

Uloga dipeptidil-peptidaze III u regulaciji boli

Sanja Tomić, Zrinka Karačić, Lidija Brkljačić, Ana Tomašić Paić, Mirsada Čehić, Mihaela Matovina
Institut Ruđer Bošković, Bijenička 54, Zagreb

Dipeptidil-peptidaza III (DPP III, EC 3.4.14.4) je cink-ovisna metalopeptidaza koja hidrolizira dipeptide s N-kraja kratkih peptida (3 do 10 aminokiselina) [1]. U tkivima sisavaca široko je zastupljena i smatra se da sudjeluje u završnim koracima unutarstaničnog katabolizma proteina. Pokazana je njezina uključenost u regulaciju krvnog tlaka odgradnjom angiotenzina II i njegovih produkata [2]. Visoke koncentracije DPP III nađene su u površinskim neuronima stražnjeg roga leđne moždine štakora, što upućuje na njezinu ulogu u endogenom sustavu modulacije boli kod sisavaca [3]. Prethodno je pokazano da DPP III odgrađuje neke opioidne peptide *in vitro* [4]: Leu-enkefalin, Met-enkefalin, endomorfina-I, endomorfina-II. Odlučili smo stoga ispitati niz neuropeptida kao potencijalne supstrate hDPP III, a odabrali smo ih uvažavajući postojeća znanja o veličini peptidnih supstrata humane DPP III.

Metoda spregnute kromatografije i masene spektrometrije (HPLC-MS) korištena je za praćenje odgradnje peptida ljudskom DPP III (hDPP III), a spektrofotometrija za ispitivanje inhibicije enzima hDPP III peptidima za koje je pokazano da nisu supstrati.

METODE

Pomoću dokiranja i molekulske-dinamičkih (MD) simulacija određene su moguće strukture kompleksa hDPP III – peptid i njihova stabilnost. Relativni afiniteti pojedinih peptida procijenjeni su na temelju MMGBSA energija (aproksimacija slobodne energije vezanja) izračunatih na uravnoteženim dijelovima trajektorija.

REZULTATI

U eksperimentu je u različitim vremenskim intervalima inkubirana 0,18 μ M hDPP III s 1 mM peptidom u 20 mM puferu amonijevog bikarbonata pH 7,4. Utvrdili smo da hDPP III razgrađuje valorfin, Leu-valorfin-Arg, β -kazomorfina i dinorfina, a hemopresin i vazopresin ostali su nerazgrađeni.

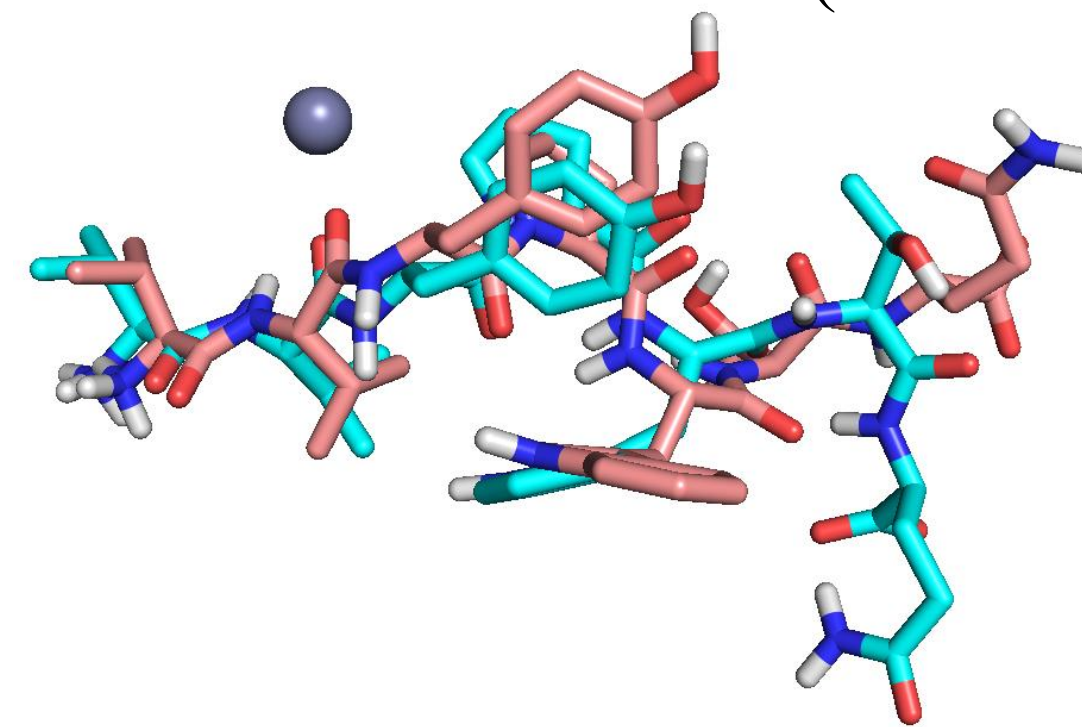
Peptid	Sekvenca	preostalo peptida nakon	
		≤ 2 h	24h
hemopresin	H-PVNFKFLSH-OH	88 %	98 %
vazopresin	H-CYFQNCPRG-NH ₂	100 %	93 %
valorfin	H-VVYPWTQ-OH	0 %	0 %
Leu-valorfin-Arg	H-LVVYPWTQR-OH	0 %	0 %
β -kazomorfina	H-YPFVEPI-OH	80 %	0 %
dinorfina A (1-8)	H-YGGFLRRI-OH	55 %	51 %

Dodatno, hemopresin i vazopresin su ispitivani kao inhibitori hDPP III praćenjem enzimске kinetike korištenjem analoga supstrata diarginil-2-naftilamida u prisutnosti 1 μ M peptida. Ustanovili smo da nema inhibicije.

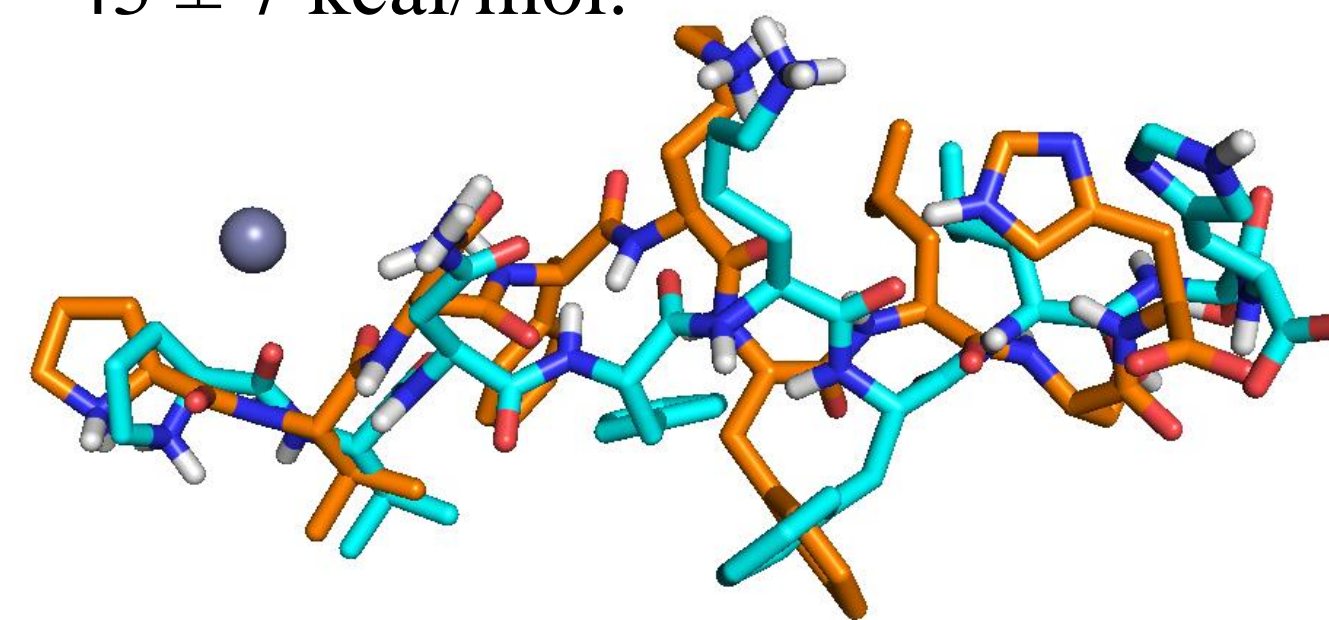
Tijekom narednih mjeseci planiramo testirati još β -neoendorfin i hemorfin-4. U tijeku su eksperimenti mjerenja kinetičkih parametara odgradnje peptida za koje smo ustanovili da su supstrati hDPP III.

Hemopresin i valorfin su dokirani u aktivno mjesto hDPP III koristeći difrakcijom X-zraka određenu strukturu kompleksa hDPP III s Leu-enkefalinom (PDB 5E3A) kao predložak. Kompleksi su simulirani u vodi u trajanju 100 ns za hemopresin i 500 ns za valorfin.

Tijekom MD simulacija kompleksa hDPP III – **valorfin** u vodi peptid je ostao vezan u aktivnom mjestu enzima s karboksilnom skupinom druge peptidne veze koordiniranom na ion cinka. Orijentacija prvih 5 aminokiselina s N terminusa peptida nije se značajno promijenila, no orijentacija aminokiselinskih ostataka Thr i Gln na C terminusu jest. Na slici je početna konformacija peptida cijan-plava, dok je ona nakon 500 ns simulacije ružičasta. MMGBSA energije izračunate za konformere uzorkovane u intervalima 90-100 ns i 450-500 ns su -56 kcal/mol odnosno -53 kcal/mol (uz SD od 6 kcal/mol).



U slučaju modeliranja hDPP III – **hemopresin** kompleksa karboksilna skupina druge peptidne veze ne koordinira ion cinka u stabiliziranoj strukturi. Osim toga, tijekom MD simulacije dolazi do značajnije reorijentacije supstrata. Na slici je početna konformacija cijan-plava, a konačna narančasta. MMGBSA energija izračunata za skup konformera iz intervala 90-100 ns je -43 ± 7 kcal/mol.



Reference:

- Chen JM, Barrett, Handbook of Proteolytic Enzymes, Vol. 1, Academ. Press, 2004, 809-12.
- Jha S, Taschler U, Domenig O, Poglitsch M, Bourgeois B, Pollheimer M, Pusch LM, Malovan G, Frank S, Madl T, Gruber K, Zimmermann R and Macheroux P, *J Biol Chem.* 2020, 10.1074/jbc.RA120.014183.
- Chiba T, Li YH, Yamane T, Ogikubo O, Fukuoka M, Arai R, Takahashi S, Ohtsuka T, Ohkubo I, Matsui N. *Peptides.* 2003, 24, 773-8.
- Baršun M, Jajčanin N, Vukelić B, Špoljarić J, Abramić M, *Biol Chem.* 2007, 388, 343-8.

Ovaj rad u potpunosti je financiran projektom Hrvatske zaklade za znanost IP-2018-01-2936.