutar citosola kako je ranije predloženo (Geiss-Friedlander i sur. 2009). Međutim, prirodu endosoma trebalo bi tek potvrditi pomoću specifičnih markera.

Signal za promjenu lokalizacije DPP9 iz Golgija u endosome/fagosome mogao bi biti vezanje liganda na manozne (Gordon 2007) ili TLR receptore (Kreer i sur. 2011), kao i međudjelovanje ovih dvaju tipova receptora (Geijtenbeek i Gringhuis 2009).

Nadalje, prisutnost DPP9 u vezikulama/endosomima opažena u ovom radu ukazuje da DPP9 može imati pristup i već poznatim prirodnim peptidnim supstratima DPP4, te da bi mogla sudjelovati u regulaciji njihovog sazrijevanja i/ili inaktivacije. Mogućnost interakcije s DPP9 primjerice postoji kod NPY koji je kao i DPP9 lokaliziran u vezikulama koje se odvajaju iz Golgija (Frerker i sur. 2007). DPP9 bi s potencijalnim supstratima mogla doći u kontakt i u slučaju unosa kompleksa peptid-receptor putem endocitoze. Slična uloga na temelju *in vitro* cijepanja određenih kemokina već je predložena za srodnu peptidazu DPP8 (Ajami i sur. 2008).

5.5. Ekspresija DPP9 na aktiviranim stanicama

U prilog uključenosti DPP9 u imunosne i upalne procese govori ekspresija DPP9 nađena na leukocitima (Maes i sur. 2007) kao i povišena ekspresija DPP9 u aktiviranim limfocitima (Chowdhury i sur. 2013). Kako je većina dosadašnjih istraživanja bila usmjerena na ulogu DPP9 u limfocitima (Lankas i sur. 2005; Reinhold i sur. 2009; Bank i sur. 2011; Chowdhury i sur. 2013) u ovom radu ispitana je ekspresija DPP9 na stanicama makrofagnog porijekla, kao i mogući učinak aktivacije tih stanica na ekspresiju DPP9.

Primarni makrofagi (neaktivirani i aktivirani) dobiveni su iz ispirka peritonealne šupljine bez prethodne aktivacije ili pet dana nakon aktivacije glikogenom. Rezultati su pokazali da neaktivirani makrofagi eksprimiraju visoku razinu DPP9 mRNA dok je razina DPP4 mRNA bila niska. Nadalje, *in vivo* aktivacija makrofaga različito je utjecala na ekspresiju DPP9 i DPP4, tj. smanjila je ekspresiju DPP9, a pojačala ekspresiju DPP4. Rezultati upućuju na različitu regulaciju ova dva enzima i predstavljaju prvi takav nalaz u literaturi. Nasuprot ovom nalazu dobivenom na makrofagima pokazano je da aktivacija limfocita fitohemaglutininom (engl. *phytohaemagglutinin*, PHA) povećava ekspresiju i DPP4 i DPP9 mRNA (Bank i sur. 2011).

Slično rezultatima ovog rada Rohnert i sur. (2012) su opisali prolazno smanjenje ekspresije DPP9 u uzorcima mozga štakora kod neuroinflamacije uzrokovane ishemijom mozga. Smanjenje ekspresije DPP9 tri dana nakon ishemije u zahvaćenom dijelu mozga podudara se s maksimumom aktivacije makrofaga i mikroglia stanica (Rohnert i sur. 2012).

Smanjena ekspresija DPP9 u aktiviranim makrofagima mogla bi dijelom odražavati i različit stupanj diferencijacije stanica u ispitivanim uzorcima neaktiviranih i aktiviranih makrofaga. Naime, pojačana ekspresija DPP9 pokazana je na ljudskim makrofagima diferenciranim iz monocita periferne krvi (Matheussen i sur., 2013), kao i u stanicama mijelo-monocitne ljudske linije HL-60 (Čupić i sur. 2013). Zanimljivo je istaknuti, da nakon diferencijacijom izazvane pojačane ekspresije DPP9, njezinu ekspresiju nije bilo moguće dodatno pojačati aktivacijom (Matheussen i sur. 2013).

Sličan obrazac regulacije DPP9 koji je nađen kod primarnih makrofaga, uočen je i kod stanica J774 makrofagnog porijekla. Aktivacija je inducirana kombiniranim tretmanom interferonom- γ i LPS-om u niskim koncentracijama (2,5 ng/mL odnosno 10 ng/mL; usmjeravanje u M1 fenotip; Mantovani i sur. 2004), te provjerena određivanjem aktivacijskog markera CCR5. Smanjena ekspresija DPP9 nakon aktivacije stanica J774 linije makrofagnog porijekla dala je dodatnu potvrdu da se aktivacijom makrofaga snižava ekspresija DPP9 u njima.

Opisani rezultati koji su pokazali smanjenu ekspresiju DPP9 nakon aktivacije primarnih makrofaga i stanica J774 linije makrofagnog porijekla ukazuju da bi djelovanje DPP9 na njezine supstrate u makrofagima moglo biti regulirano aktivacijskim statusom makrofaga.

Nedavni rezultati Matheussen i sur. (2013) upućuju također da bi DPP9 eksprimirana na makrofagima mogla sudjelovati kao regulator aktiviranih makrofaga. Autori su naime pokazali da je DPP9, eksprimirana na ljudskim makrofagima koji su diferencirani iz monocita periferne krvi, uključena u proupalne reakcije: selektivni inhibitor DPP9/DPP8 smanjio je lučenje proupalnih citokina TNF- α i IL-6. Međutim, moguće je da je smanjeno lučenje citokina posljedica manjeg broja preživjelih stanica nakon tretmana inhibitorom koji istovremeno izaziva apoptozu stanica, a ne direktno inhibicije enzimske aktivnosti DPP9/DPP8.

5.6. Utišavanje gena kao metodološki pristup za proučavanje funkcija DPP9

Dosad korišteni modelni sustav kojim se pokušao dobiti uvid u moguće uloge DPP9 bile su stanične linije s prekomjerno eksprimiranim DPP9 proteinom. U tim istraživanjima proučavala se uloga samo produkta kraće varijante DPP9 mRNA (Yu i sur. 2006; Yao i sur. 2011).

U proteklih nekoliko godina sljedovi DPP9 transkripata prošli su nekoliko revizija u bazama podataka te su u NCBI bazi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) nakon najnovije revizije od 27. 1. 2014. odnosno 3. 2. 2014. validirane varijante ljudskog (NM_139159.4) i mišjeg (NM_172624.3) DPP9 transkripta dugačke 4286 pb odnosno 3509 pb.

U nizu istraživanja u kojima su se koristile stanice transfecirane konstruktima za ekspresiju DPP9 proučavala se uloga samo produkta kraće varijante DPP9 mRNA od 863 aminokiselina (Ajami i sur. 2004; Yu i sur. 2006; Yao i sur. 2011) za koju se smatralo da je funkcionalna. Ipak nakon najnovije revizije sljedova ljudskog i mišjeg DPP9 proteina kao validirane varijante navode se ljudski DPP9 od 892 aminokiseline (NP_631898.3; revidiran 27. 1. 2014.) i mišji DPP9 od 862 aminokiseline (NP_766212.2; revidiran 3. 2. 2014.).

U ovom istraživanju korištene su početnice i proba za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu kao i protutijelo koji su napravljeni na katalitičku regiju DPP9 proteina (na C-kraju) kojima se dakle mogu detektirati sve do sada zabilježene varijante DPP9. Stoga rezultati ovoga rada dobiveni na primarnim makrofagima kao i na stanicama J774 linije makrofagnog porijekla, koje endogeno eksprimiraju DPP9, omogućuju bolji uvid u moguće fiziološko značenje DPP9 u stanicama makrofagnog porijekla.

Utišavanje DPP9 gena nametnulo se kao pristup za selektivno proučavanje uloge DPP9. U slučaju DPP9 tradicionalni je pristup u kojem se uloga enzima proučava učinkom njegovog inhibitora bio otežan zbog nepostojanja DPP9 selektivnog inhibitora. Naime zbog visokog stupnja homologije DPP9 i DPP8 u katalitičkom dijelu (86% sličnih i 72% identičnih aminokiselina) (Rummey i Metz 2007) svi dosad sintetizirani inhibitori nisu mogli postići potrebnu razinu selektivnosti prema jednoj od njih (Van Goethem i sur. 2011). Pored navedenog, moguće funkcije DPP9 koje se ostvaruju neovisno o njezinoj enzimskoj aktivnosti (tzv. ekstraenzimske aktivnosti), nemoguće bi bilo pokazati, čak i uz postojanje

selektivnog DPP9 inhibitora. Dakle, utišavanje DPP9 gena predstavlja pristup izbora za selektivno proučavanje mogućih uloga DPP9, neovisno o tome da li su iste ovisne ili neovisne o enzimskoj aktivnosti.

Utišavanje gena DPP9 u J774 stanicama provedeno u ovom radu rezultiralo je smanjenjem DPP9 proteina. Smanjenje proteinske ekspresije DPP9 u jednakoj je mjeri pratilo i smanjenje enzimске aktivnosti slične DPP4. Rezultati sugeriraju da je DPP9 u stanicama J774 enzimski aktivna. Ovo je i prvi nalaz u literaturi, koji pokazuje enzimsku aktivnost mišje DPP9 u stanicama makrofagnog porijekla koje ju endogeno ekspimiraju.

5.7. Uloga DPP9 u proliferaciji

Moguća uloga DPP9 u regulaciji proliferacije stanica makrofagnog porijekla ispitana je u J774 stanicama nakon utišavanja DPP9 gena. Rezultati su pokazali da je stanicama s utišanim DPP9 genom proliferacija smanjena u odnosu na proliferaciju stanica koje su tretirane kontrolnim utišavačem (ili netretiranih stanica). Ovi bi rezultati upućivali da je DPP9 u ispitivanim stanicama pozitivni regulator proliferacije. Dobiveni rezultati u skladu su s podacima iz literature koji govore o smanjenoj proliferaciji T limfocita nakon tretmana inhibitorima DPP9/DPP8 (Reinhold i sur. 2009).

Nedavno su Matheussen i sur. (2013) pokazali da dualni inhibitor DPP9/DPP8 potiče spontanu apoptozu ljudskih diferenciranih i aktiviranih monocita. U ovom radu nije ispitivan učinak utišavanja DPP9 gena na apoptozu J774 stanica, no stanice s utišanim DPP9 genom nisu imale vidljivih znakova apoptoze i morfološki se nisu razlikovale od kontrolnih, netretiranih stanica. Moguće objašnjenje za ovo neslaganje je razlika u selektivnosti primijenjenih tretmana: ciljano djelovanje na DPP9 u ovom istraživanju vs neselektivni inhibitor koji djeluje i na DPP9 i na DPP8 (Matheussen i sur., 2013).

Utjecaj DPP9 na proliferaciju mogao bi biti posredovan već opisanom interakcijom s H-Ras koji se kao i DPP9 može naći u endosomima (Jiang i Sorkin 2002). Također, pokazani učinak DPP9 na proliferaciju makrofaga ima i biološku (fiziološku) značajnost jer je pokazano da makrofagi (M2 fenotipa) mogu proliferirati i *in situ* (Jenkins i sur. 2011).

Rezultati ovoga rada koji sugeriraju DPP9 kao pozitivni regulator proliferacije u skladu su s nedavnim podacima Spagnuola i sur. (2013) o sinergističkom djelovanju protutumorskog lijeka partenolida s inhibitorom vildagliptinom u smanjenju proliferacije leukemijskih stanica mijeloidnog porijekla. Autori su pokazali da se sinergistički učinak vildagliptina ostvaruje putem njegovog djelovanja na DPP9 i DPP8, dok ne uključuje interakciju s DPP4. Na pozitivni učinak DPP9 u regulaciji proliferacije stanica mogla bi upućivati i povišena ekspresija DPP9 u tumorima testisa i jetri oboljelih od hepatocelularnog karcinoma (Kurokawa i sur. 2003; Yu i sur. 2009).

Međutim, treba naglasiti da su opisani rezultati koji govore da DPP9 pozitivno regulira proliferaciju stanica u kojima je endogeno eksprimirana, u suprotnosti s rezultatima dobivenim na stanicama u koje je DPP9 transfecirana. Naime, u modelnim stanicama s prekomjerno eksprimiranom DPP9 također je opažena smanjena proliferacija uz povećanu spontanu i induciranu apoptozu (Yu i sur. 2006; Yao i sur. 2011).

Zaključno, u ovom radu opažena uloga DPP9 u pozitivnoj regulaciji proliferacije stanica makrofagnog porijekla dobivena je na modelu stanica koje endogeno eksprimiraju DPP9, a uz to ne eksprimiraju DPP4, te predstavljaju bolji model za procjenu moguće fiziološke uloge DPP9 u regulaciji proliferacije nego što su to modeli s transfeciranom DPP9 u prekomjernoj količini.

5.8. Uloga DPP9 u adheziji

Na modelima transfekcije u HepG2 i HEK293T stanicama pokazana je moguća uloga DPP9 u adheziji stanica (Yu i sur. 2006). Prekomjerna ekspresija DPP9 bila je povezana sa smanjenom adhezijom na kolagen tipa I uz istodobno smanjenje ekspresije DDR1 neintegrinskog kolagenskog receptora te nekoliko drugih molekula uključenih u adheziju. Za prisutnost RGD slijeda na ljudskoj DPP9 pokazalo se da nema utjecaja na adheziju stanica na ispitivane podloge (Yu i sur. 2006).

Osim razlike u prisutnosti RGD slijeda između ljudske i mišje DPP9 također postoji nešto manji stupanj homologije u središnjem dijelu tih proteina za koji se na temelju sličnosti s DPP4 može pretpostaviti da ima veznu ulogu. Na temelju navedenog moglo bi se

pretpostaviti da razlike u središnjem dijelu DPP9 proteina miša i čovjeka mogu imati i funkcionalne posljedice u njihovim različitim svojstvima vezanja drugih proteina (i prosljedično adheziji).

Kako je u radu Yu i sur. (2006) promjenom ekspresije DPP9 zabilježena promjena DDR1 receptora za kolagene I–IV pretpostavljene su moguće promjene vezanja i na druge tipove kolagena te je ispitan utjecaj na adheziju na kolagen tipa IV. DDR1 kolagenski receptor ima citoplazmatsku domenu (Vogel i sur. 1997) preko koje je potencijalno moguća interakcija s citoplazmatskom DPP9.

U ovom radu su ispitana adhezijska svojstva J774 stanica prije i poslije utišavanja DPP9 gena. Nakon utišavanja DPP9 gena nisu opažene razlike u adheziji stanica J774 ni na jednu ispitivanu podlogu (kolagen tipa IV, denaturirani goveđi serumski albumin i plastiku).

Stanice J774 u manjoj su mjeri adherirale na kolagen tipa IV. Na podlozi s kolagenom tipa IV stanice J774 stvarale su nakupine, dok su nasuprot tome na podlozi s BSA stanice bile ravnomjerno raspoređene i bolje adherirane. Slično grupiranje stanica već je opisano za makrofage na kolagenu tipa I (Koyama i sur. 2000). Vezanje makrofaga na BSA također je opisano u literaturi (Koyama i sur. 2000), a poznato je da makrofagi i fagocitiraju denaturirane proteine (što uključuje i denaturirani BSA) (Jozefowski i Marcinkiewicz 2010). U prisustvu seruma u mediju za vrijeme adhezije stanice J774 na kolagenu bile su ravnomjernije raspoređene i u konačnici ih je više adheriralo za podlogu. Sastojci seruma koje pomažu vezanje na kolagen vjerojatno su fibrinogen i fibronektin iz seruma koji i *in vivo* imaju i ulogu u prijanjanju makrofaga (primjerice na strana tijela u organizmu odnosno implantate) (van Loon i sur. 2013; Brodbeck i sur. 2003).

Kako se utišavanjem DPP9 gena očekivala pojačana adhezija očekivalo se da će se pretpostavljena promjena u vezanju na kolagen očitovati i u promjeni rasporeda stanica na podlozi kao je opaženo u slučaju dodatka seruma. Međutim nakon utišavanja DPP9 gena nisu dobivene razlike u adheziji stanica J774 ni na jednu ispitivanu podlogu koje bi se očitovale i bile vidljive kao drugačiji raspored stanica.

Zaključno, rezultati ispitivanja ovog rada sugeriraju da mišja DPP9 nema ulogu u adheziji (na ispitivane podloge) stanica makrofagnog porijekla koje ju endogeno ekspimiraju. Dobiveni

rezultati predstavljaju prvi takav nalaz u literaturi. Izostanak uloge mišje DPP9 u adheziji u suprotnosti je s rezultatima koji su dobiveni s ljudskom DPP9, prekomjerno eksprimiranom u transfeciranim stanicama. Razlozi za uočenu razliku su nepoznati, a mogli bi uključivati, razliku u mutiranom RGD motivu u mišjoj DPP9, razlike u središnjem dijelu proteina koji ima moguću veznu ulogu, kao i razliku u razini DPP9 ekspresije.

Razlike u funkcijama hematopoetskih serinskih proteaza miša i čovjeka već su zabilježene te proizlaze iz evolucijske prilagodbe na različiti životni vijek i različite patogene (Puentes i sur. 2003; Murray i Wynn 2011).

5.9. Uloga DPP9 u aktivaciji makrofaga

Zbog opaženih promjena ekspresije DPP9 uslijed *in vivo* i *in vitro* aktivacije ispitana je moguća povezanost niže razine ekspresije DPP9 s aktivacijskim fenotipom makrofaga, pri čemu je CCR5 služio kao marker aktivacije. Rezultati su pokazali da je utišavanje DPP9 gena bilo povezano s povećanjem ekspresije aktivacijskog markera CCR5. Ovi su rezultati u skladu s ranije opisanim smanjenjem ekspresije DPP9 na aktiviranim makrofagima, a mogli bi upućivati na to da je aktivacija makrofaga modulirana ekspresijom DPP9.

Matheussen i sur. (2013) su pokazali da utišavanje DPP9 gena u ljudskim monocitima rezultira smanjenom aktivacijom putem IFN- γ /LPS, mjerenom kao lučenje proupalnih citokina (TNF- α , IL-6). Međutim, treba napomenuti, da bi opaženo smanjenje lučenja citokina moglo biti posljedica smanjene proliferacije čiju mogućnost autori nisu komentirali, te posljedično manjeg broja stanica koje mogu lučiti citokine.

U ovom radu učinak utišavanja DPP9 ispitivan je na neaktiviranim stanicama makrofagnog porijekla, dok su Matheussen i sur. (2013) koristili makrofage koji su usmjeravani u M1 fenotip pomoću tretmana IFN- γ /LPS. U ovom radu o aktivaciji je zaključivano na osnovi ekspresije CCR5 koji iako je izvrstan marker makrofaga uključenih u kronične upalne bolesti (reumatoidni artritis i multipla skleroza) (Bruhl i sur. 2001), nije pokazatelj isključivo M1 puta aktivacije makrofaga (Mantovani i sur. 2004).

5.10. Kompenzacija smanjenja ekspresije DPP9

Moguća kompenzatorna uloga DPP4 u odnosu na DPP9 mogla bi se uočiti u stanicama J774 makrofagnog porijekla nakon utišavanja DPP4 gena. Rezultati su pokazali da utišavanje DPP9 gena nije bilo povezano s indukcijom ekspresije DPP4, koja bazalno nije eksprimirana na J774 stanicama. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima Lu i sur. (2011) koji su pokazali da utišavanje DPP9 u stanicama sarkoma ne dovodi do kompenzatorne pojačane ekspresije DPP4. Slično Frerker i sur. (2007) nisu našli pojačanu enzimsku aktivnost sličnu DPP4 u ekstraktima mozгова F344 štakora koji su DPP4 deficijenti.

Rezultati ispitivanja enzimske aktivnosti slične DPP4, kao i ispitivanja mogućnosti pojave kompenzatorne ekspresije DPP4 dobiveni nakon utišavanja DPP9 gena u J774 stanicama, pokazuju da DPP9 na J774 stanicama ima enzimsku aktivnost čiji nedostatak nije kompenziran s DPP4. Rad Gall i sur. (2013) o letalnom učinku gubitka enzimske aktivnosti DPP9 u miševa također govori u prilog da DPP9 ima posebnu ulogu u organizmu koja se ne kompenzira drugim srodnim enzimima (DPP8 i DPP4).

Zaključno, na temelju rezultata ispitivanja lokalizacije DPP9 proteina i inducirane endocitoze pretpostavljena je moguća uloga DPP9 u preradi izvanstaničnih antigena unutar endosoma/vezikula. Nadalje, ekspresija DPP9 ovisi o aktivacijskom statusu makrofaga što posljedično može utjecati i na ishod prezentacije antigena. Lokalna terapija tumora aktivatorom interferonom- γ već je predložena za primjenu usmjeravanja tumoru pridruženih M2 makrofaga u M1 protutumorski fenotip (Duluc i sur. 2009). Plastičnost makrofaga *in vivo* (Mantovani i sur. 2004), mogla bi stoga rezultirati boljim prezentiranjem tumorskih antigena.

Moguća praktična primjena ovih saznanja bila bi i aktivacija antigen prezentirajućih stanica (dendritičkih stanica) *ex vivo* za poticanje prezentacije tumorskih antigena (protutumorska terapija stanicama) (Pardoll 2002). Zanimljivo je napomenuti kako postoji niz tumorskih peptidnih antigena s prolinom na položaju dva koji bi mogli biti cijepani putem DPP9, a koji se prezentiraju unutar molekula MHC klase I (Renkvist i sur. 2001). Povoljan učinak na prezentaciju antigena mogao bi se polučiti i primjenom selektivnog inhibitora DPP9 koji bi inhibicijom njezine enzimske aktivnosti onemogućio neželjeno cijepanje antigenog peptida.

Ovaj hipotetski način regulacije putem DPP9 dao bi i još jedno objašnjenje za već opaženi učinak neselektivnog DPP4 inhibitora Val-boroPro na povećanje učinkovitosti poticanja specifičnog protutumorskog imunskog odgovora putem djelovanja na dendritičke stanice (Walsh i sur. 2013).

5.1. DPP inhibitori kao lijekovi: DPP9 poželjna ili nepoželjna meta

Rezultati dobiveni u ovome radu mogli bi biti značajni za budućnost kliničke primjene inhibitora enzima iz DPP4 obitelji u liječenju kroničnih upalnih bolesti. Na temelju dobivenih rezultata povezanosti snižene ekspresije DPP9 s aktivacijom makrofaga čini se da bi interferiranje putem inhibicije DPP9 u slučaju liječenja upalnih bolesti moglo biti nepoželjno. Dakle, potreban je oprez kod upotrebe inhibitora koji interferiraju s različitim članovima DPP4 obitelji enzima zbog mogućih različitih učinaka na pojedine članove obitelji, od kojih neki mogu biti nepoželjni.

Na temelju učinka DPP9 na proliferaciju stanica makrofagnog porijekla opaženog u ovom radu, kao i ranije opisanog učinka vildagliptina na tumore mijeloidnog porijekla (Spagnuolo i sur. 2013), proizlazi uloga DPP9 u proliferaciji i preživljenju tumorskih stanica. U budućnosti bi uz praćenje ekspresije DPP4 kao jedne od peptidaza uključenih u nastanak tumora bilo od interesa pratiti i ekspresiju DPP9, pogotovo u slučaju tumora hematopoetskog porijekla. Dosadašnja istraživanja upućuju da je DPP9 poželjna meta protutumorske terapije. Inhibitori DPP9 mogli bi se dakle koristiti kao dodatna protutumorska terapija. Također, kako trenutno nema velikih izgleda za razvoj selektivnog inhibitora DPP9, u terapijske bi se svrhe mogli koristiti već postojeći inhibitori DPP4 koji mogu inhibirati i DPP9 – primjerice vildagliptin.

Ekspresija DPP9 u tumorima može biti iskorištena ne samo ciljajući njezin učinak na proliferaciju tumorskih stanica, već i na njezinu ulogu i povezanost s aktivacijskim statusom makrofaga. Tumoru pridruženi makrofagi imaju M2 fenotip i slabe su antigen prezentirajuće stanice. Inhibitori ekspresije DPP9 primjenjeni lokalno u tumor mogli bi osim usmjeravanja tumoru pridruženih makrofaga u M1 protutumorski fenotip, djelovati i na utjecaj DPP9 na prezentaciju tumorskih antigena te posljedično i na specifični protutumorski imunski odgovor.

6. ZAKLJUČCI

Rezultati ispitivanja transkripcijske ekspresije DPP9 i DPP4 su pokazali:

- DPP9 mRNA eksprimirana je u svim ispitivanim uzorcima stanica mišjih limfatičnih i hematopoetskih tkiva, kao i u uzorku peritonealnih makrofaga. Razina ekspresije DPP9 mRNA različita je ovisno o uzorku, kako slijedi: makrofagi < koštana srž < slezena < limfni čvorovi.
- obrazac razine ekspresije DPP4 mRNA sličan je onom dobivenom s DPP9, tj. nije nađena recipročna ekspresija ovih dviju peptidaza u ispitivanim tkivima.

Rezultati ispitivanja lokalizacije i sublokalizacije DPP9 proteina pokazali su:

- većina stanica J774 linije makrofagnog porijekla eksprimira DPP9 unutar stanice. Unutarstaničnu lokalizaciju DPP9 karakterizira difuzno obojenje u citoplazmi i intenzivnije obojenje u području uz jezgru koje upućuje na lokalizaciju ER/Golgi.
- tek manji dio J774 stanica pokazuje prisutnost DPP9 i na staničnoj membrani, što upućuje na ulogu koja se možda javlja tek pri određenim uvjetima.

Rezultati ispitivanja lokalizacije enzimske aktivnosti slične DPP4 pokazali su:

- enzimska aktivnost slična DPP4 u J774 stanicama prisutna je većinom u citoplazmatskoj frakciji (67%), dok je manji postotak prisutan u sadržaju vezikula/organela (10%) i frakciji ukupnih staničnih membrana (23%). Rezultati su u skladu s opaženom proteinskom ekspresijom DPP9.

Rezultati praćenja lokalizacije DPP9 nakon receptorski inducirane endocitoze pokazali su:

- nakon endocitoze ovalbumina dolazi do promjene lokalizacije DPP9 koja se očituje u gubitku intenzivnijeg bojanja u području uz jezgru (ER/Golgi) i pojavi intenzivno obojenih vezikula u citoplazmi.
- DPP9 nakon endocitoze lokalizirana u vezikulama, kolokalizira s endocitiranim ovalbuminom. Rezultati ukazuju da bi DPP9 mogla sudjelovati u procesiranju ovalbumina u endosomima.

Rezultati ispitivanja ekspresije DPP9 nakon aktivacije makrofaga pokazali su:

- neaktivirani peritonealni makrofagi eksprimiraju visoku razinu DPP9 mRNA i nisku razinu DPP4 mRNA. Rezultati upućuju i da *in vivo* aktivacija makrofaga različito utječe na ekspresiju DPP9 i DPP4, tj. smanjuje ekspresiju DPP9, a pojačava ekspresiju DPP4.

- usmjeravanje makrofaga u M1 fenotip *in vitro* aktivacijom J774 stanica makrofagnog porijekla kombiniranim tretmanom IFN-om i LPS-om povezano je sa smanjenjem ekspresije DPP9 mRNA. Rezultati ukazuju da bi djelovanje DPP9 na njezine supstrate moglo biti regulirano aktivacijskim statusom makrofaga.

Funkcionalna analiza J774 stanica nakon utišavanja DPP9 gena pokazala je:

- smanjenje ukupne enzimske aktivnosti slične DPP4.
- smanjenje proliferacije J774 stanica.
- nepromjenjenu adheziju J774 stanica na ispitivane podloge (kolagen tipa IV, denaturirani goveđi serumski albumin i plastiku).
- povećanu ekspresiju aktivacijskog markera CCR5.
- smanjena ekspresija DPP9 nije se kompenzirala pojavom ekspresije DPP4. Rezultati ukazuju da DPP9 na J774 stanicama ima enzimsku aktivnost čiji nedostatak nije kompenziran s DPP4. Rezultati upućuju i na važnost DPP9 u proliferaciji i aktivaciji stanica makrofagnog porijekla.

- Abbott, C. A., D. M. Yu, E. Woollatt, G. R. Sutherland, G. W. McCaughan i M. D. Gorrell (2000). "Cloning, expression and chromosomal localization of a novel human dipeptidyl peptidase (DPP) IV homolog, DPP8." *Eur J Biochem* **267**(20): 6140-6150.
- Abbott, C. A., E. Baker, G. R. Sutherland i G. W. McCaughan (1994). "Genomic organization, exact localization, and tissue expression of the human CD26 (dipeptidyl peptidase IV) gene." *Immunogenetics* **40**(5): 331-338.
- Abbott, C. A., G. W. McCaughan i M. D. Gorrell (1999). "Two highly conserved glutamic acid residues in the predicted beta propeller domain of dipeptidyl peptidase IV are required for its enzyme activity." *FEBS Lett* **458**(3): 278-284.
- Ajami, K., C. A. Abbott, G. W. McCaughan i M. D. Gorrell (2004). "Dipeptidyl peptidase 9 has two forms, a broad tissue distribution, cytoplasmic localization and DPPIV-like peptidase activity." *Biochim Biophys Acta* **1679**(1): 18-28.
- Ajami, K., M. R. Pitman, C. H. Wilson, J. Park, R. I. Menz, A. E. Starr, J. H. Cox, C. A. Abbott, C. M. Overall i M. D. Gorrell (2008). "Stromal cell-derived factors 1alpha and 1beta, inflammatory protein-10 and interferon-inducible T cell chemo-attractant are novel substrates of dipeptidyl peptidase 8." *FEBS Lett* **582**(5): 819-825.
- Amigorena, S. i A. Savina (2010). "Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells." *Curr Opin Immunol* **22**(1): 109-117.
- Balaziova, E., L. Sedova, V. Mares, K. Vlasicova, J. Sevcik i A. Sedo (2006). "Dipeptidyl peptidase-IV activity and/or structure homologs (DASH): contributing factors in the pathogenesis of rheumatic diseases?" *Adv Exp Med Biol* **575**: 169-174.
- Bank, U., A. Heimburg, A. Wohlfarth, G. Koch, K. Nordhoff, H. Julius, M. Helmuth, D. Breyer, D. Reinhold, M. Tager i S. Ansorge (2011). "Outside or inside: role of the subcellular localization of DP4-like enzymes for substrate conversion and inhibitor effects." *Biol Chem* **392**(3): 169-187.
- Bjelke, J. R., J. Christensen, P. F. Nielsen, S. Branner, A. B. Kanstrup, N. Wagtmann i H. B. Rasmussen (2006). "Dipeptidyl peptidases 8 and 9: specificity and molecular characterization compared with dipeptidyl peptidase IV." *Biochem J* **396**(2): 391-399.
- Boonacker, E. i C. J. Van Noorden (2003). "The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV." *Eur J Cell Biol* **82**(2): 53-73.
- Bosurgi, L., A. A. Manfredi i P. Rovere-Querini (2011). "Macrophages in injured skeletal muscle: a perpetuum mobile causing and limiting fibrosis, prompting or restricting resolution and regeneration." *Front Immunol* **2**: 62.
- Brodbeck, W. G., E. Colton i J. M. Anderson (2003). "Effects of adsorbed heat labile serum proteins and fibrinogen on adhesion and apoptosis of monocytes/macrophages on biomaterials." *J Mater Sci Mater Med* **14**(8): 671-675.
- Bruhl, H., J. Cihak, M. Stangassinger, D. Schlondorff i M. Mack (2001). "Depletion of CCR5-expressing cells with bispecific antibodies and chemokine toxins: a new strategy in the treatment of chronic inflammatory diseases and HIV." *J Immunol* **166**(4): 2420-2426.
- Burkey, B. F., P. K. Hoffmann, U. Hassiepen, J. Trappe, M. Juedes i J. E. Foley (2008). "Adverse effects of dipeptidyl peptidases 8 and 9 inhibition in rodents revisited." *Diabetes Obes Metab* **10**(11): 1057-1061.
- Busek, P., J. Stremenova, L. Sromova, M. Hilser, E. Balaziova, D. Kosek, J. Trylcova, H. Strnad, E. Krepela i A. Sedo (2012). "Dipeptidyl peptidase-IV inhibits glioma cell growth independent of its enzymatic activity." *Int J Biochem Cell Biol* **44**(5): 738-747.

- Choudhary, C., C. Kumar, F. Gnad, M. L. Nielsen, M. Rehman, T. C. Walther, J. V. Olsen i M. Mann (2009). "Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions." Science **325**(5942): 834-840.
- Chowdhury, S., Y. Chen, T. W. Yao, K. Ajami, X. M. Wang, Y. Popov, D. Schuppan, P. Bertolino, G. W. McCaughan, D. M. Yu i M. D. Gorrell (2013). "Regulation of dipeptidyl peptidase 8 and 9 expression in activated lymphocytes and injured liver." World J Gastroenterol **19**(19): 2883-2893.
- Cupic, B., E. Zapletal i J. Gabrilovac (2013). Dipeptidyl peptidase-9 (DPP9) in differentiation of cells participating in immune responses. 1st Regional Congress: Education and Research in Oncology, Zagreb, Zaklada onkologija.
- Čulo, F. i D. Batinić (2010). Stanice, tkiva i organi imunskog sustava. Imunologija. Andreis, I., Batinić, D., Čulo, F. i sur. Zagreb, Medicinska naklada. 7: 42-44.
- De Meester, I., S. Korom, J. Van Damme i S. Scharpe (1999). "CD26, let it cut or cut it down." Immunol Today **20**(8): 367-375.
- Deacon, C. F. i J. J. Holst (2013). "Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes: comparison, efficacy and safety." Expert Opin Pharmacother **14**(15): 2047-2058.
- Demuth, H. U., C. H. McIntosh i R. A. Pederson (2005). "Type 2 diabetes--therapy with dipeptidyl peptidase IV inhibitors." Biochim Biophys Acta **1751**(1): 33-44.
- Drucker, D. J. (2003). "Therapeutic potential of dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of type 2 diabetes." Expert Opin Investig Drugs **12**(1): 87-100.
- Drucker, D. J. i M. A. Nauck (2006). "The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes." Lancet **368**(9548): 1696-1705.
- Dubois, V., A. M. Lambeir, S. Vandamme, V. Matheeußen, Y. Guisez, S. Scharpe i I. De Meester (2010). "Dipeptidyl peptidase 9 (DPP9) from bovine testes: identification and characterization as the short form by mass spectrometry." Biochim Biophys Acta **1804**(4): 781-788.
- Duke-Cohan, J. S., J. Gu, D. F. McLaughlin, Y. Xu, G. J. Freeman i S. F. Schlossman (1998). "Attractin (DPPT-L), a member of the CUB family of cell adhesion and guidance proteins, is secreted by activated human T lymphocytes and modulates immune cell interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(19): 11336-11341.
- Duluc, D., M. Corvaisier, S. Blanchard, L. Catala, P. Descamps, E. Gamelin, S. Ponsoda, Y. Delneste, M. Hebbar i P. Jeannin (2009). "Interferon-gamma reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages." Int J Cancer **125**(2): 367-373.
- Engel, M., T. Hoffmann, L. Wagner, M. Wermann, U. Heiser, R. Kiefersauer, R. Huber, W. Bode, H. U. Demuth i H. Brandstetter (2003). "The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5063-5068.
- Fleming, B. D. i D. M. Mosser (2011). "Regulatory macrophages: setting the threshold for therapy." Eur J Immunol **41**(9): 2498-2502.
- Franchin, G., G. Zybarth, W. W. Dai, L. Dubrovsky, N. Reiling, H. Schmidtayerova, M. Bukrinsky i B. Sherry (2000). "Lipopolysaccharide inhibits HIV-1 infection of monocyte-derived macrophages through direct and sustained down-regulation of CC chemokine receptor 5." J Immunol **164**(5): 2592-2601.

- Frerker, N., L. Wagner, R. Wolf, U. Heiser, T. Hoffmann, J. U. Rahfeld, J. Schade, T. Karl, H. Y. Naim, M. Alfalah, H. U. Demuth i S. von Horsten (2007). "Neuropeptide Y (NPY) cleaving enzymes: structural and functional homologues of dipeptidyl peptidase 4." Peptides **28**(2): 257-268.
- Friedrich, D., T. Hoffmann, J. Bar, M. Wermann, S. Manhart, U. Heiser i H. U. Demuth (2007). "Does human attractin have DP4 activity?" Biol Chem **388**(2): 155-162.
- Gall, M. G., Y. Chen, A. J. Vieira de Ribeiro, H. Zhang, C. G. Bailey, D. S. Spielman, D. M. Yu i M. D. Gorrell (2013). "Targeted inactivation of dipeptidyl peptidase 9 enzymatic activity causes mouse neonate lethality." PLoS One **8**(11): e78378.
- Geijtenbeek, T. B. i S. I. Gringhuis (2009). "Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses." Nat Rev Immunol **9**(7): 465-479.
- Geiss-Friedlander, R. i F. Melchior (2007). "Concepts in sumoylation: a decade on." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(12): 947-956.
- Geiss-Friedlander, R., N. Parmentier, U. Moller, H. Urlaub, B. J. Van den Eynde i F. Melchior (2009). "The cytoplasmic peptidase DPP9 is rate-limiting for degradation of proline-containing peptides." J Biol Chem **284**(40): 27211-27219.
- Gherzi, G., H. Dong, L. A. Goldstein, Y. Yeh, L. Hakkinen, H. S. Larjava i W. T. Chen (2002). "Regulation of fibroblast migration on collagenous matrix by a cell surface peptidase complex." J Biol Chem **277**(32): 29231-29241.
- Gold, L. I., P. Eggleton, M. T. Sweetwyne, L. B. Van Duyn, M. R. Greives, S. M. Naylor, M. Michalak i J. E. Murphy-Ullrich (2010). "Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease." FASEB J **24**(3): 665-683.
- Gordon, S. (2007). "The macrophage: past, present and future." Eur J Immunol **37** **Suppl 1**: S9-17.
- Gorrell, M. D. (2005). "Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders." Clin Sci (Lond) **108**(4): 277-292.
- Harstad, E. B., J. S. Rosenblum, M. D. Gorrell, W. E. Achanzar, L. Minimo, J. Wu, L. Rosini-Marthaler, R. Gullo, N. D. Ordway, M. S. Kirby, K. D. Chadwick, G. N. Cosma i C. F. Moyer (2013). "DPP8 and DPP9 expression in cynomolgus monkey and Sprague Dawley rat tissues." Regul Pept **186**: 26-35.
- Herold, S., K. Mayer i J. Lohmeyer (2011). "Acute lung injury: how macrophages orchestrate resolution of inflammation and tissue repair." Front Immunol **2**: 65.
- Hopsu-Havu, V. K. i G. G. Glenner (1966). "A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide." Histochemie **7**(3): 197-201.
- Jenkins, S. J., D. Ruckerl, P. C. Cook, L. H. Jones, F. D. Finkelman, N. van Rooijen, A. S. MacDonald i J. E. Allen (2011). "Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation." Science **332**(6035): 1284-1288.
- Jiaang, W. T., Y. S. Chen, T. Hsu, S. H. Wu, C. H. Chien, C. N. Chang, S. P. Chang, S. J. Lee i X. Chen (2005). "Novel isoindoline compounds for potent and selective inhibition of prolyl dipeptidase DPP8." Bioorg Med Chem Lett **15**(3): 687-691.
- Jiang, X. i A. Sorkin (2002). "Coordinated traffic of Grb2 and Ras during epidermal growth factor receptor endocytosis visualized in living cells." Mol Biol Cell **13**(5): 1522-1535.
- Jones, B., S. Adams, G. T. Miller, M. I. Jesson, T. Watanabe i B. P. Wallner (2003). "Hematopoietic stimulation by a dipeptidyl peptidase inhibitor reveals a novel

- regulatory mechanism and therapeutic treatment for blood cell deficiencies." Blood **102**(5): 1641-1648.
- Jozefowski, S. i J. Marcinkiewicz (2010). "Aggregates of denatured proteins stimulate nitric oxide and superoxide production in macrophages." Inflamm Res **59**(4): 277-289.
- Kang, N. S., J. H. Ahn, S. S. Kim, C. H. Chae i S. E. Yoo (2007). "Docking-based 3D-QSAR study for selectivity of DPP4, DPP8, and DPP9 inhibitors." Bioorg Med Chem Lett **17**(13): 3716-3721.
- Kirby, M., D. M. Yu, S. O'Connor i M. D. Gorrell (2010). "Inhibitor selectivity in the clinical application of dipeptidyl peptidase-4 inhibition." Clin Sci (Lond) **118**(1): 31-41.
- Koivisto, V. (2008). "Discovery of dipeptidyl-peptidase IV--a 40 year journey from bench to patient." Diabetologia **51**(6): 1088-1089.
- Kono, H. i K. L. Rock (2008). "How dying cells alert the immune system to danger." Nat Rev Immunol **8**(4): 279-289.
- Kotackova, L., E. Balaziová i A. Sedo (2009). "Expression pattern of dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologues in cancer." Folia Biol (Praha) **55**(3): 77-84.
- Koyama, Y., K. Norose-Toyoda, S. Hirano, M. Kobayashi, T. Ebihara, I. Someki, H. Fujisaki i S. Irie (2000). "Type I collagen is a non-adhesive extracellular matrix for macrophages." Arch Histol Cytol **63**(1): 71-79.
- Kreer, C., J. Rauen, M. Zehner i S. Burgdorf (2011). "Cross-presentation: how to get there - or how to get the ER." Front Immunol **2**: 87.
- Kuhn-Wache, K., J. W. Bar, T. Hoffmann, R. Wolf, J. U. Rahfeld i H. U. Demuth (2011). "Selective inhibition of dipeptidyl peptidase 4 by targeting a substrate-specific secondary binding site." Biol Chem **392**(3): 223-231.
- Kurokawa, Y., R. Matoba, I. Takemasa, S. Nakamori, M. Tsujie, H. Nagano, K. Dono, K. Umeshita, M. Sakon, N. Ueno, H. Kita, S. Oba, S. Ishii, K. Kato i M. Monden (2003). "Molecular features of non-B, non-C hepatocellular carcinoma: a PCR-array gene expression profiling study." J Hepatol **39**(6): 1004-1012.
- Lambeir, A. M., C. Durinx, S. Scharpe i I. De Meester (2003). "Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV." Crit Rev Clin Lab Sci **40**(3): 209-294.
- Lambeir, A. M., S. Scharpe i I. De Meester (2008). "DPP4 inhibitors for diabetes--what next?" Biochem Pharmacol **76**(12): 1637-1643.
- Lankas, G. R., B. Leiting, R. S. Roy, G. J. Eiermann, M. G. Beconi, T. Biftu, C. C. Chan, S. Edmondson, W. P. Feeney, H. He, D. E. Ippolito, D. Kim, K. A. Lyons, H. O. Ok, R. A. Patel, A. N. Petrov, K. A. Pryor, X. Qian, L. Reigle, A. Woods, J. K. Wu, D. Zaller, X. Zhang, L. Zhu, A. E. Weber i N. A. Thornberry (2005). "Dipeptidyl peptidase IV inhibition for the treatment of type 2 diabetes: potential importance of selectivity over dipeptidyl peptidases 8 and 9." Diabetes **54**(10): 2988-2994.
- Lu, C., J. U. Tilan, L. Everhart, M. Czarnecka, S. J. Soldin, D. R. Mendu, D. Jeha, J. Hanafy, C. K. Lee, J. Sun, E. Izycka-Swieszewska, J. A. Toretsky i J. Kitlinska (2011). "Dipeptidyl peptidases as survival factors in Ewing sarcoma family of tumors: implications for tumor biology and therapy." J Biol Chem **286**(31): 27494-27505.
- Lu, I. L., S. J. Lee, H. Tsu, S. Y. Wu, K. H. Kao, C. H. Chien, Y. Y. Chang, Y. S. Chen, J. H. Cheng, C. N. Chang, T. W. Chen, S. P. Chang, X. Chen i W. T. Jiaang (2005). "Glutamic acid analogues as potent dipeptidyl peptidase IV and 8 inhibitors." Bioorg Med Chem Lett **15**(13): 3271-3275.

- Maes, M. B., A. M. Lambeir, K. Gilany, K. Senten, P. Van der Veken, B. Leiting, K. Augustyns, S. Scharpe i I. De Meester (2005). "Kinetic investigation of human dipeptidyl peptidase II (DPPII)-mediated hydrolysis of dipeptide derivatives and its identification as quiescent cell proline dipeptidase (QPP)/dipeptidyl peptidase 7 (DPP7)." Biochem J **386**(Pt 2): 315-324.
- Maes, M. B., V. Dubois, I. Brandt, A. M. Lambeir, P. Van der Veken, K. Augustyns, J. D. Cheng, X. Chen, S. Scharpe i I. De Meester (2007). "Dipeptidyl peptidase 8/9-like activity in human leukocytes." J Leukoc Biol **81**(5): 1252-1257.
- Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi i M. Locati (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." Trends Immunol **25**(12): 677-686.
- Matheussen, V., L. Baerts, G. De Meyer, G. De Keulenaer, P. Van der Veken, K. Augustyns, V. Dubois, S. Scharpe i I. De Meester (2011). "Expression and spatial heterogeneity of dipeptidyl peptidases in endothelial cells of conduct vessels and capillaries." Biol Chem **392**(3): 189-198.
- Matheussen, V., Y. Waumans, W. Martinet, S. Van Goethem, P. Van der Veken, S. Scharpe, K. Augustyns, G. R. De Meyer i I. De Meester (2013). "Dipeptidyl peptidases in atherosclerosis: expression and role in macrophage differentiation, activation and apoptosis." Basic Res Cardiol **108**(3): 350.
- Matsubara, J., S. Sugiyama, K. Sugamura, T. Nakamura, Y. Fujiwara, E. Akiyama, H. Kurokawa, T. Nozaki, K. Ohba, M. Konishi, H. Maeda, Y. Izumiya, K. Kaikita, H. Sumida, H. Jinnouchi, K. Matsui, S. Kim-Mitsuyama, M. Takeya i H. Ogawa (2012). "A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, des-fluoro-sitagliptin, improves endothelial function and reduces atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice." J Am Coll Cardiol **59**(3): 265-276.
- Mentlein, R. (2004). "Cell-surface peptidases." Int Rev Cytol **235**: 165-213.
- Michalak, M., J. Groenendyk, E. Szabo, L. I. Gold i M. Opas (2009). "Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum." Biochem J **417**(3): 651-666.
- Munsaka, S. M., M. Agsalda, D. Troelstrup, N. Hu, Q. Yu i B. Shiramizu (2009). "Characteristics of Activated Monocyte Phenotype Support R5-Tropic Human Immunodeficiency Virus." Immunol Immunogenet Insights **1**: 15-20.
- Murphy, B. S., V. Sundareshan, T. J. Cory, D. Hayes, Jr., M. I. Anstead i D. J. Feola (2008). "Azithromycin alters macrophage phenotype." J Antimicrob Chemother **61**(3): 554-560.
- Murray, P. J. i T. A. Wynn (2011). "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets." Nat Rev Immunol **11**(11): 723-737.
- O'Brien, J., T. Lyons, J. Monks, M. S. Lucia, R. S. Wilson, L. Hines, Y. G. Man, V. Borges i P. Schedin (2010). "Alternatively activated macrophages and collagen remodeling characterize the postpartum involuting mammary gland across species." Am J Pathol **176**(3): 1241-1255.
- Olsen, C. i N. Wagtmann (2002). "Identification and characterization of human DPP9, a novel homologue of dipeptidyl peptidase IV." Gene **299**(1-2): 185-193.
- Pardoll, D. M. (2002). "Spinning molecular immunology into successful immunotherapy." Nat Rev Immunol **2**(4): 227-238.

- Park, J. E., M. C. Lenter, R. N. Zimmermann, P. Garin-Chesa, L. J. Old i W. J. Rettig (1999). "Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts." *J Biol Chem* **274**(51): 36505-36512.
- Park, J., H. M. Knott, N. A. Nadvi, C. A. Collyer, X. M. Wang, W. B. Church i M. D. Gorrell (2008). "Reversible Inactivation of Human Dipeptidyl Peptidases 8 and 9 by Oxidation." *The Open Enz Inhib J* **1**: 52-60.
- Pilla, E., M. Kilisch, C. Lenz, H. Urlaub i R. Geiss-Friedlander (2013). "The SUMO1-E67 interacting loop peptide is an allosteric inhibitor of the dipeptidyl peptidases 8 and 9." *J Biol Chem* **288**(45): 32787-32796.
- Pilla, E., U. Moller, G. Sauer, F. Mattioli, F. Melchior i R. Geiss-Friedlander (2012). "A novel SUMO1-specific interacting motif in dipeptidyl peptidase 9 (DPP9) that is important for enzymatic regulation." *J Biol Chem* **287**(53): 44320-44329.
- Pro, B. i N. H. Dang (2004). "CD26/dipeptidyl peptidase IV and its role in cancer." *Histol Histopathol* **19**(4): 1345-1351.
- Puente, X. S., L. M. Sanchez, C. M. Overall i C. Lopez-Otin (2003). "Human and mouse proteases: a comparative genomic approach." *Nat Rev Genet* **4**(7): 544-558.
- Qi, S. Y., P. J. Riviere, J. Trojnar, J. L. Junien i K. O. Akinsanya (2003). "Cloning and characterization of dipeptidyl peptidase 10, a new member of an emerging subgroup of serine proteases." *Biochem J* **373**(Pt 1): 179-189.
- Ralph, P. i I. Nakoinz (1975). "Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line." *Nature* **257**(5525): 393-394.
- Reinhold, D., A. Goihl, S. Wrenger, A. Reinhold, U. C. Kuhlmann, J. Faust, K. Neubert, A. Thielitz, S. Brocke, M. Tager, S. Ansorge i U. Bank (2009). "Role of dipeptidyl peptidase IV (DP IV)-like enzymes in T lymphocyte activation: investigations in DP IV/CD26-knockout mice." *Clin Chem Lab Med* **47**(3): 268-274.
- Renkvist, N., C. Castelli, P. F. Robbins i G. Parmiani (2001). "A listing of human tumor antigens recognized by T cells." *Cancer Immunol Immunother* **50**(1): 3-15.
- Rohnert, P., W. Schmidt, P. Emmerlich, A. Goihl, S. Wrenger, U. Bank, K. Nordhoff, M. Tager, S. Ansorge, D. Reinhold i F. Striggow (2012). "Dipeptidyl peptidase IV, aminopeptidase N and DPIV/APN-like proteases in cerebral ischemia." *J Neuroinflammation* **9**: 44.
- Rosenblum, J. S. i J. W. Kozarich (2003). "Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery." *Curr Opin Chem Biol* **7**(4): 496-504.
- Rumme, C. i G. Metz (2007). "Homology models of dipeptidyl peptidases 8 and 9 with a focus on loop predictions near the active site." *Proteins* **66**(1): 160-171.
- Schade, J., M. Stephan, A. Schmiedl, L. Wagner, A. J. Niestroj, H. U. Demuth, N. Frerker, C. Klemann, K. A. Raber, R. Pabst i S. von Horsten (2008). "Regulation of expression and function of dipeptidyl peptidase 4 (DP4), DP8/9, and DP10 in allergic responses of the lung in rats." *J Histochem Cytochem* **56**(2): 147-155.
- Sedo, A. i R. Malik (2001). "Dipeptidyl peptidase IV-like molecules: homologous proteins or homologous activities?" *Biochim Biophys Acta* **1550**(2): 107-116.
- Shah, Z., T. Kampfrath, J. A. Deiuliis, J. Zhong, C. Pineda, Z. Ying, X. Xu, B. Lu, S. Moffatt-Bruce, R. Durairaj, Q. Sun, G. Mihai, A. Maiseyeu i S. Rajagopalan (2011). "Long-term dipeptidyl-peptidase 4 inhibition reduces atherosclerosis and inflammation via effects on monocyte recruitment and chemotaxis." *Circulation* **124**(21): 2338-2349.

- Smith, R. E., C. J. Reynolds i E. A. Elder (1992). "The evolution of proteinase substrates with special reference to dipeptidylpeptidase IV." Histochem J **24**(9): 637-647.
- Spagnuolo, P. A., R. Hurren, M. Gronda, N. MacLean, A. Datti, A. Basheer, F. H. Lin, X. Wang, J. Wrana i A. D. Schimmer (2013). "Inhibition of intracellular dipeptidyl peptidases 8 and 9 enhances parthenolide's anti-leukemic activity." Leukemia **27**(6): 1236-1244.
- Stremenova, J., V. Mares, V. Lisa, M. Hilser, E. Krepela, Z. Vanickova, M. Syrucek, O. Soula i A. Sedo (2010). "Expression of dipeptidyl peptidase-IV activity and/or structure homologs in human meningiomas." Int J Oncol **36**(2): 351-358.
- Sulda, M. L., C. A. Abbott, P. J. Macardle, R. K. Hall i B. J. Kuss (2010). "Expression and prognostic assessment of dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in B-cell chronic lymphocytic leukemia." Cancer Biol Ther **10**(2): 180-189.
- Tanaka, S., T. Murakami, H. Horikawa, M. Sugiura, K. Kawashima i T. Sugita (1997). "Suppression of arthritis by the inhibitors of dipeptidyl peptidase IV." Int J Immunopharmacol **19**(1): 15-24.
- Tang, H. K., H. Y. Tang, S. C. Hsu, Y. R. Chu, C. H. Chien, C. H. Shu i X. Chen (2009). "Biochemical properties and expression profile of human prolyl dipeptidase DPP9." Arch Biochem Biophys **485**(2): 120-127.
- Tang, H. K., K. C. Chen, G. G. Liou, S. C. Cheng, C. H. Chien, H. Y. Tang, L. H. Huang, H. P. Chang, C. Y. Chou i X. Chen (2011). "Role of a propeller loop in the quaternary structure and enzymatic activity of prolyl dipeptidases DPP-IV and DPP9." FEBS Lett **585**(21): 3409-3414.
- Trebst, C., F. Konig, R. Ransohoff, W. Bruck i M. Stangel (2008). "CCR5 expression on macrophages/microglia is associated with early remyelination in multiple sclerosis lesions." Mult Scler **14**(6): 728-733.
- Turk, B. (2006). "Targeting proteases: successes, failures and future prospects." Nat Rev Drug Discov **5**(9): 785-799.
- Van Bambeke, F., S. Carryn, C. Seral, H. Chanteux, D. Tyteca, M. P. Mingeot-Leclercq i P. M. Tulkens (2004). "Cellular pharmacokinetics and pharmacodynamics of the glycopeptide antibiotic oritavancin (LY333328) in a model of J774 mouse macrophages." Antimicrob Agents Chemother **48**(8): 2853-2860.
- Van der Veken, P., I. De Meester, V. Dubois, A. Soroka, S. Van Goethem, M. B. Maes, I. Brandt, A. M. Lambeir, X. Chen, A. Haemers, S. Scharpe i K. Augustyns (2008). "Inhibitors of dipeptidyl peptidase 8 and dipeptidyl peptidase 9. Part 1: identification of dipeptide derived leads." Bioorg Med Chem Lett **18**(14): 4154-4158.
- Van Goethem, S., P. Van der Veken, V. Dubois, A. Soroka, A. M. Lambeir, X. Chen, A. Haemers, S. Scharpe, I. De Meester i K. Augustyns (2008). "Inhibitors of dipeptidyl peptidase 8 and dipeptidyl peptidase 9. Part 2: isoindoline containing inhibitors." Bioorg Med Chem Lett **18**(14): 4159-4162.
- Van Goethem, S., V. Matheussen, J. Joossens, A. M. Lambeir, X. Chen, I. De Meester, A. Haemers, K. Augustyns i P. Van der Veken (2011). "Structure-activity relationship studies on isoindoline inhibitors of dipeptidyl peptidases 8 and 9 (DPP8, DPP9): is DPP8-selectivity an attainable goal?" J Med Chem **54**(16): 5737-5746.
- van Loon, S. L. M., A. I. P. M. Smits, A. Driessen-Mol, F. P. T. Baaijens i C. V. C. Bouten (2013). "The Immune Response in In Situ Tissue Engineering of Aortic Heart Valves, Calcific Aortic Valve Disease.", Dr. Elena Aikawa (ur.), ISBN: 978-953-51-1150-4, InTech, DOI: 10.5772/54354. Dostupno na: <http://www.intechopen.com/books/calcific-aortic>

valve-disease/the-immune-response-in-in-situ-tissue-engineering-of-aortic-heart-valves

- Vanhoof, G., F. Goossens, I. De Meester, D. Hendriks i S. Scharpe (1995). "Proline motifs in peptides and their biological processing." *FASEB J* **9**(9): 736-744.
- Vogel, W., G. D. Gish, F. Alves i T. Pawson (1997). "The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen." *Mol Cell* **1**(1): 13-23.
- Walsh, M. P., B. Duncan, S. Larabee, A. Krauss, J. P. Davis, Y. Cui, S. Y. Kim, M. Guimond, W. Bachovchin i T. J. Fry (2013). "Val-boroPro accelerates T cell priming via modulation of dendritic cell trafficking resulting in complete regression of established murine tumors." *PLoS One* **8**(3): e58860.
- Wilson, C. H. i C. A. Abbott (2012). "Expression profiling of dipeptidyl peptidase 8 and 9 in breast and ovarian carcinoma cell lines." *Int J Oncol* **41**(3): 919-932.
- Wilson, C. H., D. Indarto, A. Doucet, L. D. Pogson, M. R. Pitman, K. McNicholas, R. I. Menz, C. M. Overall i C. A. Abbott (2013). "Identifying natural substrates for dipeptidyl peptidases 8 and 9 using terminal amine isotopic labeling of substrates (TAILS) reveals in vivo roles in cellular homeostasis and energy metabolism." *J Biol Chem* **288**(20): 13936-13949.
- Wrenger, S., J. Faust, D. Friedrich, T. Hoffmann, R. Hartig, U. Lendeckel, T. Kahne, A. Thielitz, K. Neubert i D. Reinhold (2006). "Attractin, a dipeptidyl peptidase IV/CD26-like enzyme, is expressed on human peripheral blood monocytes and potentially influences monocyte function." *J Leukoc Biol* **80**(3): 621-629.
- Wu, J. J., H. K. Tang, T. K. Yeh, C. M. Chen, H. S. Shy, Y. R. Chu, C. H. Chien, T. Y. Tsai, Y. C. Huang, Y. L. Huang, C. H. Huang, H. Y. Tseng, W. T. Jiaang, Y. S. Chao i X. Chen (2009). "Biochemistry, pharmacokinetics, and toxicology of a potent and selective DPP8/9 inhibitor." *Biochem Pharmacol* **78**(2): 203-210.
- Wu, W., Y. Liu, L. J. Milo, Jr., Y. Shu, P. Zhao, Y. Li, I. Woznica, G. Yu, D. G. Sanford, Y. Zhou, S. E. Poplawski, B. A. Connolly, J. L. Sudmeier, W. W. Bachovchin i J. H. Lai (2012). "4-Substituted boro-proline dipeptides: synthesis, characterization, and dipeptidyl peptidase IV, 8, and 9 activities." *Bioorg Med Chem Lett* **22**(17): 5536-5540.
- Yao, T. W., W. S. Kim, D. M. Yu, G. Sharbeen, G. W. McCaughan, K. Y. Choi, P. Xia i M. D. Gorrell (2011). "A novel role of dipeptidyl peptidase 9 in epidermal growth factor signaling." *Mol Cancer Res* **9**(7): 948-959.
- Yazbeck, R., G. S. Howarth i C. A. Abbott (2009). "Dipeptidyl peptidase inhibitors, an emerging drug class for inflammatory disease?" *Trends Pharmacol Sci* **30**(11): 600-607.
- Yu, D. M., K. Ajami, M. G. Gall, J. Park, C. S. Lee, K. A. Evans, E. A. McLaughlin, M. R. Pitman, C. A. Abbott, G. W. McCaughan i M. D. Gorrell (2009). "The in vivo expression of dipeptidyl peptidases 8 and 9." *J Histochem Cytochem* **57**(11): 1025-1040.
- Yu, D. M., T. W. Yao, S. Chowdhury, N. A. Nadvi, B. Osborne, W. B. Church, G. W. McCaughan i M. D. Gorrell (2010). "The dipeptidyl peptidase IV family in cancer and cell biology." *FEBS J* **277**(5): 1126-1144.
- Yu, D. M., X. M. Wang, G. W. McCaughan i M. D. Gorrell (2006). "Extraenzymatic functions of the dipeptidyl peptidase IV-related proteins DP8 and DP9 in cell adhesion, migration and apoptosis." *FEBS J* **273**(11): 2447-2460.

- Zhang, H., Y. Chen, F. M. Keane i M. D. Gorrell (2013). "Advances in understanding the expression and function of dipeptidyl peptidase 8 and 9." Mol Cancer Res **11**(12): 1487-1496.
- Zhao, Y., L. Yang i Z. Zhou (2014). "Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: Multitarget drugs, not only antidiabetes drugs." J Diabetes **6**(1): 21-29.

Web izvori:

Fluorescence SpectraViewer. URL: <http://www.lifetechnologies.com/hr/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html> [28. 11. 2013.]

NCBI. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [10. 2. 2014.]

NCBI BLAST. URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> [8. 11. 2013.]

UniProt/Align. URL: <http://www.uniprot.org/align/> [27. 2. 2012.]

UniProtKB. URL: <http://www.uniprot.org/> [10. 2. 2014.]

Dipeptidil-peptidaza 9 (DPP9) je novi član DPP4 obitelji enzima. Glavni član DPP4 obitelji je membranski lokalizirana peptidaza DPP4, koja brojne različite uloge ostvaruje enzimskom aktivnošću, te receptorskim i nereceptorskim vezanjem drugih proteina. Podaci o funkciji srodne DPP9 još su malobrojni, a upućuju na ulogu u imunskim i upalnim procesima.

U ovom radu uspoređen je transkripcijski ekspresijski profil DPP9 i DPP4 u mišjim hematopoetskim i limfatičnim tkivima kao i u stanicama makrofagnog i limfocitnog porijekla. Ekspresija DPP9 mRNA pronađena je u svim ispitivanim uzorcima, a dobivena razina ekspresije bila je najmanja u peritonealnim makrofagima, zatim nešto viša u koštanoj srži i slezeni te najviša u limfnim čvorovima. Obrazac razine ekspresije DPP4 mRNA bio je sličan onom dobivenom za DPP9. Pokazalo se i da makrofagna stanična linija (J774) eksprimira visoku razinu DPP9 mRNA, dok ne eksprimira inače dominantnu DPP4 što je čini dobrim modelom za proučavanje funkcija DPP9. Ispitivanje lokalizacije i sublokalizacije DPP9 u/na stanicama makrofagne linije J774 pokazalo je da je DPP9 dominantno lokalizirana unutar stanice, dok je na staničnoj membrani nađena samo u manjoj subpopulaciji stanica. Unutarstaničnu lokalizaciju DPP9 karakterizira intenzivnije obojenje u području uz jezgru što odgovara lokalizaciji ER/Golgi. Sublokalizacija DPP9 dodatno je provjerena ispitivanjem enzimske aktivnosti slične DPP4, u prisutnosti inhibitora sitagliptina, u frakcijama lizata J774 stanica. Pokazalo se da je enzimska aktivnost lokalizirana dominantno u citoplazmatskoj frakciji, dok je u manjoj mjeri nađena i u frakciji vezikula/organela, te frakciji ukupnih staničnih membrana. Prisutnost enzimske aktivnosti u frakciji koja sadrži ukupne stanične membrane u skladu je s opaženom proteinskom lokalizacijom DPP9. Nadalje, korištenjem modelne mišje makrofagne linije J774, ispitana je moguća uloga DPP9 u endocitozi, adheziji, proliferaciji i aktivaciji makrofaga. Ovalbuminom potaknuta endocitoza dovodi do promjene lokalizacije DPP9, tj. do gubitka intenzivnijeg bojanja u području uz jezgru i pojavi intenzivno obojenih vezikula u citoplazmi. Također, DPP9 nakon endocitoze lokalizirana u vezikulama, kolokalizira s endocitiranim ovalbuminom, što ukazuje da bi DPP9 mogla sudjelovati u procesiranju ovalbumina u endosomima. *In vivo* aktivacija peritonealnih makrofaga različito utječe na ekspresiju DPP9 i DPP4, tj. smanjuje ekspresiju DPP9, a pojačava ekspresiju DPP4. *In vitro* aktivacija J774 stanica pomoću kombiniranog tretmana IFN-om i LPS-om također je uzrokovala smanjenje

ekspresije DPP9 mRNA. Nadalje, utišavanje DPP9 gena dovelo je do smanjenja proliferacije stanica J774 i do povećanja ekspresije aktivacijskog markera CCR5. Međutim, utišavanje DPP9 nije imalo učinka na ispitivana adhezijska svojstva J774 stanica i nije uzrokovalo kompenzatornu pojavu ekspresije DPP4. Zaključno, rezultati ukazuju na moguću ulogu DPP9 u proliferaciji i aktivaciji stanica makrofagnog porijekla, kao i u procesiranju izvanstaničnih antigena.

9. SUMMARY

Dipeptidyl-peptidase 9 (DPP9) is a new member of the DPP4 enzyme family. The main member of DPP4 family is membrane peptidase DPP4, which exerts variety of functions via its enzyme activity and its receptor or nonreceptor binding of other proteins. Data on functions of the related DPP9 are still scarce, but suggest its role in immune and inflammatory processes.

In this work we compared the transcriptional expression profiles of DPP9 and DPP4 in murine hematopoietic and lymphatic tissues as well as in cells of macrophage and lymphocyte origin. DPP9 mRNA expression was found in all tested samples with the following increasing order of intensity: peritoneal macrophages, bone marrow, spleen and lymph nodes. DPP4 mRNA expression profile was similar to that obtained for DPP9. Further, macrophage cell line J774 expressed high level of DPP9 mRNA, without expressing otherwise dominant DPP4, which makes it a good model for studying possible function(s) of DPP9. Examination of DPP9 localization and sub-localization in/on cells of the macrophage line J774 showed that DPP9 was predominantly localized within cells, whereas DPP9 localized on the cell membrane was found only in a subpopulation of cells. The intracellular DPP9 localization was characterized by intense accumulation in the area near nuclei corresponding to the localization of the ER/Golgi. DPP9 sub-localization was further verified by testing the DPP4-like enzymatic activity in fractions of J774 cell lysate, in the presence of inhibitor sitagliptin. It has been shown that the enzyme activity is localized predominantly in the cytoplasmic fraction, and to a lesser extent in the fraction containing vesicles/organelles and the fraction containing total cellular membranes. The presence of enzyme activity in the fraction containing total cellular membranes was consistent with the observed localization of DPP9 protein. Furthermore, using the model macrophage cell line J774, possible role of DPP9 in endocytosis, adhesion, proliferation and activation of macrophages was examined. Ovalbumin-induced endocytosis caused changes of DPP9 localization, i.e. the loss of intense staining near nuclei and appearance of intensively stained vesicles in cytoplasm. Also, DPP9 after endocytosis localized in vesicles, co-localized with endocytosed ovalbumin, indicating that DPP9 could participate in ovalbumin processing within endosomes. *In vivo* activation of peritoneal macrophages differently affected the expression of DPP9 and DPP4, i.e. decreased the expression of DPP9, and increased expression of DPP4. *In vitro* activation of

J774 cells by combined treatment with IFN- γ and LPS also caused decrease of DPP9 mRNA expression. Further, DPP9 gene silencing resulted in a decrease of J774 cell proliferation and led to increased expression of activation marker CCR5. However, silencing of DPP9 had no effect on the tested adhesion properties of the J774 cells and did not result in the occurrence of compensatory expression DPP4. In conclusion, the results obtained suggest possible roles of DPP9 in proliferation and activation of cells of macrophage origin, as well as in processing of extracellular antigens.

Rođena sam 3. svibnja 1983. godine u Osijeku gdje sam završila osnovnu i srednju školu. Nakon mature u I. Gimnaziji u Osijeku, 2001. godine upisala sam studij biologije Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, smjer molekularna biologija. Diplomski rad na temu „Učinak 4-hidroksinonenala na sintezu transformirajućeg čimbenika rasta β u stanicama karcinoma kolona“ izradila sam u Laboratoriju za oksidacijski stres Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Suzane Borović Šunjić. Diplomirala sam 9. listopada 2007. godine i time stekla zvanje diplomiranog inženjera biologije – smjer molekularna biologija.

Od siječnja 2008. godine do svibnja 2008. godine volontirala sam u Laboratoriju za eksperimentalnu hematologiju, imunologiju i onkologiju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, a od svibnja 2008. godine zaposlena sam kao znanstveni novak-asistent u istom laboratoriju. Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti upisala sam 2008. godine. Kao istraživač obavljam znanstvena istraživanja u sklopu znanstvenog projekta MZOS „Uloga membranskih peptidaza na tumorskim i normalnim stanicama“ (098-0982464-2520) dr. sc. Jelke Gabrilovac.

Prisustvovala sam na 14 domaćih i međunarodnih simpozija i seminara, te sudjelovala na jednoj radionici. Na šest skupova aktivno sam sudjelovala izlažući svoj rad u obliku poster prezentacija. Za sudjelovanje na međunarodnom skupu European Macrophage and Dendritic Cell Society 2012 Meeting dobila sam stipendiju EFIS-EJI (European Federation of Immunological Societies-European Journal of Immunology) travel grant.

Do sada sam objavila pet izvornih znanstvenih radova citiranih u bazi publikacija Current Contents, a na jednom od njih sam i prvi autor. Isti rad uvršten je u kategoriju Key Research Articles na stranici Psychology Progress.

Član sam Hrvatskog imunološkog društva (HID), Hrvatskog društva za istraživanje raka (HDIR) te član Europskog društva za istraživanje raka (EACR).

Izvorni znanstveni radovi u CC časopisima:

1. Cupic, B., J. Štefulj, **E. Zapletal**, A. Matosic, T. Bordukalo-Nikšić, L. Čičin-Šain i J. Gabrilovac (2013). "Opioid system genes in alcoholism: a case-control study in Croatian population." Neuropeptides **47**(5): 315-319.
2. **Zapletal, E.**, O. Kraus, B. Cupic i J. Gabrilovac (2013). "Differential expression of proopiomelanocortin (POMC) transcriptional variants in human skin cells." Neuropeptides **47**(2): 99-107.
3. Cindric, M., A. Cipak, **E. Zapletal**, M. Jaganjac, L. Milkovic, G. Waeg, S. Stolc, N. Zarkovic i S. Suzana Borovic (2013). "Stobadine attenuates impairment of an intestinal barrier model caused by 4-hydroxynonenal." Toxicol In Vitro **27**(1): 426-432.
4. Gabrilovac, J., B. Cupic, **E. Zapletal** i A. Brozovic (2012). "IFN-gamma up-regulates kappa opioid receptors (KOR) on murine macrophage cell line J774." J Neuroimmunol **245**(1-2): 56-65.
5. Gabrilovac, J., B. Cupic, **E. Zivkovic**, L. Horvat i D. Majhen (2011). "Expression, regulation and functional activities of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2; APN; CD13) on murine macrophage J774 cell line." Immunobiology **216**(1-2): 132-144.

Kongresno priopćenje u CC časopisu:

Zivkovic, E., O. Kraus i J. Gabrilovac (2009). "Transcriptional expression of proopiomelanocortin (POMC) in cultured human skin cells". Neuropeptides **43**(5): 419-419.

Sažeci u zbornicima skupova:

1. Cupic, B., **E. Zapletal** i J. Gabrilovac (2013). Dipeptidyl peptidase-9 (DPP9) in differentiation of cells participating in immune responses. 1st Regional Congress: Education and Research in Oncology, Zagreb.
2. Čupić, B., J. Štefulj, **E. Zapletal**, A. Matošić, T. Bordukalo-Nikšić, L. Čičin-Šain i J. Gabrilovac (2013). Opioid system genes in alcoholism: a case-control study in croatian population. 4. Croatian Congress of Neuroscience, Zagreb.
3. Čupić, B., **E. Zapletal** i J. Gabrilovac (2013). Dipeptidyl peptidase-9 (DPP9) in differentiation of cells participating in immune responses. 17th International Summer School on Immunology, Immune System: genes, receptors and regulation, Rabac.
4. **Zapletal, E.** i J. Gabrilovac (2012). Expression, localization and regulation of dipeptidyl peptidase 9 (DPP9) on murine macrophages. European Macrophage and Dendritic Cell Society 2012 Meeting, Debrecen.
5. Gabrilovac, J., B. Čupić, **E. Zapletal**, L. Horvat i D. Majhen (2011). Mannose-receptor-mediated phagocytic activity of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2; APN; CD13) on murine

macrophage J774 cell line. 2011 Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Rabac.

6. Gabrilovac, J., **E. Živković** i B. Čupić (2010). Expression pattern and activation of dipeptidyl peptidase (DPP)-4 and -9 in murine cells of hematopoietic origin. 2010 Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Mali Lošinj.
7. Gabrilovac, J., **E. Živković** i B. Čupić (2008). Regulacija kapa opioidnih receptora (KOR) na mišjoj T-staničnoj liniji R1.1. Znanstveni simpozij 50 godina molekularne biologije u Hrvatskoj, Zagreb.
8. Gabrilovac, J., **E. Živković** i B. Čupić (2008). Regulation of functional kappa opioid receptors (KOR) on murine T-cell line R1.1. 2008 Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Šibenik.
9. Borovic Sunjic, S., M. Stroser, **E. Živković**, S. Stolc i N. Zarkovic (2007). 4-hydroxynonenal enhances permeability of in vitro intestinal barrier model. COST Meeting "Oxygen, Stress and Lipids", Dubrovnik.
10. Stroser, M., S. Borovic Sunjic, **E. Živković**, S. Stolc i N. Zarkovic (2007). In vitro model of intestinal barrier in oxidative stress research. Herman Esterbauer Memorial Meeting Reactive Oxygen Species & Antioxidants: From Biochemistry to Human Disease, Graz.