

STUDY OF NEUROPEPTIDES AS POTENTIAL SUBSTRATES OF HUMAN DPP III (O4)

Zrinka Karačić, 14. veljače 2022.

Radni sastanak DPP3BioRe

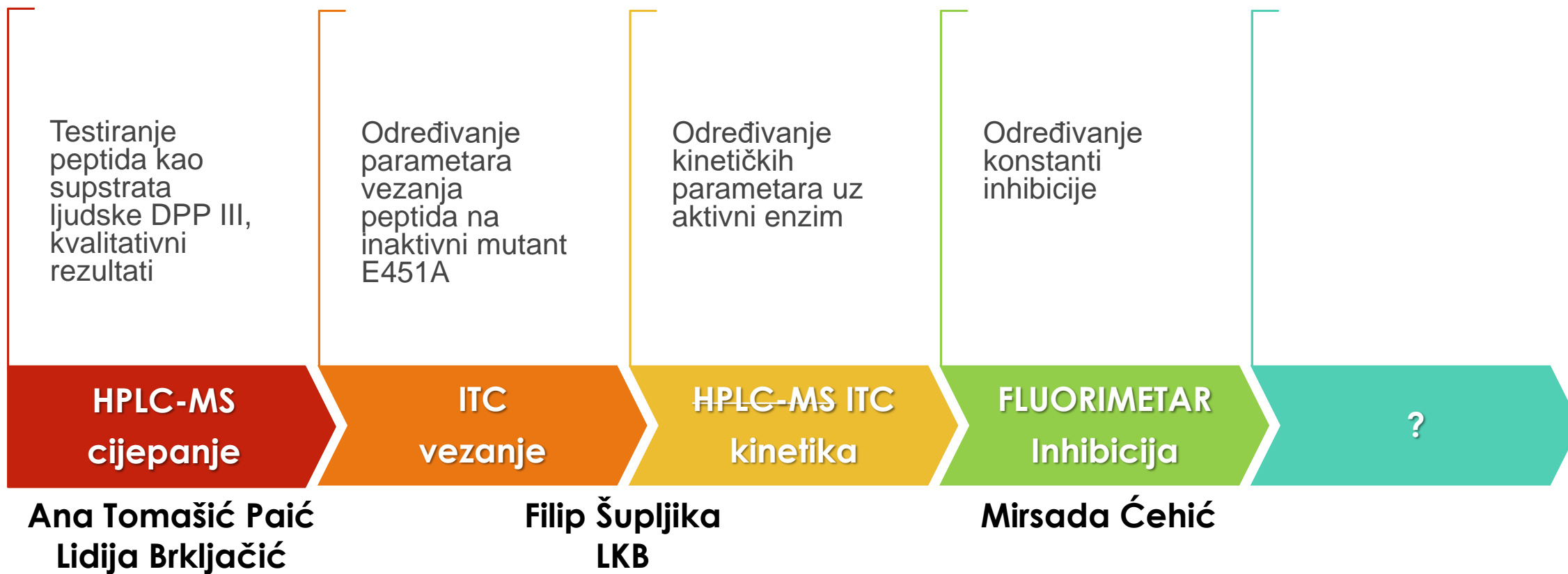
ISPITIVANJE NEUROPEPTIDA KAO POTENCIJALNIH SUPSTRATA LJUDSKE DPP III

2

Zrinka Karačić, 14. veljače 2022.

Radni sastanak DPP3BioRe

METODE



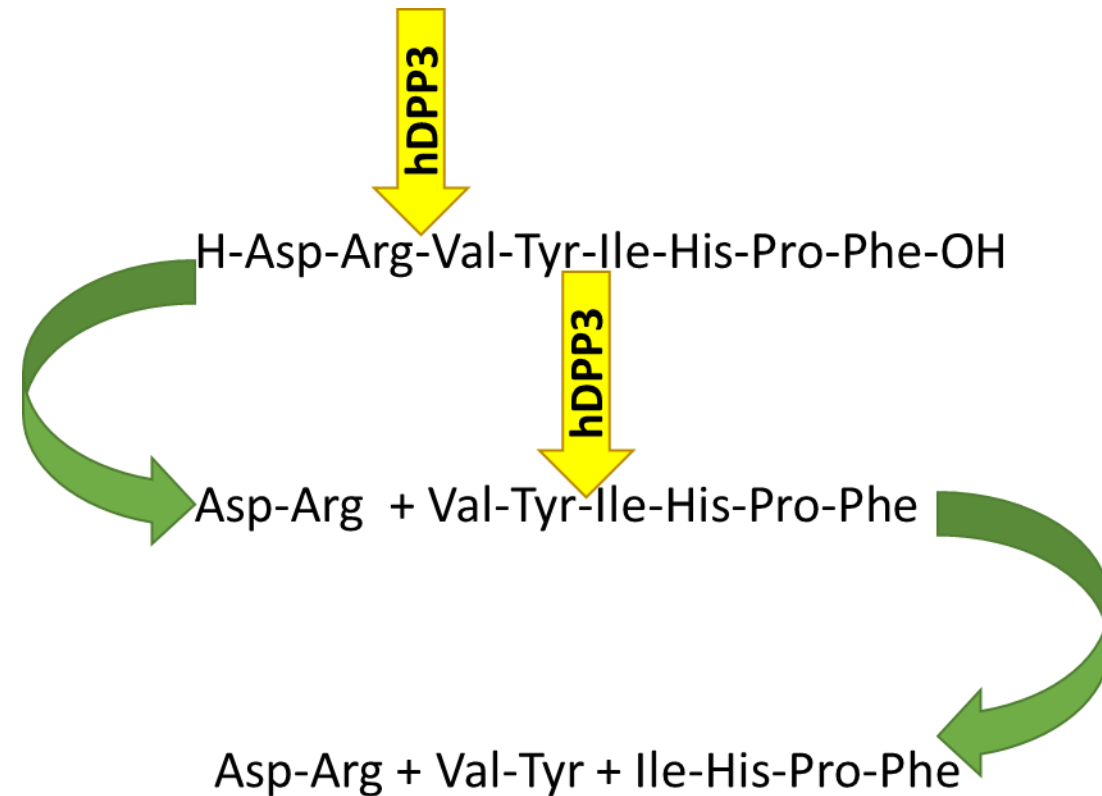
| peptid | sekvenca |
|-------------------------|-----------------------------|
| vazopresin | C*YFQNC*PRG |
| hemopresin | PVNFKFLSH |
| β-neoendorfin | YGGFLRKYP |
| angiotenzin II | DRVYIHPF |
| endomorfín-2 | YPPF |
| Leu-enkefalin | YGGFL |
| hemorfín-4 | YPWT |
| valorfin | VVYPWTQ |
| Leu-valorfin-Arg | LVVYPWTQR |
| β-kazomorfín | YPFVEPI |
| tinorfin | VVYPW |
| S-tinorfin | SVYPW |
| I-tinorfin | IVYPW |
| dinorfin A (1-8) | YGGFLRRI |
| kolecistokinín 8 | DY(SO ₃ H)MGWMDF |

Poznati supstrati h DPP III

Inhibitori – “spori supstrati”

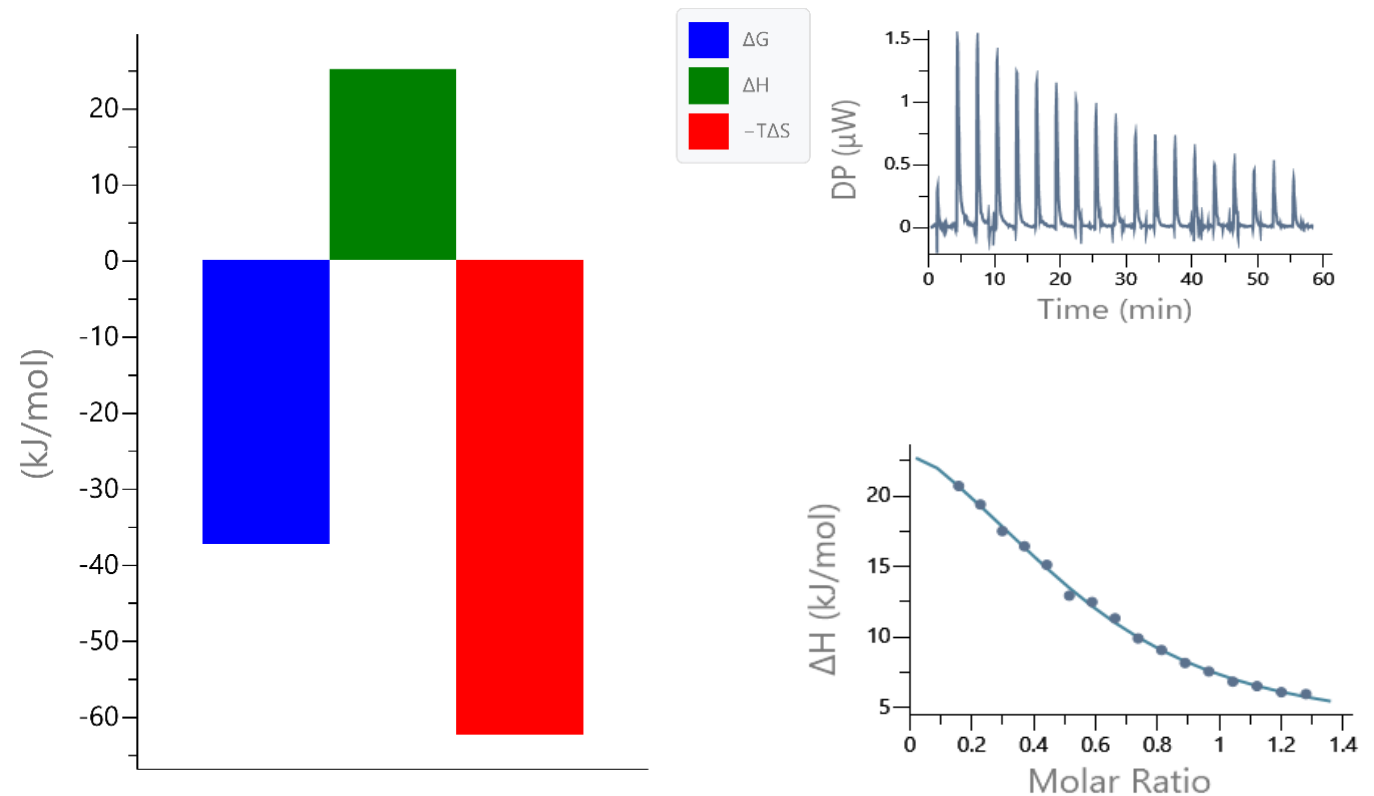
CIJEPANJE

- 1 mM peptidi inkubirani uz veliku koncentraciju enzima (0,18 μM) 2h (ili manje) i 24h
- HPLC-MS korišten za određivanje količine preostalog peptida, kao i detekciju produkata odgradnje
- U 200 μL reakcijske smjese dodano 100 μL acetonitrila za zaustavljanje enzimske reakcije, pa pohranjeno na -20°C
- Primjer: angiotenzin II



VEZANJE

- Mikrokolorimetrijskim mjerenjima (ITC = izotermalna titracijska kalorimetrija) određeni konstanta vezanja, reakcijska Gibbsova energija, entalpija i entropija
- Pretpostavka N=1
- Endotermni proces, entropijski vođen

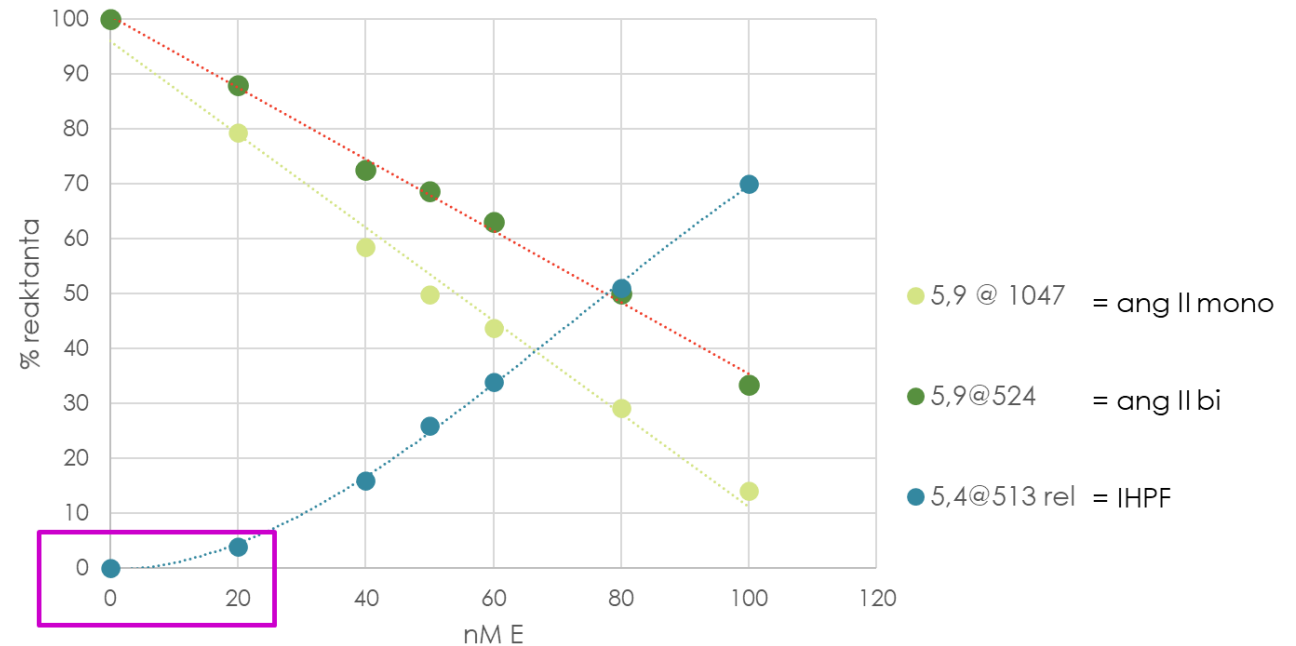


ITC VEZANJE

| peptid | $K_D / \mu\text{M}$ | $\Delta_r H / \text{kJ mol}^{-1}$ | $\Delta_r G / \text{kJ mol}^{-1}$ | $-T^* \Delta_r S / \text{kJ mol}^{-1}$ |
|--------------------------------------|---------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--|
| I-tinorfin | 0.0973 ± 0.0091 | 33.5 ± 1.0 | -40.1 ± 0.2 | -73.6 ± 0.8 |
| S-tinorfin | 0.298 ± 0.061 | 23.8 ± 1.0 | -37.3 ± 0.5 | -61.6 ± 1.6 |
| tinorfin | 0.386 ± 0.127 | 25.9 ± 1.2 | -36.7 ± 0.8 | -62.6 ± 0.4 |
| valorfin | 1.78 ± 0.21 | 19.4 ± 0.8 | -32.9 ± 0.3 | -52.3 ± 0.5 |
| angiotenzin II | 2.22 ± 0.24 | 25.8 ± 3.0 | -32.3 ± 0.3 | -58.1 ± 2.7 |
| Leu-valorfin-Arg | 2.50 ± 1.92 | 19.3 ± 9.0 | -32.5 ± 1.9 | -51.7 ± 7.6 |
| Leu-enkefalin | 11.8 ± 3.9 | | | |
| hemorfin-4 | 39.4 ± 14.6 | 36.4 ± 7.6 | -25.3 ± 1.0 | -61.7 ± 6.6 |
| endomorfin-2 | 40.1 ± 4.8 | | | |
| β-kazomorfin | 130 ± 87 | | | |

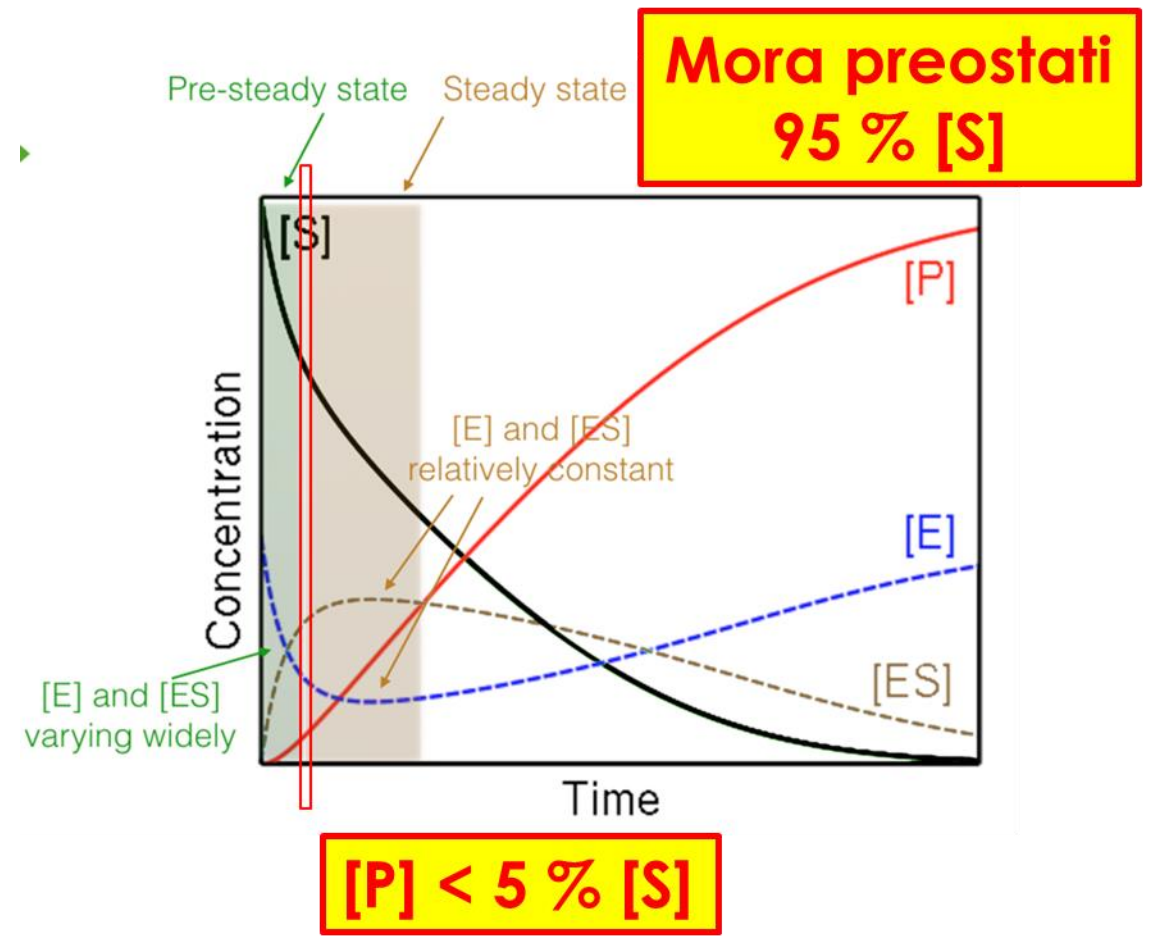
KINETIKA

- Plan: Mjeriti HPLC-MS metodom
- Uvjeti: mala koncentracija proteina, mala razlika u koncentraciji reaktanata
- Teoretski možemo mjeriti smanjenje koncentracije supstrata ili povećanje koncentracije produkta
- Primjer: angiotenzin II



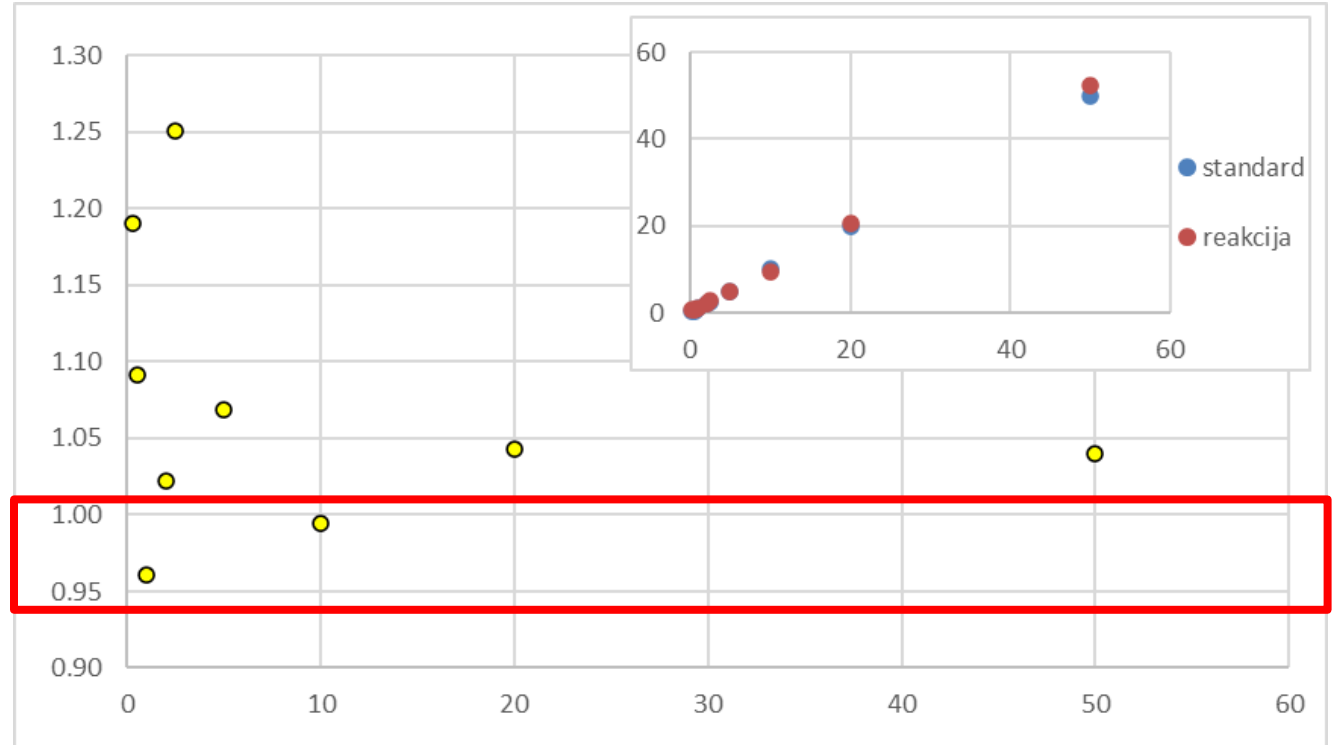
KINETIKA

- Strogo smo se pridržavali uvjeta u kojima vrijedi Michaelis-Menten kinetika



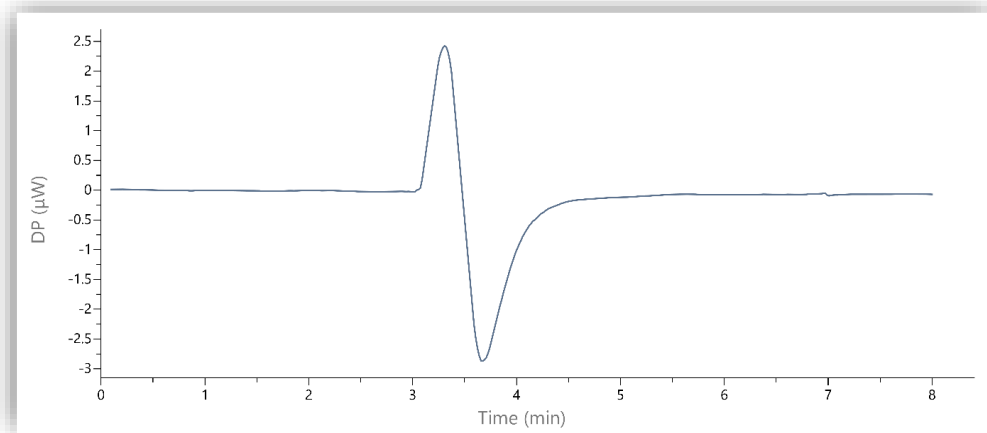
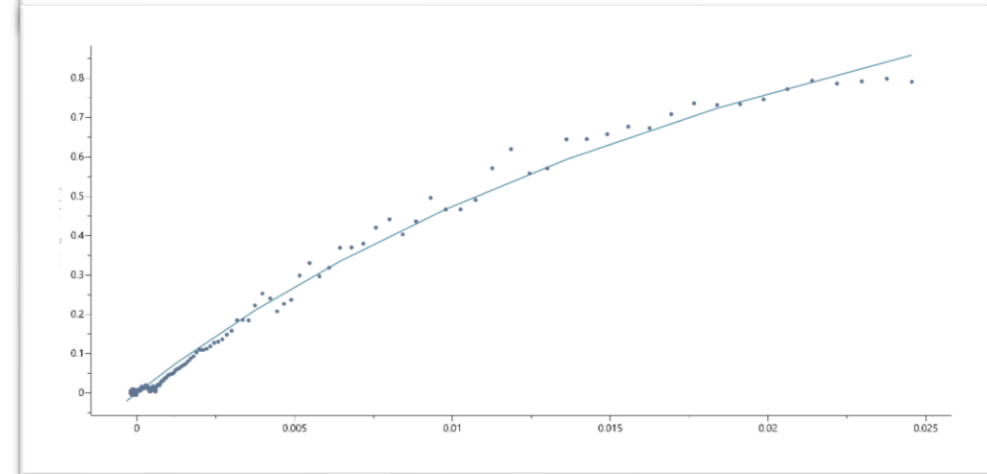
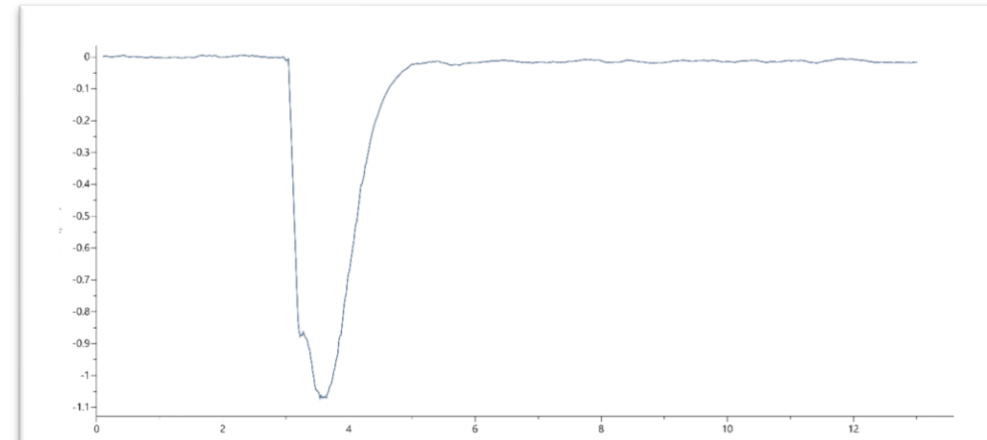
KINETIKA

- Primjer: cijepanje Leu-enkefalina
- Ima samo jedno cijepanje pa je prikladniji za mjerenje
- Problem: HPLC-MS nije dovoljno precizan



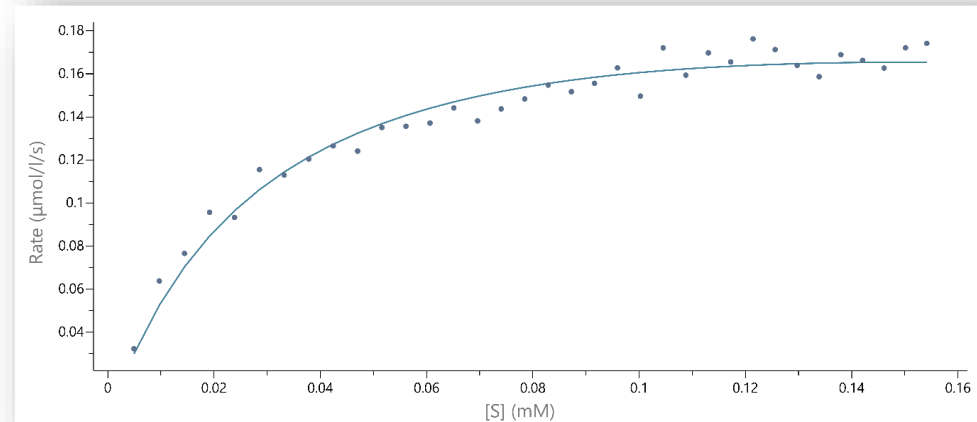
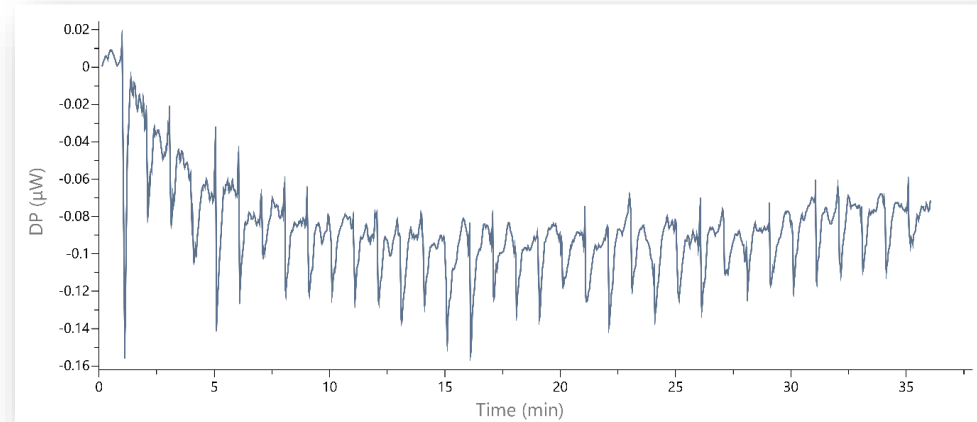
KINETIKA

- Promjena plana: pokušati s ITC
- Dvije vrste eksperimenata:
- SIM – single injection – potpuna konverzija supstrata u produkt
- MIM – multiple injection – djelomična pretvorba do 5% supstrata u produkt tijekom svake injekcije supstrata u otopinu enzima
- Primjer: SIM Leu-enkefalin i tinorfin



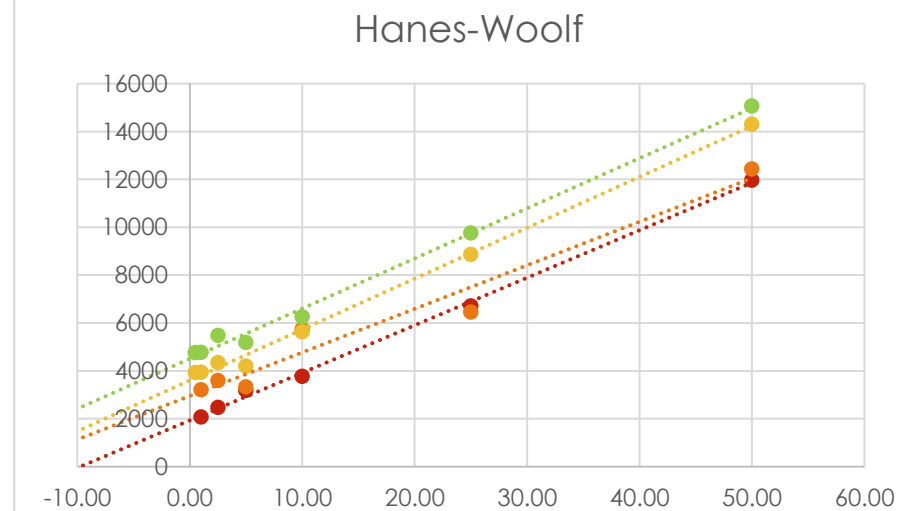
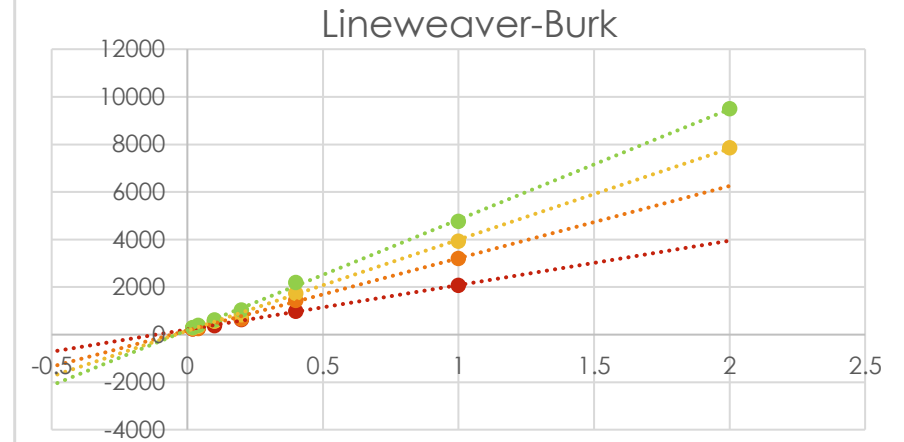
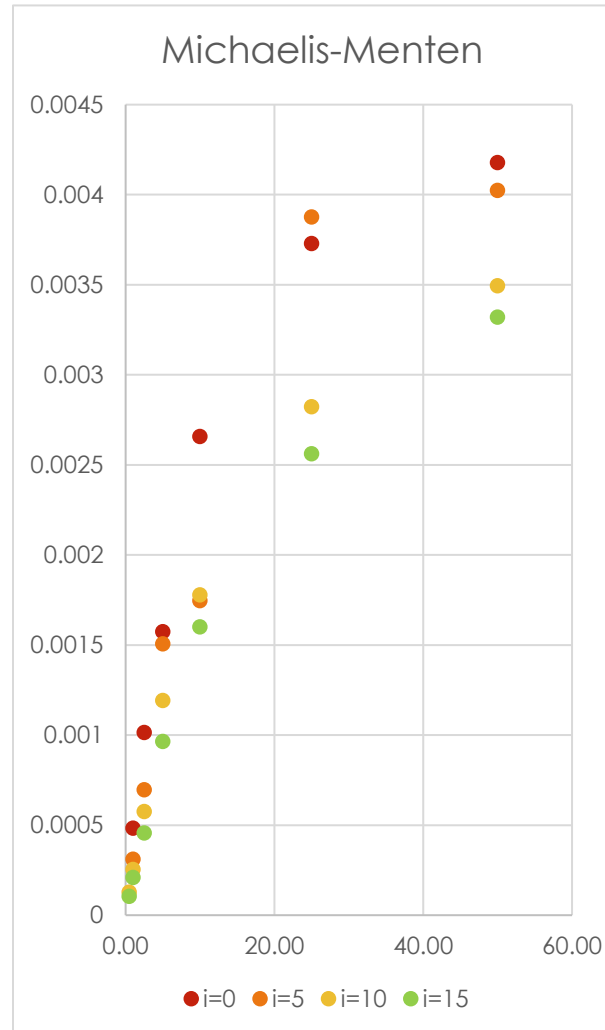
KINETIKA

- Dvije vrste eksperimenata:
- SIM – single injection – potpuna konverzija supstrata u produkt
- MIM – multiple injection – djelomična pretvorba do 5% supstrata u produkt tijekom svake injekcije supstrata u otopinu enzima
- Primjer: MIM Leu-enkefalin i tinorfin



INHIBICIJA

- Mjerenja u tijeku
- Inhibicija peptidima kao kompetitivnim inhibitorima – mjerenje brzine reakcije cijepanja supstrata Arg₂-2NA uz 3 različite koncentracije inhibitora
- Određivanje K_i nelinearnom regresijom
- Primjer: inhibicija nM tinorfinom



| peptid | sekvenca | | | | |
|----------------------|-----------------------------|--|--|--|--|
| vazopresin | C*YFQNC*PRG | | | | |
| hemopresin | PVNFKFLSH | | | | |
| β -neoendorfin | YGGFLRKYP | | | | |
| angiotenzin II | DRVYIHPF | | | | |
| endomorfín-2 | YPPF | | | | |
| Leu-enkefalin | YGGFL | | | | |
| hemorfín-4 | YPWT | | | | |
| valorfin | VVYPWTQ | | | | |
| Leu-valorfin-Arg | LVVYPWTQR | | | | |
| β -kazomorfín | YPFVEPI | | | | |
| tinorfin | VVYPW | | | | |
| S-tinorfin | SVYPW | | | | |
| I-tinorfin | IVYPW | | | | |
| dinorfin A (1-8) | YGGFLRRI | | | | |
| kolecistokinín 8 | DY(SO ₃ H)MGWMDF | | | | |

| | | HPLC-MS | | | |
|--------------------------|----------------|-----------|--|---|--|
| peptid | sekvenca | cijepanje | | | |
| vazopresin | C*YFQNC*PRG | NE | | | |
| hemopresin | PVNFKFLSH | NE | | | |
| β-neoendorfin | YGGFLRKYP | NE | | | |
| angiotenzin II | DRVYIHPF | DA | | | |
| endomorfina-2 | YPPF | DA | | | |
| Leu-enkefalin | YGGFL | DA | | | |
| hemorfina-4 | YPWT | DA | | | |
| valorfin | VVYPWTQ | DA | | | |
| Leu-valorfin-Arg | LVVYPWTQR | DA | | | |
| β-kazomorfina | YPFVEPI | DA | | | |
| tinorfina | VVYPW | DA | | | |
| S-tinorfina | SVYPW | DA | | | |
| I-tinorfina | IVYPW | DA | | | |
| dinorfina A (1-8) | YGGFLRRI | 1 | | !') nemamo više a nisu bili topljivi u vodi ili su bili problematični | |
| kolecistokinin 8 | DY(SO3H)MGWMDF | 1 | | | |

| | | HPLC-MS | ITC vezanje | | |
|---------------------------------------|-----------------------------|-----------|---------------------|--|--|
| peptid | sekvenca | cijepanje | $K_D / \mu M$ | | |
| vazopresin | C*YFQNC*PRG | NE | NE | | |
| hemopresin | PVNFKFLSH | NE | NE | | |
| β-neoendorfin | YGGFLRKYP | NE | NE | | |
| angiotenzin II | DRVYIHPF | DA | 2.22 ± 0.24 | | |
| endomorfina-2 | YPPF | DA | 40.1 ± 4.8 | | |
| Leu-enkefalin | YGGFL | DA | 118 ± 39 | | |
| hemorfina-4 | YPWT | DA | 39.4 ± 14.6 | | |
| valorfin | VVYPWTQ | DA | 1.78 ± 0.21 | | |
| Leu-valorfin-Arg | LVVYPWTQR | DA | 2.50 ± 1.92 | | |
| β-kazomorfina | YPFVEPI | DA | 130 ± 87 | | |
| tinorfina | VVYPW | DA | 0.386 ± 0.127 | | |
| S-tinorfina | SVYPW | DA | 0.298 ± 0.061 | | |
| I-tinorfina | IVYPW | DA | 0.0973 ± 0.0091 | | |
| dinorfina A (1-8) | YGGFLRRI | 1 | NE | 1) nemamo više a nisu bili topljivi u vodi ili su bili problematični | |
| kolecistokinin 8 | DY(SO ₃ H)MGWMDF | 1 | | | |

| | | HPLC-MS | ITC vezanje | ITC kinetika | |
|---------------------------------------|----------------|-----------|---------------------|--|--|
| peptid | sekvenca | cijepanje | $K_D / \mu\text{M}$ | $K_M / \mu\text{M}$ | $k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$ |
| vazopresin | C*YFQNC*PRG | NE | NE | | |
| hemopresin | PVNFKFLSH | NE | NE | | |
| β-neoendorfin | YGGFLRKYP | NE | NE | | |
| angiotenzin II | DRVYIHPF | DA | 2.22 ± 0.24 | | |
| endomorfina-2 | YPPF | DA | 40.1 ± 4.8 | | |
| Leu-enkefalin | YGGFL | DA | 118 ± 39 | SIM 34.7 ± 5.7 MIM 33.7 | SIM 1.08 ± 0.12 MIM 2.38 |
| hemorfina-4 | YPWT | DA | 39.4 ± 14.6 | SIM 55.1 ± 13.1 MIM 75.6 | SIM 6.11 ± 0.96 MIM 5.21 |
| valorfin | VVYPWTQ | DA | 1.78 ± 0.21 | | |
| Leu-valorfin-Arg | LVVYPWTQR | DA | 2.50 ± 1.92 | SIM 33.9 ± 6.4 MIM 27.3 ± 11.4 | SIM 0.35 ± 0.06 MIM 0.54 ± 0.17 |
| β-kazomorfina | YPFVEPI | DA | 130 ± 87 | 2 | |
| tinorfina | VVYPW | DA | 0.386 ± 0.127 | 2 | |
| S-tinorfina | SVYPW | DA | 0.298 ± 0.061 | | |
| I-tinorfina | IVYPW | DA | 0.0973 ± 0.0091 | | |
| dinorfina A (1-8) | YGGFLRRI | 1 | NE | 1) nemamo više a nisu bili topljivi u vodi ili su bili problematični | |
| kolecistokinin 8 | DY(SO3H)MGWMDF | 1 | | 2) tzv. profil sporog supstrata | |

| | | HPLC-MS | ITC vezanje | ITC kinetika | | inhibicija |
|---------------------------------------|----------------|-----------|---------------------|--|--|---------------------|
| peptid | sekvenca | cijepanje | $K_D / \mu\text{M}$ | $K_M / \mu\text{M}$ | $k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$ | $K_I / \mu\text{M}$ |
| vazopresin | C*YFQNC*PRG | NE | NE | | | NE |
| hemopresin | PVNFKFLSH | NE | NE | | | NE |
| β-neoendorfin | YGGFLRKYP | NE | NE | | | NE |
| angiotenzin II | DRVYIHPF | DA | 2.22 ± 0.24 | | | |
| endomorfina-2 | YPPF | DA | 40.1 ± 4.8 | | | |
| Leu-enkefalin | YGGFL | DA | 118 ± 39 | SIM 34.7 ± 5.7 MIM 33.7 | SIM 1.08 ± 0.12 MIM 2.38 | |
| hemorfina-4 | YPWT | DA | 39.4 ± 14.6 | SIM 55.1 ± 13.1 MIM 75.6 | SIM 6.11 ± 0.96 MIM 5.21 | |
| valorfin | VVYPWTQ | DA | 1.78 ± 0.21 | | | |
| Leu-valorfin-Arg | LVVYPWTQR | DA | 2.50 ± 1.92 | SIM 33.9 ± 6.4 MIM 27.3 ± 11.4 | SIM 0.35 ± 0.06 MIM 0.54 ± 0.17 | |
| β-kazomorfina | YPFVEPI | DA | 130 ± 87 | 2 | | |
| tinorfina | VVYPW | DA | 0.386 ± 0.127 | 2 | | |
| S-tinorfina | SVYPW | DA | 0.298 ± 0.061 | | | |
| I-tinorfina | IVYPW | DA | 0.0973 ± 0.0091 | | | |
| dinorfina A (1-8) | YGGFLRRI | 1 | NE | 1) nemamo više a nisu bili topljivi u vodi ili su bili problematični | | |
| kolecistokinin 8 | DY(SO3H)MGWMDF | 1 | | 2) tzv. profil sporog supstrata | | |

| | | HPLC-MS | ITC vezanje | ITC kinetika | | inhibicija |
|---------------------------------------|----------------|-----------|---------------------|--|--|---------------------|
| peptid | sekvenca | cijepanje | $K_D / \mu\text{M}$ | $K_M / \mu\text{M}$ | $k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$ | $K_I / \mu\text{M}$ |
| vazopresin | C*YFQNC*PRG | NE | NE | | | NE |
| hemopresin | PVNFKFLSH | NE | NE | | | NE |
| β-neoendorfin | YGGFLRKYP | NE | NE | | | NE |
| angiotenzin II | DRVYIHPF | DA | 2.22 ± 0.24 | | | |
| endomorfina-2 | YPPF | DA | 40.1 ± 4.8 | | | |
| Leu-enkefalin | YGGFL | DA | 118 ± 39 | SIM 34.7 ± 5.7 MIM 33.7 | SIM 1.08 ± 0.12 MIM 2.38 | |
| hemorfina-4 | YPWT | DA | 39.4 ± 14.6 | SIM 55.1 ± 13.1 MIM 75.6 | SIM 6.11 ± 0.96 MIM 5.21 | |
| valorfin | VVYPWTQ | DA | 1.78 ± 0.21 | | | |
| Leu-valorfin-Arg | LVVYPWTQR | DA | 2.50 ± 1.92 | SIM 33.9 ± 6.4 MIM 27.3 ± 11.4 | SIM 0.35 ± 0.06 MIM 0.54 ± 0.17 | |
| β-kazomorfina | YPFVEPI | DA | 130 ± 87 | 2 | | |
| tinorfina | VVYPW | DA | 0.386 ± 0.127 | 2 | | |
| S-tinorfina | SVYPW | DA | 0.298 ± 0.061 | | | |
| I-tinorfina | IVYPW | DA | 0.0973 ± 0.0091 | | | |
| dinorfina A (1-8) | YGGFLRRI | 1 | NE | 1) nemamo više a nisu bili topljivi u vodi ili su bili problematični | | |
| kolecistokinin 8 | DY(SO3H)MGWMDF | 1 | | 2) tzv. profil sporog supstrata | | |

| | | HPLC-MS | ITC vezanje | ITC kinetika | | inhibicija |
|---------------------------------------|----------------|-----------|---------------------|--|--|---------------------|
| peptid | sekvenca | cijepanje | $K_D / \mu\text{M}$ | $K_M / \mu\text{M}$ | $k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$ | $K_I / \mu\text{M}$ |
| vazopresin | C*YFQNC*PRG | NE | NE | | | NE |
| hemopresin | PVNFKFLSH | NE | NE | | | NE |
| β-neoendorfin | YGGFLRKYP | NE | NE | | | NE |
| angiotenzin II | DRVYIHPF | DA | 2.22 ± 0.24 | | | |
| endomorfina-2 | YPPF | DA | 40.1 ± 4.8 | | | |
| Leu-enkefalin | YGGFL | DA | 118 ± 39 | SIM 34.7 ± 5.7 MIM 33.7 | SIM 1.08 ± 0.12 MIM 2.38 | |
| hemorfina-4 | YPWT | DA | 39.4 ± 14.6 | SIM 55.1 ± 13.1 MIM 75.6 | SIM 6.11 ± 0.96 MIM 5.21 | |
| valorfin | VVYPWTQ | DA | 1.78 ± 0.21 | | | |
| Leu-valorfin-Arg | LVVYPWTQR | DA | 2.50 ± 1.92 | SIM 33.9 ± 6.4 MIM 27.3 ± 11.4 | SIM 0.35 ± 0.06 MIM 0.54 ± 0.17 | |
| β-kazomorfina | YPFVEPI | DA | 130 ± 87 | 2 | | |
| tinorfina | VVYPW | DA | 0.386 ± 0.127 | 2 | | |
| S-tinorfina | SVYPW | DA | 0.298 ± 0.061 | | | |
| I-tinorfina | IVYPW | DA | 0.0973 ± 0.0091 | | | |
| dinorfina A (1-8) | YGGFLRRI | 1 | NE | 1) nemamo više a nisu bili topljivi u vodi ili su bili problematični | | |
| kolecistokinin 8 | DY(SO3H)MGWMDF | 1 | | 2) tzv. profil sporog supstrata | | |

| | | HPLC-MS | ITC vezanje | ITC kinetika | | inhibicija |
|----------------------|-----------------------------|-----------|---------------------|--|--|---------------------|
| peptid | sekvenca | cijepanje | $K_D / \mu\text{M}$ | $K_M / \mu\text{M}$ | $k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$ | $K_I / \mu\text{M}$ |
| vazopresin | C*YFQNC*PRG | NE | NE | | | NE |
| hemopresin | PVNFKFLSH | NE | NE | | | NE |
| β -neoendorfin | YGGFLRKYP | NE | NE | | | NE |
| angiotenzin II | DRVYIHPF | DA | 2.22 ± 0.24 | | | |
| endomorfina-2 | YPPF | DA | 40.1 ± 4.8 | | | |
| Leu-enkefalin | YGGFL | DA | 118 ± 39 | SIM 34.7 ± 5.7 MIM 33.7 | SIM 1.08 ± 0.12 MIM 2.38 | |
| hemorfin-4 | YPWT | DA | 39.4 ± 14.6 | SIM 55.1 ± 13.1 MIM 75.6 | SIM 6.11 ± 0.96 MIM 5.21 | |
| valorfin | VVYPWTQ | DA | 1.78 ± 0.21 | | | |
| Leu-valorfin-Arg | LVVYPWTQR | DA | 2.50 ± 1.92 | SIM 33.9 ± 6.4 MIM 27.3 ± 11.4 | SIM 0.35 ± 0.06 MIM 0.54 ± 0.17 | |
| β -kazomorfina | YPFVEPI | DA | 130 ± 87 | 2 | | |
| tinorfin | VVYPW | DA | 0.386 ± 0.127 | 2 | | |
| S-tinorfin | SVYPW | DA | 0.298 ± 0.061 | | | |
| I-tinorfin | IVYPW | DA | 0.0973 ± 0.0091 | | | |
| dinorfina A (1-8) | YGGFLRRI | 1 | NE | 1) nemamo više a nisu bili topljivi u vodi ili su bili problematični | | |
| kolecistokinin 8 | DY(SO ₃ H)MGWMDF | 1 | | 2) tzv. profil sporog supstrata | | |

| | | HPLC-MS | ITC vezanje | ITC kinetika | | inhibicija |
|---------------------------------------|----------------|-----------|---------------------|--|--|---------------------|
| peptid | sekvenca | cijepanje | $K_D / \mu\text{M}$ | $K_M / \mu\text{M}$ | $k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$ | $K_I / \mu\text{M}$ |
| vazopresin | C*YFQNC*PRG | NE | NE | | | NE |
| hemopresin | PVNFKFLSH | NE | NE | | | NE |
| β-neoendorfin | YGGFLRKYP | NE | NE | | | NE |
| angiotenzin II | DRVYIHPF | DA | 2.22 ± 0.24 | | | |
| endomorfina-2 | YPPF | DA | 40.1 ± 4.8 | | | |
| Leu-enkefalin | YGGFL | DA | 118 ± 39 | SIM 34.7 ± 5.7 MIM 33.7 | SIM 1.08 ± 0.12 MIM 2.38 | |
| hemorfina-4 | YPWT | DA | 39.4 ± 14.6 | SIM 55.1 ± 13.1 MIM 75.6 | SIM 6.11 ± 0.96 MIM 5.21 | |
| valorfin | VVYPWTQ | DA | 1.78 ± 0.21 | | | |
| Leu-valorfin-Arg | LVVYPWTQR | DA | 2.50 ± 1.92 | SIM 33.9 ± 6.4 MIM 27.3 ± 11.4 | SIM 0.35 ± 0.06 MIM 0.54 ± 0.17 | |
| β-kazomorfina | YPFVEPI | DA | 130 ± 87 | 2 | | |
| tinorfina | VVYPW | DA | 0.386 ± 0.127 | 2 | | |
| S-tinorfina | SVYPW | DA | 0.298 ± 0.061 | | | |
| I-tinorfina | IVYPW | DA | 0.0973 ± 0.0091 | | | |
| dinorfina A (1-8) | YGGFLRRI | 1 | NE | 1) nemamo više a nisu bili topljivi u vodi ili su bili problematični | | |
| kolecistokinin 8 | DY(SO3H)MGWMDF | 1 | | 2) tzv. profil sporog supstrata | | |



ZAKLJUČCI

- Uspješno uvedene nove metode:
 - Mikrokolorimetrija za praćenje kinetike peptidazne enzimske reakcije – SIM i MIM
 - HPLC-MS za ispitivanje peptida kao supstrata
- Postojeće metode nadopunjuju se s novima
- Potvrđen hemorfin-4 kao do sada nepoznati supstrat hDPP III

R669 EKSPERIMENTAL

• **Mutagenеза i inhibicija**

- R669 u Ala (A)
R669 u Met (M)
- Inhibicija:
 - tinorfinom
 - Leu-enkefalinom
 - angiotenzinom IIi usporedba s divljim tipom

ITC

- Vežanje produkata reakcija na inaktivni mutant E451A:
 - tinorfin: VV i YPW
 - Leu-enkefalin: YG i GFL