

# УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ – ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ

## НАСТАВНО-НАУЧНО ВЕЋЕ

**Предмет:** Образложење предлога теме докторске дисертације

Молим Наставно-Научно веће Универзитета у Београду – Хемијског факултета да одобри израду докторске дисертације под насловом:

**„Конформационе промене химопапаина у условима ограничене аутолизе”**

### **1. Научна област:** Хемија

Ужа научна област: Биохемија

### **2. Предмет научног истраживања**

Предмет истраживања ове докторске дисертације су промене у структури химопапаина изазване променама услова у раствору (pH вредност, ниске температуре) као и контролисаном ковалентном модификацијом тиолне групе у активном центру.

Химопапаин, као представник цистеинских протеаза сличних папаину, одабран је као модел-систем због потребе за развијањем протокола и стратегија за добијање активних цистеинских протеаза уз смањење губитака услед аутопротеолизе. Такође, цистеинске протеазе сличне папаину показују високу термодинамичку стабилност, али истовремено и способност да под благим условима пролазе кроз значајне конформационе транзиције. Истраживање ће обухватити три целине.

Први део истраживања обухватиће оптимизацију стратегије за пречишћавање цистеинске протеазе из листа папаје, као и њену основну биохемијску карактеризацију у циљу добијања стабилног и репродуктивног модел система. Цистеинска протеаза биће идентификована применом идентификације отиска прста трипсинских фрагмената. За ограничавање аутолизе користиће се услови далеко од рН оптимума, и биће испитане конформационе промене и стабилност протеина под тим условима у циљу стабилизације протеина током складиштења.

Добијени химопапаин биће потом подвргнут реверзибилној инактивацији коришћењем S-метил-метантиосулфоната (MMTS), као и накнадној реактивацији применом тиолног редукционог агенса дитиотреитола (DTT). Други део истраживања обухватиће и структурну и биофизичку анализу добијених протеинских стања. Биће испитан утицај ковалентне модификације слободне тиолне групе ензима и реактивације на промену заступљености секундарних структура, изложености хидрофобних површина растварачу и промену степена агрегације ензима. Конкретно, биће испитан степен реверзибилности структурних промена и идентификовани потенцијални конформациони прелази који настају након ковалентне модификације слободног цистеина и реактивације.

За потврду механизма детектованих конформационих промена биће урађена и иреверзибилна инхибиција химопапаина алкиловањем тиолне групе у активном центру, уз детаљну биофизичку анализу.

### **3. Основе хипотезе**

Цистеинске протеазе папаинске суперфамилије представљају веома значајну групу протеолитичких ензима у биологији, услед своје кључне улоге у разградњи протеина и регулацији бројних физиолошких и патолошких процеса, као што су ремоделовање екстрацелуларног матрикса, презентација антигена, протеолитичка обрада биомолекула, имунолошка инвазија, хидролиза хемоглобина, инвазија паразита, као и процесирање површинских протеина<sup>1</sup>. Иако су кинетички стабилни, њихова каталитичка активност заснива се на високо реактивној слободној тиолној групи цистеина у активном центру, што их чини изузетно осетљивим на оксидацију и ковалентне модификације<sup>2,3,4</sup>. Под утицајем

ових фактора, протеазе могу претрпети значајне конформационе промене, укључујући прерасподелу секундарних структура, повећање изложености хидрофобних региона и настанак агрегата<sup>5</sup>. У појединим случајевима, структурне промене доводе до губитка активности, нежељене агрегације или формирања  $\beta$ -структура сличних амилоидним<sup>6</sup>.

Цистеинске протеазе се у медицини и биотехнологији често циљано инхибирају, како би се контролисала њихова активност током изоловања, складиштења и употребе ензима<sup>7</sup>.

Међутим, процес инхибиције не подразумева само блокирање активног места већ он може изазвати низ дубоких структурних промена које могу бити локалне или глобалне, реверзибилне или иреверзибилне<sup>8</sup>. Пошто је активни остатак цистеина у активном центру директно укључен у стабилизацију нативне конформације, његова ковалентна модификација може довести до ширих структурних последица које до сада нису довољно описане<sup>9</sup>.

Упркос значају овог проблема, постојећа литература недовољно описује које тачно структурне промене настају током инхибиције цистеинских протеаза папаинске суперфамилије, нити у којој мери су оне реверзибилне након третмана редукционим агенсима. Сходно томе, разумевање структурних промена насталих током инхибиције и степена њихове реверзибилности представља кључни предуслов за контролу активности, очување стабилности и примену цистеинских протеаза у различитим системима.

#### **4. Циљеви истраживања и очекивани резултати**

У оквиру предложене докторске дисертације планира се развој, оптимизација и примена протокола за изоловање из природног материјала, реверзибилну инхибицију, реактивацију и стабилизацију цистеинских протеаза (на моделу химопапаина) у условима ограничене аутолизе, са посебним фокусом на конформационе промене ензима.

Научни циљеви ове докторске дисертације обухватиће:

- Изоловање и идентификација химопапаина из листа папаје, у условима ограничене аутолизе, уз његову основну биохемијску карактеризацију применом стандардних биохемијских метода;

- Постизање контролисане, потпуне реверзибилне инактивације химопапаина коришћењем MMTS-а, као и накнадне потпуне реактивације ензима;
- Анализа промена у структури химопапаина након модификације и реактивације применом одговарајућих спектроскопских и биофизичких техника.

Очекује се да резултати ове докторске дисертације доведу до:

- Оптимизованог и стандардизованог протокола за изоловање цистеинских протеаза из природног материјала под условима ограничене аутолизе;
- Оптимизованог и стандардизованог протокола за реверзибилну инактивацију химопапаина у циљу спречавања аутолизе и структурне дестабилизације и агрегације протеина;
- Детекције и структурне карактеризације равнотежних форми химопапаина.

## 5. Методе истраживања

Током истраживања примењиваће се стандардне биохемијске технике за изоловање, пречишћавање и описивање протеазе сличне папаину из листа папаје, укључујући фракционисање солима (натријум-хлоридом, амонијум-сулфатом) на киселим рН вредностима уз проверу чистоће помоћу натријум-додецил-сулфат полиакриламидне гел-електрофорезе (SDS-PAGE). Након пречишћавања, протеин ће бити ензимски окарактерисан и идентификован методом упоређивања отиска прста трипсинских фрагмената масеном спектометријом. Променом рН вредности биће оптимизовани услови за стабилизацију протеина и његово складиштење. Структурне промене биће праћене флуоресцентном и инфрацрвеном спектроскопијом са Фуријеовом трансформацијом.

Пречишћени химопапаин биће инкубиран са S-метил-метантиосулфонатом (MMTS) при различитим моларним односима ензима и инхибитора, у циљу испитивања услова који доводе до потпуне инхибиције протеолитичке активности. Након инхибиције, узорци ће бити третирани дитиотреитолом (DTT) ради реактивације ензима, а степен повратка активности биће одређен мерењем протеолитичке активности помоћу синтетичког супстрата BAPNA (N- $\alpha$ -бензоил-DL-аргинин-p-нитроанилид). Добијени узорци инхибираног и реактивираниог ензима биће биофизички и структурно окарактерисани

спектрофлуориметријском анализом са 8-анилиннафтален-1-сулфонском киселином (ANS), ради процене изложености хидрофобних региона након инхибиције и реактивације у поређењу са почетним узорком. Промене секундарних структура биће праћене инфрацрвеном спектроскопијом у ATR-FTIR режиму, анализом амидног I региона ради утврђивања промена удела  $\alpha$ -хеликоидних, неуређених и структура  $\beta$ -плочица. Степен агрегације инхибираних и реактивираних облика биће испитиван помоћу SDS-PAGE електрофорезе. Детекција више равнотежних форми химопапаина биће изведена масеном спектрометријом после ирверзибилне инхибиције употребом различитих алкилујућих агенаса.

## 6. Литература

1. Verma, S., Dixit, R. and Pandey, K.C., 2016. Cysteine proteases: Modes of activation and future prospects as pharmacological targets. *Frontiers in Pharmacology*, 7(107).  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00107>
2. Sathish, H.A., Kumar, P.R. and Prakash, V., 2007. Mechanism of solvent induced thermal stabilization of papain. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41(4), pp.383-390. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.05.009>
3. Milošević, J., Vrhovac, L., Đurković, F., Janković, B., Malkov, S., Lah, J. and Polović, N.D., 2020. Isolation, identification, and stability of Ficin 1c isoform from fig latex. *New Journal of Chemistry*, 44(36), pp. 15716–15723. <https://doi.org/10.1039/d0nj02938f>
4. Poole, L.B., 2015. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radical Biology and Medicine*, 80(148), pp.148–157.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.013>
5. Sengupta, B., Chaudhury, A., Das, N. and Sen, P., 2017. Single molecular level probing of structure and dynamics of papain under denaturation. *Protein & Peptide Letters*, 24(11), pp. 1073–1081. <https://doi.org/10.2174/0929866524666170811145838>
6. Raskovic, B., Babic, N., Korac, J. and Polovic, N., 2015. Evidence of beta-sheet structure induced kinetic stability of papain upon thermal and sodium dodecyl sulfate denaturation.

Journal of the Serbian Chemical Society, 80(5), pp.613–625.

<https://doi.org/10.2298/JSC140901007R>

7. Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B. and Turk, D., 2012. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*, 1824(1), pp.68–88.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.10.002>
8. Li, M., Chen, C., Davies, D.R. and Chiu, T.K., 2010. Induced-fit mechanism for prolyl endopeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, 285(28), pp.21487–21495.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.092692>
9. K Shao, Q., Xiong, M., Li, J., Hu, H., Su, H. and Xu, Y., 2023. Unraveling the catalytic mechanism of SARS-CoV-2 papain-like protease with allosteric modulation of C270 mutation using multiscale computational approaches. *Chemical Science*, 14, pp. 4681–4693. <https://doi.org/10.1039/D3SC00166K>