

# Vežanje peptida na enzim dipeptidil-peptidazu III (DPP III) metodom izotermne titracijske kalorimetrije (ITC)

---

Čerkez, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:593995>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-30**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Iva Čerkez**

7003/BT

**Vežanje peptida na enzim dipeptidil-peptidazu III (DPP III)  
metodom izotermne titracijske kalorimetrije (ITC)**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Fizikalna kemija

**Mentor:** doc.dr.sc. Filip Šupljika

**Zagreb, 2020.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija**

**Zavod za kemiju i biokemiju**  
**Laboratorij za fizikalnu kemiju i koroziju**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**  
**Znanstveno polje: Biotehnologija**

**Vežanje peptida na enzim dipeptidil-peptidazu III (DPP III) metodom izotermne titracijske kalorimetrije (ITC)**

***Iva Čerkez, 0058206221***

**Sažetak:** Izotermna titracijska kalorimetrija je kalorimetrijska metoda koja služi za određivanje termodinamičkih parametara interakcija u otopini mjerenjem promjene topline tijekom kemijske reakcije. Aminopeptidaza dipeptidil-peptidaza III je enzim s bitnom funkcijom u brojnim fiziološkim procesima u organizmu, poput obrane od oksidativnog stresa i nastanka nekih tumora, a također je i eksperimentalno dokazana njena uloga u završnim fazama razgradnje bjelančevina. U ovom radu je prikazano praćenje vezanja nekih peptida na ovaj enzim metodom izotermne titracijske kalorimetrije, te je promatrano njihovo potencijalno inhibitorско djelovanje. Zaključak je da krupni arilni supstituent pridonosi inhibitorском efektu. Dipeptidil-2-naftilamidni supstrati te oligopeptidi spadaju u skupinu dobrih supstrata za ovaj enzim.

**Ključne riječi:** DPP III, ITC, kalorimetrija, peptidi, termodinamika

**Rad sadrži:** 22 stranice, 11 slika, 16 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** doc.dr.sc. Filip Šupljika

**Datum obrane:** 1.rujna 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Biotechnology**

**Department of Chemistry and Biochemistry**  
**The Laboratory for Physical Chemistry and Corrosion**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

**Isothermal titration calorimetry (ITC) studies of the binding of peptides to  
enzyme dipeptidyl-peptidase III (DPP III)**

***Iva Čerkez, 0058206221***

**Abstract:** Isothermal titration calorimetry is a calorimetric method that is used to determine relevant thermodynamic parameters of certain interactions in solution, by measuring heat changes during chemical reactions. Aminopeptidase dipeptidyl-peptidase III is an enzyme carrying important functions in numerous physiological processes in organism. For instance, the enzyme takes part in defense mechanisms regarding oxidative stress as well as in mechanisms that prevent occurrence of certain tumors. Its role in final stages of protein degradation is also experimentally proven. This thesis discusses monitoring of binding of certain peptides on the above mentioned enzyme as well as impacts of binding, such as peptide's potential inhibitory action. Both processes are monitored through isothermal titration calorimetry. It is concluded that big aryl substituents contribute to the inhibitory effect. Furthermore, dipeptidyl-2-naphthylamides and oligopeptides belong to the group of good substrates for the enzyme discussed in this thesis.

**Keywords:** calorimetry, DPP III, ITC, peptides, thermodynamics

**Thesis contains:** 22 pages, 11 figures, 16 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** doc.dr.sc. Filip Šupljika

**Defence date:** September 1<sup>st</sup>, 2020.

# SADRŽAJ

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| 1. UVOD.....                                                | 1  |
| 2. TEORIJSKI DIO .....                                      | 2  |
| 2.1. Metoda izotermne titracijske kalorimetrije .....       | 2  |
| 2.2. Enzim dipeptidil-peptidaza III .....                   | 9  |
| 2.3. Vežanje peptida na enzim dipeptidil-peptidazu III..... | 13 |
| 3. ZAKLJUČAK.....                                           | 20 |
| 4. POPIS LITERATURE .....                                   | 21 |

# 1. UVOD

Svrha kalorimetrijskih metoda je mjerenje izmjene topline tijekom kemijskih reakcija. Izotermna titracijska kalorimetrija (ITC) je kalorimetrijska metoda pomoću koje se može direktno odrediti promjena entalpije, a posljedično i ostale termodinamičke varijable poznavanjem matematičkih relacija između njih. Služi i za određivanje kinetičkih parametara ( $k_{on}$  i  $k_{off}$ ), te kinetičkih parametara enzimskih reakcija ( $K_m$  i  $k_{cat}$ ). Termodinamički opis reakcije od interesa daje uvid u sva relevantna svojstva molekula koje su u tu reakciju uključene, te definira njihove interakcije. ITC metoda se bazira na dodavanju titransa u otopinu u kojoj se nalazi makromolekula od interesa, te se prati njegovo vezanje na makromolekulu. Temperatura je tijekom cijelog procesa konstantna. Uslijed vezivanja dolazi do vezanja ili oslobađanje topline, ovisno o tome radi li se o endotermnoj ili egzotermnoj reakciji. Eksperimentalni podaci dobiveni ITC metodom se manifestiraju pikovima usmjerenim prema gore u odnosu na baznu liniju ako je riječ o endotermnoj, odnosno prema dolje ako je riječ o egzotermnoj reakciji. Integriranjem dobivenih pikova dobiva se krivulja, iz koje se nelinearnom regresijom mogu odrediti termodinamički parametri (reakcijska entalpija, entropija i Gibbsova energija te konstanta vezanja).

Dipeptidil-peptidaza III (DPP III) je egzopeptidaza, aminopeptidaza ovisna o cinku, jako zastupljena u tkivu sisavaca. Hidrolizira dipeptide i ima snažnu ulogu u brojnim fiziološkim procesima. Eksperimentalno je dokazano da je važna u obrani od oksidativnog stresa, u završnim fazama razgradnje bjelancevina, te da ima ulogu u nastanku nekih vrsta karcinoma kod čovjeka.

Određena je kristalna struktura ljudske (humane) DPP III u kompleksu s peptidima angiotenzinom II, Met-enkefalinom, Leu-enkefalinom, endomorfinom 2 i sintetičkim peptidom IVYPW, kao i termodinamički parametri prilikom vezanja tri analoga Arg-Arg-2-naftilamida, te derivata fenantridina, kao potencijalnih inhibitora DPP III, na ljudsku DPP III.

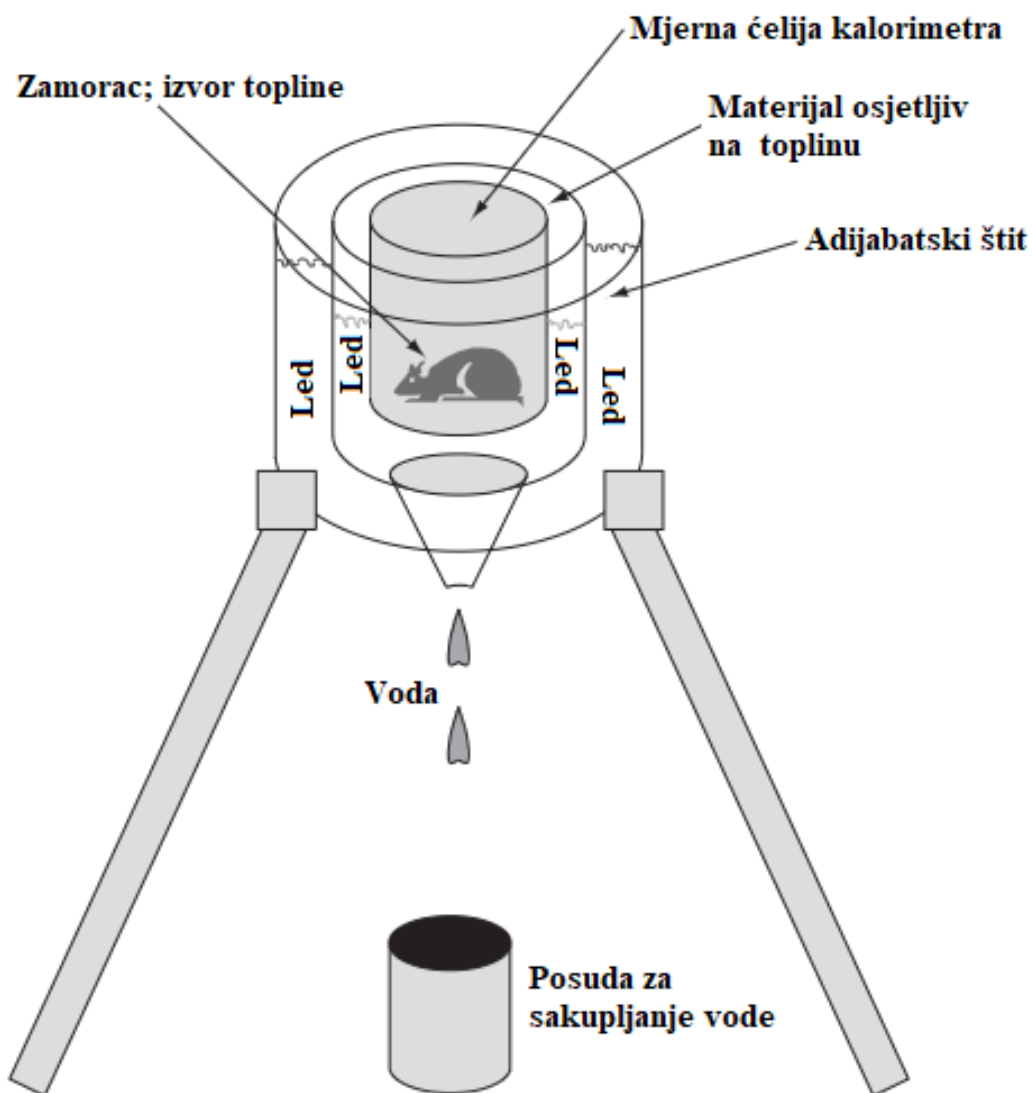
## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Metoda izotermne titracijske kalorimetrije

Mikrokalorimetrija bioloških molekula je privlačna znanstvenicima iz nekoliko razloga. Proteini i nukleinske kiseline, sastavljeni od velikog broja atoma, sudjeluju u termičkom gibanju i predstavljaju individualne kvazi - makroskopske sustave. Analogno tomu, nazivaju se makromolekulama. Da bi se dobile sve relevantne informacije o biološkim makromolekulama, moraju se poznavati njihova termodinamička svojstva. Bez poznavanja termodinamičkih svojstava, svi zaključci o principima organizacije ovih makromolekula, mehanizmima njihovog nastajanja i stabilizacije trodimenzionalne strukture su samo nagađanje. Dakle, važno je poznavati strukturu makromolekule te njezina termodinamička svojstva (Privalov, 2012).

Područje znanosti koje se bavi mjerenjem izmjene topline u kontekstu kemijskih reakcija naziva se kalorimetrija. (Thomson i Ladbury, 2004). U kemijskoj reakciji dolazi do izmjene topline između sustava i okoline. Toplina se može vezati iz okoline i takvi procesi nazivaju se endotermnim, a u slučaju kada se toplina oslobađa iz sustava, riječ je o egzotermnim procesima. Izmijenjena toplina pri stalnom tlaku jednaka je promjeni entalpije za određenu reakciju. Obično se izražava u mjernim jedinicama kcal/mol ili kJ/mol. Kalorimetrijska mjerenja (Slika 1) mogu se izvesti na tri različita načina, a za sva mjerenja dostupni su komercijalni instrumenti, različitih proizvođača. Te tri metode mjerenja baziraju se na promjeni temperature, kompenzaciji energije i na prijenosu topline (Freyer i Lewis, 2008) .

Potpuni termodinamički profil za reakciju od interesa zahtijeva određivanje Gibbsove energije, entalpije i entropije pri zadanoj temperaturi i promjenu toplinskog kapaciteta ako se entalpija mijenja s temperaturom. Reakcijska Gibbsova energija  $\Delta_r G$  je ključni parametar, jer opisuje smjer odvijanja reakcije, odnosno predstavlja kriterij spontanosti reakcije pri stalnom tlaku i temperaturi. Ona predstavlja balans između reakcijske entalpije i entropije. Ako je Gibbsova energija negativna, reakcija se spontano odvija (Chaires, 2008).



Slika 1. Lavoisierov kalorimetar s ledom pomoću kojeg se mjerila toplina koju proizvodi zamorac u mjernoj ćeliji. Vanjski drveni sloj okružuje sloj od leda koji služi kao adijabatski štit. Drugi sloj leda direktno okružuje mjernu ćeliju sa zamorcem, te se mjeri volumen vode koji nastaje otapanjem leda zbog topline koju proizvodi metabolizam zamorca (Freyer i Lewis, 2008).

Promjena Gibbsove energije definirana je jednačbom (1), gdje je  $\Delta H$  promjena entalpije,  $T$  označava termodinamičku temperaturu, a  $\Delta S$  promjenu entropije. Izražava se u mjernoj jedinici J.

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (1)$$

Ako je pak riječ o reakcijskoj veličini, vrijedi formula (2), i u tom slučaju se izražava u mjernoj jedinici J/mol.



$$\Delta_r G = \Delta_r H - T \cdot \Delta_r S \quad (2)$$

Promjena entalpije označava količinu toplinske energije koja je potrebna za postizanje određenog stanja pri stalnom tlaku, dok entropija opisuje uređenost sustava. Entalpija kao funkcija stanja se može opisati jednadžbom (3), gdje je  $U$  unutarnja energija,  $V$  označava volumen sustava, a  $p$  tlak.

$$H = U + p \cdot V \quad (3)$$

Reakcijska entalpija, kao funkcija stanja, se izračunava na način da se vrijednost ukupne entalpije produkata umanjuje za vrijednost ukupne entalpije reaktanata, što prikazuje jednadžba (4).

$$\Delta_r H^\circ = H^\circ_P - H^\circ_R \quad (4)$$

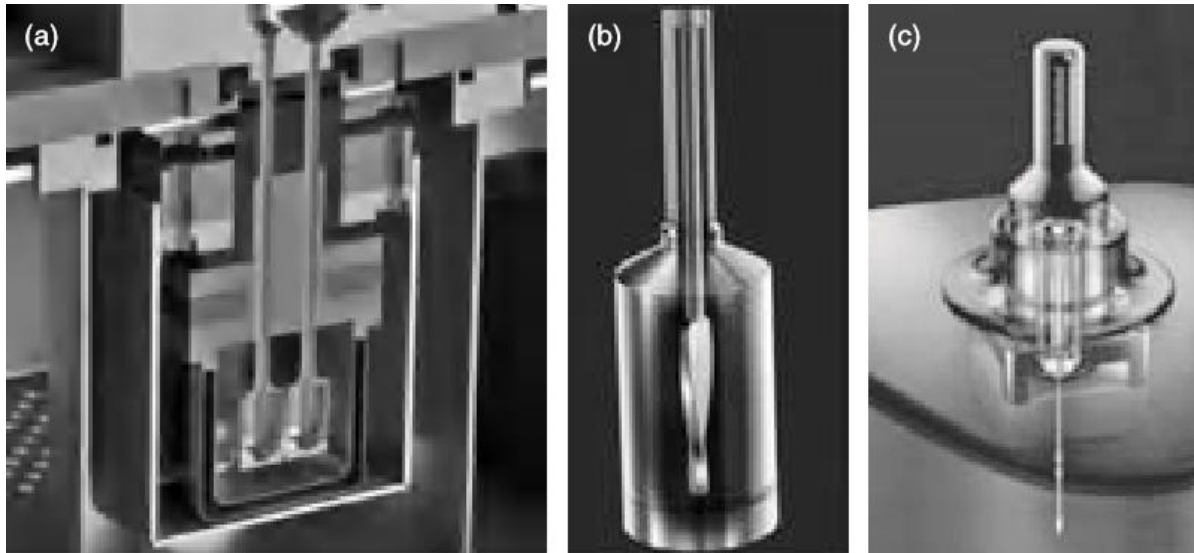
Entropija je, kao i entalpija i Gibbsova energija, funkcija stanja, što znači da ovisi samo o konačnom i početnom stanju sustava, a ne i o putu kako se do tih stanja dolazi. Jednadžba za računanje promjene entropije je (5), gdje je  $\Delta Q$  promjena topline, a  $T$  je termodinamička temperatura. Izražava se u mjernoj jedinici J/K. Reakcijska entropija dobije se zbrajanjem svih umnožaka standardnih molarnih entropija i stehiometrijskih koeficijenata sudionika reakcije.

$$\Delta S = \frac{\Delta Q}{T} \quad (5)$$

Sustav spontano teži prema sve većem neredu, pri čemu dolazi do povećanja ukupne entropije sustava. Pozitivne vrijednosti entropije su česte za reakcije vezivanja, što se može objasniti kao prirodna težnja sustava k što većem neredu (Chaires, 2008).

Moderna instrumentacija za kalorimetriju omogućava direktno određivanje promjene entalpije za reakcije vezivanja i reakcije u kojima dolazi do promjene konformacije molekule, no i kompletni termodinamički profil za reakciju od interesa, što znači također i određivanje promjene Gibbsove energije i entropije. U biofizici i biokemiji najčešće se koriste dvije kalorimetrijske metode: diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) i izotermna titracijska kalorimetrija (ITC). Instrumenti koji se koriste za obje spomenute metode su kompenzacijski, što znači da se baziraju na kompenziranju snage između mjerne i referentne ćelije. U obje metode promatra se promjena temperature između referentne ćelije i mjerne ćelije. Kod metode DSC, temperatura se mijenja definiranom brzinom, dok je kod metode ITC temperatura konstantna tijekom cijelog eksperimenta. Princip rada ITC-a je da se iz titracijske igle dodaje ligand u otopinu makromolekule, pri čemu se prati vezanje liganda na makromolekulu (Chaires, 2008). Pufer u kojem je otopljen ligand mora biti identičan puferu u kojem je otopljena makromolekula (identičan pH, koncentracija soli...) da bi se pratila samo

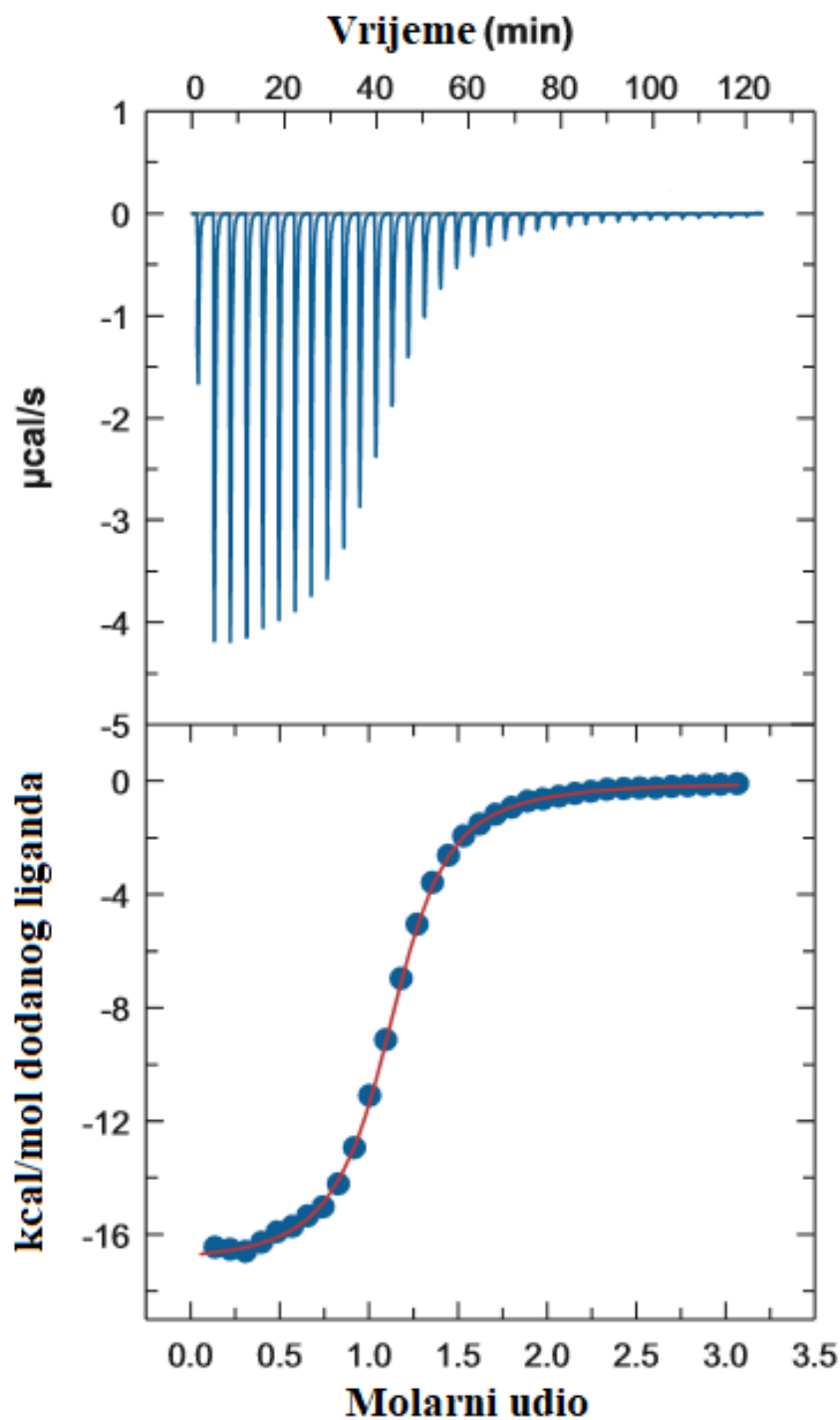
reakcija vezanja, a ne neki drugi procesi koji bi mogli zamaskirati proučavani proces. Volumeni liganda i makromolekule potrebni za mjerenje ovise o tipu instrumenta na kojem se eksperimenti provode. Titracijska igla i ćelije (Slika 2) napravljeni su od inertnih materijala da bi se spriječila bilo kakva interakcija s uzorkom.



Slika 2. Važni dijelovi jednog od komercijalnih ITC instrumenata. (a) kalorimetrijski blok koji pokazuje lokaciju mjerne i referentne ćelije; (b) mjerna ćelija u koju je umetnuta titracijska igla; (c) titracijska igla (Privalov, 2012).

Svaka izmjena topline ili promjena temperature uslijed vezanja liganda na makromolekulu rezultira disbalansom između referentne ćelije i mjerne ćelije, što se kompenzira na način da se mjerna i referentna ćelija ponovno vrata u toplinsku ravnotežu, grijanjem ili hlađenjem pomoću Peltierovih elemenata (Chaires, 2008). ITC je idealan instrument za određivanje potpunog termodinamičkog profila neke reakcije ( $\Delta_r G$ ,  $\Delta_r H$ ,  $\Delta_r S$ ), no može se koristiti i za određivanje kinetičkih parametara ( $k_{on}$  i  $k_{off}$ ), ali i za određivanje kinetičkih parametara enzimskih reakcija ( $K_m$  i  $k_{cat}$ ). Tijekom vremena povećavala se osjetljivost dostupnih komercijalnih instrumenata što je dovelo do toga da se ITC danas rutinski koristi za direktno određivanje kinetičkih parametara ( $K_m$  i  $k_{cat}$ ) enzimskih reakcija koje se odvijaju prema Michaelis-Menten mehanizmu (Todd i Gomez, 2001; Williams i Toone, 1993).

Da bi se u potpunosti iskoristile prednosti ITC metode, potrebno je odrediti optimalne eksperimentalne uvjete kako bi se dobiveni rezultati mogli analizirati i interpretirati.



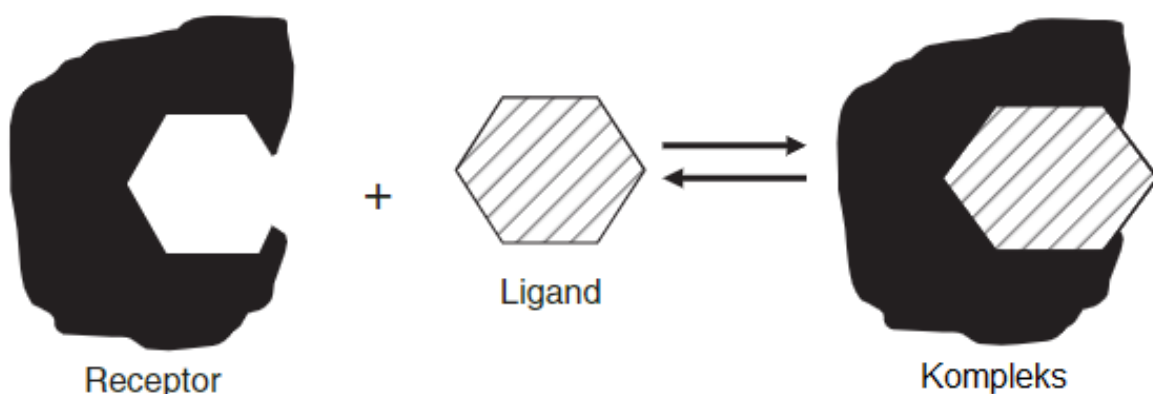
Slika 3. Gornja slika prikazuje sirove eksperimentalne podatke ITC titracije, a donja slika integrirane pikove, koji su predstavljeni nelinearnom regresijom (Chaires, 2008).

U ITC instrumentu, mjerna ćelija kalorimetra održava se na konstantnoj temperaturi. U slučaju egzotermne reakcije toplina se oslobađa, uzrokujući porast temperature u mjernoj ćeliji u odnosu na referentnu ćeliju, što rezultira smanjenjem referentne snage mjerne ćelije da se to kompenzira. To se na slici manifestira pikom koji je usmjeren prema dolje u odnosu na

baznu liniju. Ako je reakcija endotermna, mjerna ćelija je hladnija od referentne ćelije, pri čemu se referentna snaga povećava da bi se to kompenziralo. To se na slici manifestira pikom koji je usmjeren prema gore u odnosu na baznu liniju(Freyer i Lewis, 2008).

(Slika 3) je tipični prikaz dobivenih i analiziranih podataka ITC metodom. Gornji dio pokazuje primarne podatke, odnosno one koji se dobiju netom nakon titracije i završenog eksperimenta. Tu je kompenzacijska snaga prikazana kao funkcija vremena. Svaki pik označava jedan dodatak liganda u reakcijsku ćeliju gdje se nalazi makromolekula dok površina ispod svakog pika označava vezanu ili oslobođenu toplinu prilikom svakog dodatka liganda. S vremenom receptorsko mjesto na makromolekuli postaje sve zasićenije, veličina pikova se postepeno smanjuje sve dok ne nastupi zasićenje, što se manifestira malim pikovima jednake veličine na kraju titracije. Integriranjem površine ispod svakog pojedinog pika dobiva se krivulja, koja se može predstaviti nelinearnom regresijom (Slika 3, donja slika), iz čega se onda dobivaju termodinamički parametri tog vezanja (konstanta vezanja, reakcijska entalpija, entropija i Gibbsova energija te stehiometrija vezanja)(Chaires, 2008).

Važno je napomenuti da, u ovom kontekstu, ligand može biti supstrat, inhibitor, kofaktor, neki lijek, koenzim, metalni ion, prostetska grupa, protein ili polipeptid, oligonukleotid ili nukleinska kiselina; bilo koje molekule za koje je poznato da mogu stupati u nekovalentne interakcije sa specifičnim mjestom na drugoj molekuli, koja je obično protein ili nukleinska kiselina (Freyer i Lewis, 2008).



Slika 4. Vezanje liganda na makromolekulu (Privalov, 2012) .

Za dublju analizu Slike 4, potrebno je poznavati ravnotežnu konstantu za prikazanu reakciju, te ostale termodinamičke parametre. ITC omogućava da se u jednoj titraciji dobiju svi relevantni termodinamički parametri (konstanta vezanja, reakcijska entalpija, entropija i

Gibbsova energija te stehiometrija vezanja). Dakle, za sam početak izračuna je bitno navesti da je  $Q$  opservirani toplinski efekt reakcije u kalorimetrijskoj ćeliji. Ako je molarna koncentracija makromolekula u ćeliji (6), gdje je  $M$  koncentracija makromolekule, a  $ML$  koncentracija kompleksa makromolekule i liganda, i ako je volumen ćelije  $V$ , onda imajući na umu jednadžbu (7), gdje je  $F$  frakcija makromolekula s vezanim ligandom, dolazi se do sljedećeg koraka.

$$[M]_{tot} = [M] + [ML] \quad (6)$$

$$F = \frac{[ML]}{[M] + [ML]} = \frac{K[M][L]}{[M] + K[M][L]} = \frac{K[L]}{1 + K[L]} \quad (7)$$



$$K_a = \frac{[ML]}{[M] \times [L]} \quad (9)$$

Do prethodno navedene jednadžbe se došlo uzimajući u obzir najjednostavniju pretpostavku, a to je da makromolekula od interesa ima samo jedno mjesto na koje se može vezati ligand, odnosno vrijedi jednadžba (8). Konstanta vezanja za ovu reakciju može se izračunati koristeći jednadžbu (9). Uzevši jednadžbu (7) u obzir, slijedi jednadžba (10), gdje je  $\Delta H$  promjena entalpije.

$$Q = \Delta H \cdot V \cdot [ML] = \Delta H \cdot V \cdot [M]_{tot} \frac{K[L]}{1 + K[L]} \quad (10)$$

Mora se u obzir uzeti broj mjesta na koje se može vezati ligand, a za izračun se koristi jednadžba (11).

$$Q = \Delta H \cdot V \cdot [M]_{tot} \frac{nK[L]}{1 + K[L]} \quad (11)$$

Koncentracija slobodnog liganda  $[L]$  se ne može direktno odrediti, stoga se dolazi do trenutka kad je potrebno napraviti kompleksnu aproksimaciju svih podataka koji su eksperimentalno dobiveni, a sama metoda ovisi o broju mjesta na makromolekuli na koje se ligand može vezati. Najjednostavniji slučaj je onda kad postoji samo jedno mjesto za vezanje liganda na makromolekulu. Uzevši u obzir jednadžbu (12), (13), (14) te (15)

$$[L]_{tot} = [L] + [ML] \quad (12)$$

$$[L] = [L]_{tot} - [ML] \quad (13)$$

$$[M]_{tot} = [M] + [ML] \quad (14)$$

$$[M] = [M]_{tot} - [ML] \quad (15)$$

dobiju se jednadžbe (16) i (17)

$$K([L]_{tot} - [ML])([M]_{tot} - [ML]) = [ML] \quad (16)$$

$$K[M]_{tot}[L]_{tot} - K[M]_{tot}[ML] - [ML] + K[L]_{tot}[ML] + K[ML]^2 - [ML] = 0. \quad (17)$$

Zatim posljedično slijede jednačbe (18) i (19).

$$[ML]^2 + \left(-[M]_{tot} - [L]_{tot} - \frac{1}{K}\right)[ML] + [M]_{tot}[L]_{tot} = 0 \quad (18)$$

$$[ML]^2 + b[ML] + c = 0 \quad (19)$$

Tu se moraju uzeti u obzir jednačbe (20) i (21).

$$b = -[M]_{tot} - [L]_{tot} - \frac{1}{K} \quad (20)$$

$$c = [M]_{tot}[L]_{tot} \quad (21)$$

$$[ML] = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4c}}{2} \quad (22)$$

Riješavanjem kvadratne jednačbe (18) može se izračunati koncentracija kompleksa ML, što je prikazano jednačbom (22) (Privalov, 2012).

Dakle, ITC metoda je izvrsna za određivanje konstanti vezanja i stehiometrije vezanja. Najveća prednost ove metode je mogućnost direktnog određivanja promjene reakcijske entalpije, a zatim i ostalih termodinamičkih veličina (reakcijske entropije i Gibbsove energije) bitnih za razumijevanje interakcija između liganda i makromolekule (Thomson i Ladbury, 2004).

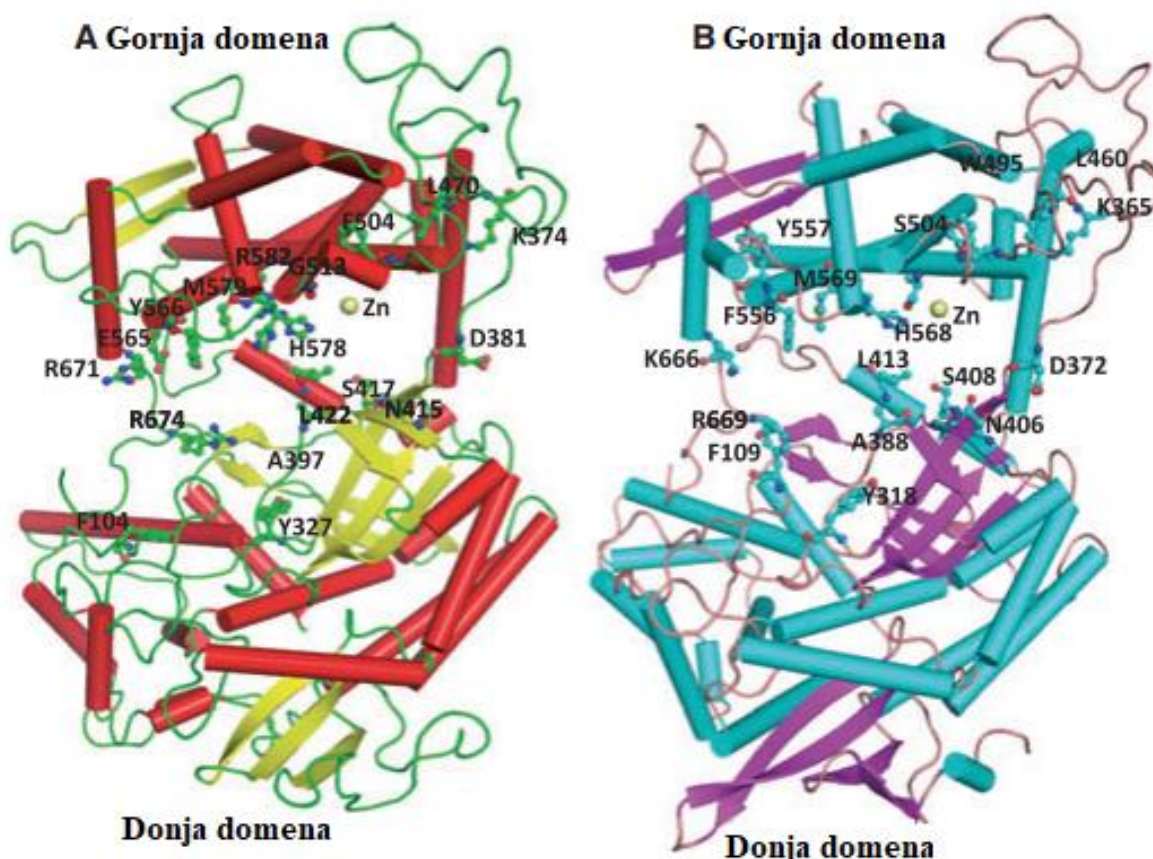
## 2.2. Enzim dipeptidil-peptidaza III

U živim organizmima, proteini su najraznolikije molekule. Imaju ulogu u prijenosu signala živčanog sustava, pohranjuju kisik, izgrađuju tkiva, reguliraju metabolizam te djeluju kao biokatalizatori. Kad se govori o katalizirajućem učinku proteina, misli se na enzime, koji obavljaju tu funkciju. Dakle, enzimi utječu na brzinu kemijske reakcije, te omogućavaju funkcioniranje organizama, s obzirom da su bi se te neophodne reakcije bez njih odvijale presporo. Način na koji djeluju enzimi je snižavanje energije aktivacije određene reakcije od interesa. Enzimi su vrlo specifični, ovise o obliku, naboju i hidrofobnim odnosno hidrofilnim karakteristikama supstrata, odnosno molekule s kojom stupaju u interakciju. Također su i vrlo fleksibilni, pa se tako neki enzimi mogu inducirano prilagoditi obliku molekule s kojom bi trebali

stupiti u interakciju, odnosno njihovo aktivno mjesto može biti modificirano. Tijekom reakcije ostaju nepromijenjeni, što omogućuje da se isti enzim nakon ubrzanja jedne reakcije odmah uključi u drugu reakciju. Enzimske reakcije karakterizira spontanost, dakle enzimi ne utječu na smjer reakcije. U termodinamičkom smislu bi to značilo da vrijednost Gibbsove energije takve reakcije mora biti negativna. Ligand formira kompleks s nekom makromolekulom. To su signalne molekule koje odlikuje specifičnost, te se vežu na vezna mjesta na molekuli enzima koja nemaju katalitičku aktivnost. Ligand može biti supstrat, inhibitor ili aktivator. Inhibitor je tvar koja može smanjiti brzinu kemijske reakcije ili u potpunosti spriječiti kemijsku reakciju. Aktivator kemijsku reakciju ubrzava. Supstrat je specifična molekula na koju enzim djeluje (Berg i sur., 2012). Manjak informacija o strukturi supstrata, aktivatora ili inhibitora dipeptidil-peptidaze III je bio glavni razlog za nerazumijevanje specifičnosti ovog enzima i razvoja specifičnih inhibitora (Bezzera i sur., 2012).

Dipeptidil-peptidaza III (DPP III) je aminopeptidaza ovisna o ionu cinka, te dio M49 porodice metalopeptidaza, koja hidrolizira dipeptide. Aminopeptidaze su biokatalizatori, enzimi, koji kataliziraju cijepanje aminokiselina s amino kraja proteina ili peptida. Široko su rasprostranjene u živom svijetu. Funkcija DPP III, odnosno njena fiziološka uloga, još uvijek nije potpuno razjašnjena (Prajapati i Chauhan, 2011). No neke su stvari ipak poznate, pa se tako zna da je to enzim s važnom ulogom u katabolizmu proteina unutar stanice, te je važan u obrani od oksidativnog stresa. Pretpostavlja se da ima ulogu u nastanku i aktivnosti primarnog karcinoma jajnika, karcinoma dojke, modulaciji boli i upala, u završnim fazama razgradnje proteina, ulogu u funkciji endokrinog sustava, probavnog sustava, te regulaciji krvnog tlaka. Interes za daljnje istraživanje ovog enzima je stoga svakako opravdan, s obzirom da očito ima snažnu ulogu u brojnim fiziološkim procesima (Špoljarić i sur., 2009). Za metalopeptidaze kodira 194 gena i one formiraju najveću frakciju proteolitičkog sustava, te su skoro sve citosolne i membranske aminopeptidaze upravo metalopeptidaze. DPP III je inicijalno izolirana i pročišćena iz režnja goveđe hipofize (Akiyama i sur., 1998), a nazvana je dipeptidil peptidazom III jer je treća dipeptidil peptidaza koja je bila identificirana. Njezini homolozi su zatim pronađeni u brojnim prokariotskim i eukariotskim vrstama, kao što su ljudski krvne stanice, posteljica, koža i mišići, te brojni drugi dijelovi ljudskog tijela, zatim u stanicama jetre, kože i mozga štakora, brojnih drugih sisavaca, te vrsta kao što su *Echis coloratus*, *Drosophila melanogaster*, *Blaberus craniifer*, *Dictyostelium discoideum*, *S. Cerevisiae* i *Entamoeba histolytica*. Većina istraživanja je provedena na eukariotima. Spoznalo se da je to citosolna peptidaza, aktivna pri neutralnom pH. Zbog njenog afiniteta prema različitim tipovima bioaktivnih peptida i sintetičkih supstrata, nazvana je enkefalinazom B, dipeptidil-aminopeptidazom III, dipeptidil arilamidaza II, te

angiotenzinazom crvenih krvnih stanica. Uzevši u obzir da ih jako inhibiraju inhibitori serinskih peptidaza, DPP III sisavaca je nekad bila klasificirana kao serinska peptidaza, no kristalografska struktura ovog enzima je pokazala da se Glu461 ponaša kao baza u katalitičkoj reakciji pri aktivaciji molekula vode deprotoniranjem, te je stoga glavni regulator aktivnosti ove porodice enzima. To je dokazano i eksperimentom gdje je izvršena ciljana mutagenaza ovog dijela enzima, koja je dovela do smanjene učinkovitosti katalitičke reakcije, stoga se nakon tog DPP III nije više smatrala serinskom peptidazom (Prajapati i Chauhan, 2011). Molekula vode je koordinirana na ion cinka, te se nakon njene aktivacije dešava nukleofilni napad na peptidnu vezu (Sabljčić, 2018). Molarna masa pročišćene DPP III varira između 69 i 89 kDa. Divlji tip kvaščeve dipeptidil-peptidaze III može postojati kao monomer ili dimer, a sve ostale istražene DPP III su isključivo monomeri (Prajapati i Chauhan, 2011).

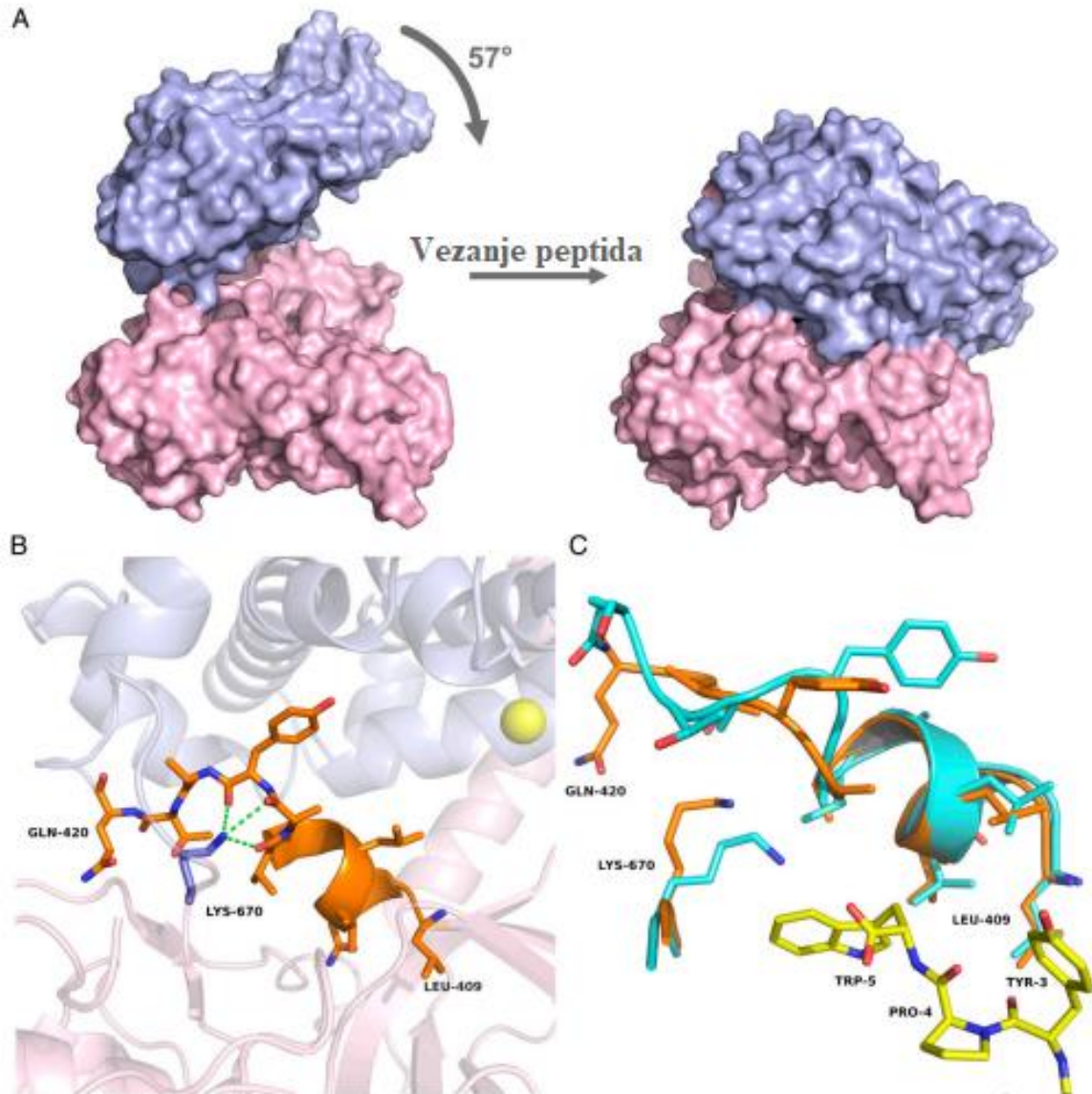


Slika 5.A) Kvaščeve DPP III i B) ljudska DPP III. Na slici su prikazane dvije domene, gornja i donja, označen je ion cinka te aminokiselinski ostaci (Prajapati i Chauhan, 2011)

Kemijska reakcija koju katalizira ovaj enzim je odvajanje dipeptida s *N*-terminalnog dijela peptida. Njegova specifičnost je široka. Ljudska i kvaščeve DPP III su, promatrajući kristalografski određenu strukturu slične, te se može vidjeti da je riječ o proteinu s dvije domene (Slika 5). Ljudska DPP III se sastoji od katalitičke domene u kojoj se nalazi metalni



ion i veće, satelitne domene s dubokim rascjepom u sredini. Obje su strukture prilično slične. Gornja domena je uglavnom  $\alpha$ -heliks i ima vezno mjesto s cinkom (Kumar i sur., 2016), a donja domena se sastoji od paralelnih  $\beta$ -nabranih ploča, oko kojih se nalaze  $\alpha$ -uzvojnice. Uz te dvije paralelne  $\beta$ -nabrane ploče, na donjoj strani ove domene se nalazi još jedna (Sabljčić, 2018).



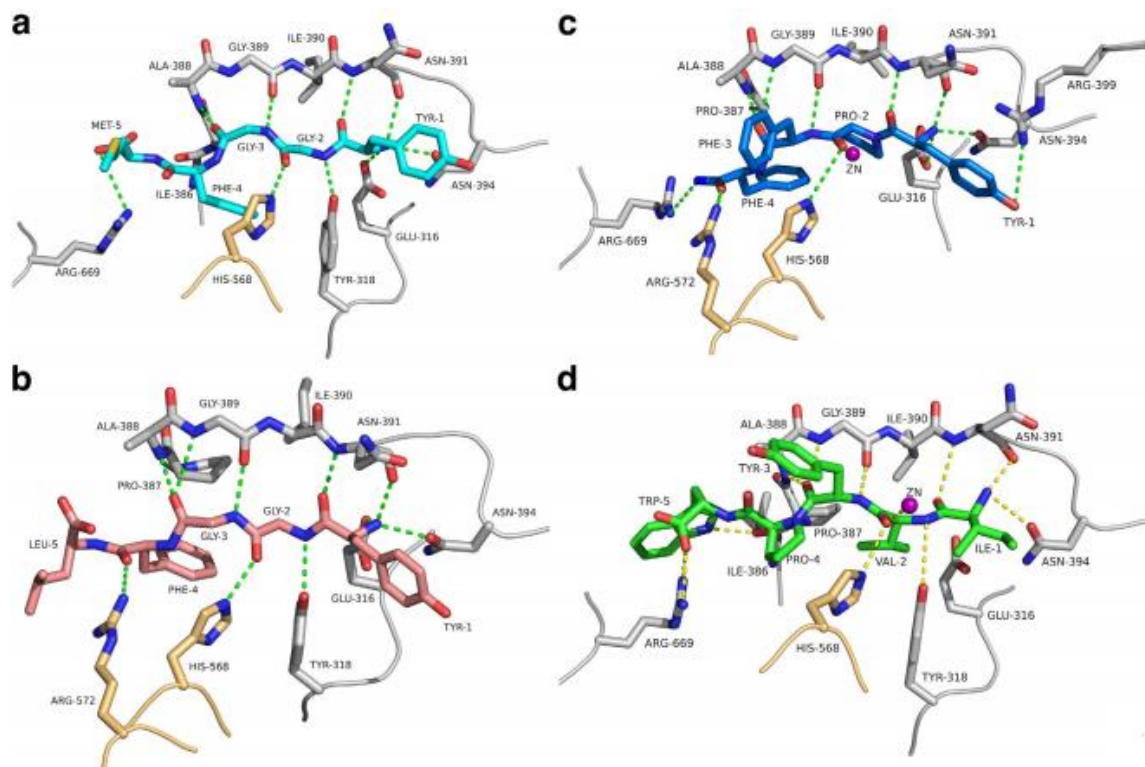
Slika 6. Promjena konformacije dipeptidil-peptidaze III izolirane iz čovjeka uslijed vezivanja peptida. A) Prikaz promjene konformacije uslijed vezanja peptida na DPP III. B) Detaljniji prikaz dodirne regije gornje i donje domene u narančastoj boji. Prikazani su aminokiselinski ostaci. C) Prikaz dodirne regije bez kompleksa s peptidom i u kompleksu s peptidom (Bezerra i sur., 2012).

DPP III ima jedinstveni strukturni heksapeptidni motiv, HEXXXH, a upravo zbog njega dolazi do vezanja iona cinka te je posljedično važan za katalitičku aktivnost enzima. Druge metalopeptidaze imaju motiv HEXXH (Sabljčić, 2018). Eksperimentalno je dokazano, na primjeru DPP III izolirane iz štakora, da ciljanom mutagenezom heksapeptida u pentapeptid, enzim gubi aktivnost, čime je dokazana važnost ovog jedinstvenog motiva (Fukasawa i sur., 1999). Cinkov ion je od ključne važnosti u strukturi ovog enzima, a koordiniran je s dva His ostatka iz HEXXXH (Chiba i sur., 2003), glutaminskom kiselinom i molekulom vode. (Sabljčić, 2018). Prisutnost rascjepa uz veliki broj potencijalnih supstrata navodi na zaključak da ljudska DPP III može vršiti različite unutarnje kretnje i formacije, pri čemu je najkompaktnija forma ujedno i najstabilnija, što je eksperimentalno dokazano. Potrebna je velika promjena konformacije (Slika 6) za stvaranje aktivnog mjesta. Supstrat koji se hidrolizira ovim enzimom se veže na način da bude u interakciji s obje domene, te utječe na orijentaciju obiju domena te pomiče konformacijsku ravnotežu ka kompaktnijoj formi, odnosno stabilnijoj. Eksperimentalno je dokazano da DPP III preferira ligande koji zauzimaju sekundarnu strukturu  $\beta$ -nabrane ploče (Matić i sur., 2012).

### **2.3. Vežanje peptida na enzim dipeptidil-peptidazu III**

Kumar i sur. su 2016. godine odredili kristalnu strukturu DPP III izolirane iz čovjeka u kompleksu sa sljedećim ligandima: angiotenzinom II, Met-enkefalinom, Leu-enkefalinom, endomorfinom 2 i sintetičkim peptidom IVYPW (Slika 7). Također su odredili kristalnu strukturu DPP III bez vezanog liganda u zatvorenoj konformaciji. Konformacija može biti otvorena ili zatvorena, one su u ravnoteži, s tim da vežanje liganda usmjerava konformaciju k zatvorenom obliku (Sabljčić, 2018).

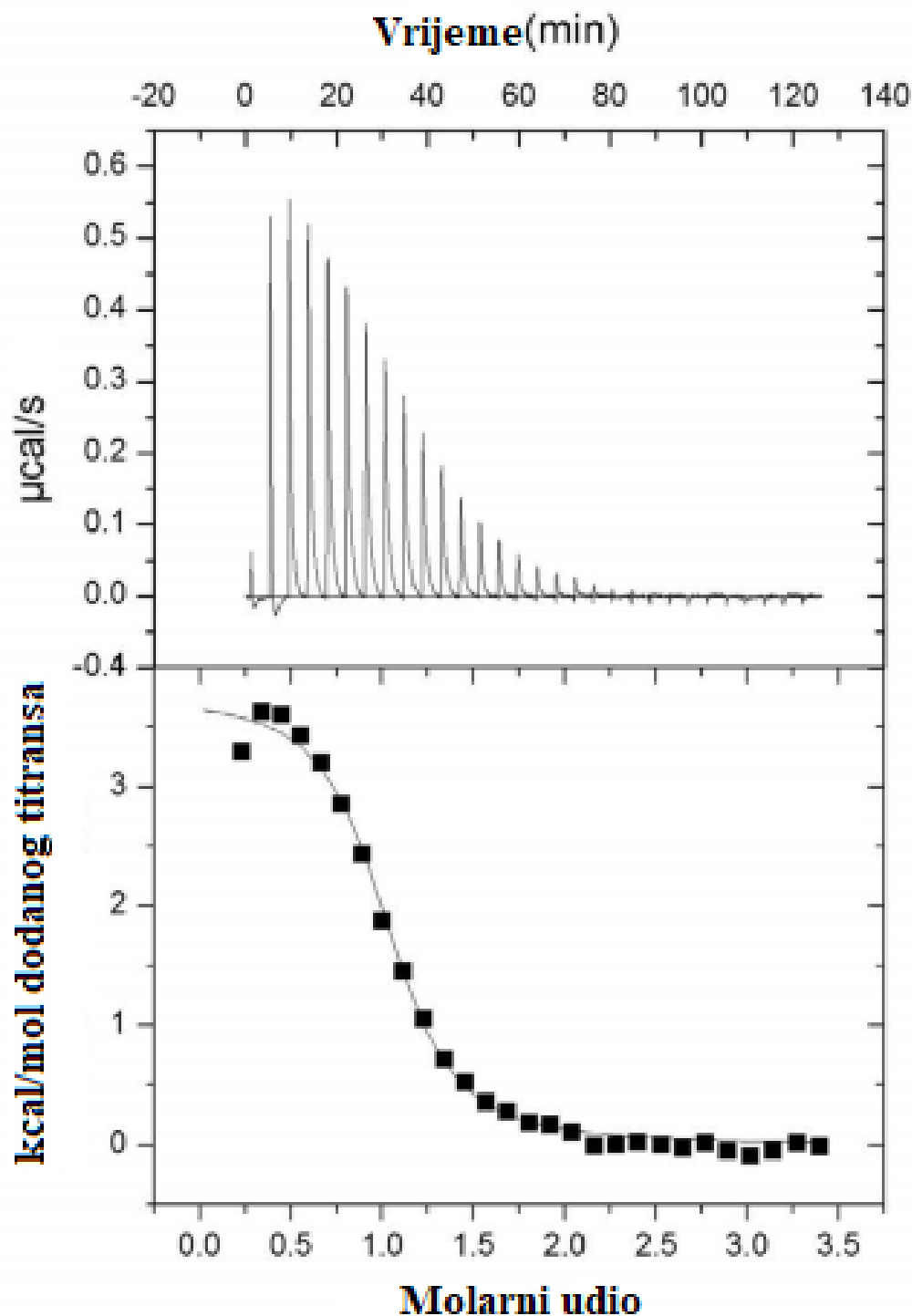
Met-enkefalin i Leu-enkefalin su neurotransmiteri pronađeni u mozgu i leđnoj moždini mnogih životinja pa tako i ljudi. Ostvaruju polarne interakcije s DPP III, i to isključivo s onim aminokiselinskim ostacima koji pripadaju donjoj domeni. Leu-enkefalin se vezao s inaktivnom formom ljudske DPP III uz konstantu disocijacije 3, 6  $\mu$ M. Endomorfina-2 je također neurotransmiter kod sisavaca. DPP III se na endomorfina-2 veže s mikromolarnim afinitetom. Sintetički peptid IVYPW se pokazao jačim inhibitorom od tinorfina, za kojeg je prethodno dokazano da je inhibitor DPP III.



Slika 7.(a) Interkacije Met-enkefalina s ljudskom DPP III (b) Interakcije Leu-enkefalina s ljudskom DPP III (c) Interakcije endomorfina 2 s ljudskom DPP III (d) Interakcije sintetičkog peptida IVYPW s ljudskom DPP III (Kumar i sur., 2016).

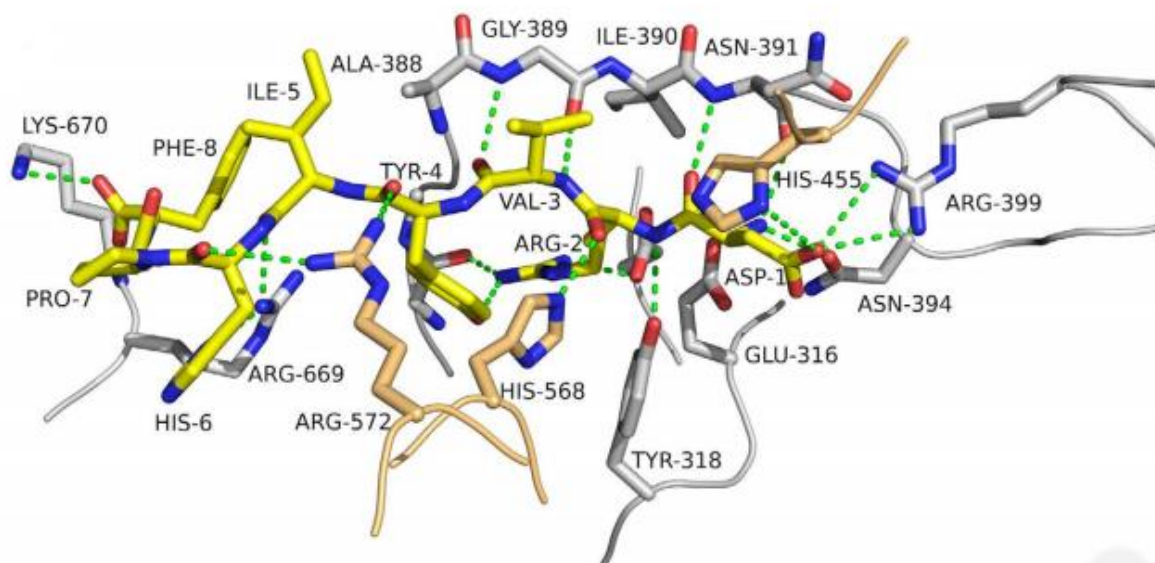
Angiotenzin II (DRVYIHPF) je vazokonstriktor, te je odgovoran za regulaciju krvnog tlaka kod sisavaca. ITC metoda je provedena da bi se utvrdilo kakav afinitet prema vezanju na inaktivni oblik ljudske DPP III ima ovaj peptid. Mikrokalorimetrijska mjerenja su provedena pri 25 °C s MicroCal kalorimetrom, u 50 mM Tris-HCl puferu pH 8, 0. Peptid se injektirao 30 puta u ćeliju s DPP III, te je izvršeno integriranje radi izračunavanja površine ispod pika u svrhu analiziranja rezultata (Slika 8).

Kao kod tinorfina, pokazalo se da je ovaj proces endoterman. Konstanta disocijacije je izračunata iz podataka dobivenih ITC metodom i iznosila je 1, 64  $\mu\text{M}$ . Iz podataka je izračunata i konstanta asocijacije, promjena entalpije, te Gibbsove energije (Kumar i sur., 2016).



Slika 8. Grafički prikaz podataka dobivenih ITC metodom tijekom vezivanja angiotenzina II na DPP III (Kumar i sur., 2016).

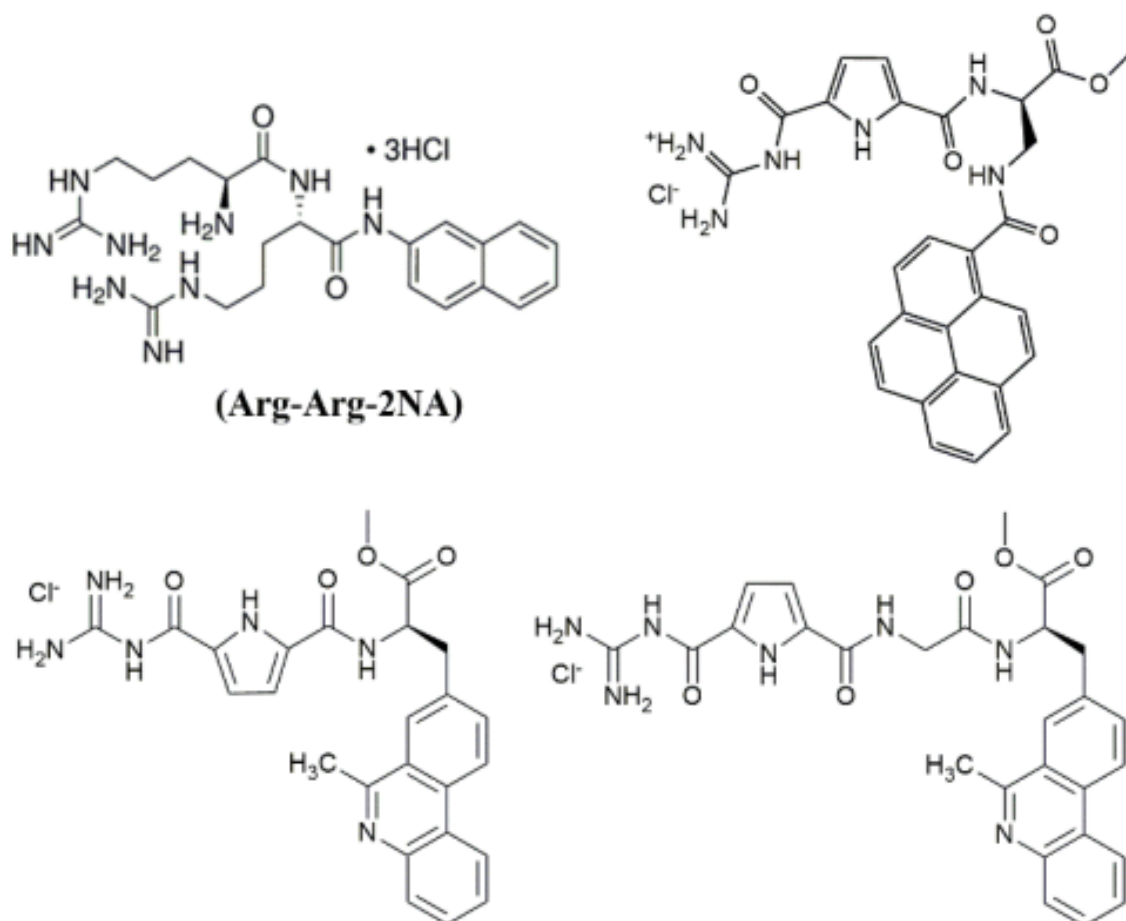
Kao što je već rečeno, do promjene konformacije dolazi radi formiranja aktivnog mjesta. Taj proces je endoterman, no kao što se može vidjeti, ukupna promjena Gibbsove energije ima negativan predznak. (Sabljčić, 2018).



Slika 9. Strukturni prikaz vezanja angiotenzina II na DPP III (Kumar i sur., 2016)

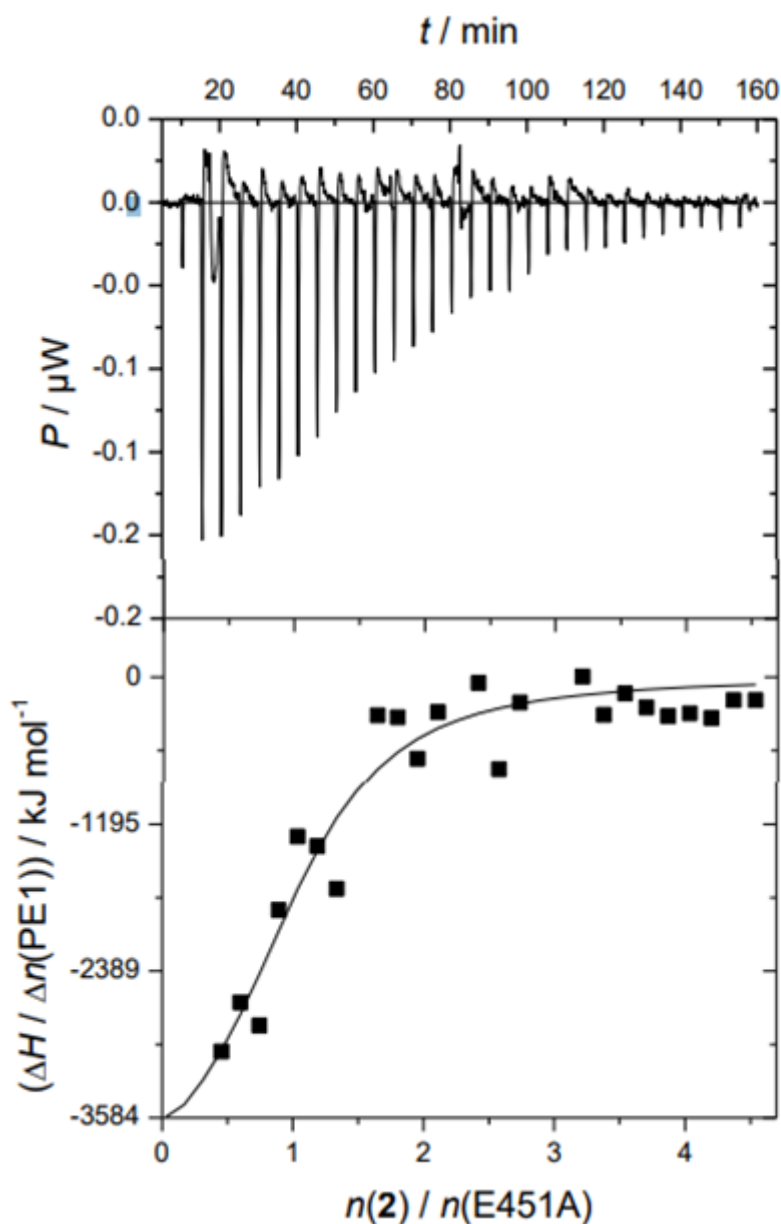
Enkefalini su, kako je pokazano, hidrolizirani prilično dobro djelovanjem DPP III, a peptidi sličnih duljina kao tinorfin inhibiraju enzim ili bivaju hidrolizirani vrlo sporo, tako da mogućnost razlikovanja supstrata i inhibitora nije najbolja. Struktura kompleksa s angiotenzinom II (Slika 9) je pokazala po prvi put koliko dugo se peptidi zadržavaju u rascjepu DPP III. Sve dobivene informacije su od pomoći pri dizajniranju i otkriću specifičnih inhibitora DPP III.

Matić i sur. su 2016. godine metodom izotermne titracijske kalorimetrije (ITC) istražili vezanje aril-guanidiniokarbonil-pirol konjugata, kao i derivata fenantridina, heterocikličkog spoja, na ljudsku DPP III, izoliranu i pročišćenu iz mutanta bakterije *Escherichia coli*. To su tri analoga Arg-Arg-2-naftilamida (Slika 10). Umjetno su sintetizirani na način da su alifatski gvanidini zamijenjeni kiselim pirolnim gvanidinima, te su dodatne veće arilne skupine, za koje je kasnije pokazano da igraju ulogu u inhibiciji. Otkriveno je da, s različitom efikasnošću, inhibiraju hidrolizu Arg-Arg-2-naftilamida, koji je klasični supstrat za DPP III, dobiven sintetički. Također je pokazano da mogu imati različite orijentacije u aktivnom mjestu ljudske DPP III.



Slika 10. Supstrat DPP III, Arg-Arg-2-naftilamid i njegovi potencijalni inhibitori, aril-guanidiniokarbonil-pirol konjugat (A) (gore), te derivati fenantridina (B) (dolje lijevo) i (C) (dolje desno) (Matić i sur., 2016).

Metoda izotermne titracijske kalorimetrije je provedena u ovom slučaju s inaktivnom formom ljudske DPP III, preciznije E451 mutantom (Slika 11). Metoda je provedena klasično, dodavanjem alikvota puferske otopine potencijalnog inhibitora u obrocim, u pufersku otopinu enzima, koja se nalazila u reakcijskoj ćeliji kalorimetra. Došlo je do vezanja potencijalnog inhibitora na inaktivni mutant E451, što je vidljivo na Slici 11.



Slika 11. Podaci dobiveni ITC metodom prilikom vezivanja aril-guanidiniokarbonil-pirol konjugata na DPP III (Matić i sur., 2016).

Gibbsova energija reakcije vezanja svake od istraživanih komponenti, guanidiniokarbonil-pirol konjugata, kao i derivata fenantridina, na inaktivni enzim E451 pokazuje da je riječ o reakciji koja je spontana, s obzirom na negativne vrijednosti Gibbsove energije, za (A)  $-34,2$  kJ/mol i za (B)  $33,0$  kJ/mol. To također vrijedi i za vezanje sintetskog supstrata DPP III, Arg-Arg-2-naftilamid (Arg-Arg-2NA), za koji je iznosila  $-33,4$  kJ/mol. Za sve navedene istraživane, potencijalne inhibitore, dekatski logaritam konstante vezanja je bio u intervalu između 5,6 i 5,9, što je prilično slično. Vrijednost promjene reakcijske entalpije je za (A) iznosila  $-18,1$

kJ/mol, za Arg-Arg-2NA -23,1 kJ/mol, a za (B) 30,6 kJ/mol. Vrijednost promjene reakcijske entropije za (A) je iznosila 54,1 J/(K mol), za Arg-Arg-2NA 34,6 J/(K mol), a za (B) 210,0 J/(K mol). Pozitivne vrijednosti entropije su očekivane za reakcije vezanja zbog prirodne težnje sustava k neredu. Termodinamičke vrijednosti za (A) i (B), dobivene analizom podataka dobivenih ITC metodom, pokazuju razlike, odnosno vrijednost promjene reakcijske entalpije je pozitivna za derivate fenantridina, za razliku od guanidiniokarbonil-pirol konjugata. Pretpostavlja se da je to zbog razlike u veličini arilne skupine ovih molekula, odnosno inhibitora, te zbog prisutnosti heterocikličkog dušika kod derivata fenantridina. Velika razlika u vrijednosti reakcijske entropije nije razjašnjena. ITC metodom je promatrano i dolazi li do mjerljivih promjena tijekom djelovanja divljeg tipa DPP III na potencijalne inhibitore u vremenu od 15 minuta pri 37 °C, no takve promjene nisu uočene. Iz tog se izvodi zaključak da enzim DPP III ne vrši hidrolizu ovih komponenti, iako su njihove konstante vezanja i konstanta vezanja sintetskog supstrata Arg-Arg-2NA jako slične. Direktno dobiveni parametri metodom izotermne titracijske kalorimetrije su promjena reakcijske entalpije i konstantavezanja, a reakcijska Gibbsova energija je izračunata iz relacije  $\Delta_r G = -RT \ln(K_a)$ . Promjena reakcijske entropije je izračunata iz relacije  $\Delta_r S = (\Delta_r H - \Delta_r G) / T$  (Matić i sur., 2016).

Ispostavilo se da je ono što karakterizira dobar inhibitor u slučaju ovog enzima krupni arilni supstituent. Dipeptidil-2-naftilamidni supstrati su generalno dobri supstrati za ovaj enzim, a također i oligopeptidi, za razliku od tripeptida (Sabljić, 2018).



### 3. ZAKLJUČAK

Može se zaključiti sljedeće :

1. Metodom izotermne titracijske kalorimetrije (ITC) se mogu uspješno odrediti sve relevantne informacije o termodinamičkom profilu vezanja liganda na makromolekulu.
2. Pomoću ITC metode je ispitano vezanje peptida angiotenzina II na dipeptidil-peptidazu III (DPP III) i zaključeno je da je taj proces endoterman, te je iz dobivenih podataka izračunato da konstanta disocijacije za tu reakciju iznosi  $1,64 \mu\text{M}$ .
3. ITC metodom je pokazano da je promjena reakcijske entalpije pri vezanju derivata fenantridina i guanidiniokarbonil-pirol konjugata na enzim DPP III pozitivna za derivate fenantridina, za razliku od guanidiniokarbonil-pirol konjugata, te se pretpostavlja se da je razlog tome prisutnost heterocikličkog dušika kod derivata fenantridina, te zbog razlike u veličini arilne skupine ovih inhibitora, odnosno da je krupni arilni supstituent dobar inhibitor za ovaj enzim. Dobri supstrati za ovaj enzim su dipeptidil-2-naftilamidni supstrati i oligopeptidi, a loši supstrati su tripeptidi.

## 4. POPIS LITERATURE

Chaires J. B. (2008) Calorimetry and thermodynamics in drug design. *Annual Review of Biophysics* **37**: 135-151.

Freyer M. W., Lewis E. A. (2008) Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions. *Methods in cell biology* **84**: 79-113.

Privalov P. L. (2012) Microcalorimetry of macromolecules: the physical basis of biological structures . Johns Hopkins University, John Wiley & Sons, Inc. str. 33-43.

Prajapati S. C., Chauhan S. S. (2011) Dipeptidyl peptidase III: a multifaceted oligopeptide N-end cutter. *The FEBS journal* **278**: 3256-3276.

Špoljarić J., Salopek-Sondi B., Makarević J., Vukelić B., Agić D., Šimaga Š., Abramić M. (2009). Absolutely conserved tryptophan in M49 family of peptidases contributes to catalysis and binding of competitive inhibitors. *Bioorganic chemistry* **37**: 70-76.

Kumar P., Reithofer V., Reisinger M., Wallner S., Pavkov-Keller T., Macheroux P., Gruber K. (2016) Substrate complexes of human dipeptidyl peptidase III reveal the mechanism of enzyme inhibition. *Scientific reports* **6**: 23787.

Bezerra G. A., Dobrovetsky E., Viertlmayr R., Dong A., Binter A., Abramić M., Gruber K. (2012) Entropy-driven binding of opioid peptides induces a large domain motion in human dipeptidyl peptidase III. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 6525-6530.

Chiba T., Li Y. H., Yamane T., Ogikubo O., Fukuoka M., Arai R., Matsui N. (2003) Inhibition of recombinant dipeptidyl peptidase III by synthetic hemorphin-like peptides. *Peptides* **24**: 773-778.

Akiyama T., Harada S., Kojima F., Takahashi Y., Imada C., Okami Y., Takeuchi T. (1998) Fluostatins A and B, New Inhibitors of Dipeptidyl Peptidase III, Produced by *Streptomyces* sp. TA-3391. *The Journal of antibiotics* **51**: 553-559.

Fukasawa K., Fukasawa K. M., Iwamoto H., Hirose J., Harada M. (1999) The HELLGH motif of rat liver dipeptidyl peptidase III is involved in zinc coordination and the catalytic activity of the enzyme. *Biochemistry* **38**: 8299-8303.

Todd M. J., Gomez J. (2001) Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity?. *Analytical biochemistry* **296**: 179-187.

Williams B. A., Toone E. J. (1993) Calorimetric evaluation of enzyme kinetic parameters. *The Journal of Organic Chemistry* **58**: 3507-3510.

Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. (2012) Biokemija, 1.izd., Školska knjiga. str. 213-215.

Matić J., Šupljika F., Tir N., Piotrowski P., Schmuck C., Abramić M., Tomić S. (2016) Guanidiniocarbonyl-pyrrole-aryl conjugates as inhibitors of human dipeptidyl peptidase III: combined experimental and computational study. *RSC advances* **6**: 83044-83052.

Sabljić I. (2018) Strukturna karakterizacija dipeptidil-peptidaze III iz bakterije *Bacteroides thetaiotaomicron*, doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.

Thomson J. A., Ladbury J. E. (2004) Isothermal Titration Calorimetry: A Tutorial. U *Biocalorimetry 2: Application of Calorimetry in the Biological Sciences*, Ladbury J. E., Doyle M. L., ur., John Wiley and Sons, str. 37-57.

## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

*Isa Čekić*

---

ime i prezime studenta