Eksperimentalno i računalno istraživanje novih konjugata gvanidina s različitim fluoroforima kao liganada humane dipeptidil-peptidaze III

Ćehić, Mirsada

Doctoral thesis / Disertacija

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:630027

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-03**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Mirsada Ćehić

EKSPERIMENTALNO I RAČUNALNO ISTRAŽIVANJE NOVIH KONJUGATA GVANIDINA S RAZLIČITIM FLUOROFORIMA KAO LIGANADA HUMANE DIPEPTIDIL-PEPTIDAZE III

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019.

University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

Mirsada Ćehić

STUDY OF NOVEL FLUOROPHORE-GUANIDINE CONJUGATES AS LIGANDS OF HUMAN DIPEPTIDYL-PEPTIDASE III COMBINED EXPERIMENTAL AND COMPUTATIONAL APPROACH

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2019

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Mirsada Ćehić

EKSPERIMENTALNO I RAČUNALNO ISTRAŽIVANJE NOVIH KONJUGATA GVANIDINA S RAZLIČITIM FLUOROFORIMA KAO LIGANADA HUMANE DIPEPTIDIL-PEPTIDAZE III

DOKTORSKI RAD

Mentori:

dr. sc. Sanja Tomić,

dr. sc. Ivo Piantanida

Zagreb, 2019.

University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

Mirsada Ćehić

STUDY OF NOVEL FLUOROPHORE-GUANIDINE CONJUGATES AS LIGANDS OF HUMAN DIPEPTIDYL-PEPTIDASE III COMBINED EXPERIMENTAL AND COMPUTATIONAL APPROACH

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

dr. sc. Sanja Tomić,

dr. sc. Ivo Piantanida

Zagreb, 2019

Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za biokemiju proteina i molekulsko modeliranje i Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Sanje Tomić i prof. dr. sc. Ive Piantanide. Istraživanje u sklopu ovog doktorskog rada je dijelomično financirano sredstvima Hrvatske zaklade za znanost u sklopu projekata HRZZ-IP-2018-01-2936 i HRZZ-IP-2018-01-5475.

Zahvala

Zahvaljujem se svojim mentorima prof. dr. sc. Sanji Tomić i prof. dr. sc. Ivi Piantanidi prije svega na pruženoj prilici da budem njihov doktorand i da učim od njih. Bila mi je izuzetna čast i zadovoljstvo biti njihov doktorand i neizmjerno ću im zauvijek biti zahvalna za svo znanje i potporu koju su mi tijekom ovih godina pružali. Želim Vam se zahvaliti za vođenje tijekom izrade ovog rada, od planiranja i izvedbe eksperimenata, obrade rezultata pa do konačnog pisanog dijela, na stručnim savjetima, strpljenju i prijedlozima vezanim uz cijelokupni rad. Biti mentor osobi koja je izvan sustava je izuzetno teško no Vi ste uvijek iznašli način da moj rad bude neometan, da su mi osigurana sredstva i instrumenti, te da i ja mogu učestvovati na konferencijama unatoč svemu. Hvala Vam za sve što ste me naučili, kako onom vezanom za struku tako i onom izvan nje. Hvala Vam za svo strpljenje i razumijevanje koje ste za mene imali i svu pomoć koju ste mi nesebično pružali kada je to bilo potrebno.

Posebnu zahvalu posvećujem dr. sc. Zrinki Karačić koja je na mene prenjela veliko znanje po pitanju biokemije i uvela me u taj za mene do tada relativno strani svijet. Hvala joj za svo znanje koje mi je prenjela, vrijeme koje mi je nesebično posvetila, jako puno razumijevanja i strpljenja koje je uvijek imala.

Docent dr. sc. Filip Šupljika me posebno zadužio jer osim što je sjajan znanstvenik, genijalac uz to sve je jedno predivno ljudsko biće. Hvala mu za njegovu nesebičnu pomoć i spremnost da uvijek pomogne.

Veliko hvala dugujem dr. sc. Josipi Suć i dr. sc. Tamari Šmidlehner koje su sve ove spojeve sintetizirale i uvijek bile dostupne za diskusiju i konzultacije.

Dr. sc. Marko Tomin zaslužuje zasebnu zahvalu obzirom da je stoički podnosio enormnu količinu mojih pitanja i odvajao svoje dragocjeno vrijeme kako bi mi pomogao vezano za mnoga tehnička pitanja koja su me ponekada morila.

Želim se također zahvaliti i cijelom Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju u sklopu Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković, na svemu što su mi u proteklim godinama pružili, na svim savjetima, te za svo strpljenje koje su za mene imali. To ponekada nije baš bio jednostavan zadatak. Hvala im za svu radost koju su u

moj život donosili tijekom mog rada u laboratoriju, za sve lijepe momente koje smo skupa djelili.

Prof. dr. sc. Davor Kovačević sa Zavoda za fizikalnu kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta zaslužuje moje najdublje poštovanje i zahvalnost, jer je tijekom kompletnog mog postdiplomskog studija bio voditelj smjera koji me je vodio od prvog do evo zadnjeg dana na istome. Nesebično mi je pomagao u nizu izazovnih situacija, oko riješavanja administrativnih problema i mnogo toga drugoga što je bilo neizostavni dio bilo kojeg pa tako i moga školovanja. Uvijek je bio dostupan i na raspolaganju, spreman pomoći kako bi se našlo najbolje moguće riješenje bilo koje situacije s kojom sam se u ovih par proteklih godina susrela. Hvala Vam za to.

Želim se zahvaliti gđi. Jasni Dubrović iz Referade koja je uvijek bila tu za nas studente i imala razumijevanja za sve naše probleme.

Hvala Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, a posebice Zavodu za organsku kemiju koji mi je pružio priliku i povjerenje za rad sa studentima što mi je olakšalo studij jer bez toga nikako ne bih samostalno mogla financirati troškove školarine. Veliko hvala i mojim bivšim studentima koji su me tijekom rada podsjetili na najvažnije aspekte života, te tako doprinjeli tome da zaista postanem bolja verzija sebe.

Jedno veliko hvala dugujem i kolegama, koji su sve ove godine bili uz mene i uvijek spremni pomoći. Kada sam krenula s pisanjem zahvala shvatila sam koliko sam zapravo bogata osoba i koliko je divnih ljudi oko mene koji su mi uvijek nesebično pomagali.

Od kolega sa studija željela bih se zahvaliti dr. sc. Dori Sviben (uvijek si bila divna prijateljica, sjajna kolegica i inspiracija), dr. sc. Krešimiru Baumannu (za jedno divno prijateljstvo koje traje još od prvog dana u labosu), Ivani Nikšić-Franjić (koja je uz mene bila u mnogim teškim momentima moga života i koja je kako bi pomogla meni često znala zapostaviti sebe), Moniki Bjelčić (jer je iskreni prijatelj neovisno koliko nas kilometara dijeli, uvijek pozitivna i inspirativna) Nori Tir (jer si uvijek prisutna i sjetiš me se i kada ja sama na sebe zaboravim), Marini Kos (jer si Ftič i jedno predivno ljudsko biće koje u moj život svaki put iznova donese pregršt radosti), Dariju Dugandžiji (ajme razloga je milijun no ti znaš, lepi moj...), dr. sc. Mladenu Borovini (za predivne poklone, riječi utjehe, izvanrednu poeziju koju smo razmjenjivali, pomoć u najtežim životnim momentima i trajan utjecaj na život kao takav,

hvala ti što postojiš), Petri Kožar (za svu radost i umjetnost koju unosi u moj život svaki put iznva), Antunu Barišiću (jedna riječ-zamorac i velika sreća), Karlu Soviću, Alenu Bjelopetroviću (kolegi od prvih studentskih dana pa do vječnosti, kristalografu s kojim volim kafenisati, piscu, fotografu), Filipu S. (koji me je i financijski pomagao kada je bilo potrebe za time, uvijek ću ti biti zahvalna, jer ponekada je ta tvoja pomoć značila moju kompletnu egzistenciju), Davoru Šestanu (seenu, prijatelju, kolegi, koji me sjeti da ima nade ma koliko ponekada teško bilo), Ines Žepić (za druženja, radost i veselje), Anti Bubiću (legendi i drugu za divne momente i druženja), Senadi Muratović (jer si jedan divan insan, i k'o što reče čak je i Rumi imao svog Tabrizija), Ireni i Juri Radić, i šećer na kraju Martini Krznarić (mom Zeku, srećo moja o tebi bih i knjigu mogla napisati a ni to ne bi bilo dovoljno da se opiše sve ono što si u moj život donjela i što donosiš).

Hvala i svim drugim dobrim ljudima koji su me financijski pomagali tako što su mi davali prilike da si prizaradim kroz različite poslove kako bih se mogla financirati i preživjeti jer sam tijekom cijelog ovog studija bila nezaposlena osoba. Vjerujte jako je teško nemati priliku raditi posao s kojim ćeš moći živjeti život dostojan čovjeka, a u današnje doba sve je više onih koji to ni ne primjećuju jer ih jednostavno nije briga.

Najveće hvala dugujem svojoj obitelji, pogotovo majci Mineti koja nikada nije odustala od mene i podupiranja mojih snova. Mom ocu Sulejmanu koji nažalost nije poživio dovoljno dugo da doživi ovaj dan ali negdje s neba se vjerojatno smiješi. Hvala im za svu ljubav, potporu i razumijevanje koje mi svakodnevno pružaju, zaista, ja sam bogata osoba.

Za kraj dopustite da citiram Mešu Selimovića, za sve one koji drugima nanose bol neka im ovo bude podsjetnik da budu bolji ljudi jer neke rane nikad ne zacjele:

"Vidiš, još mislim dobro o tebi, i želim da se ponekad probudiš usred noći, i da dugo sjediš prekrštenih nogu na postelji, mučeći se kajanjem i stidom, zbog mene. Ali, neka ti je bogom prosto, nisi ti birao svoju sitnu dušu, dali su ti je, ne pitajući. Došao si na red kad drugih, boljih, više nije bilo."

Sadržaj

Sadržaj

ZAHVALA ..... **VIII**
SADRŽAJ **12**
SAŽETAK ..... **XV**
ABSTRACT ..... **XVII**
§ 1. UVOD **1**
1.1. Cilj i opseg rada **1**
§ 2. LITERATURNI PREGLED **3**
2.1. Peptidaze-proteolitički enzimi **3**
2.2. Metalopeptidaze **6**
2.3. Porodica metalopeptidaza M49 ..... **6**
2.3.1. Dipeptidil-peptidaza III *6*
2.4. Strukture DNA i RNA molekula **11**
2.4.1. Vezanje malih molekula na dvolančane DNA i RNA *15*
2.5. Molekularno prepoznavanje-nekovalentne interakcije **16**
2.6. Termodinamika molekularnog prepoznavanja **18**
2.7. Enzimska kinetika **23**
2.8. Teorijska osnova – računalna kemija **24**
§ 3. MATERIJALI I METODE **30**
3.1. Materijali **30**
3.2. Eksperimentalne metode korištene za istraživanje interakcija novosintetiziranih spojeva s E451A i hDPP III (WT) **31**
3.2.1. Priprema otopina *31*
3.2.2. Metode korištene za fizikalno kemijsku karakterizaciju novosintetiziranih spojeva *32*
3.2.3. Metode korištene za eksperimentalno istraživanje interakcija novosintetiziranih spojeva s E451A i hDPP III (WT) *33*
3.3. Računalne metode korištene za istraživanje interakcija novosintetiziranih spojeva s E451A i hDPP III (WT) **34**
3.3.1. Metoda molekulskog uklapanja *35*
3.3.2. Molekulska dinamika *36*
3.3.3. MMPBSA *37*

3.4. Eksperimentalne metode korištene za istraživanje interakcija novosintetiziranih spojeva s ctDNA i pApU 39

3.4.1. Metoda termičke denaturacije (mekšanja) dvolančanih DNA i RNA 39

3.4.2. Spektrofotometrijske (UV/Vis, fluorimetrijske) titracije 39

3.4.3. Cirkularni dikroizam 40

3.4.4. Obrada rezultata spektrofotometrijskih titracija s ciljem izračuna konstante stabilnosti kompleksa 41

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA 43

4.1. Rezultati eksperimentalnog istraživanja s E451A i hDPP III (WT) 43

4.1.1. Fizikalno kemijska karakterizacija puferiranih otopina novosintetiziranih liganada 43

4.1.2. Eksperimentalno istraživanje interakcija novosintetiziranih liganada s E451A u uvjetima sličnim biološkim sustavima 46

4.1.3. Eksperimentalno istraživanje interakcija novosintetiziranih liganada s hDPP III (WT) u uvjetima sličnim biološkim sustavima 51

4.2. Rezultati računalnih istraživanja kompleksa GPC konjugata s hDPP III (WT i neaktivnim E451A mutantom) 56

4.3. Diskusija o interakcijama novosintetiziranih spojeva s E451A i hDPP III na temelju eksperimentalno i računalno dobivenih rezultata 64

4.4. Eksperimentalno istraživanje interakcija novosintetiziranih spojeva s ctDNA i pApU u biološkim uvjetima 65

4.4.1. Cirkularni dikroizam 73

4.5. Diskusija o interakcijama novosintetiziranih spojeva s ctDNA i pApU na temelju eksperimentalno dobivenih rezultata 78

§ 5. ZAKLJUČAK 79

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ (PREMA POTREBI) 81

§ 7. LITERATURNI IZVORI 84

§ 8. DODATAK XCIV

§ 9. ŽIVOTOPIS CXV

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

EKSPERIMENTALNO I RAČUNALNO ISTRAŽIVANJE NOVIH KONJUGATA GVANIDINA S RAZLIČITIM FLUOROFORIMA KAO LIGANADA HUMANE DIPEPTIDIL-PEPTIDAZE III

Mirsada Ćehić

Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, Zagreb, Hrvatska

U ovom istraživanju ispitane su interkacije 7 novih konjugata gvanidiniokarbonilpirol (GCP)-fluorofora s humanom dipeptidil peptidazom III (DPP III) te je utvrđeno snažno vezanje svih spojeva u aktivno mjesto enzima, ali s vrlo različitim fluorimetrijskim odgovorom. Pozitivno nabijen lizinski bočni ogranak značajno je doprinio povećanju topljivosti spojeva i smanjenju jakosti fluorescentnog odgovora pri vezanju na DPP III, te potpuno ukinuo inhibitivni učinak na enzimsku aktivnost DPP III, dok su analozi s nenabijenom poveznicom pokazali snažniji porast emisije i učinkoviti su inhibitori enzima. Daleko najbolji fluorimetrijski odgovor i inhibitorna svojstva pokazao je analog GCP-cijanin, što ga čini dobrim sustavom za daljnje studije u kontekstu teragonstičkih primjena vezanih za humanu DPP III. U sklopu ove disertacije provedeno je istraživanje interakcija derivata GCP-pirena s dvolančanim DNA i RNA, pri čemu je ustanovljen visok afinitet vezanja i značajna razlika u fluorimetrijskim odgovorima, čime ti spojevi pokazuju svojstva dvostrukih senzora, koji omogućuju praćenje enzima DPP III te dvolančane DNA i RNA.

(134 stranica, 65 slika, 15 tablica, 117 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: cijanin / DNA / DPP III / fluorescencija / gvanidinokarbonilpirol / piren / RNA

Mentori: prof. dr. sc. Sanja Tomić i prof. dr. sc. Ivo Piantanida

Rad prihvaćen:
Ocjenitelji:
1. izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša,
2. doc. dr. sc. Ivan Kodrin,
3. doc. dr. sc. Filip Šupljika.

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

STUDY OF NOVEL FLUOROPHORE-GUANIDINE CONJUGATES AS LIGANDS OF HUMAN DIPEPTIDYL-PEPTIDASE III COMBINED EXPERIMENTAL AND COMPUTATIONAL APPROACH

Mirsada Ćehić

Division of Organic Chemistry and Biochemistry, Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, Zagreb, Croatia

Study of 7 new guanidiniocarbonylpyrrole (GCP)-fluorophore conjugates interactions with human dipeptidyl peptidase III (DPP III) showed that all compounds bind strongly to enzyme active site, but with very different fluorimetric response. Positively charged lysine side chain improved significantly compound solubility but diminished fluorescence increase upon DPP III binding and completely abolished inhibitor effect on DPP III activity, whereas linker-neutral analogues showed stronger emission increase and were efficient enzyme inhibitors. By far the best fluorimetric response and inhibitive properties showed cyanine-GCP analogue, thus being promising lead compound for both, enzyme sensing and bio-activity inhibiting (theragnostic) studies of human DPP III in the future. Study of pyrene-GCP derivatives interactions with double-stranded DNA and RNA, showed that all compounds have high binding affinity and significant difference in fluorimetric responses, thus showing properties of double sensors for DPP III and double-stranded DNA and RNA.

(134 pages, 65 figures, 15 tables, 117 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: cyanine / DNA / DPP III / fluorescence / guanidiniocarbonylpyrrole / pyrene / RNA

Supervisors: Dr. Sanja Tomić, Professor and Dr. Ivo Piantanida, Professor

Thesis accepted:
Reviewers:

1. Dr. Branimir Bertoša, Associate Professor,
2. Dr. Ivan Kodrin, Assistant Professor,
3. Dr. Filip Šupljika, Assistant Professor.

§ 1. UVOD

Dipeptidil-peptidaza III (DPP III, EC 3.4.14.4) je o cinku ovisna metalo-egzopeptidaza koja hidrolizira dipeptide s N-kraja svojih supstrata, peptida koji se sastoje od tri ili više aminokiselina.[1] U tkivima sisavaca široko je zastupljena i smatra se da sudjeluje u završnim koracima unutarstaničnog katabolizma proteina. Međutim visoki afinitet prema nekim bioaktivnim peptidima (npr. anigiotenzin II i III i opoidni peptidi) upućuju na specifičniju ulogu DPP III u ljudskom organizmu kao što je uključenost u regulaciju krvnog tlaka i boli. Također je sve veći broj eksperimentalnih dokaza o uključenosti DPP III u razvoj nekih tipova tumora kod čovjeka,[2,3] no pozadina ovih mehanizama do sada nije razjašnjena. Specifični inhibitori mogu znatno doprinijeti u razjašnjenju fiziološke uloge enzima.[4] Inhibicija nespecifičnim kelirajućim i tiolnim reagensima karakteristika je DPP III različitih vrsta, ali studije vezane za specifične inhibitore enzimske aktivnosti DPP III[5,6] su rijetke. Posebno zanimljivi su fluorescentni inhibitori kao što su fluoroforni konjugati gvanidinokarbonilpirola. Za neke analoge gvanidinokarbonilpirola već je ranije pokazano da mogu inhibirati funkciju enzima.[7] Također, tijekom proteklih godina, niz gvanidinokarbonilpirolarilnih konjugata testiran je za mogućnost vezanja za DNA/RNA,[8] pri čemu se nedavno otkriveni derivat pirena pokazao kao dobar fluorimetrijski indikator malih promjena strukture DNA/RNA veznog mjesta.[9]

1.1. Cilj i opseg rada

Potencijalni ligandi, novosintetizirani konjugati fluorofora (piren, cijaninske boje, fenantridin) i gvanidina, podvrgnut će se potpunoj fizikalnoj karakterizaciji UV/Vis, Fluo i CD metodama. Potom će se provesti studija interakcija s ljudskom DPP III (u daljnjem tekstu hDPP III) , dvolančanom ctDNA i RNA (pApU) kako bi se ispitao stupanj i način međudjelovanja. Spektroskopske titracije (UV/Vis, Fluo, CD) bit će provedene pri odgovarajućem pH dodatkom određenog volumena otopine hDPP III divljeg tipa (WT) i E451A mutanta, odnosno ctDNA i pApU. Pratit će se utjecaj spojeva na efikasnost hDPP III katalizirane reakcije hidrolize

sintetičkog supstrata Arg-Arg-2-naftilamida (Arg_2-2NA) kako bi se utvrdilo radi li se o inhibitorima ili supstratima.

Korištenjem programskog paketa AMBER16[10] provest će se računalna istraživanja kompleksa hDPP III s konjugatima koji pokažu zadovoljavajuću aktivnost kako bi se ista što bolje objasnila. Nakon provedenih eksperimentalnih ispitivanja interakcija odabranih konjugata fluorofora i gvanidina s hDPPIII, njegovim mutantom E451A, ctDNA i pApU, pristupit će se računalnim istraživanjima kompleksa proteina s ligandima. Odabrani konjugati vezat će se u aktivno mjesto hDPP III korištenjem programa za molekulsko uklapanje AutoDock[11], dok će se program Pymol[12] koristiti za detaljni pregled dobivenih kompleksa.

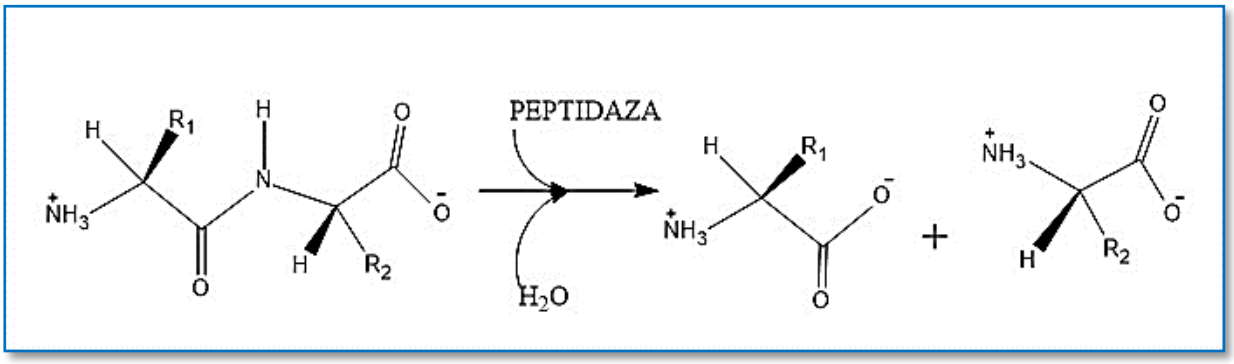
Nakon odabira nekoliko najbolje ocijenjenih načina vezanja pojedinih liganada provesti će se molekulsko dinamičke simulacije na enzim-ligand sustavima. Analiza interakcija, strukture i dinamičkih parametara provodit će se programom CPPTRAJ (dio AmberTools[10] programskog paketa), a računi će se pretežno izvoditi na radnim stanicama sa snažnim grafičkim procesorima.

Molekulskim modeliranjem bit će određeni načini vezanja novosintetiziranih konjugata fluorofora i gvanidina, s potencijalnim inhibitorskim djelovanjem, u aktivno mjesto hDPP III, a na temelju analize stabilnosti i intermolekularnih interakcija utvrdit će se koji je način vezanja najpovoljniji, te njihov utjecaj na strukturu proteina.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Peptidaze-proteolitički enzimi

Peptidaze (u literaturi proteaze ili proteolitički enzimi) je grupni naziv za sve enzime kojima je svojstvena reakcija hidrolize peptidnih veza u peptidima ili proteinima (slika 1).[13]

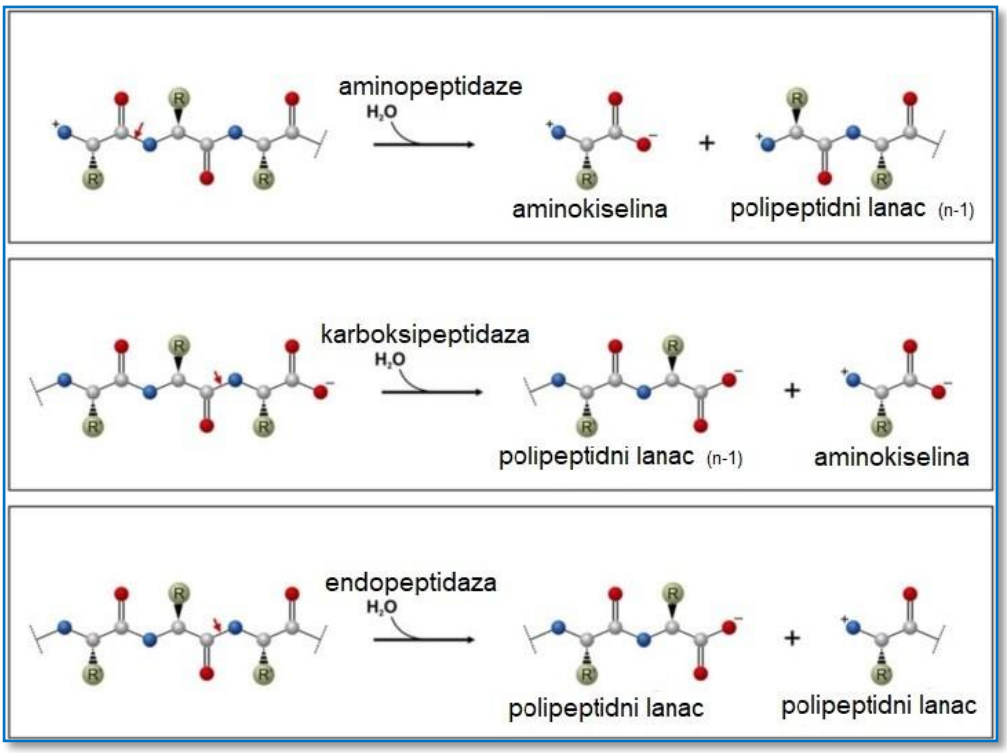


Slika 1. Prikaz hidrolize peptidne veze; gdje su s R1 i R2 općenito prikazani bočni aminokiselinski ogranci koji su kovalentno vezani za α-C atom, a razlikuju se ovisno o aminokiselinama. Izvor: Izrada autora, prilagođeno prema Voet, D., and Voet, J. *Biochemistry*. John Wiley & Sons. Vol. 4, 2015.

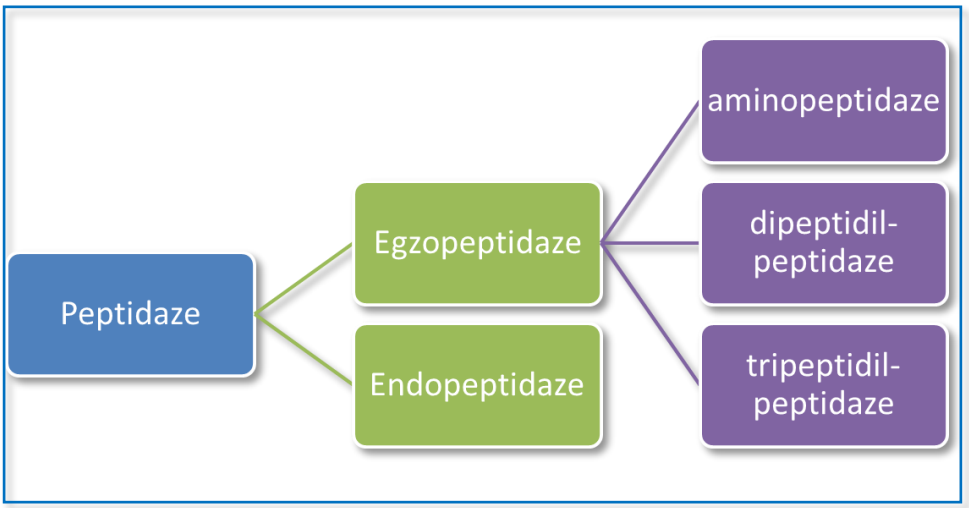
Svaki enzim ima zasebnu EC oznaku (engl. *Enzyme Commision*) koja je sačinjena od 4 jedinstvena broja.[14] Prema literaturno dostupnim podatcima peptidaze su enzimi svrstani u hidrolaznu skupinu enzima (oznaka EC 3) i unutar nje su grupirani u podskupinu peptidnih hidrolaza ili peptidaza (oznaka EC 3.4). Postoje različite vrste proteolitičkih enzima koji se dalje mogu grupirati prema mjestu djelovanja odnosno prema mehanizmu katalize i aminokiselinama u aktivnom mjestu.[13,15]

Ovisno o tome cijepa li se peptidna veza pri kraju ili u unutrašnosti peptidnog lanca peptidaze se dijele na egzopeptidaze odnosno endopeptidaze. Egzopeptidaze se dalje klasificiraju prema specifičnosti koju pokazuju prema *N*- odnosno *C*- kraju peptidnog lanca, te prema broju aminokiselina koje odcjepljuju. Ovisno o broju aminokiselina koje odcjepljuju s N-kraja

peptidnog lanca, egzopeptidaze nazivamo aminopeptidaze (jednu aminokiselinu), dipeptidil peptidaze (dvije aminokiseline), odnosno tripeptidil peptidaze (tri aminokiseline) (slike 2 i 3).[13]



Slika 2. Podjela peptidaza prema mjestu cijepanja peptidne veze. Izvor: Prilagođeno prema Mótyán, J., Tóth, F. & Tőzsér, J. Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. *Biomolecules* **3**, 923–942 (2013).



Slika 3. Podjela peptidaza prema djelovanju. Izvor: Prilagođeno prema Mótyán, J., Tóth, F. & Tőzsér, J. Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. *Biomolecules* **3**, 923–942 (2013).

Proteolitički enzimi imaju veliku medicinsku i farmaceutsku važnost zbog njihove ključne uloge u biološkim procesima i životnom ciklusu mnogih patogena.[13] U literaturi su također proteolitički enzimi razvrstani i prema njihovom porijeklu, što je u skladu s njihovom fiziološkom funkcijom koja je neophodna za svaki pojedini živi organizam.

U upotrebi je hijerarhijski sustav podjele peptidaza koji se temelji na konceptu katalitičkog tipa, obitelji i klana koje su predložili Rawlings i Barrett[16], a korišten je u bazi podataka MEROPS.[17]

Hijerarhijski sustav je izuzetno dobar s obzirom na to da su u iste porodice svrstane sve one peptidaze koje imaju statistički značajno sličnu primarnu strukturu u domeni koja je odgovorna za katalitičku aktivnost. Pritom su porodice označene brojem, a unutar nje može biti i podporodica. Peptidaze s istim evolucijskim porijeklom grupirane su u klanove[17], pri čemu svaki od klanova prestavlja jednu ili više obitelji u kontekstu dokaza njihovih evolucijskih odnosa prema sličnosti njihove tercijarne strukture odnosno, ukoliko ista nije poznata, prema aminokiselinskim ostatcima unutar samog katalitičkog mjesta ili u njegoj blizini. Na analogan način se pristupa svrstavanju proteinskih inhibitora peptidaza koji se grupiraju u obitelji odnosno klanove.[18]

Da bi se dogodio proces katalize, nužno je vezanje enzima i supstrata gdje se prema starijoj literaturi (Fischer, 1894)[19] smatralo da se isto vrši prema modelu „ključa i brave“ što je ukazivalo da je aktivno mjesto enzima komplementarno supstratu. Daljnim istraživanjima specifičnosti interakcija između enizma i supstrata navedeni prikaz je unaprijeđen u model pobuđene prilagodbe (engl. *induced fit*), što bi se slikovito moglo opisati kao odnos „ruke i rukavice“, prema kojem se konformacija enzima mijenja tijekom interakcija sa supstratom te mu postaje komplementarna tek *a posteriori*.[20]

Treba istaknuti da je specifičnost većine peptidaza prema supstratu izuzetno kompleksna, te se danas koriste model i terminologija koji su još davne 1967. godine predložili Harper i Berger za opisivanje aktivnih mjesta peptidaza.[21]

U ljudskom organizmu dipeptidil-peptidaza III je prisutna u gotovo svim tkivima i smatra se da sudjeluje u završnoj fazi razgradnje proteina u stanici. Iako postoje značajne indicije o ulozi hDPP III u endogenoj regulaciji boli, krvnog tlaka i obrani organizma od oksidativnog stresa, a utvrđena je i povećana aktivnost hDPP III kod karcinoma jajnika, treba istaknuti da je njezina patofiziološka uloga uglavnom još uvijek nepoznata.[22,23]

2.2. Metalopeptidaze

Metaloproteini su proteini koji vežu ione metala potrebne za stabilizaciju strukture i/ili za katalitičku aktivnost. Kod katalize metaloenzimima, ioni metala mogu vezati molekulu supstrata orijentirajući je da bude pogodna za reakciju, doprinijeti elektrostatskoj stabilizaciji prijelaznog stanja, te sudjelovati u samoj reakciji.[24]

Kada govorimo o metalopeptidazama zapravo se radi o hidrolazama koje vežu dvovalentni metalni kation odgovoran za aktivaciju molekule vode koja u reakciji hidrolize peptidne veze nukleofilno „napada“ peptidnu vezu.[1]

Mnoge od poznatih metalopeptidaza posjeduju karakteristični strukturni motiv od nekoliko aminokiselina kako slijedi, His-Glu-Xaa-Xaa-His (skraćeno HEXXH) koji je prema kristalografskim studijama dio veznog mjesta iona cinka (Zn^{2+}), pri čemu su navedena dva histidina zapravo ligandi cinkova iona.[16]

Postoji nekoliko različitih načina klasifikacije ovih proteina, no s obzirom na sve veći broj istraživanja koja se bave strukturnim analizama metalopeptidaza i fokusirana su na uspoređivanje istih, jasno je da su načini klasifikacije, uslijed neprestanog dotoka novih informacija promjenjivi.

Mnogo je biološki aktivnih peptida s različitim fiziološkim ulogama u organizmima. Peptidaze svojom proteolitičkom funkcijom modificiraju fiziološke procese te je poznato da o cinku ovisne peptidaze sudjeluju u razgradnji neuropeptida[25]

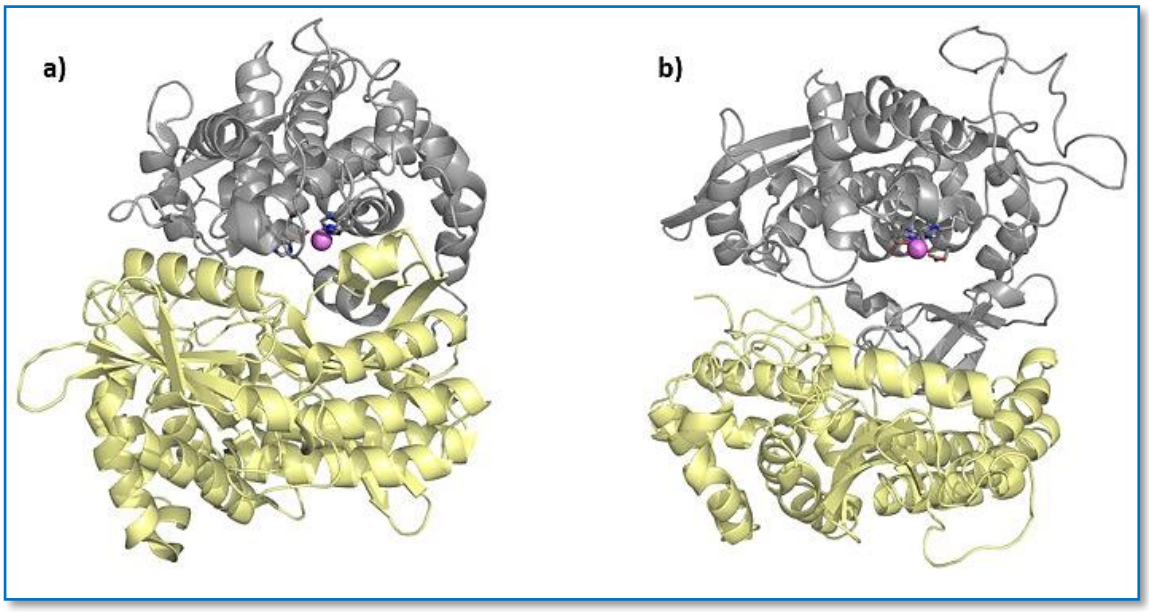
2.3. Porodica metalopeptidaza M49

2.3.1. Dipeptidil-peptidaza III

Dipeptidil–peptidaza III (DPP III) je o cinku ovisna citosolna egzopeptidaza koja katalizira reakciju hidrolize peptidne veze odcjepljujući dipeptid s *N*-kraja supstrata, a karakterizira ju prisutnost u mnogim organizmima.[22] DPP III je jedini član obitelji dipeptidil metalopeptidaza

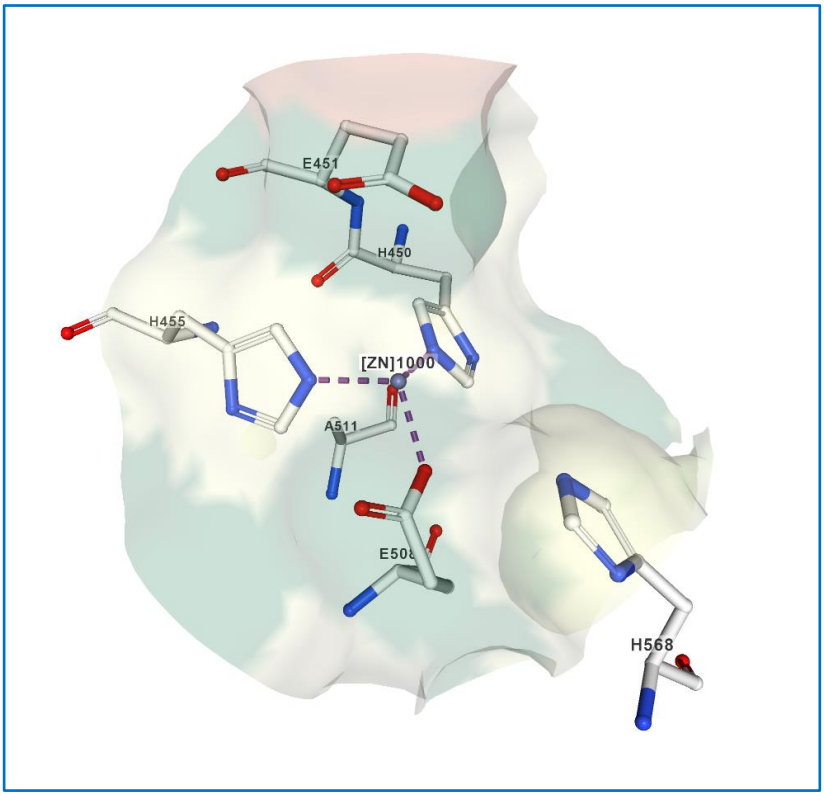
III, prema klasifikaciji baze MEROPS nazvane još M49 obitelj, koju karakteriziraju dva jedinstvena struktura motiva HEXXGH i EEXR(K)AE(D) odgovorna za vezanje metalnog iona u aktivno mjesto enzima i hidrolizu peptidne veze.[26]

Rezultati rentgenske strukturne analize pokazali su da je DPP III monomerni protein koji se sastoji od dviju domena između kojih se nalazi velika pukotina. Ion cinka potreban za aktivnost i aminokiseline koje ga koordiniraju nalaze se s unutarnje strane pukotine na dnu tzv. „gornje“ (katalitičke) domene. Prisustvo velike pukotine između dviju domena i činjenica da se sačuvane regije unutar grupe DPP III protežu kroz obje domene, ukazuju da bi ovaj enzim mogao biti podložan velikim konformacijskim promjenama (slika 4).[22,27,28]



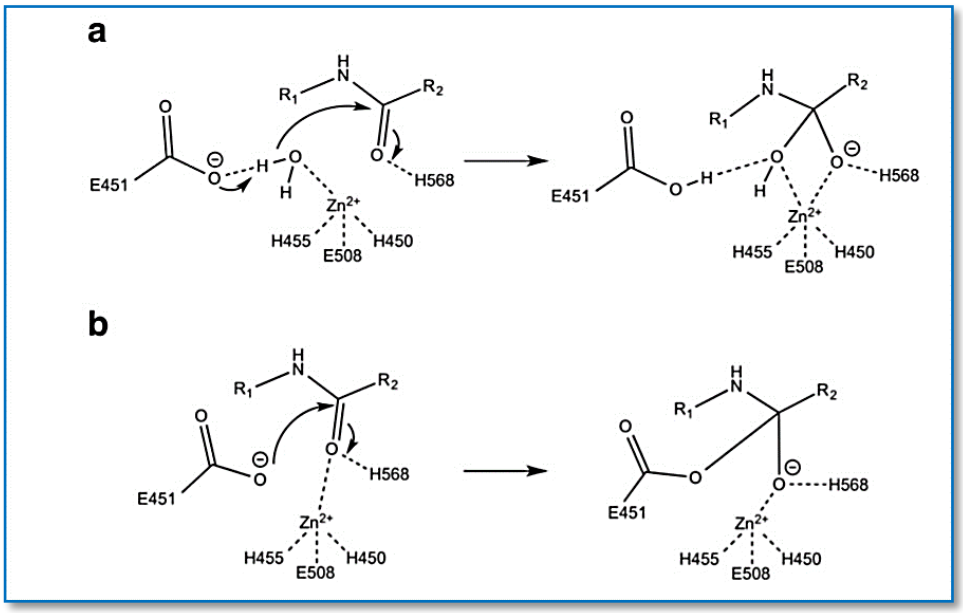
Slika 4. Struktura hDPP III: a) zatvorena struktura, b) otvorena struktura. Gornja domena je obojena sivom bojom, donja domena je obojena žutom bojom, a ion cinka je prikazan kao ružičasta sfera. Izvor: Prilagođeno prema Baral, P. K. et al. The first structure of dipeptidyl-peptidase III provides insight into the catalytic mechanism and mode of substrate binding. *J. Biol. Chem.* **283**, 22316–22324 (2008).

Kako je prikazano na slici 4 gornja domena je pretežno građena od α-uzvojnica i sadrži vezno mjesto za ion cinka, kao i katalitički važne aminokiselinske ogranke (slika 5).[29]



Slika 5. Aktivno mjesto hDPP III (kod 3FVY). Cinkov ion prikazan je kao srebrna sfera, a aminokiselinski ostatci koji koordiniraju metalni ion i/ili tvore prvu i drugu cinkovu koordinacijsku sferu su prikazani štapćima. Isprekidane ljubičaste linije predstavljaju koordinaciju cinka s donorima elektrona. Izvor: Preuzeto s https://www.rcsb.org/3d-view/3FVY.

U strukturi hDPP III ion cinka je tetraedarski koordiniran s dva histidinska ostatka (His450 i His455), glutamatnim ostatkom (Glu508) i molekulom vode. Navedeni aminokiselinski ostatci koji koordiniraju ion cinka su dio konzerviranih motiva sekvenci (^{450}**H**ELLG**H**^{455} i ^{507}E**E**CRAE^{512}) koje su karakteristične za članove metalopeptidaza obitelji M49.[27] Studija enzimske reakcije pokazala je da glutamat (Glu451) iz HELLGH motiva ima ulogu opće baze koja aktivira molekulu vode odgovornu za hidrolizu peptidne veze[30] Mehanizam hidrolize utvrđen za hDPP III u skladu je s katalitičkim mehanizmom koji je predložen za druge cink ovisne proteaze kao što je termolizin (slika 6).[31,32]



Slika 6. Prikaz mogućih mehanizama katalitičkog djelovanja hDPP III pri hidrolizi peptidne veze, a) uz participaciju molekule vode, b) bez participacije molekule vode. Izvor: Kumar, P. et al. Substrate complexes of human dipeptidyl peptidase III reveal the mechanism of enzyme inhibition. *Sci. Rep*. **6**, 1–10 (2016).

Važnost Glu451 u reakciji hidrolize koju DPP III kataliziraju potvrdila su i eksperimentalna istraživanja u kojima je Glu451 zamijenjen s alaninom što je u konačnici rezultiralo neaktivnošću enzima.[26] Donja domena DPP-a III je građena od kombinacije α-uzvojnica i β-nabranih ploča koje formiraju β-bačve, a koje zajedno formiraju strukturnu jezgru ove domene (slika 4). Dvije domene su međusobno povezane s brojnim prilično fleksibilnim područjima petlje.[27]

In vitro istraživanja ukazala su na relativno široku specifičnost DPP III prema oligopeptidima velične od 3 do 10 aminokiselina u koje spadaju i mnogi neuropeptidi.[33,34,35] No uloga DPP III u različitim fiziološkim procesima još uvijek nije dovoljno razjašnjena.[28,36,37]

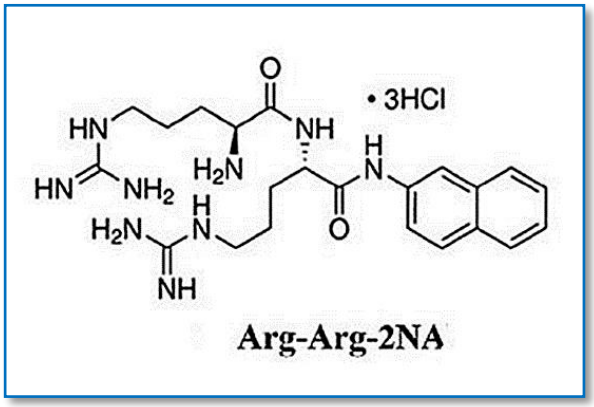
S obzirom na relativno široku specifičnost prema peptidima i prisustvo u citosolu gotovo svih do danas ispitanih stanica pretpostavka je da ovaj enzim ima značajnu ulogu u završnim stupnjevima unutarstaničnog katabolizma proteina, a pretpostavlja se i da ima ulogu kod regulacije boli u sisavaca budući da je pronađena visoka koncentracija DPP III u površinskim slojevima roga leđne moždine štakora.[35,38] U prilog navedenome svakako idu i studije koje su pokazale postojanje velikog afiniteta ljudskog enzima prema važnim neuropeptidima (npr. enkefalinu, endomorfinu) u *in vitro* uvjetima.[34]

Pretpostavlja se da bi široka supstratna specifičnost DPP III mogla biti rezultat izrazite fleksibilnosti enzima, a budući da fiziološka uloga ovog enzima još nije razjašnjena vrlo je važan daljnji razvoj specifičnih inhibitora kako bi se utvrdila ta uloga.[22]

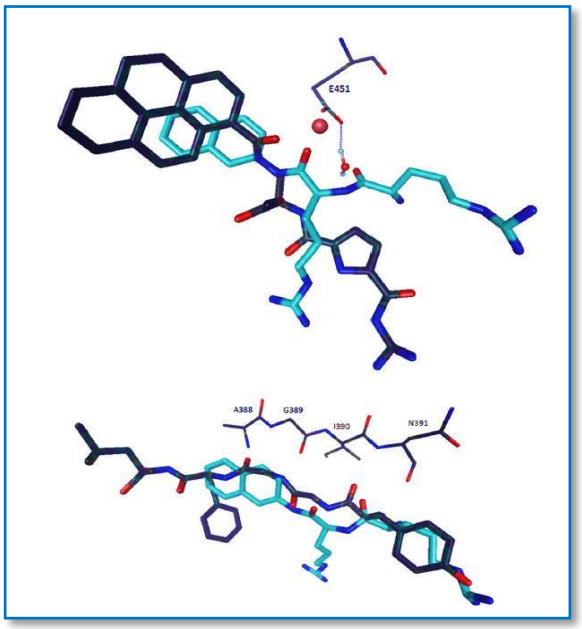
Prema literaturi vezanje supstrata s enzimom rezultira konformacijskom promjenom enzima koja se opisuje kao "zatvaranje" s obzirom da dolazi do smanjivanja kuta između dvaju domena, pri čemu struktura pojedinih domena ostaje nepromijenjena.[39]

Konformacijska promjena je posljedica povećanja entropije, pri čemu je, prema literaturno dostupnim podatcima o provedenim studijama, vezanje tinorfina endoterman proces. Prema tome slijedi da je entropijski član taj koji je dominantniji u ukupnoj promjeni Gibbsove energije čime se postiže konačna egzergonost procesa. Također prema dostupnim podatcima evidentno je da uslijed vezanja supstrata dolazi do oslobađanja nekoliko desetaka strukturiranih molekula vode iz rascjepa na razmeđu domena enzima. Opažena konformacijska promjena pojašnjava široku supstratnu specifičnost DPP III.[40]

Dosadašnje studije enzimske aktivnosti DPP III su podrazumijevale različite sintetske supstrate dipeptitil-naftilamida pri čemu je utvrđeno da sam enzim najbolje hidrolizira Arg_2-2NA (slika 7).[37,38] Upravo zbog navedenog se pri dizajnu potencijalnih inhibitora enzima kao polazna točka koristi standardni DPP III supstrat Arg_2-2NA (slika 8).[22]



Slika 7. Struktura diarginil-2-naftilamida, Arg_2-2NA.

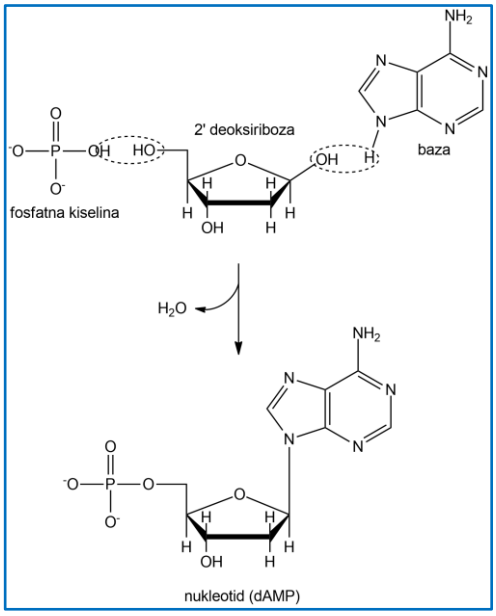


Slika 8. Diarginil-2-nafilamin (tirkizna boja) i strukturno preklapanje s inhibitorom (Leu enkephalin, Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu; crna boja) u aktivnom mjestu DPP III. Izvor: Matić, J. *et al*. Guanidiniocarbonyl-pyrrole-aryl conjugates as inhibitors of human dipeptidyl peptidase III: Combined experimental and computational study. *RSC Adv*. **6**, 83044-83052 (2016).

2.4. Strukture DNA i RNA molekula

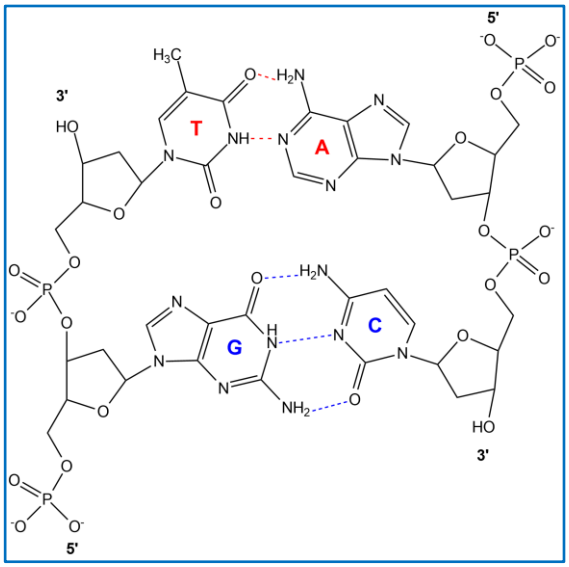
DNA molekula je najvažnija molekula u živim stanicama koja nosi nasljedne informacije. Nukleotid se sastoji od tri dijela: baze, šećera i fosfata. Baza je vezana na 2'-deoksiribozu pomoću glikozidne veze, a šećer je povezan s fosfatom fosfodiesterskom vezom (Slika 9).[41]

Nukleotidi su spojeni zajedno preko fosfodiesterske veze koja formira polinukleotid sa slobodnim 5' fosfatom i 3' hidroksilnom skupinom na krajevima lanca. Dva polinukleotidna lanca omataju se jedan oko drugog u anti-paralelnoj orijentaciji formirajući dvostruku uzvojnicu (engl. *helix*) koja predstavlja trodimenzionalnu DNA strukturu.



Slika 9. Nastanak nukleotida uz eliminaciju vode. Izvor: Izrada autora prema Lehninger, A., Nelson, D. A. & Cox, M. M. *Principlees of Biochemistry*. (W. H. Freeman, 2008).

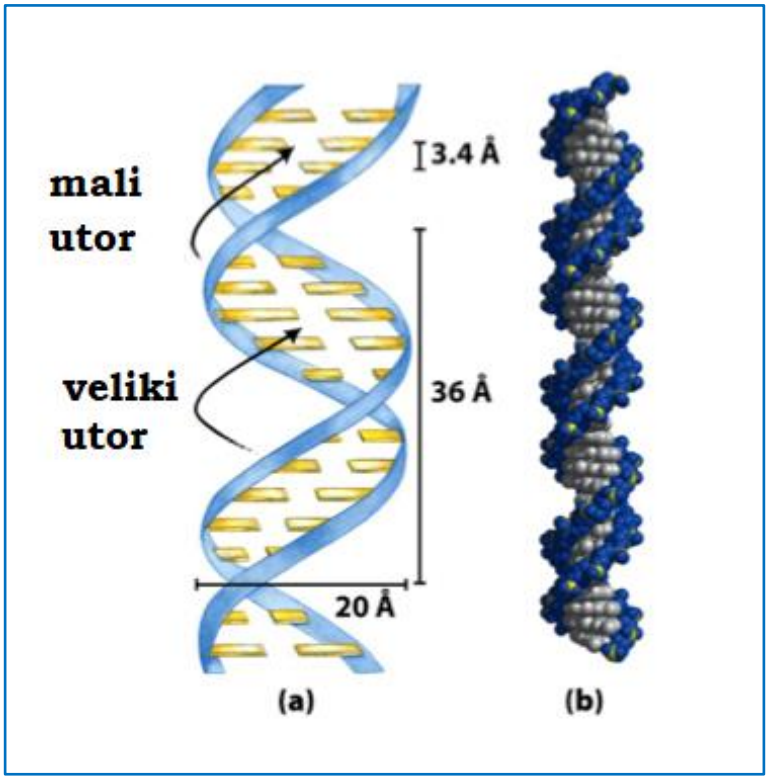
Dvolančani polinukleotidi su međusobno povezani vodikovim vezama između odgovarajućih komplementarnih baza (adenin-timin odnosno gvanin-citozin) koje doprinose stabilizaciji strukture (slika 10).



Slika 10. Struktura polinukleotidnog polimera. Timin (T; pirimidin) tvori dvije vodikove veze (prikazane crvenom crtkanom linijom) s adeninom (A; purinom) iz antiparalelnog polinukleotidnog lanca, dok se gvanin (G; purin) veže na citozin (C; pirimidin) preko tri vodikove veze (prikazane plavom crtakom linijom). Izvor: Izrada autora prema Lehninger, A., Nelson, D. A. & Cox, M. M. *Principlees of Biochemistry.* (W. H. Freeman, 2008).

Osim navedenog izuzetno važan doprinos ovakvoj strukturi daju interakcije aromatskih slaganja između (engl. *flat*) baza.[41] Kako je svaka baza pomaknuta za određeni kut u odnosu na druge, dvolančane (dl) DNA molekula ima dva utora, tzv. manji (engl. *minor*) i veliki (engl. *major*) utor koji se međusobno razlikuju po veličini (slika 11).[42]

Rubovi baza izloženi su utorima koji tvore mrežu donora i akceptora vodikovih veza, kao i van der Waalsovu površinu koja omogućuje da proteini nedvosmisleno prepoznaju specifičan slijed dok se vežu u veliki utor. S druge strane, manji utor nije toliko bogat kemijskim informacijama, no pogodan je za uklapanje manjih molekula koje se mogu vezati na DNA te tako utjecati na replikaciju i transkripciju.[41]



Slika 11. Prikaz strukture uzvojnice B-DNA: a) Shematski prikaz s navedenim dimenzijama uzvojnice; b) trodimenzijski prikaz (engl. *space-filling* model). Izvor: Prilagođeno prema Lehninger, A., Nelson, D. A. & Cox, M. M. *Principlees of Biochemistry*. (W. H. Freeman, 2008).

Dvostruka uzvojnica ima nekoliko različitih konformacija (tablica 1), pri čemu je najzastupljeniji oblik u fiziološkim uvjetima tzv. B konformacija. DNA kod nastanka kompleksa s proteinima poprima A, dok u prisutnosti visoke koncentracije nekih soli ili malih molekula formira Z konformaciju.[41,43]

Tablica 1. Usporedba strukturnih svojstava najčešćih konformacija dvolančanih polinukleotidnih struktura (A, B) i odabrane specifične konformacije (Z) DNA.

	Konformacija uzvojnice		
	A	**B**	**Z**
Opće proporcije	kratka i široka	dulja i tanja	izduljena i tanka
Rotacija uzvojnice	desnostrana	desnostrana	lijevostrana
Lokacija osi uzvojnice	veliki utor	kroz parove baza	mali utor
Proporcije velikog utora	ekstremno uzak i veoma dubok	širok s intermedijarnom dubinom	izravnan na površini uzvojnice
Proporcije malog utora	veoma širok i plitak	uzak s intermedijarnom dubinom	ekstremno uzak i veoma dubok

RNA molekula razlikuje se od DNA u 3 aspekta:

I. RNA molekula se sastoji od šećerne skupine riboze,
II. sadrži uracil umjesto timina,
III. i obično se radi o jednolančanoj uzvojnici.[41]

Dvolančane DNA i RNA, i hibridi DNA / RNA prirodno se formiraju u stanicama između dvije niti nukleinske kiseline koje sadrže komplementarne sekvence.[44] Pojam dvolančane RNA (dl RNA) odnosi se na RNA visoke molekulske mase u obliku A konformacije.[45]

U našem istraživanju interakcija malih molekula s polinukleotidima, nekoliko dl DNA i dl RNA struktura se uobičajeno koristi kao modeli definirani svojstvima njihovih manjih utora kao što su širina, dubina ili okupacija baze-supstituenta. Ta svojstva su izravno povezana sa sekundarnom strukturom dvostruke uzvojnice i djelomično sa sekvencom parova baza (tablica 2 prikazuje dimenzije utora polinukleotida korištenih samo u ovoj disertaciji).[46]

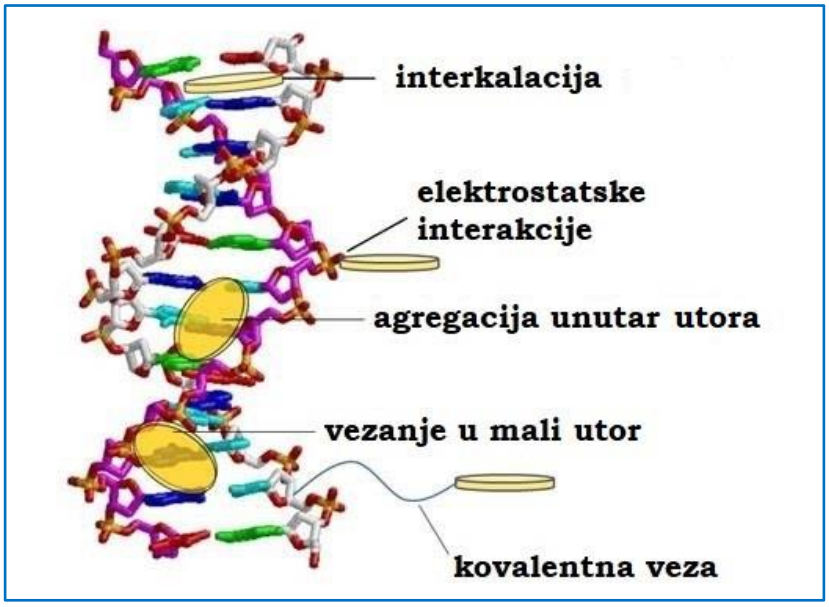
U ovom istraživanju korišten je RNA analog koji formira A konformaciju, pApU (*poly A - poly U*) i ctDNA (*Calf thymus* DNA) koja je najčešće korištena DNA koja se sastoji od 41,9 mol % parova baza G-C i 58,1 mol % parova baza A-T i predstavlja B-konformaciju strukture.[47]

Tablica 2. Širine i dubine utora za odabrane konformacije nukleinske kiseline. Treba primijetiti da dimenzije glavnog utora pApU odgovaraju dimenziji manjeg utora ctDNA.[38]

	Širina utora		**Dubina utora**	
Tip strukture	veliki	mali	veliki	mali
B-DNA (ctDNA)	11,7	5,7	8,5	7,5
pApU (RNA)	3,8	10,9	13,5	2,8

2.4.1. Vezanje malih molekula na dvolančane DNA i RNA

Dvolančane DNA i RNA molekule su potencijalna meta za neke antitumorske ili antibakterijske lijekove. Ovisno o obliku molekule, postoji nekoliko načina vezanja koje molekula može usvojiti nakon vezanja na molekulu DNA prikazane na slici 12.[48,49]



Slika 12. Shematski prikaz načina vezanja male molekule (koja je prikazana kao zeleni pravokutnik) na dvolančanu DNA odnosno RNA. Izvor: Prilagođeno prema Ogawa, T. *Molecular Architectonics*. (Springer, 2017).

2.5. Molekularno prepoznavanje-nekovalentne interakcije

Molekularno prepoznavanje predstavlja osnovu odvijanja većine esencijalnih bioloških procesa (enzimske reakcije, stanična signalizacija, replikacija DNA, ...). Molekulske interakcije kod biomakromolekula su najčešće nekovalentne interakcije. Razlog tome je što su kovalentne interakcije u pravilu invarijabilne u biofizičkim sustavima, iako postoje iznimke (poput nekih enzimskih reakcija), dok su nekovalentne interakcije odgovorne za konformacije biomakromolekule, njenu fleksibilnost, funkcionalnost te dinamička svojstva.

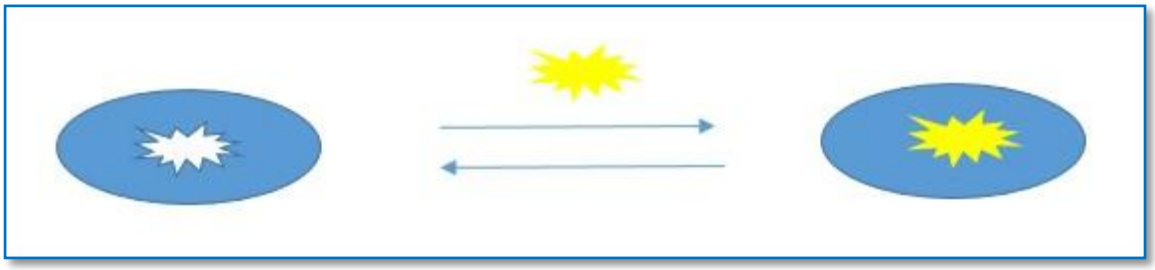
Kod bimolekularnog prepoznavanja interakcije se javljaju između molekule gosta tzv. liganda, te molekule domaćina tzv. receptora.[50,51] Ligandi su obično relativno male molekule koje po konvenciji imaju jedno vezno mjesto, dok su receptori biomakromolekule koje mogu imati više od jednog veznog mjesta. Vezanje molekule gosta na molekulu domaćina karakterizirano je afinitetom i selektivnošću.[52] Ovdje je fokus istraživanja prvenstveno usmjeren na određivanje (predviđanje) smjera reakcije od interesa (ili nekog od bioloških procesa), te na određivanje maksimalnog dosega iste.

Kada različite molekule, ili dijelovi iste molekule stupe u međusobnu interakciju nekovalentnim vezama, potrebno je uočiti da u slučaju više centara interakcije postoji visok stupanj aditivnosti. Čak i u slučaju relativno jednostavnih ionskih parova, istovremeno djeluje nekoliko mehanizama tako da su važni i entalpijski i entropijski doprinos, pa tako i slabe pojedinačne interakcije dovode do snažnog vezanja domaćina i gosta.[53,54] Pri tome konformacijske promjene do kojih dolazi prilikom kompleksiranja mogu također doprinositi vezanju i tako rezultirati pojavom alosteričkih sustava.

Općenito molekularno prepoznavanje predstavlja specifičnu interakciju između dviju ili više molekula kroz interakcije poput vodikovih veza, metalne koordinacije, hidrofobnog efekta,[50,51] van der Waalsovih sila, π-π interakcija, halogenskih veza, te elektrostatskih i/ili elektromagnetskih[55] interakcija.

Navedene interakcije imaju direktan utjecaj na molekularno prepoznavanje, no također je važan i indirektan utjecaj otapala koji može biti vrlo značajan te se ne smije zanemariti.[56,57]

Molekularno prepoznavanje može se podijeliti na statičko i dinamičko molekularno prepoznavanje. Statičko molekularno prepoznavanje se može slikovito prikazati po shemi „ključ-brava“, gdje imamo reakciju kompleksiranja molekule receptora s molekulom liganda, slika 13.[58]



Slika 13. Prikaz statičkog molekularnog prepoznavanja, gdje je plavom bojom označena molekula receptora, a žutom molekula liganda. Izvor: Izrada autora prema Kuriyan, Konforti & Wemmer. Molecular Recognition : The Thermodynamics of Binding. *Mol. Life* 1–58 (2009).

Kod nekih oblika dinamičkog molekularnog prepoznavanja imamo pojavu alosteričkog efekta, gdje ovisno o broju veznih mjesta, vezanje prve molekule gosta na prvo aktivno mjesto utječe na konstantu asocijacije druge molekule gosta na drugo vezno mjesto, slika 14.[52,58]

Slika 14. Prikaz dinamičkog molekularnog prepoznavanja, gdje je plavom bojom označena molekula receptora s dva vezna mjesta, a žutom i ljubičastom su označene molekule ligandi. Izvor: Izrada autora prema Kuriyan, Konforti & Wemmer. Molecular Recognition : The Thermodynamics of Binding. *Mol. Life* 1–58 (2009).

Kod studija ovakvih sustava postoje dva pristupa, jedan je kroz eksperimente, a drugi je putem računalnih simulacija. Računalne metode omogućavaju bolju interpretaciju eksperimentalnih podataka. Navedeno daje bolji uvid u razumijevanje samog molekularnog mehanizma procesa od interesa, te pruža mogućnost dizajniranja novih eksperimentalnih pristupa.

2.6. Termodinamika molekularnog prepoznavanja

Termodinamika je područje fizikalne kemije u kojem se pomoću matematičkih relacija opisuje međusobna povezanost makroskopskih veličina sustava koje opisuju prijenos ili pretvorbu energije iz jednog oblika u drugi, te promjenu svojstva tvari (npr. gustoća) koje izaziva neka reakcija, odnosno proces. Važno je definiranje stanja sustava, kako bi svi eksperimenti bili reproducibilni pri čemu treba imati na umu činjenicu da je stanje sustava potpuno termodinamički određeno samo kada je sustav u ravnoteži, a biološki sustavi su neravnotežni sustavi.[59,60]

Kada je fokus istraživanja usmjeren na uvid u samo molekularno prepoznavanje, nužni su oni pristupi koji se temelje na termodinamici. Važni parametri su nam svakako stehiometrija vezanja, konstanta asocijacije, odnosno disocijacije (K_a, K_d), promjena Gibbsove energije ($\Delta_r G$), te promjena entalpije ($\Delta_r H$) i entropije ($\Delta_r S$) koje prate proces od interesa. Odnos tih triju veličina dan je relacijom:

$$\Delta_r G = \Delta_r H - T\Delta_r S. \qquad (2.6.1)$$

Neravnotežna termodinamika služi za izučavanje sustava koji nisu u termodinamičkoj ravnoteži, kao što je većina bioloških sustava, te se (2.6.1) pri njihovom proučavanju koriste aproksimacije kojima se neravnotežni sustav aproksimira ravnotežnim što omogućuje korištenje principa ravnotežne termodinamike.

Stehiometrija vezanja je vrlo vrijedna informacija koja nam govori koliko veznih mjesta molekula receptor ima. Jer kako je već rečeno prema konvenciji molekula liganda ima samo jedno vezno mjesto. Konstanta ravnoteže vezanja odnosno disocijacije (K_a, K_d) pak daje informaciju o tome koliko je dano vezanje specifično i kakav je afinitet tog vezanja za danu kombinaciju molekule liganda i receptora.

Promjena slobodne energije (Gibbsova energija, $\Delta_r G$) tijekom nastajanja kompleksa daje informaciju o spontanosti samog procesa, te o stabilnosti nastalog kompleksa što se vidi iz predznaka iste. Također, što je ta promjena negativnija to je afinitet vezanja veći za danu kombinaciju ligand-receptor. Iz vrijednosti promjene entalpije ($\Delta_r H$) dobivamo informaciju međumolekularnim interakcijama pri čemu najveći doprinos imaju vodikove veze.

Također, ne smije se zanemariti doprinos otapala. Što je negativnija promjena entalpije, to je vezanje favoriziranije. Promjena entropije ($\Delta_r S$) daje informacije o promjeni uređenosti sustava, pa razlikujemo promjenu entropije otapala (kao, npr. rezultat oslobađanje strukturnih molekula vode), te konformacijsku promjenu entropije uslijed promjene stupnjeva slobode pojedinih gibanja unutar receptora odnosno liganda (npr. rotacijska i vibracijska komponenta entropije).[58]

Afinitet liganda prema receptoru (ili obrnuto) najčešće se izražava konstantom disocijacije (K_d) (2.6.2), koja je recipročna konstanti asocijacije (K_a) (2.6.3) na primjeru reakcije kompleksiranja između liganda (L) i receptora (R), te nastanka kompleksa ligand-receptor (LR) u omjeru 1:1 :

$$K_\mathrm{d} = \frac{[\mathrm{R}][\mathrm{L}]}{[\mathrm{RL}]} = \frac{1}{K_\mathrm{a}}, \tag{2.6.2}$$

$$K_\mathrm{a} = \frac{[\mathrm{RL}]}{[\mathrm{R}][\mathrm{L}]}. \tag{2.6.3}$$

Iz vrijednosti konstante disocijacije (ili asocijacije) lako se može izračunati promjena Gibbsove energije vezanja liganda na receptor prema jednadžbi (2.6.4), odnosno (2.6.5):

$$\Delta G_{\text{vezanja}} = -RT \ln K_{\text{a}}, \tag{2.6.4}$$

odnosno

$$\Delta G_{\text{vezanja}} = RT \ln K_{\text{d}}. \tag{2.6.5}$$

Iako je strogo termodinmački gledano standardna konstanta ravnoteže formalno bezdimenzijska veličina, u praksi kod biofizičkih istraživanja se obično izražava u molarnim jedinicama. Ta molarna konstanta ravnoteže se ponekada još naziva i pseudokonstantom, što nam mogućava da afinitet receptora za ligand izrazimo jedinicama koncentracije. U praksi vezanje koje karakterizirano nanomolarnim (ili čak pikomolarnim) konstantama disocijacije se smatra vezanjem velikog afiniteta, dok se vezanjem slabog afiniteta smatraju sva ona karakterizirana milimolarnim konstantama, tablica 3.[58]

Tablica 3. Usporedba različitih tipova interakcija pri 300 K, te pripadnih vrijednosti konstante disocijacije i promjene slobodne energije kako bi se dobio uvid u jakost afiniteta vezanja uslijed pojedine interakcije.[58]

Vrsta interakcije	K_{d} **(molarna)**	$\Delta G_{\text{vezanja}}$ **/ kJ mol^{-1}**
enzim : ATP	10^{-3}-10^{-6} (mM-μM)	-17 do -35
vezanje signalizacijskog proteina	10^{-6} (μM)	-35
DNA : transkripcijski faktor	10^{-9} (nM)	-52
inhibitor : protein (lijekovi)	10^{-9}-10^{-12} (nM-pM)	-52 do -69
biotin : avidin protein (najjača nekovalentna interakcija)	10^{-15} (fM)	-86

Izvor: Izrada autora prema Kuriyan, Konforti & Wemmer. Molecular Recognition : The Thermodynamics of Binding. *Mol. Life* 1–58 (2009).

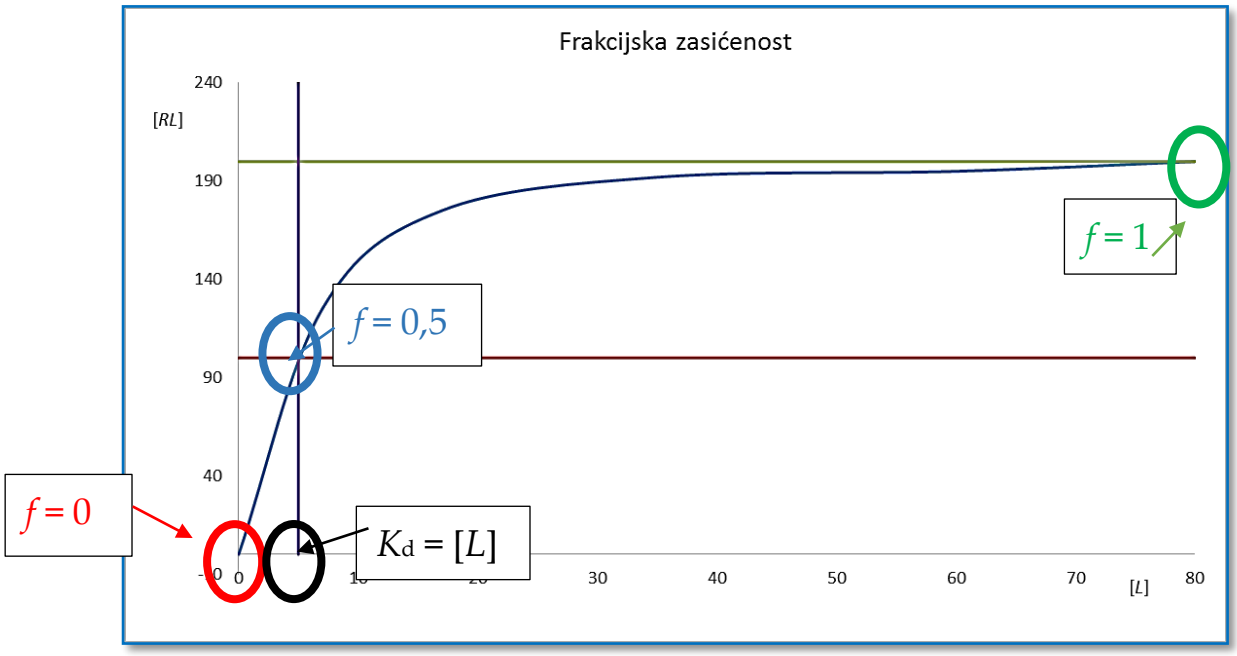
K_d odgovara koncentraciji liganda pri kojoj je polovina molekula receptora zasićena ligandom pri određenoj temperaturi. U tu svrhu definira se frakcijsko zasićenje kao omjer koncentracije nastalog kompleksa ligand-receptor (RL) i sve ukupne koncentracije receptora (R). Iz izraza za frakcijsku zasićenost (2.6.6):

$$f = \frac{[\mathrm{RL}]}{[\mathrm{R}] + [\mathrm{RL}]}, \tag{2.6.6}$$

lako se da dobiti izraz (2.6.7) iz kojeg se vidi da je frakcijsko zasićenje 50 % u situaciji kada je koncentracija liganda jednaka konstanti disocijacije.

$$f = \frac{[\mathrm{L}]}{[\mathrm{L}] + K_\mathrm{d}}. \tag{2.6.7}$$

Iz izraza (2.6.7) jasno je da u slučaju kada je [L] = K_d, vrijednost frakcijskog zasićenja je f = 0,5.



Slika 15. Frakcijska zasićenost, f_i u ovisnosti o koncentraciji liganda [L] pri konstantnoj temperaturi. Vrijednost frakcijskog zasićenja kreće se od 0 (nema interakcija) do 1 (kada su sve molekule receptora vezane s ligandom). Izvor: Prilagođeno prema Kuriyan, Konforti & Wemmer. Molecular Recognition : The Thermodynamics of Binding. *Mol. Life* 1–58 (2009).

Iz krivulje ovisnosti frakcijske zasićenosti o koncentraciji liganda može se odrediti konstanta disocijacije pri određenoj temperaturi. U literaturi je dosta česta uporaba Scatchardove jednadžbe (2.6.8) koja daje mogućnost računanja afiniteta i broja aktivnih mjesta receptora za ligand:[61,62]

$$\frac{[\mathrm{RL}]}{[\mathrm{L}]} = K_{\mathrm{a}}([\mathrm{Rt}] - [\mathrm{RL}]). \qquad (2.6.8.)$$

Ukoliko se javlja odstupanje od hiperboličnog oblika krivulje ovisnosti frakcijske zasićenosti o koncentraciji liganda to je indikacija da postoji više veznih mjesta na receptoru za ligand, te eventualni alosterički efekt. Za izvođenje takvih eksperimenata koriste se različite metode kojima se prati koncentracija slobodnog liganda u otopini, a to su spektroskopske metode poput: UV/Vis, fluorescencija, CD, NMR, te mikrokalorimetrija poput: ITC, DSC, ono što je važno je da metoda razlučuje koncentraciju slobodne vrste (liganda) od specije u kompleksu.

Kombinacijom eksperimentalnog (UV/Vis, Fluo i ITC) i računalnog pristupa (prianjanje, MD simulacije i račun slobodnih energija vezanja) do sada su rađene studije vezanja pojedinih novo sintetiziranih derivata gvanidinopirolarila na ljudsku DPP III (hDPP III). Utvrđeno je da se ti spojevi vežu s mikromolarnim afinitetom na enzim, te da s različitom razinom učinkovitosti inhibiraju hidrolizu Arg_2-2NA, koji je standardni komercijalno dostupni supstrat hDPP III. Molekulskim modeliranjem otkriveni su različiti načini vezanja derivata gvanidinopirolarila u aktivno mjesto hDPP III.[22]

Kako je i DNA potencijalna meta novo-dizajniranih spojeva izuzetno je važna karakterizacija tih interakcija. U literaturi su poznate studije koje su se bazirale na praćenju odgovarajućih spektroskopskih svojstava supstance od interesa, kako bi se objasnile nekovalentne interakcije, titracijom s polinukleotidima pri temperaturi od 25 °C. Nekovalentno vezanje malih molekula na dl-polinukleotide obično ima određeni učinak na toplinsku stabilnost uzvojnica dajući tako različite T_{m} vrijednosti. Razlika između T_{m} vrijednosti slobodnog polinukleotida i kompleksa s malom molekulom (ΔT_{m} vrijednost) važan je čimbenik u karakterizaciji interakcija malih molekula s polinukleotidima.[63]

Osim termodinamike važna je i kinetika vezanja koje imaju važnu ulogu kod studija interakcija ligand-receptor u kojima termodinamički parametri pružaju uvid o jakosti vezanja, a kinetički parametri daju uvid u vrijeme vezanja što je posebice bitno kod studija novih lijekova.[64,65]

2.7. Enzimska kinetika

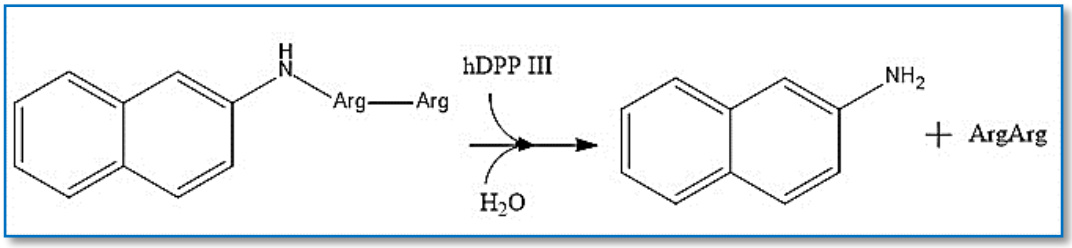
Enzimska kinetika je proučavanje kemijskih reakcija koje kataliziraju enzimi. U kinetici enzima mjeri se brzina reakcije i istražuju učinci promjena uvjeta reakcije. Proučavanjem kinetike enzima moguće je utvrditi dani katalitički mehanizam enzima, njegovu ulogu u metabolizmu, te kako bi se njegovo djelovanje moglo kontrolirati i na koji način neki lijek ili agonist mogu inhibirati enzim.[24] Enzimi su obično molekule proteina koje djeluju na druge molekule koje se nazivaju supstrati enzima. Te ciljane molekule vežu se u aktivno mjesto enzima i transformiraju se u produkte kroz niz koraka poznatih kao enzimski mehanizam, slika 16:

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons ES^* \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E + P$$

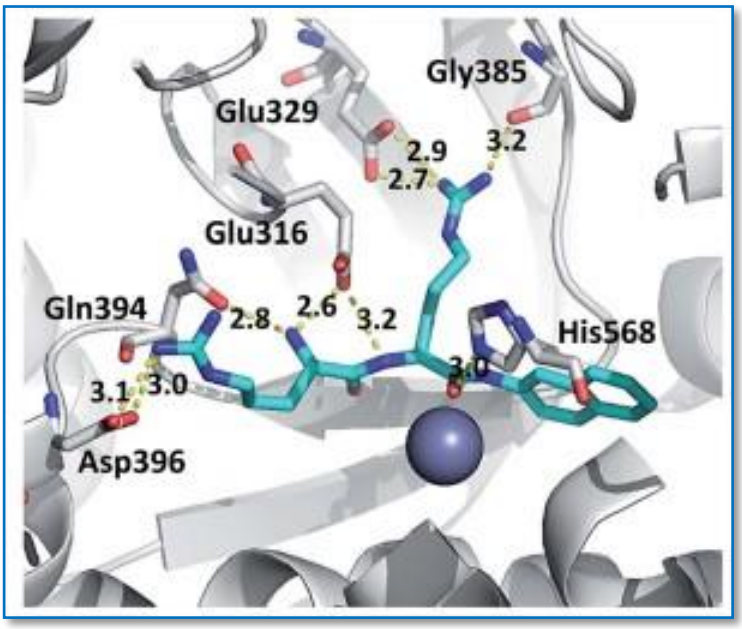
Slika 16. Mehanizam enzimske reakcije. Izvor: Izrada autora prilagođeno prema Voet, D. and Voet, J. *Biochemistry*. John Wiley & Sons. Vol. 4, 2015.

Poznavanje strukture enzima je vrlo korisno je u tumačenju kinetičkih podataka. Na temelju strukture je moguće razmatranje načina vezanja supstrata za vrijeme katalize, koje se promjene događaju tijekom reakcije, te dati uvid u ulogu pojedinih aminokiselinskih ogranaka u mehanizmu. Neki enzimi znatno mijenjaju oblik tijekom mehanizma, te je tada korisno utvrditi enzimsku strukturu sa i bez vezanih supstratnih analoga koji ne prolaze enzimsku reakciju.

Kod istraživanja djelovanja inhibitora na hDPP III najčešće se koristi komercijalno dostupni supstrat diarginin-2-naftilamid (Arg_2-2NA) zbog svojstva nastalog produkta hidrolize 2-naftilamina da jako fluorescira Reakcija hidrolize Arg_2-2NA katalizirana od strane hDPP III shematski je tako prikazana na slici 17.[23]



Slika 17. Prikaz reakcije hidrolize komercijalno dostupnog supstrata Arg_2-2NA s hDPP III



Slika 18. Prikaz vezanja komercijalnog supstrata Arg_2-2NA (tirkizni štapići) u aktivno mjesto hDPP III (siva pozadina, gdje je Zn^{2+} ion prikazan kao siva kuglica). Udaljenosti su navedene u Å. Izvor: Matovina, M. *et al*. New findings about human dipeptidyl peptidase III based on mutations found in cancer. *RSC Adv*. **7**, 36326–36334 (2017).

Inhibitori peptidaza su vrlo važni s obzirom na široku rasprostranjenost peptidaza u brojnim tkivima životinja i biljaka, kao i u mikroorganizmima, te nedovoljno razrješenu njihovu fiziološku funkciju. Većina peptidaznih inhibitora ima sličan mehanizam djelovanja, gdje se molekula inhibitora veže u odgovarajuće aktivno mjesto u enzimu. Prema literatruno dostupnim podatcima omjer k_{cat}/K_m za takav tip interakcije je velik, dok su pri neutralnom pH vrijednosti k_{cat} i K_m dosta niske.[66] Razlike u načinu vezanja omogućuju razlikovanje između stvarnih supstrata i inhibitornih peptida ili „sporih“ supstrata.[27]

2.8. Teorijska osnova – računalna kemija

Razvojem računalne kemije sve je veći interes za nove studije molekulskih interakcija bioloških molekula s različitim ligandima što doprinosi boljem razumijevanju eksperimentalno dobivenih

rezultata. Jasno je da niti jedna metoda ne može dati savršen opis nekog realnog sustava, posebice kada se radi o biološkim sustavima koji su po samoj svojoj prirodi izuzetno kompleksni.

Računalna kemija grana je kemije koja pruža mogućnost računanja i predviđanja pojedinih svojstava molekula, struktura, konformacijskih promjena i mehanizama reakcija od interesa. Ovisno o složenosti teorije koju koriste metode molekulskog modeliranja dijele se na:

I. molekulsko-mehaničke metode,
II. semiempirijske, empirijske,
III. metode kvantne mehanike,
IV. i metode koje kombiniraju kvantnu i molekulsku mehaniku.[67,68]

Metode koje koriste visoku razinu teorije i pomoću kojih se dobivaju elektronska svojstva molekula pripadaju metodama kvantne mehanike i primjenjive su samo za male molekule. Empirijske metode manje su točne, uključuju i eksperimentalne parametre, zanemaruju elektronska svojstva molekula i primjenjive su za velike molekule i (bio)makromolekule.[69,70]

Empirijske metode računalne kemije visoke rezolucije promatraju atom kao kuglice određene mase. Molekule se ovim metodama promatraju kao sustavi kuglica povezanih oprugama, a njihova se stukturna svojstva ispituju pomoću zakona klasične mehanike. Ukupna potencijalna energija molekule, odnosno sustava, izražena je kao funkcija položaja atoma i sadrži parametre koji opisuju veze, kuteve i nevezne interakcije među atomima (jednadžba 2.8.1 odnosno 2.8.2):[71,72]

$$U_{\text{ukupna}} = U_{\text{vezna}} + U_{\text{nevezna}}, \tag{2.8.1}$$

$$U_{\text{ukupna}} = \sum_i U_{\text{veze},i} + \sum_i U_{\text{kuta},i} + \sum_i U_{\text{torzije},i} + \sum_i U_{\text{vdw},i} + \sum_i U_{\text{el},i}, \tag{2.8.2}$$

Funkcija ukupne potencijalne energije sustava s pripadnim parametrima naziva se polje sila. Članovi koji se odnose na energiju istezanja veze (U_{veza}) i energiju promjene kuta atoma koji su povezani kovalentnom vezom (U_{kuta}) imaju oblik harmonijskog potencijala (2.8.3 i 2.8.4):

$$\sum_i U_{\text{veze},i} = \sum_i k_{\text{veze},i} \left(r_i - r_{0,i}\right)^2, \tag{2.8.3}$$

gdje su r_i-duljina i-te veze, $r_{0,i}$-referentna duljina i-te veze (ovisi o polju sila), k je konstanta sile;

$$\sum_i U_{\text{kuta},i} = \sum_i k_{\text{kuta},i} \left(\theta_i - \theta_{0,i}\right)^2, \tag{2.8.4}$$

gdje su θ_i-vrijednost i-tog kuta, $\theta_{0,i}$-referentna vrijednost i-tog kuta, k je konstanta sile.
Promjena torzijskog (diherdalnog) kuta (U_{torzije}) opisana je periodičnom funkcijom (2.8.5):

$$\sum_i U_{\text{torzije},i} = \frac{1}{2}\sum_i \sum_{n=1}^{3}[1 + (-1)^{n+1}\cos(n\tau_i + \Phi_i)]. \tag{2.8.5}$$

Član koji opisuje van der Waalsove interakcije ($E_{\text{vdw},i}$) sadrži Lennard-Jonesov (2.8.6) ili Buckinghamov potencijal (2.8.7):

$$U_{\text{vdw(LJ)},ij} = \frac{A}{r_{ij}^{12}} - \frac{C}{r_{ij}^{6}}, \tag{2.8.6}$$

$$U_{\text{vdw (B)},ij} = Ae^{-Br_{ij}} - \frac{C}{r_{ij}^{6}}, \tag{2.8.7}$$

češće se koristi Lennard-Jonesov oblik za računanje van der Waalsove komponente potencijalne energije (2.8.5):

$$U_{\text{vdw(LJ)},ij} = \sum_i \sum_j U_{\text{vdw(LJ)},ij} = \sum_i \sum_j \varepsilon_{ij}\left[\left(\frac{r_{0.ij}}{r_{ij}}\right)^{12} - 2\left(\frac{r_{0,ij}}{r_{ij}}\right)^{6}\right], \tag{2.8.8}$$

gdje je r_{ij}-udaljenost atoma i i atoma j, $r_{0,ij}$-referentna van der Waalsova udaljenost atoma i i j (pribilžno jednaka sumi van der Waalsovih radijusa). Elektrostatski doprinos ($U_{\text{el},i}$) neveznom članu polja sila dan je Coulombovim potencijalom gdje su q_i i q_j i-ti i j-ti naboj atoma, a ε_0 je dielektrična permitivnost vakuuma, ε_r-dielektrična permitivnost medija, dok je r_{ij}-udaljenost naboja q_i i q_j (2.8.9):

$$\sum_i \sum_j E_{\text{el},ij} = \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r r_{ij}}. \tag{2.8.9}$$

Metode polja sila dijele se na metode molekulske mehanike (u daljnjem tekstu MM, engl. *Molecular Modelling*) odnosno molekulske dinamike (u daljnjem tekstu MD, engl. *Molecular Dynamics*) i Monte Carlo metode.[67,68]

MM metode koriste se za određivanje geometrije molekule koja odgovara minimumu na plohi potencijalne energije (engl. *Potential Energy Surfaces*), a MD metode za proučavanje ponašanja sustava, a time i konformacijskih promjena molekula, u nekom vremenskom periodu.[67] Molekulska dinamika pomaže u utvrđivanju veza između strukture i dinamike molekula.[73]

MD simulacije koriste se kako bi se ispitala dinamika približno realnih sustava. Vremenskim uprosječivanjem veličina generiranih tijekom dovoljno dugih simulacija mogu se odrediti termodinamička, odnosno makroskopska svojstva simuliranog sustava koja se tada mogu usporediti s eksperimentalno dobivenim vrijednostima,[67] no one također pružaju uvid u intra i intermolekularne interakcije proučavanog sustava, što je eksperimentalno teško, a ponekad i nemoguće odrediti.

Monte Carlo (u daljnjem tekstu MC) simulacije nalaze novu konfiguraciju sustava nasumičnim pomicanjem pojedinog atoma ili molekule odnosno nasumičnom promjenom neke interne koordinate, koristeći poseban skup kriterija za odluku o prihvaćanju ili odbacivanju nove konfiguracije. Pored potencijalne energije u MD simulacijama važnu ulogu ima kinetička energija o kojoj ovisi brzina i vjerodostojnost pretraživanja plohe potencijalne energije. U MC simulaciji ukupna energija određena je izravno iz funkcije potencijalne energije, ali vjerojatnost prijelaza između pojedinih konformera (odnosno općenitije, stanja sustava) ovisi o temperaturi na kojoj se sustav promatra.[67]

Kako bi dobiveni rezultati bili prikladniji za usporedbu s eksperimentalnima, važno je da su i uvjeti čim sličniji, pa se tako simulacije provode u odgovarajućim otapalima, koje je u slučaju biomakromolekula voda. Otapalo se u simulacijama može opisati na 3 različita načina ovisno o odabranom modelu:

I. implicitno, tzv. model kontinuuma,
II. eksplicitno simulacijama pojedinačnih molekula vode,
III. ili kombinacijom oba pristupa.[74]

Jasno je da računalne metode zahtijevaju određenu pripremu sustava koja sama po sebi nije uvijek jednostavna. Naime, kako bi se dobio čim bolji uvid u problematiku važno je postići da su uvjeti u sustavu čim sličniji ekperimentalnim uvjetima. Sustav koji se promatra zajedno s molekulama otapala, i eventualno (protuionima) ionima dodanima za neutralizaciju sustava obično se smješta u tzv. kutiju (engl. *box*) pravilnog oblika, (kao što je npr. krnji oktaedar).[75] Također, nužno je koristiti periodične rubne uvjete (engl. *periodic boundary conditions*) kako bi se izbjegli neželjeni rubni efekti.[75] Kako bi se osigurali odgovarajući termodinamički uvjeti, kao što su gustoća sustava, te konstantnost prosječne temperature i tlak sustava, koriste se regulatori temperature i tlaka (termostati i barostati). [67] Na taj način postižu se uvjeti koji odgovaraju kanonskom ansamblu (konstantni volumen, *V* i temperatura, *T*) odnosno izobarno-izotermnom ansamblu (konstantni tlak, *P* i temperatura,*T*).

Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann (ili Generalized Born) Surface Area (MM-PB(GB)SA) koje se koriste za računanje promjene slobodne energije između dva stanja sustava, primjerice vezanog i slobodnog stanja receptora i liganda, a temelje se na rezultatima MD (ili MC) simulacija. MMGBSA i MMPBSA su često korištene metode za račun slobodnih energija s obzirom na to da daju prihvatljivu razinu točnosti, relativno niske troškove računanja i široku primjenu kod studija interakcija u različitim sustavima: ligand-protein[76], protein protein[77] i protein-DNA/RNA[78] što je izuzetno važno za cjeloukupno razumijevanje interakcija u biološkim sustavima.

MD simulacijama mogu se otkriti interakcije protein-ligand kao i ligandom inducirana "reorganizacija" aktivnog mjesta kao i njegovo djelomično zatvaranje. Također MD simulacije pružaju mogućnost utvrđivanja mogućih reakcijskih mehanizama, te jasno utvrđivanje slaganja računalnih s eksperimentalnim rezultatima.[29,79] O ovim metodama će nešto više riječi biti u sljedećem poglavlju.[80]

U dosada literaturno opisanim istraživanjima temeljenim na molekulskom modeliranju utvrđeni su višestruki načini vezanja konjugata gvanidiniokarbonilpirola s aromatskim sustavima u aktivno mjesto hDPP III, a na temelju njihove stabilnosti tijekom MD simulacija i analize intermolekularnih interakcija utvrđeno je koji način vezanja je najstabilniji.[81]

Molekulskim modeliranjem i biokemijskim analizama, uz upotrebu određene kristalne strukture hDPP III izgrađeni su kompleksi, divljeg tipa hDPP III (WT) i odgovarajućeg mutanta H568N s komercijalno dostupnim supstratom Arg_2-2NA, te s kompetitivnim inhibitorom Tyr-Phe-hidroksamatom (Tyr-Phe-NHOH).[29]

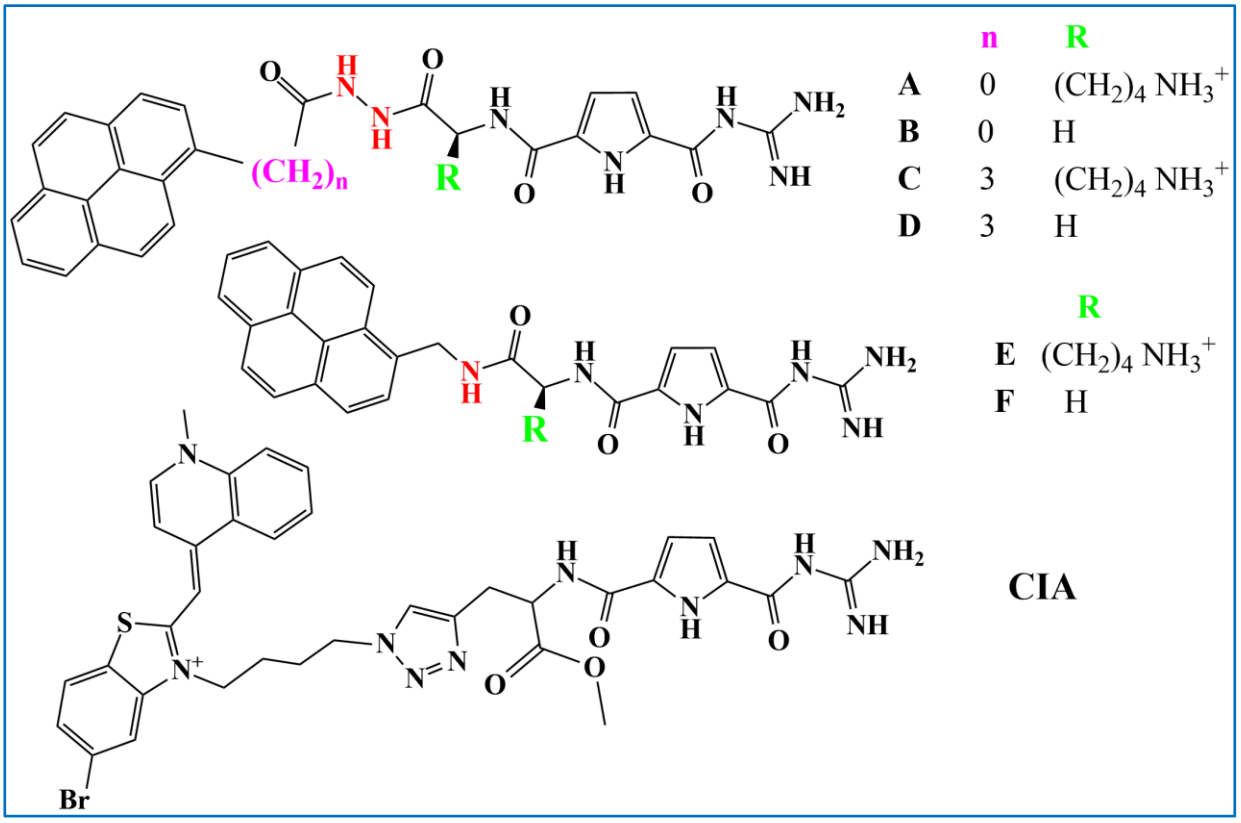
Simulacijama molekulske dinamike otkrivene su ključne protein-ligand interakcije, te ligandom inducirana "reorganizacija" aktivnog mjesta koja rezultira povećanom kompaktnošću enzima. Također je određen mogući reakcijski mehanizam.[30]

Molekulsko modeliranje omogućuje razumijevanje aktivnosti enzima na molekularnoj osnovi. Tako je na temelju rezultata molekulskog modeliranja pojašnjena supstratna specifičnost DPP III iz termofilne bakterije *Caldithrix abyssi* prema različitim dipeptidil-2-NA supstratima.[82]

§ 3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Potencijalni ligandi (slika 19) su novosintetizirani konjugati fluorofora (piren, cijaninska boja) i gvanidina koje su sintetizirale dr. sc. Josipa Suć (**A**-**F**) i dr. sc. Tamara Šmidlehner (**CIA**) s Instituta Ruđer Bošković.



Slika 19. Pregled oznaka i struktura novosintetiziranih potencijalnih liganada.

Rekombinantni humani DPP III dobiven je heterolognom ekspresijom u *Escherichia coli* i pročišćavanju prema Špoljarić i sur.[83] U istraživanjima su korišteni sljedeći polinukleotidi: DNA iz timusa goveda (*calf thymus* DNA, ctDNA, Sigma Aldrich, SAD), te sintetska dvolančana RNA pApU (*poly A-poly U*), svi proizvođača Sigma Aldrich, SAD. Otopine polinukleotida određenih koncentracija unaprijed su pripremljene u puferu natrijeva kakodilata pri pH 7,4, I = 0,05 mol dm^{-3}. ctDNA (*calf thymus* DNA) je dodatno sonificirana i filtrirana kroz 0,45 μm filter,[84,85] a neposredno prije izvođenja eksperimenta svakom polinukleotidu spektrofotometrijski je određena točna koncentracija. Svi polinukleotidi su dvolančane molekule ctDNA, odnosno pApU, a sintetski polinukleotidi sadrže više od 100 parova baza, koji osiguravaju više veznih mjesta duž dvostruke uzvojnice.

3.2. Eksperimentalne metode korištene za istraživanje interakcija novosintetiziranih spojeva s E451A i hDPP III (WT)

3.2.1. Priprema otopina

S obzirom na to da je osnovna svrha priprave novih spojeva bilo ispitivanje njihovih interakcija s hDPP III (WT), mutantom E451A, ctDNA te pApU u biološkim uvijetima, bilo je nužno ispitati njihovu topljivost i stabilnost u vodi, te u DMSO (Sigma Aldrich). U tablici 4 dan je prikaz oznaka svih novosinteiziranih spojeva i otapala u kojima je utvrđena njihova topljivost. Navedena otapala korištena su za pripremu ishodišnih otopina novosintetiziranih spojeva koncentracije 1×10^{-3} mol dm^{-3} na način da se odvagana masa krutine novosintetiziranog spoja otopila u odgovarajućem prethodno izračunatom volumenu otapala. Otopine spojeva čuvane su na hladnom (~4 °C) i tamnom mjestu. Utvrđeno je da su pripravljene ishodišne otopine spojeva stabilne unutar 2-4 tjedna, nakon čega dolazi do taloženja spojeva.

Tablica 4. Pregled oznaka novosintetiziranih spojeva, njihovih izračunatih relativnih molekulskih masa i otapalo koje je korišteno za pripremu ishodišne otopine koncentracije 1×10^{-3} mol dm^{-3} upotrebom pufera-natrijev kakodilat (pH 7,0, I = 0,05 mol dm^{-3}) pri 25 °C.

Novosintetizirani spoj	M_r	Otapalo
A	568,63	H_2O
B	496,90	DMSO
C	539,63	H_2O
D	538,58	DMSO
E	610,70	H_2O
F	467,50	DMSO
CIA	1027,51	H_2O / DMSO

3.2.2. Metode korištene za fizikalno kemijsku karakterizaciju novosintetiziranih spojeva

Svi spojevi su novi te su strukture i čistoća u potpunosti okarakterizirani NMR i HRMS metodama (D-1). Za karakterizaciju novosintetiziranih potencijalnih liganada korištene su spektrofotometrijske metode. Za mjerenje UV/Vis spektara korišten je instrument Carry 100 UV-Vis spektrofotometar (Agilent Technologies) s kvarcnim kivetama (1 cm). Fluorescentni spektri su mjereni na Cary Eclipse fluoresencijskom spektrofotometru (Aglient Technologies), s kvarcnim kivetama (1 cm).

Spektrofotometrijske studije novosinteiziranih spojeva su provedene u puferskim otopinama (pH 7,0 i pH 7,4, pufer natrijev kakodilat, I = 0,05 mol dm^{-3}) pri 25 °C. Za mjerenja su korištene prethodno priređene ishodišne otopine novosintetiziranih liganada (1×10^{-3} mol dm^{-3}), na način da su dodavani odgovarajući alikvoti ishodišne otopine (V = 0,5 µl) koji su potom razrjeđivani na zadanu koncentraciju dodatkom kakodilatnog pufera (pH 7,0, I = 0,05 mol dm^{-3}) do volumena od 2 mL pri 25 °C.

UV/Vis spektroskopija je korištena kako bi se utvrdilo da li je u eksperimentalnim uvjetima apsorpcija novosintetiziranih spojeva je proporcionalna njihovoj koncentraciji prema Lambert-Beerovom zakonu, te su određeni apsorpcijski maksimumi puferiranih otopina spojeva pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije (λ_{max}) i njihovi molarni ekstinkcijski koeficijenti (ε). U svrhu istraživanja termičke stabilnosti spojeva snimljeni su UV/Vis spektri u temperaturnom rasponu 25-90 °C.

Fluorescencijskom spektroskopijom određeni su emisijski spektri spojeva pri pobudi kromofora na valnoj duljini maksimuma absorpcije (izabrani maksimumi najveće valne duljine), kao i proporcionalnost emisije prema koncentraciji spoja. Također, snimljeni su pobudni spektri spojeva praćenjem emisije na valnoj duljini maksimuma emisijskog spektra uz pobudu u odgovarajućem rasponu valnih duljina za novosintetizirane spojeve u otopinama kakodilatnog pufera, pH 7,0, I = 0,05 mol dm^{-3}. Ispitan je utjecaj temperature na emisijske spektre spojeva u području od 25-90 °C, te su snimljeni emisijski spektri nakon hlađenja otopina tih spojeva na sobnu temperaturu.

3.2.3. Metode korištene za eksperimentalno istraživanje interakcija novosintetiziranih spojeva s E451A i hDPP III (WT)

UV/Vis i fluorimetrijska ispitivanja konjugata fluorofora i gvanidina s hDPP III su provedena u puferiranim otopinama (pH 7,4), koje odgovaraju djelovanju enzima. Titracije su provedene pri odgovarajućem pH dodavanjem alikvota ishodišne otopine mutanta E451A odnosno hDPP III divljeg tipa (WT) u otopinu ispitivanog spoja pri pH 7,4, I = 0,05 mol dm^{-3}, 25 °C. Vrijeme inkubacije prije snimanja spektara je u slučaju spojeva **A**, **B, C** i **D** bilo 60 sekundi, dok je kod spojeva **E**, **F** i **CIA** bilo 10 sekundi.

Za mjerenja su korištene prethodno priređene ishodišne otopine novosintetiziranih liganada (1×10^{-3} mol dm^{-3}), na način da su dodavani odgovarajući alikvoti ishodišne otopine razrjeđivani na zadanu koncentraciju dodatkom kakodilatnog pufera (pH 7,4, I = 0,05 mol dm^{-3}) do volumena od 1 mL. U spektrofotometrijskim istraživanjima korištene su koncentracije ispitivanih spojeva pri kojima je spektroskopski odgovor linearno ovisan o promjeni koncentracije.

U svrhu studije interakcija novosintetiziranih liganada s hDPP III (WT) provedene su kinetičke studije za sve novosintetizirane potencijalne ligande, Michaelis-Menten kinetika.[24] Kako bi se odredili kinetički parametri k_{cat} i K_m divljeg tipa ljudske DPP III provedena su kontinuirana mjerenja kojima se fluorimetrijski pratio stupanj hidrolize supstrata Arg_2-2NA u produkt (2-naftilamid) prema izmjerenoj baždarnoj krivulji dobivenoj fluorescencijskim mjerenjem na instrumentu Eclipse Fluorescence Spectrophotometer, Agilent Technologies pri pH 7,4, I = 0,05 mol dm^{-3}, 25 °C.

Prilikom izvedbe eksperimenta u svrhu praćenja navedene reakcije hidrolize Arg_2-2NA, volumen reakcijske smjese je bio 3 mL, te je sadržavala 1500 µl 20 mM TrisHCl pufer pH vrijednosti 7,4, 50 µl otopine novosinteiziranog spoja, supstrat u rasponu koncentracija od 0,5 do 80 µM i 5 µl divljeg tipa DPP III proteina (60 nM) koji je bio dodavan. Svi pokusi su napravljeni u triplikatu.

Sve ishodišne otopine liganada bile su svježe pripravljene otapanjem spoja u odgovarajućem otapalu. Reakcija je inicirana na način da se prethodno inkubiranoj smjesi pufera, komercijalno dostupnog supstrata i liganda (u trajanju od 2 minute) dodavao protein. Praćena je reakcija hidrolize Arg_2-2NA kontinuiranim snimanjem fluorescencije produkta u vremenskom trajanju od 1 minute pri sljedećim uvjetima: λ_{ex} = 332 nm i λ_{em} = 420 nm, S_{EX}=10, S_{EM}=5.

Vrijednosti K_m i k_{cat} dobivene su iz izmjerenih podataka obradom u program GraphPad, upotrebom alata nelinearne regresije. Isti je program korišten za izračun konstante inhibicije, a tip inhibicije određen je pomoću linearizacije po Lineweaver-Burku.[86,87]

3.3. Računalne metode korištene za istraživanje interakcija novosintetiziranih spojeva s E451A i hDPP III (WT)

Polazni kompleksi dobiveni su kroz odabir najpovoljnijih konformacija liganada u proteinu dobivenih metodom molekulskog uklapanja (engl. *docking*) koji su potom optimizirani. Kako bi se ispitala stabilnost kompleksa i omogućilo bolje smještanje liganda u aktivno mjesto enzima provedene su molekulsko dinamičke simulacije kompleksa u vodi. Analiza rezultata obuhvatila je praćenje fleksibilnosti pojedinih kompleksa, koordinacije cinkovog iona i račun

slobodne energije vezanja liganda metodom MMPBSA (engl. *Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area*).

3.3.1. Metoda molekulskog uklapanja

Tehnike molekulskog uklapanja (engl. *docking*) dizajnirane su za pronalaženje adekvatne konfiguracije liganda i receptora.[88,89]. Proces vezanja male molekule na proteinski cilj nije jednostavan s obzirom na to da različiti entropijski i entalpijski čimbenici utječu na interakcije među njima. Pokretljivost liganda i receptora, učinak proteinske okoline na raspodjelu naboja na ligandu,[90] te njihove interakcije s molekulama vode u okolini dodatno otežavaju opis procesa. Ova tehnika se temelji na postupku koji podrazumijeva generiranje sveobuhvatnog skupa konformacija kompleksa, i njihova rangiranja prema stabilnosti.[91]

Za izgradnju kompleksa sa spojevima **A**, **C**, **D**, **F** i **CIA** korištene su poluzatvorene konformacije hDPP III i njezinog neaktivnog E451A mutanta dobivene u ranijim istraživanjima, budući da je pokazano da je takav oblik hDPP III najzastupljeniji u vodenom mediju.[39,81]

Trodimenzijske strukture liganda konstruirane su pomoću programa GaussView 5.0.[92] Uklapanje liganda provedeno je pomoću programa AutoDock (AutoDock 4.2.6).[11] Središte trodimenzijske rešetke za uklapanje (engl. *docking box*) veličine 80 × 80 × 80 $Å^3$ postavljeno je na cinkov ion (Zn^{2+}) u aktivnom mjestu enzima, dok je razmak između čvorova rešetki (engl. *grid spacing*) iznosio 0,25 Å. Ligandi su smatrani fleksibilnim, a uklapanje je provedeno pomoću Lamarckian genetskog algoritma (engl. *Lamarckian Genetic Algorithm*, LGA) uz zadane parametre.[11]

Kompleksi dobiveni korištenjem programa AutoDock[11] su poredani i na temelju najboljih rezultata (od ukupno 10 kompleksa generiranih za svaki spoj) i usporedbe s načinom vezanja prirodnih supstrata, odabrani su kompleksi za daljnje simulacije. Za svaki spoj koji sadrži pirene razmatrane su dvije do tri početne strukture, dok su za **CIA** odabrane 4 strukture koje je generirao AutoDock za daljnje simulacije molekulske dinamike (MD).

3.3.2. Molekulska dinamika

Kompleksi dobiveni molekulskim uklapanjem su parametrizirani pomoću modula Antechamber[93] i *tLEaP*[94] iz AMBER16[10] programskog paketa upotrebom GAFF[95] i ff14SB[96] polja sila, prvog za parametrizaciju liganada, a drugog proteina. Za cinkov ion (Zn^{2+}) su korišteni hibridni, vezno-nevezni parametri razvijeni u Laboratoriju za biokemiju proteina i molekulsko modeliranje (ZOKB, IRB).[97]

Pojam AMBER (engl. *Assisted Model Building with Energy Refinement*) obuhvaća skup polja sila koja opisuju strukturna svojstva biomakromolekula i paket programa za simulacije molekulske dinamike i analizu rezultata.[94]

Tzv. opće AMBER polje sila (engl. *General Amber force field*, GAFF) razvijeno je za parametrizaciju malih organskih molekula i kompatibilno je s AMBER poljima sila za proteine i nukleinske kiseline. Ono sadrži 33 osnovna tipa atoma i 22 posebna tipa atoma što omogućava karakterizaciju organskih molekula s heteroatomima (N, O, S, …).[95] Primjena ovih polja pruža mogućnost izučavanja kompleksnih sustava koji čine različite (bio)makromolekule i male organske molekule što je posebice važno kod istraživanja načina vezanja liganda u receptor, pri dizajnu novih lijekova ili pak kod izračuna slobodnih energija vezanja.

Budući je hDPP III pretežno smještena u citosolu bilo je važno da *In silico* studije budu provedene u sličnim uvjetima što podrazumijeva rad u vodenim otopinama. Kompleksi su smješteni u oktaedarskoj kutiji ispunjenoj TIP3P (engl. *transferable intermolecular potential with 3 points*)[74,98] molekulama vode, osiguravajući sloj molekula vode od 11 Å oko proteina. Dodani su ioni natrija (Na^+) kako bi se neutralizirao sustav, te su smješteni u blizini odgovarajućih negativno nabijenih aminokiselinskih ostataka na površini proteina.[99,100]

Dobiveni sustavi (hDPP III-ligand kompleksi otopljeni u vodenoj otopini Na^+ iona) su optimizirani i simulirani. Geometrija proteina optimizirana je kroz 3 ciklusa s različitim ograničenjima. Tijekom prvog ciklusa izvedeno je 1500 koraka optimizacije, gdje je prvih 450 koraka bila korištena metoda najstrmijeg spusta (engl. *steepest descent method*), a za ostale metoda konjugiranog gradijenta (engl. *conjugate gradient*). Pomicale su se samo molekule vode, dok su položaji atoma kompleksa bili ograničeni harmonijskim potencijalom konstante sile od 133,89 kJ mol^{-1} $Å^{-2}$, kako bi se uravnotežile molekule vode. U drugom krugu od 2500 koraka konstanta sile za ograničavanje položaja atoma okosnice proteina iznosila je 50,21 kJ

mol^{-1} Å^{-2}. U trećem krugu koji se sastojao od 9500 koraka nisu bila primjenjivana nikakva ograničenja.

Nakon optimizacije geometrije kompleksa sustav je zagrijavan od 0 do 300 K tijekom 30 ps korištenjem Langevinovog termostata s frekvencijom sudara od 1 ps^{-}1 (*NVT* ansambl). Slijedio je korak uravnotežavanja gustoće sustava u trajanju od 70 ps uz korak od 1 fs. Konstantnost prosječne vrijednosti tlaka od 1 atm osigurana je upotrebom Brendsenovog barostata, a temperatura sustava (300 K) je reguliran pomoću Langevinovog termostata (*NPT* ansambl).

Provedena je produktivna MD simulacija tijekom koje je korišten vremenski korak od 2 fs (za ograničavanje veza s atomom vodika korišten je SHAKE algoritam). Korišteni su periodični granični uvjeti u kojima su elektrostatske interakcije izračunate primjenom Ewaldove metode. Simulacije su izvršene pomoću pmemd modula iz AMBER16[10] paketa prilagođenog za izvođenje na grafičkim procesorima.

Za analizu i karakterizaciju utjecaja inhibitora na konformaciju i dinamiku enzima analizirano je nekoliko geometrijskih parametara o čemu će više riječi biti u narednom poglavlju s rezultatima.

3.3.3. MMPBSA

MMPBSA (*Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area*) metoda se primjenjuje za računanje promjene Gibbsove slobodne energije, tj. njezine entalpijske komponente (iako je preko računa površine djelomično uključena i entropija solvatacije) prilikom modeliranja molekularnog prepoznavanja, kao što su interakcije protein-ligand (3.3.3.1 i 3.3.3.2).[101,102] Reprezentativne strukture liganada, receptora i kompleksa se mogu generirati na 2 načina:[102,103]

1. engl. *single-trajectory* → dekompozicija trajektorije kompleksa,
2. engl. *multiple-trajectory* → odvojene simulacije receptora, liganda i kompleksa.

$$\Delta_r G^{\circ}_{\text{vezanje},H_2O} = G^{\circ}_{\text{kompleks}} - G^{\circ}_{\text{receptor}} - G^{\circ}_{\text{ligand}}, \qquad (3.3.3.1)$$

$$\Delta_r G^{\circ}_{\text{vezanje},H_2O} = \Delta_r G^{\circ}_{\text{vezanje,vakuum}} + (\Delta_{sol} G^{\circ}_{\text{kompleks}} - \Delta_{sol} G^{\circ}_{\text{receptor}} - \Delta_{sol} G^{\circ}_{\text{ligand}}). \quad (3.3.3.2)$$

Kod konstantnog tlaka i volumena (p i V) sustava entalpijski doprinos Gibbsovoj energiji vezanja jednak je potencijalnoj energiji sustava koja se dijelom računa unutar polja sila (interakcija u vakuumu), a dijelom PBSA ili GBSA pristupom (doprinos potencijalnoj energiji uslijed njegovog prijenosa iz vakuuma u polarizabilni medij) pri čemu PB označava Poisson-Boltzmannovu jednadžbu, GB (*Generalized Born*) jednadžbu poopćenog Bornovog modela, a SA (*Solvent Accesible Area*) otapalu dostupnu površinu. PB i GA koriste se za računanje polarnog doprinosa otapanja solvatacije sustava, a SA nepolarnog (3.3.3.3):[102]

$$\Delta_{sol} H^{\circ}_{np} = \gamma SASA + \beta, \quad (3.3.3.3)$$

gdje su γ i β empirijski dobiveni parametri.

Kod računa slobodnih energija vezanja liganada u aktivno mjesto proteina korištena je MMPBSA.py skripta koja je dostupna u paketu Amber16.[10] Za račun MMPBSA energija korištene su strukture kompleksa generirane tijekom završnih 5 ns simulacija produktivnih MD simulacija. Za računanje elektrostatskih doprinosa korištena je nelinearna Poisson-Boltzmannova metoda[104] dok je nepolarna komponenta slobodne energije uslijed otapanja kompleksa aproksimirana računom promjene površina. Granica za van der Waalsovu interakciju bila je postavljena na 11 Å, dielektrična konstanta proteina i liganda bila je 2 , a otapala 80. Koncentracija soli bila je 0,10 mol dm^{-3}.

3.4. Eksperimentalne metode korištene za istraživanje interakcija novosintetiziranih spojeva s ctDNA i pApU

Kako su ctDNA i pApU potencijalne mete novosintetiziranih spojeva, bilo je važno okarakterizirati i te interakcije. Ovom metodom su određene točke mekšanja kod utvrđivanja interakcija svih novosintetiziranih liganada s komercijalno dostupnim ctDNA i pApU.

Korišteni su komercijalno dostupni ctDNA (*calf thymus* (ctDNA) (Sigma Aldrich) odnosno pApU (*poly A-poly U*) (Sigma Aldrich), otopljeni u puferu natrijeva kakodilata, pH 7,4, I = 0,05 mol dm^{-3}.

3.4.1. Metoda termičke denaturacije (mekšanja) dvolančanih DNA i RNA

Poznato je da se kod zagrijavanja dvolančani polinukleotidi pri određenoj temperaturi (T_m vrijednost) disociraju u dva jednolančana polinukleotida. Nekovalentno vezanje malih molekula na dl-polinukleotide obično ima određeni učinak na toplinsku stabilnost uzvojnica dajući tako različite T_m vrijednosti. Razlika između T_m vrijednosti slobodnog polinukleotida i kompleksa s malom molekulom (ΔT_m vrijednost) važan je čimbenik u karakterizaciji interakcija malih molekula s polinukleotidima.[63]

Sva mjerenja su izvedena u duplikatima i dane vrijednosti su aritmetičke sredine.

3.4.2. Spektrofotometrijske (UV/Vis, fluorimetrijske) titracije

Za mjerenja su korištene ishodišne otopine novosintetiziranih liganada (1×10^{-3}mol dm^{-3}), na način da su odgovarajući alikvoti ishodišne otopine razrjeđivani na zadanu koncentraciju dodatkom kakodilatnog pufera (pH 7,4, I = 0,05 mol dm^{-3}). U spektrofotometrijskim istraživanjima korištene su koncentracije ispitivanih spojeva pri kojima je spektroskopski odgovor linearno ovisan o promjeni koncentracije.

Ttitracije u provedene dodavanjem alikvota ishodišne otopine ctDNA ili pApU u otopinu ispitivanog spoja pri pH 7,4, I = 0,05 mol dm^{-3}, 25 °C, λ_{ex}=342 nm (**A-F**) ili λ_{ex}=505 nm (**CIA**). Vrijeme inkubacije prije snimanja spektara je bilo 10 sekundi.

3.4.3. Cirkularni dikroizam

Da bi se dobio uvid u promjene polinukleotidnih svojstava induciranih vezanjem male molekule, odabrana je CD spektroskopija kao vrlo osjetljiva metoda prema konformacijskim promjenama u sekundarnoj strukturi polinukleotida.[105] Dodatno, akiralne male molekule mogu na kraju utjecati na inducirani CD spektar (ICD) nakon vezanja na polinukleotide, što bi moglo dati korisne informacije o načinima interakcije.[105]

Primjena CD spektroskopije za proučavanje kompleksa između male molekule (liganda) i DNA / RNA može se općenito podijeliti u dva raspona valnih duljina:

1. U rasponu valnih duljina 200-300 nm gdje DNA odnosno RNA posjeduju intrinzični spektar i upravo su promjene u ovom području povezane sa specifičnom promjenom u sekundarnoj strukturi polinukleotida. Važno je istaknuti da navedeno vrijedi isključivo u slučaju kada ligand ne apsorbira unutar tog raspona, te su tada promjene rezultat vezanja liganda. Na primjer, značajno smanjenje CD spektra u cijelom rasponu od 200-300 nm ukazuje na poremećaj kiralnosti uzvojnica (najčešće pri interkalaciji liganda). Ukoliko se pak CD spektar DNA odnosno RNA ne promijeni značajno, polinukleotidna struktura uzvojnice je sačuvana, što upućuje na nekoliko mogućih scenarija: vezanje liganda u utore DNA ili RNA, vezanje uzduž negativno nabijene okosnice DNA/RNA, ili pak vrlo slabo ili nikakvo vezanje. Ako ligand također apsorbira unutar tog raspona, promatrane promjene se ne mogu nedvosmisleno pripisati promjenama uzvojnica DNA odnosno RNA, jer će inducirani CD spektar liganda biti preklopljen s intrinzičnim CD spektrom polinukleotida.[47,105,106,107,108]

2. U rasponu valnih duljina iznad 300 nm, svi CD signali mogu se pripisati samo ligandu, budući da polinukleotidi ovdje ne apsorbiraju. Najjednostavniji slučaj se javlja kod akiralnih liganda, pri čemu će vezanje liganda u kiralno okruženje (dvolančana polinukleotidna uzvojnica) dati inducirani CD spektar (ICD) čiji su predznak i veličina određeni geometrijom vezanja. Negativni ICD sa zasićenjem koje se približava na oko r = 0,2-0,3 (r = [ligand] / [polinukleotid]) je jaka indikacija interkalativnog vezanja, s momentom prijelaza liganda orijentiranog „paralelno“ u odnosu na dugu os susjednih

parova baza. Pozitivni predznak ICD signala, također s približavanjem zasićenja na oko r = 0,2-0,3, povezuje se s vezanjem u utore DNA/RNA ili interkalacijsko vezanje momentom prijelaza liganda orijentiranog okomito na dugu os susjednih parova baza.[47,105,106,107,108]

Spektri cirkularnog dikroizma snimljeni su na spektropolarimetru J-815 (Jasco), pri 25 °C u kvarcnim kivetama optičkog puta 1 cm. Sve otopine su pripremljene u kakodilatnom puferu ionske jakosti I = 0,05 mol dm^{-3}, pH 7,4. Mjerenja su napravljena na način da su u otopinu polinukleotida (c = 2 × 10^{-5} mol dm^{-3}) dodavani alikvoti ishodne otopine ispitivanog spoja minimalno u rasponu molarnih omjera $\boldsymbol{r}$ [L] / [*polinukleotid*]=0,05-0,3. Mjerenja su izvedena u rasponu valnih duljina od 220 nm do 750 nm, usrednjavanjem tri mjerenja po spektru.

3.4.4. Obrada rezultata spektrofotometrijskih titracija s ciljem izračuna konstante stabilnosti kompleksa

Pri računanju konstante stabilnosti kompleksa (K_s) ispitivanog spoja s DNA/RNA koristi se Scatchardova jednadžba,[42,61] izvedena iz Langmuirove izoterme (jednadžbe 3.4.4.1 i 3.4.4.2), koja omogućuje istovremeno računanje konstante stabilnosti K_s i omjera $\boldsymbol{n}$ [vezani spoj]/[polinukleotid] nekom od metoda nelinearne regresije.

Scatchardova izoterma vezanja u slučaju spektrofotometrijski aktivnog kompleksa može se prikazati izrazom:

$$I = I_0 + \left(\frac{(I_{lim} - I_0)}{2 \times c}\right) \times \left(c + \boldsymbol{n} \times c_s + \frac{1}{K_s} - \left(\sqrt{\left(c + \boldsymbol{n} \times c_s + \frac{1}{K_s}\right)^2 - (4 \times c \times \boldsymbol{n} \times c_s)}\right)\right), \qquad (3.4.4.1)$$

dok se Scatchardova izoterma vezanja u slučaju spektroskopski neaktivnog kompleksa može prikazati izrazom:

$$I = I_0 - \left(\frac{I_0}{2 \times c}\right) \times \left(c + \boldsymbol{n} \times c_s + \frac{1}{K_s}\right) - \sqrt{\left(c + \boldsymbol{n} \times c_s + \frac{1}{K_s}\right)^2 - (4 \times c \times \boldsymbol{n} \times c_s)}\,, \qquad (3.4.4.2)$$

gdje je c koncentracija ispitivanog spoja u otopini, c_s koncentracija polinukleotida, $\boldsymbol{n}$ omjer koncentracije vezanog spoja i polinukleotida ($\boldsymbol{n}_{[\text{vezani spoj}]/[\text{poli XY}]}$), I_0 spektrofotometrijski odgovor čistog spoja, I spektrofotometrijski odgovor nakon dodatka određene količine supstrata, I_{lim} spektrofotometrijski odgovor kompleksa kada više nema slobodnog spoja u otopini i K_s konstanta stabilnosti kompleksa.

Kod titracija spojeva s hDPP III (E451A mutant) najbolji rezultati dobiveni su za stehiometriju kompleksa, spoj/E451A, 1 : 1 (kod Scatchard-ove jednadžbe za omjer n=1).

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

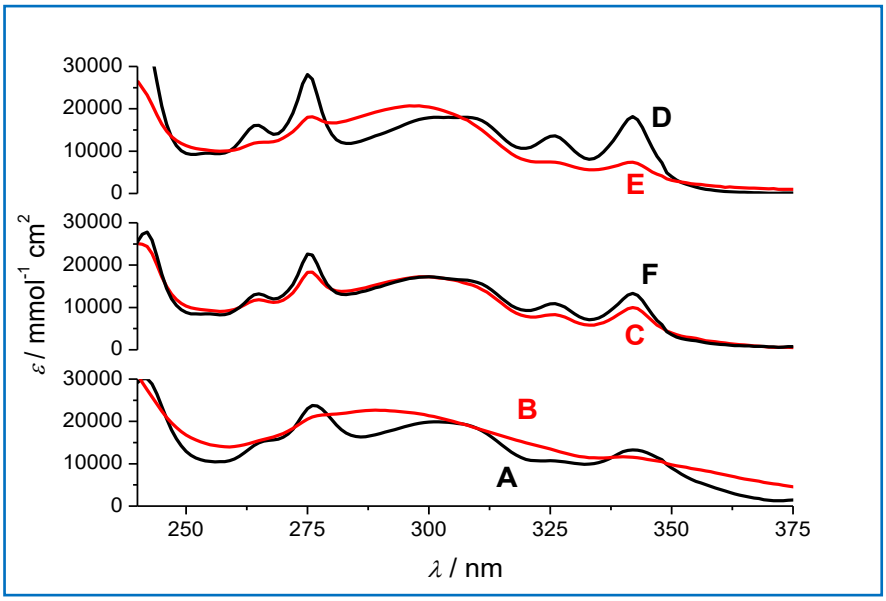
4.1. Rezultati eksperimentalnog istraživanja s E451A i hDPP III (WT)

4.1.1. Fizikalno kemijska karakterizacija puferiranih otopina novosintetiziranih liganada

Za potrebe eksperimentalnih mjerenja prvi i najvažniji korak je bio pronalazak adekvatnih otapala za pripremu otopina novosintetiziranih liganada. Kako je navedeno u tablici 4, utvrđeno je da su **A**, **C**, **E** i **CIA** spojevi topljivi u redestiliranoj vodi, dok su spojevi **B**, **D** i **F** otopljeni u DMSO-u (tablica 4). Potom su priređene ishodišne otopine svih spojeva (c = 1 × 10^{-3}mol dm^{-3}) u puferu natrijev kakodilat (pH 7,0, I = 0,05 mol dm^{-3}).

Za potrebe kvalitativne i kvantitativne analize priređenih puferskih otopina novosintetiziranih liganada korištene su UV/Vis i fluorescencijska spektroskopija. Primjenom UV/Vis spektroskopije utvrđeno je da su izmjerene apsorbancije pripremljenih puferskih otopina novosintetiziranih liganada proporcionalne njihovim koncentracijama (sve do c = 2 × 10^{-6} mol dm^{-3}), što je u potpunosti u skladu s Beer-Lambertovim zakonom (D-slika 1 i 2). Apsorpcijski maksimumi i pripadni molarni ekstincijski koeficijenti (ε) dani su u D-tablici 1 i slici 20.

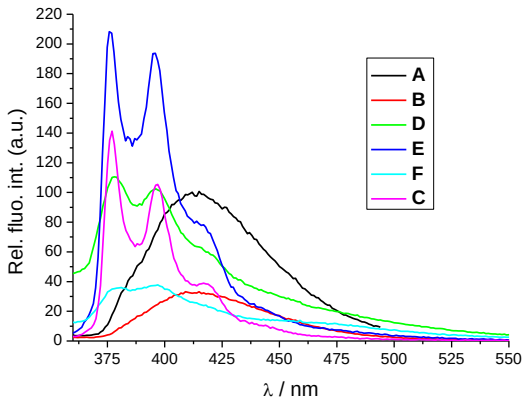
UV/Vis spektri spojeva **A**, **C**, **E** i **F** nisu se značajno promijenili na porast temperature do 95 °C, a reproduktivnost UV/Vis spektara pri hlađenju na 25 °C bila je izvrsna. Sve navedeno ukazuje da se ispitivani spojevi **A**, **C**, **E** i **F** ne agregiraju stvaranjem intermolekularnih interakcija u eksperimentalnim uvjetima i pretežno su ispruženi (nema intramolekularnih „*stacking*“ interakcija). Za razliku od **A**, **C**, **E** i **F**; spojevi **B** i **D** pokazali su izražene promjene u svojim UV/Vis spektrima nakon zagrijavanja (D-slika 3), što ukazuje na intermolekularne ili intramolekularne aromatske interakcije. Nakon hlađenja UV/Vis spektar spoja **B** je gotovo obnovljen, što upućuje na reverzibilnost aromatskih interakcija, dok je UV/Vis spektar spoja **D** pokazao značajno povećanje intenziteza i osnovne linije, što je pripisano formiranju opalescentnog koloida (D-slika 3).



Slika 20. Usporedba UV/Vis spektara puferskih otopina spojeva **A-F**, pH 7,0, natrijev kakodilat, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C. Derivati s lizinskim bočnim ogrankom su prikazani crnim linijama (**A**, **D** i **F**) dok su oni s glicinskim bočnim ograncima prikazani crvenim linijama (**B**, **C** i **E**).

Nakon provedenih mjerenja s UV/Vis spektroskopijom, provedena su mjerenja fluorescencijskom spektroskopijom na temelju ranije utvrđenih najpovoljnih valnih duljina pobude za svaki od spojeva (λ_{exc}). Izmjereni su baždarni dijagrami za novosintetizirane spojeve (slika 21), na način da su se u otopinu pufera (pH = 7,0, I = 0,05 mol dm^{-3}, V = 2 ml) dodavani alikvoti prethodno priređenih ishodišnih otopina novosintetiziranih spojeva **A-F** i **CIA**.

Emisija fluorescencije derivata pirena **A-F** bila je proporcionalna njihovoj koncentraciji do $c = 1\times10^{-6}$mol dm^{-3} (Prilozi) što ukazuje da ne dolazi do agregacije spojeva. Spektri pri $c = 2 \times 10^{-7}$ mol dm^{-3} (slika 21, D-slika 5) pokazuju razliku u fluorescenciji.



Slika 21. Usporedba fluorescencijskih spektara puferiranih otopina novosintetiziranih spojeva **A**-**F** (c_0 = 2 × 10^{-7} mol dm^{-3}; pH 7,0, I = 0,05 mol dm^{-3}) na različitim postavkama instrumenta (slit-ovi), zbog čega se samo sljedeći parovi **A**-**B**; **C**-**E** i **D**-**F** mogu međusobno uspoređivati.

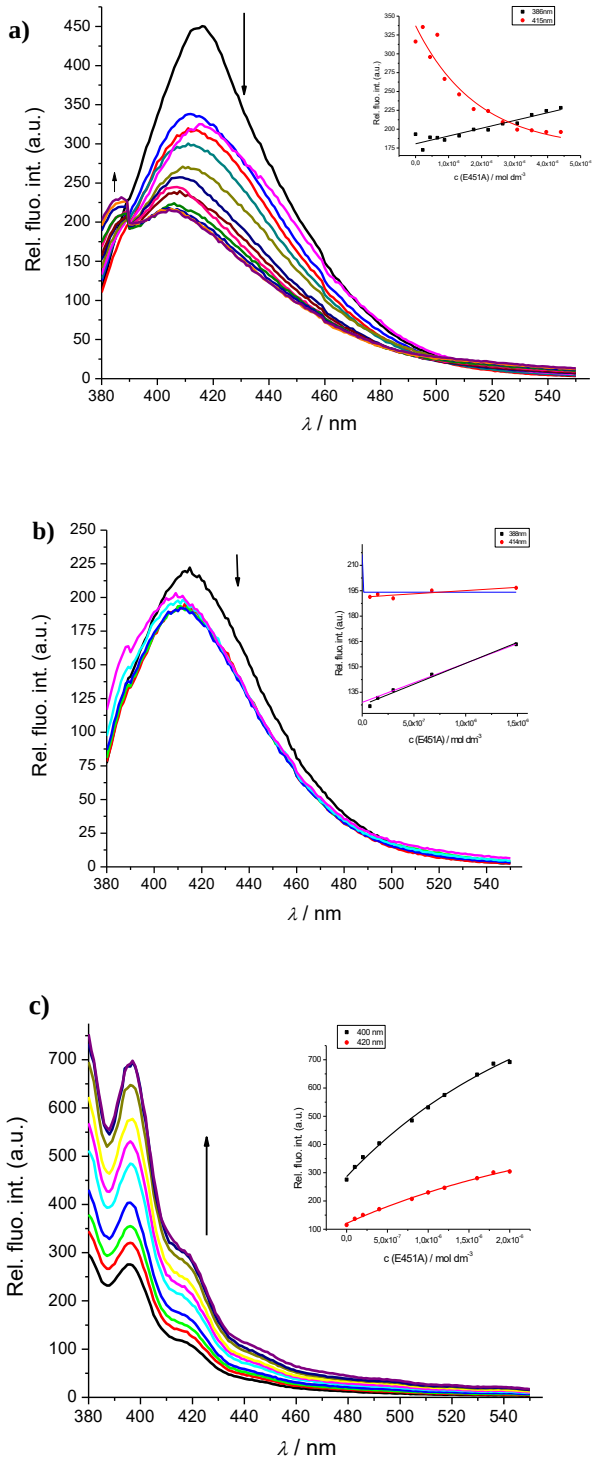
Novosintetizirani derivati **A** i **B** pokazuju emisiju tipičnu za derivate piren-1-karbonila, pri čemu je emisija **B** jako gašena u usporedbi s **A**. Fluorescencijski spektri spojeva **C**-**F** odgovaraju derivatima piren-1-alifata. Međutim, u **C**-**F** seriji postoje izrazite razlike u obliku emisijskog spektra, naime spojevi **D** i **F** pokazuju oštre vibronske vrpce na valnim duljinama od 378, 396 i 420 nm tipične za slobodni pokretni piren, dok su spektri njihovih analoga (**C** i **E**) dosta smanjeni i široki. Osim toga, kod spoja **E** emisija je gotovo u potpunosti izgubila vibronsku strukturu maksimuma pirena. Takve razlike u emisiji se slažu s naglašenim temperaturno induciranim promjenama u UV/Vis spektrima spojeva **B**, **C** i **E** (ali ne i kod spojeva **A**, **F** i **D**) i snažno podupiru pretpostavku da kod spojeva **B**, **C** i **E** dolazi do važne uloge pirena kod intramolekularnih interakcija slaganja aromatskih spojeva.[109,110] Ova razlika u emisijskim i UV/Vis spektralnim svojstvima možebitno je rezultat djelovanja lizinskog bočnog ogranka prisutnog u strukturi spojeva **A**, **C** i **E**, koji sterički i hidratacijom pozitivnog naboja ometa intramolekularno slaganje molekule. Analogni cijanin **CIA** nije bio fluorescentan u vodenim otopinama zbog dobro poznate ne-emisijske relaksacije uslijed rotacije oko metinske veze.[111]

4.1.2. Eksperimentalno istraživanje interakcija novosintetiziranih liganada s E451A u uvjetima sličnim biološkim sustavima

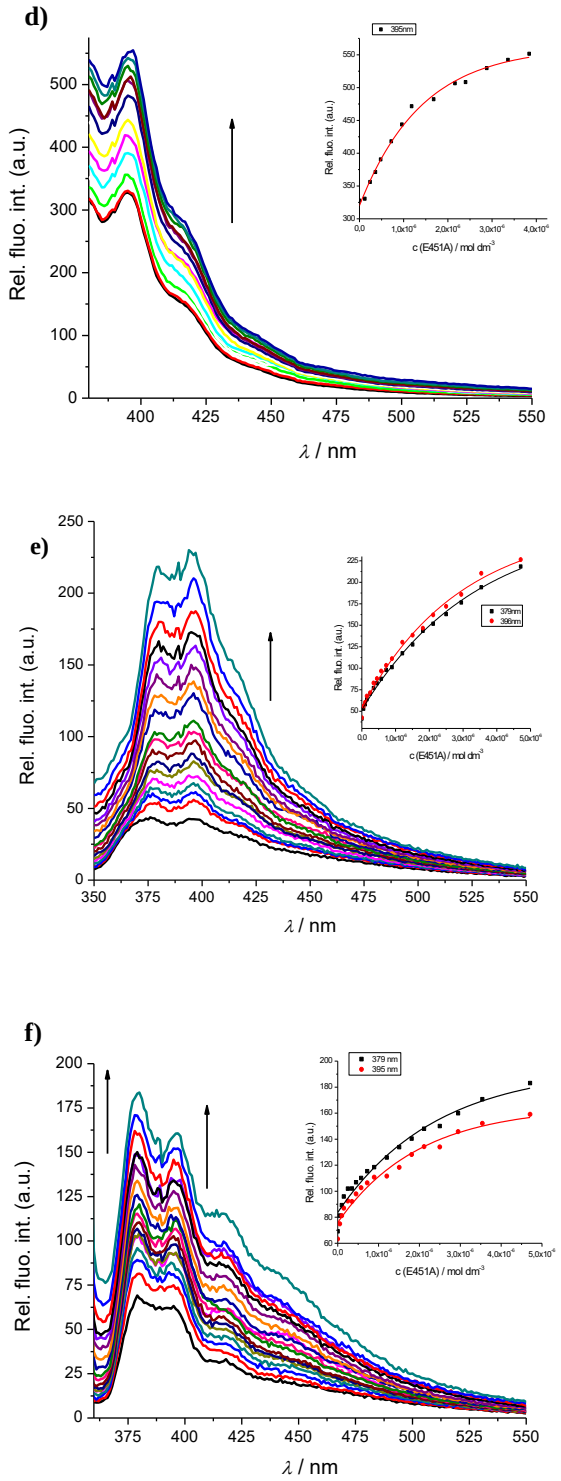
U svrhu istraživanja interakcija novosintetiziranih liganada s inaktivnim enzimom E451A provedena je fluorescencijska spektrofotometrijska titracija u kojoj su prethodno priređenim puferskim otopinama novosintetiziranih spojeva (**A-F**, **CIA**; c = 1 × 10^{-8} mol dm^{-3}; pri pH 7,4; I = 0,05 mol dm^{-3}) dodavani alikvoti ishodišne otopine E451A (c_0 = 1,8 × 10^{-4}mol dm^{-3}), pri čemu je inkubacijsko vrijeme prije snimanja spektara bilo 60 sekundi, a slit-ovi na instrument su bili 10 – 10, pri 25 °C (slika 22, tablica 5).

Zanimljiva je ovisnost intenziteta dobivenog nakon vezanja pirenskih derivata na E451A o strukturi spoja. Emisija spojeva koji su piren-1-karbonilni analozi, **A** i **B**, zaustavljena je njihovim vezanjem za E451A, pri čemu je analog lizina **A** dao znatno jači odziv/intenzitet. To je skladu s time da se kod spoja **A** radi o intramolekularno ne-presavijenoj, ispruženoj, konformaciji, dok intramolekularno gašenje emisije spoja **B** nije pružilo mogućnost značajnijeg daljnjeg gašenja nakon njegovog vezanja za E451A.

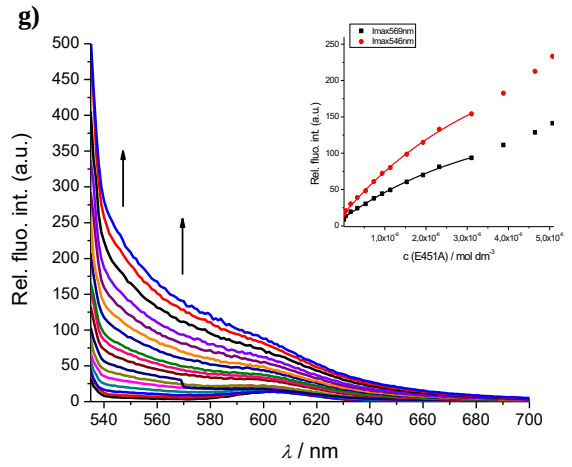
Kod piren-1-alifatskih derivata dodavanje E451A rezultiralo je povećanjem emisije, pri čemu je uočen znatno jači porast za neutralne analoge **D** i **F** u usporedbi s pozitivno nabijenim analozima lizina **C** i **E**. Budući da je kod spojeva **C** i **E** zbog intramolekularnog samoslaganja intrinzična emisija manja u odnosu na spojeve **D** i **F** (slika 19), njihovim intramolekularnim razmatanjem pri vezanju na E451A došlo je pojačane fluorescencijske emisije. Molekulskim modeliranjem pokazano je da je gvanidinijeva funkcijska skupina uronjena duboko u mjesto vezanja enzima, a vrlo dugačak linker omogućava da piren ostane daleko od bilo koje interakcije aromatskog slaganja te spoj na odgovarajućoj valnoj duljini ima jaču fluorescenciju.



Slika 22. Promjene fluorescencijskih spektara puferskih otopina novosintetiziranih spojeva: a) **A**; b) **B**; c) **C**; (c = 1 × 10^{-8} mol dm^{-3}; pH 7,4; I = 0,05 mol dm^{-3}) pri različitim koncentracijama dodanih alikvota ishodišne otopine inaktivnog E451A (c_0 = 1,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}; koncentracijski raspon od ≈ 1 × 10^{-7} mol dm^{-3}- 4,4 × 10^{-6} mol dm^{-3}) pri 25 °C.



Slika 23. Promjene fluorescencijskih spektara puferskih otopina novosintetiziranih spojeva: d) **D**; e) **E**; c) **F**; (c = 1 × 10^{-8} mol dm^{-3}; pH 7,4; I = 0,05 mol dm^{-3}) pri različitim koncentracijama dodanih alikvota ishodišne otopine inaktivnog E451A (c_0 = 1,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}; koncentracijski raspon od ≈ 1 × 10^{-7} mol dm^{-3}- 4,4 × 10^{-6} mol dm^{-3}) pri 25 °C.



Slika 24. Promjena fluorescencijskog spektra puferskih otopina novosintetiziranog spoja: g) **CIA**; (c = 1 × 10^{-8} mol dm^{-3}; pH 7,4; I = 0,05 mol dm^{-3}) pri različitim koncentracijama dodanih alikvota ishodišne otopine inaktivnog E451A (c_0 = 1,8 × 10^{-4} mol dm^{-3}; koncentracijski raspon od ≈ 1 × 10^{-7} mol dm^{-3}- 4,4 × 10^{-6} mol dm^{-3}) pri 25 °C.

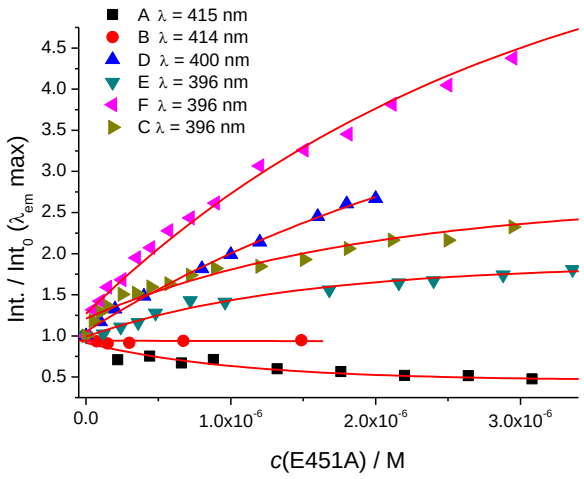
Cijaninski analog **CIA**, intrinzično nefluorescentan, reagirao je snažnom emisijom nakon vezanja na E451A (slika 25), jasno ukazujući da je slobodna rotacija cijaninskog kromofora oko metinske veze značajno zakočena.

Obradom podataka titracija nelinearnom regresijom za spoj / E451A stehiometriju 1 : 1 (slika 25) utvrđena je izvrsna korelacija (r = 0,999) i određene su vrijednosti konstanti vezanja za formirane komplekse (tablica 5). Gotovo svi proučavani spojevi pokazali su sličan mikromolarni afinitet prema hDPP III E451A mutantu, što ih definira kao učinkovite ligande u biorelevantnim uvjetima.

Tablica 5. Izračunate vrijednosti konstanti vezanja (log *K*) i promjene fluorescencije (Int/Int_0) metodom nelinearne regresije za stehiometrijski omjer spoj / E451A = 1:1 pri pH 7,4 u puferu natrijeva kakodilata, I = 0,05 mol dm^{-3}, c(**A-F**, **CIA**) = 1×10^{-8} mol dm^{-3}, pri 25 °C.

Spoj	log *K*	Int/Int_0
A	6,3	0,5
B	–	0,95
C	6,4	10
D	6,1	1,7
E	6,5	6,7
F	6,4	3,3
CIA	6,5	–

Zanimljivo je da kod spoja **CIA** afinitet prema hDPP III E451A mutantu bio je 30 puta jači u usporedbi s prethodno istraženim bliskim analogom,[112] što bi se moglo pripisati obrnutoj povezanosti alifatske premosnice na cijaninski kromofor (prethodni spoj bio je povezan preko kinolinskog dijela cijaninske boje).



Slika 25. Usporedba rezultata fluorimetrijske titracije novosintetiziranih spojeva **A-F** (c = 1×10^{-8} mol dm^{-3}, $\lambda_{exc} \approx 340$ nm) s E451A, u puferskoj otopini natrijeva kakodilata, pH 7,4, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C; vrijednosti su normalizirane prema polaznom intenzitetu Int_0 pri emisiji spoja $\lambda_{max} \in [396\text{-}420]$ nm.

4.1.3. Eksperimentalno istraživanje interakcija novosintetiziranih liganada s hDPP III (WT) u uvjetima sličnim biološkim sustavima

Budući da svi novosintetizirani spojevi posjeduju peptidne veze, oni mogu biti potencijalni supstrati hDPP III ili, u nedostatku cijepanja peptidnih veza, jaki inhibitori. Stoga je provedeno eksperimentalno istraživanje njihova utjecaja na hidrolizu komercijalno dostupnog sintetskog supstrata Arg_2-2NA s hDPP III.

4.1.3.1. Michaelis-Menten kinetika

Prilikom izvedbe eksperimenta u svrhu praćenja navedene reakcije hidrolize Arg_2-2NA, volumen reakcijske smjese je bio 3 mL, te je sadržavala 20 mM TrisHCl pufer pH vrijednosti 7,4, divlji tip DPP III proteina i supstrat je bio dodavan u rangu koncentracija od 0,5 do 80 μM.

Sve ishodišne otopine liganada bile su svježe pripravljene otapanjem spoja u odgovarajućem otapalu (poglavlje 4.1.1).

Budući da svi novosintetizirani spojevi posjeduju peptidne veze, oni mogu biti potencijalni supstrati hDPP III ili, u nedostatku cijepanja peptidnih veza, jaki inhibitori. Svi spojevi su bili stabilni u eksperimentalnim uvjetima, tako da se dalje fluorimetrijski pratila reakcija humanog DPP III sa sintetičkim, komercijalno dostupnim supstratom Arg_2-2NA, kroz detekciju oslobađanja/nastanka produkta hidrolize, 2-naftilamina (λ_{ex} = 332 nm i λ_{em} = 420 nm).[113,37]

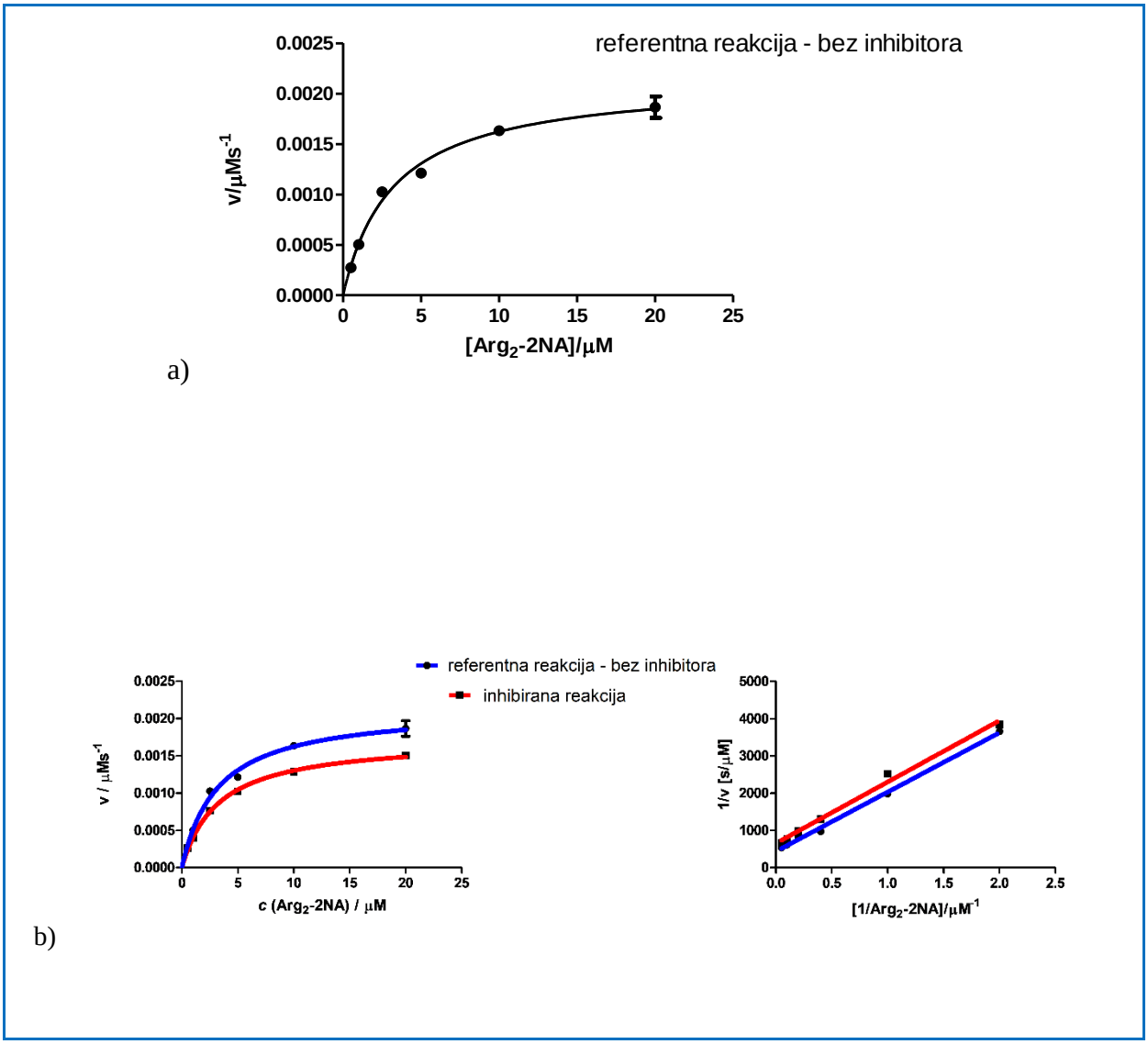
Mjerenja su provedena na 25 °C, u 20 mM TrisHCl puferu pH 7,4[113,37 37] i analizi kinetičkih parametara nelinearnom regresijskom analizom podataka korištenjem softvera GrapPad Prism 5.[114] Isti je program korišten za izračun konstante inhibicije, a tip inhibicije određen je pomoću linearizacije po Lineweaver-Burku.

Važno je istaknuti da se eksperimentalni uvjeti ove analize djelomično preklapaju s emisijom pirena (λ_{ex} = 342 nm i λ_{em} = 400-420 nm). Međutim, u kontrolnim eksperimentima

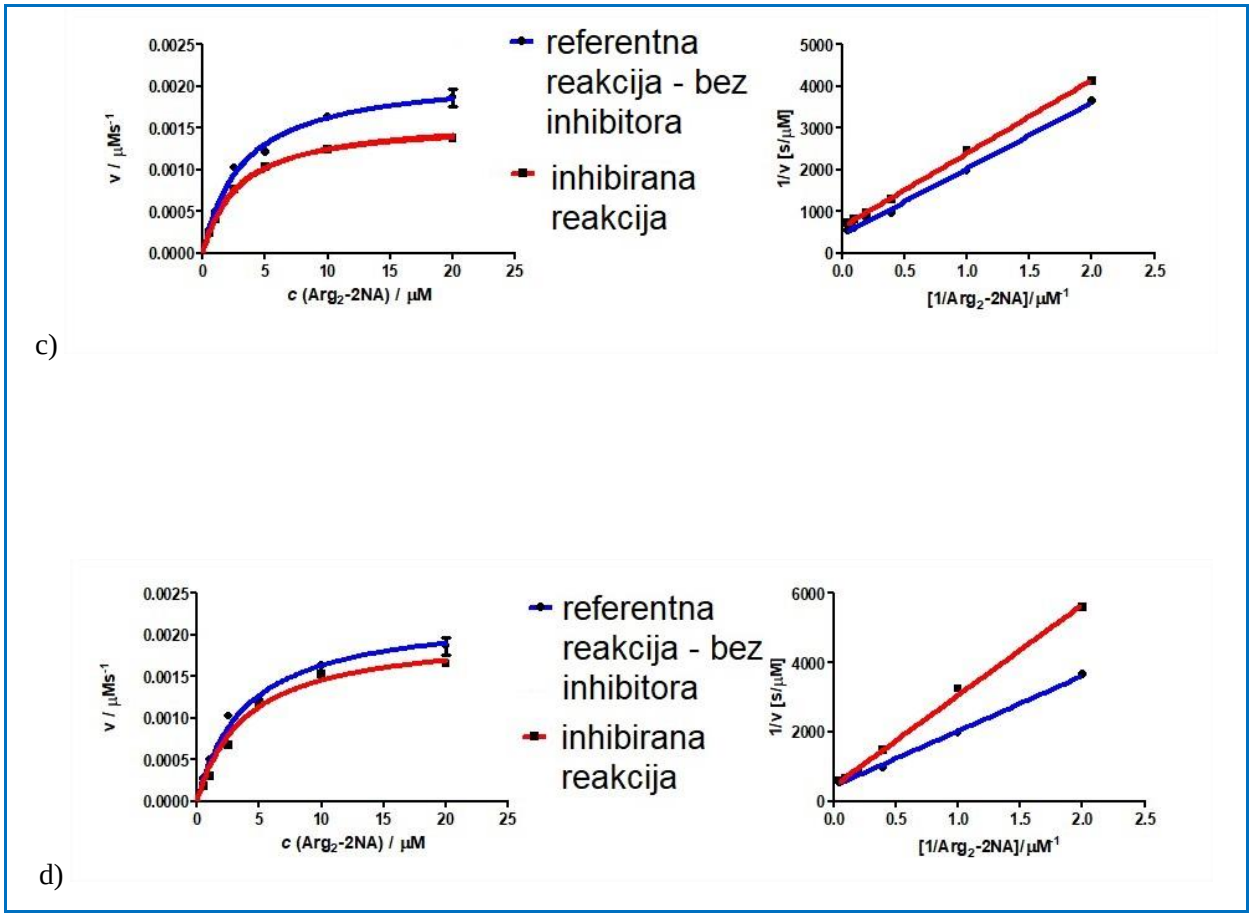
fluorescencija pirena spojeva **A**-**F** nije se promijenila, tako da se svaka promjena emisije tijekom enzimske reakcije sa supstratom (Arg_2-2NA) može isključivo pripisati proporcionalnom povećanju koncentracije produkta razgradnje Arg_2-2NA, 2-naftilamida.

Podatci svih mjerenja su u prilogu (D-tablica 2) s tim da su eksperimentalni problemi (taloženje, topivost) su dozvolili određivanje svih parametara samo za 3 spoja: **D**, **F** i **CIA** pokazali su značajan inhibitorski učinak na enzimsku reakciju (slika 28 i tablica 6).

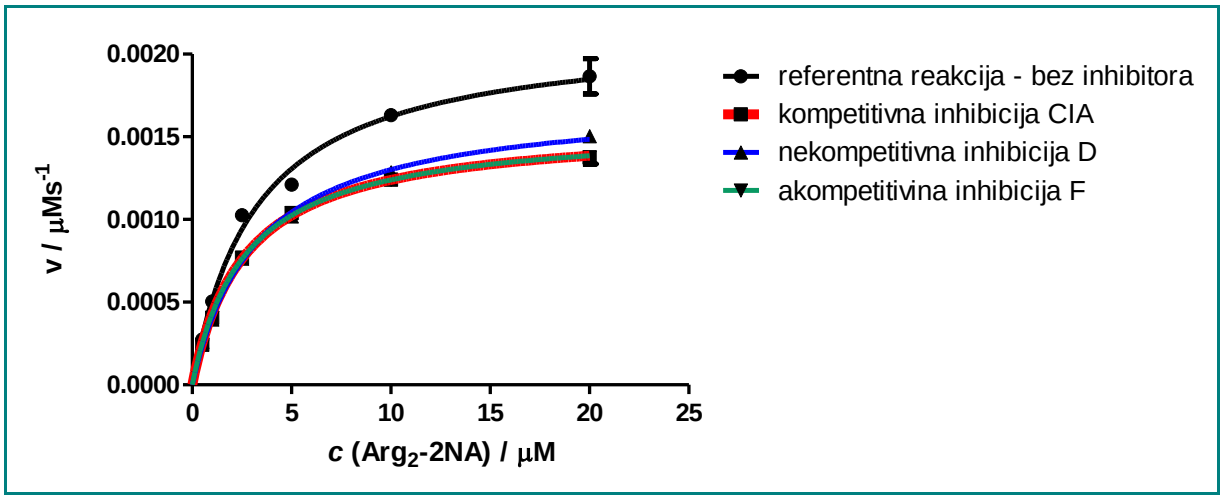
Na sljedećim grafovima (slika 26, 27, 28 i D-slika 6) koji su rezultat obrade izmjerenih podataka u programu GraphPad, plavom krivuljom je dano mjerenje bez spoja dakle u otopini je bio prisutan samo komercijalno dostupni marker Arg_2-2NA, dok je crvenom bojom prikazana krivulja koja se odnosi na mjerenja kod kojih je u praćenoj otopini bio prisutan određeni spoj čija je koncentracija bila jednaka onoj koja je dana u D-tablici 2.



Slika 26. Grafički prikaz rezultata dobivenih provedbom eksperimenata Michaelis-Menten kinetika na prethodno opisan način za odabrane novosintetizirane spojeve: a) **Arg2-2NA**; b) **D**; s hDPP III (WT) pri 25 °C; *lijevo*-Michaelis-Menten graf; *desno*-linearizacija dobivenih rezultata kroz Lineweaver-Burk linearizaciju.



Slika 27. Grafički prikaz rezultata dobivenih provedbom eksperimenata Michaelis-Menten kinetika na prethodno opisan način za odabrane novosintetizirane spojeve: c) **F**; d) **CIA**; s hDPP III (WT) pri 25 °C; *lijevo*-Michaelis-Menten graf; *desno*-linearizacija dobivenih rezultata kroz Lineweaver-Burk linearizaciju.



Slika 28. Michaelis Menten kinetički profil reakcije bez inhibitora za hDPP III (20 pM); s komercijalno dostupnim supstratom Arg_2-2NA (1 μM - 200 μM; crna linija) uz dodatak inhibitora **D** (0,1 μM; plava), **F** (0,1 μM; zelena) and **CIA** (0,1 μM; crvena) (0,2 μM), u 20 mM TrisHCl puferu pH 7,4.

Za spojeve **D**, **F** i **CIA** nađeno je da inhibiraju enzimsku reakciju hDPP III s Arg_2-2NA. Mjerenja su rađena s otopinama kod kojih je koncentracija navedenih liganada bila 0,1 μM. Zamijećeni su različiti tipovi inhibicije, pa tako spoj **D** pokazuje nekompetitivnu, spoj **F** akompetitivnu, a spoj **CIA** kompetitivnu inhibiciju. Navedeno se očituje u promjenama vrijednosti v_{max} odnosno K_m. Kod kompetitivne inhibicije v_{max} vrijednost se ne mijenja, no dolazi do porasata K_m vrijednosti što govori da je spoj **CIA** kompetitivni inhibitor i natječe se sa supstratom za vezanje u aktivno mjesto (D-tablica 2, slika 24 i 25). Iz vrijednosti K_m odnosno v_{max} se na analogan način utvrđuje da li se radi o nekompetitivnoj ili akompetitivnoj inhibiciji. Za spoj **F** je utvrđeno da se radi o akompetitivnoj inhibiciji gdje se dakle on veže na kompleks enzim-supstrat čime onemogućava daljnju reakciju, dok je kod spoja **D** utvrđena nekompetitivna inhibicija što ukazuje da se on veže ili u aktivno mjesto ili na kompleks enzim-supstrat čime onemogućava daljnji tijek reakcije (D-tablica 2, slika 24 i 25).[24,42]

Prema literaturi, što je manja vrijednost konstante inhibicije (K_i) to imamo bolji inhibitor, tako da se iz navedenog pokazuje da je najbolji inhibitor hDPP III spoj **CIA** (K_i = 228 ± 53 nM), a sljede **D** (K_i = 295 ± 35 nM) i **F** (K_i = 335 ± 32 nM).

Tablica 6. Eksperimentalno dobiveni kinetički paramteri za hidrolizu Arg_2-2NA s hDPP3 III (WT) u puferskoj otopini (Tris HCl, pH 7,4, I = 0,02 mol dm^{-3}) sa novosintetiziranim spojevima **D**, **F** and **CIA**.

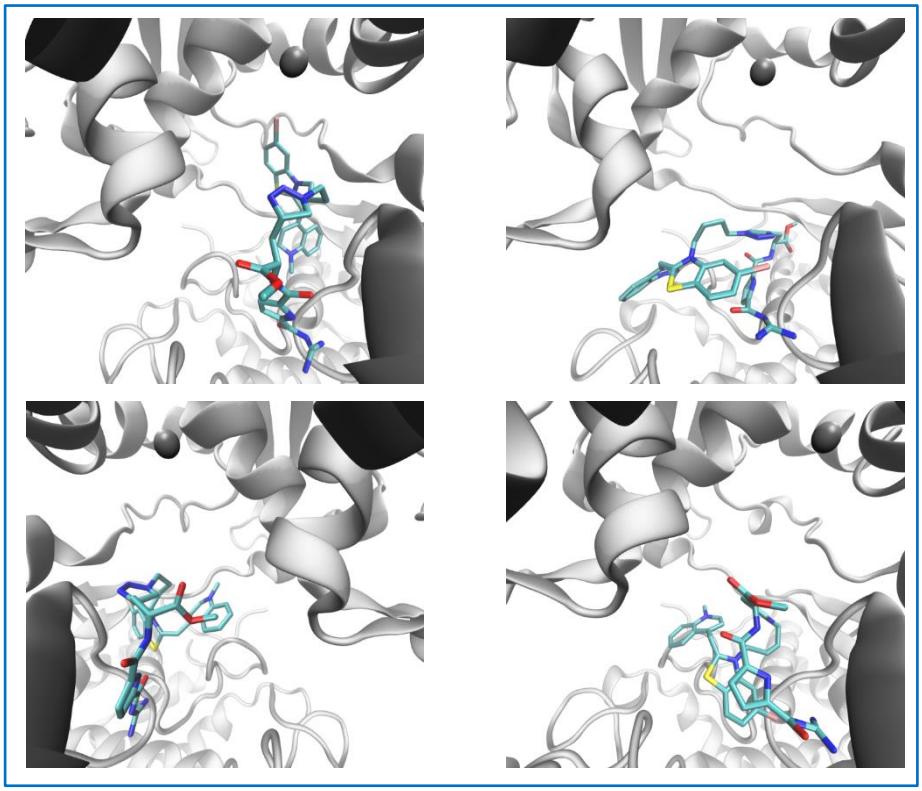
spoj	tip inhibicije	K_I/nM	K_m/μM	k_{cat}/s^{-1}
D	nekompetitivna	295 ± 35	3,3 ± 0,1	17,3 ± 0,2
F	akompetitivna	335 ± 32	2,7 ± 0,1	15,7 ± 0,2
CIA	kompetitivna	228 ± 53	5,2 ± 0,6	22,6 ± 0,1

Nadalje, analiza strukture i aktivnosti pokazala je da su svi ovdje prikazani spojevi djelotvorni inhibitori (**D**, **F** i **CIA**), što nije slučaj sa spojevima (**A**, **C** i **E**) koji imaju u svojoj strukturi karakterističan dugi pozitivno nabijen bočni lanac lizina, koji prema dobivenim rezultatima dovodi do slabljenja, odnosno potpunog nepostojanja inhibitorskog djelovanja spojeva **A**, **C** i **E**. Kod spoja **C** problematična je bila precipitacija nastalog kompleksa, te dobiveni podatci nisu pouzdani iako se može primijetiti određeni inhibitorski učinak (D-slika 6, c).[115] Zanimljivo je da analog s nabijenom poveznicom **B** nije inhibirao enzimsku reakciju, dok je njegov izduženi i fleksibilniji analog s neutralnom poveznicom, **D** djelovao kao vrlo učinkovit inhibitor.

4.2. Rezultati računalnih istraživanja kompleksa GPC konjugata s hDPP III (WT i neaktivnim E451A mutantom)

Kao pomoć u razumijevanju utjecaja spojeva **F** i **CIA** na katalitičku efikasnost hDPP III pri hidrolizi Arg_2-2NA, njihovi kompleksi s divljim tipom enzima su modelirani i simulirani u vodenoj otopini. Nadalje, kompleksi neaktivnog mutanta hDPP III, E451A, sa spojevima **A**, **D**, **E**, **F** i **CIA**, proučavani su računalno kako bi dobili uvid u njihove međusobne (intermolekularne) interakcije i racionalizirali njihove vezne afinitete (D-tablica 3).

Uklapanje liganda provedeno je pomoću programa AutoDock[11] (kako je detaljnije opisano u poglavlju 3.3.1), te su na temelju predviđenih afiniteta dobivenih kompleksa i saznanja o načinu vezanja prirodnih supstrata za svaki spoj koji sadrži pirenski sustav odabrane za daljnje razmatranje dvije do tri početne strukture, dok su za spoj **CIA** odabrane četiri strukture za potrebe daljnjih simulacija molekulske dinamike. Ovisno o obliku i načinu smještanja svakog pojedinog spoja u među-domensku udubinu, uvedena je oznaka mod (M), pa su tako za komplekse pirenskih analoga s E451A razmatrana po dva do tri različita moda (M1-M3), dok za komplekse spoja CIA s divljim tipom hDPP III imamo četiri različita moda (M1-M4), a za komplekse s E451A mutantom tri (M1-M3). Razmatrana četiri različita načina vezanja novosintetiziranog spoja **CIA** za hDPP III, M1-M4 prikazana su na slici 29.

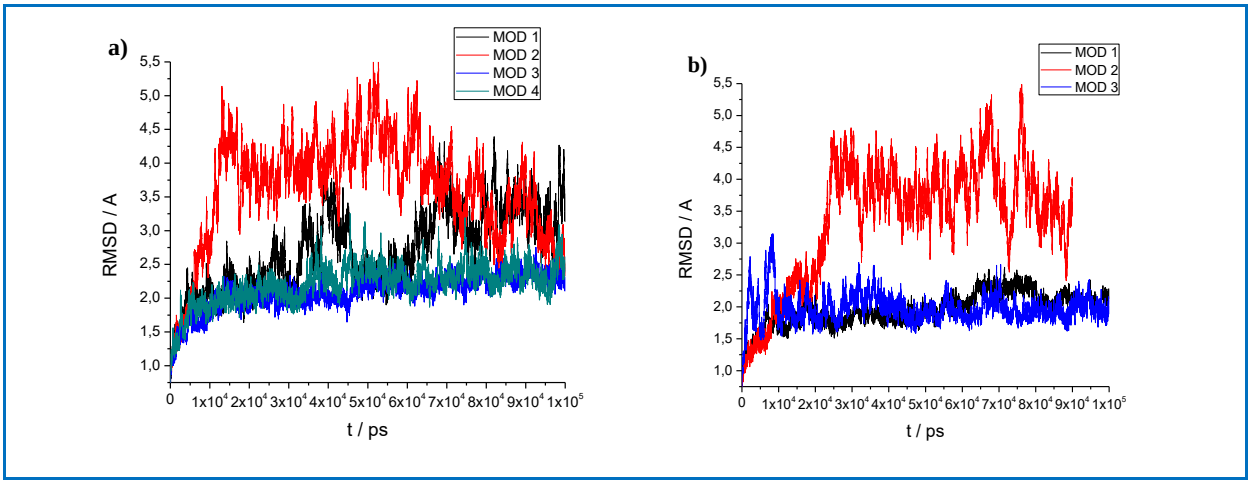


Slika 29. Kompleksi hDPP III-**CIA** odabrani za MD simulacije u vodi (načini vezanja niske energije **CIA**, M1-M4, određeni programom AUTODOCK4.2.6).

Vezanje liganda u enzim divljeg tipa i E451A mutant ne razlikuje se značajno (D-slika 7). Prema rezultatima analize 100 ns MD simulacija provedenih za svaki pojedini kompleks, najveće odstupanje struktura i proteina i liganda, od početnih kako kod kompleksa divljeg tipa

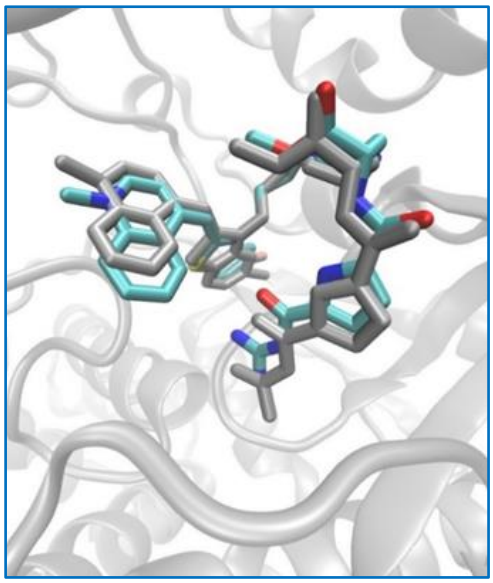
enzima tako i kod E451 mutanta sa spojem **CIA**, uočeno je u modu vezanja 2 (M2) (slika 30 i D-slika 8), dok su oni s **CIA** vezanom u modu 3 (M3) bili najstabilniji, (slike 30, D-slike 8 i 9).

Navedeno je u skladu s njihovim relativnim MMPBSA energijama (D-tablica 3) koje su za **CIA** vezan u prva dva moda više nego za kompleks s **CIA** vezan u modu 3. Pri tome treba napomenuti da u slučaju izrazito fleksibilnog proteina kakav je DPP III, MMPBSA izračunate vrijednosti energija možemo koristit tek kao vrlo grubi pokazatelj stabilnosti sustava i ne treba se razmatrati odvojeno od grafova RMSD vrijednosti dobivenih za protein i ligand. U svim slučajevima ligand se veže blizu β ploče donje domene i ostaje blizu svog početnog položaja tijekom 100 ns MD simulacija.



Slika 30. Izračunata RMSD vrijednost za atome glavnog lanca/okosnice (engl. *backbone*) proteina (C, CA, N) tijekom MD simulacija: a) hDPP III-**CIA** (M1-M4) kompleksa; b) E451A-**CIA** (Ml-M3) kompleksa.

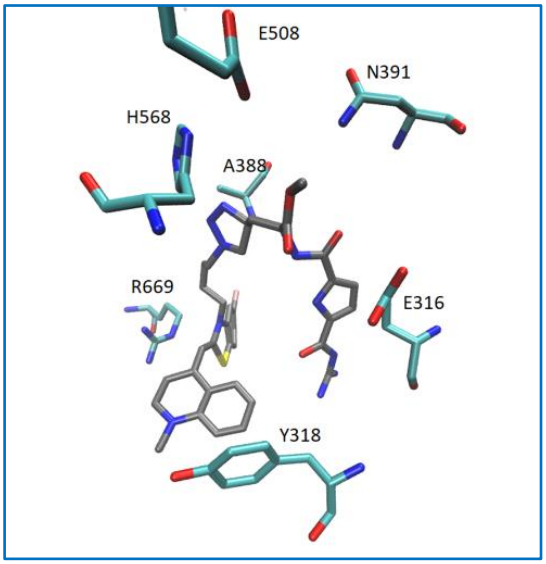
Novosintetizirani spoj **CIA** u modu vezanja M3 samo je neznatno promijenio orijentaciju cijanina, dok je konformacija liganda u drugim načinima vezanja izmijenjena u nešto većoj mjeri tijekom simulacija. Kako bismo detaljnije ispitali stabilnost E451A-**CIA**-M3 kompleksa, produljeno je vrijeme MD simulacija za još 100 ns. Struktura dobivena nakon 200 ns MD simulacija nalikuje strukturama nakon prvih 100 ns, tj. može se zaključiti da je kompleks E451A-**CIA**-M3 stabilan (slika 31).



Slika 31. Usporedba E451A-**CIA**-M3 kompleksa nakon 100 ns (sivo) i 200 ns (cian) MD simulacija.

S gvanidiniokarbonilpirolskim (GCP) dijelom **CIA** stupa u interakciju s aminokiselinskim ograncima za koje je utvrđeno da stabiliziraju supstrat (Glu316, Tyr318, Ala388, Asn391), dok s COOMe skupinom stupa u interakciju s His568 i Glu508, aminokiselinskim ograncima koji aktivno sudjeluju u hDPP III kataliziranoj hidrolizi peptidne veze.[30]

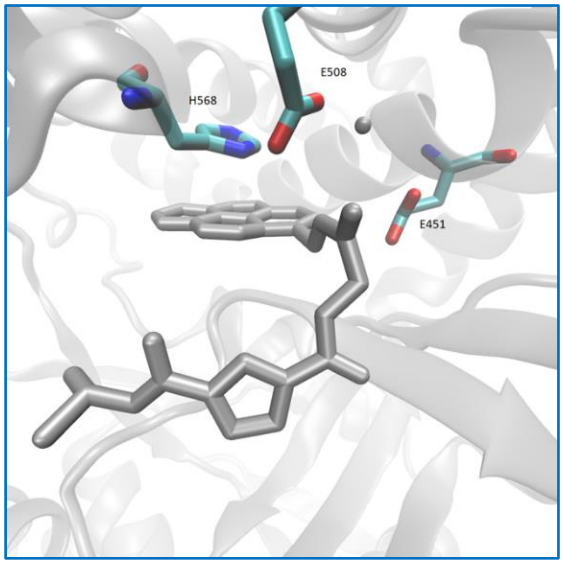
Osim toga, ona također elektrostatski interagira s Glu451 tijekom MD simulacija kompleksa s enzimom divljeg tipa (slika 32). Očigledno, svojim vezanjem na hDPP III **CIA** ometa pravilan smještaj Arg_2-2NA supstrata u aktivno mjesto enzima hDPP III, a time i kemijsku reakciju.



Slika 32. Interakcije **CIA**-M3 s aminokiselinskim ostatcima u aktivnom mjestu hDPP III. Struktura dobivena nakon 200 ns MD simulacija E451A-**CIA**-M3 kompleksa (prikazani su aminokiselinski ostatci smješeni na udaljenosti manjoj od 4Å od CIA).

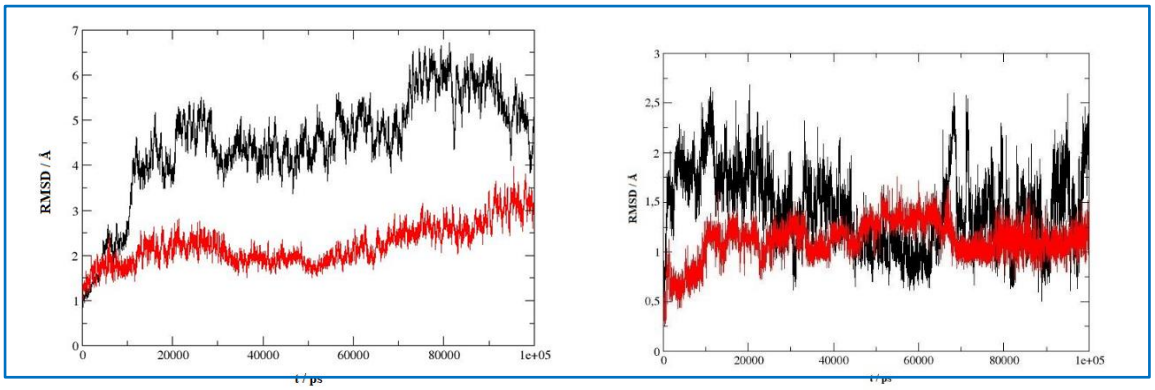
Spoj **F** je simuliran u tri različite orijentacije unutar veznog mjesta supstrata hDPP III. Modeli vezanja M1 i M2 inducirali su značajne promjene u kompaktnosti proteina, što je rezultiralo s RMSD vrijednošću većom od 3 Å (D-slika 10), dok je RMSD za protein u kompleksu s **F**-M3 bio uglavnom ispod 2 Å.

Budući da su konformacija i položaj liganda u ovom načinu vezanja očuvane tijekom MD simulacija, pretpostavka je da je to poželjan način vezanja **F**. Slično kao kod **CIA** spoja, spoj **F** je također ostvario jake elektrostatske interakcije s Glu451 i His568 tijekom MD simulacija s enzimom divljeg tipa (slika 30) i takvo vezanje je u skladu s njegovim inhibicijskim djelovanjem. Za razliku od njegovog položaja u enzimu divljeg tipa, u neaktivnom mutantu E451A spoj **F** je ostao blizu donje domene tijekom MD simulacija (D-slika 11).

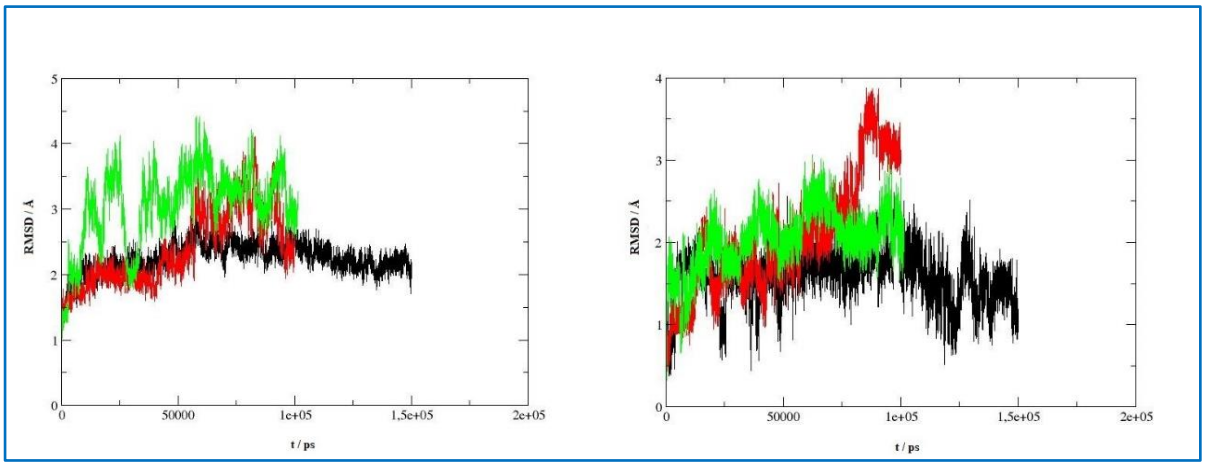


Slika 33. Aminokiseline iz aktivnog mjesta hDPP III koje sudjeluju u interakciji s **F**-M3 (sivi štapićasti prikaz) prikazani su u boji. Struktura je dobivena nakon 100 ns MD simulacija kompleksa hDPP III-**F**-M3.

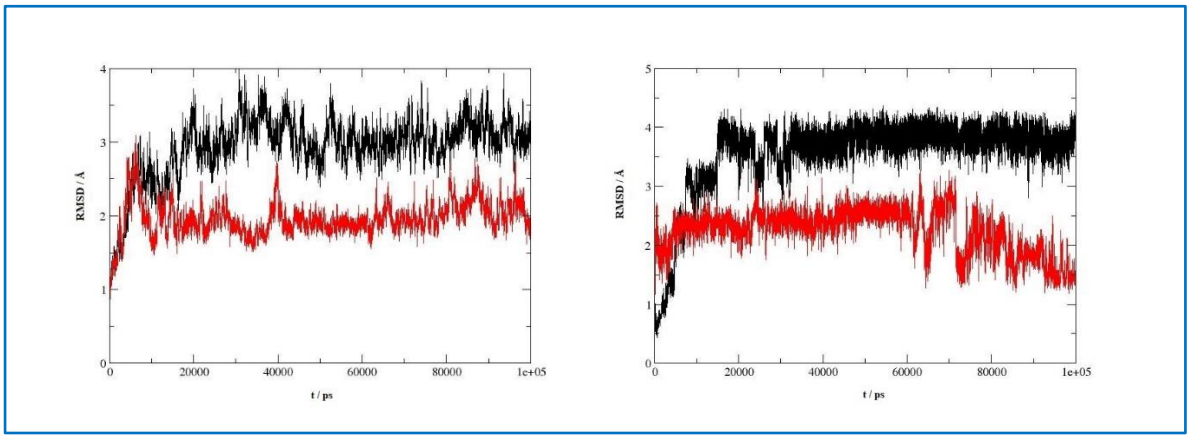
Spojevi **A**, **D** i **E** su simulirani u kompleksu s mutiranim enzimom E451A, gdje su za spojeve **A** i **E** prikazani rezultati dobiveni za dva različita načina vezanja, a za spoj **D** tri (D-tablica 3 i slike 34-36). Usporedba najstabilnijih načina vezanja ovih spojeva pokazala je da su slične stabilnosti i ne induciraju velike konformacijske promjene proteina. Gvanidiniska skupina stvara jaku vodikovu vezu s elektrostatski negativnim donjim domenskim dijelom koji sadrži Glu329 Glu327 i Glu316 (D-tablice 4 i 5) tijekom MD simulacija.



Slika 34. Izračunata RMSD vrijednost tijekom 100 ns MD simulacija kompleksa E451A-**A** (M1-crno i M2- crveno): *lijevo*-za atome okosnice proteina (C, CA, N) i *desno*-za atome liganda (svi osim vodika).

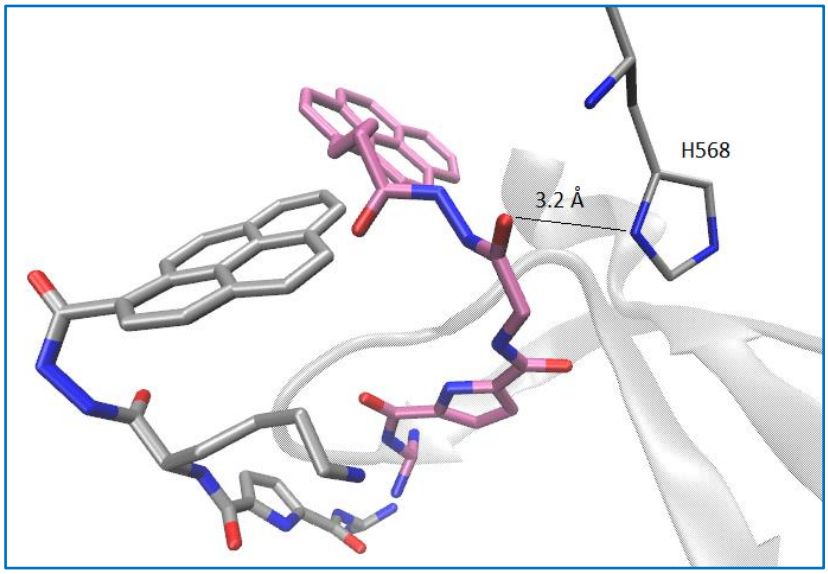


Slika 35. Izračunata RMSD vrijednost tijekom 100 i 150 ns MD simulacija kompleksa E451A-**D** (M1-crni, M2-crveni i M3-zeleni): *lijevo*-za atome okosnice proteina (C, CA, N) i *desno*-za atome liganda (svi osim vodika).

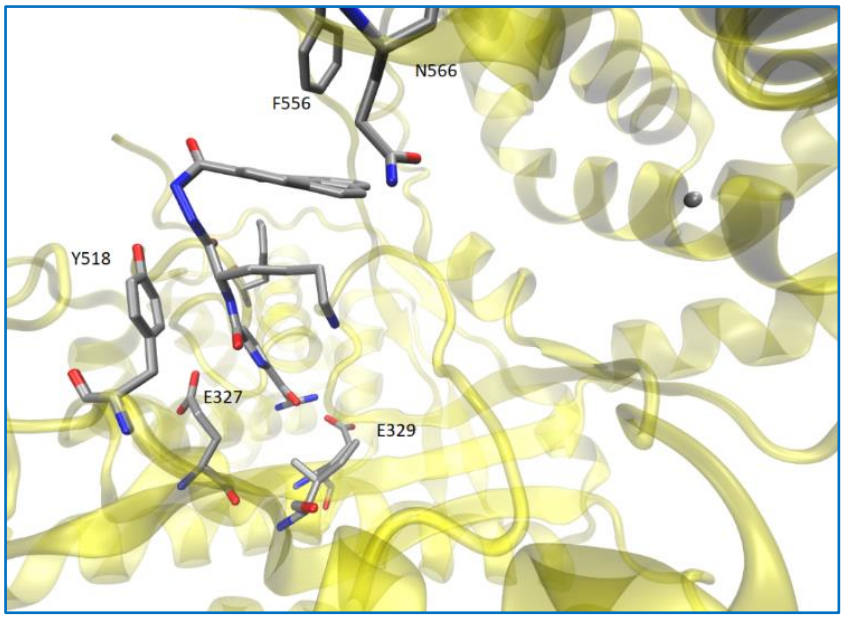


Slika 36. Izračunata RMSD vrijednost tijekom 100 ns MD simulacija kompleksa E451A-**E** (M1-crni i M2-crveni): *lijevo*-za atome okosnice proteina (C, CA, N) i *desno*-za atome liganda (svi osim vodika).

Međutim, dok se spojevi **D** i **E** vežu bliže gornjem dijelu β-ploče donje domene i interagiraju s His568 i ostalim ograncima aminokiselina u aktivnom mjestu (slika 37), **A** je "čvrsto" smješten blizu ulaza u međudomenski rascjep i stupa u interakciju s udaljenim dijelom donje domene (slika 38). Dakle, dobiveni računalni rezultati sugeriraju da se spoj **A** veže za hDPP III sa sličnim afinitetom kao i drugi spojevi, no za razliku od njih ne ometa hidrolizu Arg_2-2NA.



Slika 37. Usporedba spojeva **A** (sivo) i **D** (ružičasto) u njihovim najpovoljnijim načinima vezanja nakon 100 ns MD simulacija njihovih kompleksa s E451A; donja β-ploča je prikazana u prozirnoj vrpčastoj reprezentaciji.



Slika 38. Interakcije **A**-M2 s proteinom; struktura dobivena nakon 100 ns MD simulacija E451A-**A**-M2 kompleksa.

4.3. Diskusija o interakcijama novosintetiziranih spojeva s E451A i hDPP III na temelju eksperimentalno i računalno dobivenih rezultata

U ovom istraživanju korišteno je sedam novosintetiziranih spojeva-novih gvanidiniokarbonilpirol (GCP)-fluorofora za koje je bilo potrebno detaljno utvrditi kako pojedini strukturni elementi (vrsta, duljina i krutost, te tip poveznice, fluorofora) utječu na njihov fluorimetrijski odgovor, enzimsku reakciju i afinitet prema hDPP III.

Fluorimetrijska emisija derivata pirena bila je sama po sebi vrlo osjetljiva na strukturu spoja, neutralni glicinski derivati **B**, **D**, **F** pokazali su jako gašenje/smanjenje emisije uslijed intramolekulskog smatanja, za razliku od njihovih pozitivno nabijenih lizinskih analoga **A**, **C** i **E** čija konformacija u vodi nije savijena u smislu da dolazi do „*stacking*“ interakcija konjugiranih prstenova. Slijedom toga, fluorimetrijski odziv raznih pirenskih derivata na vezanje za hDPP III jako varira: od povećanja emisije (mnogo jače za lizinske analoge **C**, **E**) do smanjenja emisije (samo piren-1-karbonil, opet jače za lizinski analog **A**). Cijaninski konjugat **CIA** pokazao je snažnu emisiju samo nakon vezanja za hDPP III. Zanimljivo, afinitet vezanja svih ispitivanih spojeva bio je unutar istog reda veličine ($\log K_s \approx 6$).

Utjecaj novih spojeva na enzimsku aktivnost humane DPP III bio je izravno povezan s pozitivno nabijenim ogrankom lizina, koji je blokirao inhibitorno djelovanje odgovarajućih analoga (**A**, **C** i **E**).

Simulacije molekulske dinamike u kombinaciji s MMPBSA izračunima i analizom intermolekularnih interakcija pokazale su da kompleksi neaktivnog hDPP III mutanta E451A s **A**, **D**, **E**, **F** i **CIA** imaju sličnu stabilnost u vodenoj otopini što je u skladu s njihovim eksperimentalno dobivenim konstantama vezanja koje su također međusobno slične. Detaljnija studija provedena za najučinkovitiji inhibitor hDPP III, **CIA** ukazala je na veću stabilnost kompleksa između divljeg tipa enzima i **CIA** (M3) od stabilnosti njegovog kompleksa s mutiranim enzimom E451A. Takav rezultat posljedica je interakcija **CIA** s aminokiselinskim ostatcima Glu451 i His568 enzima divljeg tipa, koji aktivno sudjeluju u enzimskoj reakciji. Na taj način vezanje **CIA** ometa i vezanje supstrata (Arg_2-2NA) i enzimsku reakciju. Spoj **F** pokazao je slične interakcije i djelovanje kao **CIA**, no interakcija spoja **F** s Glu451 tijekom MD

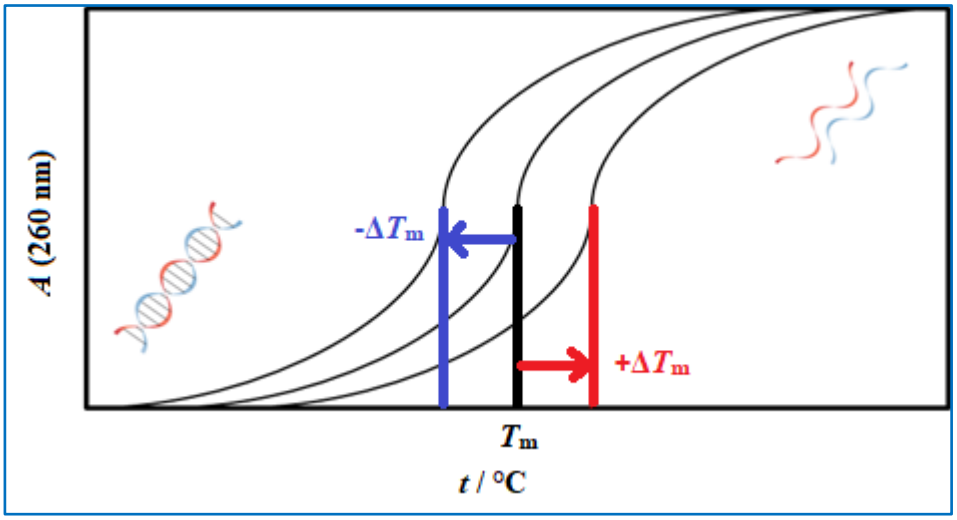
simulacije nešto je slabija od interakcije spoja **CIA**, što u konačnici vjerojatno ukazuje da on ima nešto slabiji inhibicijski učinak.

4.4. Eksperimentalno istraživanje interakcija novosintetiziranih spojeva s ctDNA i pApU u biološkim uvjetima

U ovom potpoglavlju dan je prikaz rezultata provedenih eksperimentalnih studija novosintetiziranih spojeva **A-F** i utvrđivanje njihovih interakcija s ctDNA odnosno pApU.[116] Spojevi i njihove interakcije s ctDNA i pApU proučavani su UV/Vis, fluorescencijskom i CD spektroskopijom.

Eksperimentom temperaturnog mekšanja određuje se stabilnost dvolančane strukture ctDNA odnosno pApU pomoću UV/Vis spektrofotometra mjerenjem apsorbancije na 260 nm kao funkcije temperature. Dvostruka denaturacija dovodi do povećanja apsorbancije za 15-20 % i prinosa denaturacije prikazanog u krivulji sigmoidalnog oblika. Maksimum prve derivacije signala apsorbancije (*dAbs / dT*) odgovara temperaturi mekšanja, T_m vrijednosti koja je definirana kao temperatura pri kojoj je polovica polinukleotida smotana u dvolančanu uzvojnicu (engl. *folded*), a druga polovica denaturirana u dva jednolančana slijeda.[117]

T_m vrijednost jako ovisi o sastavu parova baza polinukleotida, te je tako u literaturi navedeno da za miješani polinukleotidni slijed T_m vrijednost iznosi oko 70 °C, a za npr. poli dGdC prelazi 90 °C. Prisutnost ispitivanog spoja može utjecati na T_m vrijednost na način da se ista poveća ili smanji. U slučaju kada prisutnost ispitivanog spoja doprinosi povećanju ΔT_m vrijednosti to ukazuje da se radi o preferencijalnom vezanju spoja na presavijeni oblik u usporedbi s neotvorenim oblikom, te stoga podrazumijeva dodatnu stabilizaciju dvostruke spirale DNA, odnosno RNA, dok negativna ΔT_m vrijednost ukazuje na destabilizaciju dvostruke spirale (slika 39).[117]



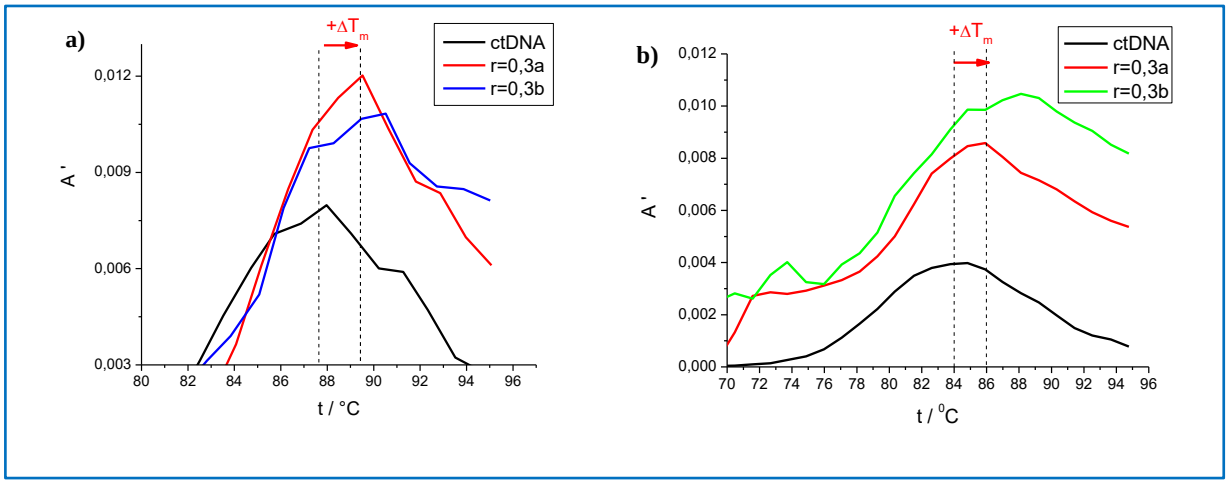
Slika 39. Shematski prikaz krivulje temperaturne denaturacije dvolančanog polinukleotida i njegove odgovarajuće T_m vrijednosti (crno) u prisutnosti stabilizirajućeg (pozitivan ΔT_m pomak, crveno) i destabilizirajućeg spoja (negativan ΔT_m pomak, plavo). Izvor: Prilagođeno prema T. Šmidlehner, doktorska disertacija, Multifunctional Molecular Recognition of DNA/RNA Secondary Structure By Molecular Senzors, University of Rijeka, Department of Biotechnology, 2018.

Upotrebom prethodno priređenih ishodišnih otopina dvolančanih polinukleotida, ctDNA (c_0 = 5,26 × 10^{-3} mol dm^{-3}) odnosno poly A-poly U (c_0 = 4,5 × 10^{-3} mol dm^{-3}) priređene su otopine u kvarcnim kivetama u kojima je koncentracija polinukleotida bila c(ctDNA) = 2 × 10^{-5} mol dm^{-3}, odnosno c(pApU) = 2,5 × 10^{-5} mol dm^{-3}. Upotrebom UV/Vis spektrofotometrije provjerena je točna koncentracija dvolančanih polinukleotida u kvarcnim kivetama te su izračunati potrebni dodatci (ΔV / µl) svježe pripremljenih otopina novosintetiziranih spojeva **A-F** kako bi se postigao željeni stehiometrijski omjer ($r_{[spoj]/[polinukleotid]}$ = 0,3). Sva mjerenja za svaku kombinaciju novosintetizirani spoj-dvolančani polinukleotid su napravljena u duplikatu.

Rezultati dobiveni kroz provedene eksperimente temperaturnog mekšanja ctDNA i pApU (tablica 7, D-slika 13 i D-slika 14) ukazuju kako većina novosintetiziranih spojeva nema utjecaj na temperaturnu stabilnost dvolančanih polinukleotida. Jedine iznimke su spojevi **A** i **E** koji doprinose slaboj stabilizaciji ctDNA (slika 40), odnosno spoj **B** koji doprinosi slaboj destabilizaciji pApU (slika 41). Kod mjerenja s novosinteiziranim spojem **E** i pApU došlo je do taloženja koje je omelo mjerenja uslijed čega nije bilo moguće odrediti ΔT_m vrijednost.

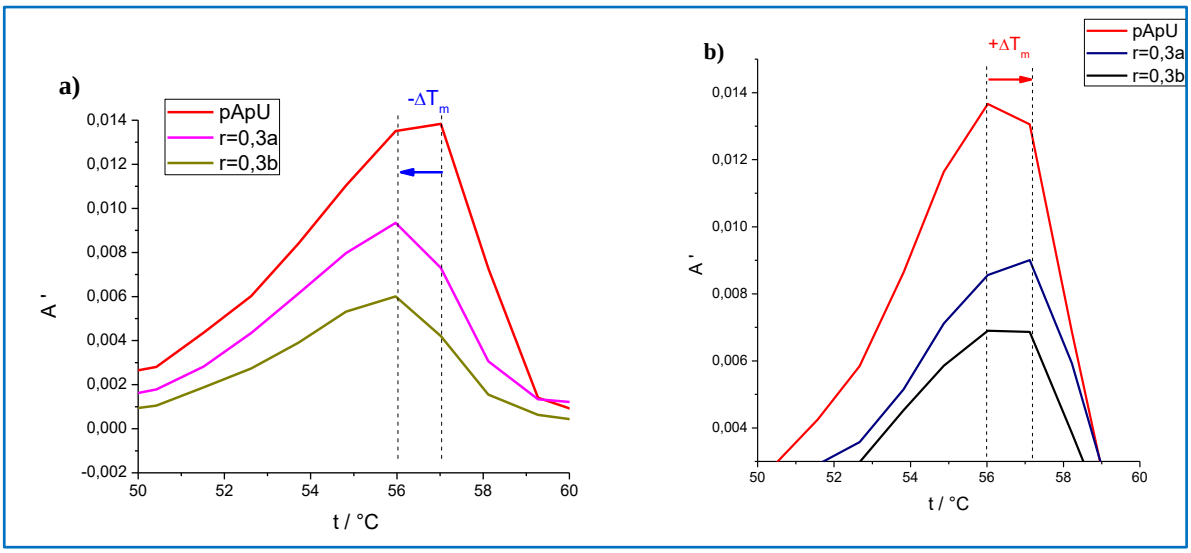
Tablica 7. Određene vrijednosti ΔT_m / °C (± 0,5 °C) ispitivanih dl-polinukleotida nakon dodatka novosintetiziranog spoja u stehiometrijskom omjeru prema dvolančanom polinukleotidu 3 : 10 (r = 0,3) pri pH 7,4 (natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05 mol dm^{-3}).

	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**
	ΔT_m / °C ± 0,5 °C					
ctDNA	+ 2	0	0	0	+ 2	0
pApU	0	− 1	0	+ 1	−	0



Slika 40. Prikaz krivulje temperaturne denaturacije ctDNA (c = 2 × 10^{-5} mol dm^{-3}) u prisutnosti stabilizirajućeg (pozitivan ΔT_m pomak, crveno) spoja (r = 0,3): a) **A**; b) **E**; pri pH 7,4, I = 0,05 mol dm^{-3}.

r = [spoj] / [ctDNA]



Slika 41. Prikaz krivulje temperaturne denaturacije pApU (c = 2,5 × 10^{-5} mol dm^{-3}) u prisutnosti: a) destabilizirajućeg spoja **B** (negativan ΔT_m pomak, plavo); b) stabilizirajućeg spoja **D** (pozitivan ΔT_m pomak, crveno); r = 0,3, pri pH 7,4, I = 0,05 mol dm^{-3}.

r = [spoj] / [pApU]

U svrhu istraživanja interakcija novosintetiziranih liganada s dvolančanim polinukleotidima provedene su fluorimetrijske titracije spojeva **A-F** (c = 2 × 10^{-7}mol dm^{-3}; pri pH 7,4; I = 0,05 mol dm^{-3}) dodavanjem alikvota ishodišne otopine ctDNA odnosno pApU, pri čemu je inkubacijsko vrijeme prije snimanja spektara bilo 10 sekundi, λ_{exc} 342 nm, a slit-ovi na instrumentu su bili 10 – 10, pri 25 °C.

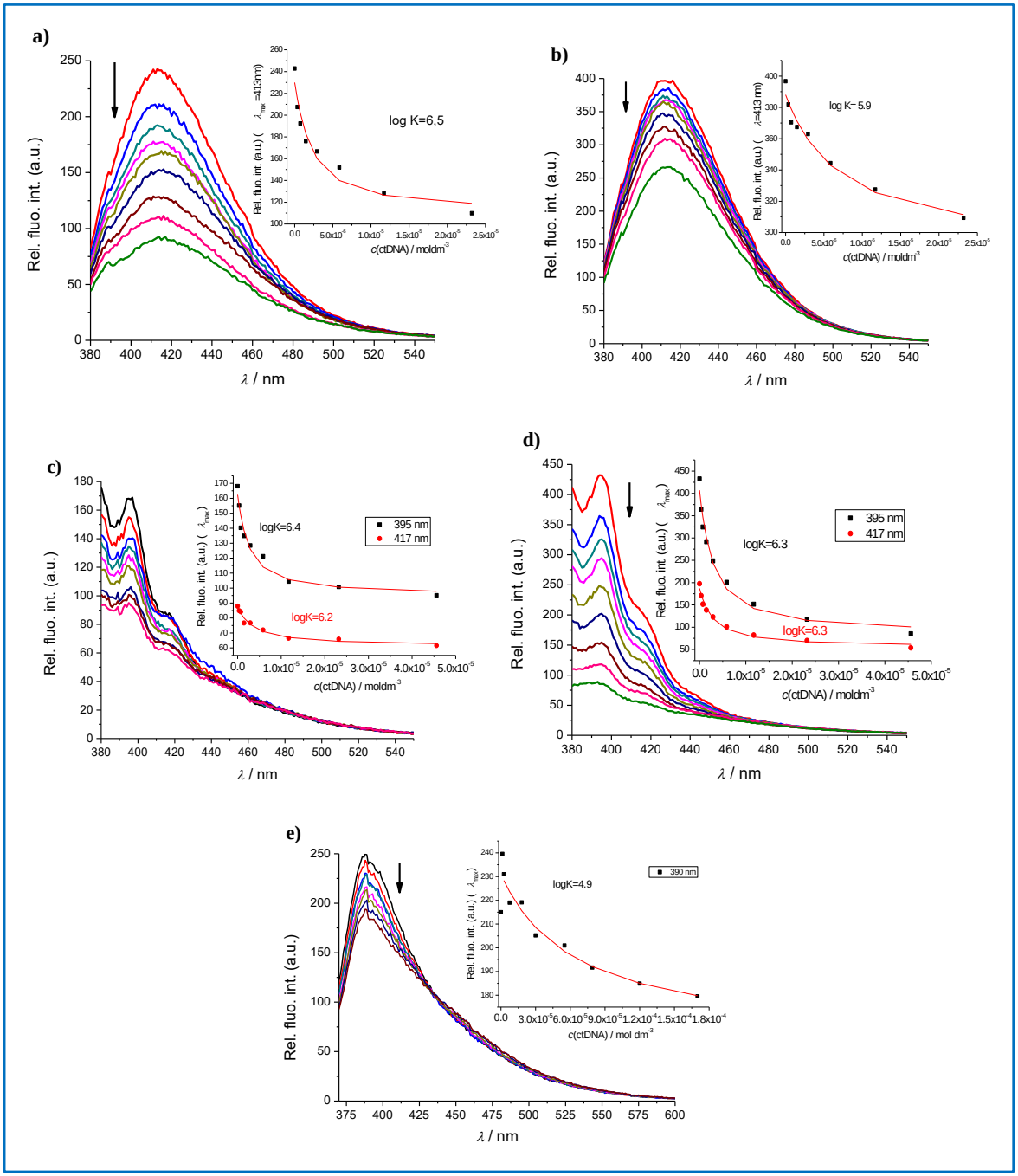
Fluorimetrijske titracije novosintetiziranih spojeva **A-F** s ctDNA (slika 43 i 45), odnosno pApU (slika 44 i 46) su u većini slučajeva rezultirale s gašenjem emisije pirenskog fluorofora. Jedine iznimke su bile titracije spojeva **E** s ctDNA i spoja **F** s pApU, gdje je promjena emisije bila zanemariva (D-slika 14). Obradom rezultata titracija pomoću Scatchardove jednadžbe dobivene su konstante stabilnosti nastalih kompleksa i omjeri vezanja n [vezani spoj]/[polinukleotid]. Zbog lakše usporedbe svih dobivenih vrijednosti log K_s vrijednosti su preračunate za fiksnu vrijednost omjera n = 0,1 za sve kombinacije s ctDNA i pApU. Korelacijski koeficijenti su bili > 0,99 za sve izračunate vrijednosti K_s. Afiniteti spojeva prema ctDNA i pApU su slični (logK_s ≈ 6), kao i promjene intenziteta emisije (tablica 8).

Tablica 8. Izračunate vrijednosti konstanti vezanja (log K_s)[a] i omjera intenziteta I/I_0 za fiksni omjer ***n***[a] ([spoj] / [polinukleotid]) na temelju promjene fluorescencije tijekom titracija otopina novosintetiziranih spojeva **A-F** s ctDNA i pApU pri pH 7,4 u puferu natrijeva kakodilata, I = 0,05 mol dm^{-3}.

	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**
	logK_s $^bI/I_0$	**logK_s $^bI/I_0$**	**logK_s $^bI/I_0$**	**logK_s $^bI/I_0$**	**logK_s $^bI/I_0$**	**logK_s $^bI/I_0$**
ctDNA	6,5 / 0,4	5,9 / 0,7	6,3 / 0,6	6,3 / 0,2	c / 0,9	4,9 / 0,8
pApU	6,3 / 0,8	6,1 / 0,7	c / 0,9	5,8 / 0,4	c / 1,7	c / 0,9

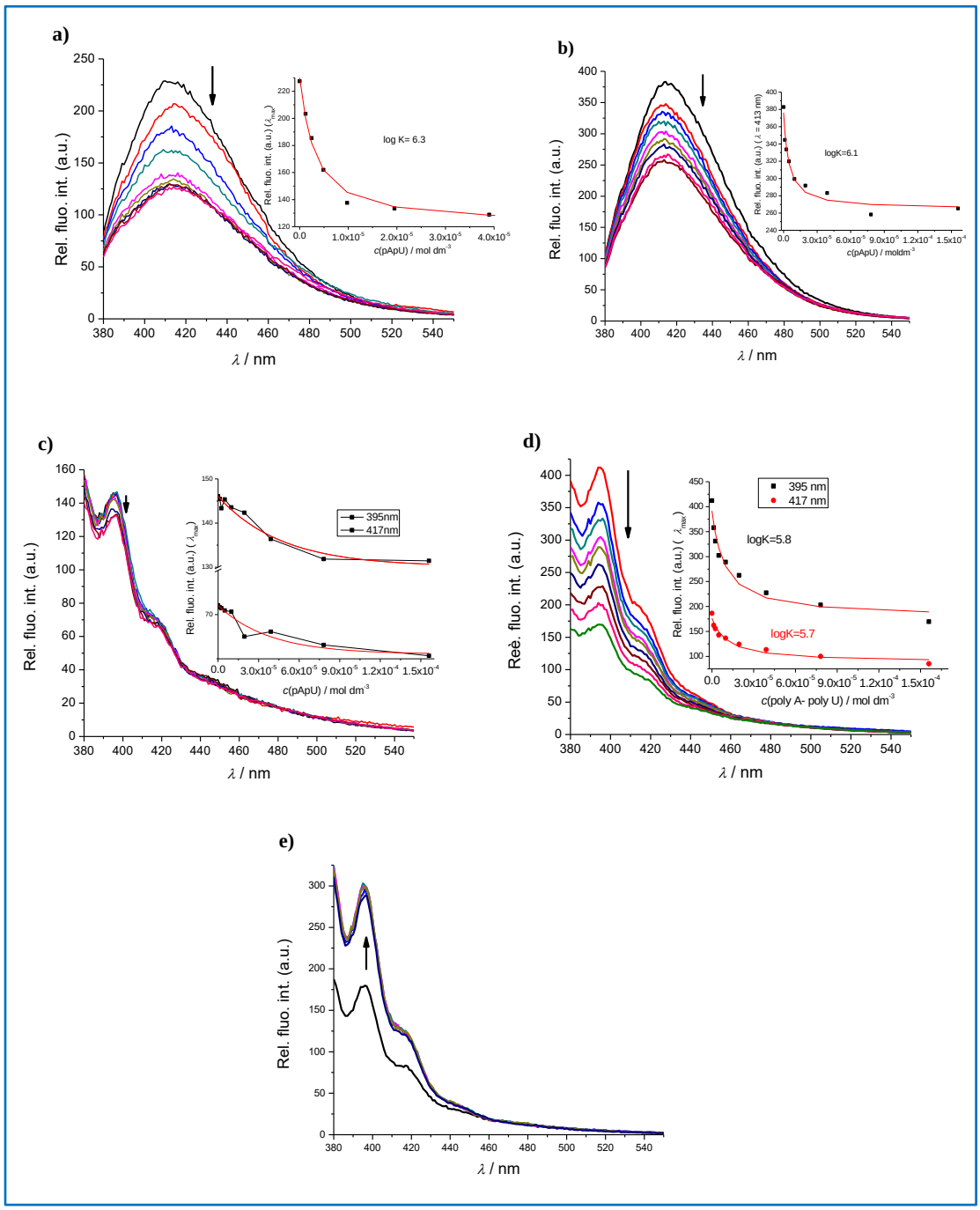
Napomene:

[a]Obrada podataka Scatchardovom jednadžbom davala je slične vrijednosti omjera ***n***[spoj **2-4**]/[polinukleotid]. Zbog jednostavnosti i bolje usporedivosti rezultata sve logK_s vrijednosti preračunate su za fiksnu vrijednost ***n***=0,1 i za ctDNA i za pApU. [b]I_0-početni intenzitet emisije spoja; I-intenzitet emisije kompleksa spoj / polinukleotid izračunat prema Scatchardovoj jednadžbi. [c]Premale promjene za obradu s Scatchardovom jednadžbom.



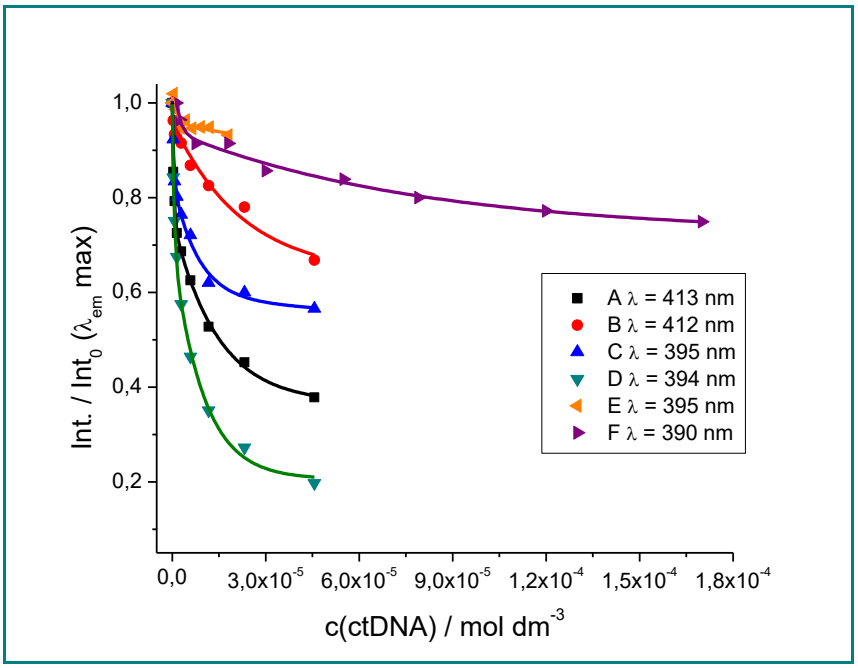
Slika 42. Promjene fluorescencijskih spektara puferskih otopina novosintetiziranih spojeva: a) **A**; b) **B**; c) **C**; d) **D**; e) **F**; (c = 2 × 10^{-7}mol dm^{-3}; pH 7,4; I = 0,05 mol dm^{-3}) pri različitim koncentracijama dodanih alikvota *stock* otopine ctDNA (c_0 = 5,3 × 10^{-3} mol dm^{-3}) pri 25 °C, λ_{exc}= 342 nm, inkubacijsko vrijeme 10 sekundi.

Umetci: promjena intenziteta emisije na maksimumu u ovisnosti o c(ctDNA); crvenom linijom prikazana je nelinearna regresija eksperimentalnih podataka po Scatchardovoj jednadžbi ($\boldsymbol{n}_{[\text{vezani spoj}]/[\text{ctDNA}]}$ = 0,1) prema eksperimentalnim potatcima, pri pH 7,4, I = 0,05 mol dm^{-3}, 25 °C.

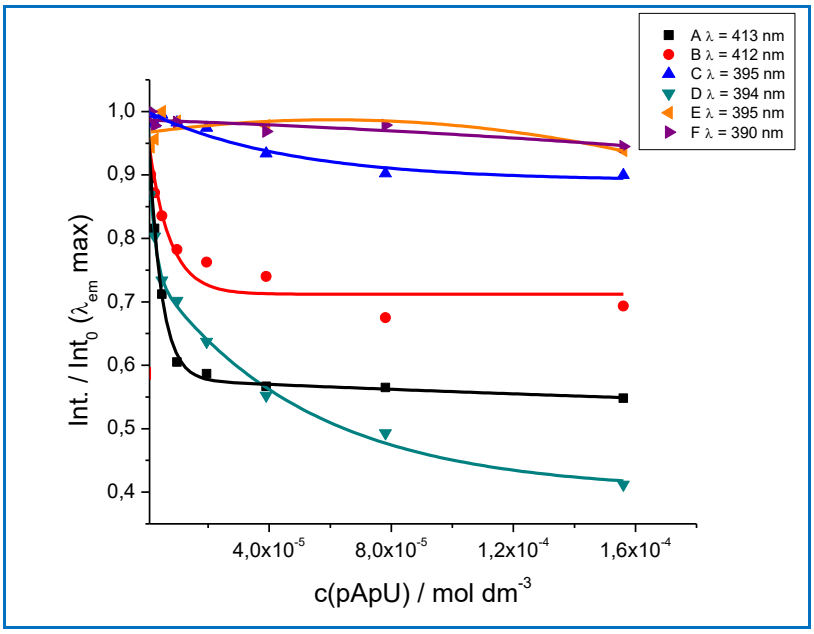


Slika 43. Promjene fluorescencijskih spektara puferskih otopina novosintetiziranih spojeva: a) **A**; b) **B**; c) **C**; d) **D**; e) **E**; (c = 2 × 10^{-7}mol dm^{-3}; pH 7,4; I = 0,05 mol dm^{-3}) po titraciji s pApU (c_0 = 4,5 × 10^{-3} mol dm^{-3}) pri 25 °C, λ_{exc}= 342 nm, inkubacijsko vrijeme 10 sekundi.

Umetci: promjena intenziteta emisije na maksimumu u ovisnosti o c(pApU); crvenom linijom prikazana je nelinearna regresija eksperimentalnih podataka po Scatchardovoj jednadžbi ($n_{[vezani\ spoj]/[ctDNA]}$ = 0,1) prema eksperimentalnim potatcima, pri pH 7,4, I = 0,05 mol dm^{-3}, 25 °C.



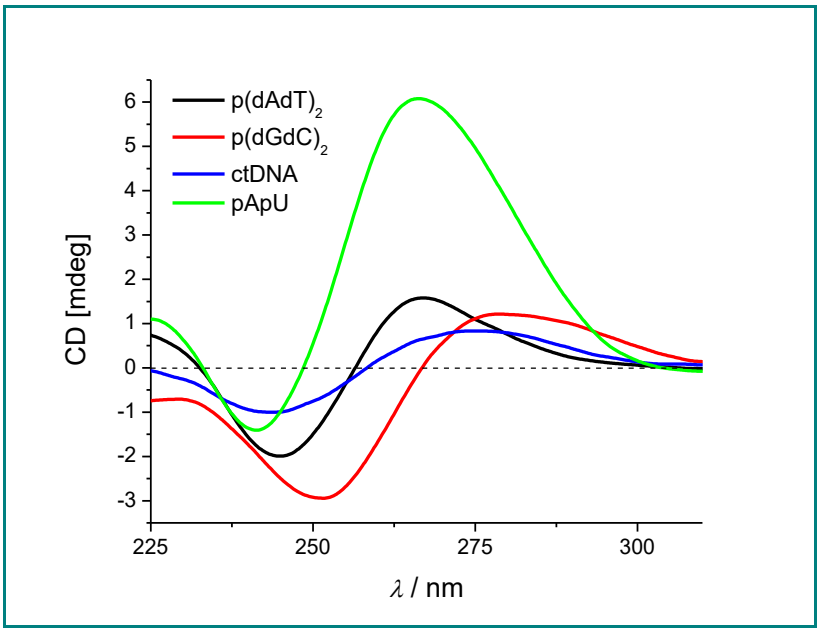
Slika 44. Usporedba rezultata fluorimetrijske titracije novosintetiziranih spojeva **A-F** (c = 2 × 10^{-7} mol dm^{-3}, $\lambda_{exc} \approx$ 342 nm) s ctDNA, u puferskoj otopini natrijeva kakodilata, pH 7,4, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C; vrijednosti su normalizirane prema polaznom intenzitetu Int_0 pri emisiji spoja λ_{max}∈[390-415] nm.



Slika 45. Usporedba rezultata fluorimetrijske titracije novosintetiziranih spojeva **A-F** (c = 2 × 10^{-7} mol dm^{-3}, $\lambda_{exc} \approx$ 342 nm) s pApU, u puferskoj otopini natrijeva kakodilata, pH 7,4, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C; vrijednosti su normalizirane prema polaznom intenzitetu Int_0 pri emisiji spoja λ_{max}∈[390-415] nm.

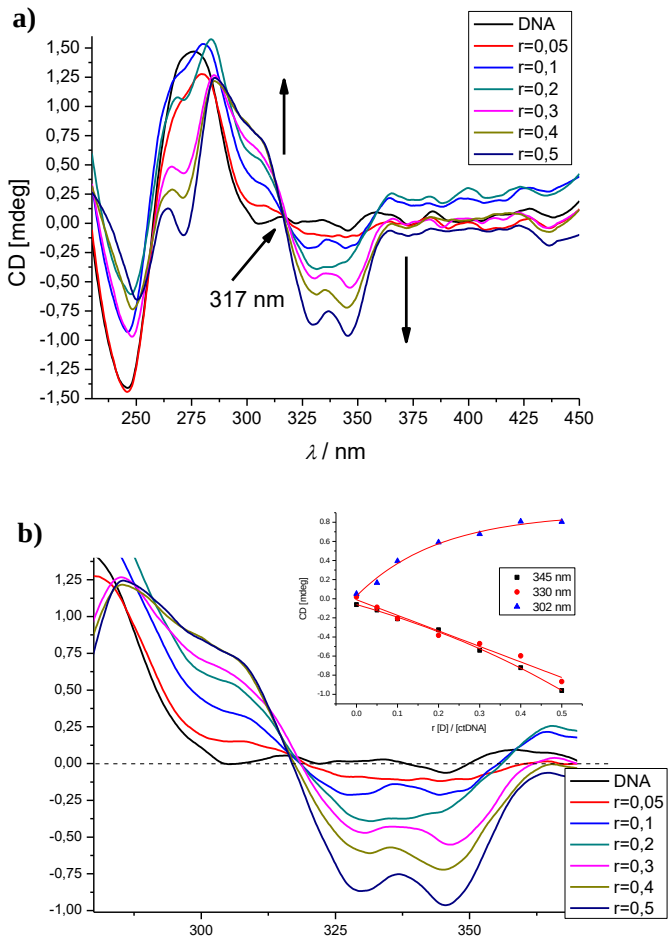
4.4.1. Cirkularni dikroizam

Do sada su proučavane nekovalentne interakcije na 25 ° C praćenjem spektroskopskih svojstava ispitivanog spoja nakon dodavanja polinukleotida. Kako bismo dobili uvid u promjene polinukleotidnih svojstava induciranih vezanjem malih molekula, odabrana je CD spektroskopija kao vrlo osjetljiva metoda za praćenje konformacijskih promjena u sekundarnoj strukturi polinukleotida.[61] Prema tome, na temelju organizacije parova nukleobaze DNA / RNA u spiralnoj strukturi, CD je u velikoj mjeri ovisan o polinukleotidnoj sekundarnoj strukturi i daje karakteristične CD spektre nukleinskih kiselina kao rezultat osnovnog slijeda i eksperimentalnih uvjeta (slika 46). Nadalje, akiralne male molekule mogu nakon vezanja na polinukleotide imati u konačnici inducirani CD spektar (ICD), što može dati korisne informacije o načinima interakcije.[105]

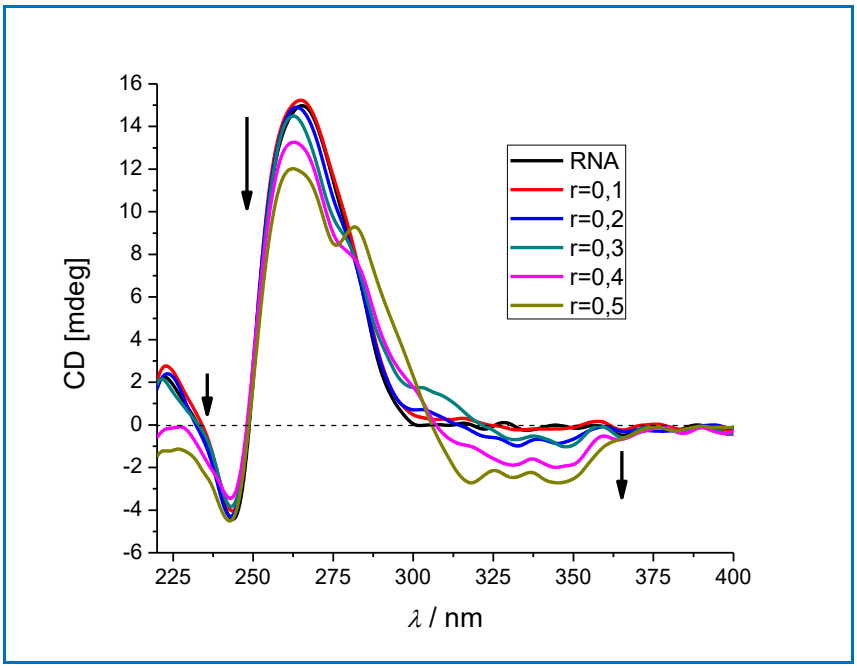


Slika 46. CD spektri polinukleotida (c = 2 × 10^{-5} mol dm^{-3}) različite sekundarne strukture. Izvor: T. Šmidlehner, doktorska disertacija, Multifunctional Molecular Recognition of DNA/RNA Secondary Structure By Molecular Senzors, University of Rijeka, Department of Biotechnology, 2018.

Korišteni su ctDNA i pApU polinukleotidi koji su prethodno bili otopljeni u svježe priređenoj otopini kakodilatnog pufera pH 7,4, I = 0,05 mol dm^{-3}. CD eksperimenti provođeni su na način da su se otopini polinukleotida (c_{DNA} = 2 × 10^{-5} mol dm^{-3}, c_{RNA} = 2,5 × 10^{-5} mol dm^{-3}) dodavali odgovarajući alikvoti svježe priređene ishodišne otopine novosintetiziranih spojeva **A-F** (c_0 = 1 × 10^{-3} mol dm^{-3}).



Slika 47. Promjene CD spektara otopine ctDNA (c_{DNA} = 2 × 10^{-5} mol dm^{-3}) s dodatkom spoja **D** $r_{[\mathrm{C}]\,/\,[\mathrm{DNA}]}$ = 0,1-0,5, u puferu natrijeva kakodilata, pri pH 7,4, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C. a) CD spektar; b) uvećani dio spektra s ctDNA pod a) od 280 do 370 nm, uz umetak koji se odnosi na spektralne promjene u ovisnosti o r.



Slika 48. Promjene CD spektara otopine pApU (c_{RNA} = 2,5 × 10^{-5} mol dm^{-3}) s dodatkom spoja **D** u ovisnosti o r = [spoj] / [dl polinukleotid], u puferu natrijeva kakodilata, pri pH 7,4, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C. Napomena: crnim strelicama su označena smanjenja intenziteta CD i ICD vrpci.

Većina istraživanih spojeva ne mijenja značajno CD spektre ctDNA/pApU niti ne daje inducirane CD signale, što ukazuje da dolazi do vezanja uzduž polinukleotida bez jednoznačne orijentacije pirenskog kromofora s obzirom na kiralnu okosnicu ctDNA (D-slika 15) odnosno pApU (D-slika 16).

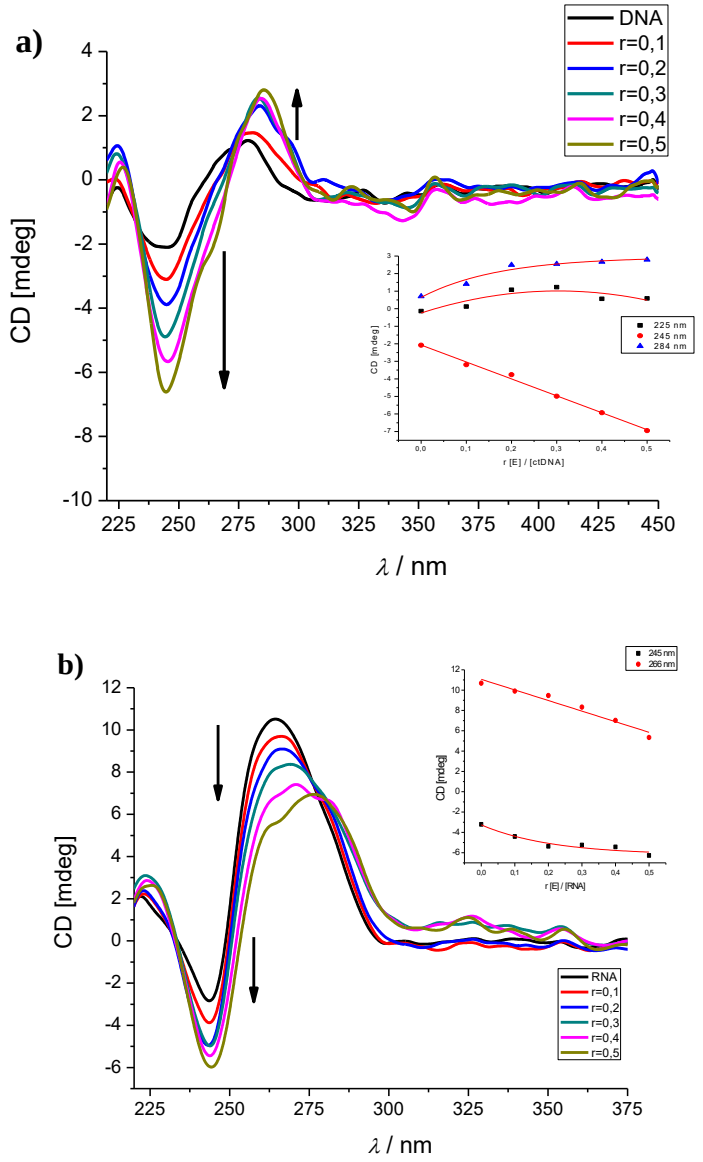
Dodatak spoja **D** u otopine s ctDNA i pApU ne samo da je promijenio CD spektre < 300 nm, već je rezultirao jakim induciranim CD (ICD) vrpcama na valnim duljinama > 300 nm (Slika 47 i 48), pri čemu se pozitivne vrpce na 302 nm mogu pripisati GCP skupini položenoj u utore ctDNA/pApU, dok negativne vrpce na 330 nm i 345 nm odgovaraju maksimumima pirena. Međutim, važno je istaknuti kako se omjer intenziteta ICD vrpci između 330 nm i 345 nm mijenja kao funkcija stehiometrijskog omjera r[spoja]/[polinukleotida] što ukazuje na agregaciju pirena unutar ctDNA veznog mjesta (slika 47). Takve negativne ICD vrpce mogu

biti: a) posljedica potpunog ili djelomičnog interkaliranja pirena unutar ctDNA/pApU ili b) negativne vrpce mogu biti posljedica bisignatnog Cotton-ovog effekta sprege s vrpcom GCP na 300 nm kroz izoeliptičku točku (317 nm) što bi ukazivalo na intramolekularne aromatske interakcije slaganja GCP-piren unutar ctDNA/pApU utora.

Nedostatak temperaturne stabilizacije ctDNA/pApU od strane spoja **D** (tablica 7) ne podržava interkalativni način vezanja (za interkaliranje pirena se očekuje stabilizacija $\Delta T_m > 5$ °C),[47] a s druge strane značajni porast ICD signala za $r > 0,3$ podržava vezanje **D** unutar utora ctDNA/pApU.[47]

Dodatak spoja **E** je rezultirao značajnim promjenama CD spektra i ctDNA i pApU (slika 46, 230-350 nm). Kod ctDNA se izdvaja jaki pozitivni ICD maksimum na 290-300 nm pripisan GCP smještenom u malom utoru, no za razliku od spoja **D** uz odsustvo ICD signala u pirenskom dijelu (330-350 nm)-to ukazuje kako je samo GCP dio molekule jednoznačno orijentiran s obzirom na kiralnu os ctDNA.

S druge strane, **E**/pApU CD spektar pokazuje i ICD vrpcu GCP (290-300 nm) i pozitivnu ICD vrpcu pirena (330-350 nm), oba ICD signala sugerirajući jednoznačno orijentirano vezanje oba kromofora **E** unutar većeg utora pApU.[47] Razlog različitog CD odgovora **E** pri vezanju na ctDNA, odnosno pApU može se pripisati različitim dimenzijama utora, pri čemu uzak manji utor ctDNA preferira samo GCP dio molekule, dok bitno veći i dublji utor pApU dozvoljava jednoznačno vezanje i orijentaciju oba kromofora.



Slika 49. Promjene CD spektara otopine dl polinukleotida s dodatkom spoja **E** u omjeru *r*, u puferu natrijeva kakodilata, pri pH 7,4, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C; a) s ctDNA (c_{DNA} = 2 × 10^{-5} mol dm^{-3}); b) s pApU (c_{RNA} = 2,5 × 10^{-5} mol dm^{-3}); uz umetak koji se odnosi na spektralne promjene u ovisnosti o *r*.

4.5. Diskusija o interakcijama novosintetiziranih spojeva s ctDNA i pApU na temelju eksperimentalno dobivenih rezultata

Svi spojevi (**A**-**F**) se vežu na ctDNA i pApU sličnim, mikromolarnim afinitetom, pri čemu se emisija pirena različito smanjuje. Rezultati CD titracija ukazuju kako se jedino spoj **D** (karakteriziran dugom premosnicom prema GCP) veže na ctDNA i pApU orijentirajući piren i GCP jednoznačno prema kiralnoj okosnici polinukleotida, dok spoj **E** razlikuje ctDNA po ICD vrpci samo GCP dijela i pApU po ICD vrpci GCP i pirenskog dijela. Drugi spojevi sličan afinitet vezanja ostvaruju uz nehomogenu orjentaciju kromofora prema kiralnim okosnicama.

Spojevi ne stabiliziraju značajno ctDNA odnosno pApU tijekom temperaturnog mekšanja, što eliminira interkalativni način vezanja (koji bi trebao rezultirati značajnom stabilizacijom polinukleotida). Sve navedeno ukazuje na vezanje spojeva u utore ctDNA i pApU kao dominantni način interakcija.

§ 5. ZAKLJUČAK

U sklopu ove disertacije provedenim znanstvenim istraživanjem ostvaren je originalan znanstveni doprinos dosadašnjem znanju o interakcijama humane dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) s malim molekulama. Svi prikazani rezultati (spektroskopska karakterizacija novih spojeva i studije njihovih interakcija s hDPP III, ctDNA i pApU) su dobiveni u sklopu rada vezanog za ovu disertaciju, uz napomenu kako su novi spojevi istraživani u ovom radu pripravljeni ranije od strane suradnika te sinteza nije dio disertacije.

Ispitivanjem interakcija sedam novih konjugata gvanidiniokarbonilpirol (GCP)-fluorofora (priprava nije dio disertacije) s dipeptidil peptidazom III (DPP III) utvrđeno je da se svi spojevi snažno vežu (s mikromolarnim afinitetom) u aktivno mjesto enzima. Fluorimetrijski odgovor spojeva pri vezanju na hDPP III izuzetno varira (od gašenja do jakog povećanja), ovisno o tipu fluorofora i intramolekularnoj (pred)organizaciji male molekule.

Utvrđeno je da pozitivno nabijen lizinski bočni lanac u sklopu poveznice nekih GCP-fluorofor analoga značajno doprinosi boljoj topljivosti spojeva u vodi, no istovremeno uzrokuje smanjenje jakosti fluorescentnog odgovora pri vezanju liganda na hDPP III i rezultira nestajanjem inhibitornog učinka, koji imaju analozi s neutralnom poveznicom, na enzimsku aktivnost hDPP III.

S druge strane, analozi s nenabijenom poveznicom pokazali su snažniji porast emisije pri vezanju na hDPP III i bili su učinkoviti inhibitori enzima. Daleko najbolji fluorimetrijski odgovor i inhibitorna svojstva pokazao je cijaninski analog (**CIA**), što ga čini dobrim sustavom za daljnje razvijanje malih molekula s dualnim efektom fluorescentnog markera i inhibitora DPP III.

U sklopu ove disertacije provedeno je također i istraživanje interakcija derivata GCP-pirena s ctDNA i pApU, pri čemu je ustanovljen visok afinitet vezanja i značajna razlika u fluorimetrijskim odgovorima, čime ti spojevi pokazuju svojstva dvostrukih senzora, koji omogućuju praćenje kako enzima DPP III tako i ctDNA odnosno pApU.

Za pet, od navedenih sedam, GCP-fluorofor analoga, (četiri analoga pirena i jedan cijaninski) ispitane su njihove interakcije s hDPP III korištenjem (empirijskih) metoda molekulskog modeliranja. Uklapanje GCP analoga u aktivno mjesto ljudske DPP III provedeno je računalnim programom AutoDock 4.2.6.

Za svaki od navedenih spojeva (GCP analoga) određeno je 10 mogućih načina (modova) vezanja, a zatim su na temelju njihove međusobne sličnosti, te sličnosti s eksperimentalno određenim načinom vezanja peptidnih supstrata za DPP III izabrana dva do četiri vezna načina za koje su provedene molekulsko dinamičke (MD) simulacije u vodenom mediju pri čemu je neutralizacija hDPP III-GCP-fluorofor kompleksa provedena Na^+ ionima.

Stabilnost kompleksa određena na temelju MMPBSA računa i analize intermolekularnh interakcija u kompleksima koji su se tijekom MD simulacija najmanje perturbirali (najmanje promjene okosnice proteina, te položaja liganda) u skladu su s eksperimentalno dobivenim rezultatima i pružaju uvid u moguće intermolekularne interakcije koje stabiliziraju navedene komplekse.

Simulacijama molekularne dinamike u kombinaciji s MMPBSA izračunima i analizom intermolekularnih interakcija utvrđeno je da kompleksi neaktivnog hDPP III mutanta E451A s odabranim novosintetiziranim spojevima imaju sličnu stabilnost u vodenoj otopini što je u skladu sa sličnošću eksperimentalno dobivenih konstanti vezanja.

Detaljnija studija provedena za najučinkovitiji inhibitor hDPP III, GCP-cijanin ukazala je na interakcije tog spoja s aminokiselinskim ograncima Glu451 i His568 enzima divljeg tipa, koji aktivno sudjeluju u enzimskoj reakciji, a čemu u prilog ide i činjenica da je kompleks između divljeg tipa enzima i spoja bio stabilniji od kompleksa spoja s mutiranim enzimom E451A. Utvrđeno je da na taj način vezanjem GCP-cijanin analog ometa vezanje supstrata (Arg_2-2NA) i enzimsku reakciju. GCP-piren analog s nenabijenom poveznicom (**F**) pokazao je slične interakcije i djelovanje kao GCP-cijanin analog. Međutim, kod navedenog GCP-pirenskog analoga (**F**) utvrđena je slabija interakcija s Glu451 od interakcije koju ima GCP-cijaninski analog s Glu451 tijekom MD simulacije, što u konačnici vjerojatno doprinosi tome da on ima nešto slabiji inhibicijski učinak.

Svi dobiveni rezultati upućuju na to da bi daljnja istraživanja na novim GCP-cijanin analozima mogla biti od značaja za razvoj teragnostičkih molekula za praćenje i inhibiciju hDPP III.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ (prema potrebi)

Å	ångström, mjerna jedinica za duljinu; 1 Å = 10^{-10} m
Arg_2-2NA	komercijalno dostupni supstrat; diarginil-2-naftilamid
bar	mjerna jedinica za tlak; 1 bar = 10^5 Pa
CD	cirkularni dikroizam
ctDNA	*calf thymus* DNA
dl DNA	dvolančana (engl. *double-stranded*, ds) DNA
dl RNA	dvolančana (engl. *double-stranded*, ds) RNA
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
E451A	inaktivni mutant hDPP III
ff14SB	polje sila
Fluo	Fluorescencijska spektroskopija
GAFF	polje sila (engl. *generalized Amber force field*)
GCP	gvanidinijevkarbonilpirol
hDPP III	humana dipeptitil petidaza III; protein
M	mol dm^{-3}; mjerna jedinica za množinsku koncentraciju
M*	oznaka za pojedine odabrane strukture (modove) odabranih spojeva uz koju je naveden odgovarajući broj koji joj je dodjeljen prilikom rangiranja (M1-M4)
MD	molekulska dinamika
MM	molekulska mehanika
MM-PBSA	metoda za izračun slobodne energije (engl. *molecular mechanics-PoissonBoltzmann surface area*)
$NaO_2As(CH_3)_2 \cdot 3H_2O$	kakodilatni pufer
NPT	izotermno-izobarni ansambl
NVT	kanonski ansambl
pApU	*poly A-poly U* RNA

R_g	radijus giracije
RMSD	korijen srednjeg kvadrata odstupanja (engl. *root mean square deviation*)
RMSF	korijen srednjeg kvadrata fluktuacija (engl. *root mean square fluctuation*)
RNA	ribonukleinska kiselina
rpm	broj obrtaja; (engl. *revolutions per minute*)
SHAKE	algoritam ograničavanja gibanja vodikovih atoma tijekom MD simulacija
TIP3P	modeli molekula vode u kojima su duljine veza i kutevi fiksirani, a elektrostatske interakcije definirane preko 3 točkasta naboja (engl. *transferrable intermolecular potential 3 point*)
T_m	tempratura mekšanja, temperatura pri kojoj je 50 % polinukleotida denaturirano
Tris-HCl	Tris(hidroksimetil)aminometan hidrokloridni pufer
UV/Vis	UV/VIS spektroskopija
UV	ultraljubičasto zračenje
Vis	vidljivi dio spektra; bijela svjetlost; $\lambda \in$ [400-800] nm
WT	divlji tip (engl. *wild type*)

POPIS DUŠIČNIH BAZA TE PREGLED NJIHOVIH JEDNOSLOVNIH OZNAKA:

Dušične baze	Jednoslovne oznake
Adenin	A
Citozin	C
Guanin	G
Timin	T
Uracil	U

POPIS ESENCIJALNIH AMINOKISELINA, TE PREGLED NJIHOVIH TROSLOVNIH I JEDNOSLOVNIH OZNAKA:

Aminokiseline	Troslovne oznake	Jednoslovne oznake
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginska kiselina	Aps	D
Cistein	Cys	C
Fenilalanin	Phe	F
Glutaminska kiselina	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glicin	Gly	G
Histidin	His	H
Izoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lizin	Lys	K
Metionin	Met	M
Prolin	Pro	P
serin	Ser	S
Treonin	Thr	T
Triptofan	Trp	W
Tirozin	Tyr	Y
Valin	Val	V

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. Chen, J. M. & Barrett, A. J. Dipeptidyl-peptidase III. in *Handbook of Proteolytic Enzymes* (eds. Barrett, A. J., Woessner, J. F. & Rawlings, N. D.) **1**, 809-812. (Elsvier Academic Press, 2004).
2. Hast, B. E., Cloer, E. W., Goldfarb, D., Li, H., Siesser, P. F., Yan, F., Walter, V., Zheng, N., Hayes, D. N. and Major, M. B. Cancer-derived mutations in KEAP1 impair NRF2 degradation but not ubiquitination. *Cancer Res.* **74**, 808–817 (2014).
3. Lu, K., Alcivar, A. L., Ma, J. Foo, T. K., Zywea, S., Mahdi, A., Huo, Y., Kensler, T. W., Gatza, M. L. and Xia, B. NRF2 induction supporting breast cancer cell survival is enabled by oxidative stress-induced DPP3-KEAP1 interaction. *Cancer Res.* **77**, 2881–2892 (2017).
4. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. *Biochemistry*. (W. H. Freeman, 2002).
5. Agić, D., Hranjec, M., Jajčanin, N., Starčević, K., Karminski-Zamola, G. and Abramić, M. Novel amidino-substituted benzimidazoles: Synthesis of compounds and inhibition of dipeptidyl peptidase III. *Bioorg. Chem.* **35**, 153–169 (2007).
6. Cvitešić, A., Sabljić, I., Makarević, J. & Abramić, M. Novel dipeptidyl hydroxamic acids that inhibit human and bacterial dipeptidyl peptidase III. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **31**, 40–45 (2016).
7. Langolf, S., Machon, U., Ehlers, M., Sicking, W., Schirmeister, T., Büchhold, C., Gelhaus, C., Rosenthal, P. J. and Schmuck, C. Development of Antitrypanosomal and Antiplasmodial Nonpeptidic Cysteine Protease Inhibitors based on N-Protected-Gvanidin-Furan and -Pyrrole Building Blocks. *ChemMedChem* **6**, 1581–1586 (2011).
8. Klemm, K., Radić Stojković, M., Horvat, G., Tomišić, V., Piantanida, I. and Schmuck, C. Interactions of multicationic bis(guanidiniocarbonylpyrrole) receptors with double-stranded nucleic acids: Syntheses, binding studies, and atomic force microscopy imaging. *Chemistry (Easton).* **18**, 1352–1363 (2012).
9. Radić Stojković, M., Gonzalez-Garcia, J., Šupljika, F., Galiana-Rosello, C., Guijarro, L., Gazze, S. A., Francis, L. W., Piantanida, I. and Garcia-Espana, E. Specific and highly

efficient condensation of GC and IC DNA by polyaza pyridinophane derivatives. *Int. J. Biol. Macromol.* **109**, 143–151 (2018).

10. Case, D. A., Betz, R. M., Botello-Smith, W., Cerutti, D. S., Cheatham, T. E. III, Darden, T. A., Duke, R. E., Giese, T. J., Gohlke, H., Goetz, A. W., Homeyer, N., Izadi, S., Janowski, P. Kaus, J., Kovalenko, A., Lee, T. S., LeGrand, S., Li, P., Lin, C., Luchko, T., Luo, R., Madej, B., Mermelstein, D., Merz, K. M., Monard, G., Nguyen, H., Nguyen, H. T., Omelyan, I., Onufriev, A., Roe, D. R., Roitberg, A., Sagui, C., Simmerling, C. L., Swails, J., Walker, R. C., Wang, J., Wolf, R. M., Wu, X., Xiao, L., York, D. M. & Kollman, P. A. AMBER16. (2016).
11. Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K. & Olson, A. J.. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *J. Comput. Chem.* **19**, 1639–1662 (1639).
12. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8, Schrödinger, LLC, 2017.
13. Mótyán, J., Tóth, F. & Tőzsér, J. Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. *Biomolecules* **3**, 923–942 (2013).
14. NC-IUBMB & Biology), (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular. Enzyme Nomenclature 1992. *Recomm. Nomencl. Comm. Int. Union Biochem. Mol. Biol. Nomencl. Classif. Enzym. Acad. Press. Orlando.* (1992).
15. Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. & Deshpande, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 597–635 (1998).
16. Rawlings, N. D. & Barrett, A. J. Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods Enzymol.* **248**, 183–228 (1995).
17. Rawlings, N. D. & Barrett, A. J. MEROPS: The peptidase database. *Nucleic Acids Research* **27**, 325–331 (1999).
18. Rawlings, N. D., Tolle, D. P. & Barrett, A. J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.* **378**, 705–716 (2004).
19. Fischer, E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **27**, 2985–2993 (1894).
20. Koshland, D. E. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **44**, 98–104 (1958).
21. Harper, E. & Berger, A. On the size of the active site in proteases: Pronase. *Biochem.*

Biophys. Res. Commun. **46**, 1956–1960 (1972).

22. Matić, J., Šupljika, F., Tir, N., Piotrowski, P., Schmuck, C., Abramić, M., Piantanida, I., Tomić, S. Guanidiniocarbonyl-pyrrole-aryl conjugates as inhibitors of human dipeptidyl peptidase III: Combined experimental and computational study. *RSC Adv.* **6**, 83044–83052 (2016).
23. Matovina, M., Agić, D., Abramić, M., Matić, S., Karačić, Z. & Tomić, S. New findings about human dipeptidyl peptidase III based on mutations found in cancer. *RSC Adv.* **7**, 36326–36334 (2017).
24. Voet, D. & Voet, J. g. *Biochemistry*. *John Wiley & Sons* **4**, (2015).
25. Brown, C. K., Madauss, K., Lian, W., Beck, M. R., Tolbert, W. D. & Rodgers, D. W. Structure of neurolysin reveals a deep channel that limits substrate access. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 3127–3132 (2001).
26. Fukasawa, K., Fukasawa, K. M., Iwamoto, H., Hirose, J. & Harada, M. The HELLGH motif of rat liver dipeptidyl peptidase III is involved in zinc coordination and the catalytic activity of the enzyme. *Biochemistry* **38**, 8299–8303 (1999).
27. Kumar, P., Reithofer, V., Reisinger, M., Wallner, S., Pavkov-Keller, T., Macheroux, P. & Gruber, K. Substrate complexes of human dipeptidyl peptidase III reveal the mechanism of enzyme inhibition. *Sci. Rep.* **6**, 1–10 (2016).
28. Baral, P. K., Jajčanin-Jozić, N., Deller, S., Macheroux, P., Abramić, M. & Gruber, K. The first structure of dipeptidyl-peptidase III provides insight into the catalytic mechanism and mode of substrate binding. *J. Biol. Chem.* **283**, 22316–22324 (2008).
29. Tomić, A., Abramić, M., Špoljarić, J., Agić, D., Smith, D. M. & Tomić, S. Human dipeptidyl peptidase III: Insights into ligand binding from a combined experimental and computational approach. *J. Mol. Recognit.* **24**, 804–814 (2011).
30. Tomić, A., Kovačević, B. & Tomić, S. Concerted nitrogen inversion and hydrogen bonding to Glu451 are responsible for protein-controlled suppression of the reverse reaction in human DPP III. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 27245–27256 (2016).
31. Pelmenschikov, V., Blomberg, M. R. A. & Siegbahn, P. E. M. A theoretical study of the mechanism for peptide hydrolysis by thermolysin. *J. Biol. Inorg. Chem.* **7**, 284–298 (2002).
32. Blumberger, J., Lamoureux, G. & Klein, M. L. Peptide hydrolysis in thermolysin: Ab initio QM/MM investigation of the Glu143-assisted water addition mechanism. *J. Chem.*

Theory Comput. **3**, 1837–1850 (2007).

33. Abramic, M., Zubanovic, M. & Vitale, L. Dipeptidyl Peptidase III from Human Erythrocytes. **369**, 29–38 (1988).
34. Smyth, M. & O'Cuinn, G. Dipeptidyl Aminopeptidase III of Guinea-Pig Brain: Specificity for Short Oligopeptide Sequences. *J. Neurochem.* **63**, 1439–1445 (1994).
35. Lee, C. M. & Snyder, S. H. Dipeptidyl-aminopeptidase III of rat brain. Selective affinity for enkephalin and angiotensin. *J. Biol. Chem.* **257**, 12043–12050 (1982).
36. Ohkubo, I., Li, Y. H., Maeda, T., Yamamoto, Y., Yamane, T., Du, P. G. & Nishi, K. Molecular cloning and immunohistochemical localization of rat dipeptidyl peptidase III. in *Forensic Science International* **113**, 147–151 (2000).
37. Baršun, M., Jajčanin, N., Vukelić, B., Špoljarić, J. & Abramić, M. Human dipeptidyl peptidase III acts as a post-proline-cleaving enzyme on endomorphins. *Biol. Chem.* **388**, 343–348 (2007).
38. Chiba, T., Li, Yao H., Yamane, T., Ogikubo, O., Fukuoka, M., Arai, R., Takahashi, S., Ohtsuka, T., Ohkubo, I. & Matsui, N. Inhibition of recombinant dipeptidyl peptidase III by synthetic hemorphin-like peptides. *Peptides* **24**, 773–778 (2003).
39. Tomić, A., González, M. & Tomić, S. The large scale conformational change of the human DPP III-substrate prefers the 'closed' form. *J. Chem. Inf. Model.* **52**, 1583–1594 (2012).
40. Bezerra, G. A., Dobrovetsky, E., Viertlmayr, R., Dong, A., Binter, A. & Abramic, M. Entropy-driven binding of opioid peptides induces a large domain motion in human dipeptidyl peptidase III. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 6525–6530 (2012).
41. The, O. F. *Molecular Biology Gene of the*. (Pearson, 2005).
42. Lehninger, A., Nelson, D. A. & Cox, M. M. *Principlees of Biochemistry*. (W. H. Freeman, 2008).
43. Garret, R. H. & Grisham, C. M. *Biochemistry*. (Brooks Cole, Cengage Learning, 2012).
44. Chang, C.-W., Li, M., Xu, X. & Liu, Y. Helicase Dysfunctions in Human Diseases. in *Helicases from All Domains of Life* 191–210 (Elsevier Inc., 2018). doi:10.1016/b978-0-12-814685-9.00012-9
45. Libonati, M. & Sorrentino, S. Degradation of double-stranded RNA by mammalian pancreatic-type ribonucleases. in *Methods in Enzymology* **341**, 234–248 (2001).
46. Wilson, W. D., Wang, Y. H., Krishnamoorthy, C. R. & Smith, J. C. Poly(dA)·Poly(dT)

Exists in an Unusual Conformation under Physiological Conditions: Propidium Binding to Poly(dA)·Poly(dT) and Poly[d(A-T)].Poly[d(A-T)]. *Biochemistry* **24**, 3991–3999 (1985).

47. Šmidlehner, T., Piantanida, I. & Pescitelli, G. Polarization spectroscopy methods in the determination of interactions of small molecules with nucleic acids - Tutorial. *Beilstein J. Org. Chem.* **14**, 84–105 (2017).
48. Gowda, S. K., Baby Mathew, B., Sudhamani, C. & Bhojya Naik, H. Mechanism of DNA Binding and Cleavage. *Biomed. Biotechnol. Biotechnol.* **2**, 1–9 (2014).
49. Ogawa, T. *Molecular Architectonics*. (Springer, 2017).
50. Lockett, M. R., Lange, H., Breiten, B., Heroux, A., Sherman, W., Rappoport, D., Yau, P. O., Snyder, P. W. & Whitesides, G. M. The binding of benzoarylsulfonamide ligands to human carbonic anhydrase is insensitive to formal fluorination of the ligand. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **52**, 7714–7717 (2013).
51. Breiten, B., Lockett, Matthew R., Sherman, W., Fujita, S., Al-Sayah, M., Lange, H., Bowers, C. M. Heroux, A., Krilov, G. & Whitesides, G. M. Water networks contribute to enthalpy/entropy compensation in protein-ligand binding. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 15579–15584 (2013).
52. Shinkai, S., Ikeda, M., Sugasaki, A. & Takeuchi, M. Positive allosteric systems designed on dynamic supramolecular scaffolds: Toward switching and amplification of guest affinity and selectivity. *Acc. Chem. Res.* **34**, 494–503 (2001).
53. Daze, K., Hof, F., Daze, K. & Hof, F. *Molecular Interaction and Recognition*. *Encyclopedia of Physical Organic Chemistry, 5 Volume Set* (2016). doi:10.1002/9781118468586.epoc3001
54. Schneider, H. -J. Mechanisms of Molecular Recognition : Investigations of Organic Host–Guest Complexes. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **30**, 1417–1436 (1991).
55. Cosic, I. Macromolecular Bioactivity: Is It Resonant Interaction Between Macromolecules?—Theory and Applications. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **41**, 1101–1114 (1994).
56. Baron, R. & McCammon, J. A. Molecular Recognition and Ligand Association. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **64**, 151–175 (2013).
57. Baron, R., Setny, P. & Andrew McCammon, J. Water in cavity-ligand recognition. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 12091–12097 (2010).

58. Kuriyan, J., Konforti, B. & Wemmer, D. Molecular Recognition : The Thermodynamics of Binding. *Mol. Life* 1–58 (2009).
59. Myron Kaufman Principles of thermodynamics 2002.
60. Glasstone, S. Thermodynamics For Chemist. (1947).
61. Scatchard, G. the Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**, 660–672 (1949).
62. Mc Ghee, J. D. & von Hippel, P. H. Theoretical Aspects of DNA - Protein Interactions: Co-operative and Non-co-operative Binding of Large Ligands to a One-dimensional Homogeneous Lattice. *J. Mol. Biol.* **86**, 469–489 (1974).
63. Chaires, J. B. A thermodynamic signature for drug-DNA binding mode. *Arch. Biochem. Biophys.* **453**, 26–31 (2006).
64. Copeland, R. A., Pompliano, D. L. & Meek, T. D. Drug-target resid. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **5**, 730-739. (2006).
65. Copeland, R. A. The drug-target residence time model: A 10-year retrospective. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 87–95 (2016).
66. Laskowski, M. & Kato, I. Protein Inhibitors of Proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 593–626 (2003).
67. Cramer, C. J. *Essentials of Computational Chemistry Theories and Models*. *Essentials of Computational Chemistry* **42**, (2004).
68. Ramachandran, K. I., Deepa, G. and Namboori, K. *Computational Chemsitry and Molecular Modeling-Principles and Applications*. (Springer, 2008).
69. Crabbe, J. Molecular modelling: Principles and applications A.R. Leach. Adison Wesley Longman (1996). *Comput. Chem.* **21**, 185 (1997).
70. Hinchliffe, A. *Modelling molecular structures 2th Ed*. (John Wiley & Sons, LTD, 2000).
71. Vanommeslaeghe, K., Guvench, O. & MacKerell, A. D. Molecular mechanics. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 3281–92 (2014).
72. Pissurlenkar, R., Shaikh, M., Iyer, R. & Coutinho, E. Molecular Mechanics Force Fields and their Applications in Drug Design. *Antiinfect. Agents Med. Chem.* **8**, 128–150 (2009).
73. Alder, B. J. & Wainwright, T. E. Studies in molecular dynamics. I. General method. *J. Chem. Phys.* **31**, 459–466 (1959).
74. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. & Klein, M. L.

Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926–935 (1983).

75. Bekker, H. Molecular dynamics simulation methods revised. 33–62 (1996).
76. Sun, H. Y., Hou, T. J. & Zhang, H. Y. Finding chemical drugs for genetic diseases. *Drug Discov. Today* **19**, 1836–1840 (2015).
77. Chen, J. Drug resistance mechanisms of three mutations V321I, I47V and V82I in HIV-1 protease probed by molecular dynamics simulations and binding free energy predictions. *RSC Adv.* **6**, 58573-58585. (2016).
78. Chang, S., Zhang, D. W., Xu, L., Wan, H., Hou, T. J. & Kong, R. Exploring the molecular basis of RNA recognition by the dimeric RNA-binding protein via molecular simulation methods. *RNA Biol.* **13**, 1133–1143 (2016).
79. Fuxreiter, M., Magyar, C., Juhász, T., Szeltner, Z., Polgár, L. & Simon, I. Flexibility of prolyl oligopeptidase: Molecular dynamics and molecular framework analysis of the potential substrate pathways. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **60**, 504–512 (2005).
80. Sun, H., Duan, L., Chen, F., Liu, H., Wang, Z., Pan, P., Zhu, F., Zhang, J. Z. H. & Hou, T. Assessing the performance of MM/PBSA and MM/GBSA methods. 7. Entropy effects on the performance of end-point binding free energy calculation approaches. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 14450–14460 (2018).
81. Tomić, A., Berynskyy, M., Wade, R. C. & Tomić, S. Molecular simulations reveal that the long range fluctuations of human DPP III change upon ligand binding. *Mol. Biosyst.* **11**, 3068–3080 (2015).
82. Sabljić, I., Tomin, M., Matovina, M., Sučec, I., Paić Tomašić, A., Tomić, A., Abramić, M. & Tomić, S. The first dipeptidyl peptidase III from a thermophile: Structural basis for thermal stability and reduced activity. *PLoS One* **13**, 1–25 (2018).
83. Špoljarić, J., Salopek-Sondi, B., Makarević, J., Vukelić, B., Agić, D., Šimaga, Š., Jajčanin-Jozić, N., Abramić, M. Absolutely conserved tryptophan in M49 family of peptidases contributes to catalysis and binding of competitive inhibitors. *Bioorg. Chem.* **37**, 70–76 (2009).
84. Chaires, J. B., Dattagupta, N. & Crothers, D. M. Studies on Interaction of Anthracycline Antibiotics and Deoxyribonucleic Acid: Equilibrium Binding Studies on Interaction of Daunomycin with Deoxyribonucleic Acid1 Numerous studies on the interaction of daunomycin with DNA have been reported (Zunnio et al. *Biochemistry* **21**, 3933–3940

(1982).

85. Palm, B. S., Piantanida, I., Žinić, M. & Schneider, H. J. The interaction of new 4,9-diazapyrenium compounds with double stranded nucleic acids. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2**, 385–392 (2000).

86. Jeričević, Željko Kušter, Ž. Non-linear optimization of parameters in Michaelis-Menten kinetics *. *Croat. Chem. Acta* **78**, 519–523 (2005).

87. Motulsky, H. J. & Ransnas, L. A. Fitting curves nonlinear regression : review a practical. *FASEB* **1**, 365–374 (1987).

88. Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H. & Nussinov, R. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **47**, 409–443 (2002).

89. Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R. & Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 935–49 (2004).

90. Cho, A. E., Guallar, V., Berne, B. J. & Friesner, R. Importance of accurate charges in molecular docking: Quantum Mechanical/Molecular Mechanical (QM/MM) approach. *J. Comput. Chem.* **26**, 915–931 (2005).

91. Alonso, H., Bliznyuk, A. A. & Gready, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Med. Res. Rev.* **26**, 531–568 (2006).

92. Dennington, R., Keith, T. & Millam, J. Shmichem Inc., Shawnee Mission, K. GaussView 5.0. (2009).

93. Wang, J., Wang, W., Kollman, P. A. & Case, D. A. Antechamber , An Accessory Software Package For Molecular Mechanical Calculations. *Molecules* **222**, U403–U403 (2001).

94. Case, D. A., Cheatham, T. E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K. M., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B. & Woods, R. J. The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* **26**, 1668–88 (2005).

95. Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A. & Case, D. A. Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.* **25**, 1157-1174. (2004).

96. Maier, J. A., Simmerling, C., Wickstrom, L., Hauser, K. E., Martinez, C. & Kasavajhala, K. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **11**, 3696–3713 (2015).

97. Tomić, A., Horvat, G., Ramek, M., Agić, D., Brkić, H., Tomić, S. New zinc ion parameters suitable for classical MD simulations of zinc metallo-peptidases. *J. Chem. Inf. Model.* acs.jcim.9b00235 (2019). doi:10.1021/acs.jcim.9b00235

98. Nguyen, T. T., Viet, M. H. & Li, M. S. Effects of water models on binding affinity: Evidence from all-atom simulation of binding of tamiflu to A/H5N1 neuraminidase. *Sci. World J.* **2014**, (2014).

99. Ibragimova, G. T. & Wade, R. C. Importance of explicit salt ions for protein stability in molecular dynamics simulation. *Biophys. J.* **74**, 2906–2911 (1998).

100. Joung, I. S. & Cheatham, T. E. Determination of alkali and halide monovalent ion parameters for use in explicitly solvated biomolecular simulations. *J. Phys. Chem. B* **112**, 9020–9041 (2008).

101. Genheden, S. & Ryde, U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin. Drug Discov.* **10**, 449–461 (2015).

102. Wang, C., Greene, D., Xiao, L., Qi, R. & Luo, R. Recent Developments and Applications of the MMPBSA Method. *Front. Mol. Biosci.* **4**, 1–18 (2018).

103. Wang, C., Nguyen, P. H., Pham, K., Huynh, D., Le, T., Binh, N., Wang, H., Ren, P. and Luo, R. Calculating protein-ligand binding affinities with MMPBSA: Method and error analysis. *J. Comput. Chem.* **37**, 2436–2446 (2016).

104. Fisicaro, G., Genovese, L., Andreussi, O., Marzari, N. & Goedecker, S. A generalized Poisson and Poisson-Boltzmann solver for electrostatic environments. *J. Chem. Phys.* **144**, (2016).

105. Pagni, R. M. Circular Dichroism and Linear Dichroism (Rodger, Alison; Norden, Bengt). *J. Chem. Educ.* **75**, 1095 (2009).

106. Nordén, B. & Kurucsev, T. Analysing DNA complexes by circular and linear dichroism. *J. Mol. Recognit.* **7**, 141–155 (1994).

107. Norden, B., Kubista, M. & Kurucsev, T. Linear dichroism spectroscopy of nucleic acids. *Q. Rev. Biophys.* **25**, 51 (2009).

108. Berova, N., Polavarapu, P. L., Nakanishi, K. & Woody, R. W. *Comprehensive Chiroptical Spectroscopy, Two volume set*. **2**, (2012).

109. Yamana, K., Zako, H., Asazuma, K., Iwase, R., Nakano, H. & Murakami, A. Fluorescence detection of specific RNA sequences using 2′-pyrene-modified oligoribonucleotides. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **40**, 1104–1106 (2001).

110. Korshun, V. A., Stetsenko, D. A. & Gait, M. J. Novel uridin-2′-yl carbamates: Synthesis, incorporation into oligodeoxyribonucleotides, and remarkable fluorescence properties of 2′-pyren-1-ylmethylcarbamate. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **2**, 1092–1104 (2002).

111. Armitage, B. A. Cyanine dye-DNA interactions: Intercalation, groove binding, and aggregation. *Top. Curr. Chem.* **253**, 55–76 (2005).

112. Šmidlehner, T., Karačić, Z., Tomić, S., Schmuck, C. & Piantanida, I. Fluorescent cyanine-guanidiniocarbonyl-pyrrole conjugate with pH-dependent DNA/RNA recognition and DPP III fluorescent labelling and inhibition properties. *Monatshefte fur Chemie* **149**, 1307–1313 (2018).

113. Prajapati, S. C. & Chauhan, S. S. Dipeptidyl peptidase III: A multifaceted oligopeptide N-end cutter. *FEBS J.* **278**, 3256–3276 (2011).

114. GraphPad Software, Inc. 386987 (2015).

115. El Seoud, O. A., Baader, W. J. & Bastos, E. L. *Practical Chemical Kinetics in Solution*. *Encyclopedia of Physical Organic Chemistry, 5 Volume Set* (2016). doi:10.1002/9781118468586.epoc1012

116. Hernandez-Folgado, L., Baretić, D., Piantanida, I., Marjanović, M., Kralj, M., Rehm, T. & Schmuck, C. Guanidiniocarbonylpyrrole-aryl derivatives: Structure tuning for spectrophotometry; recognition of specific DNA and RNA sequences and for antiproliferative activity. *Chem. - A Eur. J.* **16**, 3036–3056 (2010).

117. Mergny, J.-L. & Lacroix, L. Analysis of Thermal Melting Curves. *Oligonucleotides* **13**, 515–537 (2004).

§ 8. DODATAK

D- 1. Strukturna karakterizacija spojeva **A-F**, **CIA**.

Spoj **A:**

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO) δ / ppm 12.61 (NH, gvanidin, s, 1H), 12.19 (NH, s, 1H), 10.55 (NH, hyd, s, 1H), 10.45 (NH, hyd, s, 1H), 8.83 (NH, amide, d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.79-8.70 (NH_2, gvanidin, s, 2H), 8.69 (CH, PCA, d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 8.54 (NH_2, gvanidin, s, 2H), 8.37 - 8.14 (CH, PCA, m, 8H), 7.95 (NH_3^+, Lys, s, 3H), 7.64 (CH, gvanidin, s, 1H), 6.98 (CH, gvanidin, s, 1H), 4.71 - 4.67 (α, Lys, m, 1H), 2.83 (ε, Lys, s, 2H), 2.00-1.80 (β, Lys, m, 2H), 1.66 (δ, Lys, d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.60 - 1.51 (γ, Lys, m, 2H).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ / ppm 171.2 (CO), 168.0 (CO), 159.8 (CO), 158.9 (CO), 155.6 (CNH), 132.4, 131.9 (C, gvanidin), 130.7, 130.2 (CH, gvanidin), 129.7 (C, PCA), 128.6, 128.3, 128.2, 127.2 (CH, PCA), 126.7, 125.9, 125.8, 125.7, 125.3 (C, PCA), 124.7, 124.5, 123.7, 123.5, 115.8 (CH, PCA), 113.8 (C, PCA), 51.4 (α, Lys), 38.6 (ε, Lys), 31.7 (β, Lys), 26.6 (δ, Lys), 22.5 (γ, Lys).

HRMS (MALDI-TOF/TOF) *m/z* = calc. for $\mathbf{C_{30}H_{32}N_8O_4^{2+}}$: 567,2468 $[M-H]^+$; found 567,2451 $[M-H]^+$.

Spoj **B**:

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO) δ / ppm 12.51 (NH, gvanidin, s, 1H), 12.11 (NH, s, 1H), 10.54 (NH, hyd, s, 1H), 10.36 (NH, hyd, s, 1H), 8.99 (NH, amide, t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 8.69 (NH_2, gvanidin, bs, 2H), 8.66 (CH, PCA, d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 8.55 (NH_2, gvanidin, bs, 2H), 8.37-8.12 (CH, PCA, m, 8H), 7.61 (CH, gvanidin, s, 1H), 6.96 (CH, gvanidin, s, 1H), 4.13 (α, Gly, d, *J* = 5.8 Hz, 2H).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ / ppm 168.4 (CO), 168.0 (CO), 159.7 (CO), 159.5 (CO), 155.5 (CNH), 132.5, 131.9 (C, gvanidin), 130.7, 130.2 (CH, gvanidin), 129.7 (C, PCA), 128.6, 128.3, 128.2, 127.2 (CH, PCA), 126.7, 125.9, 125.8, 125.7, 125.4 (C, PCA), 124.6, 124.5, 123.7, 123.5, 115.9 (CH, PCA), 113.0 (C, PCA), 45.4 (α, Gly).

HRMS (MALDI-TOF/TOF) *m/z* = calc. for $\mathbf{C_{26}H_{22}N_7O_4^{+}}$: 496,1733 $[M]^+$; found 496,1731 $[M]^+$.

Spoj **C**:

^{1}H NMR (300 MHz, MeOD) δ / ppm 8.46-7.95 (CH, PMA, m, 9H), 7.15 (CH, gvanidin, d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.91 (CH, gvanidin, d, J = 4.0 Hz, 1H), 5.15 (CH_2, PMA, s, 2H), 4.10 (α, Gly, s, 2H).

^{13}C NMR (151 MHz, MeOD) δ / ppm 170.8 (CO), 160.9 (CO), 159.9 (CO), 155.8 (CNH), 131.3, 130.8, 129.8, 128.6, 127.5, 127.0, 126.9, 126.5, 125.7, 124.9, 124.8, 124.4, 122.5, 115.2, 114.7, 114.6, 114.3, 112.9, 111.9 (CH, PMA, gvanidin), 41.1 (CH_2, PMA), 31.4 (α, Gly).

HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z = calc. for $\mathbf{C_{26}H_{23}N_6O_3^+}$: 489,1651 $[M-H+Na]^+$; found 489,1664 $[M-H+Na]^+$.

Spoj **D**:

^{1}H NMR (600 MHz, MeOD) δ 8.35 / ppm (H-gvanidin, d, J = 9.2 Hz, 1H), 8.16 (H-gvanidin, d, J = 7.6 Hz, 2H), 8.11 (H-gvanidin, t, J = 8.6 Hz, 2H), 8.02 (H-gvanidin, d, J = 1.4 Hz, 2H), 7.97 (H-gvanidin, t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.91 (H-gvanidin, d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.11 (H-PBA, d, J = 4.2 Hz, 1H), 6.98 (H-PBA, d, J = 4.1 Hz, 1H), 4.64 (α, Lys, t, J = 7.9 Hz, 1H), 3.45-3.39 (CH_2-3, PBA, m, 2H), 2.94 (ε, Lys, t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.44 (CH_2-1, PBA, t, J = 13.2 Hz, 2H), 2.19 (CH_2-2, PBA, t, J = 15.1 Hz, 2H), 2.02 (β, Lys, t, J = 15.5 Hz, 1H), 1.88 (β', Lys, t, J = 15.2 Hz, 1H), 1.75 - 1.71 (δ, Lys, m, 2H), 1.60 - 1.56 (γ, Lys, m, 2H).

^{13}C NMR (151 MHz, MeOD) δ / ppm 173.5 (CO), 171.6 (CO), 160.4 (CO), 160.0 (CO), 155.9 (CNH), 135.9 (C, PBA), 131.8 131.4 (C, gvanidin), 130.9, 130.0 (C, PBA), 128.6, 127.1 (CH, gvanidin), 126.9, 126.3, 125.8, 125.6, 124.8, 124.7, 124.5, 124.4 (CH, PBA), 123.1, 117.1, 114.7, 112.5 (C, PBA), 51.8 (α, Lys), 39.1 (ε, Lys), 33.0 (CH_2-1, PBA), 32.2 (CH_2-3, PBA), 31.0 (β, Lys), 27.2 (δ, Lys), 26.7 (CH_2-2, PBA), 22.2 (γ, Lys).

HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z = calc. for $\mathbf{C_{33}H_{38}N_8O_4^{2+}}$: 609,2938 $[M-H]^+$; found 609,2960 $[M-H]^+$.

Spoj **E**:

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ / ppm 12.44 (NH, gvanidin, s, 1H), 12.00 (NH, s, 1H), 9.99 (NH, hyd, s, 1H), 9.85 (NH, hyd, s, 1H), 8.85 (NH, amide, s, 1H), 8.62 (NH_2, PGA, bs, 2H), 8.46 (NH_2, PGA, bs, 2H), 8.39 (d, J = 9.3 Hz, 7H), 8.30-8.16 (m, 21H), 8.12 (dd, J = 4.1, 3.1 Hz, 9H), 8.05 (dd, J = 14.2, 6.6 Hz, 7H), 7.96 (dd, J = 7.7, 4.4 Hz, 6H), 7.53 (CH, PGA, s, 1H), 6.89 (CH, PGA, s, 1H), 3.97 (α, Gly, s, 2H), 3.38-3.29 (CH_2-3, PBA, m, 2H), 2.35 - 2.32 (CH_2-1, PBA, m, 11H), 2.10 - 2.02 (CH_2-2, PBA, m, 2H).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ / ppm 170.9 (CO), 167.8 (CO), 159.6 (CO), 159.4 (CO), 155.4 (CNH), 136.5, 132.5 (C, gvanidin), 130.9, 130.4 (CH, gvanidin), 129.3 (C, PBA), 128.2, 127.6, 127.5, 127.3 (CH, PCA), 127.3, 126.5, 126.1, 125.6, 124.9 (C, PBA), 124.9, 124.8, 124.2, 124.1, 123.6 (CH, PBA), 45.5 (α, Gly), 32.9 (CH_2-1, PBA), 32.1 (CH_2-3, PBA), 27.6 (CH_2-2, PBA).

HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z = calc. for $\mathbf{C_{29}H_{28}N_7O_4^+}$: 538,2203 $[M]^+$; found 538,2197 $[M]^+$.

Spoj **F**:

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ / ppm 12.54 (NH, gvanidin, s, 1H), 12.20 (NH, s, 1H), 8.91 (NH, amide, d, J = 6.0 Hz, 1H), 8.74 (NH_2, PGA, bs, 2H), 8.58 (NH_2, PGA, bs, 2H), 8.48 - 7.90 (CH, PMA, NH_3^+, Lys, m, 17H), 7.62 (CH, PGA, s, 1H), 6.92 (CH, PGA, s, 1H), 5.03 (CH_2, PMA, d, J = 5.2 Hz, 2H), 4.52 (α, Lys, d, J = 4.8 Hz, 1H), 2.70 (ε, Lys, s, 2H), 1.76 (β, Lys, d, J = 5.8 Hz, 2H), 1.63-1.41 (δ, γ, Lys, m, 4H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ / ppm 171.5 (CO), 159.7 (CO), 158.9 (CO), 155.6 (CNH), 132.7, 132.5 (C, PGA), 130.7, 130.3 (CH, PGA), 130.0 (C, PMA), 128.3, 127.9, 127.4, 127.3, 126.9, 126.4 (CH, PMA), 126.2, 125.5, 125.1 (C, PMA), 124.7, 123.9, 123.9 (CH, PMA), 123.1, 115.8, 113.6 (C, PMA), 52.9 (α, Lys), 38.4 (CH_2, PMA), 31.4 (ε, Lys), 30.5 (β, Lys), 26.5 (δ, Lys), 22.6 (γ, Lys).

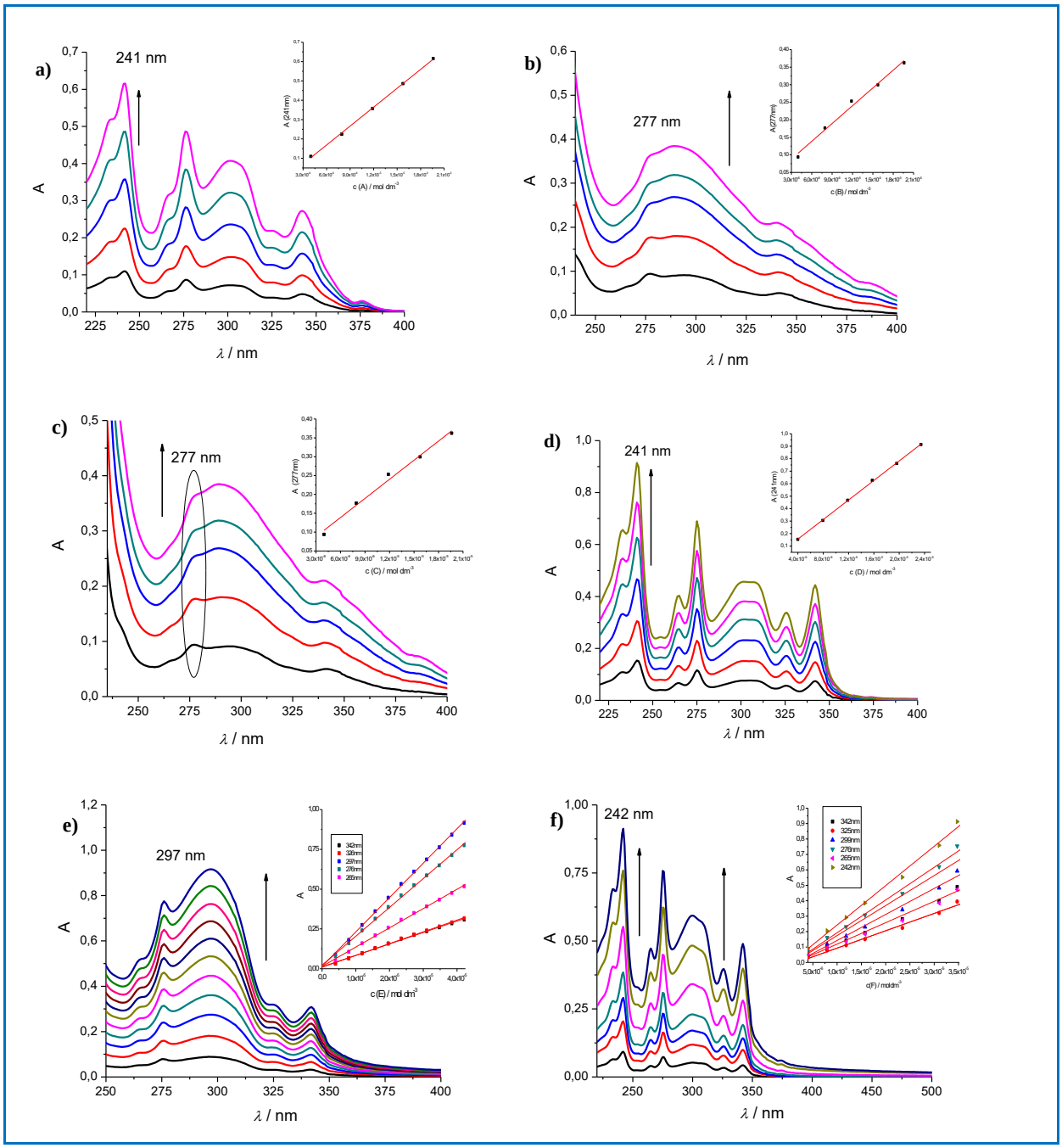
HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z = calc. for $\mathbf{C_{30}H_{33}N_7O_3^{2+}}$: 538,2567 $[M-H]^+$; found 538,2580 $[M-H]^+$.

Spoj **CIA**:

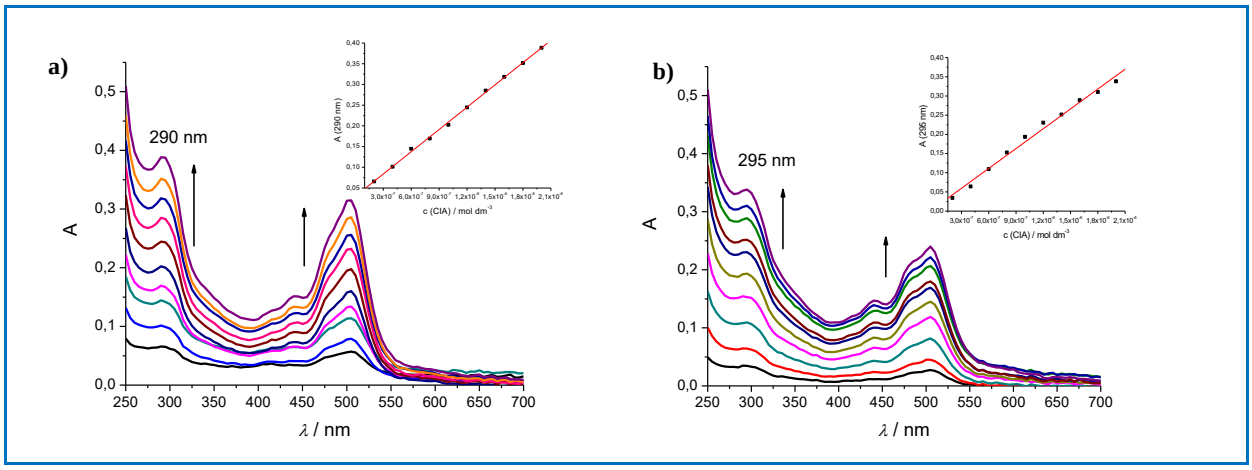
^{1}H NMR (600 MHz, DMSO) δ 12.47 (s, 1H, NH), 10.93 (s, 1H, NH), 8.84 (dd, J = 18.6, 7.6 Hz, 1H, Ar), 8.75 (d, J = 8.7 Hz, 1H, Ar), 8.71 (d, J = 7.2 Hz, 1H, Ar), 8.25-8.09 (m, 5H, Ar + NH), 8.07-8.01 (m, 2H, Ar), 7.95 (dd, J = 26.2, 17.8 Hz, 2H, Ar), 7.85-7.81 (m, 1H, Ar), 7.55 (dd, J = 8.3, 1.6 Hz, 1H, Ar), 7.43 (d, J = 7.0 Hz, 1H, Ar), 6.99 (dd, J = 4.0, 2.4 Hz, 1H, Ar), 6.87 (s, 1H, CH), 4.67 (dd, J = 15.1, 7.0 Hz, 1H, CH), 4.56-4.50 (m, 1H, CH), 4.43 (t, J = 6.7 Hz, 1H, CH), 4.23 (s, 3H, CH_3), 3.59 (s, 3H, CH_3), 3.18-3.01 (m, 2H, CH_2), 2.10-1.97 (m, 2H, CH_2), 1.87-1.63 (m, 4H, 2X CH_2) ppm.

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ 159.37, 155.94, 149.79, 145.88, 141.95, 138.51, 133.89, 132.17, 127.78, 127.32, 126.19, 124.88, 124.70, 123.59, 123.40, 121.74, 118.80, 115.68, 115.56, 109.25, 88.21, 67.21, 53.66, 52.90, 49.31, 46.43, 43.18, 27.69 ppm.

HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z calcd for $C_{35}H_{37}BrN_{10}O_4S^{2+}$ ($[M-H]^+$) 771,1825, found 771,1835.



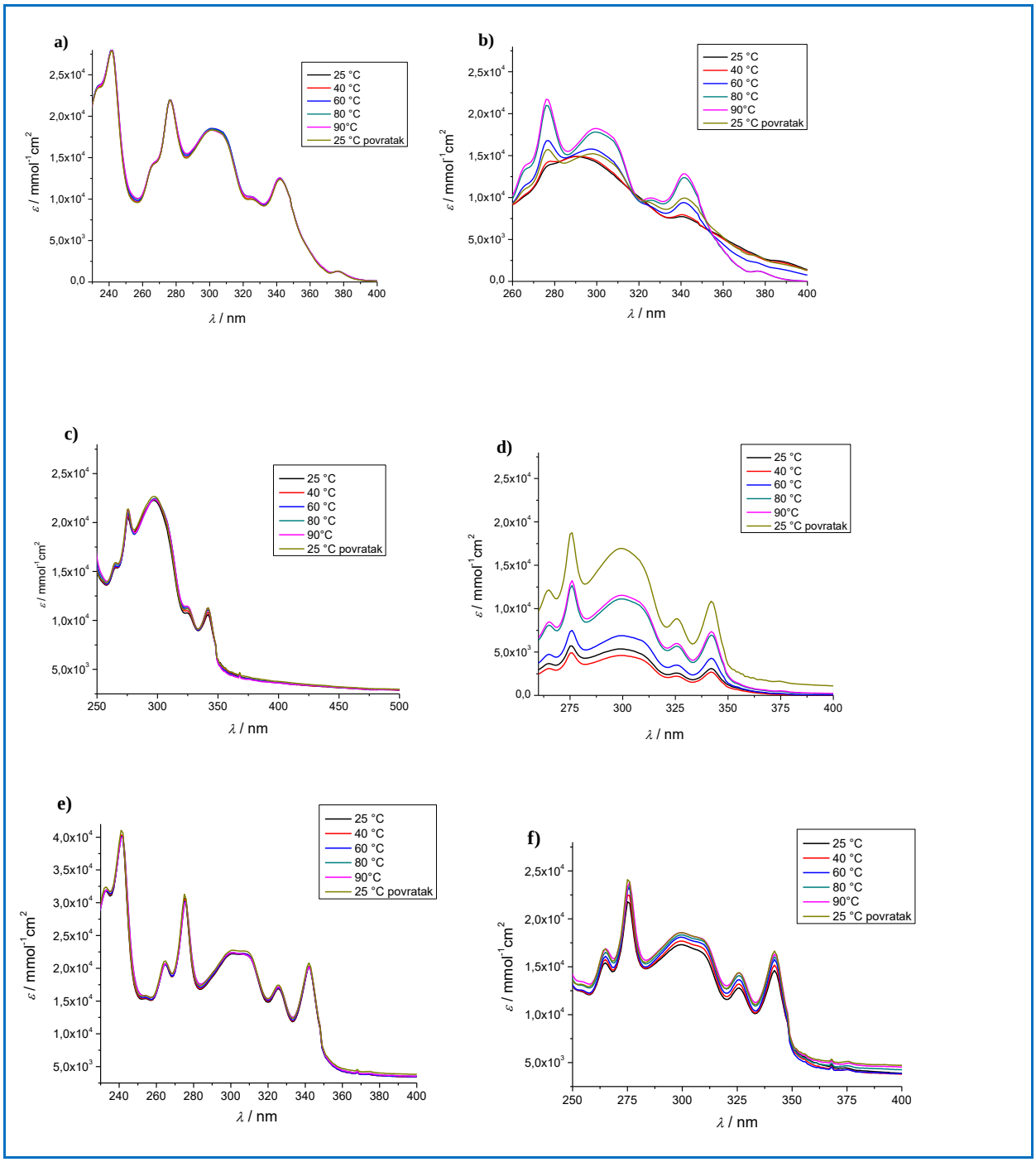
D-Slika 1. Ovisnost UV/Vis spektara o koncentraciji za novosintetizirane spojeve a) **A**; b) **B**; c) **C**; d) **D**; e) **E**; f) **F**. Umetak: Lambert-Beerova linearizacija apsorbancije (λ_{max}) u ovisnosti o koncentraciji spoja (puferska otopina natrijeva kakodilata, pH 7, I = 0,05 mol dm^{-3}).



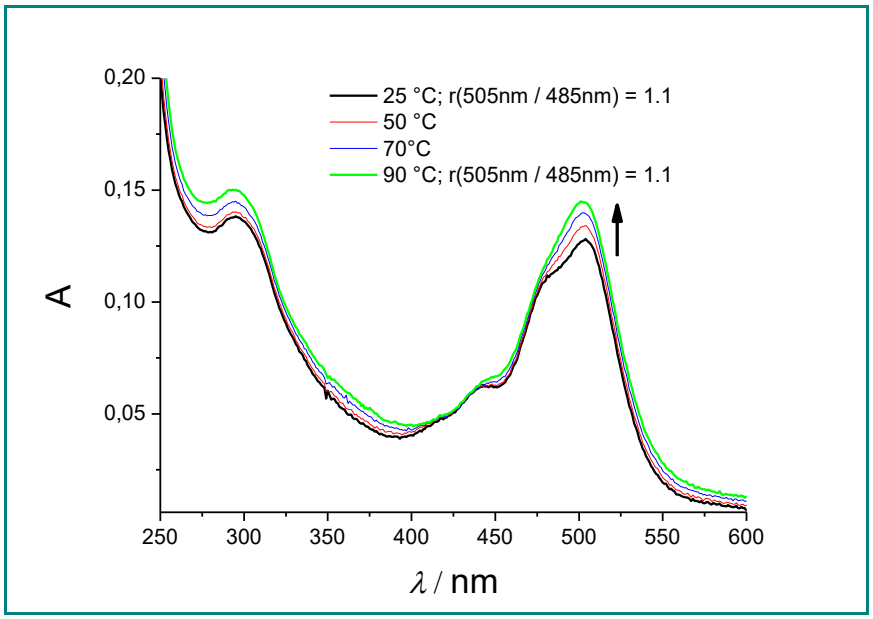
D-Slika 2. Ovisnost UV/Vis spektara o koncentraciji za novosintetizirani spoj **CIA**: a) pH = 5,0; b) pH = 7,0. Umetak: Lambert-Beerova linearizacija apsorbancije (λ_{max}) u ovisnosti o koncentraciji spoja (puferska otopina natrijeva kakodilata, I = 0,05 mol dm^{-3}).

D-Tablica 1. Podatci dobiveni obradom apsorpcijskih spektara puferskih otopina novosintetiziranih spojeva **A**-**F** (pH 7,0) i **CIA** (pH 5,0 i pH 7,0), pri 25 °C.

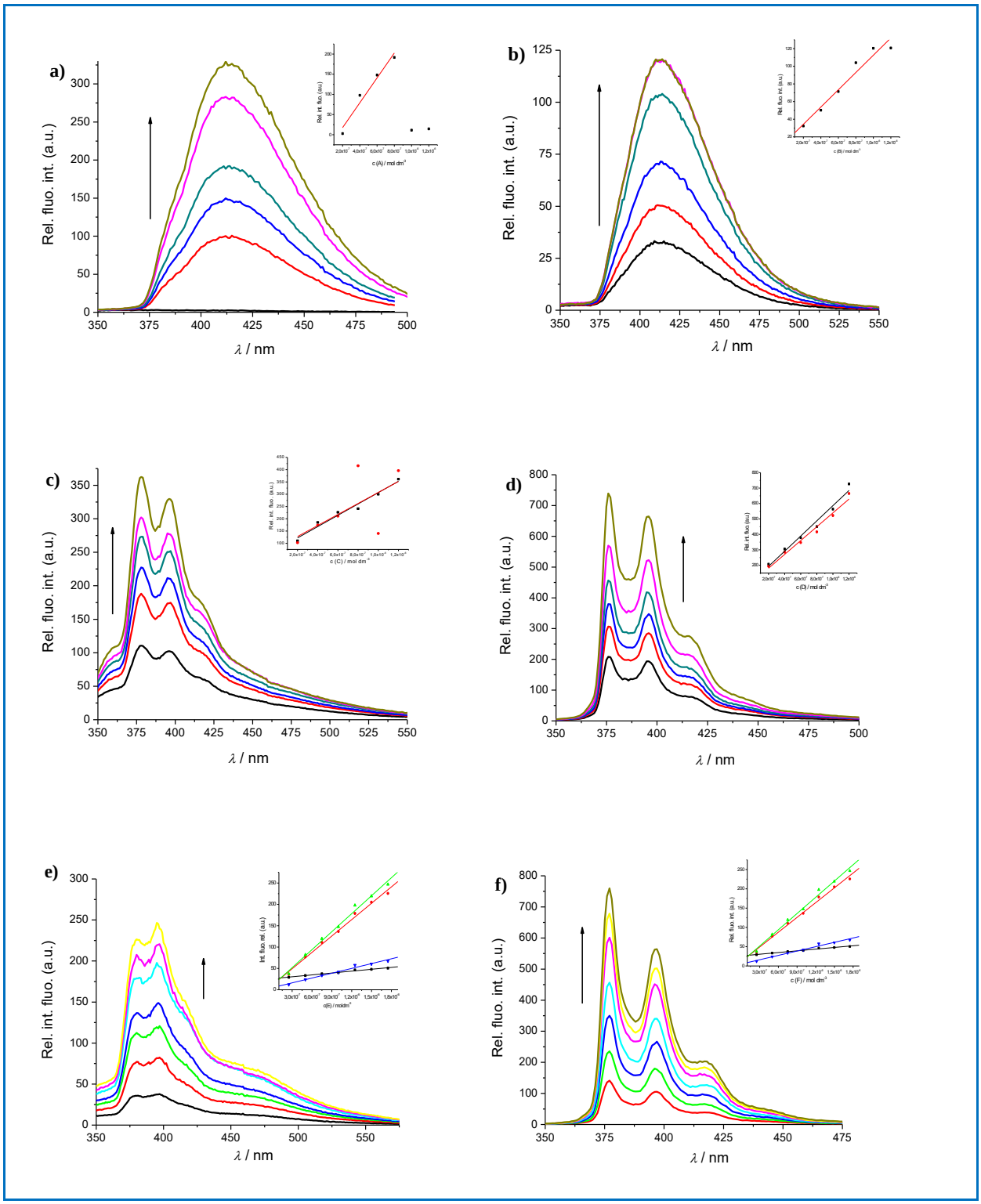
Spoj	λ_{max}/nm	$\varepsilon \times 10^3$/mmol^{-1} cm^2	Spoj	λ_{max}/nm	$\varepsilon \times 10^3$/mmol^{-1} cm^2
A	233	26,1 ± 0,4	**CIA** pH 5,0	290	48,2 ± 0,6
	241	32,6 ± 0,5		505	17,7 ± 0,6
	266	15,8 ± 0,2	**CIA** pH 7,0	295	31,0 ± 0,9
	277	24,4 ± 0,3		505	18,0 ± 0,1
	304	20,5 ± 0,3	**E**	265	12,1 ± 0,2
	326	11,1 ± 0,2		276	18,1 ± 0,2
	342	13,8 ± 0,2		297	21,6 ± 0,2
B	278	16,9 ± 1,0		326	7,4 ± 0,1
	289	18,7 ± 1,2		432	7,2 ± 0,1
	341	10,0 ± 0,4	**F**	234	19,5 ± 0,8
	387	4.0 ± 0,1		242	25,5 ± 0,9
C	267	13.5 ± 0,7		276	21,2 ± 0,8
	277	16,9 ± 1,0		299	16,8 ± 0,8
	284	18,3 ± 0,9		325	11,2 ± 0,5
	299	17.7 ± 1,0		342	13,9 ± 0,0
	341	10,0 ± 0,4			
D	233	28,2 ± 0,3	**D**	304	19,6 ± 0,2
	241	39,2 ± 0,4		326	14,5 ± 0,1
	264	17,2 ± 0,1		342	19,1 ± 0,2
	275	29,6 ± 0,3			



D-Slika 3. Ovisnost UV/Vis spektara o povećanju temperature do 95 °C i ponovnom hlađenju na 25 °C za novosintetizirane spojeve a) **A**; b) **B**; c) **C**; d) **D**; e) **E**; f) **F**.



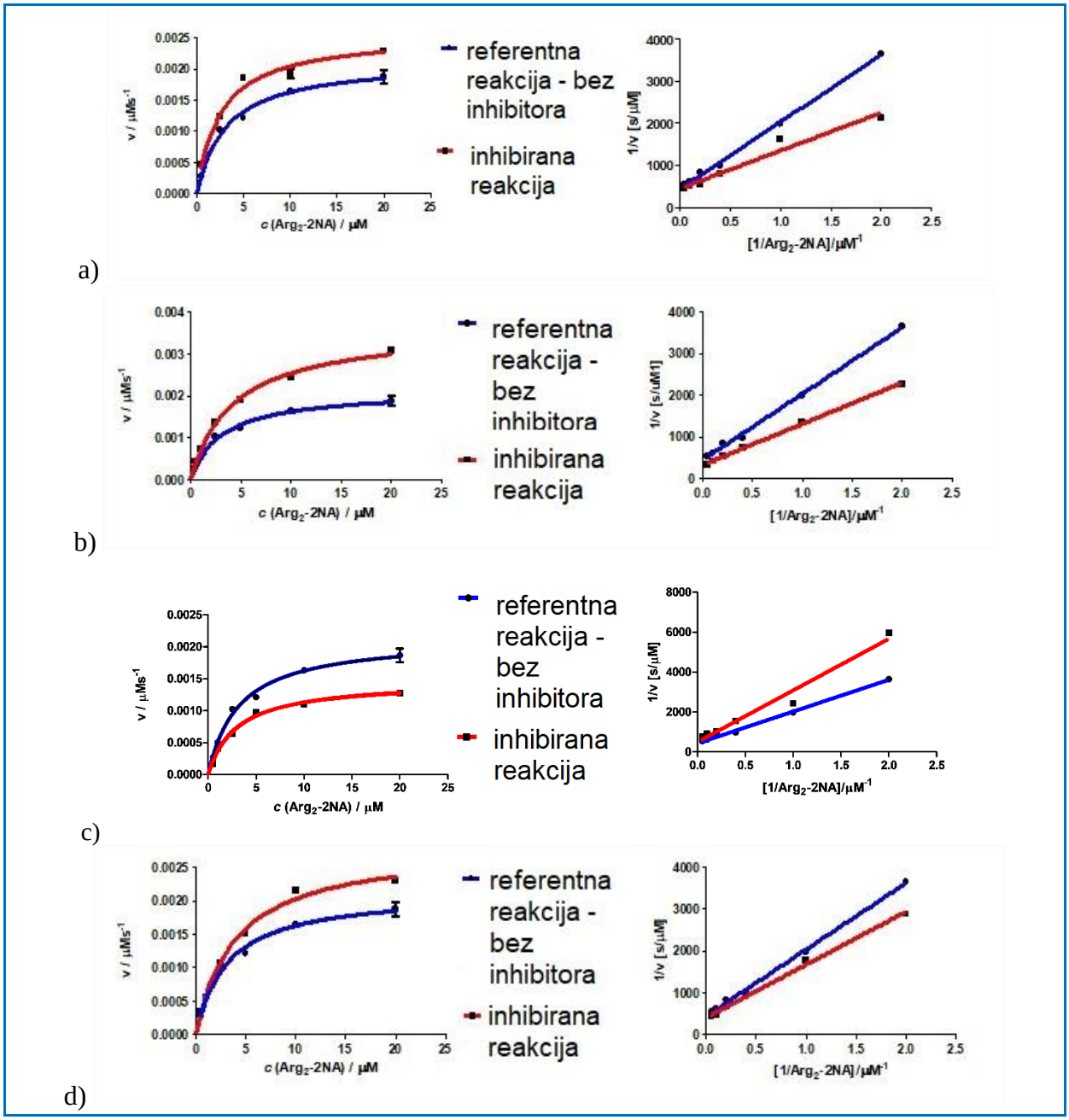
D-Slika 4. Ovisnost UV/Vis spektara o povećanju temperature do 95 °C i ponovnom hlađenju na 25 °C za novosintetizirani spoj **CIA.**



D-Slika 5. Baždarni dijagram fluorescencijskog spektra puferiranih otopina novosintetiziranih spojeva pri različitim koncentracijama spoja u otopini ($2 \times 10^{-7} - 1{,}5 \times 10^{-6}$ mol dm^{-3}): a) **A**; b) **B**; c) **C**; d) **D**; e) **E**; f) **F**. Umetak: linearizacija intenziteta (λ_{max}) u ovisnosti o koncentraciji spoja (puferska otopina natrijeva kakodilata, pH 7, I = 0,05 mol dm^{-3}) pri 25 °C.

D-Tablica 2. Podatci dobiveni obradom eksperimentalnih rezultata Michaelis-Menten kinetika u GraphPad-u.

	Arg_2 – 2NA	A	B	C	D	E	F	CIA
Otapalo		H_2O	DMSO	H_2O	DMSO	DMSO	H_2O	H_2O / DMSO
c (spoj) / μM	0	0,001	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
K_m/μM	3,2 ± 0,3	2,6 ± 0,3	4,3 ± 0,3	2,9 ± 0,2	3,3 ± 0,1	4,0 ± 0,3	2,7 ± 0,1	5,2 ± 0,6
v_{max} x10^3/μMs^{-1}	2,14 ± 0,07	2,56 ± 0,08	3,63 ± 0,08	1,45 ± 0,04	1,73 ± 0,02	2,83 ± 0,07	1,57 ± 0,02	2,3 ± 0,1
k_{cat}/s^{-1}	21,4 ± 0,7	25,6 ± 0,3	36,3 ± 0,8	14,5 ± 0,4	17,3 ± 0,2	28,3 ± 0,7	15,7 ± 0,2	22,6 ± 0,1
K_I	–	–	–	–	295 ± 35 nM	–	335 ± 32 nM	228 ± 53 nM
Tip inhibicije	referentna reakcija	–	–	–	nekompetitivna inhibicija	–	akompetitivna inhibicija	kompetitivna inhibicija

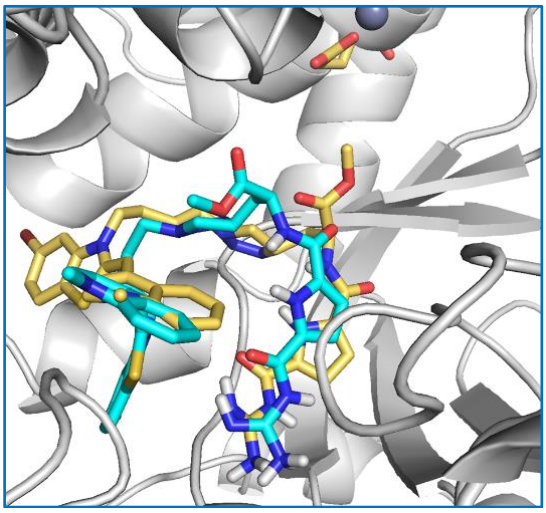


D-Slika 6. Grafički prikaz rezultata dobivenih provedbom eksperimenata Michaelis-Menten kinetika za odabrane novosintetizirane spojeve: a) **A**; b) **B**, c) **C**; d) **E**; *lijevo*-Michaelis-Menten graf; *desno*-linearizacija dobivenih rezultata kroz Lineweaver-Burk linearizaciju u programu GraphPad.

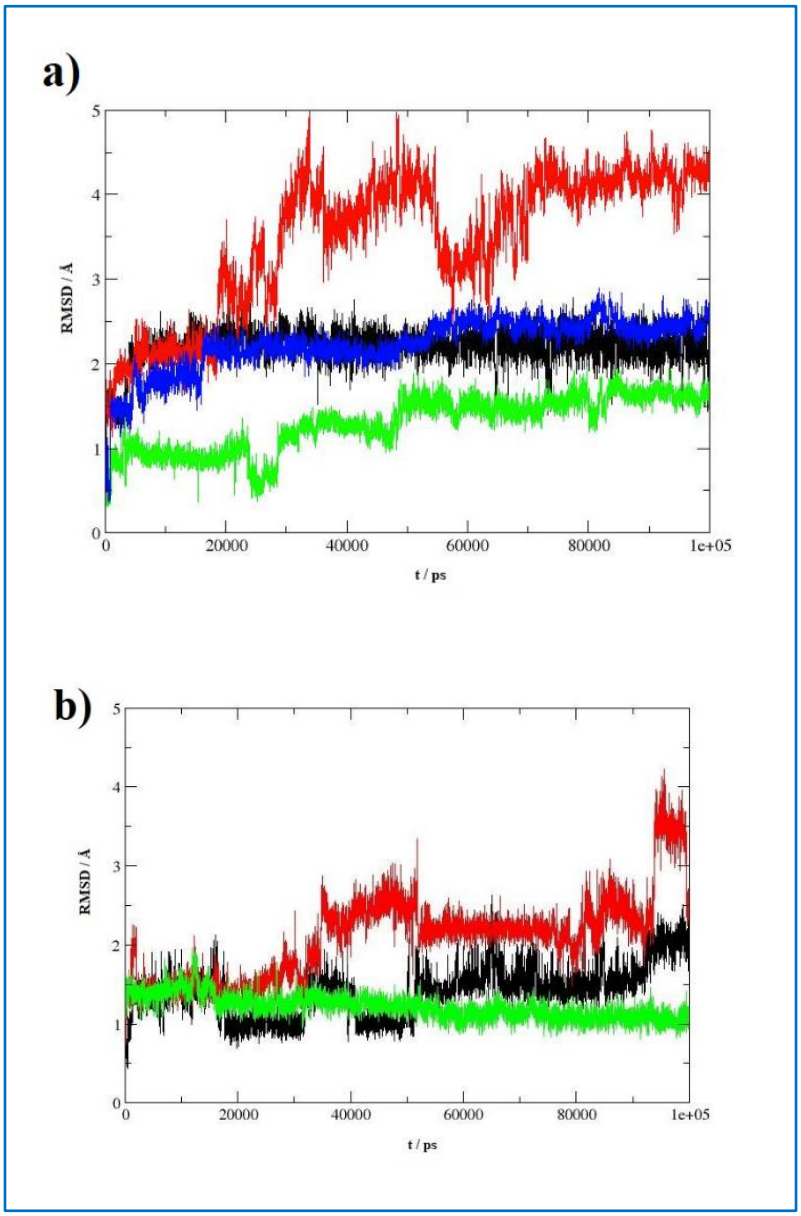
D-Tablica 3. Odabrani kompleksi i informacije dobivene računalnim istraživanjem; kompleksi novosintetiziranih spojeva s mutantom E451A (ljubičasta), kompleksi s hDPP III (zelena).

Sustav	vrijeme simulacije / ns	Rgyr / Å[a]	ΔE_{MMPBSA} / kJ mol^{-1}
E451A −**A**-mod1	100	27,8	–180 ± 21
E451A −**A**-mod2	100	27,8	–243 ± 18
E451A −**D**-mod1	150	26,2	–203 ± 14
E451A −**D**-mod2	100	26,9	–223 ± 22
E451A −**D**-mod3	101	27,2	–212 ± 16
E451A-**E**-mod1	100	27,1	–230 ± 18
E451A-**E**-mod2	100	27,1	–236 ± 17
E451A-**F**-mod1	100	26,2	–246 ± 16
E451A-**F**-mod2	104	26,9	–238 ± 17
E451A-**CIA**-mod1	102	26,5	–154 ± 17
E451A-**CIA**-mod2	100	27,4	–205 ± 17
E451A-**CIA**-mod3	100/**190**	26,6/26,7	213/–**263** ± 16
WT −**F**-mod1	160	26,39	–205 ± 16
WT −**F**-mod2	130	26,9	–188 ± 13
WT −**F**-mod3	150	26,4	-255± 21
WT-**CIA**-mod1	100	27,5	–293 ± 17
WT-**CIA**-mod2	100	27,0	-192± 17
WT-**CIA**-mod3	100	26,5	–514 ± 17
WT– **CIA**-mod4	100	27,0	–276 ± 17

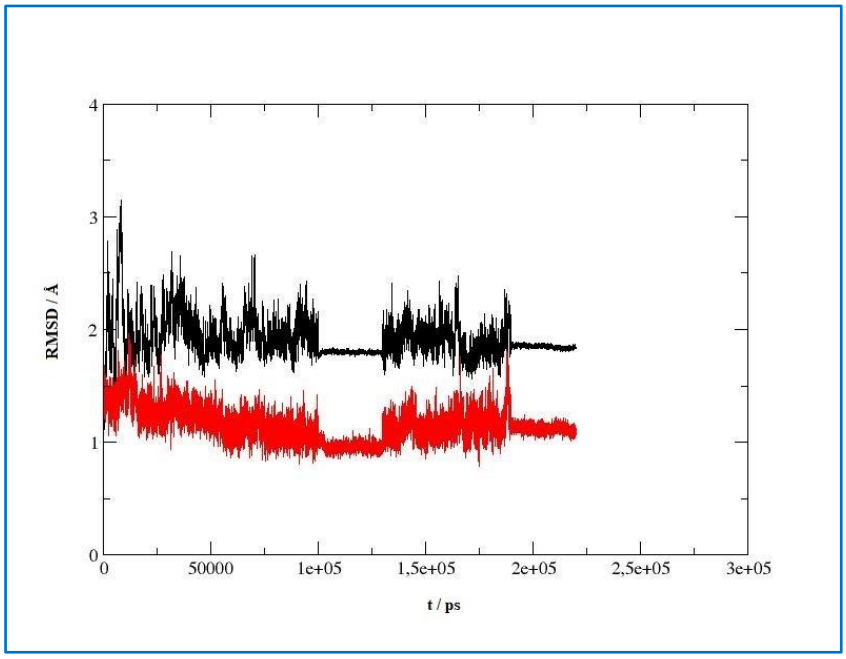
[a] Prosječna vrijednost kroz zadnjih 10 ns



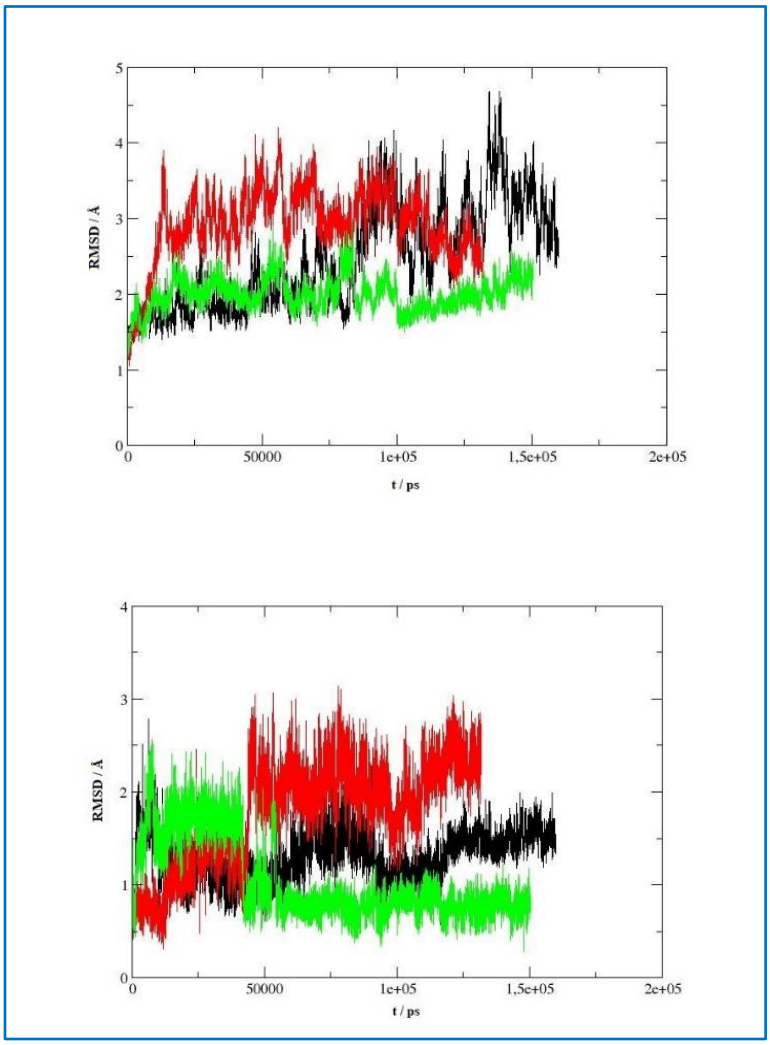
D-Slika 7. Usporedba kompleksa hDPP III-**CIA**-M3 (žuti) i E451-**CIA**-M3 (cian) određenih programom AUTODOCK4.2.6.



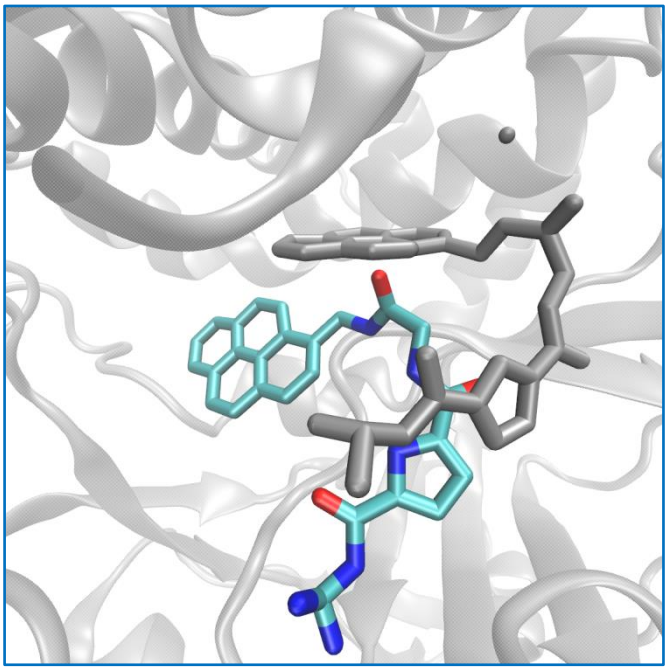
D-Slika 8. Izračunata RMSD vrijednost za atome liganda (sve osim vodika) tijekom MD simulacija: a) hDPP III-**CIA** (M1-M4) kompleksa; b) E451A-**CIA** (Ml-M3) kompleksi. Svaki od modova je označen svojom bojom kako slijedi: M1 (crna), M2 (crvena), M3 (zeleni) i M4 (plavi).



D-Slika 9. Izračunata RMSD vrijednost za protein (crno) i ligand (crveno) tijekom 200 ns MD simulacija kompleksa E451A-**CIA**-M3. RMSD je izračunat za isti izbor atoma kao što je navedeno na slici 28 odnosno D-slici 7.



D-Slika 10. Izračunata RMSD vrijednost tijekom 100 ns MD simulacija hDPP III-**F** kompleksa (M1 - crno, M2 - crveno i M3 - zeleno): a) za atome glavnog lanca/okosnice proteina (C, CA, N) i b) za atome liganda (sve osim vodika).



D-Slika 11. Usporedba struktura kompleksa hDPP III-**F** (siva) i E451A-**F** (cian) dobivenih nakon 100 ns MD simulacija.

D-Tablica 4. Populacija vodikovih veza (%) koje doprinose stabilizaciji spojeva vezanih za E451A u njihovom najpovoljnijem načinu vezanja tijekom MD simulacija.

	A	D	E	F	CIA
Glu329[a]	77	127	86	172	183
Glu316 [a]	24	57	82	3	0
Glu327 [a]	130	0	44	110	62
Gly389 [a]	47	0	50	22	0
Gly385 [a]	0	21	7	24	10
Ser384 [a]	0	0	0	5	39
Phe328 [a]	60	0	0	0	0
Pro387 [a]	43	0	0	0	0
Gln566 [a]	0	26	0	0	0
Tyr318 [a]	0	14	0	0	0
Ala388 [a]	0	0	21	0	0
Asp396 [a]	0	0	14	0	0
Ile386 [a]	0	0	13	0	0
Gln566[d]	2	17	0	0	0
Glu316[d]	0	4	0	8	0
Hip568[d]	0	0	0	23	5
Gln568[d]	0	6	0	0	0
Gly389[d]	0	0	2	0	0
Asn391[d]	0	0	0	64	0

[a] akceptor; [d] donor

D-Tablica 5. Populacija vodikovih veza (%) koje doprinose stabilizaciji spojeva vezanih za hDPP III (divlji tip) u njihovom najpovoljnijem načinu vezanja tijekom MD simulacija.

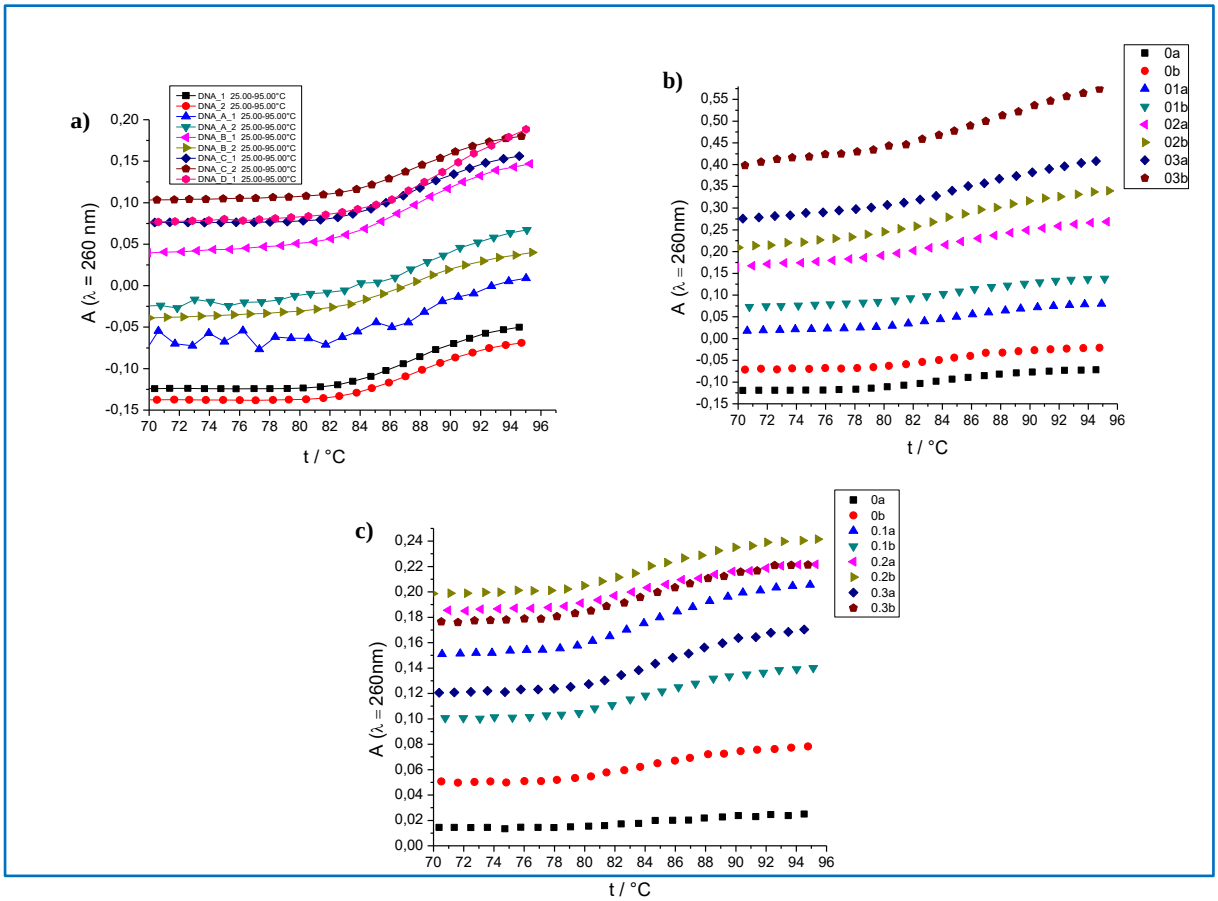
	F	CIA
Glu329 [a]	175	158
Glu327 [a]	73	69
Ser384 [a]	28	26
Gly385 [a]	11	16
Gln556 [a]	10	0
Hip568 [a]	6	0
Asn391 [a]	2	0
Asn391 [d]	57	44
Gln566 [d]	3	16
Hip568 [d]	51	0
Ala388 [d]	6	0

[a] akceptor; [d] donor

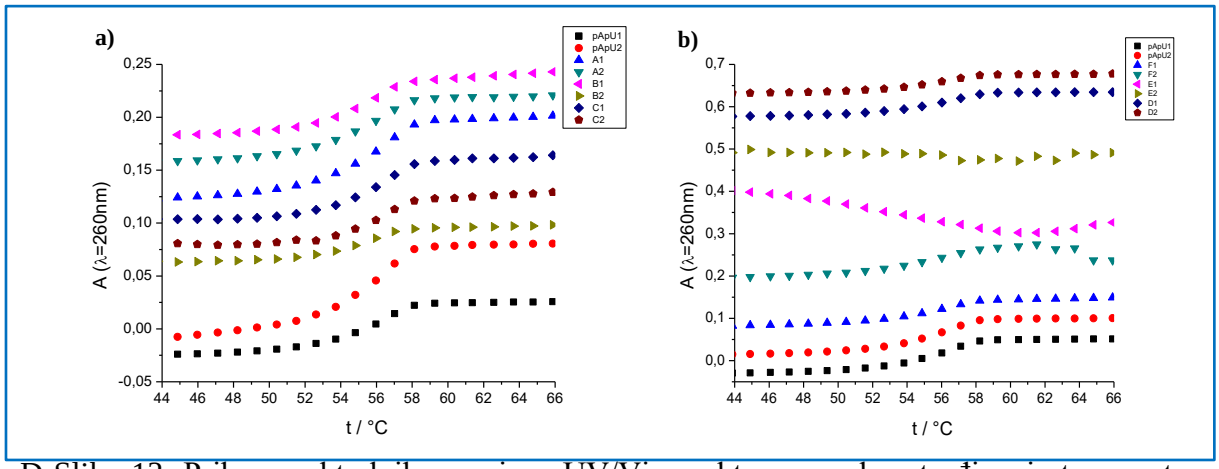
D-Tablica 6. Volumeni dodataka (ΔV) ishodišnih otopina novosintetiziranih spojeva **A-F** (c_0 = 1×10^{-3} mol dm^{-3}), omjer prema dvolančanom polinukleotidu (ctDNA odnosno pApU) pripadni stehiometrijski omjer r, u puferu natrijeva kakodilata, pri pH 7,4, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C.

N	ΔV(spoja)/µl	V(spoja)$_{TOT}$/µl	r
1.	0	0	0
2.	4	4,0	0,10
3.	4	8,0	0,20
4.	4	12,0	0,30
5.	4	16,0	0,40
6.	4	20,0	0,50

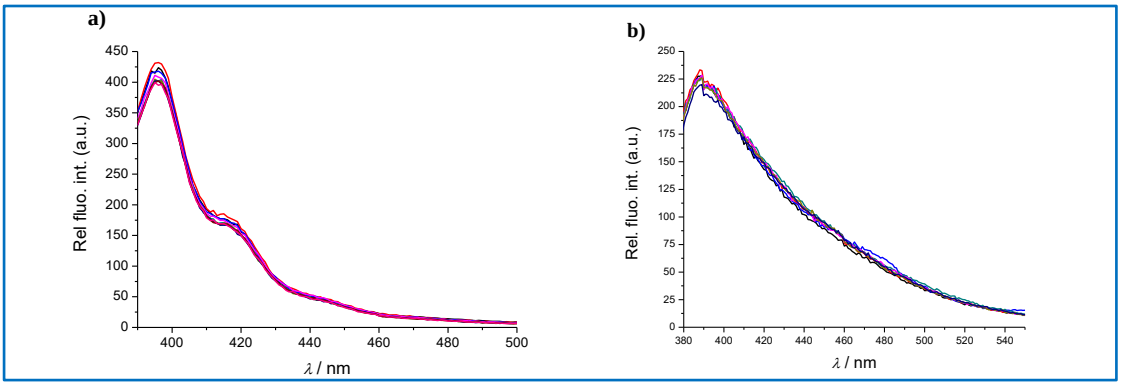
r = [spoj] / [dl polinukleotid]



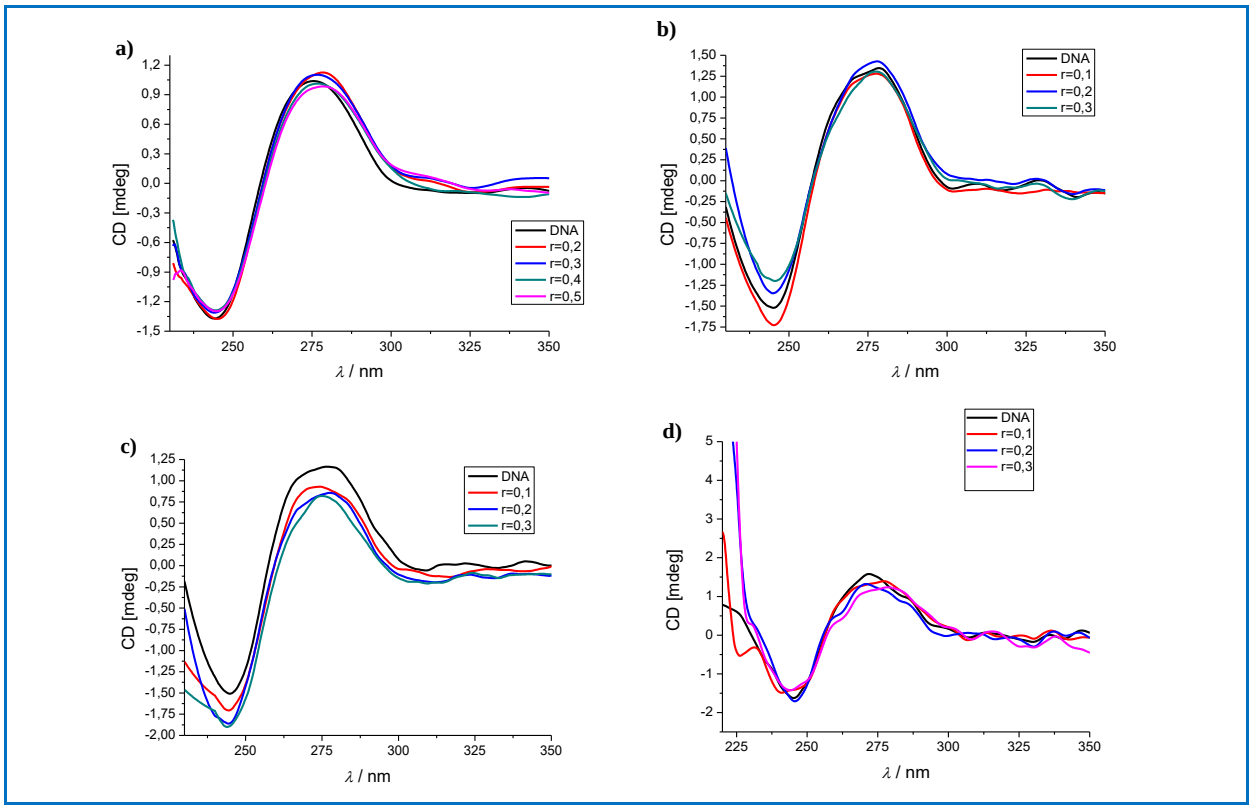
D-Slika 12. Prikaz spektralnih promjena UV/Vis spektara u svrhu utvrđivanja temperaturne stabilnosti ctDNA (c = 2×10^{-5} mol dm^{-3}) i odgovarajućeg novosintetiziranog spoja: a) **A-D** (r = 0,3); b) **E** (r = 0-0,3); c) **F** (r = 0-0,3) pri pH 7,4, I = 0,05 mol dm^{-3}. r = [spoj] / [ctDNA]



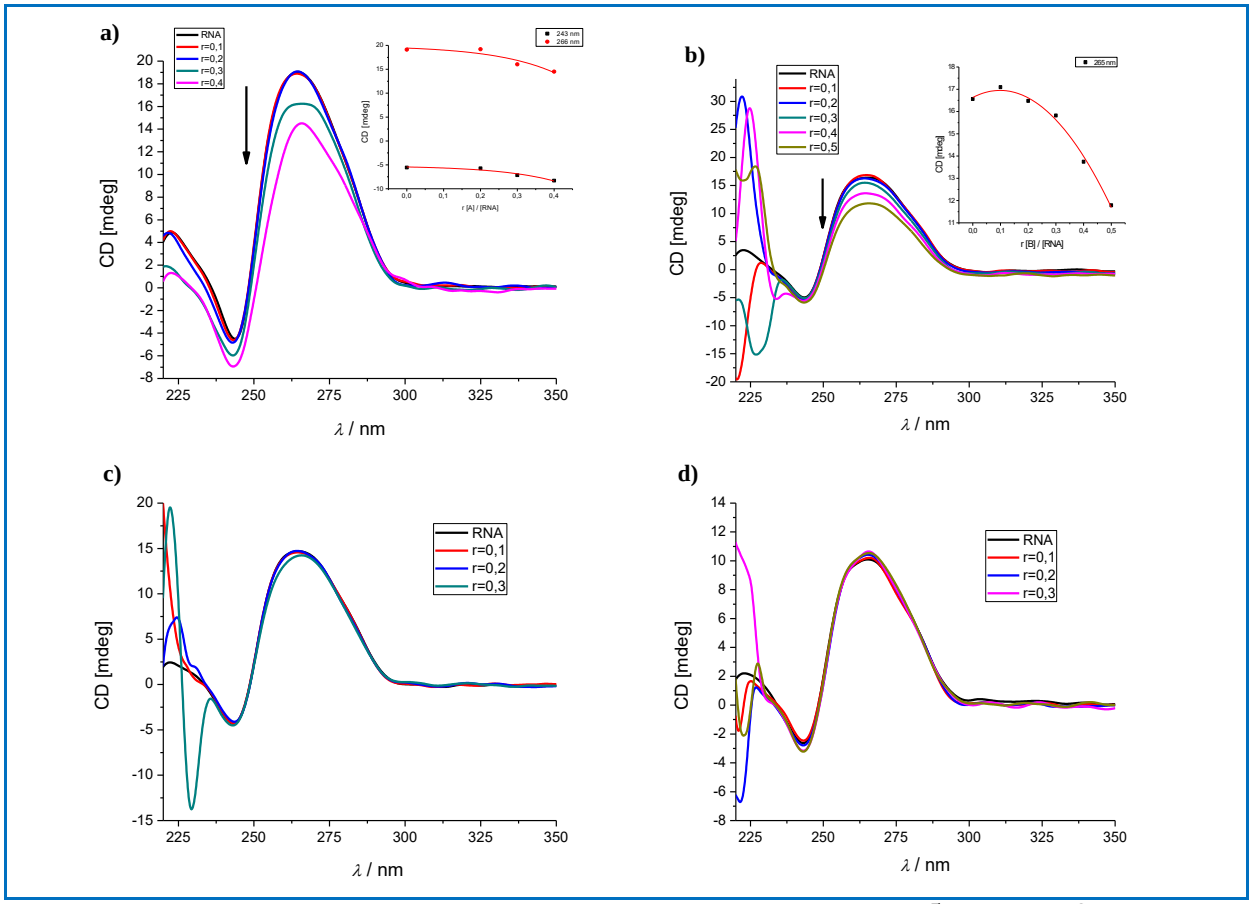
D-Slika 13. Prikaz spektralnih promjena UV/Vis spektara u svrhu utvrđivanja temperaturne stabilnosti pApU (c = 2,5 × 10^{-5}mol dm^{-3}) i odgovarajućeg novosintetiziranog spoja: a) **A**, **B** i **C**; b) **D**, **E** i **F**; (r = 0,3) pri pH 7,4, I = 0,05 mol dm^{-3}. r = [spoj] / [pApU]



D-Slika 14. Promjene fluorescencijskih spektara puferskih otopina novosintetiziranih spojeva: a) **E**; (c = 2 × 10^{-7} mol dm^{-3}; pH 7,4; I = 0,05 mol dm^{-3}) pri različitim koncentracijama dodanih alikvota ishodišne otopine ctDNA (c_0 = 5,26 × 10^{-3} mol dm^{-3}), koncentracijski raspon polinukleotida je bio $c \approx 2 \times 10^{-7}$ mol dm^{-3}- 2 × 10^{-6}mol dm^{-3}; b) **F**; (c = 2 × 10^{-7} mol dm^{-3}; pH 7,4; I = 0,05 mol dm^{-3}) pri različitim koncentracijama dodanih alikvota ishodišne otopine pApU (c_0 = 4,5 × 10^{-3} mol dm^{-3}); koncentracijski raspon polinukleotida je bio $c \approx 1{,}2 \times 10^{-6}$ mol dm^{-3}- 1,6 × 10^{-4} mol dm^{-3}; pri 25 °C, λ_{exc} = 342 nm, slitovi 10 – 10, inkubacijsko vrijeme 10 sekundi.



D-Slika 15. Promjene CD spektara otopine ctDNA (c_{DNA} = 2 × 10^{-5} mol dm^{-3}), u puferu natrijeva kakodilata, pri pH 7,4, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C, λ_{exc} = 342 nm, slitovi 10 – 10, inkubacijsko vrijeme 0 sekundi, s dodatkom novosintetiziranog spoja: a) **A**; b) **B**; c) **C**; d) **F**; u navedenom pripadnom stehiometrijskom omjeru *r*.



D-Slika 16. Promjene CD spektara otopine pApU (c_{RNA} = 2,5 × 10^{-5} mol dm^{-3}), u puferu natrijeva kakodilata, pri pH 7,4, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C, λ_{exc} = 342 nm, slitovi 10 – 10, inkubacijsko vrijeme 0 sekundi, s dodatkom novosintetiziranog spoja: a) **A**; b) **B**; c) **C**; d) **F**; u navedenom pripadnom stehiometrijskom omjeru *r*.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Mirsada Ćehić rođena je u Zagrebu 21. listopada 1985. godine. Osnovnu školu Velika Mlaka završila je u Velikoj Mlaki-Velika Gorica, a potom je upisala i završila XV. gimnaziju u Zagrebu. Paralelno s osnovnom i srednjom školom, završila je i Umjetničku školu Franje Lučića u Velikoj Gorici, gudački odsjek: violina. Osim navedenoga pohađala je nekoliko dodatnih škola, poput Poslovnog učilišta Experta u Zagrebu-smjer MPM, te škole jezika (engleski, njemački, francuski i arapski jezik).

Preddiplomski studij kemije pri Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2010., a završila 2013. godine sa završnim radom na Zavodu za fizikalnu kemiju „*Jednadžbe stanja realnih plinova*“ pod vodstvom prof. dr. sc. V. Tomišić i doc. dr. sc. J. Požar. Potom je 2013. godine upisala diplomski studij istraživačkog smjera s odabranim granama kemije-fizikalna i organska kemija, te je srpnju 2015. godine diplomirala je na Zavodu za organsku kemiju s radom „*Priprava novih 2-supstituiranih derivata imidazola*“ pod vodstvom prof. dr. sc. I. Primožič.

Poslijediplomski studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Zavod za fizikalnu kemiju, upisuje 2015. godine i nezaposlena je osoba. Kao asistentica sudjelovala je u izvođenju nastave nekoliko praktikuma na Zavodu za organsku kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta kao vanjski suradnik kako bi na taj način odradila školarinu postdiplomskog studija u vremenskom trajanju od ožujka 2016. do veljače 2019. godine. Tijekom svog rada na Institutu Ruđer Bošković je volontirala na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju.

Znanstvene publikacije:

1. M. Ćehić, J. Suć, Z. Karačić, P. Piotrowski, T. Šmidlehner, I. Jerić, C. Schmuck, I. Piantanida, S. Tomić, Guanidiniocarbonylpyrrole-fluorophore conjugates as theragnostic tools for DPP III monitoring and inhibition, rad prihvaćen u Journal of Biomolecular Structure & Dynamics dana 28.08.2019.
2.

Sudjelovanja na skupovima, radionicama i tečajevima:

1. Mirsada Ćehić, Josipa Suć, Ivanka Jerić, Ivo Piantanida, Sanja Tomić, Carsten Schmuck Experimental study of new guandiniocarbonyl-pyrrole-aryl conjugates as potential inhibitors of human dipeptidyl peptidase III // EFMC-YMCS 2017 (poster), *4th EFMC Young Medicinal Chemist Symposium Wien*, Austrija, 2017.

2. Mirsada Ćehić, Josipa Suć, Ivanka Jerić, Ivo Piantanida, Sanja Tomić, Carsten Schmuck, Experimental study of new guandiniocarbonyl-pyrrole-aryl conjugates as potential inhibitors of human dipeptidyl peptidase III Eksperimentalni studij novih guvanidinokarbonil-pirol-aril derivata kao potencijalnih inhibitora humane dipeltidil peptidaze III (poster), *25. HSKIKI*, Poreč, 2017.

3. Mirsada Ćehić, Mario Špadina, Atiđa Selmani, Marija Zbačnik, Surface properties of the TiO2 nanowires (predavanje), *X. Meeting of Young Chemical Engineers*, FKIT, Zagreb, 2014.

4. NMR Pharma Day, Zagreb, 2017 (Znanstveni skupovi i radionice, Bez priopćenja)

5. 17th International Chromatography School (ICS), Zagreb, Hrvatska, 2017 (Znanstveni skupovi i radionice, Bez priopćenja)

6. 18th International Chromatography School (ICS), Zagreb, Hrvatska, 2018 (Znanstveni skupovi i radionice, Bez priopćenja)

7. 3. Okrugli stol „Postupci patentiranja u području biotehnologije“, Zagreb, Hrvatska, 2017 (Znanstveni skupovi i radionice, Bez priopćenja)