

Poništavanje hepatoprotektivnog učinka D-met-enkefalina komplementarnim peptidom kao model za proučavanje peptidnih interakcija

Matković, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:811245>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Katarina Matković

Poništavanje hepatoprotektivnog učinka D-met-enkefalina komplementarnim
peptidom kao model za proučavanje peptidnih interakcija

Diplomski rad

Zagreb, 2021

Rosa Ueblich

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za epigenomiku na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom doc. dr. sc. Paška Konjevode i suvodstvom doc. dr. sc. Rose Karlić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Iskreno zahvaljujem svim članovima Laboratorija za epigenomiku na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković.

Posebno zahvaljujem dr.sc. Nikoli Štambuku na zanimljivim pričama i korisnim savjetima koji su uvelike obogatili ovo iskustvo.

Zahvaljujem doc.dr.sc. Rosi Karlić što je pristala na suvoditeljstvo te pružila svoju pomoć i podršku.

Željela bih zahvaliti svojim roditeljima na razumijevanju i podršci koju su mi pružili tijekom cijelog studiranja. Veliko hvala didu Miru koji me naučio da trebam vjerovati u sebe i da nema problema koji se ne može riješiti trudom i upornošću.

Hvala svim prijateljima koji su učinili ovih pet godina nezaboravnim iskustvom, a posebno hvala Dadi što mi je bio podrška kada je bilo najteže.

Iznad svega, zahvaljujem svom mentoru, dr. sc. Pašku Konjevodi, na strpljenju, pruženoj podršci i svim savjetima koji su mi pomogli učvrstiti kritičko razmišljanje u znanstvenom radu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno matematički
fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Poništavanje hepatoprotektivnog učinka D-met-enkefalina komplementarnim peptidom kao model za proučavanje peptidnih interakcija

Katarina Matković

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Većina regulatornih procesa u biološkim sustavima ovisi o interakcijama između proteina. Naše spoznaje o takvim interakcijama su relativno ograničene, a eksperimentalne metode za njihovo proučavanje kompleksne, spore i skupe. Zbog toga se u radu opisuju heurističke metode za određivanje bioaktivnih područja u proteinima te interakcije tih područja s drugim proteinima. Jedna od takvih metoda, teorija molekularnog prepoznavanja (MRT) praktično je primijenjena u biološkom eksperimentalnom modelu poništenja učinka peptida D-met-enkefalina. Protektivni učinak D-met-enkefalina proučavan je u *in vivo* modelu oštećenja jetre mužjaka miša CBA soja paracetamolom uz primjenu tri kriterija: aktivnost enzima ALT i AST, patohistološko određivanje stupnja nekroze jetre te broj spontano uginulih životinja. Dokazan je protektivni učinak po dva kriterija: aktivnost enzima ALT (U/L) i AST (U/L) te bodovi nekroze jetre. Optimalna protektivna doza iznosi 5 mg/kg. Protektivni učinak poništavao se uz pomoć komplementarnog peptida (IPPLY) konstruiranog uporabom MRT. Osnovna svojstva komplementarnog peptida te njegova interakcija s D-met enkefalinom proučavana su pomoću cirkularne dikroizmatске spektroskopije i fluorescentne spektroskopije. Antisens peptid u potpunosti poništava protektivni učinak optimalne doze D-met-enkefalina. Dokazano je da je uporabom teorije molekularnoga prepoznavanja moguće na jednostavan i učinkovit način izraditi peptidni sustav liganda i akceptora.

(35 stranica, 17 slika, 8 tablica, 54 literaturna navoda , jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: heuristički algoritmi, teorija molekularnoga prepoznavanja, komplementarni peptidi. met-enkefalin, hepatoprotekcija

Voditelj: Doc. dr. sc. Paško Konjevoda

Suvoditelj: Doc. dr. sc. Rosa Karlić

Ocjenitelji: Doc. dr. sc. Rosa Karlić

Doc. dr. sc. Duje Lisičić

Izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Zamjena: Doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation thesis

Reversal of the hepatoprotective effect of D-met-enkephalin by a complementary peptide as a model for studying peptide interactions

Katarina Matković

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

Most regulatory processes in biological systems depend on protein-protein interactions. Our knowledge of such interactions is relatively limited, and experimental methods for studying them are complex, slow and expensive. Therefore, heuristic methods to determine bioactive regions in proteins and interactions of these regions with other proteins are described in the paper. One such method, Molecular Recognition Theory (MRT), has been practically applied in the biological experimental model of reversal effect of the D-met-enkephalin peptide. Protective potential of Met-enkephalin was evaluated using an experimental model of paracetamol induced hepatotoxicity in male CBA mice and observed by using three criteria: plasma activities of ALT and AST enzymes, liver necrosis score and number of spontaneously dead animals. Protective potential was demonstrated by two criteria: activity of enzymes ALT (U / L) and AST (U / L) and liver necrosis score. The optimal protective dose is 5 mg / kg. Protective effect was reversed using a complementary peptide (IPPLY) constructed using MRT. The basic properties of the complementary peptide and its interaction with D-met enkephalin were studied using circular dichroism spectroscopy and fluorescence spectroscopy. The antisense peptide completely reverses the protective effect of the optimal dose of D-met-enkephalin. It has been proven that using molecular recognition theory it is possible to construct a ligand-acceptor peptide system in a simple and efficient way.

(35 pages, 17 figures, 8 tables, 54 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: heuristic algorithms, molecular recognition theory, complementary peptides, met-enkephalin, hepatoprotection

Supervisor: Doc. dr. sc. Paško Konjevoda

Co-supervisor: Doc. dr. sc. Rosa Karlić

Reviewers: Doc. dr. sc. Rosa Karlić

Doc. dr. sc. Duje Lisičić

Izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Replacement reviewer: Doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Thesis accepted:

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Što su interakcije između proteina (PPI)?	1
1.2. Metode istraživanja interakcija između proteina (PPI)	2
1.2.1. Metode <i>in vitro</i>	2
1.2.1.1. Fluorescencijska spektroskopija.....	3
1.2.2. Metode <i>in vivo</i>	4
1.2.3. Usporedba <i>in vitro</i> s <i>in vivo</i> metodama	4
1.2.4. Metode <i>in silico</i>	4
1.2.5. Heurističke metode	6
1.3. Traženje bioaktivnog mjesta	6
1.3.1. Hidrofobni profil.....	6
1.3.2. Rezonancijski model prepoznavanja	8
1.4. Teorija molekularnog prepoznavanja.....	9
1.5. Met-enkefalin.....	10
1.6. Oštećenje jetre paracetamolom	12
2. CILJEVI RADA	15
2.1. Hipoteze	15
3. MATERIJAL I METODE	16
3.1. Eksperimentalne životinje.....	16
3.2. Materijali.....	16
3.3. Spektroskopska analiza	16
3.4. Mjerenje razine hepatotoksičnosti.....	17
3.5. Eksperimentalni protokol	18
3.6. Statistička analiza	19
4. REZULTATI	20
4.1. Rezultati spektroskopskih analiza	20
4.1.1. Cirkularna dikroizmatska (CD) spektroskopija.....	20
4.1.2. Fluorescentna spektroskopija (FS).....	20
4.2. Jetreni enzimi	21
4.2.1. ALT	21
4.2.2. AST	23
4.3. Patohistološka analiza hepatotoksičnosti	24

4.4. Preživljenje eksperimentalnih živali.....	26
4.5. Sažetak rezultata	26
5. RASPRAVA.....	27
6. ZAKLJUČAK.....	30
7. LITERATURA.....	31
ŽIVOTOPIS	i

POPIS KRATICA

ALT	alanin aminottransferaza
AST	aspartat aminottransferaza
ATP	adenozin trifosfat
BiFC	bimolekularna fluorescentna komplementacija
BRET	bioluminiscentni rezonantni prijenos energije
CD	cirkularna dikroizmatska spektroskopija
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
EIIP	elektronsko-ionske interakcijske vrijednosti pseudopotencijala
FRET	fluorescentni rezonantni prijenos energije
FS	fluorescentna spektroskopija
HE	hemalaun-eozin
i.g.	intragastrička aplikacija
i.p.	intraperitonealna aplikacija
ISM	metoda informacijskog spektra
MAPK	mitogen-aktivirani protein kinazni
MRT	teorija molekularnog prepoznavanja
M2H	mammalian two-hybrid test
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NAPQI	N-acetil-p-benzokinonimin
POMC	proopiomelanokortin
PPI	interakcije između proteina
RRM	rezonantni rekognicijski model
SH	Src homologne
SVD	Dekompozicija na pojedinačne vrijednosti
TAP	Transporter asociran s procesuiranjem antigena
Y2H	yeast two-hybrid test

1. UVOD

1.1. Što su interakcije između proteina (PPI)?

Proteini su ključni dio svakog živog organizma. Sastoje se od jednog ili više dugih lanaca aminokiselina te su važni za brojne funkcije u organizmu poput katalize metaboličkih reakcija, replikacije DNA, transporta molekula, itd. Funkcije i molekularna svojstva pojedinih proteina prilično su opširno opisana u velikim proteinskim bazama kao što je UniProt (UniProt, 2010). Proteini, međutim, rijetko djeluju sami. Brojne molekularne procese u stanici obavljaju tzv. molekularni strojevi sastavljeni od brojnih proteinskih komponenti organiziranih uz pomoć interakcija između proteina, *eng.* protein-protein interaction (PPI). Cjelokupna mapa PPI koje se mogu dogoditi u živom organizmu naziva se interaktom (Cusick i sur., 2005). Interakcijama između proteina smatraju se fizički kontakti, uz određenu orijentaciju, između proteina u živoj stanici ili organizmu. Fizički kontakt kod PPI mora biti specifičan, a ne slučajan te se ne uzimaju u obzir interakcije nastale za vrijeme nastanka, smatanja, provjere kvalitete i razgradnje proteina (De Las Rivas i Fontanillo, 2010).

Interakcije između proteina ne moraju biti statične ni trajne. Neke proteinske grupacije su stabilne zbog toga što čine makromolekularne proteinske komplekse i stanične strojeve, poput adenzin trifosfat (ATP) sintaze i citokrom oksidaze, čiji se sastavni proteini nazivaju podjedinice. Ostale proteinske skupine nastaju zbog prolaznih radnji kao što je aktivacija genske ekspresije vezanjem transkripcijskih faktora i aktivatora na promotorsku regiju DNA (De Las Rivas i Fontanillo, 2010). Kako bi se PPI definirale u biološkom kontekstu važno je razumjeti da se neće sve moguće interakcije dogoditi u svakoj stanici u bilo koje vrijeme. Koje PPI će se dogoditi ovisi o vrsti stanice, fazi staničnog ciklusa, razvojnom stadiju, okolišnim uvjetima, proteinskim modifikacijama, prisutnosti kofaktora i ostalih veznih partnera (De Las Rivas i Fontanillo, 2010).

Proteini se vežu jedni s drugima kombinacijom hidrofobnih veza, van der Waals-ovih veza, vodikovih veza i elektrostatskih interakcija, na specifičnim veznim domenama proteina u interakciji. Jedna vrsta takvih veznih domena su leucinski zatvarači koji, zbog gustog pakiranja molekula, omogućavaju nastanak stabilnih multiproteinskih kompleksa. Dvije Src homologne (SH) domene, SH2 i SH3, su najčešći primjeri prolaznih veznih domena koje vežu kratke peptidne sekvence, najčešće signalnih proteina. SH2 domena prepoznaje peptidne sekvence s fosforiliranim tirozinima, što je čest indikator proteinske aktivacije. SH3 domena obično prepoznaje prolinom bogate peptide i često je koriste kinaze, fosforilaze i GTPaze kako bi identificirale ciljne proteine (www.termofisher.com).

Proteini se mogu povezivati u homo-oligomere i hetero-oligomere. Homo-oligomeri se sastoje od samo jedne vrste proteinskih podjedinica koje se mogu rastaviti jedino denaturacijom kompleksa. Nekoliko enzima, proteinskih nosača i transkripcijskih regulatornih faktora izvršavaju svoje funkcije kao homo-oligomeri. Hetero-oligomeri su kompleksi više različitih proteinskih podjedinica. Važni su za regulaciju raznih funkcija stanica poput signalizacije (Jones i Thornton, 1996).

Neki od mjerljivih učinaka protein-protein interakcija mogu se sažeti u sljedeće točke:

- mijenjanje kinetičkih svojstava enzima
- generalni mehanizam za kanaliziranje supstrata
- stvaranje novog veznog mjesta, karakteristično za male efektorske molekule
- inaktivacija ili supresija proteina
- promjena specifičnosti proteina za njegov supstrat preko interakcija s različitim veznim partnerima
- regulatorna uloga na uzvodnom ili nizvodnom nivou (Rao i sur., 2014)

Istraživanjem PPI znatno su se proširile mogućnosti razvoja lijekova koji ne ciljaju samo pojedinačne proteine. Prema podacima iz 2013. godine, za samo 266 ljudskih proteina postoje odobreni lijekovi koji djeluju na upravo te proteine, a procjena je da bi se moglo napraviti takve lijekove za oko njih 1500 (Ottman, 2013). Obzirom da se veličina interaktoma procjenjuje na 130 000 – 650 000 (Venkatesan i sur., 2009; Stumpf i sur., 2008) to otvara puno šire mogućnosti za razvoj novih lijekova. To je od posebno velike važnosti pri istraživanju pogodnih terapija za tumore. Tako se recimo otkrila važnost PPI u pronalasku aktivnog mjesta inhibitora koji ciljaju onkogeni kinazu B-Raf, koja pod određenim okolnostima aktivira, umjesto da inhibira, mitogen-aktivirani protein kinazni (MAPK) put. Ovo je samo jedan od brojnih primjera koji ukazuje na to da se u većini slučajeva funkcioniranje organizama zasniva na regulaciji proteina putem PPI (Ottman, 2013).

1.2. Metode istraživanja interakcija između proteina (PPI)

Metode detekcije PPI dijele se na one *in vitro*, *in vivo* i *in silico*.

1.2.1. Metode *in vitro*

In vitro tehnike se provode u kontroliranim uvjetima izvan živog organizma. Jedna od takvih tehnika je označavanje TAP proteinom (*eng.* Transporter Associated with Antigen Processing), a to je protein bitan za prijenos antigenih proteina kroz membranu endoplazmatskog retikuluma. Metoda

se zasniva na dvostrukom označavanju proteina od interesa na njegovom kromosomalnom lokusu, nakon čega slijedi proces pročišćavanja u dva koraka. Proteini koji ostanu povezani s ciljnim proteinom se onda mogu proučavati i identificirati pomoću SDS-PAGE i spektrometrije masa te se tako otkriju PPI s ciljnim proteinom i proteinski kompleksi (Pitre i sur., 2008). Koristi se i afinitetna kromatografija, koja se također može kombinirati s SDS-PAGE i spektrometrijom masa. Također je važno spomenuti i koimunoprecipitaciju u kojoj se koristi cijeli stanični izolat u kojem se proteini nalaze u prirodnom obliku i u kombinaciji s ostalim staničnim komponentama koje mogu biti važne za ostvarivanje uspješnih interakcija. Ukoliko se koriste eukariotski ekspresijski organizmi moguće su i posttranslacijske modifikacije bez kojih se neke PPI ne bi mogle dogoditi (Rao i sur., 2014). Sve brže se razvijaju i proteinski mikročipovi koji omogućavaju istovremenu analizu na tisuće parametara u sklopu jednog eksperimenta. Protein-fragment komplementacijska analiza (*eng.* protein-fragment complementation assay) koristi se za detekciju PPI između proteina bilo koje molekulske mase, eksprimiranih na njihovom endogenom nivou (Michnick i sur., 2011). Treba još spomenuti i kristalografiju X-zrakama i spektroskopiju nuklearne magnetske rezonance (NMR), kojom se mogu detektirati i slabe PPI (Rao i sur., 2014).

1.2.1.1. Fluorescencijska spektroskopija

Jedan od načina provjere dobivenih rezultata je fluorescencijska spektroskopija (Fisher i Arnold, 2013). Ova metoda ovisi jedino o promjeni u okolišu fluorofora, a ne o veličini i tipu molekula pa je pogodna za detekciju i kvantifikaciju PPI i interakcija između peptida (Štambuk i sur., 2014; Štambuk i sur., 2019). Fluorescencija proteina okarakterizirana je njegovim ekscitacijskim i emisijskim spektrom, odgovarajućim emisijskim maksimumom (λ_{max}), kvantnim poljem (postotak apsorbiranih fotona koji rezultiraju emitirajućim fotonima) i anizotropijom (doseg fluorescencijskog intenziteta koji varira kada se mjeri u različitim smjerovima). Ti parametri ovise o lokalnom okolišu fluorofora i zbog toga se mijenjaju uslijed interakcije proteina s drugim proteinom ili ligandom. Izvor fluorescencije može biti intrinzični fluorofor, poput triptofana ili tirozina, kovalentno ili nekovalentno pričvršćena fluorescentna boja ili fluorescentni vezni partner (kofaktor, poput NADH ili nukleotida) koji se specifično veže na kompleks (Groemping i Hellmann, 2005).

Važno je voditi računa o intrinzičnim fluoroforima kod akceptorskih proteina, kako ne bi interferirali s fluorescencijom koju želimo mjeriti. Autofluorescenciju pretežno uzrokuju aromatske aminokiseline poput triptofana te je shodno tome potrebno prilagoditi pokus (Ghisaidoobe i Chung, 2014). Takve intrinzične fluorofore moguće je spektralno definirati i tretirati ih kao dodatni signal. Fluorescentni signali mogu se opisati kao linearna kombinacija fluorofora prisutnih u promatranom volumenu, a njihova koncentracija u promatranj točki pridonosi ukupnom signalu:

$$S(\lambda) = A_1 \times \text{Fluo1}(\lambda) + A_2 \times \text{Fluo2}(\lambda) + A_3 \times \text{Fluo3}(\lambda) \dots,$$

gdje S predstavlja ukupni detektirani signal za svaki kanal λ , $\text{FluoX}(\lambda)$ predstavlja spektralni doprinos fluorofora svakom kanalu, a A_x predstavlja koncentraciju fluorofora na mjerenom mjestu. Linearno razdvajanje je metoda koja rješava tu linearnu jednadžbu uz pomoć metode najmanjih kvadrata i takozvane SVD metode (*eng.* singular value decomposition) te kao rezultat daju razdvojene signale fluorofora koji se mogu zasebno prikazati neovisno jedan o drugome bez da se promjeni njihov intenzitet (Zimmerman i sur., 2014).

1.2.2. Metode *in vivo*

Najpoznatija *in vivo* tehnika je *eng.* yeast two-hybrid assay (Y2H). Potrebne su dvije proteinske domene koje imaju dvije specifične funkcije: DNA vezna domena, koja pomaže u vezanju DNA, i aktivacijska domena, odgovorna za aktivaciju transkripcije DNA. Obje domene potrebne su za aktivaciju transkripcije reporter gena, čime se onda otkrivaju PPI kod proteinskih parova (Ito i sur., 2001). Novija verzija ove metode je *eng.* mammalian two-hybrid assay (M2H). Korištenje stanica sisavaca omogućava proučavanje proteina u prirodnijem obliku, stvaranjem sličnih posttranslacijskih modifikacija te je lokalizacija proteina preciznija u usporedbi s određivanjem lokalizacije u stanicama kvasca. Ovom metodom mogu se otkriti samo interakcije proteina koje se odvijaju u jezgri stanice. U širokoj upotrebi su bioluminiscentni rezonantni prijenos energije (BRET), fluorescentni rezonantni prijenos energije (FRET) i bimolekularna fluorescentna komplementacija (BiFC) (Rao i sur., 2014).

1.2.3. Usporedba *in vitro* s *in vivo* metodama

Sve prethodno navedene metode imaju i svoje nedostatke. Za većinu metoda potrebno je nadeksprimirati proteine, kako bi se otkrile slabe i prolazne PPI, što može dovesti do umjetno stvorenih rezultata. Važni su i okolišni uvjeti u kojima se eksperiment provodi. Tako naprimjer neurođeni organizmi, poput kvasca, mogu utjecati na ekspresiju, translaciju, substancičnu lokalizaciju, posttranslacijske modifikacije, itd. Međutim, dva možda najveća nedostatka su visoki troškovi i sporost ovih metoda.

1.2.4. Metode *in silico*

Kako bi se smanjili troškovi i ubrzala analiza PPI, došlo je do sve bržeg razvoja *in silico*, odnosno računalnih metoda. Ovi postupci temelje se na različitim pristupima, koji mogu biti zasnovani na: sekvencama, strukturi, kromosomskoj udaljenosti, fuziji gena, *in silico* dvostrukim hibridima, filogenetskim stablima, genskoj ontologiji i genskoj ekspresiji (Rao i sur., 2014).

Predikcije PPI rade se na osnovi poznatih interakcija, temeljenih na homologiji sekvenci. Smatra se da interakcije pronađene u jednoj vrsti mogu poslužiti za predviđanje interakcija u drugoj vrsti. Postoje dvije osnovne vrste pristupa. Prvi se zasniva na ortologiji. Cilj je prenijeti anotaciju s funkcionalno definirane proteinske sekvence na sekvencu od interesa, za što se koristi *eng.* „pairwise local sequence“ algoritam. Drugi pristup koristi proteinske domene za predviđanje PPI. S obzirom na to da su domene evolucijski visoko očuvane smatra se da se interakcije između domena mogu koristiti za uspješnije predviđanje PPI (Rao i sur., 2014).

Strukturalne metode temelje se na pretpostavci da dva proteina slične strukture tvore slične PPI. Točnije, ako protein X i protein Y tvore PPI, onda će to biti slučaj i za X' i Y'. Problem ove metode leži u tome što nisu poznate strukture svih proteina pa ih je prvo potrebno predvidjeti (Rao i sur., 2014). Jedan od poznatijih algoritama, koji predikciju PPI temelji na strukturi proteina, je Coev2Net. Temelji se na tri koraka: predikcija veznog sučelja, provjera kompatibilnosti veznog sučelja s veznim sučeljem koevolucijski baziranog modela i provjera pouzdanosti te interakcije (Hosur i sur., 2011).

U prokariotskim organizmima, geni za funkcionalno povezane proteine često se nalaze vrlo blizu u organiziranim regijama u genomu kao što su operoni te se transkribiraju zajedno. Metoda kromosomske udaljenosti zasniva se na pretpostavci da ukoliko su takvi geni očuvani u različitim genomima, onda je puno veća vjerojatnost da će proteini koje kodiraju biti funkcionalno povezani. Ova metoda ograničena je samo na bakterijske genome, obzirom da je udaljenost gena (*eng.* gene neighboring) očuvana samo u bakterijama (Rao i sur., 2014).

Fuzija gena zasniva se na tome da se proteini s jednom domenom, iz jednog organizma, mogu međusobno spajati i tvoriti protein s više domena u drugom organizmu (Enright i sur., 1999). Ovo svojstvo posebno je izraženo kod proteina koji sudjeluju u metaboličkom putu. Ova metoda predikcije PPI koristi informacije o razmještanju domena u različitim genomima, za proteine za koje isti uopće postoji (Rao i sur., 2014).

Metoda dvostrukih hibrida (*eng.* In Silico Two Hybrid) za glavnu pretpostavku ima da proteini koji imaju međusobnu interakciju koevoluiraju kako bi očuvali funkcionalnost. Drugim riječima, ukoliko neke ključne aminokiseline u jednom proteinu mutiraju, onda će doći i do mutacija u aminokiselinama njegovog proteina partnera. Genomi koji sadrže gene za ta dva proteina identificiraju se pomoću višestrukog poravnavanja sekvenci te se računaju korelacijski koeficijenti za svaki par aminokiselina unutar jednog proteina i između dva proteina. PPI se određuje preko razlike raspodjela korelacijskih koeficijenata interakcijskih partnera i unutar samog proteina (Pazos i sur., 2002; Rao i sur., 2014).

Metode koje koriste filogenetska stabla temelje se na pretpostavci da funkcionalno povezani proteini koevoluiraju. Te metode su uspješne kada su u pitanju prokariotski organizmi, ali ne daju zadovoljavajuće rezultate kod eukariotskih organizama (Lin i sur., 2013; Rao i sur., 2014).

Genskom ekspresijom smatra se kvantifikacija razine ekspresije gena u stanici, tkivu ili organizmu u različitim eksperimentalnim uvjetima i vremenskim intervalima. Predviđanje PPI pomoću genske ekspresije radi se upotrebom algoritama za klasteriranje, koji grupiraju gene ovisno o njihovoj razini ekspresije. Glavna pretpostavka je da će proteini čiji su geni u istom klasteru imati češće interakcije međusobno nego s onima iz drugog klastera (Rao i sur., 2014).

Glavni problem svih navedenih metoda je to što su nepouzdanе i različiti algoritmi mogu dati potpuno različite rezultate. Svakako je poželjno koristiti kombinaciju više različitih metoda kako bi dobiveni rezultati bili što vjerodostojniji.

1.2.5. Heurističke metode

Heuristički algoritmi su u suštini metode pokušaja i pogrešaka. Provode pametno pretraživanje prostora rješenja (Laubenbacher i sur., 2013). Umjesto da pretražuju sva moguća rješenja, fokusiraju se na jedan aspekt problema ili aktualiziraju metode pretraživanja s obzirom na prethodno dobivena rješenja. Algoritmi započinju izborom kontrolnih ulaznih vrijednosti, odnosno parcijalnih ili cijelih rješenja, koje se potom uz pomoć različitih metoda variraju kako bi se smanjila vrijednost pridružene funkcije, sve dok se ne nađe bolje rješenje. Iako ova metoda ne garantira pronalazak optimalnog rješenja, omogućava analizu kada ostale metode zakažu. Ukoliko se algoritmi pametno i točno konstruiraju, predstavljaju ogroman napredak u odnosu na nasumično pretraživanje prostora rješenja. (Laubenbacher i sur., 2013).

1.3. Traženje bioaktivnog mjesta

Bioaktivna mjesta, *eng.* hot spots, su u općenitom smislu mjesta većeg interesa, aktivnosti ili popularnosti (www.blopig.com). Kada je riječ o PPI hot spots su mjesta na proteinu gdje će se s najvećom vjerojatnošću dogoditi vezanje zbog minimizacije slobodne energije. Eksperimentalne predikcije su financijski i vremenski i dalje jako zahtjevne pa se stoga više oslanja na računalne metode (Young, 2009).

1.3.1. Hidrofobni profil

Informaciju o tome gdje se nalaze bioaktivna mjesta može dati hidrofobni profil proteina. Ova je metoda naročito važna pri izradi vakcina (Tong i sur., 2013). Hidrofobnost se računa uz pomoć kliznog prozora, *eng.* sliding window, s fiksim neparnim brojem aminokiselina, uzduž

proteinske sekvence (Štambuk i sur., 2014, Štambuk i sur., 2019). Ne postoji egzaktna metoda za određivanje širine prozora, već se to mora raditi metodom pokušaja i pogreške. Na središnjoj poziciji tog prozora, na grafu se crta prosječna hidrofobnost svih aminokiselina unutar prozora (Štambuk i sur., 2014, Štambuk i sur., 2019). Objavljeno je nekoliko ljestvica hidrofobnosti različitih autora, a najpoznatija je Kyte-Doolittle ljestvica. Među poznatijima ljestvicama su još: Engelmanova, Eisenbergova, Hopp-Woods, Cornettova, Roseova i Janinova (Tablica 1).

Tablica 1. Usporedni prikaz različitih ljestvica hidrofobnosti koje se koriste za predikciju transmembranskih regija i antigenosti (preuzeto sa www.resources.qiagenbioinformatics.com).

aa	aminokiselina	Kyte-Doolittle	Hopp-Woods	Cornette	Eisenberg	Rose	Janin	Engelman
A	Alanin	1,80	-0,50	0,20	0,62	0,74	0,30	1,60
C	Cistein	2,50	-1,00	4,10	0,29	0,91	0,90	2,00
D	Asparaginska kiselina	-3,50	3,00	-3,10	-0,90	0,62	-0,60	-9,20
E	Glutaminska kiselina	-3,50	3,00	-1,80	-0,74	0,62	-0,70	-8,20
F	Fenilalanin	2,80	-2,50	4,40	1,19	0,88	0,50	3,70
G	Glicin	-0,40	0,00	0,00	0,48	0,72	0,30	1,00
H	Histidin	-3,20	-0,50	0,50	-0,40	0,78	-0,10	-3,00
I	Izoleucin	4,50	-1,80	4,80	1,38	0,88	0,70	3,10
K	Lizin	-3,90	3,00	-3,10	-1,50	0,52	-1,80	-8,80
L	Leucin	3,80	-1,80	5,70	1,06	0,85	0,50	2,80
M	Metionin	1,90	-1,30	4,20	0,64	0,85	0,40	3,40
N	Asparagin	-3,50	0,20	-0,50	-0,78	0,63	-0,50	-4,80
P	Prolin	-1,60	0,00	-2,20	0,12	0,64	-0,30	-0,20
Q	Glutamin	-3,50	0,20	-2,80	-0,85	0,62	-0,70	-4,10
R	Arginin	-4,50	3,00	1,40	-2,53	0,64	-1,40	-12,3
S	Serin	-0,80	0,30	-0,50	-0,18	0,66	-0,10	0,60
T	Treonin	-0,70	-0,40	-1,90	-0,05	0,70	-0,20	1,20
V	Valin	4,20	-1,50	4,70	1,08	0,86	0,60	2,60
W	Triptofan	-0,90	-3,40	1,00	0,81	0,85	0,30	1,90
Y	Tirozin	-1,30	-2,30	3,20	0,26	0,76	-0,40	-0,70

Ova se ljestvica koristi za detekciju hidrofobnih regija proteina. One regije koje imaju pozitivnu vrijednost su hidrofobne. Ta se ljestvica može koristiti i za površinske regije, kao i za transmembranske regije, ovisno o veličini prozora koji se koristi. Kraći prozori, veličine između pet i sedam, koriste za površinski izložene regije, a veliki prozori, veličine 19-21 su pogodni za transmembranske domene, ukoliko su izračunate vrijednosti iznad 1,6 (Tong i sur., 2013).

1.3.2. Rezonancijski model prepoznavanja

Jedna od popularnijih heurističkih metoda za određivanje bioaktivnih mjesta je rezonancijski model prepoznavanja, *eng.* Resonant Recognition Model (RRM). Metoda se temelji na spoznaji da su određene frekvencije, unutar distribucije delokaliziranih elektrona duž proteina, ključne za biološku funkciju proteina te za njegovu interakciju s drugim proteinima ili molekulama (Veljković i Slavić, 1972).

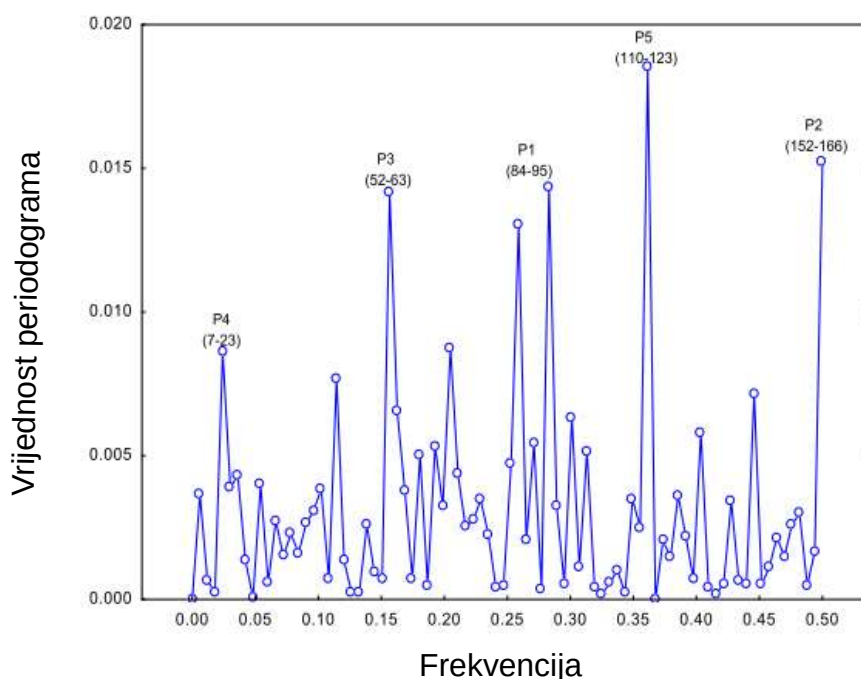
RRM omogućava izračunavanje spektralnih karakteristika koje odgovaraju distribuciji energije duž proteina (Ćosić, 1997). RRM je zapravo fizikalni i matematički model koji koristi signalnu analizu za interpretaciju linearne informacije sadržane u makromolekulskim sekvencama. Svi proteini mogu se smatrati linearnim sekvencama njihovih gradivnih elemenata, odnosno aminokiselina. RRM metoda interpretira tu linearnu informaciju transformiranjem proteinske sekvence u brojčanu te zatim u frekvencije, uz pomoć metoda za digitalno procesuiranje signala. To se odvija u dva koraka.

Prvi je korak metoda informacijskog spektra, *eng.* Information Spectrum Method (ISM), i uključuje transformaciju aminokiselinske sekvence proteina u brojčane serije. Svaka aminokiselina se opisuje uz pomoć elektron-ion interakcijske vrijednosti pseudopotencijala (Tablica 2), *eng.* electron-ion interaction pseudopotential value (EIIP). Rezultirajuća brojčana sekvenca predstavlja prosječno energetska stanje svih valentnih elektrona uzduž proteinske molekule.

Tablica 2. EIIP vrijednosti pojedinačnih aminokiselina koje se koriste u rezonantnom rekognicijskom modelu (Ćosić, 1997).

aa	aminokiseline	EIIP (Ry)	aa	aminokiseline	EIIP (Ry)
A	Alanin	0,0373	M	Metionin	0,0823
C	Cistein	0,0829	N	Asparagin	0,0036
D	Asparaginska kiselina	0,1263	P	Prolin	0,0198
E	Glutaminska kiselina	0,0058	Q	Glutamin	0,0761
F	Fenilalanin	0,0946	R	Arginin	0,0959
G	Glicin	0,0050	S	Serin	0,0829
H	Histidin	0,0242	T	Treonin	0,0941
I	Izoleucin	0,0000	V	Valin	0,0057
K	Lizin	0,0371	W	Triptofan	0,0548
L	Leucin	0,0000	Y	Tirozin	0,0516

Drugi korak je spektralna analiza dobivenih brojčanih serija uz pomoć Fourierove transformacije, *eng.* Fast Fourier Transform (Ćosić i sur., 1997; Štambuk i sur., 2014). Na Slici 1 prikazan je primjer Fourierove analize eritropoetina nakon dodjele EIIP svakoj aminokiselini.



Slika 1. Jednospektralna (Fourierova) analiza eritropoetina nakon dodjeljivanja EIIP svakoj aminokiselini. Frekvencija je broj ciklusa po opzervaciji, a periodogramska vrijednost se računa prema formuli navedenoj u radu. Pet dominantnih frekvencijskih pikova odgovara imunogeničnim djelovima P1-P5 molekule eritropoetina (Štambuk i sur., 2014).

1.4. Teorija molekularnog prepoznavanja

Izrada komplementarnih peptida, to jest peptida koji će se vezati na bioaktivno mjesto na selektivan način i s dovoljno visokim afinitetom, moguća je uporabom različitih računalnih metoda. Jedan od heurističkih algoritama koji to omogućavaju je teorija molekularnog prepoznavanja, *eng.* Molecular Recognition Theory (MRT). Ona se zasniva na tome da se peptidi kodirani komplementarnim RNA kodonima međusobno vezuju specifičnije i efikasnije nego s peptidima koji nisu kodirani komplementarnim kodonom (Blalock i Bost, 1986; Blalock, 1995; Root-Bernstein, 2005). Do sada je ta teorija provjerena na više od pedeset različitih sustava liganda i akceptora.

Dvije glavne karakteristike modeliranja antisens peptida temeljenog na standardnom genetičkom kodu su:

- (1) težnja za suprotnim obrascem polarnosti antisens peptida u odnosu na strukturu sens peptida

(2) različiti broj antisens peptida ovisno o smjeru transkripcije mRNA ($3' \rightarrow 5'$ / $5' \rightarrow 3'$) (Tablica 3) (Štambuk i sur., 2014).

Tablica 3. Znatno više antisens aminokiselina se dobiva transkripcijom mRNA kodona u $5' \rightarrow 3'$ nego u $3' \rightarrow 5'$ smjeru (Štambuk i sur., 2014).

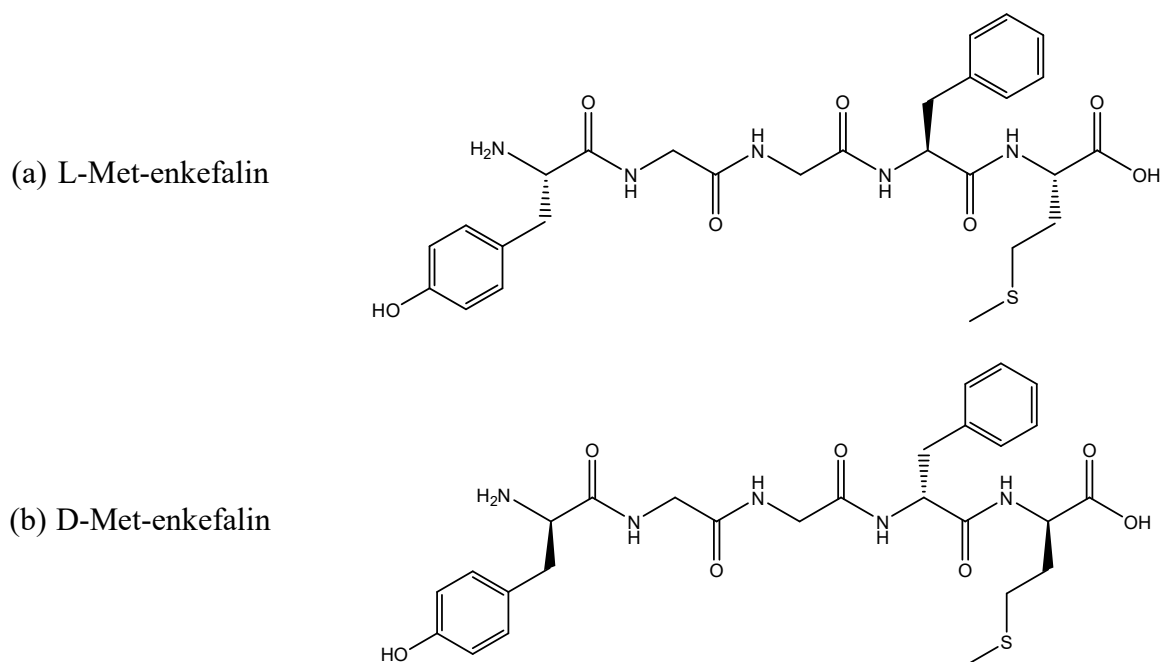
Aminokiselina	Antisens $3' \rightarrow 5'$	Antisens $5' \rightarrow 3'$
F	K	K, E
L	D, E, N	E, Q, K
I	Y	N, D, Y
M	Y	H
V	H, Q	H, D, N, Y
S	S, R	G, R, T, A
P	G	G, W, R
T	W, C	G, S, C, R
A	R	R, G, S, C
Y	M, I	I, V
H	V	V, M
Q	V	L
N	L	I, V
K	F	F, L
D	L	I, V
E	L	L, F
C	T	T, A
W	T	P
R	A, S	A, S, P, T
G	P	P, S, T, A

Korištenjem Tablice 3 moguće je konstruirati različite peptidne ligande koji pokazuju afinitet prema peptidnom akceptoru. Uporabom fluorescentne spektroskopije moguće je brzo, jednostavno i jeftino provjeriti učinkovitost vezanja liganda na akceptor. Jedan od važnih tehničkih detalja u konstrukciji liganda jest njegov hidrofobni profil jer pretjerano hidrofobne molekule zbog slabe topljivosti često pokazuju i slabu bioaktivnost.

1.5. Met-enkefalin

Met-enkefalin evolucijski je očuvan endogeni opioidni pentapeptid aminokiselinskog slijeda YGGFM (Plotnikoff i sur., 1997, Zagon i sur., 2002). Njegov prirodni L-enantiomer (Slika 2a) pokazuje protektivna svojstva u tkivima i organima u različitim *in vivo* modelima: eksperimentalni alergijski encefalomijelitis, histaminom inducirana bronhokonstrikcija, anafilaktički šok, hepatotoksičnost inducirana acetaminofenom te brojni drugi (Plotnikoff i sur., 1997, Zagon i sur.,

2002). Njegov D-enantiomer karakteriziran je kiralnom inverzijom na pozicijama 1, 4 i 5 L-aminokiselinske sekvence (Slika 2b).



Slika 2. Struktura L-Met-enkefalina (a) i D-Met-enkefalina (b).

Met-enkefalin nastaje cijepanjem dviju peptidnih molekula: proopiomelanokortina (POMC) i proenkefalina (Barrett i sur., 2019). Cijepanjem POMC-a nastaje jedna molekula met-enkefalina, dok cijepanjem proenkefalina nastaju četiri molekule met-enkefalina. Ova se molekula definira kao opioidni peptid sa sposobnošću modulacije nocicepcije (Barrett i sur., 2019). Različita istraživanja uglavnom povezuju met-enkefalin s δ -opioidnim receptorima (Zagon i sur., 2002).

Također, met-enkefalin se po nekim autorima može definirati i kao citokin s nizom učinaka na imunosni sustav (Plotnikoff i sur., 1997; Scharrer i sur., 1994; Štambuk i sur., 1998). Imunomodulatorni učinci met-enkefalina su istraživani na različitim modelima, pri čemu je uočeno značajno smanjenje migracije upalnih stanica (limfociti i polimorfonuklearni leukociti) u upalno područje i posljedično smanjenje oslobađanja medijatora upale te stanične apoptoze (Moore, 1984; Ficher i sur., 1990).

Istraživan je i utjecaj met-enkefalina na proliferaciju čitavog niza tkiva i stanica u *in vivo* i *in vitro* modelima. Tako je istraživan učinak na neurone i glija stanice, retinu, miokardne i epikardne stanice, i čitav niz neoplazmi (Plotnikoff i sur., 1997; Scharrer i sur., 1994; Štambuk i sur., 1998; Moore, 1984; Ficher i sur., 1990; Zagon i sur., 2002). Budući da bi met-enkefalin mogao biti regulator rasta čitavog niza normalnih i neoplastičnih tkiva za njega se sve češće koristi naziv

opioidni faktor rasta (Zagon i sur., 2002). Štoviše, izoliran je i kloniran receptor preko kojeg bi met-enkefalin/opioidni faktor rasta ostvarivao svoj učinak na rast tkiva (Zagon i sur., 2002).

Visoki terapijski indeks met-enkefalina, njegova učinkovitost u većem broju eksperimentalnih modela upale te detaljno istraжена farmakokinetika i toksikologija čine ga pogodnim kandidatom za humana klinička ispitivanja kod različitih upalnih i imunoloških oboljenja (Plotnikoff i sur., 1997; Scharrer i sur., 1994).

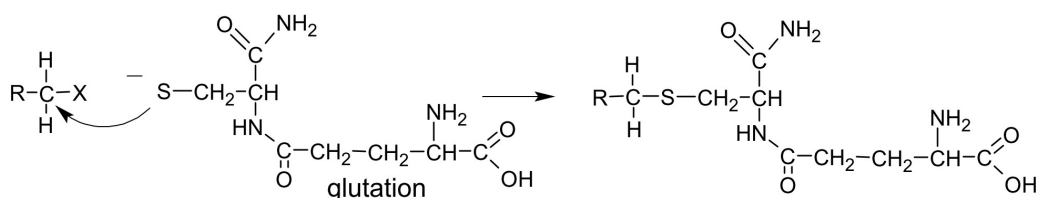
1.6. Oštećenje jetre paracetamolom

Protektivni učinak D-Met-enkefalina, te poništavanje njegovog učinka antisens peptidom, ispitivani su na modelu hepatotoksičnosti inducirane paracetamolom. Ovo je klasični model za probir hepatoprotektivnih spojeva, vrlo pogodan zbog relativne jednostavnosti i reproducibilnosti. Model je također pogodan za istraživanje spojeva s potencijalnim protuupalnim učinkom, jer je nekroza jetre uzrokovana paracetamolom praćena jakim sterilnim upalnim odgovorom.

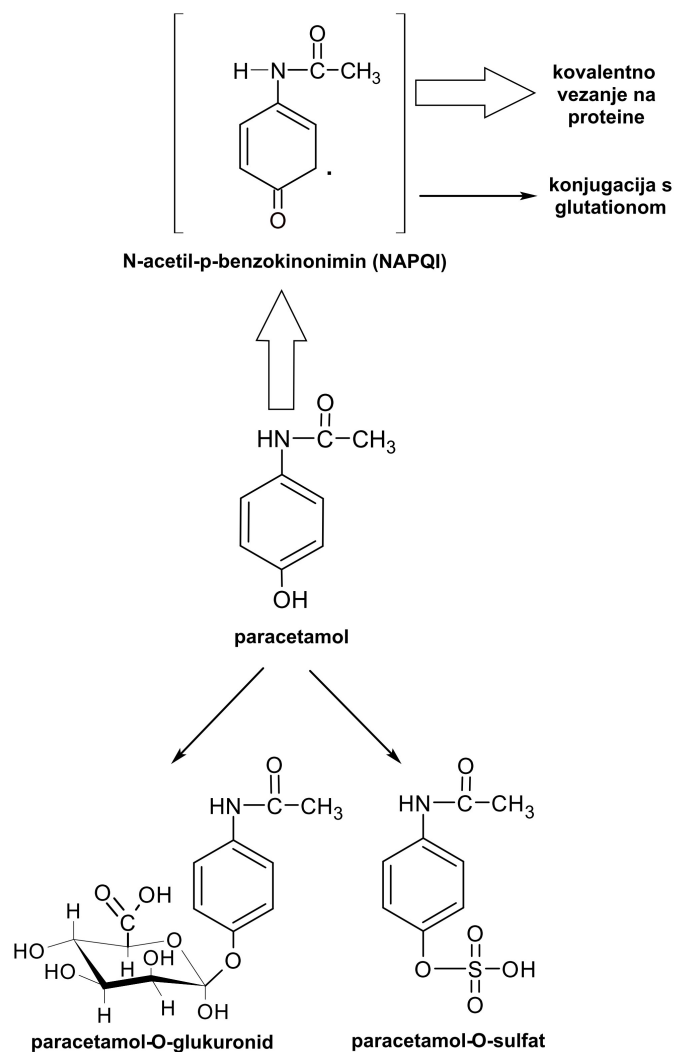
Paracetamol je aktivni metabolit fenacetina i acetanilida, a pripada skupini paraaminofenolskih spojeva (McEvoy i sur., 2008). Uvršten je u nesteroidne protuupalne lijekove te posjeduje snažno antipiretsko, analgetsko i vrlo slabo protuupalno djelovanje.

Metabolizam paracetamola primarno se odvija u jetri gdje se 90-95% paracetamola prevodi u netoksične metabolite. Ostatak paracetamola (5-10%) se oksidira uz pomoć citokrom P450 enzima u reaktivne, toksične, metabolite (Brunton i sur., 2008).

Glavni toksični metabolit koji tako nastaje je N-acetil-p-benzokinonimin (NAPQI). Količine NAPQI koje nastaju pri pravilnom doziranju paracetamola su niske pa se uspješno detoksicira ireverzibilnom konjugacijom sa sulfhidrilnim skupinama ili glutationom (Slika 3 i Slika 4), uz stvaranje netoksičnih konjugata s cisteinom i merkapturinom kiselinom (Nelson i Bruschi, 2007).



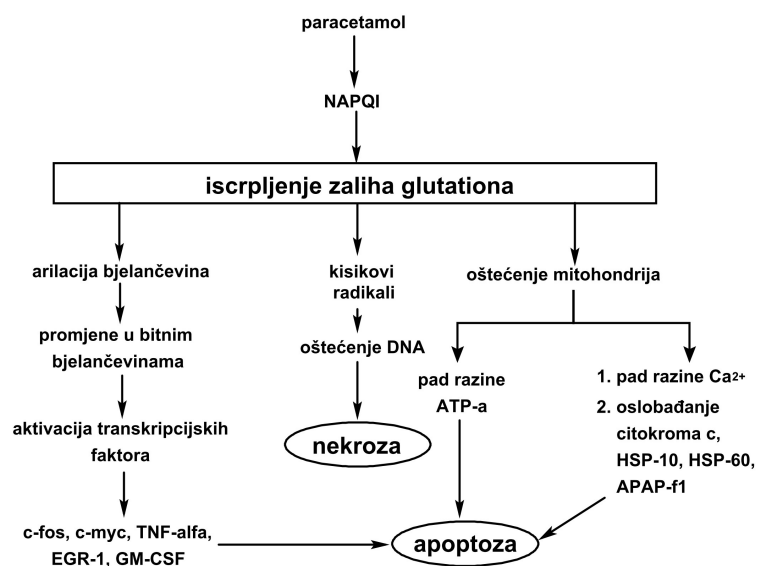
Slika 3. Tripeptid glutation predstavlja glavnu obranu od napada elektrofilnih spojeva, a njegovo iscrpljenje je ključan događaj u oštećenju jetre paracetamolom (Timbrell, 2009).



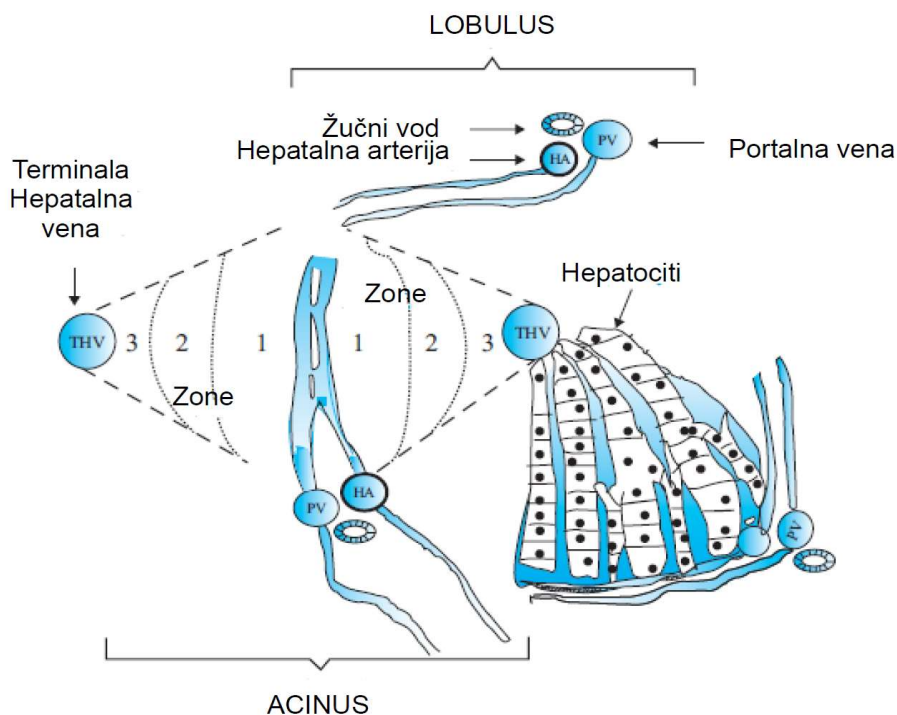
Slika 4. Kemijska struktura paracetamola i njegovih glavnih metabolita kod predoziranja (Nelson i Bruschi, 2007).

Kada količina NAPQI nadmaši količinu u jetri raspoloživog glutationa, ostatak se kovalentno veže na bitne intracelularne molekule, uzrokujući smrt hepatocita (Slika 5). Oštećenje jetre paracetamolom je najčešće oštećenje jetre lijekovima, te predstavlja značajan kliničko medicinski problem (McEvoy i sur., 2008).

Osnovna histološka jedinica jetre jest jetreni acinus, koji je organiziran oko terminalnih ogranaka portalne vene i hepatalne arterije (Slika 6). Unutar acinusa postoje tri zone: zona I koja se nalazi uz terminalne ogranke hepatalne arterije, zona III uz terminalne ogranke hepatalne vene i intermedijalna zona II između njih. Karakteristika otrovanja paracetamolom je nekroza u zoni III koja ima najveću koncentraciju citokroma P2E1 i najmanju koncentraciju glutationa. (Lee i sur., 2007).



Slika 5. Glavni mehanizmi toksičnosti u paracetamolnom modelu oštećenja tkiva jetre. Preuzeto i prilagođeno prema Timbrell, 2009.



Slika 6. Osnovni elementi građe jetrenog acinusa. Preuzeto i prilagođeno prema Lee i sur., 2007.

2. CILJEVI RADA

Naše spoznaje o PPI relativno su ograničene, a eksperimentalne metode za njihovo proučavanje kompleksne, spore i skupe. Zbog toga je cilj rada prikazati takozvane heurističke računalne metode za određivanje bioaktivnih područja u proteinima, te heurističke metode za određivanje interakcije determiniranih područja s drugim proteinima (Root-Bernstein, 2005; Štambuk i sur., 2014). Jedna od metoda, teorija molekularnog prepoznavanja bit će praktično primijenjena, tako da će uporabom komplementarnoga peptida IPPKY (Štambuk i sur., 2014), konstruiranog njenom primjenom, u biološkom eksperimentalnom modelu biti poništen učinak peptida D-met-enkefalina.

2.1. Hipoteze

1. Metodom fluorescentne spektroskopije moguće je brzo i jednostavno utvrditi da li se antisens peptid IPPKY, izrađen uporabom teorije molekularnog prepoznavanja, veže uz akceptorski protein (D enantiomer met-enkefalina), te kvantificirati afinitet vezanja.
2. U *in vivo* pokusu moguće je utvrditi poništava li antisens peptid IPPKY biološke učinke akceptorskog proteina.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

Za pokus su korišteni mužjaci miševa soja CBA, uzgoj Instituta Ruđer Bošković. Tjelesna masa životinja bila je u rasponu 20-25 g, a starost 12 tjedana. Istraživanja su provedena u skladu s odredbama „Zakona o zaštiti životinja“ (Narodne novine 135/2006) uz odobrenja Bioetičkog povjerenstva Instituta Ruđer Bošković, Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja RH (Uprava za veterinarstvo) i Ministarstva znanosti, tehnologije i športa RH. Životinje su držane u kavezima od po 8 jedinki, poštivajući standardne laboratorijske uvjete koji uključuju osvjetljenje u ciklusu svjetlo-tama od po 12 sati te konstantnu temperaturu prostora (22 ± 1 °C).

3.2. Materijali

U pokusu su korištene sljedeće kemikalije:

- fenobarbital (Pliva, Zagreb, Hrvatska).
- paracetamol čistoće > 99% (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA).
- 0,9% NaCl (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb, Hrvatska).
- L-met enkefalin, mase 573,66 i čistoće više od 99% (GenScript, USA).
- D-met-enkefalin, molekularne mase 573,66 i čistoće više od 99% (GenScript, USA).
- Antisens peptid IPPKY, molekularne mase 802,96 i čistoće više od 99% (GenScript, USA).
- Heparin 5000 IU/mL (Belupo, Koprivnica, Hrvatska).

3.3. Spektroskopska analiza

Strukture L- i D-enantiomera met-enkefalina uspoređene su uporabom cirkularne dikroizmatске (CD) spektroskopije (Fisher i Arnold, 2013). Korišteni uređaj je bio Jasco J-815 CD spektropolarimetar (Jasco Inc., Easton, MD, USA). Koncentracija oba peptida prilikom mjerenja bila je 1 mg na 0,5 mL. Za otapanje peptida korišten je fosfatni pufer pH vrijednosti 7,4, a mjerenja su obavljena pri temperaturi od 25 °C.

Interakcija komplementarnog peptida IPPKY s L- i D- enantiomerima met-enkefalina analizirana je uporabom fluorescentne spektroskopije (FS) (Fisher i Arnold, 2013). Korišteni aparat je OLIS RSM 1000F spektrofluorimetar (Bogart, Georgia, USA). Mjerenja su obavljena pri temperaturi od 25 °C, te uz ekscitacijsku valnu duljinu od 290 nm. Korišteno je osam koncentracija D enantiomera met-enkefalina: 2,5 μM, 25 μM, 50 μM, 100 μM, 200 μM, 300 μM. Koncentracija IPPKY peptida bila je 2,5 μM. Dobiveni podatci analizirani su uporabom Specfir programa. FS

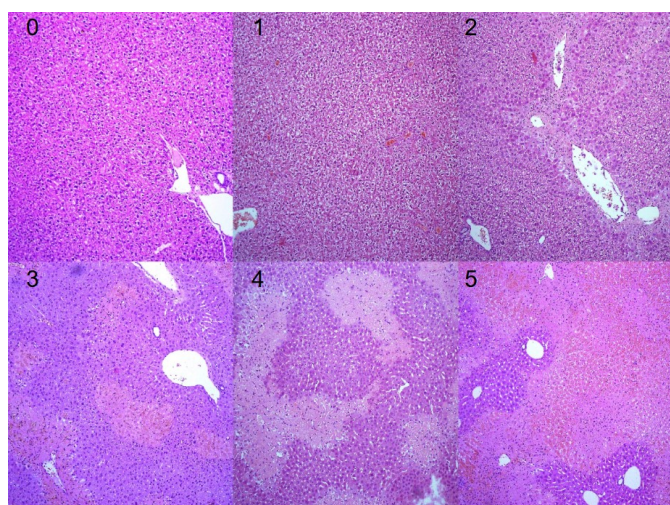
opisuje vezanje antisens-sens peptida izračunavanjem konstante disocijacije (K_d). Iz konstante disocijacije se potom izračunava afinitet, s time da je afinitet recipročna vrijednost konstante disocijacije.

3.4. Mjerenje razine hepatotoksičnosti

Razina hepatotoksičnosti mjerena je pomoću tri skupine parametara: (1) biokemijski parametri, to jest aktivnost jetrenih enzima alanin aminotransferaza (ALT) i aspartat aminotransferaza (AST); (2) patohistološko bodovanje stupnja nekroze jetre; (3) broj uginulih životinja.

Aktivnost jetrenih enzima ALT i AST određivana je pomoću Olympus AU® 400 analizatora (<http://www.clearchemdiagnostics.com/au-series.html>), uporabom standardnih AST-OSR6109 i ALT-OSR6107 reagensa (Blagaić i sur., 2010). Petnaest minuta prije žrtvovanja miševima je intraperitonealno dat heparin (250 I), a krv je prikupljena iz vratnih krvnih žila u heparinizirane tube. Poslije centrifugiranja (5 minuta na 8000 g), plazma je odvojena i pohranjena na -20 °C do određivanja (Blagaić i sur., 2010).

Uzorci tkiva jetre fiksirani su u 10% formalinu s fosfatnim puferom te uklopljeni u parafin. Za svaku jetru napravljena su tri uzorka, koja su narezana na šest presjeka debljine 3 µm, te obojana s hemalaun-eozinom (HE). Obojani presjeci su potom pregledavani na svjetlosnom mikroskopu (×100). Stupanj nekroze je bodovan na ljestvici od 0-5: 0 = nema nekroze; 1 = minimalne lezije (pojedinačne nekrotične stanice); 2 = manje lezije (10% do 25% nekrotičnih stanica ili blaže difuzne degenerativne promjene); 3 = umjerene lezije (25% do 40% nekrotičnih stanica); 4 = jake lezije (40% do 50% nekrotičnih lezija); 5 = teške lezije (više od 50% nekrotičnih lezija). Praktični primjeri bodovanja oštećenja tkiva jetre prikazani su na slici 7. Završni bod za svaku jetru je izračunat kao konsenzus bod svih pregledanih presjeka (Silva i sur., 2001) .



Slika 7. Praktični primjeri bodovanja oštećenja tkiva jetre na ljestvici od 0 do 5 (Silva i sur., 2001).

Bodovi nekroze jetre prikazani su tabelarno kao minimum, prva kvartila (Q1), medijan, treća kvartila (Q3), te maksimum. Podaci na grafikonima izraženi su kao medijan i interkvartilni raspon (IQR) koji je izračunat po formuli: $IQR = Q3 - Q1$.

3.5. Eksperimentalni protokol

Tijekom 7 dana miševima se, umjesto vode za piće, davala otopina fenobarbitala u koncentraciji 300 mg/L vode. Svrha fenobarbitala je inducirati jetrene metaboličke enzime kako bi se postigao snažniji i ujednačeniji odgovor na paracetamol (Čulo i sur., 1995). Prije indukcije oštećenja jetre paracetamolom, kako bi se izbjegao utjecaj hrane na apsorpciju, miševi su 24 h bili stavljeni na gladovanje, uz slobodan pristup vodi za piće. Paracetamol je administriran intragastrički (i.g.), u dozi od 150 mg/kg, otopljen u 0,9 % NaCl, temperature 37 °C, putem intragastričke sonde, u volumenu od 0,5 mL (Guarner i sur., 1988). Miševi su dobili pristup hrani 4 h poslije administracije paracetamola. Životinje spontano uginule prije uzimanja uzoraka krvi i tkiva jetre bile su isključene iz analize. Ispitivani spojevi (D-met enkefalin i antisens peptid IPPKY), otopljeni u fiziološkoj otopini, su administrirani intraperitonealno (i.p.) 60 minuta prije paracetamola. Miševi su žrtvovani 24 sata poslije aplikacije paracetamola. 15 minuta prije žrtvovanja životinjama je dat heparin (250 IU) intraperitonealno, a krv je prikupljana u heparinizirane tube. Tvari korištene u pokusu, njihove doze, način administracije, kao i vremenski aspekti, navedeni su u Tablici 4.

Tablica 4. Ispitivani spojevi, njihove doze, broj životinja u eksperimentalnoj skupini (n), način administracije, i vremenski raspored postupaka.

-7 dana, svakodnevno	-60 minuta	0 h	+ 24 h
fenobarbital u vodi za piće (300 mg/L vode)	kontrola (n = 8) (0,9% NaCl i.p.)	paracetamol (150 mg/kg i.g.)	žrtvovanje
fenobarbital u vodi za piće (300 mg/L vode)	D-met-enkefalin (n = 8) (0,5 mg/kg i.p.)	paracetamol (150 mg/kg i.g.)	žrtvovanje
fenobarbital u vodi za piće (300 mg/L vode)	D-met-enkefalin (n = 8) (5 mg/kg i.p.)	paracetamol (150 mg/kg i.g.)	žrtvovanje
fenobarbital u vodi za piće (300 mg/L vode)	D-met-enkefalin (n = 8) (20 mg/kg i.p.)	paracetamol (150 mg/kg i.g.)	žrtvovanje
fenobarbital u vodi za piće (300 mg/L vode)	D-met-enkefalin (n = 8) (50 mg/kg i.p.)	paracetamol (150 mg/kg i.g.)	žrtvovanje
fenobarbital u vodi za piće (300 mg/L vode)	antisens peptid IPPKY (n = 8) (15 mg/kg i.p.)	paracetamol (150 mg/kg i.g.)	žrtvovanje

3.6. Statistička analiza

Statistička analiza i izrada grafikona načinjeni su uporabom statističkih programa GraphPad Prism verzija 6 (<https://www.graphpad.com/>), te Kyplot verzija 6,02 (<https://www.kyenslab.com/en-us/>). Aktivnosti enzima ALT i AST su prikazane kao aritmetička sredina, medijan i standardna devijacija. Usporedba s kontrolnom skupinom obavljena je pomoću Steelova testa (Rowe, 2007). Steelov test je neparametrijski test višestruke usporedbe, vrlo robustan na odstupanja od Gaussove raspodjele. Test posjeduje veliku snagu, to jest sposobnost da otkrije razliku između skupina ako ona postoji, istodobno umanjujući vjerojatnost lažno pozitivnih rezultata jer uspoređuje testne skupine samo s kontrolom, a ne i testne skupine međusobno. Ne zahtijeva prethodnu uporabu Kruskal-Wallis testa. Broj spontano uginulih životinja analiziran je uporabom Fisherovog testa (Rowe, 2007). P vrijednosti su smatrane statistički signifikantnima ukoliko im je vrijednost bila $\leq 0,05$ (Rowe, 2007).

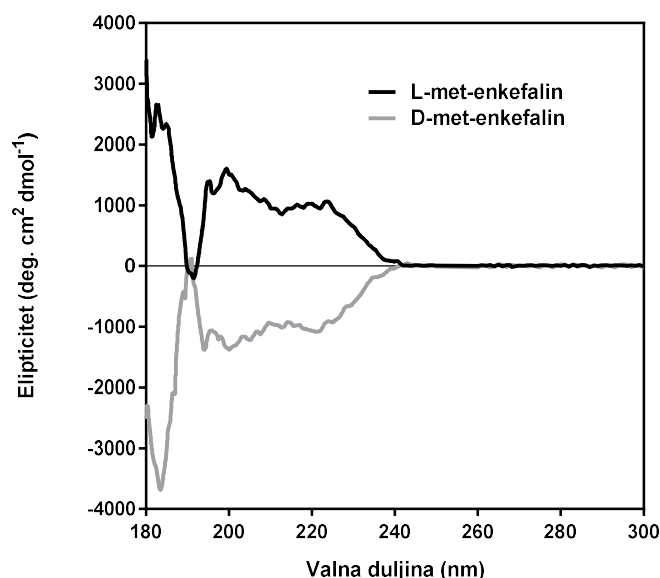
4. REZULTATI

4.1. Rezultati spektroskopskih analiza

4.1.1. Cirkularna dikroizmatska (CD) spektroskopija

Slika 8 prikazuje rezultate CD spektroskopije, pri čemu se uočava zrcalna slika. To upućuje da L i D- enantiomeri met-enkefalina imaju iste strukture, ali zakreću polariziranu svjetlost u različitom smjeru.

Važan dio strukture oba enantiomera je dipeptid G-G (pozicije 2 i 3), pri čemu treba uzeti u obzir da je glicin akiralna aminokiselina. Rezultati CD spektroskopije upućuju da funkcionalne skupine aminokiselina na pozicijama 1 (Y) te 4 i 5 (FM) imaju sličan prostorni raspored u oba enantiomera, s time da su rotirane u odnosu na glicin-glicin par. Zbog toga se može očekivati i sličnost u vezanju oba enantiomera.

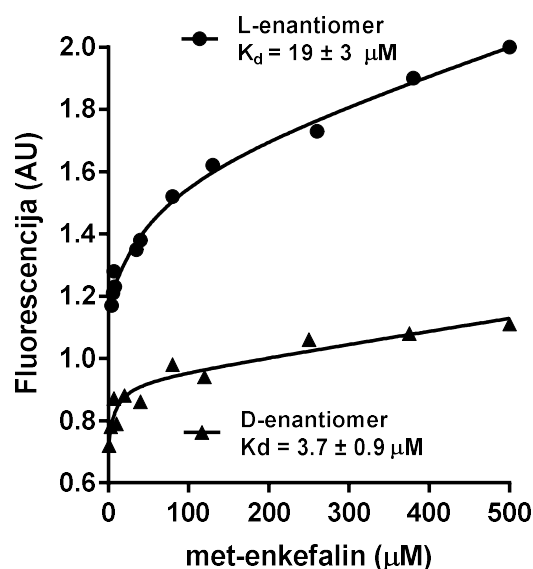


Slika 8. Analiza L- i D-met-enkefalina pomoću cirkularne dikroizmatske spektroskopije.

4.1.2. Fluorescentna spektroskopija (FS)

Najvažniji rezultat FS jest podatak da se komplementarni peptid IPPKY veže uz L- i D-met-enkefalin u omjeru 1:1.

FS omogućava izračunavanje disocijacijske konstante (K_d), koja za L- enantiomer iznosi $19 \pm 3 \mu\text{M}$, dok je za D-enantiomer određena K_d od $3,7 \pm 0,8 \mu\text{M}$. Iako je vrijednost K_d D-enantiomera niža, što upućuje na nešto veći afinitet vezanja za komplementarni peptid, obje su vrijednosti u vrlo sličnim mikromolarnim vrijednostima.



Slika 9. Analiza vezanja komplementarnog peptida L-IPPKY za L- i D-met-enkefalin pomoću fluorescentne spektroskopije.

4.2. Jetreni enzimi

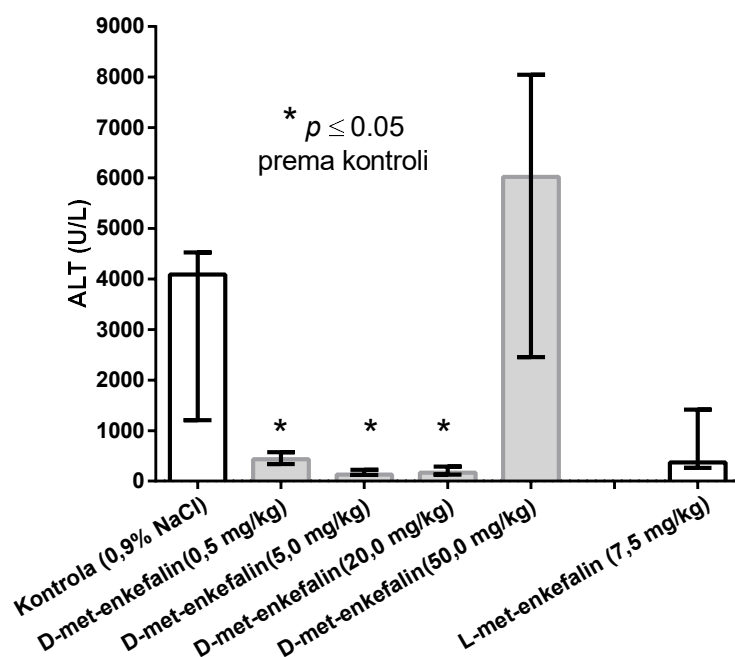
4.2.1. ALT

Tablica 5 i Slika 10 prikazuju izmjerene vrijednosti aktivnosti enzima ALT (U/L) 24 sata po aplikaciji paracetamola.

Tablica 5. Deskriptivna statistika aktivnosti enzima ALT (U/L)

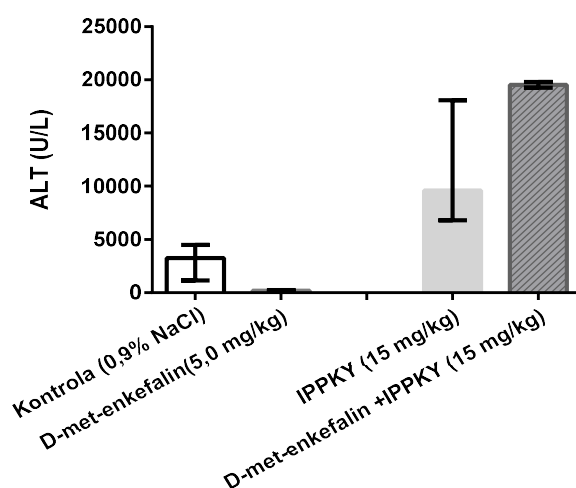
Skupina	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Medijan
Kontrola (0,9% NaCl)	3606,0	2221,0	4091
D-met-enkefalin (0,5 mg/kg)	458,4	107,0	436
D-met-enkefalin (5,0 mg/kg)	158,3	50,7	124
D-met-enkefalin (20,0 mg/kg)	196,6	81,69	169
D-met-enkefalin (50,0 mg/kg)	5406,0	3113,0	6020

Na slici 10 uočljiva je U-krivulja, tipična za peptide. Naime, s porastom doze peptida raste i učinak peptida, ali samo do određene mjere, kada njegov učinak počinje opadati ili čak prelaziti u suprotni smjer. Pretpostavlja se da pri velikim dozama dolazi do nespecifičnog vezanja na druge receptore, što može dovesti do štetnoga učinka. Iz U-krivulje je uočljivo da je najснаžнiji protektivni učinak bio pri dozi od 5 mg/kg, što je usporedivo s optimalnom dozom L-met-enkefalina (7,5 mg/kg) u istom eksperimentalnom modelu (Martinić i sur., 2014).



Slika 10. Vrijednosti ALT-a (U/L) za primijenjene doze D-izomera met-enkefalina, uspoređene s kontrolnom skupinom (0,9% NaCl). Podaci na grafu izraženi su kao medijan i interkvartilni raspon.

Slika 11 pokazuje rezultate poništavanja učinka optimalne doze D-met-enkefalina s antisens peptidom (IPPKY). Iz slike je uočljivo da antisens peptid potpuno poništava učinak doze D-met-enkefalina od 5 mg/kg, što se očituje enormnim porastom aktivnosti enzima ALT. Antisens peptid, sam po sebi, pokazuje povišene razine aktivnosti enzima ALT, što se može pripisati poništavanju učinka endogenog met-enkefalina.



Slika 11. Vrijednosti ALT-a (U/L) pri poništavanju protektivnog učinka najučinkovitije doze D-izomera met-enkefalina od 5,0 mg/kg s antisens peptidom IPPKY (15,0 mg/kg). Podaci na grafu izraženi su kao medijan i interkvartilni raspon.

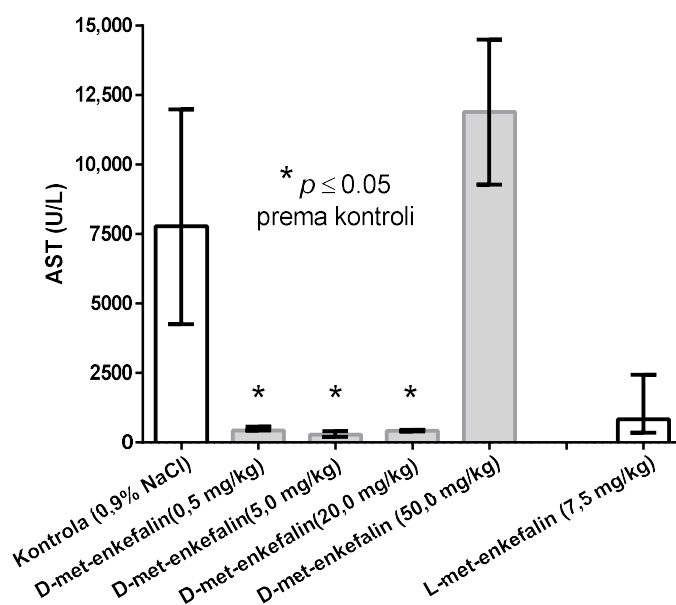
4.2.2. AST

Tablica 6 i Slika 12 prikazuju izmjerene vrijednosti aktivnosti enzima AST (U/L) 24 sata po aplikaciji paracetamola. Kao i kod enzima ALT, i ovdje se uočava U-krivulja, s time da se doza D-met-enkefalina od 5 mg/kg pokazala optimalnom. Obrazloženje oblika ove krivulje je isto kao i kod enzima ALT.

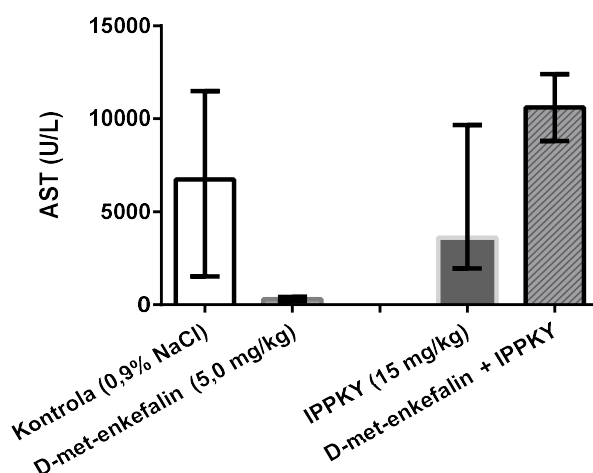
Tablica 6. Deskriptivna statistika aktivnosti enzima AST (U/L)

Skupina	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Medijan
Kontrola (0,9% NaCl)	7500,0	4284,00	7770
D-met-enkefalin (0,5 mg/kg)	486,3	77,18	435
D-met-enkefalin (5,0 mg/kg)	285,0	119,30	282
D-met-enkefalin (20,0 mg/kg)	430,7	50,21	413
D-met-enkefalin (50,0 mg/kg)	11884,0	2611,00	11180

Poništavanje protektivnog učinka doze od 5 mg/kg s antisens peptidom prikazano je na Slici 13. Iz nje se jasno uočava da antisens peptid IPPKY u potpunosti poništava protektivni učinak navedene doze D-Met-enkefalina, što se očituje kao enormni porast izmjerenih aktivnosti AST-a. I ovdje je uočljivo da antisens peptid sam po sebi dovodi do porasta aktivnosti AST-a, što se, kao i kod ALT-a, može obrazložiti blokadom endogenog met-enkefalina.



Slika 12. Vrijednosti AST-a (U/L) za primijenjene doze D-izomera met-enkefalina, uspoređene s kontrolnom skupinom (0,9% NaCl). Podaci na grafu izraženi su kao medijan i interkvartilni raspon.



Slika 13. Vrijednosti AST-a (U/L) pri poništavanju protektivnog učinka najučinkovitije doze D-izomera met-enkefalina od 5,0 mg/kg antisens peptidom IPPKY (15,0 mg/kg). Podaci na grafu izraženi su kao medijan i interkvartilni raspon.

4.3. Patohistološka analiza hepatotoksičnosti

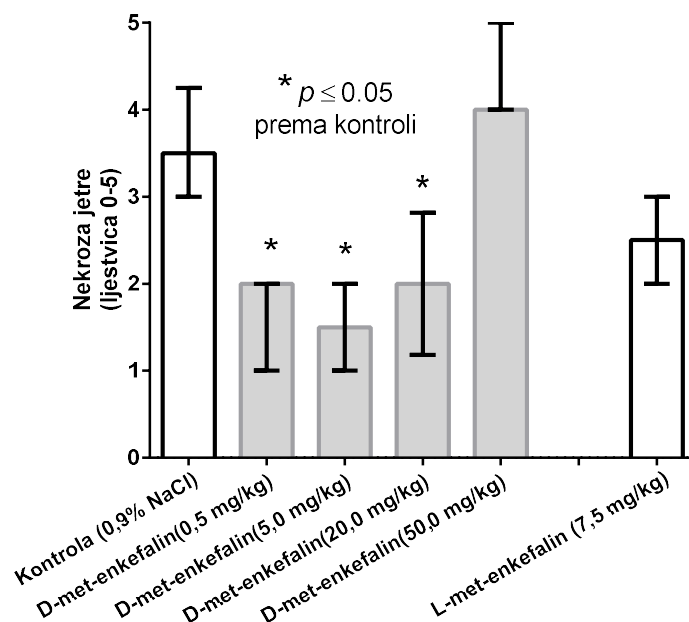
Patohistološka procjena stupnja nekroze tkiva jetre smatra se najboljim pokazateljem učinka neke tvari u paracetamolnom modelu. Stupanj nekroze jetre je određivan semikvantitativno na ljestvici od 0-5, a dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 7 i na Slici 14.

Tablica 7. Deskriptivna statistika bodova nekroze jetre (ljestvica od 0 do 5).

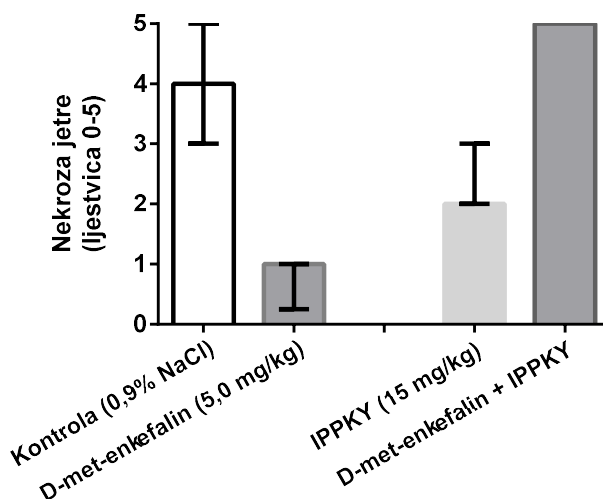
Skupina	Minimum	Q1	Medijan	Q3	Maksimum
Kontrola (0,9% NaCl)	3	3	3,5	4,25	5
D-met-enkefalin (0,5 mg/kg)	1	1	2	2	3
D-met-enkefalin (5,0 mg/kg)	1	1	1,5	2	2
D-met-enkefalin (20,0 mg/kg)	1	1	2	3	3
D-met-enkefalin (50,0 mg/kg)	3	4	4	5	5

Kao i kod aktivnosti enzima ALT i AST, i ovdje se uočava U-krivulja, s optimalnom dozom D-met-enkefalina od 5 mg/kg. Kod primjene ove doze medijan bodova nekroze je bio 1,5, s interkvartilnim rasponom od 1 do 2, dok je u kontrolnoj skupini medijan bodova nekroze bio 3,5 s interkvartilnim rasponom od 3 do 4,25. Budući da se bodovi nekroze veći od 3 smatraju težim oblikom nekroze, jasno je da doza D-met-enkefalina ima vrlo snažan protektivni učinak jer većina životinja u ovoj skupini ima manje od 3 boda, dok u kontrolnoj skupini većina životinja ima više od 3 boda.

Slika 15 pokazuje rezultate poništavanja protektivnog učinka s IPPKY peptidom. Iz slike je jasno da ovaj antisens peptid u potpunosti poništava protektivni učinak optimalne doze od 5 mg/kg.



Slika 14. Bodovi nekroze jetre (ljestvica 0-5) za primijenjene doze D-izomera met-enkefalina, uspoređene s kontrolnom skupinom (0,9% NaCl). Podaci na grafu izraženi su kao medijan i interkvartilni raspon.



Slika 15. Bodovi nekroze jetre (ljestvica 0-5) pri poništavanju protektivnog učinka najučinkovitije doze D-izomera met-enkefalina od 5,0 mg/kg antisens peptidom IPPKY (15,0 mg/kg). Podaci na grafu izraženi su kao medijan i interkvartilni raspon.

4.4. Preživljenje eksperimentalnih životinja

Rezultati preživljenja eksperimentalnih životinja prikazani su u Tablici 8. Oni pokazuju koliko je životinja spontano uginulo unutar 24 sata od aplikacije paracetamola. Iz tablice je uočljivo da je najbolje preživljenje imala skupina životinja tretirana s D-met-enkefalinom (5 mg/kg). Skupine tretirane s antisens peptidom, te skupina tretirana s kombinacijom antisens peptida i D-met-enkefalinom nisu se razlikovale od kontrolne skupine. Navedene dvije skupine su imale slabije preživljenje u odnosu na skupinu tretiranu s D-met-enkefalinom.

Tablica 8. Smrtnost eksperimentalnih životinja pri blokadi protektivnog učinka D-izomera met-enkefalina s antisens peptidom IPPKY.

Eksperimentalna skupina	Smrtnost	P vrijednost vs. kontrola	P vrijednost vs D-met-enkefalinu
Kontrola (0,9% NaCl)	3 / 8		
D-met-enkefalin (5 mg/kg)	0 / 8	0,080	
antisens peptid (15 mg/kg)	5 / 8	1,000	0,026
antisens peptid (15 mg/kg) + D-met-enkefalin (5 mg/kg)	6 / 8	0,610	0,007

4.5. Sažetak rezultata

D-met-enkefalin pokazuje protektivni učinak u paracetamolnom modelu oštećenja jetre. Rezultat je bio statistički signifikantan ($P \leq 0,05$) po tri kriterija: (1) aktivnost enzima ALT (U/L); (2) aktivnost enzima AST (U/L); (3) bodovi nekroze jetre (ljestvica 0-5). Četvrti parametar, preživljenje životinja, nije bio signifikantan ($P = 0,08$).

Učinak D-met enkefalina, pokazuje U-krivulju, s time da je optimalna protektivna doza iznosila 5 mg/kg.

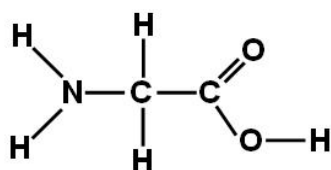
Antisens peptid IPPKY u potpunosti poništava protektivni učinak optimalne doze D-met-enkefalina.

5. RASPRAVA

Teorija molekularnoga prepoznavanja je testirana u ovome radu tako da je njenim korištenjem izrađen antisens (komplementarni) peptid IPPKY, koji je u biološkom pokusu poništio protektivni učinak D-enantiomera met-enkefalina (D-YGGFM) u paracetamolnom modelu oštećenja tkiva jetre.

Za konstrukciju antisens peptida korištena je Tablica 3, pri čemu su aminokiseline iz peptida YGGFM transformirane u antisens peptid IPPKY, tako da je uzet u obzir konsenzus antisens 3'→5' i antisens 5'→3 smjerova. Na primjer, amino kiselina Y se može transformirati u M i I (3'→5' smjer), odnosno I i V (5'→3). Po tome kriteriju odabrane su aminokiseline PPK kao komplementarne za aminokiseline GGF na pozicijama 2, 3 i 4. Za amino kiselinu M (pozicija 5) odabrana je amino kiselina Y kao komplementarna, jer po profilu hidrofobnosti više odgovara.

Strukturu IPPKY peptida moguće je vrlo brzo i jednostavno provjeriti uporabom cirkularne dikroizmatске spektroskopije. Doista, Slika 8 upućuje da se L- i D-enantiomeri met-enkefalina ponašaju kao zrcalne slike. Pri tome je bitno uočiti da se u sens peptidu (YGGFM) na pozicijama 2 i 3 nalazi aminokiselina G, koja je akiralna (Slika 16).



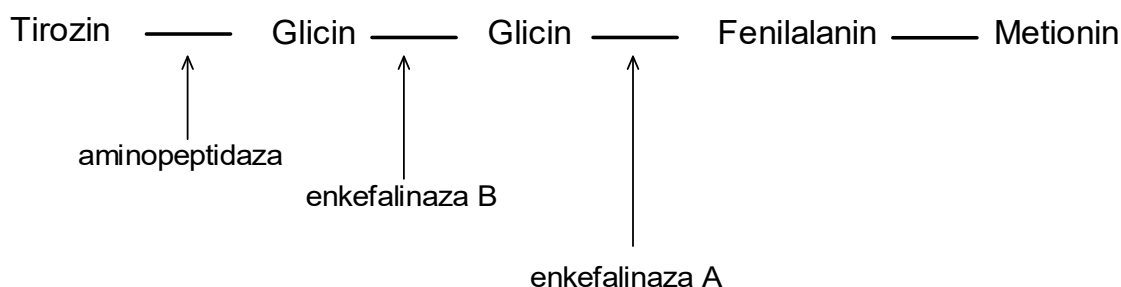
Slika 16. Aminokiselina glicin nije kiralna jer posjeduje dva vodikova atoma vezana za središnji ugljikov atom (Patrick, 2001).

Zbog toga se javlja zanimljiv fenomen, a to je da funkcionalne skupine u antisens peptidu mogu stupiti u interakciju i s L- i D-enantiomerom met-enkefalina zbog sličnog prostornog rasporeda. To je dokazano uporabom fluorescentne spektroskopije, pri čemu su uočene slične konstante disocijacije, odnosno afiniteta, za vezanje antisens peptida IPPKY na oba enantiomera met-enkefalina (Slika 9).

U biološkom pokusu utvrđeno je da D-enantiomer met-enkefalina ima isto ponašanje kao i L-enantiomer, što se očituje kao protektivni učinak. Krivulja međuodnosa doze i učinka pokazuje U-oblik koji je tipičan za peptidne agense. Naime, ako peptid posjeduje biološki, odnosno farmakološki učinak, onda učinak raste s porastom doze, ali samo do određene mjere. Kada se prijeđe određena doza peptida, dolazi do nespecifičnoga vezanja za druge akceptore što može

umanjiti protektivni učinak peptida ili čak dovesti do štetnih učinaka. Uočena U-krivulja upućuje na to da D-met-enkefalin ima upravo takav obrazac odnosa doze i učinka.

Optimalna doza D-enantiomera met-enkefalina u modelu oštećenja jetre paracetamolom jest 5 mg/kg, što je usporedivo s dozom od 7,5 mg/kg za L-enantiomer, dostupnom iz literature (Martinić i sur., 2014). Pri tome D-enantiomer ima čak nešto veći potencijal, vjerojatno zbog smanjene osjetljivosti na razgradnju zbog prisustva D-aminokiselina koje otežavaju učinak aminopeptidaze (cijepanje Y-G peptidnog veza), te enkefalinaze A (cijepanje G-F peptidnog veza) (Slika 17). Zbog toga D-enantiomer vjerojatno ima duže vrijeme poluživota, te protrahirani učinak (Barrett i sur., 2019).



Slika 17. Enzimi koji cijepaju met-enkefalin. Preuzeto i prilagođeno prema Barrett i sur., 2019.

Dobiveni rezultati spektroskopskih metoda i biološkoga pokusa pokazuju da je uporabom teorije molekularnoga prepoznavanja moguće brzo i jednostavno konstruirati antisens peptid koji će se specifično i s dovoljnim afinitetom vezati za svoj akceptor. Postupak ne zahtijeva posjedovanje skupih računalnih informacijskih sustava, već se može s minimalnom informatičkom infrastrukturom modelirati PPI. Pri tome treba uzeti tri osnovna ograničenja: (1) broj mogućih antisens peptida; (2) njihova topljivost; (3) farmakokinetika svojstva.

Prilikom konstrukcije antisens peptida moguće je dobiti više varijanti antisens peptida, čiji broj naglo raste s dužinom peptida i ovisno o aminokiselinskom sastavu. U takvim situacijama bilo bi idealno izraditi veći broj peptida te napraviti njihov probir po afinitetu, uporabom fluorescentne spektroskopije, i biološkom učinku s ciljem utvrđivanja odnosa strukture prema aktivnosti (Patrick, 2001).

Topljivost peptida bitno je područje jer nema smisla razvijati spoj sa slabom topljivošću. Naime, slabo topivi peptidi u principu pokazuju nisku biološku aktivnost. U probiru peptida pomažu različiti računalni programi koji vrlo precizno upućuju na topljivost peptida. Topljivost peptida bitna je i za postupak njegove sinteze jer je sinteza slabo topivih peptida spora i skupa. Prilikom izrade antisens peptida treba misliti i na njegovu farmakokinetiku. Slabo topivi lijekovi

teško se apsorbiraju i raspodjeljuju po tijelu (Patrick, 2001), tako da aminokiseline s većom topljivošću u vodenom mediju imaju prednost pred slabo topivim aminokiselinama.

Brzina razgradnje peptida često je čimbenik koji limitira njihov učinak. Jedna od strategija za usporavanje razgradnje je korištenje aminokiselina koje su povezane peptidnim vezama otpornim na razgradnju. Jedan od primjera je lispro inzulin, koji ima zamijenjene dvije aminokiseline (lizin i prolin na C-terminalnom kraju B-lanca), i duže vrijeme poluživota (Koivisto, 1998). Uporaba D-aminokiselina također spada u strategije za usporavanje razgradnje peptida (Domhan i sur., 2019).

Potvrđivanje ligand-akceptor sustava opisanim postupkom koji kombinira računalne i eksperimentalne postupke, nema samo teoretsko značenje već se može iskoristiti za izradu cijelog niza materijala. Na primjer, peptidni ligand može poslužiti za izradu nepeptidnog liganda koji oponaša peptid, i kojeg nazivamo peptidomimetik (Tamamura i sur., 2018). Konstruirani peptidomimetik može poslužiti kao startna osnovica za izradu novoga lijeka. Identificirani peptidi mogu poslužiti i za izradu vakcina, te kao nosači za radiofarmaceutike.

Također je moguća i izrada različitih eksperimentalnih i dijagnostičkih testova (Štambuk i sur., 2019). Izrada dijagnostičkih testova u kojima se koriste sintetski peptidi umjesto monoklonskih protutijela ima potencijalno veliki značaj u dijagnostici tropskih bolesti jer se sintetski peptidi teže kvare i lakše pohranjuju u tropskim uvjetima, gdje su laboratorijski uvjeti često skromni.

Korištenje sintetskih peptida umjesto protutijela ima i etičko značenje jer proizvodnja protutijela zahtijeva životinje i njihovo žrtvovanje, a sam postupak nasađivanja i rasta tumorskih stanica koje proizvode protutijelo vrlo je bolan za životinju (Štambuk i sur., 2019).

Značajan čimbenik u istraživanjima je znatan pad cijene sintetskih peptida u posljednja dva desetljeća, tako da je s relativno malenim utroškom novca moguće dobiti veći broj peptidnih analoga od interesa. Osnovna svojstva analoga moguće je istražiti spektroskopskim metodama, poput CD i FS, i svesti njihov broj na prihvatljivu mjeru za biološki pokus, koji naglo podiže cijenu istraživanja (Young, 2009). Procjenjuje se da je cijena računalno dobivenog spoja svega 10 US dolara po molekuli, dok je cijena biološkog pokusa na životinjama u kojem se utvrđuje efikasnost spoja oko 300.000 US dolara (Young, 2009).

Iz navedenog se može zaključiti da heurističke metode za analizu proteinskih interakcija posjeduju značajan potencijal u biološkim i farmakološkim istraživanjima.

6. ZAKLJUČAK

1. Uporabom teorije molekularnoga prepoznavanja moguće je izraditi ligand-akceptor peptidni sustav na jednostavan i učinkovit način, koji ne zahtijeva korištenje kompleksnih informacijskih računalnih sustava.
2. Prilikom izrade peptidnog liganda bitno je paziti na njegovu topljivost, odnosno njegov hidrofobni profil, jer to može imati značajan utjecaj na njegov farmakokinetički profil i, posljedično, biološke učinke.
3. Uporabom fluorescentne spektroskopije moguće je brzo, jednostavno i jeftino utvrditi afinitet vezanja liganda za akceptor.
4. Postojanje prirodnog fluorofora može otežati ili onemogućiti izvođenje fluorescentne spektroskopije.
5. U biološkom pokusu moguće je utvrditi učinak liganda na akceptor. U modelu oštećenja jetre paracetamolom, antisens peptid IPPKY, izrađen uporabom teorije molekularnog prepoznavanja, u potpunosti je poništio protektivni učinak D-enantiomera met-enkefalina (YGGFM).
6. Uporabom D-izomera amino kiselina Y, F i M moguće je umanjiti razgradnju met-enkefalina enzimima aminopeptidaza i enkefalinaza A.

7. LITERATURA

- Barrett, K.E., Barman, S.M., Brooks, H.L., Yuan, J.X.-J. (2019). *Ganong's Review of Medical Physiology*. 26th ed., McGraw Hill, New York, USA.
- Blagaić, V., Houra, K., Turčić, P., Štambuk, N., Konjevoda, P., Boban-Blagaić, A., Kelava, T., Kos, M., Aralica, G., Čulo, F. (2010). The influence of alpha-, beta-, and gamma-melanocyte stimulating hormone on acetaminophen induced liver lesions in male CBA mice. *Molecules*, 15(3), 1232-1241.
- Blalock, J.E., Bost, K.L. (1986). Binding of peptides that are specified by complementary RNAs. *Biochem. J.*, 234(3), 679–683.
- Blalock, J.E. (1995). Genetic origin of protein shape and interaction rules. *Nat. Med.*, 1(9), 876–878.
- Brunton, L.L., Parker, K.L., Blumenthal, D.K., Buxton, I.L.O. (2008). *Goodman & Gilman's manual of pharmacology and therapeutics*. McGraw Hill, New York, USA.
- Cusick, M., Klitgord, N., Vidal, M., Hill, D. (2005). Interactome: Gateway into systems biology. *Human molecular genetics*, 14 Spec No. 2, R171-81.
- Ćosić, I. (ed.). (1997). *The Resonant Recognition Model of Macromolecular Bioactivity: Theory and Applications*, Biomethods. Birkhäuser, Basel, Switzerland.
- Čulo, F., Renić, M., Sabolović, D., Radoš, M., Bilić, A., Jagić, V. (1995). Ketoconazole inhibits acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 7(8), 757–762.
- De Las Rivas, J., Fontanillo, C. (2010). Protein–Protein Interactions Essentials: Key Concepts to Building and Analyzing Interactome Networks. *PLoS Comput. Biol.*, 6(6), e1000807.
- Domhan, C., Uhl, P., Kleist, C., Zimmermann, S., Umstätter, F., Leotta, K., Mier, W., Wink, M. (2019). Replacement of l-Amino Acids by d-Amino Acids in the Antimicrobial Peptide Ranalexin and Its Consequences for Antimicrobial Activity and Biodistribution. *Molecules*, 24(16), 2987.
- Enright, A.J., Iliopoulos, I., Kyrpides, N.C., Ouzounis, C.A. (1999). Protein interaction maps for complete genomes based on gene fusion events. *Nature*, 402(6757), 86–90.
- Fischer, E.G., Stingl, A., Kirkpatrick, C.J. (1990). Opioid influence on the adherence of granulocytes to human umbilical vein endothelial cells *in vitro*. *Cell Biol. Int. Rep.*, 14(9), 797–804.

- Fisher, J., Arnold, J. (2013). *Chemistry for Biologists*. 3rd ed., Garland Science, New York, USA.
- Ghisaidoobe, A.B.T., Chung, S.J. (2014). Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques. *Int. J. Mol. Sci.*, 15(12), 22518–22538.
- Groemping, Y., Hellmann, N. (2005). Spectroscopic Methods for the Determination of Protein Interactions. *Curr. Protoc. Protein Sci.*, 39(1).
- Guarner, F., Boughton-Smith, N.K., Blackwell, G.J., Moncada, S. (1988). Reduction by prostacyclin of acetaminophen-induced liver toxicity in the mouse. *Hepatology*, 8(2), 248–253.
- Hosur, R., Xu, J., Bienkowska, J., Berger, B. (2011). IWRAP: an interface threading approach with application to prediction of cancer-related protein-protein interactions. *J. Mol. Biol.*, 405(5), 1295–1310.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *PNAS*, 98(8), 4569–4574.
- Jones, S. i Thornton, J.M. (1996). Principles of protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93(1), 13–20.
- Koivisto, V.A. (1998). The human insulin analogue insulin lispro. *Ann. Med.*, 30(3), 260–266.
- Laubenbacher, R., Hinkelmann, F., Oremland, M. (2013). Agent-Based Models and Optimal Control in Biology: A Discrete Approach. U: Robeva, R., Hodge, T. (ed.), *Mathematical Concepts and Methods in Modern Biology*. Elsevier, San Diego, CA, 143–178.
- Lee, W.M., Ostapowicz, G. (2007). Acetaminophen: pathology and clinical presentation of hepatotoxicity. U: Kaplowitz, N., DeLeve, L.D. (ed.), *Drug induced liver disease*. 2nd ed., Informa Healthcare, New York, USA, 389–405.
- Lin, T.-W., Wu, J.-W., Chang, D.T.-H. (2013). Combining Phylogenetic Profiling-Based and Machine Learning-Based Techniques to Predict Functional Related Proteins. *PLoS ONE*, 8(9), e75940.
- Martinić, R., Šošić, H., Turčić, P., Konjevoda, P., Fučić, A., Stojković, R., Štambuk, N. (2014). Hepatoprotective effects of met-enkephalin on acetaminophen-induced liver lesions in male CBA mice. *Molecules*, 19(8), 11833–11845.

- McEvoy, G.K. (ed.). (2008). AHFS Drug information. Bethesda, American Society of Health-Systems Pharmacists, Inc, 3580-3584.
- Michnick, S.W., Ear, P.H., Landry, C., Malleshaiah, M.K., Messier, V. (2011). Protein-fragment complementation assays for large-scale analysis, functional dissection and dynamic studies of protein-protein interactions in living cells. *Methods Mol. Biol.*, 756, 395–425.
- Moore, T.C. (1984). Modification of lymphocyte traffic by vasoactive neurotransmitter substances. *Immunology*, 52(3), 511-518.
- Nelson, S.D., Bruschi, S.A. (2007). Mechanisms of acetaminophen-induced liver disease. U: Kaplowitz, N., DeLeve, L.D. (ed.), *Drug-Induced Liver Disease*. 2nd ed., Informa, London, UK, 353–388.
- Ottman, C. (2013). Protein–Protein Interactions: An Overview. U: Dömling, A., Mannhold, R., Kubynil, H., Folkers, G. (ed.), *Protein-Protein Interactions in Drug Discovery*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 1–19.
- Patrick, G. (2001). *Instant Notes in Medicinal Chemistry*. Taylor & Francis, New York, USA.
- Pazos, F. i Valencia, A. (2002). In silico two-hybrid system for the selection of physically interacting protein pairs. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 47(2), 219–227.
- Pitre, S., Alamgir, M., Green, J.R., Dumontier, M., Dehne, F., Golshani, A. (2008). Computational Methods For Predicting Protein–Protein Interactions, U: Werther, M., Seitz, H. (ed.), *Protein – Protein Interaction, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer, Berlin, Heidelberg, 247–267.
- Plotnikoff, N.P., Faith, R.E., Murgo, A.J., Herberman, R.B. (1997). Good, R.A. Methionine enkephalin: A new cytokine-human studies. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 82, 93–101.
- Rao, V.S., Srinivas, K., Sujini, G.N., Kumar, G.N.S. (2014). Protein-Protein Interaction Detection: Methods and Analysis. *Int. J. Proteomics*, 2014, 1-12.
- Root-Bernstein, R.S. (2005). Peptide self-aggregation and peptide complementarity as bases for the evolution of peptide receptors: a review. *J. Mol. Recognit.*, 18, 40–49.
- Rowe, P. (2007). *Essential statistics in the pharmaceutical sciences*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, West Sussex, UK.

- Scharrer, B., Smith, E.M., Stefano, G.B. (1994). Neuropeptides and immunoregulation. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 76-100.
- Silva, V.M., Chen, C., Hennig, G.E., Whiteley, H.E., Manautou, E.J. (2001). Changes in susceptibility to acetaminophen-induced liver injury by the organic anion indocyanine green. *Food Chem. Tox.*, 39(3), 271–278.
- Stumpf, M.P., Thorne, T., de Silva, E., Stewart, R., An, H.J., Lappe, M., and Wiuf, C. (2008). Estimating the size of the human interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105(19), 6959–6964.
- Štambuk, N., Kopjar, N., Šentija, K., Garaj-Vrhovac, V., Vikić-Topić, D., Marušić-DellaMarina, B., Brinar, V., Trbojević-Čepe, M., Žarković, N., Ćurković, B., i sur. (1998). Cytogenetic effects of met-enkephalin (peptid-M) on human lymphocytes. *Croat. Chem. Acta*, 71, 591–605.
- Štambuk, N., Manojlović, Z., Turčić, P., Martinić, R., Konjevoda, P., Weitner, T., Gabričević M (2014) A simple three-step method for design and affinity testing of new antisense šeptides: an example of erythropoietin. *Int. J. Mol. Sci.*, 15(6), 9209–9223.
- Štambuk, N., Konjevoda, P., Turčić, P., Šošić, H., Aralica, G., Babić, D., Seiwerth, S., Kaštelan, Ž., Novak Kujundžić, R., Wardega, P., Barać Žutelija, J., Gudelj Gračanin, A., Gabričević, M. (2019). Targeting tumor markers with antisense peptides: an example of human Prostate Specific Antigen. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(9), 2090.
- Tamamura, H., Kobayakawa, T., Ohashi, N., (2018). Mid-size Drugs Based on Peptides and Peptidomimetics: A New Drug Category. SpringerBriefs in Pharmaceutical Science & Drug Development, Springer, Singapore.
- Timbrell, J.A. (2009). Principles of biochemical toxicology. 4th ed., Informa Healthcare, New York, USA.
- Tong, J.C., Ranganathan, S. (2013). Computer-aided vaccine design. Woodhead Publishing Limited, Philadelphia, USA.
- The Universal Protein Resource (UniProt) in 2010. (2010). *Nucleic Acids Res.*, 38(Database issue), D142–D148.
- Veljković, V., Slavić, I. (1972). Simple General-Model Pseudopotential. *Phys. Rev. Lett.*, 29, 105-108.

- Venkatesan, K., Rual, J.F., Vazquez, A., Stelzl, U., Lemmens, I., Hirozane-Kishikawa, T., Hao, T., Zenkner, M., Xin, X., Goh, K.I., Yildirim, M.A., Simonis, N., Heinzmann, K., Gebreab, F., Sahalie, J.M., Cevik, S., Simon, C., de Smet, A.S., Dann, E., Smolyar, A., Vinayagam, A., Yu, H., Szeto, D., Borick, H., Dricot, A., Klitgord, N., Murray, R.R., Lin, C., Lalowski, M., Timm, J., Rau, K., Boone, C., Braun, P., Cusick, M.E., Roth, F.P., Hill, D.E., Tavernier, J., Wanker, E.E., Barabási, A.L., Vidal, M. (2009). An empirical framework for binary interactome mapping. *Nature Methods*, 6(1), 83–90.
- Young, D.C. (2009). Computational Drug Design. A Guide for Computational and Medicinal Chemists. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- Zagon, I.S., Verderame, M.F., McLaughlin, P.J. (2002). The biology of the opioid growth factor receptor (OGFr). *Brain Res. Rev.*, 38(3), 351–376.
- Zimmermann, T., Marrison, J., Hogg, K., O'Toole, P. (2014). Clearing up the signal: spectral imaging and linear unmixing in fluorescence microscopy. *Methods Mol. Biol.*, 1075, 129–148.
- <https://www.blopig.com/blog/2019/10/hotspots-in-structural-biology> (zadnji pristup 05.02.2021).
- https://resources.qiagenbioinformatics.com/manuals/clcgenomicsworkbench/current/index.php?manual=BE_Protein_hydrophobicity.html (zadnji pristup 05.02.2021).
- <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-protein-protein-interaction-analysis.html#1> (zadnji pristup 22.01.2021).

ŽIVOTOPIS

Katarina Matković rođena je 28.05.1996. u Splitu. Pohađala je III. Gimnaziju u Splitu od 2010. do 2014. godine. Potom je upisala preddiplomski studij molekularne biologije te 2018. godine stekla titulu bacc. biol. mol. Diplomski studij molekularne biologije upisala je 2018. s ciljem stjecanja titule mag. biol. mol.

U sklopu preddiplomskog studija pohađala je terensku nastavu iz zoologije i botanike. Na trećoj godini preddiplomskog studija bila je student demonstrator na kolegiju Osnove fizikalne kemije. U sklopu diplomskog studija odradila je laboratorijsku stručnu praksu u Laboratoriju za biljnu proteomiku, Zavoda za molekularnu biologiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Tijekom gotovo cjelokupnog studiranja sudjelovala je u organizaciji popularno-znanstvene manifestacije „Noć biologije”(2014/15; 2015/16; 2016/17; 2018/19). Kao student je radila u XV. Gimnaziji u Zagrebu, na pripremanju učenika drugih razreda za natjecanja u kemiji.

Tijekom druge i treće godine preddiplomskog studija primala je stipendiju grada Splita za izvrsnost.

Hrvatski joj je materinski jezik, a ima položenu C1 razinu engleskog jezika. Izvrsno se služi Microsoft Windows-om i MS Office-om. Poznaje programski jezik C++ te zna programirati i služiti se funkcijama u R-u. Ima vozačku dozvolu B kategorije.