

Primjena antisens peptida kao novi pristup liječenja ugriza poskoka

Marić, Marin

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:951925>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Marin Marić

**Primjena antisens peptida kao novi pristup
liječenja ugriza poskoka**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Opća i anorganska kemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Marija Gabričevića.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Poskok.....	1
1.1.1. Sastav otrova poskoka	2
1.1.2. Djelovanje otrova poskoka.....	9
1.2. Amoditoksin A	10
1.2.1. Struktura amoditoksina A	10
1.2.2. Djelovanje amoditoksina A.....	12
1.3. Teorija molekularnog prepoznavanja	14
2. OBRAZLOŽENJE TEME	18
3. MATERIJALI I METODE	20
3.1. Materijali.....	20
3.1.1. Kemikalije i pribor.....	20
3.1.2. Instrumenti	21
3.2. Metode	21
3.2.1. Priprema otopina sens i antisens peptida	21
3.2.2. Određivanje intenziteta fluorescencije.....	27
3.2.3. Ovis RSM 1000	29
3.2.4. Određivanje konstante vezanja.....	32
4. REZULTATI I RASPRAVA	36
4.1. Fluorescencija sens i antisens peptida	36
4.2. Fluorescencija prilikom interakcije sens i antisens peptida	37
4.3. Afinitet vezanja sens i antisens peptida	42
5. ZAKLJUČCI	46
6. LITERATURA	47
7. SAŽETAK	65

1. UVOD

1.1. Poskok

Poskok (lat. *Vipera ammodytes*, eng. *nose-horned viper*) je životinja otrovnica (eng. *venomous animal*) pod koje ubrajamo one koje posjeduju otrovni aparat koji služi za proizvodnju otrova i njegov unos u tijelo žrtve. Pripada razredu gmazova (lat. *Reptilia*), redu ljuskaša (lat. *Squamata*), podredu zmija (*Serpentes*) i porodici ljutica (lat. *Viperidae*) unutar koje se smatra najopasnijom vrstom. Mužjaci su pepeljastosive boje i mogu narasti do 100cm, a ženke su najčešće smeđe, sivosmeđe ili crvenosmeđe boje i mogu narasti do 60cm. Smatraju se najvećom otrovnicom u Europi (Slika 1). Na glavi imaju karakteristični maleni roščić, a na leđima specifičnu cik-cak liniju koja kod nekih primjeraka može biti izlomljena čineći rombove (Plavšić i sur., 2006). Glava im je trokutastog ili srcolikog oblika, a na očima kojima vide po noći ističu se okomito izdužene zjenice (www.plantea.hr).

Njihov otrovni aparat nalazi se u temporalnoj regiji, sa stražnje strane u odnosu na oči. Sastoji se od dvije žlijezde s velikim bazalnim lumenom unutar kojeg je pohranjen otrov. Okružene su mišićnim tkivom čijom kontrakcijom se otrov provodi tubulima do šupljih povećanih zubi koji se nalaze u prednjem dijelu gornje čeljusti. U stanju mirovanja oni su savijeni unatrag i prekriveni zaštitnim kožnim naborom, ali prilikom ugriza se uspravljaju čime se otrov kroz zubni kanal unosi u tijelo žrtve. Uz svaku žlijezdu nalazi se pomoćna žlijezda čija uloga još nije do kraja poznata, ali smatra se da sudjeluju u održavanju litičkih komponenti inaktivnim pomoću niske pH vrijednosti i endogenih inhibitora (Mackessy i Baxter, 2006; Plavšić i sur., 2006).

Poskok obitava na području s oskudnom vegetacijom (www.eea.europa.eu), točnije na suhim i sunčanim staništima krških i kamenitih predjela (www.plantea.hr). Nalaze se na području jugoistočne Europe (Slovenija, Hrvatska, Bosna i Hercegovina, Srbija, Albanija, Kosovo, Makedonija, Bugarska, Rumunjska, Grčka) te Austrije, Italije, Turske i Armenije. U svim nabrojanim zemljama, osim Austrije, Italije i Turske, poskok se smatra otrovnicom od najvećeg medicinskog značaja, točnije spada u prvu kategoriju. Pod njom se ubrajaju izrazito otrovne zmije koje su široko rasprostranjene i čiji ugrizi izazivaju veliku incidenciju morbiditeta, invaliditeta i smrtnosti (www.who.int). U Hrvatskoj ih nalazimo u Istri, Kvarneru, Lici, Gorskom kotaru i Dalmaciji (Jelić i sur., 2013). Strogo je zaštićena vrsta (www.ju-priroda.hr).



Slika 1. Prikaz poskoka (preuzeto sa: www.plitvicetimes.com)

1.1.1. Sastav otrova poskoka

Otrov zmiya je vodena, viskozna tekućina bezbojne ili žućkaste boje kompleksnog sastava. Proteini i polipeptidi čine 90% suhe tvari otrova dok ostatak otpada na nukleozide (npr. adenzin), elemente u tragovima (npr. kalcij, cink), aminokiseline i ugljikohidrate (Plavšić i sur., 2006). Otrovi podvrste *Vipera ammodytes ammodytes* heterogenog je sastava čije sastavnice iskazuju širok spektar farmakološkog i patofiziološkog djelovanja. Sadrži sedam obitelji proteina koje inače nalazimo kod zmiya iz porodice *Viperidae*: serinske proteaze (SVSPs), metaloproteinaze (SVMPs), sekrecijske fosfolipaze A₂ (sPLA₂), oksidaze L-aminokiselina (LAAOs), proteine slične lektinima C-tipa (CLPs), sekrecijske proteine bogate cisteinom (CRISPs) i disintegrine (Dis) (Morita, 2005; Calvete i sur., 2009). Sastav otrova unutar jedinki iste vrste je varijabilan, primijećeno je da se razlikuje na razini populacije, pa čak i na razini jedinke. Taj fenomen nazivamo intraspecijska ili unutarvrstna varijabilnost. Glavni čimbenik koji utječe na intraspecijsku varijabilnost je geografska rasprostranjenost, dok su ostali poput sezonske promjene, prehrane, ontogenetskog stadija i spolnog dimorfizma slabije istraženi (Chippaux i sur., 1991; Gutiérrez i sur., 2009). U otrovu poskoka, točnije podvrste *Vipera ammodytes* prikupljenih iz različitih krajeva Hrvatske identificirano je 57

proteina koji pripadaju 16 različitim obiteljima proteina (Leonardi i sur., 2019), u otrovu jedinki iz Srbije 99 proteina potječe iz 9 različitih obitelji (Gopcevic i sur., 2021), a u onima iz Bugarske 38 proteina iz 8 različitih obitelji (Georgieva i sur., 2008). Obitelji proteina dijelimo na enzimске i neenzimске. Pod enzimске ubrajamo serinske proteaze, metaloproteinaze, fosfolipaze A₂ i oksidaze L-aminokiselina, a pod neenzimске lektine C-tipa, sekrecijske proteine bogate cisteinom, disintegrine, živčane faktore rasta (NGFs) i faktore rasta vaskularnog endotela (VEGFs), inhibitore serinskih proteaza Kunitzovog tipa (SPis) i inhibitore metaloproteinaza (MPis), natrijuretske peptide (NPs) i bradikinin-potencirajuće peptide (BPPs) (Leonardi i sur., 2019; Gopcevic i sur., 2021).

Serinske proteaze (SVSPs) su uz metaloproteinaze, lektine C-tipa i fosfolipaze A₂ najzastupljenije sastavnice u otrovu poskoka (Leonardi i sur., 2019). U otrovu jedinki iz Srbije identificirano je 39 (Gopcevic i sur., 2021), a kod onih iz Hrvatske 7 serinskih proteaza (Leonardi i sur., 2019). Iako im je specifičnost za supstrate različita, dijele visoku razinu podudarnosti sekvence, tj. slijeda aminokiselina (Vaiyapuri i sur., 2012). Sve sadrže 12 cisteinskih ostataka za koje se vjeruje da stvaraju disulfidne veze i produženje na C-kraju što je karakteristika serinskih proteaza iz otrova zmija. Mogu biti kiselog, neutralnog ili bazičnog karaktera čija je relativna molekularna masa u rasponu od 30 kDa do 45 kDa (Leonardi i sur., 2019), a pI u rasponu od 4,6 do 9,1 (Gopcevic i sur., 2021). Prisustvom različitog broja N-glikozilacijskih mjesta u slijedu može se objasniti širok raspon pI, kao i veća relativna molekularna masa nego što bismo očekivali na temelju njihove primarne strukture. N-glikozilacija također utječe na stabilnost, aktivnost i afinitet serinskih proteaza za njihove inhibitore (Samel i sur., 2002; Zhu i sur., 2005). Kod većine sačuvana je katalitička trijada His-Asp-Ser u aktivnom mjestu (Leonardi i sur., 2019). Zbog toga posjeduju enzimsku aktivnost pa djeluju kao proteaze koje hidroliziraju fibrinogen i aktiviraju faktor IX (FIX) i faktor X (FX), ali ne protrombin (Sajevic i sur., 2014). S druge strane, kod manjeg broja serinskih proteaza poput Vaa-SPH-1 katalitička trijada zamijenjena je s Arg-Asp-Asn zbog čega nema enzimsku aktivnost, ali djeluje antikoagulacijski kao antagonist faktora IXa (FIXa) (Latinović i sur., 2018) tako da serinske proteaze smatramo sastavnicama otrova zmija koje primarno djeluju na hemostazu (Markland, 1998).

Metaloproteinaze (SVMPs) iz otrova zmija, sastavnice otrova odgovorne za hemoragiju, proteolitički su enzimi ovisni o cinkovim ionima koji razgrađuju proteine vanstaničnog matriksa i faktore zgrušavanja krvi (Markland, 1998; Gutiérrez i Rucavado, 2000). Dijeleg se u 4 grupe ovisno o organizaciji domena: P-I, P-II, P-III i P-IV. Pripadnici P-I grupe sadrže samo metaloproteinaznu domenu, P-II grupe uz metaloproteinaznu sadrže i disintegrinsku domenu, a

P-III grupe još i domenu bogatu cisteinom. Članovi P-IV grupe sadrže dvije dodatne podjedinice slične lektinima C-tipa koje su s glavnim slijedom povezane disulfidnim vezama (Bjarnason i Fox, 1994). Međutim, novija saznanja ukazuju na činjenicu da članovi P-IV grupe predstavljaju samo posttranslacijsku modifikaciju strukture članova P-III grupe pa je ona u novijoj klasifikaciji izostavljena (Fox i Serrano, 2008). Biološko djelovanje metaloproteinaza proizlazi iz njihove katalitičke aktivnosti i adhezivnih svojstava. Mogu izravno aktivirati stanice ili osloboditi endogene aktivne tvari iz prekursora djelujući na proteine bazalne membrane, faktore zgrušavanja krvi, trombocite, endotelne ili proupalne stanice (Moura-da-Silva i sur., 2003). Metaloproteinaze su sastavnice otrova zmija najodgovornije za velik broj lokalnih i sistemskih simptoma prilikom čega su pripadnici P-III grupe najzaslužniji za hemoragiju (Escalante i sur., 2011). Iako točan mehanizam hemoragičnosti još nije do kraja razjašnjen smatra se da dolazi do selektivnog proteolitičkog cijepanja proteina bazalne membrane što slabi mehaničku stabilnost kapilarnog zida. Metaloproteinaze također interferiraju s adhezijom susjednih stanica ili stanica i vanstaničnog matriksa djelujući proteolitički ili antagonistički na adhezijske proteine endotelnih stanica, integrine ili kadherine. Djelovanjem hemodinamičkih sila tenzijski se rasteže što uzrokuje stanjivanje i gubitak endotelnih stanica čime dolazi do ekstravazacije (Gutiérrez i Rucavado, 2000; Gutiérrez i sur., 2005; Gutiérrez i sur., 2010). U podvrsti *Vipera ammodytes ammodytes* identificirani su hemoragini VaH1, VaH2 (Leonardi i sur., 2002), VaH3 (Sajevec i sur., 2013), VaH4 (Leonardi i sur., 2014) i amoditagin (Kurtović i sur., 2011). VaH1 i VaH2, metaloproteinaze koje pripadaju P-IIIa podgrupi, kiseli su monomerni glikoproteini čija je proteolitička aktivnost nužna za hemoragičnost. VaH1 djeluje i kao fibrinogenaza (Leonardi i sur., 2002; Leonardi i sur., 2019). VaH3 je kiseli homodimerni glikoprotein koji pripada P-IIIc podgrupi. Iako ima usku proteolitičku specifičnost učinkovito razgrađuje komponente bazalne membrane poput kolagena IV, fibronektina i nidogena. Djeluje i kao fibrinogenaza razgrađujući protrombin i FX bez njihove aktivacije što potiče njegovu hemoragičnost (Sajevec i sur., 2013). Sličnu supstratnu specifičnost i fibrinogenaznu aktivnost iskazuje i VaH4, heterodimerni glikoprotein koji potencijalno posjeduje antitumorsko djelovanje (Leonardi i sur., 2014). Amoditagin je heterodimer iz P-IIIc podgrupe koji uz fibrinogenaznu aktivnost iskazuje i jaku hemoragičnost. Antitijela prikupljena na amoditagin neutraliziraju hemoragičnost cijelog otrova što ukazuje na njegovu važnost (Kurtović i sur., 2011). Uz hemoragiju metaloproteinaze su odgovorne i za pojavu mjehura na mjestu ugriza i razvoj ulceracija hidrolizom integrina $\alpha 2\beta 4$ i laminina čime se epidermis odvaja od dermisa. Narušavanjem mikrovaskulature prekida se dotok krvi u mišićno tkivo čime dolazi do mionekroze. Također, sprječava se i regeneracija mišićnog tkiva

(Gutiérrez i Rucavado, 2000; Gutiérrez i sur., 2010). Metaloproteinaze mogu djelovati i na faktore zgrušavanja krvi i funkciju trombocita čime potiču hemoragiju narušavajući hemostazu (Kamiguti i sur., 1998). Uzrokuju defibrin(ogen)aciju, proces iscrpljivanja fibrinogena i fibrina. Može biti potaknuta proteolitičkom razgradnjom fibrinogena ili fibrina, kao i aktivacijom FX i protrombina (Gutiérrez i sur., 2010). Kod podvrste *Vipera ammodytes ammodytes* identificirane su fibrinogenze VaF1 (Leonardi i sur., 2015) i amoditaza (Leonardi i sur., 2007) i aktivatori FX VAFXA-1 i VAFXA-2 (Leonardi i sur., 2008).

Disintegrini (Dis) su neenzimski polipeptidi bogati cisteinom koji djeluju kao antagonisti β_1 i β_3 integrina koji se nalaze na površini raznih stanica (Calvete, 2013). Spriječena je njihova interakcija s proteinima vanstaničnog matriksa čime se remeti adhezija (Marcinkiewicz, 2013). Disintegrini mogu biti homodimeri koji se sastoje od dvije α podjedinice ili heterodimeri od α i β podjedinice. α podjedinice se izravno sintetiziraju, a β podjedinice nastaju posttranslacijskom proteolitičkom obradom metaloproteinaza iz grupe P-II (Calvete i sur., 2003). Nalazimo ih kod jedinki podvrste *Vipera ammodytes ammodytes* iz Hrvatske (Leonardi i sur., 2019) koje imaju antitumorsko djelovanje (Latinović i sur., 2017).

Sekrecijske fosfolipaze A_2 (sPLA₂) kod zmija iz porodice *Viperidae* pripadaju na temelju aminokiselinskog slijeda, trodimenzionalne strukture i broja disulfidnih veza u grupu IIa (Six i Dennis, 2000). Pod njih ubrajamo tri amoditoksina (Atxs) i tri amoditina (Atns) koji imaju neurotoksično, miotoksično i antikoagulacijsko djelovanje, ali mehanizam djelovanja na molekularnoj razini im još nije do kraja određen (Pungerčar i sur., 2011). Razlikujemo tri amoditoksina koji su bazičnog karaktera: amoditoksin A (AtxA), amoditoksin B (AtxB) i amoditoksin C (AtxC) (Križaj, 2011). Amoditoksini su presinaptički ili β -neurotoksini. Djeluju na presinaptičku membranu u neuromuskulatornoj vezi inhibirajući otpuštanje acetilkolina što uzrokuje poteškoće s disanjem koje vode do smrti (Liang i sur., 1993). AtxA, kao i AtxB i AtxC, sastoji se od 122 aminokiseline i najpotentniji je toksin od nabrojanih (i.v. LD₅₀ = 0,021 mg/kg). AtxB je 28 puta manje potentan od AtxA i razlikuje se u tri aminokiseline (Y115H/R118M/N119Y), a AtxC je 17 puta manje potentan i razlikuje se u dvije aminokiseline (F124I/K128E) (Ritonja i Gubenšek, 1985; Ritonja i sur., 1986; Križaj i sur., 1989). Pod amoditine ubrajamo amoditin I₁ (AtnI₁), amoditin I₂ (AtnI₂) i amoditin L (AtnL). Amoditin I₁ i amoditin I₂ su enzimski aktivne netoksične sastavnice, a amoditin L enzimski neaktivan miotoksin. AtnI₁ i AtnI₂ su izrazito bazični proteini koji se sastoje od 122, odnosno 121 aminokiseline, a AtnL je slabo kiseli protein koji sadrži 122 aminokiseline (Pungerčar i sur., 2011). AtnL na položaju 49 umjesto asparagina sadrži serin. Kako navedeni asparagin sudjeluje

u vezanju Ca^{2+} koji je kao kofaktor esencijalan za enzimsku aktivnost, AtnL ju ne posjeduje (Križaj i sur., 1991).

Oksidaze L-aminokiselina (LAAOs), sastavnice otrova koje mu daju žućkastu boju (Guo i sur., 2012), su flavoproteini koji kataliziraju stereospecifičnu reakciju oksidativne deaminacije L-aminokiselina pri čemu nastaju α -ketokiseline, amonijak i H_2O_2 (Marsh i Williams, 2005). One posjeduju citotoksično djelovanje, induciraju apoptozu i hemoragiju što značajno pridonosi ukupnoj toksičnosti otrova zmijsa (Du i Clemetson, 2002). Smatra se da je H_2O_2 odgovoran za apoptotski učinak i inhibiciju agregacije trombocita (Sakurai i sur., 2001; Du i Clemetson, 2002), a uočen je i njihov antitumorski učinak (de Vieira Santos i sur., 2008). Međutim, mehanizam djelovanja još nije do kraja rasvijetljen (Georgieva i sur., 2011). Oksidaze L-aminokiselina izolirane iz otrova podvrste *Vipera ammodytes ammodytes* su asimetrični tetrameri. Svaki monomer sadrži FAD-vezujuću domenu, domenu koja veže supstrat i α -heliks domenu. FAD-vezujuća domena sastoji se od 4 α -heliksa i 8 β -ploča i veže kofaktor FAD koji se nalazi u aktivnom mjestu. Domena koja veže supstrat sastoji se od 4 α -heliksa i 11 β -ploča. Nalazi se iznad izoaloksazinskog prstena FAD-a i njezini aminokiselinski ostaci odgovorni su za vezanje supstrata. α -heliks domena sastoji se od 6 α -heliksa pri čemu je na asparaginu na položaju 172 došlo je do N-glikozilacije. Vezani oligosaharidi, pozicionirani na površini, smatraju se važnim za toksičnost. Oni ulaze u interakciju s površinom stanice pri čemu se osigurava visoka koncentracija H_2O_2 na mjestu djelovanja što dovodi do citotoksičnosti i apoptoze (Ande i sur., 2006). Četiri Zn^{2+} iona stabiliziraju enzimski aktivnu kvarternu strukturu zbog čega su esencijalni za biološku aktivnost (Georgieva i sur., 2011). Ne svrstavamo ih među najzastupljenije sastavnice otrova (Leonardi i sur., 2019). U otrovu jedinki iz Srbije identificirano je 19 monomera oksidaza L-aminokiselina čiji pI varira između 4,3 i 9,1 što ukazuje na postojanje velikog broja navedenog enzima u otrovu (Gopcevic i sur., 2021). S druge strane, kod jedinki iz Hrvatske identificirana su samo dva izoenzima (Leonardi i sur., 2019).

Proteini slični lektinima C-tipa (CLPs) iz otrova zmijsa su proteini koji za razliku od lektina ne vežu ugljikohidrate (Morita, 2005). Najzastupljenija su neenzimska sastavnica u otrovu podvrste *Vipera ammodytes ammodytes* (Leonardi i sur., 2019). Sastoji se od α podjedinice ($M_r = 14 - 15$ kDa) i β podjedinice ($M_r = 13 - 14$ kDa) koje mogu tvoriti $\alpha\beta$ heterodimer ili $(\alpha\beta)_2$ ili $(\alpha\beta)_4$ oligomere (Morita, 2005). S druge strane, lektini C-tipa iz otrova zmijsa su isključivo homodimeri ili homooligomeri ovisni o kalcijevim ionima (Clemetson, 2010). Proteini slični lektinima C-tipa u svojim domenama, koje su homologne domenama koje vežu ugljikohidrate kod lektina C-tipa, ne sadrže petlju koja veže Ca^{2+} ione ili ugljikohidrate zbog čega su izgubile sposobnost vezanja ugljikohidrata, ali se mogu vezati na fiziološki važne proteine ili receptore

(Morita, 2005; Clemetson, 2010) pri čemu utječu na hemostazu djelujući na aktivaciju trombocita i koagulaciju (Arlinghaus i Eble, 2012). Mogu djelovati kao antikoagulansi inhibirajući FIX i FX i kao antitrombotici djelujući na integrin $\alpha 2\beta 1$ ili GPIb što dovodi do hemoragije. S druge strane, neki mogu aktivirati trombocite djelujući kao vWF, GPVI, CLEC-2 ili GPIb agonisti (Lu i sur., 2005). Navedenim neenzimskim djelovanjem na trombocite proteini slični lektinima C-tipa pridonose ukupnoj toksičnosti otrova. To potvrđuju određeni slučajevi ugriza poskoka kod kojih je zabilježen teški oblik koagulopatije uz akutnu trombocitopeniju, ali bez promjene brzine koagulacije ili razine fibrinogena (Frangides i sur., 2006; Al i sur., 2010; Marinov i sur., 2010; Karabuva i sur., 2016; Kurtović i sur., 2016; Brvar i sur., 2017). Uočeno je i da potenciraju hemoragijsko djelovanje metaloproteinaza (Rucavado i sur., 2005). U otrovu jedinki iz Srbije identificirano je 16 monomera proteina sličnih lektinima C-tipa (Gopcevic i sur., 2021), a kod onih iz Hrvatske 9 monomera, od kojih su 5 α podjedinice, a 4 β podjedinice (Leonardi i sur., 2019).

Sekrecijski proteini bogati cisteinom (CRISPs) su jednolančani polipeptidi relativne molekularne mase u rasponu od 20 kDa do 30 kDa. Sadrže 16 cisteinskih ostataka od kojih se 10 nalazi na C-kraju i tvore 8 disulfidnih veza (Yamazaki i Morita, 2004). Iako se često nalaze kao sastavnica otrova zmija, njihovo je biološko djelovanje još uvijek slabo poznato. Funkcija tek nekolicine je razjašnjena (Yamazaki i Morita, 2004; Leonardi i sur., 2019). Neki od njih mogu inhibirati kontrakciju glatkog mišićnog tkiva blokiranjem L-tipa Ca^{2+} ionskih kanala (Yamazaki i sur., 2002), drugi pak CNG ionske kanale (Brown i sur., 1999). Kod trećih zabilježena je inhibicija angiogeneze, povećanje vaskularne permeabilnosti ili pojačan upalni odgovor (Tadokoro i sur., 2020). U otrovu jedinki iz Srbije identificirano je 11 (Gopcevic i sur., 2021), a kod onih iz Hrvatske 15 sekrecijskih proteina bogatih cisteinom (Leonardi i sur., 2019). Živčani faktori rasta (NGFs) potiču diferencijaciju i rast simpatičkih i embrionalnih senzornih živaca (Trummal i sur., 2011). Nalazimo ih u maloj količini u otrovu velikog broja zmija (Kostiza i Meier, 1996; Trummal i sur., 2011). Većina živčanih faktora rasta su nekovalentno vezani dimeri relativne molekularne mase oko 25 kDa koji se sastoje od dvije jednake ili vrlo slične podjedinice (Smith i sur., 1992). Identificirani su i kovalentno vezani dimeri (Furukawa i Hayashi, 1976; Smith i sur., 1992), kao i oni s vezanim ugljikohidratima (Pearce i sur., 1972; Siigur i sur., 1985). Netoksične su sastavnice otrova (Fry, 2005a), ali postoje indicije da potiču aktivnost toksičnih sastavnica otrova vezujući se za specifične receptore na membranama stanica povećavajući vazopermeabilnost ili djelujući na imunski sustav (Kostiza i Meier, 1996; Sunagar i sur., 2013). U otrovu jedinki iz Srbije identificirana su 3 (Gopcevic i sur., 2021), a kod onih iz Hrvatske 6 živčanih faktora rasta (Leonardi i sur., 2019).

Faktori rasta vaskularnog endotela (VEGFs) su sastavnice otrova koje potiču proliferaciju endotelnih stanica i angiogenezu, povećavaju vaskularnu permeabilnost i uzrokuju hipotenziju (Yamazaki i sur., 2003; Simons i sur., 2016). Iz podvrste *Vipera ammodytes ammodytes* izoliran je vamin, homodimer od 110 aminokiselina čije su podjedinice povezane s dvije disulfidne veze. Na N-kraju svakog monomera nalaze se aminokiseline koje sudjeluju u dimerizaciji, a na C-kraju bazične aminokiseline koje vežu heparin. Vamin hipotenzivni učinak i povećanje vaskularne permeabilnosti ostvaruje vezanjem za VEGFR-2 i aktivacijom NO signalnog puta (Yamazaki i sur., 2003; Suto i sur., 2005). Na taj način otrov se lakše širi s mjesta ugriza (Leonardi i sur., 2019). U otrovu jedinki iz Srbije i iz Hrvatske identificiran je jedan faktor rasta vaskularnog endotela, tj. vamin (Leonardi i sur., 2019; Gopcevic i sur., 2021).

Inhibitori serinskih proteaza Kunitzovog tipa (SPis) su proteini građeni od približno 60 aminokiselina. Sadrže 3 disulfidne veze i antiproteinazno mjesto koje je zaslužno za inhibiciju serinskih proteaza (Župunski i sur., 2003; Guo i sur., 2013a; Guo i sur., 2013b; Mukherjee i sur., 2014). Prisutnost pozitivno nabijenih aminokiselina u antiproteinaznom mjestu (Arg ili Lys) sugerira da je riječ o inhibitorima tripsina, dok velike hidrofobne aminokiseline (Leu, Phe, Tyr) nalazimo kod inhibitora kimotripsina (Laskowski i Kato, 1980). Obje vrste se nalaze u otrovu podvrste *Vipera ammodytes ammodytes* pri čemu inhibitor tripsina djeluje na koagulaciju i fibrinolizu inhibirajući plazmin i plazmatski kalikrein (Ritonja i sur., 1983). Mogu stvarati komplekse s ostalim sastavnicama otrova modulirajući ili pojačavajući njihovu aktivnost (Thakur i Mukherjee, 2017), primjerice s AtxA pojačavajući njegovu toksičnost (Brgles i sur., 2014). U otrovu jedinki iz Srbije identificirana su 2 inhibitora serinskih proteaza (Gopcevic i sur., 2021), a kod onih iz Hrvatske samo jedan (Leonardi i sur., 2019).

Inhibitori metaloproteinaza (MPis) su uz nisku pH vrijednost i visoku koncentraciju citrata čimbenici koji inhibiraju djelovanje metaloproteinaza u otrovu (Odell i sur., 1998; Munekiyo i Mackessy, 2005). U lumenu žlijezda otrov mora biti u inaktivnom stanju, ali spreman aktivirati se prilikom ugriza. Zna biti pohranjen i mjesecima pa su navedeni inhibitori ključni u održavanju stabilnosti metaloproteinaza i sprječavanju autolize (Mackessy, 1991; Francis i Kaiser, 1993; Munekiyo i Mackessy, 2005). Inhibitori metaloproteinaza su tripeptidi poput piroglutamat-lizin-triptofana (pEKW) (Wagstaff i sur., 2008), piroglutamat-glutamin-triptofana (pEQW) (Francis i Kaiser, 1993) ili peptidi poput poli-histidin-poli-glicina (pHpG) (Wagstaff i sur., 2008). U otrovu podvrste *Vipera ammodytes ammodytes* identificiran je tripeptid pEKW (Sajevic i sur., 2014).

Natrijuretski peptidi (NPs) su peptidi koji izazivaju natrijurezu, diurezu i vazodilataciju (Kerkelä i sur., 2015). Nalazimo ih u otrovu zmija gdje sudjeluju u onesposobljavanju plijena.

Izazivaju hipotenziju koja pridonosi gubitku svijesti (Fry i sur., 2006). Građeni su od 35 do 40 aminokiselina, a karakterizira ih prsten sastavljen od 17 aminokiselina povezan s dvije disulfidne veze (Amininasab i sur., 2004; Fry i sur., 2005b; Vink i sur., 2012; Leonardi i sur., 2019). Identificirani su i u otrovu jedinki podvrste *Vipera ammodytes ammodytes* iz Hrvatske (Leonardi i sur., 2019).

Bradikinin-potencirajući peptidi (BPPs) su inhibitori angiotenzin-konvertirajućeg enzima (ACE) koji uzrokuju hipotenziju. Inhibicijom navedenog enzima sprječava se nastanak angiotenzina II, vazokonstriktora i hipertenzivnog agensa, iz angiotenzina I i cijepanje bradikininina, hipotenzivnog agensa (Dendorfer i sur., 1999; Fernandez i sur., 2004). Identificirani su i u otrovu zmija (Sciani i Pimenta, 2017), između ostalog i u otrovu podvrste *Vipera ammodytes ammodytes* iz Hrvatske (Leonardi i sur., 2019). Bradikinin-potencirajući peptidi iz otrova zmija su peptidi bogati prolinom koji sadrže manje od 14 aminokiselina. Na N-kraju sadrže piroglutamat, a na C-kraju prolin ako se sastoje od manje od 5 aminokiselina ili tripeptid izoleucin-prolin-prolin ako se sastoje od više od 5 aminokiselina (Ianzer i sur., 2004).

1.1.2. Djelovanje otrova poskoka

Envenomacija je proces unošenja otrova u tijelo žrtve najčešće ugrizom ili ubodom (www.nsw.gov.au). Gornji i donji ekstremiteti najčešća su mjesta ugriza poskoka, rjeđe glava i vrat koja predstavljaju izrazito opasna mjesta. Najviše slučajeva envenomacije zabilježeno je kod osoba srednje životne dobi koje se bave poljoprivredom te djece i adolescenata koji su provodili vrijeme u prirodi. Proljeće i ljeto godišnja su doba tijekom kojih je zabilježeno najviše slučajeva, poglavito razdoblje od srpnja do listopada (Radonić i sur., 1997; Frangides i sur., 2006; Lukšić i sur., 2006).

Simptomi mogu biti lokalni i sistemski. Kod lokalnih izdvaja se pojava edema uz bol. Njihova veličina varira, mogu biti jedva vidljivi, ali i zahvatiti cijeli ekstremitet šireći se na trup. U velikom postotku dolazi i do diskoloracije kože i ehimoze, tj. pojave modrica, kao i regionalnog limfadenitisa, odnosno oticanja lokalnih limfnih čvorova. U manjem postotku zabilježena je pojava hemoragijskih mjehura, nekroze kože i mišića, tromboflebitisa i infekcija poput celulitisa. Najčešći sistemski simptomi su oni gastrointestinalni poput mučnine, povraćanja i proljeva. Uglavnom su popraćeni hipertermijom koja ne prelazi 38°C, ponekad tahikardijom i nesvjesticom. Kod manjeg broja slučajeva dolazi do pareze ili paralize kranijalnih živaca, najčešće 3. kranijalnog ili okulomotornog živca koja se manifestira palpebralnom ptozom, tj.

abnormalnim spuštanjem gornjeg kapka. Zahvaćanjem ostalih kranijalnih živaca može doći do oftalmoplegije, disfagije i disfonije. Kod manjeg broja slučajeva može doći depresije središnjeg živčanog sustava uz hipotenziju i stanje šoka. Zabilježeno je i reverzibilno smanjenje funkcije bubrega i jetre koja se još tijekom hospitalizacije vrate na normalnu razinu. Kod nezanemarivog broja pacijenata zabilježena je leukocitoza, a manjeg broja anemija i trombocitopenija (Frangides i sur., 2006; Luksić i sur., 2006; Marinov i sur., 2010; Karabuva i sur., 2016).

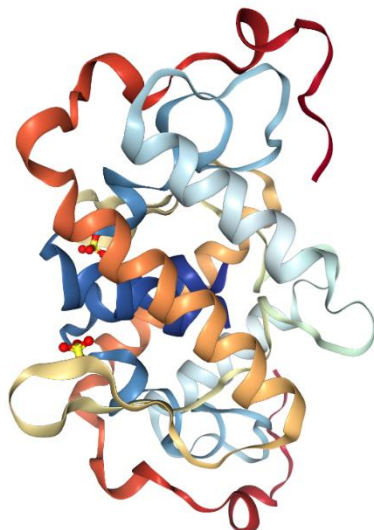
1.2. Amoditoksin A

AtxA je sekrecijska fosfolipaza (sPLA₂) izolirana iz otrova vrste *Vipera ammodytes* (Ritonja i Gubenšek, 1985). Presinaptički je neurotoksin koji inhibira sekreciju acetilkolina u neuromuskulatornoj vezi što dovodi do paralize respiratornih mišića (Chang, 1985), ali mehanizam djelovanja još nije do kraja razjašnjen (Pungerčar i Križaj, 2007). Smatra se da neselektivno enzimsko djelovanje nije jedino odgovorno za neurotoksičnost (Petan i sur., 2005), već da se vezanjem za različite unutarstanične i vanstanične ciljane proteine ostvaruje potpuno toksično djelovanje (Križaj i Gubenšek, 2000; Kini, 2003; Pungerčar i Križaj, 2007). Ostvareni neurotoksičan učinak posljedica je kompleksnog procesa koji se sastoji od razdvojenih koraka za koje su zaslužni različiti dijelovi molekule (Pungerčar i Križaj, 2007). Klaster YIRN, aromatski ostaci F24 i F124 te M7 i G11 na N-kraju identificirani su kao ključni (Priatelj i sur., 2008).

1.2.1. Struktura amoditoksina A

Amoditoksin A (AtxA) je polipeptid koji se sastoji od 122 aminokiseline (Ritonja i Gubenšek, 1985). Kao i sve fosfolipaze iz grupe IIa sadrži 7 disulfidnih veza na točno određenim mjestima i kanonsku strukturu karakterističnu za fosfolipaze iz te grupe: α -heliks A na N-kraju (položaj 1-14), kratki heliks B (položaj 16-22), petlja koja veže kalcijeve ione (položaj 25-35), dugi α -heliks C (položaj 39-57), petlja koja prethodi antiparalelnoj β -ploči (položaji 75-58 i 81-84), dugi α -heliks D (antiparalelan α -heliksu C, položaj 89-109) i ekstenzija na C-kraju (položaj 110-133) gdje su prisutna i dva vrlo kratka okreta strukture heliksa (Slika 2). Hidrofobni kanal aktivno je mjesto kojeg tvore His48, Tyr52, Tyr73 i Asp99 (Saul i sur., 2010). Njega okružuje

površina za međusobno povezivanje (Snitko i sur., 1997) koju tvore Leu2, Leu3, Leu19, Thr20, Phe24, Val31, Ser67, Lys69, Thr70, Arg72, Lys74, Tyr113, Arg118, Asn119, Phe124 (Petan i sur., 2005). Njihovi bočni ogranci su fleksibilni što omogućuje zauzimanje pravilne orijentacije prilikom vezanja za fosfolipide i njihovu hidrolizu (Saul i sur., 2010). U kristaliziranom obliku prisutni su kao homodimeri. Dvije asimetrične podjedinice, tj. molekule međusobno su povezane hidrofobnim interakcijama α -heliksa A na N-kraju svake podjedinice tvoreći hidrofobni vezujući džep prilikom čega Met7 ima esencijalnu ulogu i vodikovim vezama između Ser23 i Arg72. Met7 je važan za neurotoksičnost (Prijatelj i sur., 2008) jer dimerizacijom površina postaje prikladnija za vezanje na ciljne proteine (Saul i sur., 2010).



Slika 2. Kristalna struktura amoditoksina A (preuzeto sa: www.rcsb.org)

AtxA ne posjeduje jedno mjesto odgovorno za neurotoksičnost već se smatra da su za to zaslužni različiti dijelovi molekule, odnosno aminokiseline prisutne i na N-kraju i C-kraju (Prijatelj i sur., 2008). Klaster YIRN koji se sastoji od Y115, I116, R118 i N119, aminokiselina na C-kraju, od najvećeg je značaja za neurotoksičnost (Ivanovski i sur., 2000; Prijatelj i sur., 2008). Uz njega na C-kraju važan je i ostatak F124 (Prijatelj i sur., 2008). Na N-kraju nalazimo F24, aromatsku aminokiselinu odgovornu za neurotoksičnost i enzimsku aktivnost (Petan i sur.,

2002). Uz spomenuti ostatak na N-kraju važni su M7 i G11 (Prijetelj i sur., 2008). Ostatak V31 ima značajan utjecaj na enzimsku aktivnost, a slabiji na neurotoksičnost (Petan i sur., 2005). Aminokiseline odgovorne za neurotoksičnost su ujedno i one odgovorne za vezanje na ciljne proteine. Ostaci na C-kraju, a poglavito klaster YIRN je ključan prilikom vezanja na kalmodulin (CaM) i R25, dok N-kraj ima manju ulogu (Petan i sur., 2002; Prijetelj i sur., 2002; Prijetelj i sur., 2003; Prijetelj i sur., 2008). Za vezanje na R180 važni su ostaci na C-kraju, poglavito klaster YIRN, ostaci blizu petlje koja veže kalcijeve ione te oni na N-kraju (Lambeau i sur., 1995; Ivanovski i sur., 2000; Prijetelj i sur., 2008).

1.2.2. Djelovanje amoditoksina A

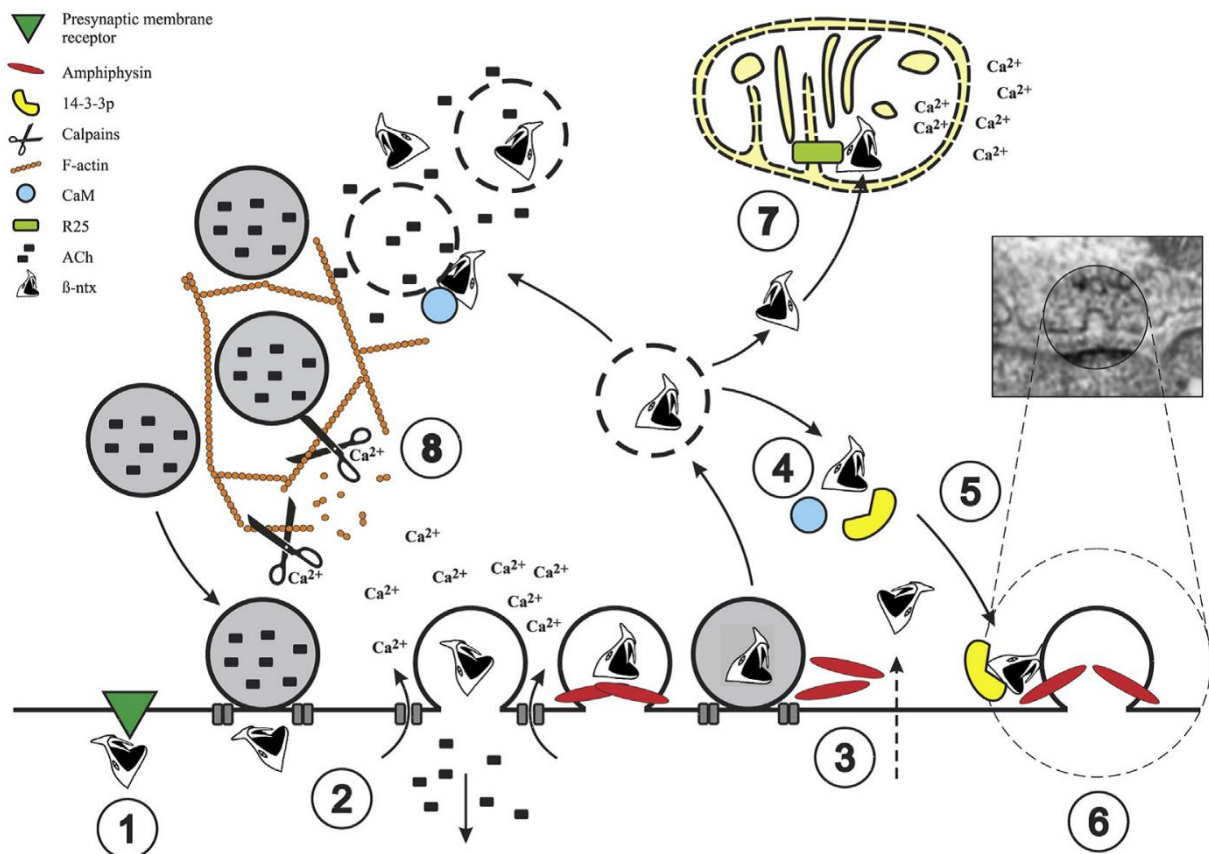
AtxA je presinaptički ili β -neurotoksin koji djeluje na presinaptičku membranu u neuromuskulatornoj vezi (Lee i sur., 1984). Envenomacijom AtxA djeluje na periferni živčani sustav, točnije na kolinergične motoneurone. U vrlo maloj količini prelazi barijeru krv-mozak (Gubenšek i sur., 1982), ali je izrazito toksičan izravnim unosom u središnji živčani sustav (Križaj, 2011). Inhibira sekreciju acetilkolina u tri faze. U prvoj fazi ubrzo nakon unosa AtxA inhibira se sekrecija acetilkolina koja traje nekoliko minuta. U drugoj fazi dolazi do pojačane sekrecije koja dostiže vrhunac nakon 10 do 20 minuta. U trećoj fazi sekrecija postepeno pada do konačnog ireverzibilnog prestanka neuromuskulatorne transmisije nakon 60-90 minuta (Lee i sur., 1984; Prijetelj i sur., 2006). Međutim, i dalje dolazi do spontane sekrecije slabog intenziteta što ukazuje na činjenicu da nije došlo do ekstenzivne fuzije sinaptičkih vezikula u živčanom završetku, odnosno da AtxA ne djeluje na transportere acetilkolina (Logonder i sur., 2008). Prva faza neovisna je o enzimskoj aktivnosti (Prijetelj i sur., 2006) već se smatra da je za početnu inhibiciju sekrecije acetilkolina zaslužno vezanje na presinaptičku membranu (Križaj, 2011). Ono može biti nespecifično, usmjereno na neproteinska mjesta na membrani i specifično, usmjereno na proteinske receptore na membrani poput N-tipa sPLA₂ receptora koji su važni za neurotoksičnost (Križaj i sur., 1994; Križaj i sur., 1995; Križaj i sur., 1997) i M-tipa sPLA₂ receptora poput R180 koji nije ključan za neurotoksičnost (Čopić i sur., 1999; Vardjan i sur., 2001; Prijetelj i sur., 2006). Druga faza također je neovisna o enzimskoj aktivnosti (Prijetelj i sur., 2006). Postoje indicije da pojačanu sekreciju acetilkolina uzrokuje interferencija s K⁺ kanalima ovisnima o naponu tako da dolazi do inhibicije ulaska K⁺ iona u stanicu, ali one nisu do kraja potvrđene (Križaj i sur., 1995; Fathi H i sur., 2001). Treća faza ovisna je o enzimskoj aktivnosti (Prijetelj i sur., 2006).

Djelovanjem AtxA dolazi do morfoloških promjena motoneurona. Na živčanom završetku mitohondriji su oštećeni i natečeni, smanjuje se broj sinaptičkih vezikula, stvaraju se Ω strukture na presinaptičkoj membrani i fragmentira se citoskelet (Lee i sur., 1984; Pungercar i Križaj, 2007; Logonder i sur., 2008).

Mehanizam neurotoksičnosti nije do kraja razjašnjen, ali se smatra da je posljedica vanstaničnog i unutarstaničnog djelovanja AtxA koje se ostvaruje enzimskom aktivnošću i interakcijom s unutarstaničnim ciljnim proteinima (Pungercar i Križaj, 2007). AtxA je sekrecijska fosfolipaza (sPLA₂), enzim koji hidrolizira *sn*-2 estersku vezu glicerofosfolipida čime nastaju lizofosfolipidi i slobodne masne kiseline (Berg i sur., 2001). Posjeduju visok afinitet za stanične membrane koje su bogate anionskim fosfolipidima (Petan i sur., 2005). Njihovom hidrolizom nastaju produkti koji uzrokuju oštećenje stanične membrane i stanice (Petan i sur., 2007). Iako je enzimska aktivnost ključna za neurotoksičnost (Šribar i sur., 2014), nije poznata korelacija između stupnja enzimске aktivnosti i toksičnosti, tj. letalnosti (Pungercar i Križaj, 2007). Da bi se ostvarila potpuna neurotoksičnost mora doći do internalizacije AtxA, tj. ulaska u stanicu. Međutim, točan mehanizam translokacije kroz staničnu membranu neurona još nije poznat (Šribar i sur., 2014). Kalmodulin je prvi otkriveni unutarstanični ciljni protein (Šribar i sur., 2001). Regulatorni je protein lokaliziran u citosolu eukariotskih stanica koji sudjeluje u mnogim staničnim aktivnostima, primjerice fuziji vezikula (Peters i Mayer, 1998; Chin i Means, 2000). On djeluje kao aktivator AtxA povećavajući njegovu enzimsku aktivnost u citosolu (Kovačić i sur., 2009). AtxA se veže na γ i ϵ izoformu 14-3-3 regulatornih proteina. Smješteni su u citosolu gdje posreduju kod protoka iona, neurotransmisije i apoptoze (Šribar i sur., 2003b). AtxA veže i R25, integralni membranski protein lokaliziran u mitohondrijima (Vučemilo i sur., 1998; Šribar i sur., 2003a). On je podjedinica II citokrom c oksidaze čime se remeti sinteza ATP-a u živčanim završecima (Šribar i sur., 2019).

AtxA ostvaruje toksičan učinak u više koraka (Slika 3). Veže se na proteinske receptore na presinaptičkoj membrani neuromuskulatorne veze i hidrolizira fosfolipide u vanjskom sloju čime potiče egzocitozu sinaptičkih vezikula punih acetilkolinom i provodljivost određenih Ca²⁺ kanala. Brzo internalizira i translocira u citosol i mitohondrije. Ulazi u interakciju s raznim proteinima u citosolu, primjerice kalmodulinom koji potiče njegovu enzimsku aktivnost i 14-3-3 proteinima koji usmjeravaju AtxA na mjesto endocitoze sinaptičkih vezikula na staničnoj membrani. Hidrolizira fosfolipide u unutarnjem sloju membrane čime mijenja njenu morfologiju što se očituje nastankom Ω struktura. Narušava se i morfologija i funkcija mitohondrija. Remeti se struktura stanične membrane i narušava funkcija amfifizina koji ima

ulogu kod endocitoze sinaptičkih vezikula. Vezanjem na R25 u mitohondrijima povećava se permeabilnost pora što uzrokuje prijelaz Ca^{2+} u citosol te se smanjuje sinteza ATP-a. Na povećanje koncentracije Ca^{2+} iona u citosolu utječe i hidroliza fosfolipida u staničnoj membrani kojoj se na taj način povećava permeabilnost. Visoka razina Ca^{2+} iona aktivira kalpaine, proteinaze koje hidroliziraju citoskelet što vodi do degradacije živčanog završetka (Šribar i sur., 2014).



Slika 3. Prikaz pretpostavljenog mehanizma djelovanja amoditoksina A na staničnoj razini (Šribar i sur., 2014)

1.3. Teorija molekularnog prepoznavanja

Teorija molekularnog prepoznavanja sugerira da sens peptid i njegov komplementarni antisens peptid ulaze u interakciju preko aminokiselina na temelju hidropatskih karakteristika (Štambuk i sur., 2005). Sens peptid sintetizira se temeljem slijeda nukleotida na sens lancu DNA u smjeru 5'-3', a antisens peptid na antisens lancu DNA u istom smjeru (Heal i sur., 2002). Hidropatija

označava hidrofilna i hidrofobna svojstva aminokiselina pri čemu je svakoj od 20 poznatih aminokiselina pridružena određena vrijednost. Hidrofobne aminokiseline (A, C, F, I, L, M, V) imaju vrijednost od +4,5 do +1,8, blago hidrofilne ili neutralne (G, P, S, T, W, Y) od -0,4 do -1,6, a hidrofilne (H, R, K, N, D, Q, E) od -3,2 do -4,5 (Kyte i Doolittle, 1982). Hidropatski karakter aminokiseline određen je drugom bazom kodona. Uracil uvjetuje sintezu hidrofobne aminokiseline, adenin hidrofilne, a citozin ili gvanin neutralne. Kako su adenin i uracil te citozin i gvanin bazni parovi prema Watson-Cricku, sens i antisens lanac sadrže informaciju za sintezu aminokiseline, odnosno peptida suprotnih hidropatskih karakteristika (Blalock, 1995). Ako se na kodirajućem ili sens lancu DNA nalaze kodoni za hidrofobne aminokiseline na nekodirajućem ili antisens lancu će im biti pridruženi kodoni za hidrofilne aminokiseline. S druge strane, ako se na sens lancu DNA nalaze kodoni za hidrofilne aminokiseline na antisens lancu će im biti pridruženi kodoni za hidrofobne aminokiseline. Kodonima za blago hidrofilne i neutralne aminokiseline na sens lancu također su uglavnom pridruženi kodoni za blago hidrofilne i neutralne aminokiseline na antisens lancu (Blalock i Smith, 1984). Zbog međusobno suprotnih hidropatskih svojstava vjeruje se da sens i antisens peptidi imaju komplementarnu sekundarnu i tercijarnu strukturu zbog čega specifično ulaze u interakciju visokim afinitetom (Blalock, 1995).

Za komplementarne peptide koji zauzimaju konformaciju β -ploče zabilježen je najveći afinitet vezanja. Postranični lanci hidrofobnih aminokiselina orijentirani su prema unutrašnjosti povezujući se hidrofobnim interakcijama, dok su postranični lanci hidrofilnih aminokiselina orijentirani prema van. Međutim, ovakve interakcije su zabilježene kod peptida koji se sastoje od sljedova hidrofobnih pa hidrofilnih aminokiselina što uglavnom nije slučaj (Markus i sur., 1989). Smatra se da uz hidrofobne interakcije i elektrostatske te vodikove veze sudjeluju u povezivanju sens i antisens peptida. Postranični lanac hidrofobnih aminokiselina povezuje se hidrofobnim interakcijama s glavnim ugljikovodičnim lancem antisens peptida. On također može tvoriti vodikove veze s postraničnim lancem hidrofilnih aminokiselina. Povezivanje pojačavaju van der Waalove veze koje nastaju među hidrofobnim dijelovima postraničnih lanaca sens i antisens peptida (Brentani, 1988).

Eksperimentalno je utvrđeno da je njihovo vezanje „konformacijski degenerirano“, odnosno da se vezanje ostvaruje na više različitih mjesta prilikom čega se stvaraju klasteri stabilnih nekovalentnih veza među određenim aminokiselinama. Zabilježeno je da se duži peptidi vežu jačim afinitetom nego kraći (Shai i sur., 1987; Shai i sur., 1989; Fassina i sur., 1989; Heal i sur., 2002).

Tablica 1. Sens aminokiseline i njihove komplementarne antisens aminokiseline (Štambuk i sur., 2005)

Sens aminokiseline	Antisens aminokiseline (smjer 5'-3')	Antisens aminokiseline (smjer 3'-5')
Izoleucin (I)	Y, N, D	Y
Valin (V)	H, N, D, Y	H, Q
Leucin (L)	E, K, Q	N, E, D
Fenilalanin (F)	K, E	K
Cistein (C)	T, A	T
Metionin (M)	H	Y
Alanin (A)	R, G, S, C	R
Glicin (G)	P, S, T, A	P
Treonin (T)	G, S, C, R	C, W
Triptofan (W)	P	T
Serin (S)	R, G, T, A	S, R
Tirozin (Y)	I, V	M, I
Prolin (P)	G, W, R	G
Histidin (H)	V, M	V
Aspartat (D)	I, V	L
Glutamat (E)	L, F	L
Asparagin (N)	I, V	L
Glutamin (Q)	L	V
Lizin (K)	F, L	F
Arginin (R)	A, S, P, T	A, S

Većina aminokiselina može ući u interakciju s nekoliko različitih aminokiselina (Tablica 1). To je posljedica degeneracije genetskog koda, odnosno pojave kod koje aminokiseline mogu biti kodirane s nekoliko različitih kodona (Heal i sur., 2002). Zbog toga može postojati nekoliko komplementarnih antisens peptida čak i za kratak sens peptid (Štambuk i sur., 2005). 3'-5' i 5'-3' antisens peptidi su definirani smjerom čitanja slijeda nukleotida, tj. kodona mRNA. Kako druga baza kodona određuje hidropatsku vrijednost aminokiseline 3'-5' i 5'-3' antisens peptidi trebali bi imati slične hidropatske karakteristike i na sličan način ući u interakciju sa sens peptidom (Heal i sur., 2002). Međutim, čitanjem kodona u smjeru 3'-5' smanjuje se degeneracija genetskog koda zbog čega se smanjuje broj antisens aminokiselina (Root-Bernstein, 1982; Root-Bernstein, 1983). To svojstvo je korisno kod dizajniranja antisens peptida jer se smanjuje broj potencijalnih kombinacija. Ipak, jedinstven i jasan algoritam za dizajn antisens peptida i dalje nije utvrđen. Antisens peptidi mogu se dizajnirati na temelju primarne strukture sens peptida tako da sadrži aminokiseline koje su najvjerojatnije komplementarne onima u sens peptidu (Heal i sur., 2002; Štambuk i sur., 2005).

Antisens peptid vezanjem na sens peptid može inhibirati njegovo djelovanje (Heal i sur., 2002). To se može postići stvaranjem sens-antisens kompleksa čime se smanjuje koncentracija slobodnog sens peptida raspoloživog za djelovanje, djelovanjem antisens peptida kao parcijani antagonist receptora za sens peptide, kombinacijom ova dva mehanizma ili nekim mehanizmom neovisnim o sens peptidu i njegovom receptoru koji još nije objašnjen (Štambuk i sur., 2005).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Imunoglobulini zmijskog protuotrova jedini su lijek koji se koristi u terapijske svrhe prilikom envenomacije. Proizvodi se imunizacijom velikih životinja, primjerice konja ili ovce. Injektira im se zmijski otrov na kojeg se stvaraju antitijela koja se potom iz hiperimunizirane plazme izoliraju. Nedostaci ovog načina proizvodnje su višestruki. Postupak je skup, dugotrajan i tehnološki zahtjevan, skladištenje pripravaka je složeno koje je nužno za održavanje stabilnosti te podižu razna etička pitanja zbog korištenja i patnje životinja (www.who.int).

Cilj ovog rada eksperimentalno je odrediti afinitet vezanja komplementarnih antisens peptida na sens peptide koji predstavljaju mjesta u strukturi amoditoksina A koja su odgovorna za neurotoksičnost. Vezanjem inhibirao bi se biološki učinak toksina i spriječila letalnost. Takvi antisens peptidi mogli bi biti upotrijebljeni za terapiju envenomacije. Njihovom primjenom izbjegli bi se negativni aspekti danas korištenih imunoglobulina. Upotrebom protuotrova može doći do imunosne reakcije primatelja usmjerene prema stranim imunoglobulinima što za peptide ne bi bio slučaj. Također, cijena proizvodnje bila bi niža uz olakšan transport i skladištenje zbog dužeg roka stabilnosti.

Kao mjesta odgovorna za neurotoksičnost u strukturi amoditoksina A identificirani su ostaci M7, G11 i P24 na N-kraju i Y115, I116, R118, N119 i P124 na C-kraju. U mjerenjima nije korištena cijela molekula amoditoksina A već njeni segmenti: sens1 peptid (s1) i sens2 peptid (s2). Primarna struktura sens1 peptida je GMMILG (Gly-Met-Met-Ile-Leu-Gly) koja je identična slijedu aminokiselina amoditoksina A od položaja 6 do položaja 11. Sens1 peptid na drugom mjestu sadrži metionin, a na šestom glicin koji predstavljaju M7 i G11 u amoditoksinu A. Primarna struktura sens2 peptida je YIYRNYPDF (Tyr-Ile-Tyr-Arg-Asn-Tyr-Pro-Asp-Phe) koja je identična slijedu aminokiselina amoditoksina A od položaja 115 do položaja 124. Sens2 peptid na prvom mjestu sadrži tirozin, na drugom izoleucin, četvrtom arginin, petom asparagin i devetom fenilalanin koji predstavljaju Y115, I116, R118, N119 i P124 u amoditoksinu A. Na temelju strukture sens1 i sens2 peptida dizajnirani su njihovi potencijalno komplementarni antisens peptidi. Uz pomoć prof. Štambuka s Instituta Ruđer Bošković predložena su po dva antisens peptida za svaki sens peptid koji posjeduju najveću teorijsku vjerojatnost vezanja, a da ujedno jedan peptid ima svojstvo fluorescencije, a njemu komplementaran ne. Za sens1 peptid predloženi su sens1antisens1 peptid (s1a1) i sens1antisens2 peptid (s1a2), a za sens2 peptid sens2antisens1 peptid (s2a1) i sens2antisens2 peptid (s2a2). Primarna struktura sens1antisens1 peptida je SHHYEP (Ser-His-His-Tyr-Glu-Pro), sens1antisens2 peptida SHHYSP (Ser-His-

His-Tyr-Ser-Pro), sens2antisens1 peptida INISIVGVK (Ile-Asn-Ile-Ser-Ile-Val-Gly-Val-Lys) i sens2antisens2 peptida VNISVIGIK (Val-Asn-Ile-Ser-Val-Ile-Gly-Ile-Lys).

Vežanje sens i njihovih pripadajućih antisens peptida praćeno je fluorescencijskom spektroskopijom. Metoda je primjenjiva jer dolazi do mogućeg vežanja jednog peptida koji nema svojstvo fluorescencije i drugog koji to svojstvo posjeduje. Peptid ima svojstvo fluorescencije ako sadrži aromatske aminokiseline (fenilalanin, tirozin, triptofan) (Lakowicz JR, 1999). Sens1 peptid ne sadrži aromatske aminokiseline, a njegovi antisens peptid posjeduju jedan tirozin. S druge strane, sens2 peptid sadrži 3 tirozina i 1 fenilalanin, a njegovi antisens peptidi ne posjeduju aromatske aminokiseline.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije i pribor

- sens1 peptid (m = 21,5 mg, pročišćenost 95,9 %, proizvođač GenScript)
- sens1antisens1 peptid (m = 24,1 mg, pročišćenost 98,5 %, proizvođač GenScript)
- sens1antisens2 peptid (m = 24,8 mg, pročišćenost 99,7 %, proizvođač GenScript)
- sens2 peptid (m = 24,2 mg, pročišćenost 98,9 %, proizvođač GenScript)
- sens2antisens1 peptid (m = 24,0 mg, pročišćenost 95,3 %, proizvođač GenScript)
- sens2antisens2 peptid (m = 20,2 mg, pročišćenost 95,5 %, proizvođač GenScript)
- dimetilsulfoksid (DMSO) (Kemika d.d., Heinzlova 53, Zagreb)
- redestilirana voda (re-H₂O)
- Eppendorf tubice (1,5 mL)
- plastične epruvete (5 mL)
- staklena čaša (50 mL)
- stakleni praščić za vaganje
- gumeni stalak za plastične Eppendorf tubice
- metalna špatula
- stakleni štapić
- automatske pipete (0,5 µL - 10 µL, 10 µL - 100 µL, 100 µL - 1000 µL, 0,5 mL - 5 mL, proizvođač Eppendorf)
- kvarcna kiveta

3.1.2. Instrumenti

- miješalica vortex za epruvete (proizvođač Cole-Parmer, tip Cole-Parmer Vortex Mixer, 0 to 2850 rpm, 230 VAC)
- ionizator zraka (proizvođač SCS, tip 963E)
- sušionik (proizvođač Instrumentarnica, tip ST 01/02)
- digitalna vaga (proizvođač Mettler Toledo, tip AG245)
- spektrofluorimetar (proizvođač Olis, tip RSM 1000)

3.2. Metode

3.2.1. Priprema otopina sens i antisens peptida

Otopine sens i antisens peptida pripremaju se otapanjem liofiliziranih prašaka sens i antisens peptida u 100% otopini DMSO-a. Prvo se pripravi koncentrirana *stock* otopina iz koje se razrjeđivanjem pripremi otopina željene koncentracije. Otopina željene koncentracije nije izravno pripravljena jer je lakše izvagati veću masu praška za priređivanje *stock* otopine nego precizno odrediti izrazito male mase.

Priprema otopine sens1 peptida:

Cilj je priprema otopine sens1 peptida koncentracije $4 \cdot 10^{-4}$ mol/L ($c = 4 \cdot 10^{-4}$ mol/L). Molarna masa sens1 peptida je 621 g/mol ($M = 621$ g/mol). Željena masa liofiliziranog praška sens1 peptida određuje se digitalnom vagom. Metalnom špatulom prinosi se prašak na prethodno tarirani stakleni praščić za vaganje. Odvaga od 0,0013 g ($m = 0,0013$ g) prenese se iz staklenog praščića za vaganje u Eppendorf tubicu gdje se otopi u što manjoj količini 100% otopine DMSO-a u svrhu postizanja što veće koncentracije. Otapanjem navedene mase sens1 peptida u 200 μ L 100% otopine DMSO-a ($V = 200$ μ L) nastaje otopina sens1 peptida koncentracije $1,05 \cdot 10^{-2}$ mol/L ($c = 1,05 \cdot 10^{-2}$ mol/L).

$$c_{\text{exp}} = \frac{n}{V} = \frac{m_{\text{exp}}}{M \cdot V}$$

$$c_{\text{exp}} = \frac{0,0013 \text{ g}}{621 \text{ g/mol} \cdot 200 \cdot 10^{-6} \text{ L}}$$

$$c_{\text{exp}} = 1,05 \cdot 10^{-2} \text{ mol/L}$$

Razrjeđivanjem nastale otopine pripraviti će se otopina koncentracije $4 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ ($c = 4 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$) i volumena $800 \mu\text{L}$ ($V = 800 \mu\text{L}$). Automatskom pipetom prenese se $30,48 \mu\text{L}$ otopine sens1 peptida koncentracije $1,05 \cdot 10^{-2} \text{ mol/L}$ u Eppendorf tubicu i razrijedi se dodatkom $769,52 \mu\text{L}$ 100% otopine DMSO-a tako da ukupan volumen bude $800 \mu\text{L}$.

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

$$4 \cdot 10^{-4} \text{ M} \cdot 800 \mu\text{L} = 1,05 \cdot 10^{-2} \text{ M} \cdot V_2$$

$$V_2 = 30,48 \mu\text{L}$$

$$V (\text{DMSO}) = 800 \mu\text{L} - V_2 = 800 \mu\text{L} - 30,48 \mu\text{L} = 769,52 \mu\text{L}$$

Priprema otopine sens1antisens1 peptida:

Cilj je priprema otopine sens1antisens2 peptida koncentracije $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$ ($c = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$). Molarna masa sens1antisens2 peptida je 769 g/mol ($M = 769 \text{ g/mol}$). Željena masa liofiliziranog praška sens1antisens1 peptida određuje se digitalnom vagom. Metalnom špatulom prinosi se prašak na prethodno tarirani stakleni praščić za vaganje. Odvaga od $0,0034 \text{ g}$ ($m = 0,0034 \text{ g}$) prenese se iz staklenog praščića za vaganje u Eppendorf tubicu gdje se otopi u što manjoj količini 100% otopine DMSO-a u svrhu postizanja što veće koncentracije. Otapanjem navedene mase sens1antisens1 peptida u $400 \mu\text{L}$ 100% otopine DMSO-a ($V = 400 \mu\text{L}$) nastaje otopina sens1antisens1 peptida koncentracije $1,11 \cdot 10^{-2} \text{ mol/L}$ ($c = 1,11 \cdot 10^{-2} \text{ mol/L}$).

$$c_{\text{exp}} = \frac{n}{V} = \frac{m_{\text{exp}}}{M \cdot V}$$

$$c_{\text{exp}} = \frac{0,0034 \text{ g}}{769 \text{ g/mol} \cdot 400 \cdot 10^{-6} \text{ L}}$$

$$c_{\text{exp}} = 1,11 \cdot 10^{-2} \text{ mol/L}$$

Razrjeđivanjem nastale otopine pripraviti će se otopina koncentracije $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$ ($c = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$) i volumena $3000 \mu\text{L}$ ($V = 3000 \mu\text{L}$). Automatskom pipetom prenese se $1,35 \mu\text{L}$ otopine sens1antisens1 peptida koncentracije $1,11 \cdot 10^{-2}$ u Eppendorf tubicu i razrijedi se dodatkom $2998,65 \mu\text{L}$ 100% otopine DMSO-a tako da ukupan volumen bude $3000 \mu\text{L}$.

$$\begin{aligned}c_1 \cdot V_1 &= c_2 \cdot V_2 \\5 \cdot 10^{-6} \text{ M} \cdot 3000 \mu\text{L} &= 1,11 \cdot 10^{-2} \text{ M} \cdot V_2 \\V_2 &= 1,35 \mu\text{L}\end{aligned}$$

$$V (\text{DMSO}) = 3000 \mu\text{L} - V_2 = 3000 \mu\text{L} - 1,35 \mu\text{L} = 2998,65 \mu\text{L}$$

Priprema otopine sens1antisens2 peptida:

Cilj je priprema otopine sens1antisens2 peptida koncentracije $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$ ($c = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$). Molarna masa sens1antisens2 peptida je 727 g/mol ($M = 727 \text{ g/mol}$). Željena masa liofiliziranog praška sens1 peptida određuje se digitalnom vagom. Metalnom špatulom prinosi se prašak na prethodno tarirani stakleni praščić za vaganje. Odvaga od $0,0017 \text{ g}$ ($m = 0,0017 \text{ g}$) prenese se iz staklenog praščića za vaganje u Eppendorf tubicu gdje se otopi u što manjoj količini 100% otopine DMSO-a u svrhu postizanja što veće koncentracije. Otapanjem navedene mase sens1antisens2 peptida u $200 \mu\text{L}$ 100% otopine DMSO-a ($V = 200 \mu\text{L}$) nastaje otopina sens1antisens2 peptida koncentracije $1,17 \cdot 10^{-2} \text{ mol/L}$ ($c = 1,17 \cdot 10^{-2} \text{ mol/L}$).

$$c_{\text{exp}} = \frac{n}{V} = \frac{m_{\text{exp}}}{M \cdot V}$$

$$c_{\text{exp}} = \frac{0,0017 \text{ g}}{727 \text{ g/mol} \cdot 200 \cdot 10^{-6} \text{ L}}$$

$$c_{\text{exp}} = 1,17 \cdot 10^{-2} \text{ mol/L}$$

Razrjeđivanjem nastale otopine pripravit će se otopina koncentracije $5 \cdot 10^{-6}$ mol/L ($c = 5 \cdot 10^{-6}$ mol/L) i volumena 3000 μ L ($V = 3000 \mu$ L). Automatskom pipetom prenesemo 1,28 μ L otopine sens1antisens2 peptida koncentracije $1,17 \cdot 10^{-2}$ mol/L u Eppendorf tubicu i razrijedi se dodatkom 2998,72 μ L 100% otopine DMSO-a tako da ukupan volumen bude 3000 μ L.

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

$$5 \cdot 10^{-6} \text{ M} \times 3000 \mu\text{L} = 1,17 \cdot 10^{-2} \text{ M} \cdot V_2$$

$$V_2 = 1,28 \mu\text{L}$$

$$V (\text{DMSO}) = 3000 \mu\text{L} - V_2 = 3000 \mu\text{L} - 1,28 \mu\text{L} = 2998,72 \mu\text{L}$$

Priprema otopine sens2 peptida:

Cilj je priprava otopine sens2 peptida koncentracije $5 \cdot 10^{-6}$ mol/L ($c = 5 \cdot 10^{-6}$ mol/L). Molarna masa sens2 peptida je 1250 g/mol ($M = 1250$ g/mol). Željena masa liofiliziranog praška sens2 peptida određuje se digitalnom vagom. Metalnom špatulom prinosi se prašak na prethodno tarirani stakleni praščić za vaganje. Odvaga od 0,0016 g ($m = 0,0016$ g) prenese se iz staklenog praščića za vaganje u Eppendorf tubicu gdje se otopi u što manjoj količini 100% otopine DMSO-a u svrhu postizanja što veće koncentracije. Otapanjem navedene mase sens2 peptida u 200 μ L 100% otopine DMSO-a ($V = 200 \mu$ L) nastaje otopina sens2 peptida koncentracije $6,40 \cdot 10^{-3}$ mol/L ($c = 6,40 \cdot 10^{-3}$ mol/L).

$$c_{\text{exp}} = \frac{n}{V} = \frac{m_{\text{exp}}}{M \cdot V}$$

$$c_{\text{exp}} = \frac{0,0016 \text{ g}}{1250 \text{ g/mol} \cdot 200 \cdot 10^{-6} \text{ L}}$$

$$c_{\text{exp}} = 6,40 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$$

Razrjeđivanjem nastale otopine pripravi se otopina koncentracije $5 \cdot 10^{-6}$ mol/L ($c = 5 \cdot 10^{-6}$ mol/L) i volumena 3000 μ L ($V = 3000 \mu$ L). Automatskom pipetom prenese se 2,35 μ L otopine

sens2 peptida koncentracije $6,40 \cdot 10^{-3}$ mol/L u Eppendorf tubicu i razrijedi se dodatkom 2997,66 μL 100% otopine DMSO-a tako da ukupan volumen bude 3000 μL .

$$\begin{aligned}c_1 \cdot V_1 &= c_2 \cdot V_2 \\5 \cdot 10^{-6} \text{ M} \cdot 3000 \mu\text{L} &= 6,4 \cdot 10^{-3} \text{ M} \cdot V_2 \\V_2 &= 2,34 \mu\text{L}\end{aligned}$$

$$V (\text{DMSO}) = 3000 \mu\text{L} - V_2 = 3000 \mu\text{L} - 2,34 \mu\text{L} = 2997,66 \mu\text{L}$$

Priprema otopine sens2antisens1 peptida:

Cilj je priprema otopine sens2antisens1 peptida koncentracije $4 \cdot 10^{-4}$ mol/L ($c = 4 \cdot 10^{-4}$ mol/L). Molarna masa sens2antisens1 peptida je 942 g/mol ($M = 942$ g/mol). Željena masa liofiliziranog praška sens2antisens1 peptida određuje se digitalnom vagom. Metalnom špatulom prinosi se prašak na prethodno tarirani praščić za vaganje. Odvaga od 0,0011 g ($m = 0,0011$ g) prenese se iz staklenog praščića za vaganje u Eppendorf tubicu gdje se otopi u što manjoj količini 100% otopine DMSO-a u svrhu postizanja što veće koncentracije. Otapanjem navedene mase sens2antisens1 peptida u 150 μL 100% otopine DMSO-a ($V = 150 \mu\text{L}$) nastaje otopina sens2antisens1 peptida koncentracije $7,79 \cdot 10^{-3}$ mol/L ($c = 7,79 \cdot 10^{-3}$ mol/L).

$$\begin{aligned}c_{\text{exp}} &= \frac{n}{V} = \frac{m_{\text{exp}}}{M \cdot V} \\c_{\text{exp}} &= \frac{0,0011 \text{ g}}{942 \text{ g/mol} \cdot 150 \cdot 10^{-6} \text{ L}} \\c_{\text{exp}} &= 7,79 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}\end{aligned}$$

Razrjeđivanjem nastale otopine pripravi se otopina koncentracije $4 \cdot 10^{-4}$ mol/L ($c = 4 \cdot 10^{-4}$ mol/L) i volumena 800 μL ($V = 800 \mu\text{L}$). Automatskom pipetom prenese se 41,07 μL otopine sens2antisens1 peptida koncentracije $7,79 \cdot 10^{-3}$ mol/L u Eppendorf tubicu i razrijedi se dodatkom 758,93 μL 100% otopine DMSO-a tako da ukupan volumen bude 800 μL .

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

$$4 \cdot 10^{-4} \text{ M} \cdot 800 \text{ } \mu\text{L} = 7,79 \cdot 10^{-3} \text{ M} \cdot V_2$$

$$V_2 = 41,07 \text{ } \mu\text{L}$$

$$V (\text{DMSO}) = 800 \mu\text{L} - V_2 = 800 \text{ } \mu\text{L} - 41,07 \text{ } \mu\text{L} = 758,93 \text{ } \mu\text{L}$$

Priprema otopine sens2antisens2 peptida:

Cilj je priprema otopine sens2antsens2 peptida koncentracije $4 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ ($c = 4 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$). Molarna masa sens2antisens2 peptida je 942 g/mol ($M = 942 \text{ g/mol}$). Željena masa liofiliziranog praška sens2antisens2 peptida određuje se digitalnom vagom. Metalnom špatulom prinosi se prašak na prethodno tarirani stakleni praščić za vaganje. Odvaga od $0,0018 \text{ g}$ ($m = 0,0018 \text{ g}$) prenese se iz staklenog praščića za vaganje u Eppendorf tubicu gdje se otopi u što manjoj količini 100% otopine DMSO-a u svrhu postizanja što veće koncentracije. Otapanjem navedene mase sens2antisens2 peptida u $200 \text{ } \mu\text{L}$ 100% otopine DMSO-a ($V = 200 \text{ } \mu\text{L}$) nastaje otopina sens2antisens2 peptida koncentracije $9,55 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$ ($c = 9,55 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$).

$$c_{\text{exp}} = \frac{n}{V} = \frac{m_{\text{exp}}}{M \cdot V}$$

$$c_{\text{exp}} = \frac{0,0018 \text{ g}}{942 \text{ g/mol} \cdot 200 \cdot 10^{-6} \text{ L}}$$

$$c_{\text{exp}} = 9,55 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$$

Razrjeđivanjem nastale otopine pripravi se otopina koncentracije $4 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ ($c = 4 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$) i volumena $800 \text{ } \mu\text{L}$ ($V = 800 \text{ } \mu\text{L}$). Automatskom pipetom prenese se $33,51 \text{ } \mu\text{L}$ otopine sens2antisens2 peptida koncentracije $9,55 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$ u Eppendorf tubicu i razrijedi se dodatkom $766,49 \text{ } \mu\text{L}$ 100% otopine DMSO-a tako da ukupan volumen bude $800 \text{ } \mu\text{L}$.

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

$$4 \cdot 10^{-4} \text{ M} \cdot 800 \text{ } \mu\text{L} = 9,55 \cdot 10^{-3} \text{ M} \cdot V_2$$

$$V_2 = 33,51 \text{ } \mu$$

$$V(\text{DMSO}) = 800 \mu\text{L} - V_2 = 800 \mu\text{L} - 33,51 \mu\text{L} = 766,49 \mu\text{L}$$

3.2.2. Određivanje intenziteta fluorescencije

Konstanta vezanja sens i antisens peptida određena je praćenjem intenziteta fluorescencije spektrofotometrijskom metodom. Fluorescencijska spektroskopija je izrazito osjetljiva metoda koja je pogodna za određivanje konstanta vezanja visokog iznosa ($K_a > 10^6 \text{ M}^{-1}$) pri malim koncentracijama, čak i onim nanomolarnim (Thordarson, 2011). Pri većim koncentracijama intenzitet fluorescencije nije linearno ovisan o apsorbiranom zračenju, a dodatnu tu proporcionalnost remeti efekt unutarnjeg filtera (eng. *inner filter effect*) (Parker i Rees, 1962). U otopinu peptida koji posjeduje svojstvo fluorescencije postepeno se dodaje otopina peptida koji ne posjeduje svojstvo fluorescencije tijekom kojeg se prati intenzitet fluorescencije. Sens1 peptid ne sadrži aromatske aminokiseline zbog čega ne fluorescira, dok sens1antisens1 i sens1antisens2 peptidi sadrže 1 tirozin koji uzrokuju fluorescenciju. Zbog toga se otopina sens1 peptida dodaje otopini njegovih antisens peptida. S druge strane, sens2 peptid sadrži 3 tirozina i 1 fenilalanin koji uzrokuju fluorescenciju, a sens2antisens1 i sens2antisens2 peptidi ne sadrže aromatske aminokiseline pa ne fluoresciraju. Zbog toga se otopini sens2 peptida postepeno dodaje otopina njegovih antisens peptida.

Određivanje intenziteta fluorescencije prilikom interakcije sens1 peptida i njegovih antisens peptida:

500 μL otopine antisens peptida koncentracije $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$ prebaci se u kvarcnu kivetu. Postepeno se dodaje otopina sens1 peptida koncentracije $4 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ tako da u pripremljenoj otopini koncentracija sens1 peptida bude redom $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$, $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$, $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$, $7,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$, $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$, $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$, $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$, $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$, $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$, $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$, $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$, $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ i $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$. Da bi se takve koncentracije postigle dodaju se redom volumeni otopine sens1 peptida (Tablica 2). Dodatkom određenog volumena antisens peptida sadržaj kvarcne kivete se promiješa pomoću vortex miješalice i ostavi na sobnoj temperaturi 5 minuta nakon čega se izmjeri intenzitet fluorescencije Olis RSM 1000 spektrofotometrom. Uzorak se analizira 30 sekundi pri čemu se svake sekunde izmjeri 62 spektra uz vrijednost parametara PMT1 = 900 i PMT2 = 650. Intenzitet fluorescencije se određivao za valne duljine od 261,5 nm do 416,2 nm. Za svaki dodani volumen ovaj postupak

ponovi se još dva puta što na koncu rezultira s tri dobivene vrijednosti. Njihova srednja vrijednosti daje konačan rezultat.

Tablica 2. Shematski prikaz dodavanja otopine sens1 peptida

	$V_{\text{antisens}} (\mu\text{L})$	Dodani $V_{\text{sens1}} (\mu\text{L})$	Ukupni $V_{\text{sens1}} (\mu\text{L})$
1.	500	/	/
2.	500	2,51	2,51
3.	500	1,27	3,78
4.	500	2,55	6,33
5.	500	3,22	9,55
6.	500	3,27	12,82
7.	500	6,66	19,48
8.	500	6,84	26,32
9.	500	14,22	40,54
10.	500	15,02	55,56
11.	500	15,87	71,43
12.	500	95,24	166,67
13.	500	133,33	300
14.	500	300	500

Određivanje intenziteta fluorescencije prilikom interakcije sens2 peptida i njegovih antisens peptida:

500 μL otopine sens2 peptida koncentracije $5 \cdot 10^{-6}$ mol/L prebaci se u kvarcnu kivetu. Postepeno se dodaje otopina antisens peptida koncentracije $4 \cdot 10^{-4}$ mol/L tako da u pripremljenoj otopini koncentracija antisens peptida bude redom $2 \cdot 10^{-6}$ mol/L, $3 \cdot 10^{-6}$ mol/L, $5 \cdot 10^{-6}$ mol/L, $7,5 \cdot 10^{-6}$ mol/L, $1 \cdot 10^{-5}$ mol/L, $1,5 \cdot 10^{-5}$ mol/L, $2 \cdot 10^{-5}$ mol/L, $3 \cdot 10^{-5}$ mol/L, $4 \cdot 10^{-5}$ mol/L, $5 \cdot 10^{-5}$ mol/L, $1 \cdot 10^{-4}$ mol/L, $1,5 \cdot 10^{-4}$ mol/L i $2 \cdot 10^{-4}$ mol/L. Da bi se takve koncentracije postigle dodaju se redom točno određeni volumeni otopine antisens peptida (Tablica 3). Dodatkom određenog volumena antisens peptida sadržaj kvarcne kivete se promiješa pomoću vortex miješalice i ostavi na sobnoj temperaturi 5 minuta nakon čega se izmjeri intenzitet fluorescencije Olis RSM 1000 spektrofotometrom. Uzorak se analizira 30 sekundi pri čemu se svake sekunde izmjeri 62 spektra uz vrijednost parametara PMT1 = 900 i PMT2 = 650. Intenzitet fluorescencije se određivao za valne duljine od 261,5 nm do 416,2 nm. Za svaki dodani volumen ovaj postupak ponovi se još dva puta što na koncu rezultira s tri dobivene vrijednosti. Njihova srednja vrijednosti daje konačan rezultat.

Tablica 3. Shematski prikaz dodavanja otopina sens2antisens1 i sens2antisens2 peptida

	$V_{\text{sens2}} (\mu\text{L})$	Dodani $V_{\text{antisens}} (\mu\text{L})$	Ukupni $V_{\text{antisens}} (\mu\text{L})$
1.	500	/	/
2.	500	2,51	2,51
3.	500	1,27	3,78
4.	500	2,55	6,33
5.	500	3,22	9,55
6.	500	3,27	12,82
7.	500	6,66	19,48
8.	500	6,84	26,32
9.	500	14,22	40,54
10.	500	15,02	55,56
11.	500	15,87	71,43
12.	500	95,24	166,67
13.	500	133,33	300
14.	500	300	500

3.2.3. Olis RSM 1000

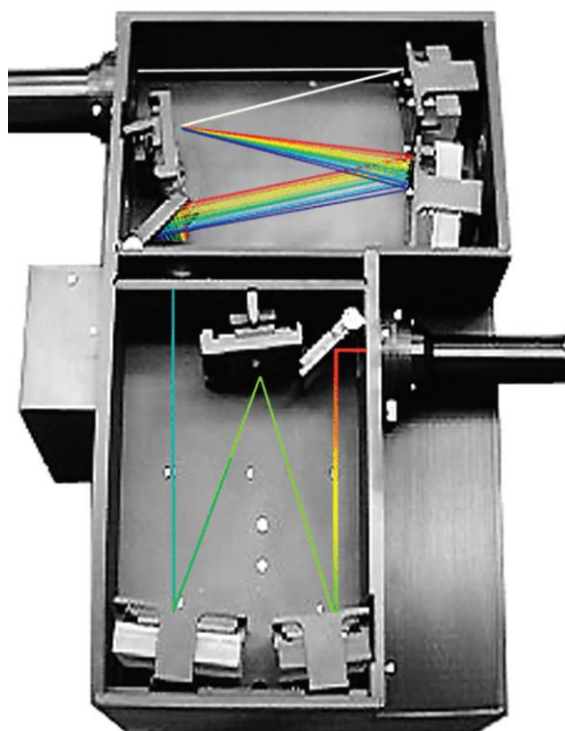
Olis RSM 1000 je uređaj koji služi za određivanje apsorbancije, fluorescencije i cirkularnog dikroizma koje se ostvaruje minimalnom promjenom konfiguracije hardwarea, tj. njegovih komponenti (Slika 4) (www.olisclarity.com).



Slika 4. Olis RSM 1000 (preuzeto sa: www.olisweb.com)

Najvažnija komponenta Olis RSM 1000 uređaja je DeSa monokromator, sastavljen od dvostruke rešetke koja omogućuje određivanje i do 1000 spektara u sekundi. Takvo brzo skeniranje omogućeno je primjenom pomičnih proreza kroz koje prolazi disperzirana svjetlost

koju stvara rešetka bez potrebe za pomicanjem optičkih komponenti. Rešetke su zamjenjive i njihov izbor ovisi o rasponu skeniranja. Pomični prorezi nalaze se unutar ScanDiska, metalnog diska sa 16 proreza kojeg okreće motor pri frekvenciji od 62,5 Hz. Prorezi mogu biti široki od 0,2 mm do 20 mm: uži su pogodniji za određivanje apsorbancije jer je potrebna veća rezolucija, a širi za određivanje fluorescencije jer je intenzitet svjetlosti važniji od rezolucije. U ovom eksperimentu korišteni su prorezi širine 1,0 mm. Umjesto ScanDiska može se nalaziti običan prorez. Uz proreze unutar ScanDiska nalaze se i prorezi na ulazu i izlazu iz DeSa monokromatora koji kontroliraju količinu zračenja koja prolazi od izvora zračenja (lampe ili uzorka) do detektora. Ako mjerenje to zahtjeva oni se mogu ukloniti. ScanDisk dijeli DeSa monokromator na dva dijela: prvi dio služi za difrakciju ulaznog zračenja, a drugi dio skuplja ta zračenja tako da se dobije spektralno homogeno izlazno zračenje (Slika 5). Sadrži 6 zrcala: 4 konkavna koja služe za difrakciju zračenja i 2 ravna koji reflektiraju zračenje pod kutom od 90 stupnjeva. DeSa monokromator može se koristiti kao ekscitacijski ili emisijski monokromator.



Slika 5. Unutrašnjost Olis RSM 1000 uređaja - DeSa monokromator i ScanDisk (preuzeto sa: www.olisclarity.com)

Ksenonske lampe snage 75 W, 150 W i 450 W najprikladnije su za brzo skeniranje. Služe kao izvor zračenja valnih duljina u UV, Vis i NIR području (180 nm - 2400 nm). Ona snage 75 W koristi se za određivanje apsorbancije i ne zahtjeva sustav hlađenja. Lampa snage 150 W je dvostruko snažnija i koristi se pri određivanju cirkularnog dikroizma. U prisustvu kisika dolazi do stvaranja ozona koji može emitirati svjetlost valnih duljina ispod 170 nm. Zbog toga se lampu i monokromator pročišćava dušikom pri protoku 8 L/min koji uklanja kisik tijekom rada uređaja. U ovom eksperimentu korištena je lampa snage 450 W pogodna za određivanje fluorescencije. Ona kao i lampa snage 150 W zahtjeva sustav hlađenja. Sustav hlađenja lampe koristi vodu koja uklanja toplinu čime sprječava pregrijavanje. Sustav hlađenja zračenja uklanja IR zračenje iz zračenja kojeg stvara lampa. Na taj način čuvaju se fotolabilni uzorci i sprječavaju oštećenja zrcala, filtera i rešetki. DeSa monokromator povezan je s komorom za uzorak. Kod određivanja apsorbancije unutar nje nalazi se raspršivač zračenja koji reflektira 20% zračenja prema referentnoj multiplikatorskoj cijevi (PMT) koji služi da dobivanje referentnog zračenja. Zračenje koje prolazi kroz uzorak je detektirano pomoću fotomultiplikatorske cijevi koja se nalazi neposredno iza uzorka što poboljšava promatranje uzoraka s visokim raspršenjem zračenja. Međutim, ovo nije jedini položaj koji fotomultiplikatorske cijevi, tj. detektori mogu zauzeti. Ovisno o vrsti i zahtjevima mjerenja položaj i vrsta detektora se mijenja. Primjerice, kod određivanja fluorescencije uzorka sa slabom emisijom može se postaviti posebna fotomultiplikatorska cijev namijenjena određivanju fluorescencije iza ScanDiska pretvarajući DeSa monokromator u onaj s jednom rešetkom. Kod određivanja fluorescencije raspršivač zračenja se uklanja te između lampe i uzorka se nalazi ekscitacijski monokromator. Sastoji se od jedne rešetke koja se ne može zamijeniti. Držać filtera omogućuje polaganje standardnog filtera promjera 25 mm. Prorezi su smješteni na ulazu i izlazu. Kako je disperzija ekscitacijskog monokromatora 4 nm/mm standardni prorezi veličine 0,12 mm, 0,60 mm, 1,24 mm, 3,16 mm i 6,32 mm rezultiraju širinom spektralnog pojasa od 0,5 nm, 2,4 nm, 5,0 nm, 12,6 nm i 25,3 nm. Kontrolna kutija sadrži elektroničke sklopove koji pokreću monokromator i upravljaju naponom. Također, sve informacije prođu kroz nju prije nego što dođu do računala (www.olisweb.com; www.olisclarity.com)

3.2.4. Određivanje konstante vezanja

Konstanta vezanja (β) za jednadžbu



pri čemu je X fluorescirajući peptid, Y nefluorescirajući peptid, a XY kompleks fluorescirajući peptid - nefluorescirajući peptid se definira kao omjer umnoška koncentracije produkata i reaktanata koji su potencirani za iznos svojeg stehiometrijskog koeficijenta.

$$\beta = \frac{[X_m Y_n]}{[X]^m [Y]^n}$$

Ako fluorescirajući i nefluorescirajući peptid ulaze u interakciju u omjeru 1:1 onda će se konstanta vezanja (K_a) odrediti prema sljedećem izrazu:

$$K_a = \frac{[XY]}{[X][Y]}$$

[XY], tj. koncentracija kompleksa fluorescirajući peptid - nefluorescirajući peptid nužna je za izračunavanje konstante vezanja. Nju nije moguće odrediti izravno već se koriste indirektno metode, primjerice mjerenje različitih fizikalnih veličina spektrofluorimetrijskim metodama tijekom titracije čija je promjena u korelaciji s [XY]. Tijekom titracije najčešće se koncentracija jedne tvari drži konstantnom, dok se koncentracija druge mijenja (Thordarson, 2011). U ovom eksperimentu koncentracija nefluorescirajućeg peptida se povećavala, a koncentracija fluorescirajućeg smanjivala (Tablica 4). Spektrofluorimetrijski se pratio intenzitet fluorescencije u ovisnosti o valnoj duljini da bi se potom uz pomoć Specfit Global Analysis programa odredila izoterma vezanja pri valnoj duljini od 340 nm, odnosno funkcija ovisnosti promjene intenziteta fluorescencije (ΔI) o omjeru ukupnih koncentracija nefluorescirajućeg i fluorescirajućeg peptida $\{[Y]_{uk} / [X]_{uk}\}$. Promjena intenziteta fluorescencije (ΔI) jednaka je razlici izmjerenog intenziteta fluorescencije (I) i intenziteta fluorescencije otopine fluorescirajućeg peptida prije dodatka otopine nefluorescirajućeg peptida (I_0). Izoterma vezanja mu služi kod računanja vrijednosti K_a . Računalni algoritam to ostvaruje neprestanim variranjem vrijednosti K_a i $I_{\Delta XY}$ (razlika intenziteta fluorescencije kompleksa fluorescirajući peptid -

nefluorescirajući peptid i fluorescirajućeg peptida, $I_{\Delta XY} = I_{XY} - I_X$) čime se konstantno računa vrijednost ΔI i uspoređuje s onom izmjerenom sve dok se ne postigne njihova najveća moguća skladnost. Vrijednost ΔI algoritam računa prema izrazu

$$\Delta I = I_{\Delta XY} \cdot [XY]$$

uz pretpostavku da se intenzitet fluorescencije otopine fluorescirajućeg peptida prije dodatka otopine nefluorescirajućeg peptida (I_0) računa prema izrazu

$$I_0 = I_X \cdot [X]_{uk}$$

$[XY]$ se računa prema izrazu

$$[XY] = \frac{1}{2} \cdot \left([Y]_{uk} + [X]_{uk} + \frac{1}{K_a} \right) - \sqrt{\left([Y]_{uk} + [X]_{uk} + \frac{1}{K_a} \right)^2 + 4 \cdot [X]_{uk} \cdot [Y]_{uk}}$$

pri čemu su $[X]_{uk}$ i $[Y]_{uk}$ poznate vrijednosti (Thordarson, 2011).

Specfit Global Analysis je računalni program koji analizira podatke prikupljene spektrofotometrijskim mjerenjima pri različitim valnim duljinama u svrhu modeliranja, usklađivanja i određivanja kemijske ravnoteže i kinetike. Spektrofotometrijskim mjerenjima odredi se ovisnost apsorbancije ili intenziteta fluorescencije o valnoj duljini koja je neovisna o parametrima poput temperature, vremena ili koncentracije titranta (www.jasco.de). Dobivene podatke Specfit Global Analysis program analizira i obrađuje primjenom faktorske analize i Marquardtovog algoritma. Faktorska analiza je skup matematičko-statističkih postupaka koji omogućuju da se u većem broju varijabli, među kojima postoji povezanost, utvrdi manji broj varijabli koje objašnjavaju tu povezanost. Broj obilježja svake varijable može biti velik. Zbog toga se njihov broj može reducirati kako bi ona dominantna došla do izražaja. To se može ostvariti tako da se pronađu neke hipotetičke varijable, koje predstavljaju ponderirane sume promatranih varijabli i koje te iste mogu zamijeniti. Takve izvedene varijable koje daju sumarni opis promatranih podataka nazivaju se faktori (www.enciklopedija.hr). Marquardtov algoritam, točnije Levenberg-Marquardtov algoritam razvijen je zbog problema koji su se javljali kod primjene metode najmanjih kvadrata kod nelinearnih funkcija (Marquardt, 1963). Metoda najmanjih kvadrata je metoda obrade eksperimentalno dobivenih podataka kojom se dobiva

funkcionalna ovisnost mjerene veličine iz eksperimentalnih podataka. Njome se određuje funkcija čija krivulja što bliže određuje, tj. prilazi zadanim točkama što se koristi za predviđanje vrijednosti mjerene veličine u područjima koja nisu obuhvaćena mjerenjem. Ta funkcija određuje se tako da je zbroj kvadrata razlika između izmjerenih i izračunatih vrijednosti minimalan. Zbroj kvadrata može se opisati funkcijom cilja koja ovisi o nepoznatim parametrima. Oni se određuju kada funkcija cilja postiže minimum (Johnson i Faunt, 1992; www.enciklopedija.hr). Kod određivanja linearne funkcije, tj. pravca regresije funkcija cilja će biti kvadratna. Nepoznati parametri tada se mogu odrediti pri minimumu funkcije cilja, u jednom koraku rješavanjem matrice sustava linearnih jednadžbi. Pravac regresije se određuje ako izmjereni podaci upućuju na linearnu ovisnost. S druge strane, ako to nije slučaj određuje se nelinearna funkcija. Kod nje se javlja problem prisustva veće razlike između izmjerenih i izračunatih vrijednosti koje se nastoje smanjiti korištenjem algoritama koji serijom procesa mijenjaju vrijednosti parametara smanjujući njihov zbroj kvadrata. Levenberg-Marquardtov algoritam kombinira dvije metode: metodu silaznog gradijenta i Gauss-Newtonovu metodu. Kod metode silaznog gradijenta zbroj kvadrata razlika se smanjuje mijenjajući vrijednost parametara u smjeru najvećeg padajućeg nagiba i Levenberg-Marquardtov algoritam ju više koristi kad su parametri daleko od optimalne vrijednosti. Kod Gauss-Newtonove metode funkcija je podijeljena na manje dijelove za koje se pretpostavlja da su kvadratne kojoj se potom pri minimumu određuju parametri. Ova metoda se koristi kad su parametri blizu optimalnoj vrijednosti (Johnson i Faunt, 1992; Maeder i Zuberbühler, 1990; www.duke.edu).

Specfit Global Analysis verzija 2.12 program korišten je za određivanje konstanta vezanja sens i antisens peptida. Program uzima u obzir broj tvari koje reagiraju, promjenu njihove koncentracije, broj i iznos valnih duljina pri kojima je za svaki dodatak nefluorescirajućeg peptida određen intenzitet fluorescencije i temperaturu. Kod određivanja intenziteta fluorescencije korištene su dvije tvari: fluorescirajući i nefluorescirajući peptid. Koncentracija fluorescirajućeg peptida nije konstantna već se smanjuje, dok nefluorescirajućeg raste (Tablica 4). Navedeni pad koncentracije fluorescirajućeg peptida program uzet je u obzir prilikom određivanja konstanta vezanja. Analizirani su intenziteti fluorescencije za 137 vrijednosti valnih duljina od 310,3 nm do 416,2 nm. Pod temperaturom pri kojoj je rađen eksperiment je navedeno 25°C.

Tablica 4. Promjena koncentracija fluorescirajućeg i nefluorescirajućeg peptida tijekom titracije

	Koncentracija fluorescirajućeg peptida (mol/L)	Koncentracija nefluorescirajućeg peptida (mol/L)
1.	$5,000 \cdot 10^{-6}$	0
2.	$4,975 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$
3.	$4,963 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-6}$
4.	$4,938 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$
5.	$4,906 \cdot 10^{-6}$	$7,5 \cdot 10^{-6}$
6.	$4,875 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$
7.	$4,813 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$
8.	$4,750 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-5}$
9.	$4,625 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-5}$
10.	$4,500 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-5}$
11.	$4,375 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-5}$
12.	$3,750 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-4}$
13.	$3,126 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$
14.	$2,273 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-4}$

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Fluorescencija sens i antisens peptida

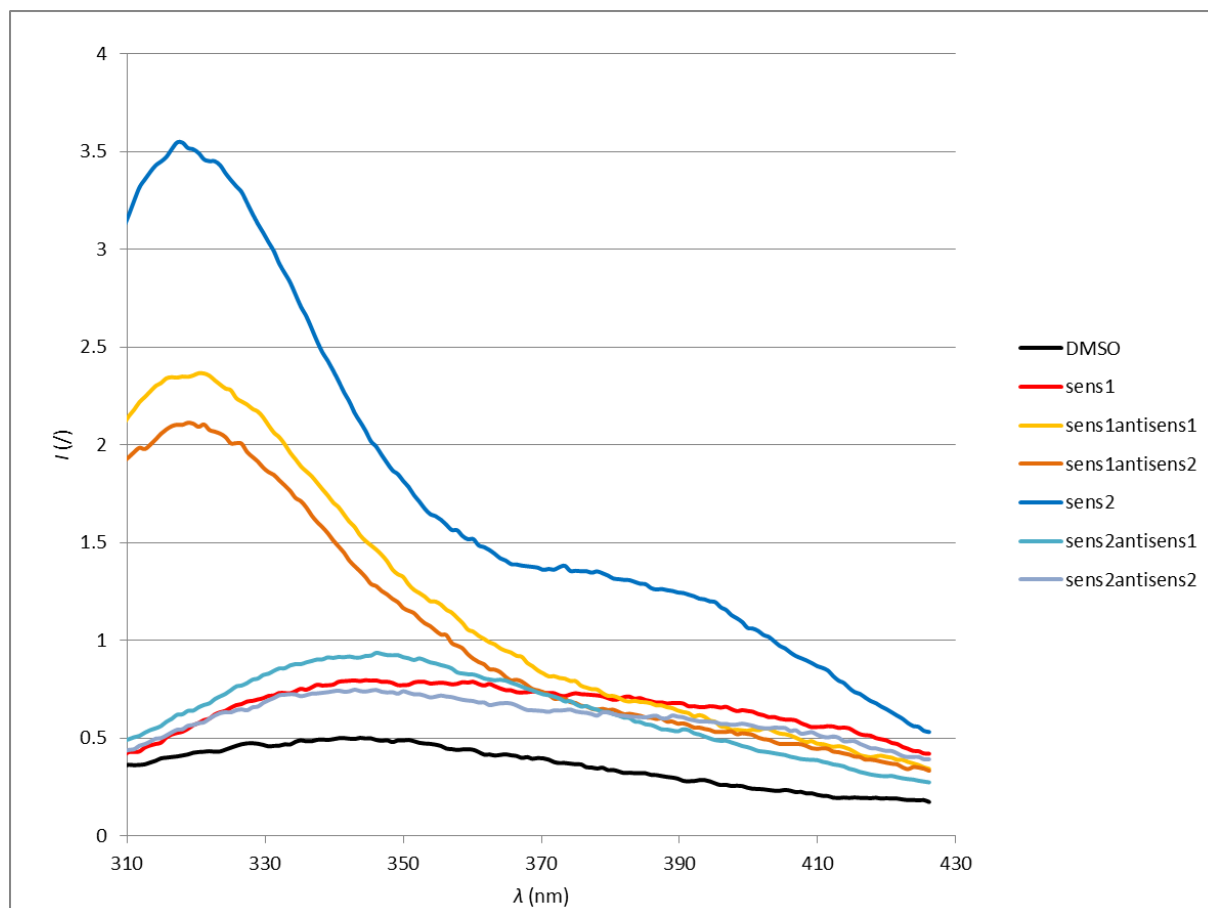
Intenzitet fluorescencije sens1, sens1antisens1, sens1antisens2, sens2, sens2antisens1, sens2antisens2 peptida pri koncentraciji 10^{-5} mol/L i 100% otopine DMSO-a određena je upotrebom Olis RSM 1000 spektrofluorimetra (Slika 6). Razmatrale su se vrijednosti valne duljine od 310 nm do 416,2 nm.

100% otopina DMSO-a pokazuje nizak intenzitet fluorescencije u cijelom rasponu valnih duljina zbog čega ne ometa određivanje intenziteta fluorescencije. Njegova upotreba preporučuje se tek kao zadnja opcija, u slučaju da peptidi nisu topljivi u otapalima poput vode, 10-30% otopine octene kiseline, metanola, acetonitrila i dimetilformamida (DMF) (www.genscript.com). Provjerom topljivosti peptida utvrđeno je da nisu topljivi u vodi, 96% otopini etanola, metanolu i izopropanolu. Neki od njih su topljivi u 10% octenoj kiselini, a svi se otapaju u organskim otapalima poput acetonitrila, DMF-a i DMSO-a. Octenoj kiselini, acetonitrilu i DMF-u određen je visok intenzitet fluorescencije što bi uzrokovalo ometanje tijekom spektrofluorimetrijskog mjerenja. DMSO u usporedbi s nabrojanim otapalima ima najniži intenzitet fluorescencije što je uz dobru topljivost peptida presudan faktor za njegov izbor u ovom istraživanju. DMSO se kao otapalo koristi u obliku 10% otopine ili otopina nižeg volumnog udjela DMSO-a jer pri tim koncentracijama nije toksičan (Galvao i sur., 2014). Također, korišteni peptidi na sadrže cistein što omogućuje korištenje DMSO-a, u suprotnom ga treba zamijeniti DMF-om (www.genscript.com). Međutim, upotrebom 0,1%, 1% i 10% otopine DMSO-a peptidi se otapaju tek dodavanjem velikog volumena otapala čime se ne postigne njihova zadovoljavajuća koncentracija. Zbog toga je korištena 100% otopina jer omogućuje otapanje dodatkom malog volumena otapala. Kod budućih istraživanja preporučuje se prilikom dizajniranja sens i antisens peptida uzeti u razmatranje njihovu topljivost u vodi i pri različitim pH vrijednostima.

Intenzitet fluorescencije sens1 peptida postiže maksimum pri valnoj duljini 344,54 nm i iznosi 0,80. Ne sadrži aromatske aminokiseline zbog čega mu je intenzitet fluorescencije nizak. S druge strane, sens1antisens1 i sens1antisens2 peptidi sadrže 1 tirozin koji uvjetuje viši intenzitet fluorescencije. Maksimum intenziteta fluorescencije za sens1antisens1 peptid iznosi 2,37 pri valnoj duljini 320,38, a za sens1antisens2 peptid 2,11 pri valnoj duljini 318,82 nm.

Intenzitet fluorescencije sens2 peptida postiže maksimum pri valnoj duljini 317,26 nm i iznosi 3,55. Prisutnost 4 aromatske aminokiseline, točnije 3 tirozina i 1 fenilalanina uzrokuju visok

intenzitet fluorescencije. Maksimum intenziteta fluorescencije za sens2antisens1 peptid iznosi 0,94 pri valnoj duljini 346,10 nm, a za sens2antisens2 peptid 0,75 pri valnoj duljini 342,98 nm. Njihov nizak intenzitet fluorescencije posljedica je odsustva aromatskih aminokiselina. Imajući u vidu navedene intenzitete fluorescencije sens1, sens2antisens1 i sens2antisens2 peptidi su korišteni kao titranti, a sens2, sens1antisens1 i sens1antisens2 peptidi kao titrandi.



Slika 6. Ovisnost intenziteta fluorescencije o valnoj duljini za DMSO, sens i antisens peptide

4.2. Fluorescencija prilikom interakcije sens i antisens peptida

Intenzitet fluorescencije tijekom interakcije sens peptida i njihovih pripadajućih antisens peptida određen je Olis RSM 1000 spektrofluorimetrom. Otopini peptida koja posjeduje svojstvo fluorescencije postepeno je dodavan točno određeni volumen otopine peptida koji ne posjeduje svojstvo fluorescencije. Ako ne dolazi do interakcije između ta dva peptida intenzitet fluorescencije se ne mijenja. S druge strane, ako dolazi do interakcije intenzitet fluorescencije

se povećava ili smanjuje čija se promjena može iskoristiti za kvantificiranje interakcije, tj. određivanje afiniteta vezanja (Ribeiro i sur., 2008).

Na temelju dobivenih rezultata zaključuje se da dolazi do interakcije između sens1 i sens1antisens1 peptida (Slika 7). Dodatkom otopine sens1 peptida intenzitet fluorescencije raste pri čemu postiže maksimum iznosa 1,79 kod valne duljine 331,41 nm koji je ostvaren pri koncentraciji sens1 peptida iznosa $5 \cdot 10^{-5}$ mol/L. Daljnjim dodavanjem otopine sens1 peptida intenzitet fluorescencije se smanjuje. To se može objasniti zasićenjem sens1antisens1 peptida, odnosno činjenicom da je maksimalan broj sens1 peptida stupio u interakciju sa sens1antisens1 peptidom. Daljnjim dodavanjem sens1 peptida on ne ulazi u interakciju već se nalazi u suvišku. Kako sens1 peptid ne posjeduje svojstvo fluorescencije, njegov suvišak neće uzrokovati porast intenziteta fluorescencije. Međutim, intenzitet nakon postizanja maksimuma nije konstantan već se smanjuje što je posljedica povećanja volumena reakcijske smjese. Svakim dodatkom točno određenog volumena otopine sens1 peptida koncentracija sens1antisens1 peptida se smanjuje (Tablica 4). U početku dodaju se mali volumeni kod kojih taj učinak neće biti značajan. Pri navedenim volumenima smanjenje intenziteta fluorescencije također je djelomično nadvladano interakcijom fluorescirajućeg i nefluorescirajućeg peptida koje uzrokuje porast intenziteta fluorescencije. Međutim, nakon postizanja koncentracije sens1 peptida iznosa 5×10^{-5} mol/L za ostvarivanje daljnjih zadanih koncentracija potrebni su veći volumeni koji značajnije utječu na koncentraciju fluorescirajućeg peptida, tj. sens1antisens1 peptida. Sličan rast, a potom pad intenziteta fluorescencije zabilježen je i tijekom dodavanja otopine sens1 peptida u otopinu sens1antisens2 peptida (Slika 8). Intenzitet fluorescencije raste pri čemu postiže maksimum iznosa 1,63 kod valne duljine 332,97 nm koji je ostvaren pri koncentraciji sens1 peptida iznosa $2 \cdot 10^{-5}$ mol/L. Daljnjim povećanjem koncentracije sens1 peptida intenzitet fluorescencije se smanjuje.

Na temelju dobivenih rezultata zaključuje se da dolazi do interakcije između sens2 i sens2antisens1 (Slika 9), odnosno sens2antisens2 peptida (Slika 10). Dodatkom otopine sens2antisens1 peptida intenzitet fluorescencije raste pri čemu postiže maksimum iznosa 2,19 kod valne duljine 332,97 nm koji je ostvaren pri koncentraciji sens1antisens1 peptida iznosa $4 \cdot 10^{-5}$ mol/L. Nakon nje, daljnjim dodavanjem sens2antisens1 peptida, intenzitet se smanjuje. Maksimum intenziteta fluorescencije prilikom dodavanja otopine sens2antisens2 postignut je također kod koncentracije iznosa $4 \cdot 10^{-5}$ mol/L i iznosi 2,72 pri valnoj duljini od 331,41 nm.

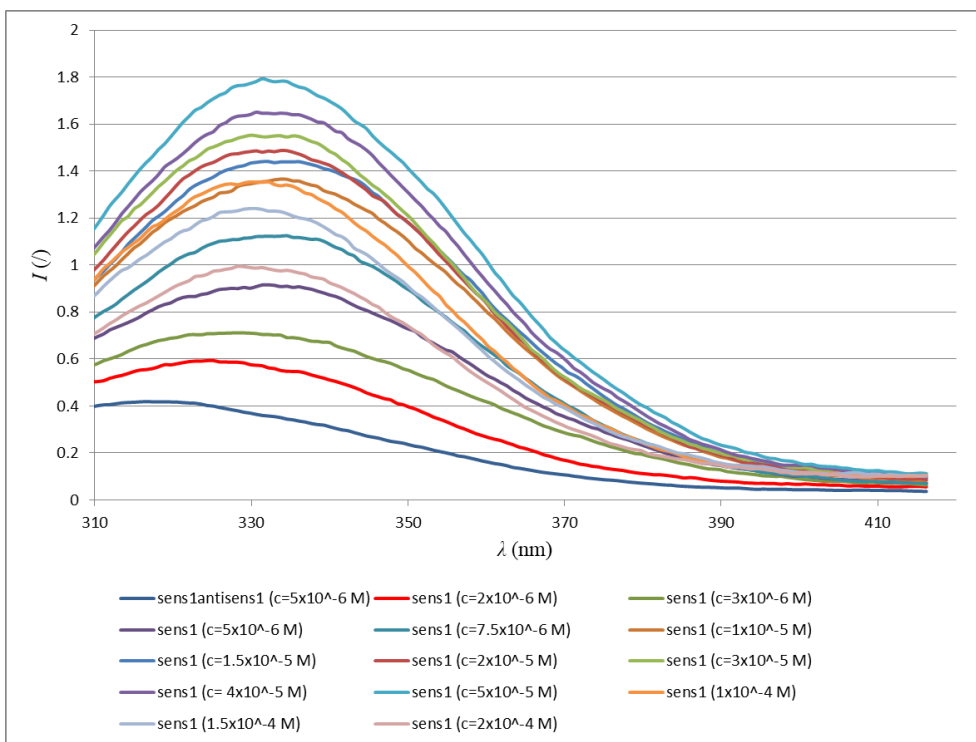
U ovom istraživanju početna koncentracija titranda je $5 \cdot 10^{-6}$ M koja se svakim dodatkom titranta smanjuje. Razlog tomu je što se intenzitet fluorescencije određuje dodatkom titranta u istu reakcijsku smjesu. Svakim dodatkom volumen reakcijske smjese raste što uzrokuje pad

koncentracije titranda, tj. fluorescirajućeg peptida. Iako je prilikom računalnog određivanja konstante vezanja to smanjenje uzeto u obzir, najčešće se određivanje konstante vezanja titracijskim metodama odvija pri konstantnoj koncentraciji titranda. Zbog toga se kod sljedećih sličnih istraživanja preporučuje osigurati njenu nepromijenjenu vrijednost dodavanjem titranta u zasebne otopine titranda čime se svaka reakcijska smjesa odnosi na jednu točku titracije.

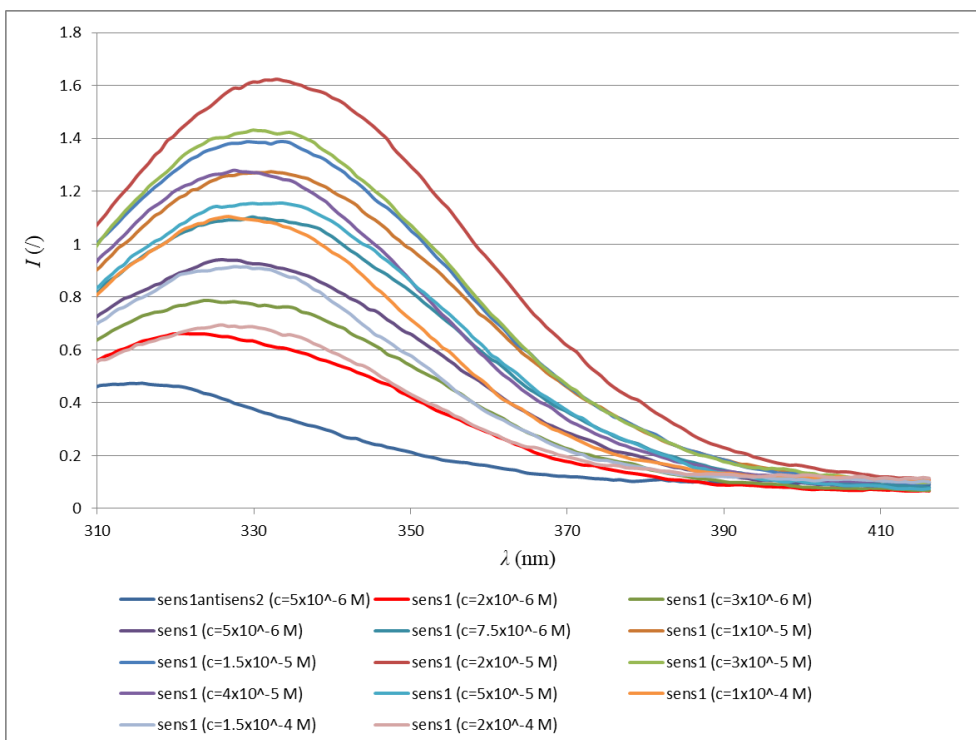
Izabrano je 13 točaka titracije tako da je koncentracija titranta prvo niža od koncentracije titranda, potom su približno jednake da bi daljnjom titracijom ona bila u suvišku (Tablica 5). Prilikom određivanja nepoznatih konstanta vezanja titracijskim metodama poželjno je izabrati 15-20 točaka. Najvažniji su eksperimentalno dobiveni podaci pri omjeru koncentracije titranta i titranda između 0 i 1,5 {[titrant]/[titrand]} ~ 0-1,5}. Zbog toga se kod budućih istraživanja preporučuje odrediti 8-10 točaka u tom rasponu i 10-15 točaka u rasponu između 1.5 i 50 (Thordarson, 2011).

Tablica 5. Promjena omjera koncentracija titranta i titranda, tj. nefluorescirajućeg i fluorescirajućeg peptida tijekom titracije

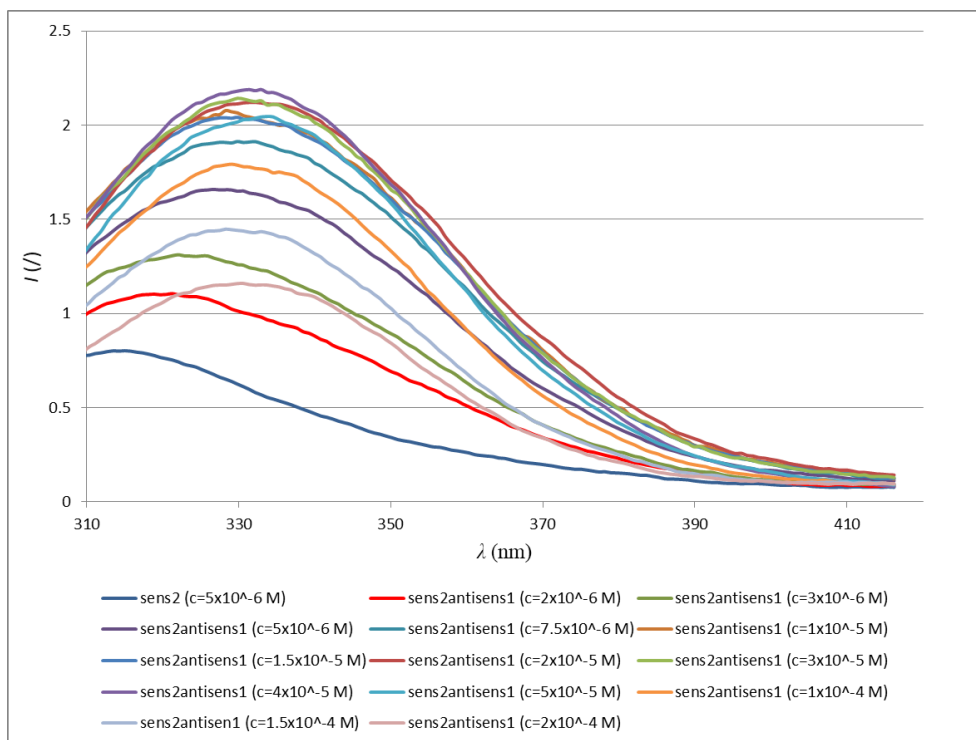
Točka titracije	[titrant]/[titrand] (/)
1.	/
2.	0,402
3.	0,604
4.	1,013
5.	1,529
6.	2,051
7.	3,117
8.	4,211
9.	6,486
10.	8,889
11.	11,429
12.	26,667
13.	47,985
14.	87,989



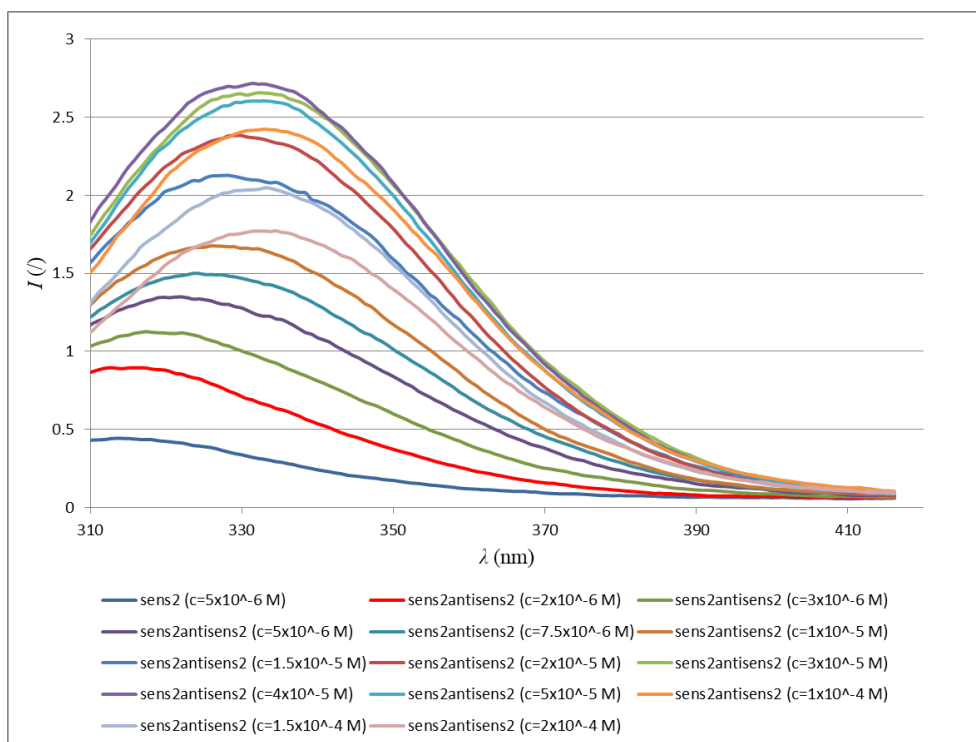
Slika 7. Interakcija sens1 peptida i sens1antisens1 peptida - ovisnost intenziteta fluorescencije o valnoj duljini pri različitim koncentracijama sens1 peptida



Slika 8. Interakcija sens1 peptida i sens1antisens2 peptida - ovisnost intenziteta fluorescencije o valnoj duljini pri različitim koncentracijama sens1 peptida



Slika 9. Interakcija sens2 peptida i sens2antisens1 peptida - ovisnost intenziteta fluorescencije o valnoj duljini pri različitim koncentracijama sens2antisens1 peptida



Slika 10. Interakcija sens2 peptida i sens2antisens2 peptida - ovisnost intenziteta fluorescencije o valnoj duljini pri različitim koncentracijama sens2antisens2 peptida

4.3. Afinitet vezanja sens i antisens peptida

Specfit Global Analysis program korišten je za određivanje ovisnosti intenziteta fluorescencije o koncentraciji nefluorescirajućeg peptida pri valnoj duljini iznosa 340 nm (Slika 11, Slika 12, Slika 13, Slika 14). Na temelju njih izračunate su logaritamske vrijednosti konstanta vezanja (Tablica 6). Konstanta vezanja je veličina koja opisuje afinitet vezanja, tj. jačinu interakcije između dvije molekule. Što joj je vrijednost veća afinitet vezanja je veći. Međutim, kod opisivanja afiniteta vezanja najčešće se upotrebljava konstanta disocijacije (K_d) koja je jednaka recipročnoj vrijednosti konstante vezanja. Što je iznos K_d manji interakcija između molekula će biti veća i obratno, što je veća interakcija će biti manja (www.malvernpanalytical.com). Primjerice, većina antitijela ima K_d u niskom mikromolarnom ($K_d \sim 10^{-6}$ M) i nanomolarnom području ($K_d \sim 10^{-7}$ M - 10^{-9} M). K_d za antitijela visokog afiniteta su u niskom nanomolarnom području ($K_d \sim 10^{-9}$ M), a vrlo visokog u pikomolarnom području ($K_d \sim 10^{-12}$ M) (www.abcam.com).

Tablica 6. Prikaz vrijednosti $\log(K_a)$ i K_a za svaku interakciju sens i antisens peptida

	$\log(K_a)$ (/)	K_a (M^{-1})
sens1 + sens1antisens1	5,29±0.06	1,97·10 ⁵ ±1,15
sens1 + sens1antisens2	5,84±0.15	6,97·10 ⁵ ±1,41
sens2 + sens2antisens1	5,94±0.06	8,75·10 ⁵ ±1,15
sens2 + sens2antisens2	5,02±0.04	1,05·10 ⁵ ±1.10

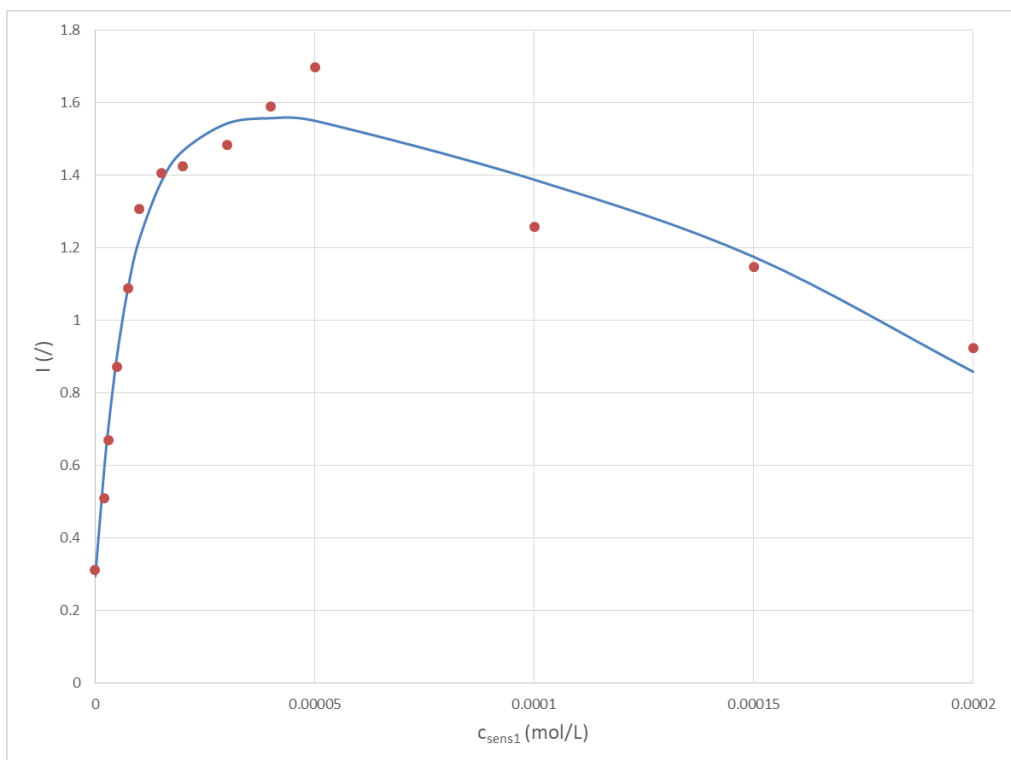
Za interakciju sens1 i sens1antisens1 peptida određen je $\log(K_a) = 5,29$ iz kojeg je izračunata $K_a = 1,97 \cdot 10^5 M^{-1}$. Za interakciju sens1 i sens1antisens2 peptida određen je $\log(K_a) = 5,84$ iz kojeg je izračunata $K_a = 6,97 \cdot 10^5 M^{-1}$. K_d za interakciju sens1 i sens1antisens1 peptida [$K_d(s1+s1a1)$] je $5,07 \cdot 10^{-6}$ M, a za interakciju sens1 i sens1antisens2 peptida [$K_d(s1+s1a2)$] je $1,43 \cdot 10^{-6}$ M. One su usporedive s vrijednostima konstanti disocijacija većine antitijela što ukazuje na jak afinitet vezanja. $K_d(s1+s1a2)$ je manji od $K_d(s1+s1a1)$ tako da je interakcija između sens1 i sens1antisens2 peptida jača nego interakcija sens1 i sens1antisens1 peptida. Iz toga proizlazi da serin na položaju 5 kod sens1antisens2 peptida ima veći utjecaj na interakciju sa sens1 peptidom nego glutamat na istom položaju kod sens1antisens1 peptida.

Za interakciju sens2 i sens2antisens2 peptida određen je $\log(K_a) = 5,94$ iz kojeg je izračunata $K_a = 8,75 \cdot 10^5 M^{-1}$. Za interakciju sens2 i sens2antisens2 peptida određen je $\log(K_a) = 5,02$ iz kojeg je izračunata $K_a = 1,05 \cdot 10^5 M^{-1}$. K_d za interakciju sens2 i sens2antisens1 peptida [$K_d(s2+s2a1)$] je $1,14 \cdot 10^{-6}$ M, a za interakciju sens2 i sens2antisens2 peptida [$K_d(s2+s2a2)$] je

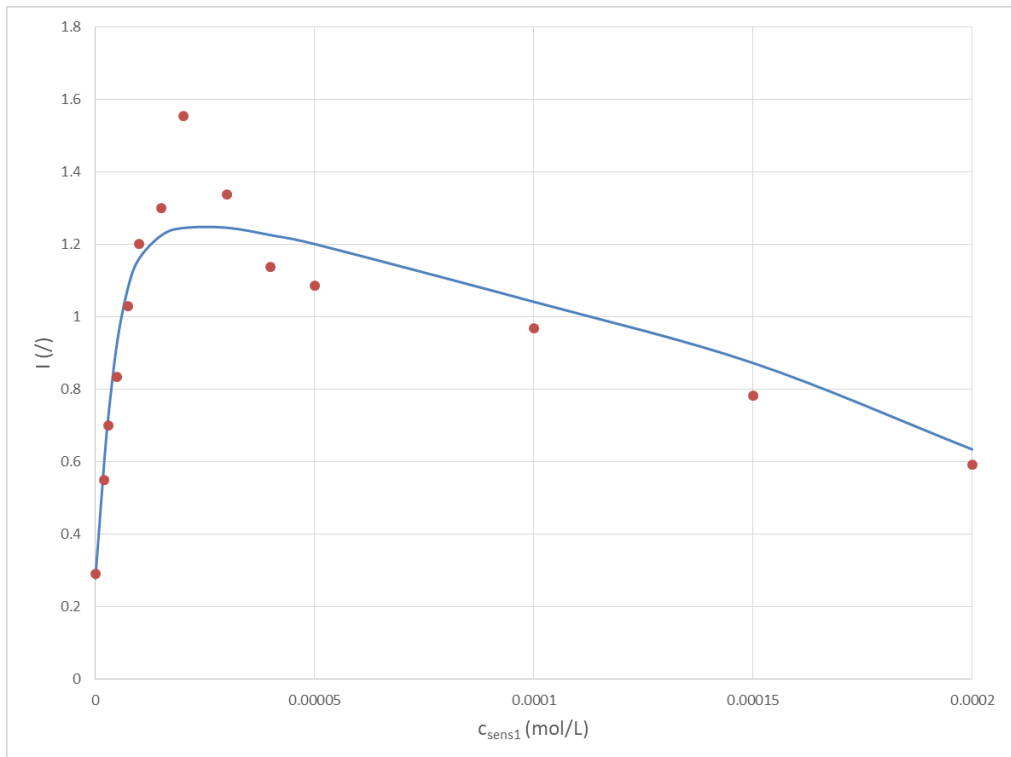
$9,57 \cdot 10^{-6}$ M. One su usporedive s vrijednostima konstanti disocijacije većine antitijela što ukazuje na jak afinitet vezanja. $K_d(s_2+s_2a_1)$ je manji od $K_d(s_2+s_2a_2)$ tako da je interakcija između sens2 i sens2antisens1 peptida jača nego interakcija sens2 i sens2antisens2 peptida. Iz toga proizlazi da izoleucin na položajima 1 i 5 te valin na položaju 8 kod sens2antisens1 peptida ima veći utjecaj na interakciju sa sens2 peptidom nego valin na položaju 1 i 5 te izoleucin na položaju 8 kod sens2antisens2 peptida.

Može se zaključiti da sens i njihovi antisens peptidi ulaze u interakciju 1:1. Općenito je termodinamički manje vjerojatno da će u istom trenutku doći do interakcije između 1 molekule sens peptida i 2 ili više molekula antisens peptida (Thordarson, 2011). Teorija molekularnog prepoznavanja bazira se na interakciji sens i antisens peptida u stehiometrijskom omjeru 1:1. Kako je ovim eksperimentom dokazano vezanje jakim afinitetom posljedično se može se potvrditi ta pretpostavka. Također, struktura sens i njihovih antisens peptida upućuje na činjenicu da ulaze u interakciju u omjeru 1:1. One nisu velike molekule: sens1 peptid i njegovi antisens peptidi se sastoje od 6 aminokiselina, a sens2 peptid i njegovi antisens peptidi od 9 aminokiselina. Kod interakcije velikih molekula, primjerice proteina, i manjih liganda veća je vjerojatnost da će se više liganda vezati na jednu molekulu. Za pobliži opis stehiometrije mogu se koristiti razni principi, primjerice Jobova metoda (Ingham, 1975).

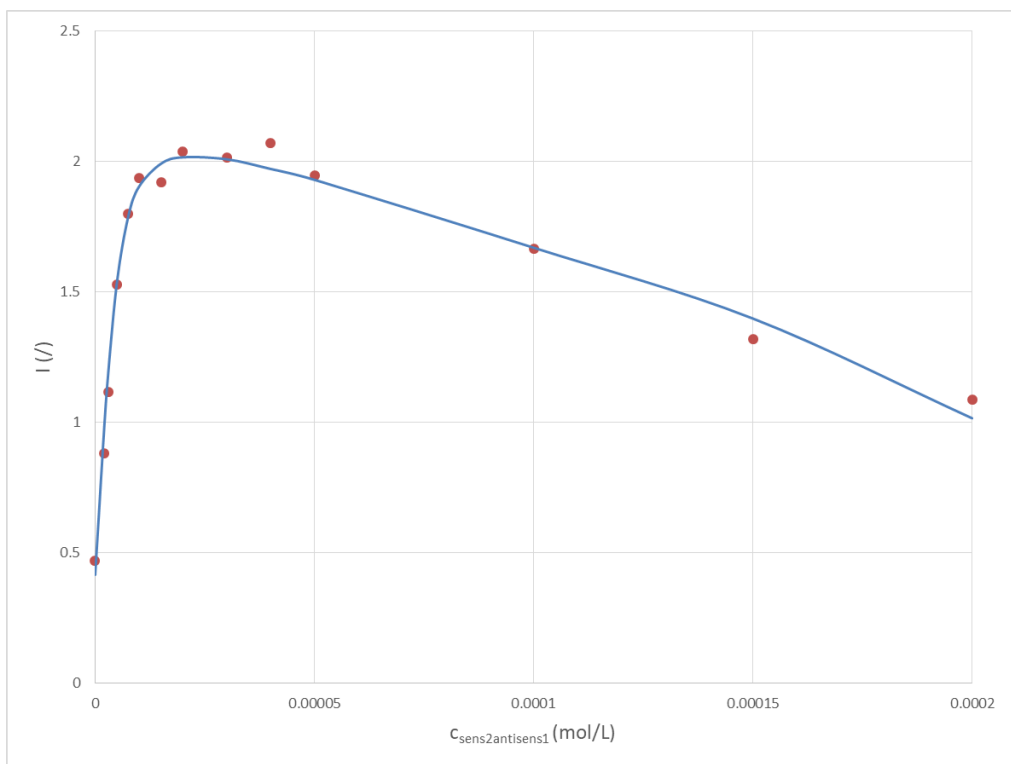
Poželjno bi bilo da se konstante vezanja odrede i drugim metodama. Iako je primijenjeno spektrofluorimetrijsko određivanje intenziteta fluorescencije pogodno s obzirom na svojstva sens i antisens peptida, korištenjem drugih tehnika dobiveni rezultati mogu se potvrditi i još točnije odrediti. U razmatranje se mogu uzeti UV/Vis spektroskopska mjerenja, određivanja NMR-om koja pružaju informacije o vrsti interakcija i stehiometriji te izotermalna titracijska kalorimetrija. Njihov izbor ovisit će o fizikalno-kemijskim svojstvima sens i antisens peptida. One omogućuju i različit dizajn antisens peptida. Naime, u ovom eksperimentu korišteni su parovi sens i antisens peptida gdje je jedan imao svojstvo fluorescencije, a drugi ne što uvelike ograničava broj potencijalnih antisens peptida. Primjenom drugih metoda on raste, a time i vjerojatnost za otkrivanjem onih koji će se vezati vrlo visokim afinitetom. Poželjno je eksperimentalno dobivene podatke odraditi programima koji koriste različite matematičke modele za određivanje nelinearne ovisnosti i konstante vezanja.



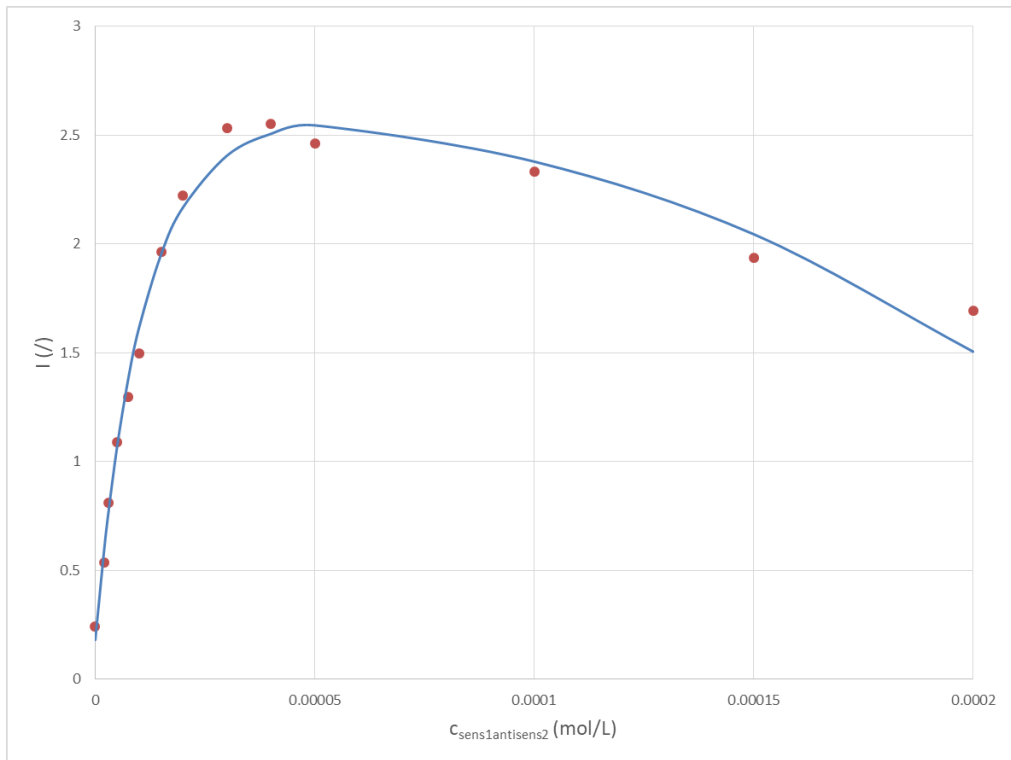
Slika 11. Interakcija sens1 peptida i sens1antisens1 peptida - ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji sens1 peptida pri 340 nm (Marquardtov *fitting* model)



Slika 12. Interakcija sens1 peptida i sens1antisens2 peptida - ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji sens1 peptida pri 340 nm (Marquardtov *fitting* model)



Slika 13. Interakcija sens2 peptida i sens2antisens1 peptida - ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji sens2antisens1 peptida pri 340nm (Marquardtov *fitting* model)



Slika 14. Interakcija sens2 peptida i sens2antisens2 peptida - ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji sens2antisens2 peptida pri 340 nm (Marquardtov *fitting* model)

5. ZAKLJUČCI

- Na temelju vrste i položaja aminokiselina koje su odgovorne za toksično djelovanje amoditoksina A dizajnirani su sens1 i sens2 peptidi koji predstavljaju dijelove amoditoksina A koji sadrže spomenute aminokiseline.
- Na temelju primarne strukture sens1 i sens2 peptida dizajnirani su njihovi komplementarni antisens peptidi koji će prema teoriji molekularnog prepoznavanja ući s njima u interakciju.
- Spektrofluorimetrijskim određivanjem intenziteta fluorescencije dokazana je fluorescencija za sens2, sens1antisens1 i sens1antisens2 peptid. S druge strane, sens1, sens2antisens1 i sens2antisens1 peptid nemaju svojstvo fluorescencije.
- Interakcija sens i antisens peptida potvrđena je spektrofluorimetrijskim određivanjem promjene intenziteta fluorescencije pri različitim koncentracijama titranta. Izračunate vrijednosti K_d se kreću u mikromolarnom području ($K_d \sim 10^{-6}$ M) što ukazuje na jaku interakciju.
- Sens1 peptid ima veći afinitet vezanja za sens1antisens2 peptid nego za sens1antisens1. Sens2 peptid ima veći afinitet vezanja za sens2antisens1 peptid nego za sens2antisens2.
- Antisens peptidi, posebice oni jačeg afiniteta vezanja, mogu poslužiti kao spojevi kandidati u daljnjim istraživanjima inhibicijskog učinka na amoditoksin A i kao predložak za dizajniranje drugih, potencijalno prihvatljivijih antisens peptida.
- Potvrda interakcije oligopeptida, tj. peptida s malim brojem aminokiselina može biti značajan poticaj budućim istraživanjima koja će se bazirati na njihovoj primjeni kao lijekova.

6. LITERATURA

Al B, Orak M, Aldemir M, Güloğlu C. Snakebites in adults from the Diyarbakir region in southeast Turkey. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, 2010, 16, 210-214.

Amininasab M, Elmi MM, Endlich N, Endlich K, Parekh N, Naderi-Manesh H, Schaller J, Mostafavi H, Sattler M, Sarbolouki MN, Muhle-Goll C. Functional and structural characterization of a novel member of the natriuretic family of peptides from the venom of *Pseudocerastes persicus*. *FEBS Lett*, 2004, 557, 104-108.

Ande SR, Kommoju PR, Draxl S, Murkovic M, Macheroux P, Ghisla S, Ferrando-May E. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. *Apoptosis*, 2006, 11, 1439-1451.

Arlinghaus FT, Eble JA. C-type lectin-like proteins from snake venoms. *Toxicon*, 2012, 60, 512-519.

Berg OG, Gelb MH, Tsai MD, Jain MK. Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A(2)-paradigm. *Chem Rev*, 2001, 101, 2613-54.

Binding affinity, 2021., <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/measurement-type/binding-affinity>, pristupljeno 28.8.2021.

Bjarnason JB, Fox JW. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol Ther*, 1994, 62, 325-372.

Blalock JE. Genetic origins of protein shape and interaction rules. *Nat Med*, 1995, 1, 876-878.

Blalock JE, Smith EM. Hydrophobic anti-complementarity of amino acids based on the genetic code. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, 121, 203-7.

Brentani RR. Biological implications of complementary hydrophobicity of amino acids. *J Theor Biol*, 1988, 135, 495-499.

Brgles M, Kurtović T, Kovačić L, Križaj I, Barut M, Lang Balija M, Allmaier G, Marchetti-Deschmann M, Halassy B. Identification of proteins interacting with ammodytoxins in *Vipera ammodytes ammodytes* venom by immuno-affinity chromatography. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406, 293-304.

Brown RL, Haley TL, West KA, Crabb JW. Pseudechetoxin: A peptide blocker of cyclic nucleotide-gated ion channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96, 754-759.

Brvar M, Kurtović T, Grenc D, Lang Balija M, Križaj I, Halassy B. *Vipera ammodytes* bites treated with antivenom ViperaTAb: a case series with pharmacokinetic evaluation. *Clin Toxicol*, 2017, 55, 241-248.

Calvete JJ, Moreno-Murciano MP, Theakston RD, Kisiel DG, Marcinkiewicz C. Snake venom disintegrins: Novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. *Biochem J*, 2003, 372, 725-734.

Calvete JJ, Sanz L, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM. Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Lett*, 2009, 583, 1736-1743.

Calvete JJ. The continuing saga of snake venom disintegrins. *Toxicon*, 2013, 62, 40-49.

Chang CC. Neurotoxins with phospholipase A2 activity in snake venoms. *Proc Natl Sci Counc Repub China B*, 1985, 9, 126-142.

Chin D, Means AR. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol*, 2000, 10, 322-328.

Chippaux JP, Williams V, White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, 1991, 29, 1279-1303.

Clemetson KJ. Snake C-type lectins (Snaclecs) that inhibit or activate platelets by binding to receptors. *Toxicon*, 2010, 56, 1236-1246.

Čopić A, Vučemilo N, Gubenšek F, Križaj I. Identification and purification of a novel receptor

for secretory phospholipase A2 in porcine cerebral cortex. *J Biol Chem*, 1999, 274, 26315-26320.

De Vieira Santos MM, Sant'Ana CD, Giglio JR, da Silva RJ, Sampaio SV, Soares AM, Fecchio D. Antitumoural effect of an L-amino acid oxidase isolated from Bothrops jararaca snake venom. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2008, 102, 533-542.

Dendorfer A, Wolfrum S, Dominiak P. Pharmacology and cardiovascular implications of the kinin-kallikrein system. *Jpn J Pharmacol*, 79, 403-426.

Du XY, Clemetson KJ. Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon*, 2002, 40, 659–665.

Envenomation, 2021., <https://aci.health.nsw.gov.au/networks/icnsw/patients-and-families/patient-conditions/envenomation>, pristupljeno 28.8.2021.

Escalante T, Rucavado A, Fox JW, Gutiérrez JM. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *J Proteomics*, 2011, 74, 1781-1794.

Faktorska analiza, 2021., <https://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=18886>, pristupljeno 28.8.2021.

Fassina G, Zamai M, Brigham-Burke M, Chaiken IM. Recognition properties of antisense peptides to Arg8-vasopressin/bovine neurophysin II biosynthetic precursor sequences. *Biochemistry*, 1989, 28, 8811-8818.

Fathi H B, Rowan EG, Harvey AL. The facilitatory actions of snake venom phospholipase A(2) neurotoxins at the neuromuscular junction are not mediated through voltage-gated K(+) channels. *Toxicon*, 2001, 39, 1871-1882.

Fernandez JH, Neshich G, Camargo AC. Using bradykinin-potentiating peptide structures to develop new antihypertensive drugs. *Genet Mol Res*, 2004, 3, 554-563.

Fox JW, Serrano SM. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom

complexity. *FEBS J*, 2008, 275, 3016-3030.

Francis B, Kaiser II. Inhibition of metalloproteinases in *Bothrops asper* venom by endogenous peptides. *Toxicon*, 1993, 31, 889-899.

Frangides CY, Koulouras V, Kouni SN, Tzortzatos GV, Nikolaou A, Pneumaticos J, Pierrakeas C, Niarchos C, Kounis NG, Koutsojannis CM. Snake venom poisoning in Greece. Experiences with 147 cases. *Eur J Intern Med*, 2006, 17, 24-27.

Fry BG. From genome to 'venome': Molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome Res*, 2005a, 15, 403-420.

Fry BG, Vidal N, Norman JA, Vonk FJ, Scheib H, Ramjan SF, Kuruppu S, Fung K, Hedges SB, Richardson MK, Hodgson WC, Ignjatovic V, Summerhayes R, Kochva E. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature*, 2006, 439, 584-588.

Fry BG, Wickramaratana JC, Lemme S, Beuve A, Garbers D, Hodgson WC, Alewood P. Novel natriuretic peptides from the venom of the inland taipan (*Oxyuranus microlepidotus*): Isolation, chemical and biological characterisation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005b, 327, 1011-1015.

Furukawa S, Hayashi K. Isolation and characterization of nerve growth factor from the venom of *naja naja atra*. *J Biochem*, 1976, 80, 1001-1009.

Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon MR, Cordeiro MF. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J*, 2014, 28, 1317-1330.

Georgieva D, Murakami M, Perband M, Arni R, Betzel C. The structure of a native l-amino acid oxidase, the major component of the *Vipera ammodytes ammodytes* venom, reveals dynamic active site and quaternary structure stabilization by divalent ions. *Mol Biosyst*, 2011, 7, 379-384.

Georgieva D, Risch M, Kardas A, Buck F, von Bergen M, Betzel C. Comparative analysis of

the venom proteomes of *Vipera ammodytes ammodytes* and *vipera ammodytes meridionalis*. *J Proteome Res*, 2008, 7, 866-886.

Gopcevic K, Karadzic I, Izrael-Zivkovic L, Medic A, Isakovic A, Popović M, Kekic D, Stanojkovic T, Hozic A, Cindric M. Study of the venom proteome of *Vipera ammodytes ammodytes* (Linnaeus, 1758): A qualitative overview, biochemical and biological profiling. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, 2021, 37, 100776.

Gubensšek F, Ritonja A, Cotič V, Koželj G, Pihler B, Orešković D, Bulat M. Distribution of *vipera ammodytes* toxic phospholipase A in the cat and its ability to cross the blood-brain barrier. *Toxicon*, 1982, 20, 191-194.

Guidelines for Dissolving Peptides, 2021.,

https://www.genscript.com/site2/document/12464_20100407015038.PDF, pristupljeno 28.8.2021.

Guo C, Liu S, Yao Y, Zhang Q, Sun MZ. Past decade study of snake venom l-amino acid oxidase. *Toxicon*, 2012, 60, 302-311.

Guo CT, McClean S, Shaw C, Rao PF, Ye MY, Bjourson AJ. Purification, characterization and molecular cloning of chymotrypsin inhibitor peptides from the venom of Burmese *Daboia russelii siamensis*. *Peptides*, 2013a, 43, 126-132.

Guo CT, McClean S, Shaw C, Rao PF, Ye MY, Bjourson AJ. Trypsin and chymotrypsin inhibitor peptides from the venom of Chinese *Daboia russelii siamensis*. *Toxicon*, 2013b, 63, 154-164.

Gutiérrez JM, Lomonte B, León G, Alape-Girón A, Flores-Díaz M, Sanz L, Angulo Y, Calvete JJ. Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *J Proteomics*, 2009, 72, 165-182.

Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*, 2005, 45, 997-1011.

Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Lomonte B, Angulo Y, Fox JW. Tissue pathology induced by snake venoms: how to understand a complex pattern of alterations from a systems biology perspective?. *Toxicon*, 2010, 55, 166-170.

Gutiérrez JM, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*, 2000, 82, 841-850.

Heal JR, Roberts GW, Raynes JG, Bhakoo A, Miller AD. Specific interactions between sense and complementary peptides: The basis for the proteomic code. *Chembiochem*, 2002, 3, 136-151.

Ianzer D, Konno K, Marques-Porto R, Vieira Portaro FC, Stöcklin R, Martins de Camargo AC, Pimenta DC. Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. *Peptides*, 2004, 25, 1085-1092.

Ingham KC. On the application of Job's method of continuous variation to the stoichiometry of protein-ligand complexes. *Anal Biochem*, 1975, 68, 660-663.

Ivanovski G, Čopič A, Križaj I, Gubenšek F, Pungerčar J. The amino acid region 115-119 of ammodytoxins plays an important role in neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 276, 1229-1234.

Jelić D, Ajtić R, Sterijovski B, Crnobrnja-Isailović J, Lelo S, Tomović LJ. Distribution of the genus *Vipera* in the western and central Balkans. *Herpetozoa*, 2013, 25, 109-132.

Johnson ML, Faunt LM. Parameter estimation by least-squares methods. *Methods Enzymol*, 1992, 210, 1-37.

Kamiguti AS, Zuzel M, Theakston RD. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. *Braz J Med Biol Res*, 1998, 31, 853-862.

Karabuva S, Vrkić I, Brizić I, Ivić I, Lukšić B. Venomous snakebites in children in southern

Croatia. *Toxicon*, 2016, 112, 8-15.

KD value: a quantitative measurement of antibody affinity, 2021.,

<https://www.abcam.com/primary-antibodies/kd-value-a-quantitative-measurement-of-antibody-affinity>, pristupljeno 28.8.2021.

Kerkelä R, Ulvila J, Magga J. Natriuretic peptides in the regulation of cardiovascular physiology and metabolic events. *J Am Heart Assoc*, 2015, 4, 1-14.

Kini RM. Excitement ahead: Structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon*, 2003, 42, 827-840.

Kostiza T, Meier J. Nerve growth factors from snake venoms: chemical properties, mode of action and biological significance. *Toxicon*, 1996, 34, 787-806.

Kovačić L, Novinec M, Petan T, Baici A, Križaj I. Calmodulin is a nonessential activator of secretory phospholipase A(2). *Biochemistry*, 2009, 48, 11319-11328.

Križaj I. Ammodytoxin: A window into understanding presynaptic toxicity of secreted phospholipases A2 and more. *Toxicon*, 2011, 58, 219-229.

Križaj I, Bieber AL, Ritonja A, Gubenšek F. The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A2 homologue from *Vipera ammodytes* venom. *Eur J Biochem*, 1991, 202, 1165-1168.

Križaj I, Dolly JO, Gubenšek F. Identification of the neuronal acceptor in bovine cortex for ammodytoxin C, a presynaptically neurotoxic phospholipase A2. *Biochemistry*, 1994, 33, 13938-13945.

Križaj I, Faure G, Gubenšek F, Bon C. Neurotoxic phospholipases A2 ammodytoxin and crotoxin bind to distinct high-affinity protein acceptors in *Torpedo marmorata* electric organ. *Biochemistry*, 1997, 36, 2779-2787.

Križaj I, Gubenšek F. Neuronal receptors for phospholipases A2 and β -neurotoxicity.

Biochimie, 2000, 82, 807-814.

Križaj I, Rowan EG, Gubenšek F. Ammodytoxin A acceptor in bovine brain synaptic membranes. *Toxicon*, 1995, 33, 437-449.

Križaj I, Turk D, Ritonja A, Gubenšek F. Primary structure of ammodytoxin C further reveals the toxic site of ammodytoxin. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 999, 198-202.

Kurtović T, Brgles M, Leonardi A, Balijs ML, Križaj I, Allmaier G, Marchetti-Deschmann M, Halassy B. Ammodytagin, a heterodimeric metalloproteinase from *Vipera ammodytes* ammodytes venom with strong hemorrhagic activity. *Toxicon*, 2011, 58, 570-582.

Kurtović T, Brvar M, Grenc D, Lang Balijs M, Križaj I, Halassy B. A single dose of viperfavTM may be inadequate for *Vipera ammodytes* snake bite: A case report and pharmacokinetic evaluation. *Toxins (Basel)*, 2016, 8, 244.

Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, 1982, 157, 105-132.

Lakowicz JR. Protein Fluorescence. U: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Lakowicz JR, urednik, Boston, Springer, 1999, str. 445-486.

Lambeau G, Ancian P, Nicolas JP, Beiboer SH, Moinier D, Verheij H, Lazdunski M. Structural elements of secretory phospholipases A2 involved in the binding to M-type receptors. *J Biol chem*, 1995, 270, 5534-5540.

Laskowski M Jr, Kato I. Protein Inhibitors of Proteinases. *Annu Rev Biochem*, 1980, 49, 593-626.

Latinović Z, Leonardi A, Kovačič L, Koh CY, Šribar J, Bakija AT, Venkateswarlu D, Kini RM, Križaj I. The First Intrinsic Tenase Complex Inhibitor with Serine Protease Structure Offers a New Perspective in Anticoagulant Therapy. *Thromb Haemost*, 2018, 118, 1713-1728.

Latinović Z, Leonardi A, Petan T, Žlajpah M, Križaj I. Disintegrins from the venom of *vipera*

ammodytes ammodytes efficiently inhibit migration of breast cancer cells. *Acta Chim Slov*, 2017, 64, 555-559.

Lee CY, Tsai MC, Chen YM, Ritonja A, Gubenšek F. Mode of neuromuscular blocking action of toxic phospholipases A2 from *Vipera ammodytes* venom. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1984, 268, 313-324.

Leonardi A, Fox JW, Trampuš-Bakija A, Križaj I. Ammodytase, a metalloprotease from *Vipera ammodytes ammodytes* venom, possesses strong fibrinolytic activity. *Toxicon*, 2007, 49, 833-842.

Leonardi A, Fox JW, Trampuš-Bakija A, Križaj I. Two coagulation factor X activators from *Vipera a. ammodytes* venom with potential to treat patients with dysfunctional factors IXa or VIIa. *Toxicon*, 2008, 52, 628-637.

Leonardi A, Gubenšek F, Križaj I. Purification and characterisation of two hemorrhagic metalloproteinases from the venom of the long-nosed viper, *Vipera ammodytes ammodytes*. *Toxicon*, 2002, 40, 55-62.

Leonardi A, Sajevic T, Kovačič L, Pungerčar J, Lang Balija M, Halassy B, Trampuš Bakija A, Križaj I. Hemorrhagin VaH4, a covalent heterodimeric P-III metalloproteinase from *Vipera ammodytes ammodytes* with a potential antitumour activity. *Toxicon*, 2014, 77, 141-155.

Leonardi A, Sajevic T, Latinović Z, Pungerčar J, Balija ML, Bakija AT, Vidmar R, Halassy B, Križaj I. Structural and biochemical characterisation of VaF1, a P-IIIa fibrinogenolytic metalloproteinase from *Vipera ammodytes ammodytes* venom. *Biochimie*, 2015, 109, 78-87.

Leonardi A, Sajevic T, Pungerčar J, Križaj I. Comprehensive Study of the Proteome and Transcriptome of the Venom of the Most Venomous European Viper: Discovery of a New Subclass of Ancestral Snake Venom Metalloproteinase Precursor-Derived Proteins. *J Proteome Res*, 2019, 18, 2287-2309.

Liang NS, Pungerčar J, Križaj I, Štrukelj B, Gubenšek F. Expression of fully active ammodytoxin A, a potent presynaptically neurotoxic phospholipase A2, in *Escherichia coli*.

FEBS Lett, 1993, 334, 55-59.

Logonder U, Križaj I, Rowan EG, Harris JB. Neurotoxicity of ammodytoxin A in the envenoming bites of *Vipera ammodytes ammodytes*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2008, 67, 1011-1019.

Lu Q, Navdaev A, Clemetson JM, Clemetson KJ. Snake venom C-type lectins interacting with platelet receptors. Structure-function relationships and effects on haemostasis. *Toxicon*, 2005, 45, 1089-1098.

Lukšić B, Bradarić N, Prgomet S. Venomous snakebites in southern Croatia. *Coll antropol*, 2006, 30, 191-197.

Mackessy SP, Baxter LM. Bioweapons synthesis and storage: The venom gland of front-fanged snakes. *Zool Anz*, 2006, 245, 147-159.

Mackessy SP. Morphology and ultrastructure of the venom glands of the northern pacific rattlesnake *Crotalus viridis oreganus*. *J Morphol*, 1991, 208, 109-128.

Maeder M, Zuberbühler AD. Nonlinear Least-Squares Fitting of Multivariate Absorption Data. *Anal Chem*, 1990, 62, 2220-2224.

Marcinkiewicz C. Applications of snake venom components to modulate integrin activities in cell-matrix interactions. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45, 1974-1986.

Marinov I, Atanasov VN, Stankova E, Duhalov D, Petrova S, Hubenova A. Severe coagulopathy after *Vipera ammodytes ammodytes* snakebite in Bulgaria: A case report. *Toxicon*, 2010, 56, 1066-1069.

Markland FS. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*, 1998, 36, 1749-1800.

Markus G, Tritsch GL, Parthasarathy R. A model for hydrophobic peptide interactions. *Arch Biochem Biophys*, 1989, 272, 433-439.

Marquardt DW. An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. *SIAM J Appl Math*, 1963, 11, 431-441.

Marsh N, Williams V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon*, 2005, 45, 1171-1181.

Metoda najmanjih kvadrata, 2021., <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=70244>, pristupljeno 28.8.2021.

Morita T. Structures and functions of snake venom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anticoagulant-, procoagulant-, and platelet-modulating activities. *Toxicon*, 2005, 45, 1099-1114.

Moura-da-Silva AM, Della-Casa MS, David AS, Assakura MT, Butera D, Lebrun I, Shannon JD, Serrano SM, Fox JW. Evidence for heterogeneous forms of the snake venom metalloproteinase jararhagin: a factor contributing to snake venom variability. *Arch Biochem Biophys*, 2003, 409, 395-401.

Mukherjee AK, Mackessy SP, Dutta S. Characterization of a Kunitz-type protease inhibitor peptide (Rusvikunin) purified from *Daboia russelii russelii* venom. *Int J Biol Macromol*, 2014, 67, 154-162.

Munekiyo SM, Mackessy SP. Presence of peptide inhibitors in rattlesnake venoms and their effects on endogenous metalloproteases. *Toxicon*, 2005, 45, 255-263.

Odell GV, Ferry PC, Vick LM, Fenton AW, Decker LS, Cowell RL, Ownby CL, Gutierrez JM. Citrate inhibition of snake venom proteases. *Toxicon*, 1998, 36, 1801-1806.

Parker CA, Rees WT. Fluorescence spectrometry. A review. *Analyst*, 1962, 87, 83-111.

Pearce FL, Banks BE, Banthorpe DV, Berry AR, Davies HS, Vernon CA. The Isolation and Characterization of Nerve-Growth Factor from the Venom of *Vipera russelli*. *Eur J Biochem*, 1972, 29, 417-425.

Petan T, Križaj I, Gelb MH, Pungercar J. Ammodytoxins, potent presynaptic neurotoxins, are also highly efficient phospholipase A2 enzymes. *Biochemistry*, 2005, 44, 12535-12545.

Petan T, Križaj I, Gubenšek F, Pungercar J. Phenylalanine-24 in the N-terminal region of ammodytoxins is important for both enzymic activity and presynaptic toxicity. *Biochem J*, 2002, 363, 353-358.

Petan T, Križaj I, Pungercar J. Restoration of enzymatic activity in a Ser-49 phospholipase A2 homologue decreases its Ca²⁺-independent membrane-damaging activity and increases its toxicity. *Biochemistry*, 2007, 46, 12795-12809.

Peters C, Mayer A. Ca²⁺/calmodulin signals the completion of docking and triggers a late step of vacuole fusion. *Nature*, 1998, 396, 575-580.

Plavšić F, Žuntar I. Otrovi životinja. U: Uvod u analitičku toksikologiju. Plavšić F, Žuntar I, urednici, Zagreb, Školska knjiga, 2006, str. 206-222.

Poskok, 2020., <https://ju-priroda.hr/2020/04/poskok/>, pristupljeno 28.8.2021.

Poskok, 2021., <https://www.plantea.com.hr/poskok/>, pristupljeno 28.8.2021.

Prijatelj P, Jenko Pražnikar Z, Petan T, Križaj I, Pungercar J. Mapping the structural determinants of presynaptic neurotoxicity of snake venom phospholipases A2. *Toxicon*, 2008, 51, 1520-1529.

Prijatelj P, Križaj I, Kralj B, Gubenšek F, Pungercar J. The C-terminal region of ammodytoxins is important but not sufficient for neurotoxicity. *Eur J Biochem*, 2002, 269, 5759-5764.

Prijatelj P, Šribar J, Ivanovski G, Križaj I, Gubenšek F, Pungercar J. Identification of a novel binding site for calmodulin in ammodytoxin A, a neurotoxic group IIA phospholipase A2. *Eur J Biochem*, 2003, 270, 3018-3025.

Prijatelj P, Vardjan N, Rowan EG, Križaj I, Pungercar J. Binding to the high-affinity M-type receptor for secreted phospholipases A2 is not obligatory for the presynaptic neurotoxicity

of ammodytoxin A. *Biochimie*, 2006, 88, 1425-1433.

Pungerčar J, Križaj I. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A2. *Toxicon*, 2007, 50, 871-892.

Pungerčar J, Žnidaršič PP, Petan T. Structure-function relationship studies of ammodytoxins and ammodytins by protein engineering. *Acta Chim Slov*, 2011, 58, 660-670.

Radonić V, Budimir D, Bradarić N, Lukšić B, Sapunar D, Vilović K. Envenomation by the horned viper (*Vipera ammodytes* L.). *Mil Med*, 1997, 162, 179-182.

Ribeiro MM, Franquelim HG, Castanho MA, Veiga AS. Molecular interaction studies of peptides using steady-state fluorescence intensity. Static (de)quenching revisited. *J Pept Sci*, 2008, 14, 401-406.

Ritonja A, Gubenšek F. Ammodytoxin A, a highly lethal phospholipase A2 from *Vipera ammodytes ammodytes* venom. *Biochim biophys acta*, 1985, 828, 306-312.

Ritonja A, Machleidt W, Turk V, Gubenšek F. Amino-Acid Sequence of Ammodytoxin B Partially Reveals the Location of the Site of Toxicity of Ammodytoxins. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1986, 367, 919-924.

Ritonja A, Turk V, Gubenšek F. Serine Proteinase Inhibitors from *Vipera ammodytes* Venom. Isolation and Kinetic Studies. *Eur J Biochem*, 1983, 133, 427-432.

Root-Bernstein RS. Amino acid pairing. *J Theor Biol*, 1982, 94, 885-894.

Root-Bernstein RS. Protein replication by amino acid pairing. *J Theor Biol*, 1983, 100, 99-106.

RSM Brochure, 2020., www.olisclarity.com/wp-content/uploads/2020/08/RSM-Brochure.pdf, pristupljeno 20.7.2021.

RSM Hardware Handbook, 1998.,

www.olisweb.com/software/Manuals/RSM%20Hardware%20Handbook.pdf, pristupljeno

20.7.2021.

Rucavado A, Soto M, Escalante T, Loría GD, Arni R, Gutiérrez JM. Thrombocytopenia and platelet hypoaggregation induced by Bothrops asper snake venom. Toxins involved and their contribution to metalloproteinase-induced pulmonary hemorrhage. *Throm Haemost*, 2005, 94, 123-131.

Sajevic T, Leonardi A, Kovačič L, Lang-Balija M, Kurtović T, Pungercar J, Halassy B, Trampuš-Bakija A, Križaj I. VaH3, one of the principal hemorrhagins in Vipera ammodytes ammodytes venom, is a homodimeric P-IIIc metalloproteinase. *Biochimie*, 2013, 95, 1158-1170.

Sajevic T, Leonardi A, Križaj I. An overview of hemostatically active components of vipera ammodytes ammodytes venom. *Toxin Rev*, 2014, 33, 33-36.

Sakurai Y, Takatsuka H, Yoshioka A, Matsui T, Suzuki M, Titani K, Fujimura Y. Inhibition of human platelet aggregation by L-amino acid oxidase purified from Naja naja kaouthia venom. *Toxicon*, 2001, 39, 1827-1833.

Samel M, Subbi J, Siigur J, Siigur E. Biochemical characterization of fibrinolytic serine proteinases from Vipera lebetina snake venom. *Toxicon*, 2002, 40, 51-54.

Saul FA, Prijatelj-Žnidaršič P, Vulliez-le Normand B, Villette B, Raynal B, Pungercar J, Križaj I, Faure G. Comparative structural studies of two natural isoforms of ammodytoxin, phospholipases A2 from Vipera ammodytes ammodytes which differ in neurotoxicity and anticoagulant activity. *J Struct Biol*, 2010, 169, 360-369.

Sciani JM, Pimenta DC. The modular nature of bradykinin-potentiating peptides isolated from snake venoms. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 2017, 23, 45.

Shai Y, Brunck TK, Chaiken IM. Antisense peptide recognition of sense peptides: sequence simplification and evaluation of forces underlying the interaction. *Biochemistry*, 1989, 28, 8804-8811.

Shai Y, Flashner M, Chaiken IM. Anti-sense peptide recognition of sense peptides: direct quantitative characterization with the ribonuclease S-peptide system using analytical high-performance affinity chromatography. *Biochemistry*, 1987, 26, 669-675.

Siigur E, Neuman T, Järve V, Tara A, Siigur J. Isolation and characterization of nerve growth factor from *Vipera lebetina* (snake) venom. *Comp Biochem Physiol B*, 1985, 81, 211-215.

Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17, 611-625.

Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: Classification and characterization. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1488, 1-19.

Smith PJ, Brandt WF, Stickells BJ, von Holt C. Bitis arietans nerve growth factor is a disulphide-linked homodimer. *Comp Biochem Physiol B*, 1992, 103, 975-980.

Snitko Y, Koduri RS, Han SK, Othman R, Baker SF, Molini BJ, Wilton DC, Gelb MH, Cho W. Mapping the interfacial binding surface of human secretory group IIa phospholipase A2. *Biochemistry*, 1997, 36, 14325-14333.

SPECFIT/32™ Global Analysis System for Windows, 2004.,

http://www.jasco.de/uploads/files/20130208092625_SpecFit-SW-Datenblatt.pdf, pristupljeno 28.8.2021.

Šribar J, Čopič A, Pariš A, Sherman NE, Gubenšek F, Fox JW, Križaj I. A High Affinity Acceptor for Phospholipase A2 with Neurotoxic Activity Is a Calmodulin. *J Biol Chem*, 2001, 276, 12493-12496.

Šribar J, Čopič A, Poljšak-Prijatelj M, Kuret J, Logonder U, Gubenšek F, Križaj I. R25 is an intracellular membrane receptor for a snake venom secretory phospholipase A2. *FEBS Lett*, 2003a, 553, 309-314.

Šribar J, Kovačič L, Oberčkal J, Ivanušec A, Petan T, Fox JW, Križaj I. The neurotoxic secreted phospholipase A2 from the *Vipera a. ammodytes* venom targets cytochrome c oxidase in

neuronal mitochondria. *Sci Rep*, 2019, 9, 1-12.

Šribar J, Oberčkal J, Križaj I. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A2: An update. *Toxicon*, 2014, 89, 9-16.

Šribar J, Sherman NE, Prijatelj P, Faure G, Gubenšek F, Fox JW, Aitken A, Pungerčar J, Križaj I. The neurotoxic phospholipase A2 associates, through a non-phosphorylated binding motif, with 14-3-3 protein γ and ϵ isoforms. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003b, 302, 691-696.

Štambuk N, Konjevoda P, Boban-Blagaić A, Pokrić B. Molecular Recognition Theory of the complementary (antisense) peptide interactions. *Theory Biosci*, 2005, 123, 265-275.

Sunagar K, Fry BG, Jackson TN, Casewell NR, Undheim EA, Vidal N, Ali SA, King GF, Vasudevan K, Vasconcelos V, Antunes A. Molecular evolution of vertebrate neurotrophins: Co-option of the highly conserved nerve growth factor gene into the advanced snake venom arsenal. *PLoS One*, 2013, 8, 81827.

Suto K, Yamazaki Y, Morita T, Mizuno H. Crystal structures of novel Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) from snake venoms: Insight into selective VEGF binding to kinase insert domain-containing receptor but not to fms-like tyrosine kinase-1. *J Biol Chem*, 2005, 280, 2126-2131.

Tadokoro T, Modahl CM, Maenaka K, Aoki-Shioi N. Cysteine-rich secretory proteins (CRISPs) from venomous snakes: An overview of the functional diversity in a large and underappreciated superfamily. *Toxins (Basel)*, 2020, 12, 175.

Thakur R, Mukherjee AK. Pathophysiological significance and therapeutic applications of snake venom protease inhibitors. *Toxicon*, 2017, 131, 37-47.

The Levenberg-Marquardt method for nonlinear least squares curve-fitting problems, 2020., <https://people.duke.edu/~hpgavin/ce281/lm.pdf>, pristupljeno 28.8.2021.

Thordarson P. Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry. *Chem Soc Rev*, 2011, 40, 1305-1323.

Trummal K, Tõnismägi K, Paalme V, Järvekülg L, Siigur J, Siigur E. Molecular diversity of snake venom nerve growth factors. *Toxicon*, 2011, 58, 363-368.

Vaiyapuri S, Thiyagarajan N, Hutchinson EG, Gibbins JM. Sequence and phylogenetic analysis of viper venom serine proteases. *Bioinformatics*, 2012, 8, 763-772.

Vardjan N, Sherman NE, Pungercar J, Fox JW, Gubenšek F, Križaj I. High-molecular-mass receptors for ammodytoxin in pig are tissue-specific isoforms of M-type phospholipase A2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289, 143-149.

Vink S, Jin AH, Poth KJ, Head GA, Alewood PF. Natriuretic peptide drug leads from snake venom. *Toxicon*, 2012, 59, 434-445.

Vipera ammodytes, 2019., <https://eunis.eea.europa.eu/species/Vipera%20ammodytes>, pristupljeno 8.5.2021.

Vučemilo N, Čopič A, Gubenšek F, Križaj I. Identification of a new high-affinity binding protein for neurotoxic phospholipases A2. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 251, 209-212.

Wagstaff SC, Favreau P, Cheneval O, Laing GD, Wilkinson MC, Miller RL, Stöcklin R, Harrison RA. Molecular characterisation of endogenous snake venom metalloproteinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*, 365, 650-656.

WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins, 2016.,

https://www.who.int/biologicals/expert_committee/Antivenom_WHO_Guidelines_DJW_DE_B_mn_cp.pdf?ua%20=%201, pristupljeno 28.8.2021.

Yamazaki Y, Koike H, Sugiyama Y, Motoyoshi K, Wada T, Hishinuma S, Mita M, Morita T. Cloning and characterization of novel snake venom proteins that block smooth muscle contraction. *Eur J Biochem*, 2002, 269, 2708-2715.

Yamazaki Y, Morita T. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins.

Toxicon, 2004, 44, 227-231.

Yamazaki Y, Takani K, Atoda H, Morita T. Snake Venom Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs) Exhibit Potent Activity through Their Specific Recognition of KDR (VEGF Receptor 2). *J Biol Chem*, 2003, 278, 51985-51988.

Zhu Z, Liang Z, Zhang T, Zhu Z, Xu W, Teng M, Niu L. Crystal structures and amidolytic activities of two glycosylated snake venom serine proteinases. *J Biol Chem*, 2005, 280, 10524-10529.

Župunski V, Kordiš D, Gubenšek F. Adaptive evolution in the snake venom Kunitz/BPTI protein family. *FEBS Lett*, 2003, 547, 131-136.

7. SAŽETAK

Danas se kao terapija ugriza poskoka koriste imunoglobulini zmijskog protuotrova čija je proizvodnja složena, skupa i dugotrajna. Kao novi pristup liječenju predlaže se upotreba oligopeptida koji će se nekovalentno vezati na dijelove amoditoksina A odgovorne za neurotoksičnost inhibirajući njegovo djelovanje. Dizajn takvih oligopeptida temelji se na teoriji molekularnog prepoznavanja koja sugerira da svaka aminokiselina ulazi u interakciju s točno određenom aminokiselinom. Cilj ovog istraživanja je odrediti afinitet vezanja sens peptida koji predstavljaju neurotoksične dijelove amoditoksina A i njihovih potencijalno komplementarnih antisens peptida. Primarna struktura sens1 peptida je GMMILG, a njegovih antisens peptida SHHYEP i SHHYSP. Primarna struktura sens2 peptida je YIYRNYPDF, a njegovih antisens peptida INISIVGVK i VNISVIGIK. Konstante disocijacije određene su spektrofluorimetrijskim određivanjem intenziteta fluorescencije tijekom titracije. Kao titranti su korišteni sens1, sens2antisens1 i sens2antisens2 peptidi jer ne fluoresciraju zbog odsustva aromatskih aminokiselina. Kao titrandi su korišteni sens1antisens1, sens1antisens2 i sens2 peptidi koji fluoresciraju. Analizom eksperimentalno dobivenih podataka računalno su izračunate konstante disocijacija. Njihova vrijednost je usporediva s vrijednostima konstantama disocijacije većine antitijela, što upućuje na jaku interakciju, tj. afinitet vezanja. K_d za interakciju sens1 i njegovih antisens peptida su $5,071 \cdot 10^{-6}$ M i $1,434 \cdot 10^{-6}$ M, a za interakciju sens2 peptida i njegovih antisens peptida $1,143 \cdot 10^{-6}$ M i $9,569 \cdot 10^{-6}$ M. Navedeni rezultati potvrđuju vezanje sens i antisens peptida i potencijalni terapijski učinak antisens peptida koji se mogu koristiti u daljnjim istraživanjima. Pozitivan rezultat ovog istraživanja sugerira što veću upotrebu teorije molekularnog prepoznavanja za dizajniranje antisens peptida koji bi se mogli koristiti u raznim područjima biomedicine.

SUMMARY

Nowadays snake antivenom immunoglobulins are being used for snake bite treatment whose production is complex, expensive and long. Use of oligopeptides is suggested as a new therapeutic approach which form noncovalent bonds with ammodytoxin A neurotoxic sites inhibiting its action. Oligopeptide design is based on molecular recognition theory which indicates that every amino acid can interact with the only specific complementary amino acid. The aim of this research is the determination of binding affinity of sens peptides which represent ammodytoxin A neurotoxic sites and their potentially complementary antisens peptides. Primary structure of sens1 peptide is GMMILG and his antisens peptides are SHHYEP and SHHYSP. Primary structure of sens2 peptide is YIYRNYPDF and his antisens peptides are INISIVGVK and VNISVIGIK. Dissociation constants are determined by spectrofluorimetric measuring of fluorescence intensity during titration. Sens1, sens2antisens1 and sens2antisens2 peptides were used as titrants considering the fact they contain aromatic amino acids which are responsible for fluorescence. On the other hand, sens1antisens1, sens1antisens2 and sens2 peptides were used as titrands since they lack aromatic amino acids. Computer program analysed experimental data and calculated dissociation constants. Their values are comparable to those of antibodies which points to strong interaction, i. e. binding affinity. K_d values for sens1 peptide and its antisens peptides interactions are $5,071 \cdot 10^{-6}$ M and $1,434 \cdot 10^{-6}$ M and for sens2 and its antisens peptides interactions are $1,143 \cdot 10^{-6}$ M and $9,569 \cdot 10^{-6}$ M. These results confirm sens and antisens peptides binding as well as potential antisens therapeutic effect which can be further used in future studies. Also, positive results of this research suggest greater use of molecular recognition theory for antisens peptide design which can be applied in various biomedicine fields.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za opću i anorgansku kemiju
Opća kemija sa stehiometrijom
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Primjena antisens peptida kao novi pristup liječenja ugriza poskoka

Marin Marić

SAŽETAK

Danas se kao terapija ugriza poskoka koriste imunoglobulini zmijskog protuotrova čija je proizvodnja složena, skupa i dugotrajna. Kao novi pristup liječenju predlaže se upotreba oligopeptida koji će se nekovalentno vezati na dijelove amoditoksina A odgovorne za neurotoksičnost inhibirajući njegovo djelovanje. Dizajn takvih oligopeptida temelji se na teoriji molekularnog prepoznavanja koja sugerira da svaka aminokiselina ulazi u interakciju s točno određenom aminokiselinom. Cilj ovog istraživanja je odrediti afinitet vezanja sens peptida koji predstavljaju neurotoksične dijelove amoditoksina A i njihovih potencijalno komplementarnih antisens peptida. Primarna struktura sens1 peptida je GMMILG, a njegovih antisens peptida SHHYEP i SHHYSP. Primarna struktura sens2 peptida je YIYRNYPDF, a njegovih antisens peptida INISIVGVK i VNISVIGIK. Konstante disocijacije određene su spektrofluorimetrijskim određivanjem intenziteta fluorescencije tijekom titracije. Kao titranti su korišteni sens1, sens2antisens1 i sens2antisens2 peptidi jer ne fluoresciraju zbog odsustva aromatskih aminokiselina. Kao titrandi su korišteni sens1antisens1, sens1antisens2 i sens2 peptidi koji fluoresciraju. Analizom eksperimentalno dobivenih podataka računalno su izračunate konstante disocijacija. Njihova vrijednost je usporediva s vrijednostima konstantama disocijacije većine antitijela, što upućuje na jaku interakciju, tj. afinitet vezanja. K_d za interakciju sens1 i njegovih antisens peptida su $5,071 \cdot 10^{-6}$ M i $1,434 \cdot 10^{-6}$ M, a za interakciju sens2 peptida i njegovih antisens peptida $1,143 \cdot 10^{-6}$ M i $9,569 \cdot 10^{-6}$ M. Navedeni rezultati potvrđuju vezanje sens i antisens peptida i potencijalni terapijski učinak antisens peptida koji se mogu koristiti u daljnjim istraživanjima. Pozitivan rezultat ovog istraživanja sugerira što veću upotrebu teorije molekularnog prepoznavanja za dizajniranje antisens peptida koji bi se mogli koristiti u raznim područjima biomedicine.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 66 stranica, 14 grafičkih prikaza, 6 tablica i 168 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Vipera ammodytes, amoditoksin A, teorija molekularnog prepoznavanja, sens, antisens, afinitet

Mentor: **Dr. sc. Mario Gabričević**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Mario Gabričević**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Tin Weitner, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Viktor Pilepić, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: Rujan 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of General and Inorganic Chemistry
General chemistry and stoichiometry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Antisens peptides application as a new approach to horned viper envenomation treatment

Marin Marić

SUMMARY

Nowadays snake antivenom immunoglobulins are being used for snake bite treatment whose production is complex, expensive and long. Use of oligopeptides is suggested as a new therapeutic approach which form noncovalent bonds with ammodytoxin A neurotoxic sites inhibiting its action. Oligopeptide design is based on molecular recognition theory which indicates that every amino acid can interact with the only specific complementary amino acid. The aim of this research is the determination of binding affinity of sens peptides which represent ammodytoxin A neurotoxic sites and their potentially complementary antisens peptides. Primary structure of sens1 peptide is GMMILG and its antisens peptides are SHHYEP and SHHYSP. Primary structure of sens2 peptide is YIYRNYPDF and its antisens peptides are INISIVGVK and VNISVIGIK. Dissociation constants are determined by spectrofluorimetric measuring of fluorescence intensity during titration. Sens1, sens2antisens1 and sens2antisens2 peptides were used as titrants considering the fact they contain aromatic amino acids which are responsible for fluorescence. On the other hand, sens1antisens1, sens1antisens2 and sens2 peptides were used as titrands since they lack aromatic amino acids. Computer program analysed experimental data and calculated dissociation constants. Their values are comparable to those of antibodies which points to strong interaction, i. e. binding affinity. K_d values for sens1 peptide and its antisens peptides interactions are $5,071 \cdot 10^{-6}$ M and $1,434 \cdot 10^{-6}$ M and for sens2 and its antisens peptides interactions are $1,143 \cdot 10^{-6}$ M and $9,569 \cdot 10^{-6}$ M. These results confirm sens and antisens peptides binding as well as potential antisens therapeutic effect which can be further used in future studies. Also, positive results of this research suggest greater use of molecular recognition theory for antisens peptide design which can be applied in various biomedicine fields.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 66 pages, 14 figures, 6 tables and 168 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Vipera ammodytes, ammodytoxin A, molecular recognition theory, sens, antisens, affinity

Mentor: **Mario Gabričević, Ph.D. Associate Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Mario Gabričević, Ph.D. Associate Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Tin Weitner, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Viktor Pilepić, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2021.