

IDENTIFIKACIJA POTENCIJALNOG INHIBITORNOG VEZNOG MJESTA ZA METAL U LJUDSKOJ DIPEPTIDIL-PEPTIDAZI III



Antonia Matić¹, Zrinka Karačić¹, Sanja Tomić¹

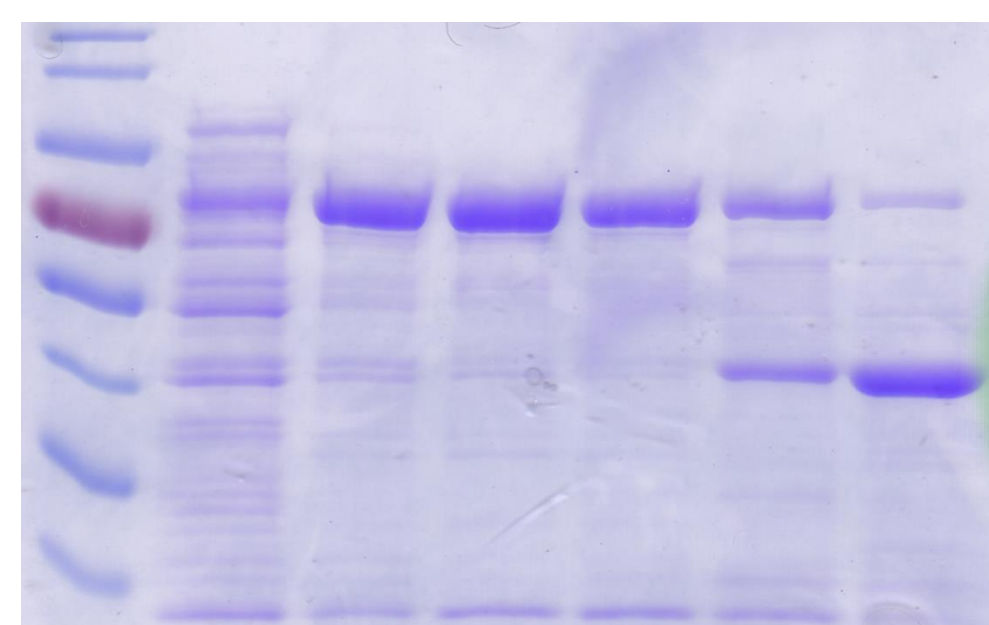
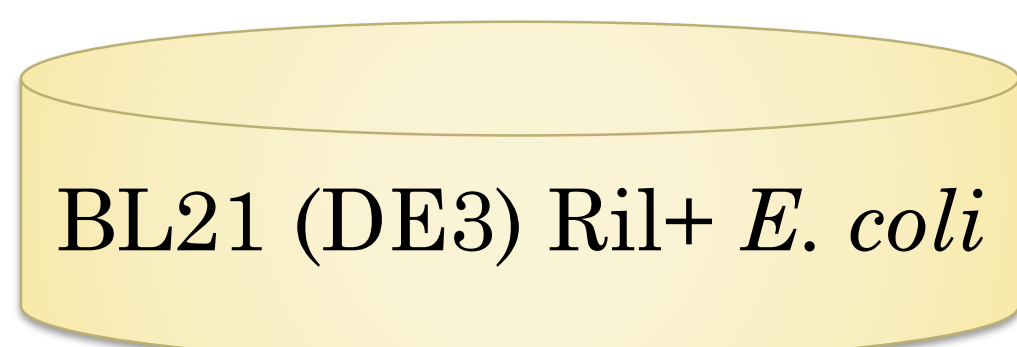
¹ Institut Ruđer Bošković, Bjenička cesta 54, Zagreb



Dipeptidil peptidaza (DPP) III je egzopeptidaza ovisna o cinku koja ima jedinstveni motiv, "HEXXGH," odgovoran za vezanje iona metala u aktivno mjesto enzima.¹

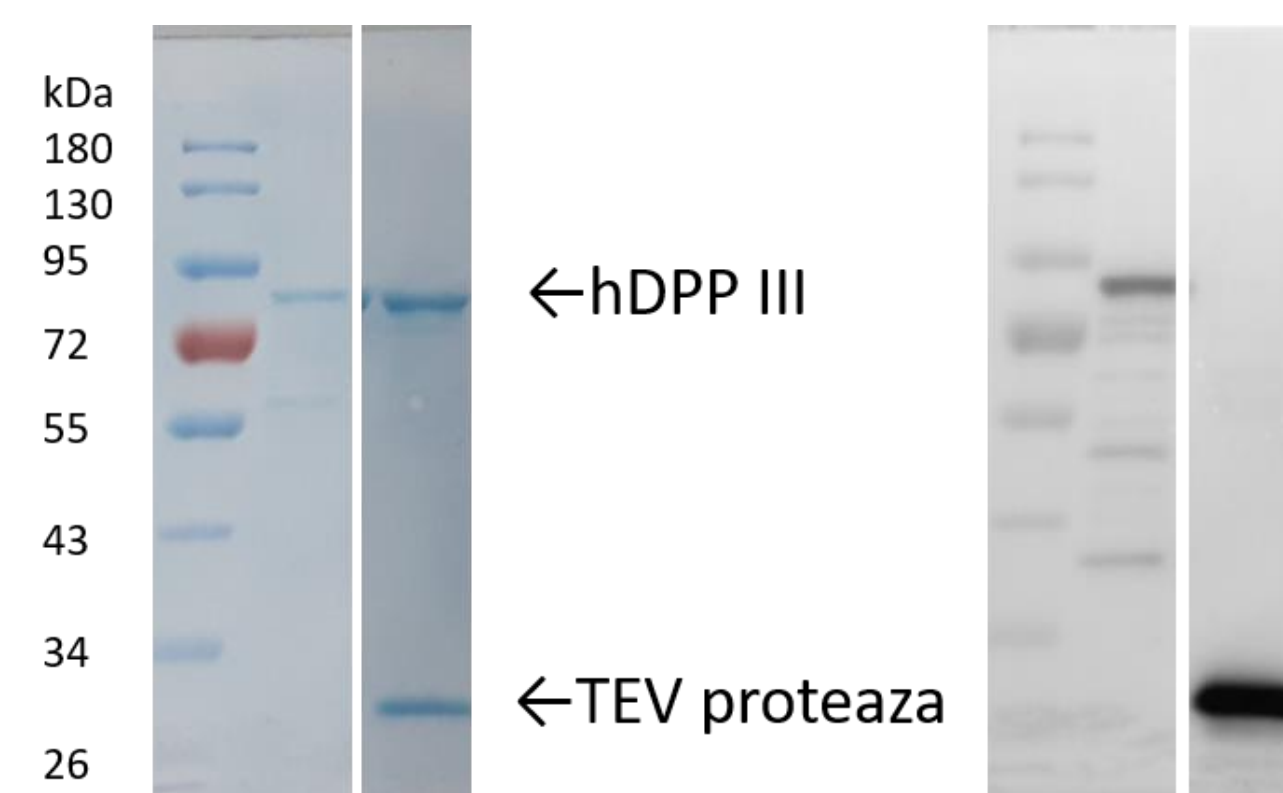
Metaloproteini su proteini koji vežu ione metala potrebne za katalitičku aktivnost ili stabilizaciju strukture. Zn²⁺ je jedan od najzastupljenijih iona metala u enzimski kataliziranim reakcijama hidrolize peptidne veze pored njega se još pojavljuju i Co²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ ili Cu²⁺. U takvim enzimima ion metala najčešće je koordiniran s tri aminokiseline, od kojih su, u većini slučajeva, to His, Glu, Asp ili Lys. Osim liganada koji vežu metal, za katalizu je potreban barem još jedan aminokiselinski ostatak. Kod većine metalopeptidaza to je Glu, a može biti i Arg ili Cys.²

Ekspresija proteina



SDS page, frakcije nakon gel-filtracije

Uklanjanje His-privjeska nakon afinitetne kromatografije



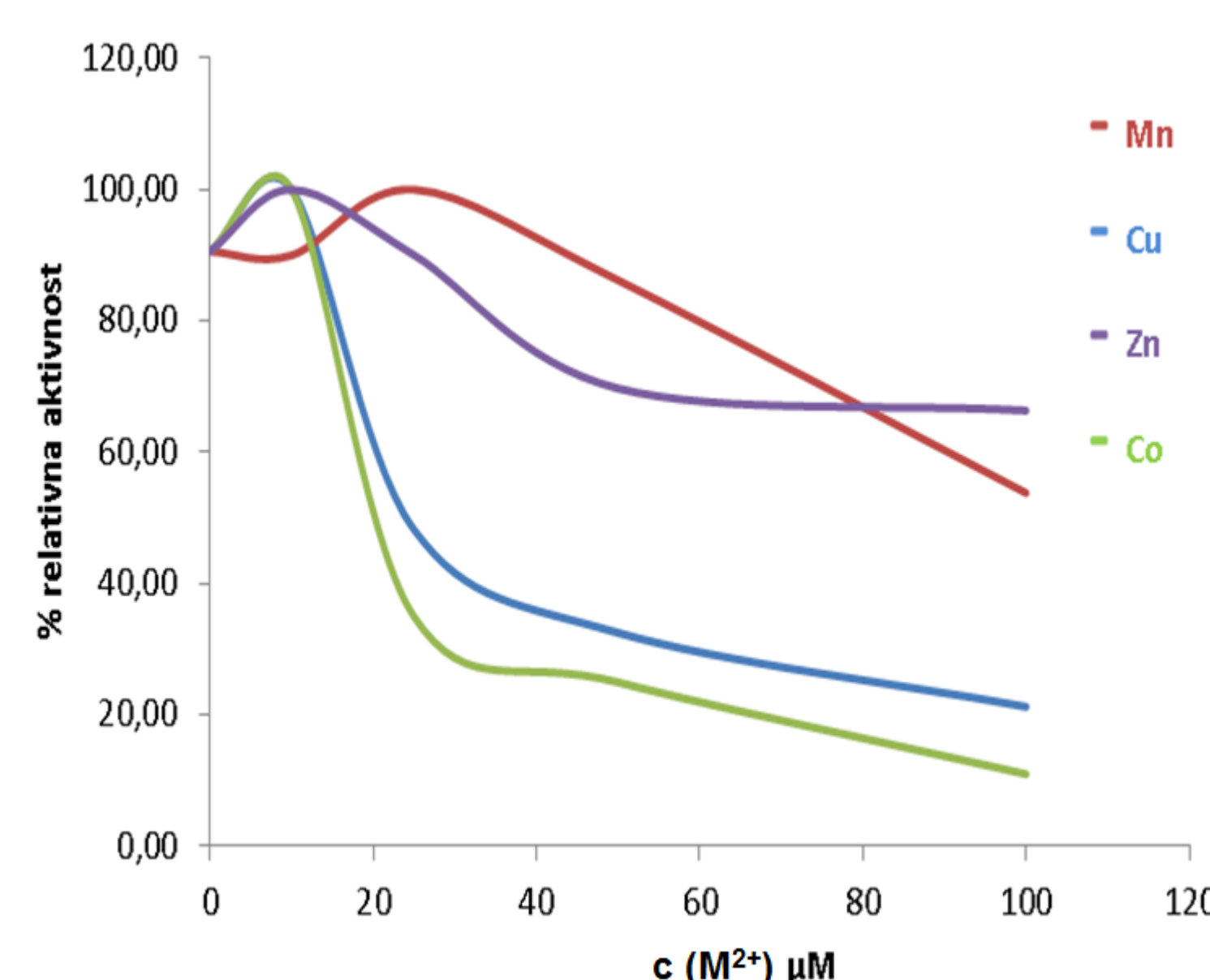
Detekcija His-privjeska nakon inkubacije sa TEV proteazom

HR-ICP-MS (masena spektroskopija visoke rezolucije s induktivno spregnutom plazmom)

Određuje se koncentracija metala u holoenzimu tj. broj iona metala prema molekuli proteina.

U tablici su prikazani očekivani omjeri eksperimentalnih rezultata.

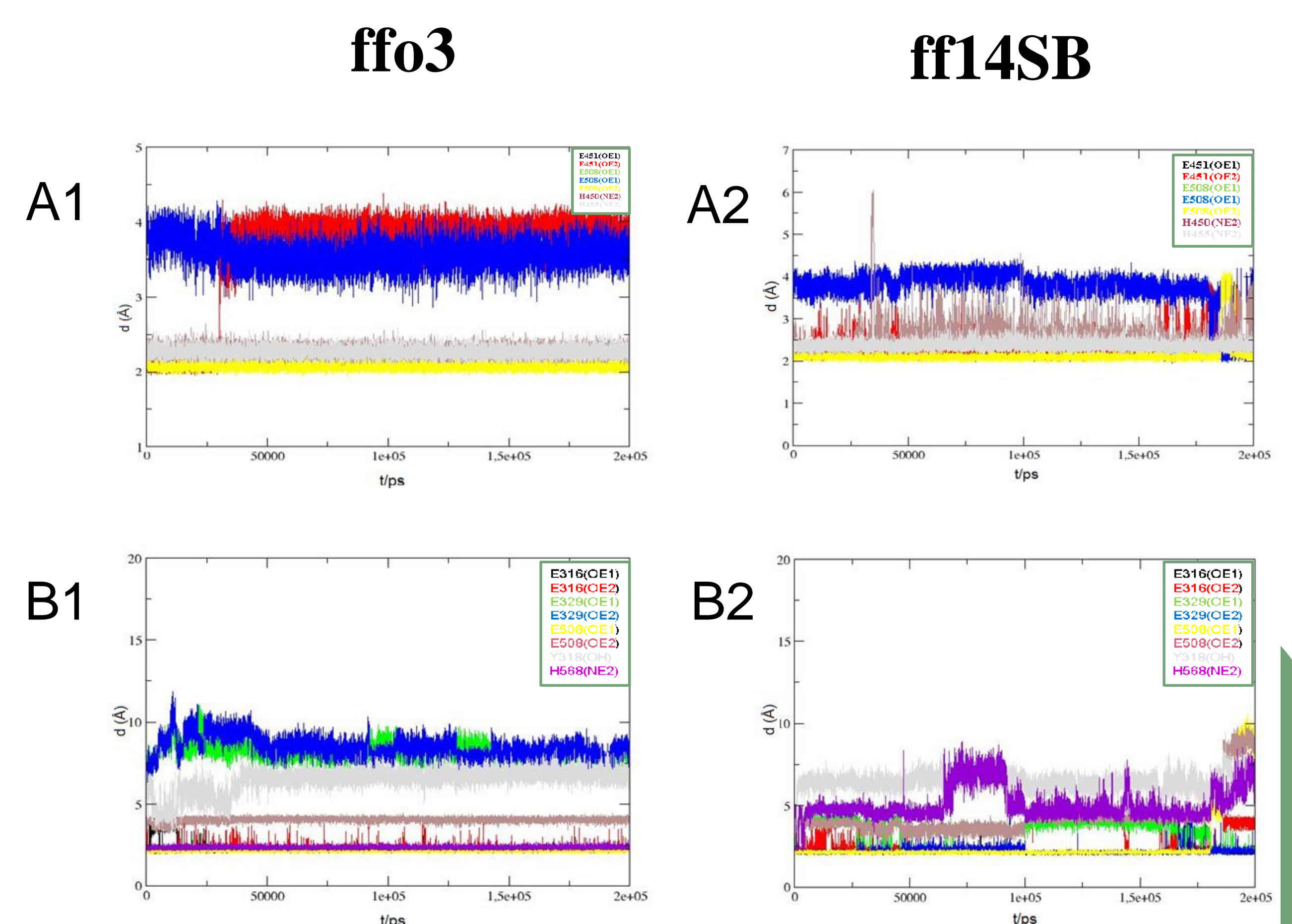
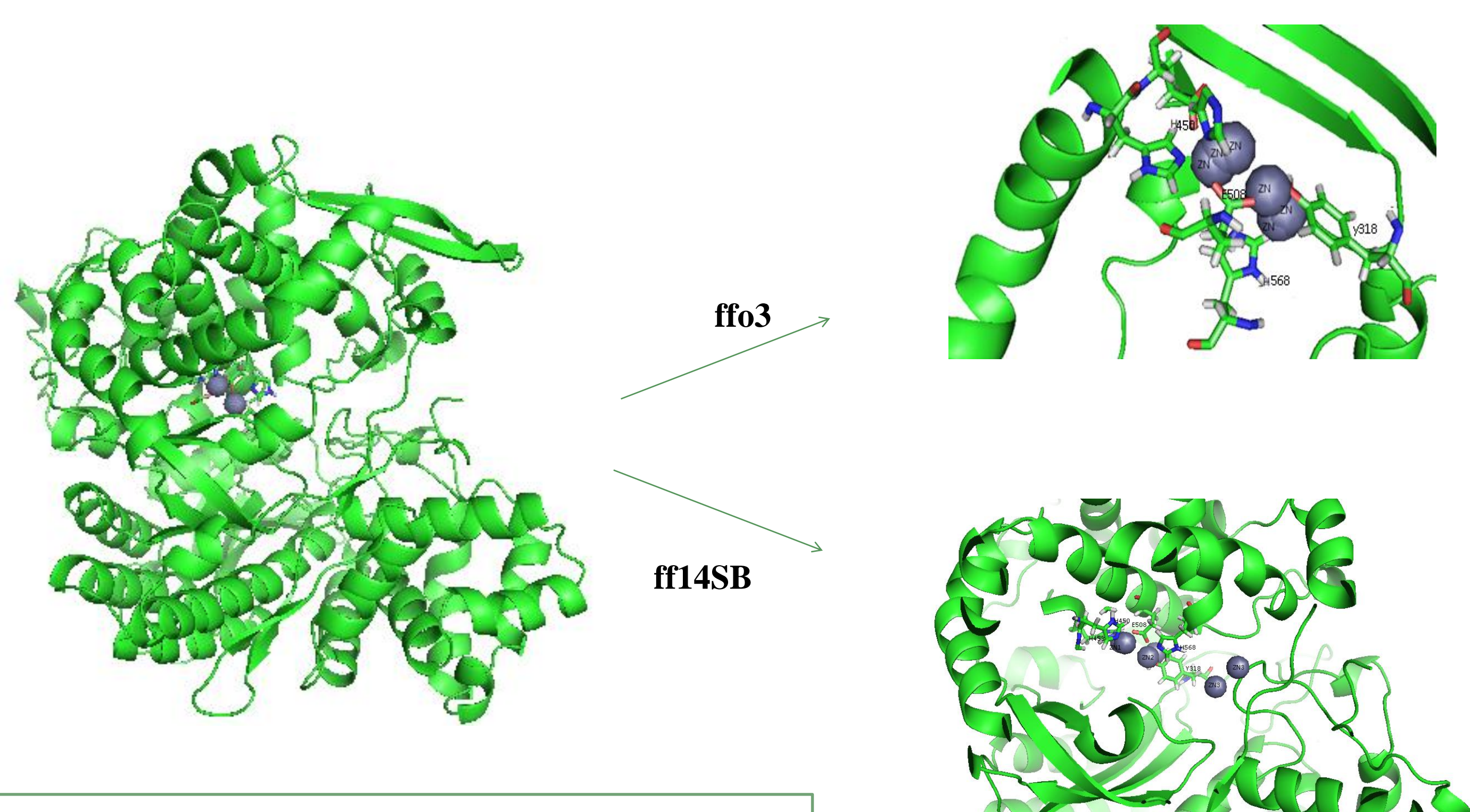
	Protein : M ²⁺
dijaliza	1:0
nativni	1:1
inhibirani	1:X



Peptidaznu aktivnost ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) inhibira suvišak iona cinka¹. Graf prikazuje utjecaj različitih koncentracija metalnih dikationa: Zn²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ i Cu²⁺ na aktivnost ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III).

Vežanje drugog iona metala u tzv. 'inhibitorsko vezno mjesto metala' smješteno neposredno uz katalitički aktivno mjesto enzima, opaženo je u kristalografskim strukturama triju o cinku ovisnih enzima: karboksipeptidazi A, termolizinu i LpxC.¹

MD simulacije kristalna struktura i hDPP III poljama sila ff03 i ff14SB.



Prikaz udaljenosti iona cinka od aminokiselina (d (Å)) u vremenu od 200 ns.

A1 i A2 za ione cinka 727

B1 i B2 za ione cinka 728

Literatura:

1. K.M. Fukasawa, J. Hirose, T. Hata, Bio.Biophys Acta.1804 (2010), 2063-2069.
2. W. N. Lipscomb, N. Sträter, Chem. Rev. 96 (1996) 2375-2434.

Acknowledgements: We acknowledge funding by the Croatian Science Foundation within the Project 'Biological relevance of dipeptidyl peptidase III and its impact on human health' (IP-2018-01-2936).