

Uloga dipeptidil-peptidaze III u oksidacijskom stresu

Matić, Sara

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:768164>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Sara Matić

Uloga dipeptidil-peptidaze III u oksidacijskom stresu

DOKTORSKI RAD

Mentorice:
dr. sc. Sanja Tomić,
dr. sc. Mihaela Matovina

Zagreb, 2021



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Sara Matić

Role of dipeptidyl peptidase III in oxidative stress response

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:
Sanja Tomić, PhD
Mihaela Matovina, PhD

Zagreb, 2021

Ova disertacija izrađena je u Laboratoriju za biokemiju proteina i molekulsko modeliranje Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Sanje Tomić i dr. sc. Mihaele Matovine, u sklopu Sveučilišnog doktorskog studija kemije pri Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Iskreno zahvaljujem svojim mentoricama dr. sc. Sanji Tomić i dr. sc. Mihaeli Matovini na predanom vodstvu, potpori te na bogatom znanju koje su mi je prenijele tijekom izrade ove doktorske disertacije.

Također, zahvaljujem svim članicama i članovima Laboratorija za biokemiju proteina i molekulsko modeliranje na svim mudrim savjetima, motivaciji i prijateljskoj radnoj atmosferi.

Veliko hvala mojoj majci, prijateljicama i prijateljima na bezuvjetnoj podršci, kako u izradi ovog rada, tako i u ostalim životnim ciljevima.

Znanost je za mene oduvijek bila oduševljenje, nepresušan izvor spoznaja, prozor u svijet u kojem živimo, ali znanost sama nije dovoljna da na taj svijet i utječemo. Zato, kada zatvorimo korice ovog rada, učinimo nešto da svijet učinimo boljim.

Sadržaj

SAŽETAK.....	XI
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Cilj i opseg istraživanja	2
§ 2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Molekulske interakcije	4
2.2. Molekulsko modeliranje	7
2.2.1. Početni sustav	7
2.2.2. Modeliranje solvatacije.....	8
2.2.3. Potencijalna energija	9
2.2.4. Molekulska dinamika	10
2.2.5. Termodinamička svojstva.....	11
2.2.6. Vremenska integracija	13
2.3. Eksperimentalne metode proučavanja makromolekula.....	14
2.3.1. Lančana reakcija polimeraze, PCR	14
2.3.2. Metode izolacije i karakterizacije proteina.....	15
2.3.2.1. Gel-filtracijska kromatografija	15
2.3.2.2. Afinitetna kromatografija	16
2.3.2.3. Elektroforeza	16
2.3.3. Proteinska kristalografija	17
2.3.4. Raspršenje X-zraka pod malim kutom, SAXS.....	17
2.3.5. Dinamičko raspršenje svjetlosti, DLS.....	18
2.3.6. Spektroskopija cirkularnog dikroizma, CD.....	19
2.3.7. Enzimska kinetika.....	19
2.3.8. Izotermna titracijska kalorimetrija, ITC	21
2.3.9. Termoforeza, MST.....	23
2.4. Dipeptidil-peptidaza III.....	27
2.5. Signalni put odgovora na oksidacijski stres.....	31
§ 3. MATERIJALI I METODE.....	38
3.1. Pretraživanje baze podataka cBioPortal	38
3.2. Metode molekulskog modeliranja	38
3.2.1. Parametrizacija i simulacije MD	38

3.2.2. Konstrukcija domene KelchC.....	39
3.2.3. Vezanje petlje ETGE DPP III na Kelch	40
3.2.4. Odvajanje petlje ETGE DPP III	40
3.2.5. Struktura kompleksa za simulacije MD.....	41
3.2.6. Uvođenje mutacija u proteinske strukture	41
3.2.7. Analiza rezultata	41
3.2.7.1. MM-PBSA i MM-GBSA račun slobodne energije	42
3.3. Eksperimentalni dio	43
3.3.1. Materijali i oprema	43
3.3.2. Metode.....	45
3.3.2.1. Ekspresijski vektori i mutageneza	45
3.3.2.2. Transformacija bakterija i ekspresija proteina.....	47
3.3.2.3. Pročišćavanje proteina.....	47
3.3.2.4. Analiza proteina elektroforezom na gelu	48
3.3.2.5. Proteinska stabilnost u otopini.....	48
3.3.2.6. Cirkularni dikroizam, CD.....	48
3.3.2.7. Peptidi petlje ETGE DPP III.....	49
3.3.2.8. Kristalografska struktura domene Kelch s peptidom ETGE DPP III.....	49
3.3.2.9. Mjerenja SAXS za kompleks DPP III-Kelch.....	49
3.3.2.10. Analiza enzimske aktivnosti i određivanje kinetičkih parametara DPP III.....	49
3.3.2.11. Izotermna titracijska kalorimetrija, ITC	50
3.3.2.12. MST i fluorescencijska promjena uslijed vezanja	51
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	53
4.1. Odabir mutacija u bazi cBioPortal.....	53
4.2. Molekulsko modeliranje strukture kompleksa Kelch – DPP III	56
4.2.1. Simulacije MD s prethodno objavljenim modelom kompleksa	56
4.2.2. Modeliranje strukture kompleksa domene Kelch s petljom ETGE DPP III.....	58
4.2.3. Modeliranje domene KelchC.....	62
4.3. Kristalografsko određivanje strukture kompleksa Kelch – ETGE peptid.....	63
4.4. SAXS analiza kompleksa Kelch – DPP III	64
4.5. Simulacije MD s novim modelom kompleksa Kelch – DPP III	65
4.5.1. Simulacije MD varijanti DPP III s mutacijama u strukturiranom dijelu.....	68
4.5.2. Kompleksi Kelch – DPP III s varijantama DPP III pronađenim u bazi cBioPortal.....	70
4.5.3. Proučavanje utjecaja mutacija domene Kelch na vezanje peptida ETGE.....	77
4.5.4. Proučavanje utjecaja mutacija domene Kelch na vezanje DPP III	80
4.6. Priprema proteina za eksperimentalna istraživanja.....	83

4.6.1. Ekspresija, pročišćavanje i analiza proteina	83
4.6.2. Utjecaj reducensa na oligomerizacijsko stanje Kelch-a	85
4.6.3. Ispitivanje vezanja domene Kelch DT s DPP III DT i njenim varijantama, s mutacijama u motivu ETGE, nativnom PAGE.....	86
4.7. Ispitivanje struktura proteina i njihovih kompleksa DLS-om.....	87
4.8. Cirkularni dikroizam.....	92
4.9. Peptidazna aktivnost mutiranih varijanti DPP III	93
4.10. ITC mjerenja vezanja Kelch – peptid ETGE DPP III.....	93
4.11. ITC mjerenja vezanja Kelch – DPP III.....	95
4.12. Proučavanje utjecaja mutacija domene Kelch na vezanje peptida ETGE ITC-om	96
4.13. Proučavanje utjecaja mutacija domene Kelch na afinitet vezanja Kelch – DPP III MST- om	100
4.14. Proučavanje utjecaja mutacija DPP III na afinitet vezanja Kelch – DPP III MST-om....	101
§ 5. ZAKLJUČAK	105
§ 6. POPIS KRATICA.....	107
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	108
§ 8. ŽIVOTOPIS	XV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

ULOGA DIPEPTIDIL-PEPTIDAZE III U OKSIDACIJSKOM STRESU

Sara Matić
Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, Zagreb

Razvoj bolesti često je posljedica deregulacije staničnih signalnih putova. Proučavanje interakcija protein-protein kombinacijom eksperimentalnih i računalnih pristupa omogućuje razumijevanje tih staničnih procesa na molekulskoj razini. Signalni put KEAP1 – NRF2, ključan za citoprotektivni odgovor i preživljavanje stanica, često je dereguliran u stanicama raka. KEAP1 je stanični senzor oksidacijskog stresa i represor transkripcijskog faktora NRF2. U uvjetima oksidacijskog stresa dipeptidil-peptidaza III (DPP III) se može kompetitivno vezati na KEAP1 i inducirati oslobađanje NRF2, što potiče antioksidacijski odgovor putem transkripcije citoprotektivnih gena. Korištenjem simulacija molekulske dinamike te izotermne titracijske kalorimetrije i termoforeze proučavan je mehanizam vezanja KEAP1 – DPP III, kako za divlji tip proteina, tako i za mutirane varijante pronađene u stanicama raka. Razumijevanje strukturnih i energetskih učinaka mutacija na brzinu i afinitet vezanja KEAP1 i DPP III u konačnici pojašnjava na koji način navedene mutacije mogu modificirati odgovor stanica raka na kemoterapiju i preživljavanje oksidacijskog stresa.

(115 stranica, 53 slike, 25 tablica, 81 literaturni navod, 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: DPP III / KEAP1 / proteinske interakcije / simulacije molekulske dinamike / mutacije u raku

Mentorice: dr.sc. Sanja Tomić, Znanstveni savjetnik u trajnom zvanju, dr.sc. Mihaela Matovina, Znanstveni suradnik

Rad prihvaćen: [dan sjednice Vijeća KO PMF]

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Branimir Bertoša,
2. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
3. doc. dr. sc. Filip Šupljika



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

ROLE OF DIPEPTIDYL PEPTIDASE III IN OXIDATIVE STRESS RESPONSE

Sara Matić
Ruđer Bošković Institute, Bijenička st. 54, Zagreb

Disease development is often due to deregulation of cellular signaling pathways. Protein-protein interactions study using a combination of experimental and computational approaches allows understanding of these cellular processes at the molecular level. The KEAP1 – NRF2 signaling pathway, crucial for cytoprotective response and cell survival, is often deregulated in cancer cells. KEAP1 is a cellular oxidative stress sensor and a repressor of NRF2 transcription factor. Under oxidative stress, dipeptidyl peptidase III (DPP III) can competitively bind to KEAP1, inducing NRF2 release and antioxidative response via transcription of cytoprotective genes. Using molecular dynamics simulations, isothermal titration calorimetry and microscale thermophoresis, the mechanism of KEAP1 – DPP III binding was studied for wild-type and mutant variants found in cancer cells. Knowledge of the structural and energetic effects that mutations have on the binding rate and the affinity of KEAP1 - DPP III complexation, enables better understanding of their influence on the cancer cell response to chemotherapy.

(115 pages, 53 figures, 25 tables, 81 reference, 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: DPP III / KEAP1 / protein interactions / molecular dynamics simulations / cancer mutations

Supervisors: Sanja Tomić, Professor, Mihaela Matovina, Research associate

Thesis accepted: [dan sjednice Vijeća KO PMF]

Reviewers:

Dr. Branimir Bertoša, Professor
Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor
Dr. Filip Šupljika, Assistant Professor

§ 1. UVOD

Eksperimentalni dokazi o uključenosti dipeptidil-peptidaze III (DPP III) u razvoj nekih tipova tumora kod čovjeka povezuju se s njenom uključenošću u signalni put odgovora na oksidacijski stres KEAP1 – NRF2 (engl. *Kelch-like ECH associated protein 1 - Nuclear factor [erythroid-derived 2]-like 2 protein*), no pozadina tog mehanizma do sada nije razjašnjena.

KEAP1 djeluje kao dimer, tako da svaki monomer domenom Kelch veže po jedan motiv, ETGE, odnosno DLG, monomera NRF2. Poznato je da proteini koji imaju ETGE/ESGE motiv, među kojima je DPP III, mogu biti kompetitivni interaktori KEAP1. Eksperimentalno je utvrđeno da je motiv ETGE, s većim afinitetom vezanja, nužan za stabilnu interakciju, kako kod NRF2, tako i kod kompetitivnih interaktora. Kod DPP III, motiv ETGE nalazi se u fleksibilnoj petlji na površini gornje domene. U proteinskoj bazi podataka (PDB, engl. *Protein Data Bank*) dostupan je znatan broj kristalografskih struktura DPP III u otvorenoj ili zatvorenoj konformaciji, te domene Kelch proteina KEAP1 s peptidima iz interakcijskih proteina koji sadrže motiv ETGE. To je povoljno za strukturnu studiju kompleksa domene Kelch sa strukturama DPP III ili peptidima koji odgovaraju njenoj veznoj petlji metodom molekulskog modeliranja. Dosadašnja istraživanja metodama molekulske dinamike (MD) sugerirala su da je umetanje fleksibilne petlje DPP III u središnju poru domene Kelch analogno vezanju peptida ETGE NRF2. Motiv ETGE, koji je presudan za vezanje DPP III za domen Kelch proteina KEAP1, nalazi se na vrhu fleksibilne petlje u DPP III. Međutim, u kristalografskim strukturama, kao i tijekom klasičnih simulacija MD u vodi, motiv ETGE poput sidra pričvršćuje petlju za tijelo proteina DPP III tvoreći vodikove veze s argininima iz susjedne α -uzvojnice. Za nastajanje kompleksa KEAP1 – DPP III nužno je kidanje navedenih veza i odvajanje motiva ETGE od tijela proteina kako bi se uspostavile interakcije s veznim mjestom domene Kelch. Na temelju toga postavljena je pretpostavka o mehanizmu vezanja DPP III na Kelch koji uključuje dva koraka: odvajanje motiva ETGE od tijela proteina, te umetanje dijela petlje s motivom ETGE u vezno mjesto domene Kelch.

Kombinirane eksperimentalne i računalne metode korištene za proučavanje vezanja KEAP1 s proteinima interaktorima u dosadašnjim radovima pokazale su se korisnima za potpunije razumijevanje ovih procesa te je takav pristup odabran i za istraživanje interakcije KEAP1 – DPP III.

Velik broj mutacija KEAP1 zabilježen je u bazi cBioPortal za genomiku raka, s naznakom da utječe na signalni put KEAP1 – NRF2. Neke od tih mutacija su proučavane kako bi se ispitalo njihov utjecaj na interakcije KEAP1 s NRF2, kao i interakcije KEAP1 s drugim proteinima koji posjeduju motiv ETGE ili STGE pomoću kojeg se mogu kompetitivno vezati. Među njima najzanimljivije su mutacije u domeni Kelch. Osim amplifikacije DPP III, čiji je utjecaj prethodno povezan s aktivacijom NRF2, u bazi za tumorsku genomiku pronađen je i velik broj mutacija DPP III koje mogu utjecati na njen afinitet prema KEAP1, te tako utjecati na signalni put KEAP1 – NRF2. Ovo interdisciplinarno istraživanje donosi nova saznanja o ulozi DPP III u odgovoru na oksidacijski stres i razvoju rezistencije stanica raka na kemoterapiju.

1.1. Cilj i opseg istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je kombinacijom eksperimentalnog i računalnog pristupa analizirati utjecaj mutacija DPP III i domene Kelch, koje su pronađene u stanicama raka, na afinitet njihovog vezanja. Posebna je pažnja posvećena mutacijama DPP III u petlji ETGE, mutacijama u aminokiselinskim ostacima koji su uključeni u vezanje petlje za tijelo DPP III, te mutacijama u domeni Kelch proteina KEAP1 koje ostvaruju specifične interakcije s DPP III.

Stabilnost kompleksa domene Kelch s DPP III proučavana je pomoću klasičnih i ubrzanih *all atom* simulacija MD. Praćeni su pojedinačni koraci u mehanizmu vezanja, kao i stabilnost nastalog kompleksa.

Simuliran je korak odvajanja petlje ETGE od tijela proteina u strukturama divljeg tipa i mutiranih varijanti DPP III te su određeni strukturni elementi koji kontroliraju ovaj korak. Izbor mutacija nađenih u bazi cBioPortal, temeljio se na pretpostavci da određene mutacije mogu pomaknuti ravnotežu procesa odvajanja petlje prema konformaciji povoljnijoj za vezanje motiva ETGE u vezno mjesto u domeni Kelch, te tako mijenjati afinitet vezanja DPP III.

Za modeliranje procesa vezanja korišten je peptid od 24 aminokiseline (24 ak) koje odgovaraju sekvenci petlje ETGE DPP III, a vezanje za DPP III je simulirano metodom ubrzane usmjerene (engl. *adaptive steered*, AS) MD. Za određivanje najpovoljnijeg kompleksa, kao i za procjenu afiniteta vezanja peptida (od 24 ak i skraćene verzije od 11 ak), korišten je račun slobodne energije vezanja (tzv. MM-PBSA račun, engl. *molecular mechanics – Poisson-Boltzman surface area*).

Tijekom istraživanja, dosadašnji modeli i saznanja o strukturi kompleksa nadopunjena su podacima dobivenim kristalografski te metodom raspršenja X-zraka pod malim kutevima na molekulama u otopini (engl. *small angle –ray scattering*, SAXS).

Za potrebu konstrukcije mutiranih varijanti proteina za eksperimentalna istraživanja, u ekspresijske vektore za transformaciju bakterije *Escherichia coli*, koji sadrže gene za proteine divljeg tipa DPP III (pLATE31-DPPIII) i domenu Kelch proteina KEAP1 (pET15b-Kelch), uvedene su točkaste mutacije pomoću specifičnih početnica koje sadrže željene mutacije korištenjem QuickChange seta za mutagenezu. Proteini divljeg tipa, kao i mutirane varijante, koji su sadržavali histidinski privjesak, eksprimirani su u bakteriji *E. coli* (soj BL21- (DE3) - RIL +) i pročišćeni afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozima, a zatim i gel filtracijskom kromatografijom.

Aktivnost mutiranih varijanti DPP III u odnosu na divlji tip ispitana je mjerenjem enzimske kinetike hidrolize sintetskog supstrata Arg₂-2NA.

Termodinamički parametri za vezanje peptida petlje ETGE DPP III na domenu Kelch, određeni su izotermnom titracijskom kalorimetrijom (ITC-om). No, tom metodom nije bilo moguće precizno odrediti parametre za vezanje čitave DPP III, pa je za mjerenje relativnih afiniteta vezanja divljeg tipa i odabranih mutiranih varijanti DPP III i domene Kelch korištena metoda termoforeze na mikroskali (engl. *Microscale thermophoresis*, MST).

Konačno, usporedba relativnih afiniteta vezanja određenih za divlji tip i mutirane varijante računalnim i eksperimentalnim metodama dovela je do identifikacije mutacija koje utječu na afinitet vezanja Kelch – DPP III, te je daljnjom usporedbom s podacima iz literature omogućila bolje razumijevanje uloge DPP III u kompetitivnom vezanju na KEAP1 i aktivaciji NRF2.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Molekulske interakcije

Biološki procesi osnova su života, a temelje se na molekulskim interakcijama i biokemiji koja se odvija unutar bioloških sustava. Za razliku od čvrstih i stabilnih kovalentnih veza, reverzibilne nekovalentne interakcije su te koje omogućuju brzi odgovor i prilagodbu živih sustava na promjene uvjeta u okolini. Voda, kao sveprisutno otapalo u biološkim sustavima također ima značajan utjecaj u tim interakcijama.

Razlikujemo tri vrste nekovalentnih interakcija: elektrostatske interakcije, vodikove veze i van der Waalove interakcije, koje se razlikuju po svojoj jačini, geometriji i specifičnosti:

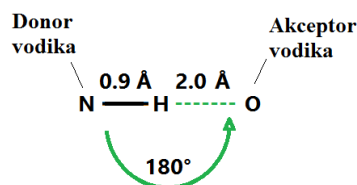
1. Elektrostatske interakcije.

Elektrostatske interakcije ovise o električnim nabojima atoma q_1 i q_2 , te kvadratu njihove udaljenosti r . Energija elektrostatske interakcije između točkastih naboja opisuje se Coulombovim zakonom, gdje je k_e konstanta proporcionalnosti:

$$F = k_e \frac{q_1 \cdot q_2}{r^2} \quad (1)$$

2. Vodikove veze.

Vodikove veze su relativno slabe interakcije, ali od iznimnog značaja za biološke makromolekule poput DNA i proteina. Vodikove veze elektrostatske su prirode, no za razliku od kulonskih interakcija one su usmjerene. Atom vodika u vodikovoj vezi podijeljen je između donora i akceptora (slika 1), koji su uglavnom skupine s elektronegativnim atomima poput dušika ili kisika, od kojih donor ima vezan vodikov atom. Relativno elektronegativni atom, na koji je vodik kovalentno vezan, povlači elektronski oblak atoma vodika stvarajući na njegovom suprotnom kraju djelomično pozitivan naboj (δ^+) što mu omogućuje elektrostatsku interakciju s atomom koji ima djelomično negativan naboj (δ^-). Energija potrebna za kidanje vodikove veze najčešće je u rasponu od 4–13 kJ mol⁻¹, a ovisi o udaljenosti donora i akceptora, te o kutu donor-vodik-akceptor. Vrijednosti navedenih veličina su u rasponu od 2,4 do 3,5 Å, odnosno od 120°-180°. Što je udaljenost donora i akceptora manja, a kut bliži 180°, vodikova veza je jača.

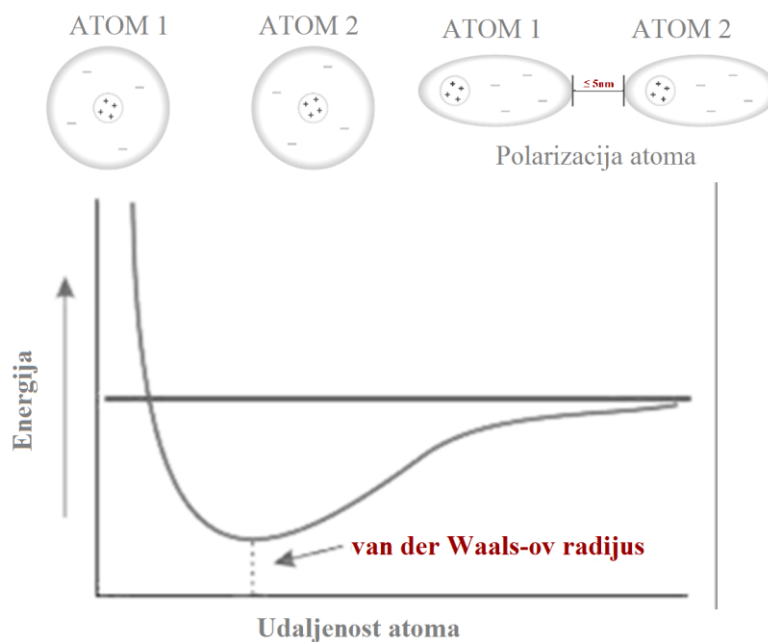


Slika 1. Primjer vodikove veze s atomima dušika i kisika kao donorom i akceptorom, te označenim vrijednostima geometrijskih parametara.

3. Van der Waalsove interakcije.

Van der Waalsove interakcije temelje se na asimetričnoj raspodjeli elektronskog naboja nastaloj uslijed usklađivanja elektronske gustoće oko susjednih atoma, do koje dolazi na udaljenosti od 5 nm ili manjoj. Među van der Waalsovima interakcijama, razlikujemo interakcije dipol-dipol, dipol-inducirani dipol i disperzijske interakcije. Rezultirajuća privlačnost između tako nastalih atomskih dipola povećava se njihovim približavanjem sve do kontaktne (ravnotežne) van der Waalsove udaljenosti (slika 2), a potencijalna energija U je obrnuto proporcionalna udaljenosti između atoma/molekula na šestu potenciju. Nakon toga, odbojne sile koje su posljedica Paulijevog principa isključenja, postaju dominantne. Van der Waalsove interakcije često se opisuju Lennard – Jonesovom 12-6 funkcijom:

$$U = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (2)$$



Slika 2. Nastanak induciranih dipola. Energija van der Waalsovih interakcija dvaju atoma s obzirom na njihovu udaljenost.

Energija je najpovoljnija na udaljenosti u kojoj su odbojna i privlačna sila u ravnoteži, tzv. kontaktnoj van der Waalsovoj udaljenosti. Nakon toga energija se brzo povećava uslijed odbijanja elektronskih oblaka. Energije van der Waalsovih interakcija su prilično male, od 2 do 4 kJ mol⁻¹. Međutim, kada se površine dviju (makro)molekula dovoljno približe, velik broj atoma može ostvariti van der Waalsove interakcije, te ukupan doprinos može biti značajan.

Biološki procesi temeljeni na interakcijama molekula u stanici ili organizmu posljedica su djelovanja istih zakona koji upravljaju fizikalnim procesima. Zakoni termodinamike razlikuju sustav, materiju unutar određenog prostora, od sve ostale materije, njegove okoline. Prvi zakon termodinamike kaže da je ukupna energija sustava i okoline konstantna, odnosno da se energija ne može stvoriti niti uništiti. Međutim, energija može imati različite oblike.

Entalpija (H) je toplina izmijenjena između sustava i okoline pri stalnom tlaku, a mjera neuređenosti i nasumičnosti sustava naziva se entropijom (S). Za opisivanje energija biokemijskih procesa u biološkim sustavima, gdje se pretpostavlja da je temperatura T (apsolutna temperatura izražena u K) konstantna, možemo izraziti odnos promjene entropije sustava i prenesene topline preko promjene reakcijske (Gibsove) slobodne energije, $\Delta_r G$:

$$\Delta_r G = \Delta_r H - T\Delta_r S \quad (3)$$

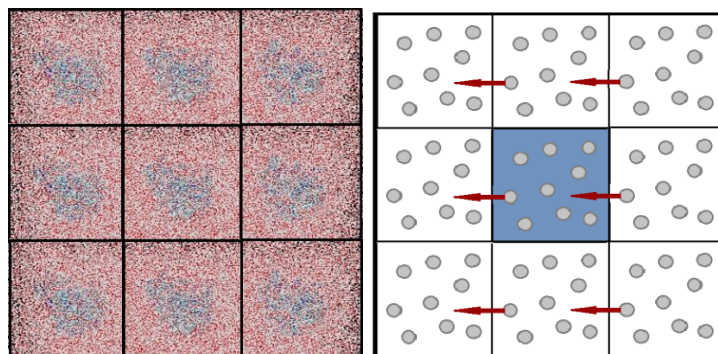
Spontani procesi su oni kod kojih se promjena reakcijske Gibbsove energije smanjuje, bilo smanjenjem reakcijske entalpije ili povećanjem reakcijske entropije. Spontanosti procesa poput molekulskih interakcija može doprinijeti i entropijski efekt vode. Molekule vode u kontaktu s površinama makromolekula postaju uređenije od molekula vode u otopini. Prilikom interakcija makromolekula, neke molekule vode se oslobađaju čime se entropija otapala, odnosno sustava koji čine makromolekula i otapalo, povećava¹.

2.2. Molekulsko modeliranje

Eksperimentalne metode omogućuju praćenje biokemijskih procesa na makroskopskoj (molarnoj) skali. No za razumjevanje mehanizama koji pokreću te procese na molekularnoj i submolekularnoj razini potrebno je koristiti molekulsko modeliranje, u kojem se sustav, primjerice određeni protein i njegovu okolinu (najčešće otapalo koje sadrži vodu i ione), simulira metodama računalne kemije. Metode modeliranja mogu biti različitih stupnjeva složenosti, pa se prema vrsti fizikalnih zakona i skali čestica koje se promatraju dijele na empirijske (tj. molekularna mehanika, MM i molekularna dinamika, MD), semi-empirijske, kvantno-mehaničke (QM) i kombinirane kvantno-mehaničke - molekularno-mehaničke (QM / MM). Za razliku od QM metoda, empirijske metode za opis sustava koriste odgovarajuće polje sila, koje objedinjuje parametre kojima se opisuju elementarne čestice u sustavu i njihove interakcije, te izraz za potencijalnu energiju sustava. U ovom radu korištene su empirijske metode zasnovane na tzv. „*all-atom*“ poljima sila.

2.2.1. Početni sustav

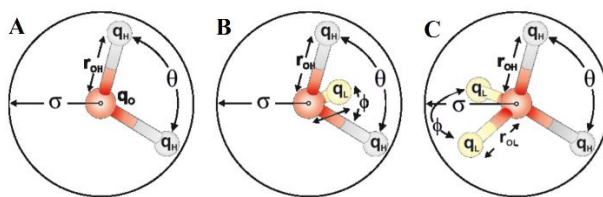
Simulirana makromolekula nalazi se u kutiji (poliedru) okružena molekulama otapala i predstavlja sustav koji se proučava. Međutim, dimenzije poliedra nisu rigidne, već se mijenjaju kako bi se sačuvala konstantna gustoća sustava. Primjenom periodičnih rubnih uvjeta položaji atoma u poliedru preslikavaju se u okolne, virtualne poliedre koji ga okružuju, te svojim oblikom i rasporedom atoma u potpunosti odgovaraju središnjem. Ako atom tijekom simulacije pređe iz središnjeg u virtualni poliedar, preslika toga atoma, s identičnim dinamičkim svojstvima, ulazi u središnji poliedar na suprotnoj strani, i njegov sadržaj ostaje nepromijenjen (slika 3). Sve informacije potrebne za promatranje dinamike u periodičnoj rešetci mogu se izračunati iz trenutne atomske konfiguracije središnjeg poliedra.



Slika 3. Protein, s molekulama vode i ionima soli, u kutiji (poliedru) periodične rešetke (lijevo) i pojednostavljeni prikaz principa koji se koristi pri simulacijama uz periodične rubne uvjete (desno).

2.2.2. Modeliranje solvatacije

Kako bi model što bolje predstavljao fiziološke uvjete, većina proteina, osim transmembranskih, simulira se u vodenom mediju. Zbog svoje izražene polarnosti molekule vode ostvaruju snažne interakcije s nabijenim aminokiselinskim ostacima proteina, mogu formirati stabilne mostove među njima, a ne treba zanemariti ni utjecaj na promjenu entropije sustava uslijed njihove preraspodjele prilikom konformacijskih promjena makromolekule, odnosno kompleksiranja. Zbog toga se molekule vode uglavnom modeliraju eksplicitno. Problem koji se javlja kao posljedica toga je povećanje zahtjevnosti računa, obzirom da se broj molekula vode potreban za solvataciju prosječnog proteina mjeri u desecima tisuća. Jedno od rješenja je korištenje poliedra čiji oblik omogućuje upotrebu manjeg broja molekula vode, kao što je, u slučaju globularnih proteina, primjerice krnji oktaedar, te što jednostavnijeg modela molekule vode. Jedan od modela je tzv. SPC (engl. *simple point charge*), u kojem su točkasti naboji pridruženi položajima kisika i vodika u molekuli vode, a duljine veza i kut među atomima su fiksni (slika 4 A). Drugi često korišteni modeli su TIPnP, gdje n označava broj točkastih naboja u molekuli. TIP3P model vode sadrži isti broj naboja kao SPC, no parametri su poboljšani. Kasnije razvijeni TIP4P i TIP5P modeli definiraju vodu s 4, odnosno 5 točkastih naboja (slika 4 B i C) uz varijacije u duljinama veza i kutevima, što u konačnici rezultira točnijim modeliranjem molekula vode.



Slika 4. A) Modeli s 3 točkasta naboja koji uključuju SPC i TIP3P, B) model s 4 točkasta naboja kao TIP4P i C) model s 5 točkastih naboja poput TIP5P. Slika preuzeta iz².

2.2.3. Potencijalna energija

Izraz za potencijalnu energiju koji se najčešće koristi u opisu sustava bioloških makromolekula, dan je izrazom:

$$U(r) = \sum_{\text{veze}} \frac{k_d}{2} (d - d_0)^2 + \sum_{\text{kutovi}} \frac{k_\theta}{2} (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{torzije}} \frac{k_\phi}{2} (1 + \cos(n\phi - \phi_0)) + \sum_{\text{odstupanja}} \frac{k_\psi}{2} (\psi - \psi_0)^2 + \sum_{\substack{\text{nevezni} \\ \text{L-J}}} 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{\substack{\text{nevezni} \\ \text{Coulombov}}} \frac{q_i q_j}{\varepsilon_D r_{ij}} \quad (4)$$

Članovi u izrazu predstavljaju sume po parovima atoma, pri čemu prva četiri člana čine tzv. 'vezni' dio potencijalne energije i opisuju odstupanja vrijednosti intrinzičnih koordinata (kovalentnih veza, valentnih kuteva, torzijskih kuteva atoma u nizu i atoma koji definiraju planarnost) od ravnotežnih vrijednosti, a posljednja dva, 'nevezna' člana, opisuju doprinos potencijalnoj energiji sustava zbog van der Waalsovih i kulonskih interakcija atoma koji nisu kovalentno povezani. Prva dva člana u izrazu opisani su funkcijom harmoničkog oscilatora, dok je član koji se odnosi na promjenu torzijskog kuta opisan periodičkom funkcijom. Konstante sile k_d , obično su vrlo visoke, što znači da je potrebna velika količina energije za značajno istezanje ili skraćivanje kemijske veze. Referentna duljina veze je d_0 , dok d predstavlja trenutnu duljinu veze. Vrijednosti konstanti sila k_θ obično su niže od prethodnih, dakle treba manje energije za odstupanje valentnih kuteva θ od referentnih vrijednosti θ_0 , dok su konstante sile koje se odnose na promjenu potencijalne energije uslijed promjene torzijskog kuta ϕ u pravilu vrlo niske, pogotovo u slučaju kad se odnose na rotaciju oko jednostrukih veza (ϕ je kut između 4 uzastopna atoma povezana s 3 kovalentne veze). U nekim poljima sila međudjelovanje krajnjih atoma torzijskog kuta opisuje se i skaliranim neveznim članovima, tzv. '1-4' van der Waalsov i kulonski član.

Van der Waalsove interakcije izražavaju se preko Lennard-Jonesovog 12-6 potencijala koji sadrži privlačnu r^6 i odbojnu r^{12} komponentu. Lennard-Jonesov potencijal je funkcija udaljenosti r_{ij} između dva atoma, pri čemu σ predstavlja udaljenosti na kojoj funkcija siječe os x (vrijednost funkcije je nula) i povezan je s ravnotežnom udaljenošću r_{ij}^0 , relacijom $\sigma = r_{ij}^0/(2)^{1/6}$, a parametar ε definira apsolutnu vrijednost potencijalne energije pri ravnotežnoj udaljenosti, $|E_{vdw}|$ za $r_i = r_{ij}^0$. Krivulja potencijala je empirijska jer su parametri σ i ε eksperimentalno određeni podaci.

Elektrostatski član potencijalne energije dan je kao suma energija kulonskih interakcija djelomičnih (parcijalnih) atomskih naboja pri čemu je r_{ij} udaljenost između središta atoma. Treba napomenuti da su kod nepolarizabilnih, 'all atom' polja sila atomi prikazani kao kuglice efektivnog radiusa r_{ij}^0 i mase m_i , s parcijalnim nabojima smještenim u njihovom središtu. Takav prikaz pojednostavljuje simulacije MD makromolekulskih sustava i čini ih računalno izvedivima³.

2.2.4. Molekulska dinamika

Klasične simulacije MD svode se na numeričku integraciju Newtonovih jednadžbi gibanja za čestice (atome ili skupine atoma) unutar promatranog sustava:

$$m \frac{d^2 r_i}{dt^2} = U_i(r_1, r_2, \dots, r_j, \dots, r_N), \quad j \neq i, j = 1, 2, \dots, N - 1. \quad (5)$$

Ovdje je r_i vektor položaja atoma i , a U_i su sile kojima preostali atomi u sustavu djeluju na njega (atom i).

Vrijednost sile F_i odgovara negativnoj vrijednosti gradijenta funkcije potencijalne energije koju atom r_i ima u sustavu N čestica specifičnog geometrijskog rasporeda čestica:

$$F_i(r_1, r_2, \dots, r_N) = -\nabla r_i U_i(r_1, r_2, \dots, r_N). \quad (6)$$

Newtonov zakon podrazumijeva očuvanje ukupne energije sustava $E = E_{kin} + U$, gdje je E_{kin} trenutna kinetička energija sustava.

Bez djelovanja vanjskih sila, potencijalna energija sustava, U , se može predstaviti u najjednostavnijem slučaju kao zbroj potencijalnih energija interakcija svih parova atoma u sustavu:

$$U = \sum_{i=1}^N U_i, \quad U_i = \sum_{j>i}^N u(r_{ij}), \quad (7)$$

gdje je $r_{ij} = r_i - r_j$, $r_{ij} \equiv |r_{ij}|$, a uvjet $j > i$ sprječava ponavljanje parova čestica. Sile koje djeluju na česticu i su u takvom slučaju zbroj pojedinačnih interakcija sa svim ostalim česticama $j \neq i$:

$$F_i = \sum_{j \neq i}^N f_{ij}, \quad f_{ij} = -\frac{du(r_{ij})}{dr_{ij}} \cdot \frac{r_{ij}}{r_{ij}} \quad (8)$$

Prema trećem Newtonovom zakonu, $f_{ji} = -f_{ij}$.

Iz navedenog slijedi da je ukupni broj jednađžbi gibanja u sustavu od N čestica proporcionalan s $N(N-1)/2$. Zbog velikog broja atoma u sustavu makromolekula (nekoliko stotina atoma), broj interakcija koje se razmatraju smanjuje se na interakcije atoma čija je udaljenost manja ili jednaka od definirane granične (engl. *cut-off*) udaljenosti. $r_{ij} \leq r_{cut}$.

2.2.5. Termodinamička svojstva

Ukoliko sustav od N čestica smješten u kutiju (poliedar) određenih dimenzija, volumena V tretiramo kao zatvoreni sustav, bez interakcije s okolinom, provođenjem simulacija MD korištenjem Newtonovih jednađžbi gibanja generira se velik broj različitih mikrostanja iste energije (E), odnosno mikrokanonski (NVE) ansambl. Međutim, eksperimentalni uvjeti koji se žele simulirati u većini slučajeva podrazumijevaju konstantan tlak i temperaturu. Uz pretpostavku da vrijedi ergotska hipoteza, tj. da dovoljno dugim praćenjem možemo odrediti moguća stanja makroskopskog (realnog) sustava u termodinamičkoj ravnoteži, simulacijama MD se nastoji generirati ili kanonski (NVT) ili izobarno-izotermni (NPT) ansambl. Uzimajući u obzir temperaturu T i gustoću ρ kao neovisne varijable, energija E i tlak p mogu se lako izraziti, čime se simulacije MD na mikroskopskoj razini povezuju s makroskopskom razinom.

U simulacijama MD konstantna temperatura zapravo znači konstantnu ukupnu kinetičku energiju čestica u sustavu. Budući da svaki translacijski stupanj slobode doprinosi ukupnoj kinetičkoj energiji s $k_B T / 2$, temperatura sustava može se definirati kao:

$$T = \frac{2E_{kin}^{TOT}}{3Nk_B} \quad (9)$$

Stoga je regulaciju temperature za dobivanje NVT ansambla najlakše postići modifikacijom kinetičke energije čestica u sustavu, pomoću takozvanih termostata. Termostati mogu biti stohastički ili koristiti jako ili slabo sprezanje za skaliranje brzina čestica. Od stohastičkih termostata najpoznatiji je Langevinov termostat. On se zasniva na interakciji čestica sa sustavom, odnosno izmjeni kinetičke energije kroz sudare. Čestice su pritom opisane Langevinovom dinamikom:

$$m \frac{d^2 r_i}{dt^2} = -\nabla U - \gamma p_i - W_i(t) \quad (10)$$

gdje je stohastički član sadržan u izrazu za nasumičnu silu W_i , u trenutku t , koja je posljedica sudara, a γp_i je sila trenja, gdje je γ koeficijent trenja.

Tlak kao funkcija potencijala među parovima atoma može se opisati jednažbom:

$$pV = Nk_B T + \frac{1}{3} \left\langle \sum_{i < j}^N r_{ij} \cdot f_{ij} \right\rangle \quad (11)$$

ili koristeći samo veličine specifične za simulaciju:

$$p = \frac{\rho}{3N} \left\langle 2E_{kin}^{TOT} + \sum_{i < j}^N r_{ij} \cdot f_{ij} \right\rangle \quad (12)$$

gdje ρ predstavlja broj čestica u jediničnom volumenu.

Održavanje konstantnog tlaka (nužno za NPT ansambl) vrši se skaliranjem udaljenosti među česticama (koje može biti izotropno i anizotropno) i njihovih brzina. Jedan od jednostavnijih barostata je Berendsenov barostat u kojem je sustav spregnut s vanjskim tlakom prema izrazu

$$\frac{dp}{dt} = \frac{p_0 - p}{\tau_p} \quad (13)$$

gdje je τ_p konstanta sprezanja.

Za razliku od ukupne energije, $E_{uk} = E_{kin} + U$, koja je konstantna tijekom simulacije, temperatura i tlak fluktuiraju, no bitno je da je njihova vrijednost uprosječna tijekom određenog vremenskog intervala, Δt , konstantna.

2.2.6. Vremenska integracija

Rješavanje diferencijalnih Newtonovih jednadžbi gibanja tijekom vremena opisuje promjenu položaja (koordinata) i brzina čestica u faznom prostoru s $3N-6$ stupnjeva slobode i time se dobiva trajektorija. Za složene sustave ovakav je račun suviše zahtjevan te se rješenja Newtonovih jednadžbi gibanja određuju numeričkim rješavanjem diferencijalnih jednadžbi za male vremenske korake. Neki od algoritama razvijenih u tu svrhu su Verletov i *velocity-Verletov* (Verletov algoritam za brzine) te *leap-frog* algoritam. Oni se temelje na razvoju funkcija u Taylorov niz do treće derivacije u Verletovom ili druge derivacije u ostala dva algoritma.

Verletov algoritam za brzine računa vektore brzina i položaj čestica sinkronizirano, za iste vremenske intervale, odnosno integracijske korake, Δt :

$$r(t + \Delta t) = r(t) + v(t)\Delta t + \frac{1}{2}a(t)\Delta t^2 \quad (14)$$

$$v(t + \Delta t) = v(t) + \frac{1}{2}[a(t) + a(t + \Delta t)]\Delta t \quad (15)$$

gdje je

$$a(t + \Delta t) = -\frac{1}{m}\nabla U[q(t + \Delta t)] \quad (16)$$

Za razliku od toga, algoritam *leap-frog* (prevedeno: žablji skok), vektore položaja i brzina računa za pomak od pola vremenskog intervala, $t = 1/2 \Delta t^3$.

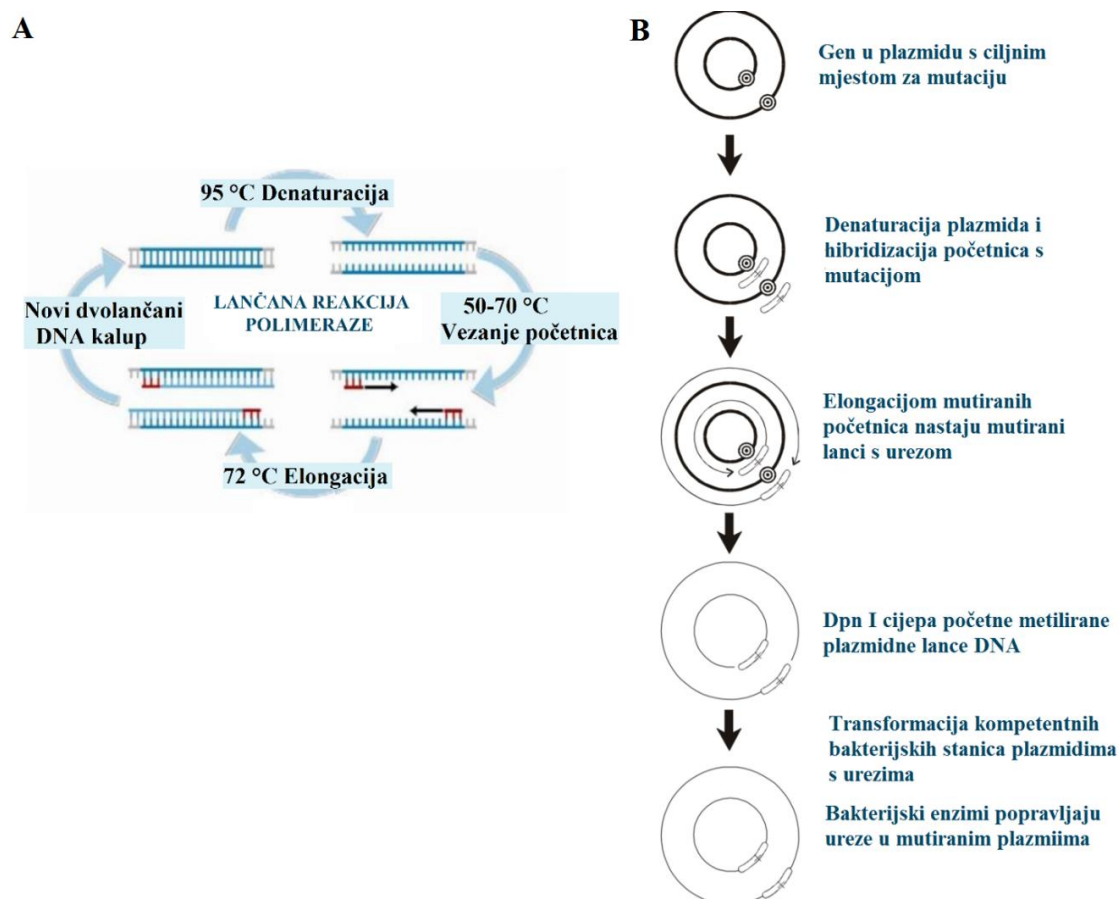
U simulacijama MD vremenski korak ograničen je trajanjem najbržeg gibanja u sustavu. Kod makromolekula to je u pravilu vibracija C-H veze čije je trajanje približno 10^{-14} sekundi, te se prema tome u simulacijama koriste vremenski koraci od 1 fs. Algoritmi kojima se uvodi restrikcija na vibraciju C-H veza, omogućuju povećanje vremenskog koraka 2-5 puta. Algoritmi koji se najčešće koriste za restrikciju navedenih kovalentnih veza tijekom simulacije makromolekula su SHAKE i LINCS⁴.

2.3. Eksperimentalne metode proučavanja makromolekula

2.3.1. Lančana reakcija polimeraze, PCR

Lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) temelji se na uporabi enzima DNA-polimeraze koja katalizira *in vitro* replikaciju specifičnih sekvenci iz dvolančanih molekula DNA. Reakcijska smjesa sadrži uzorak DNA, DNA-polimerazu, početnice (10-30 nukleotida) i četiri deoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP) u suvišku u puferskoj otopini. Reakcija se odvija u ciklusima koji se sastoje od tri faze definirane različitim temperaturama: denaturacije (razdvajanja lanaca DNA) na ~95 °C, hibridizacije sa specifičnim početnicama pri temperaturama 50-70 °C (ovisno o duljini i sastavu početnica) i elongacije (aktivnošću DNA-polimeraze) pri 72 °C. Po dvije početnice se konstruiraju na način da, nakon denaturacije, hibridiziraju s po jednim lancem jednolančane DNA na krajevima fragmenta koji se želi umnožiti. U klasičnoj metodi PCR produkti svakog koraka sinteze služe kao predložak za sljedeće korake (slika 5 A), čime se postiže eksponencijalno umnažanje⁵.

Metoda uvođenja mutacija u plazmidnu DNA korištena u ovom radu prilagođena je za umnažanje mutiranih plazmidnih vektora s fragmentom od interesa pomoću dvije sintetske oligonukleotidne početnice koje sadrže željenu mutaciju (slika 5 B). Svaka početnica hibridizira s jednim od lanaca vektora nakon odvajanja, te se produljuje aktivnošću DNA-polimeraze. Rezultat je mutirani plazmid koji sadrži ureze i ne može služiti kao kalup u sljedećem ciklusu te je umnažanje zbog toga linearno. Nakon željenog broja ciklusa, početni lanci plazmida, koji su porijeklom iz bakterijskih stanica i stoga sadrže metilirane nukleotidne ostatke, cijepaju se endonukleazom *DpnI*. Preostaje samo vektorska DNA koja sadrži željene mutacije, te se zatim transformira u kompetentne bakterijske stanice koje vlastitim mehanizmima popravka DNA popravljaju ureze u plazmidima. Selekcijom na temelju antibiotske rezistencije i provjerom sekvenciranjem vrši se probir bakterijskih klonova koji sadrže željenu mutaciju.



Slika 5. A) Prikaz ciklusa lančane reakcije polimerazom. Preuzeto iz⁶. B) Koraci u ciljanoj kružnoj mutagenezi lančanom reakcijom polimerazom. Preuzeto iz⁷.

2.3.2. Metode izolacije i karakterizacije proteina

Proteini se razlikuju po veličini, naboju i topljivosti u vodi, što omogućuje korištenje različitih metoda za izolaciju određenih proteina ili za dokazivanje prisutnosti i kvantifikaciju specifičnih proteina u uzorku.

2.3.2.1. Gel-filtracijska kromatografija

Proteini koji se razlikuju po masi mogu se odvojiti gel-filtracijskom kromatografijom. U ovoj tehnici koristi se kolona napunjena poroznim zrcima od poliakrilamida, dekstrana (bakterijski polisaharid) ili agaroze (derivat morskih algi). Proteini prolaze između kuglica ili zaostaju u porama. Budući da manji proteini mogu lakše prodrijeti u pore od većih proteina, oni putuju kroz kolonu za gel-filtraciju sporije od većih proteina. Ukupni volumen tekućine potreban za

eluiranje proteina iz kolone ovisi o njegovoj masi, dakle što je masa manja, to je veći volumen elucije. Ova metoda stoga se može koristiti za razdvajanje proteina na temelju veličine, a korištenjem proteina poznate mase, volumen elucije može poslužiti za procjenu mase proteina u smjesi⁸.

2.3.2.2. Afinitetna kromatografija

Afinitetna kromatografija se temelji na sposobnosti proteina da se specifično vežu za drugu molekulu. Kolone za pročišćavanje sadrže kuglice s kovalentno vezanim molekulama liganda na koje se reverzibilno vežu proteini od interesa. Ligandi mogu biti enzimski supstrati ili druge male molekule koje se vežu za određene proteine, ali i primjerice antitijelo specifično za željeni protein. Na taj način na koloni zaostaju samo proteini koji vežu ligand pričvršćen na kuglice; preostali proteini, bez obzira na njihov naboj ili masu, proći će kroz kolonu bez vezanja za nju. Proteini afinitetno vezani na kolonu zatim se eluiraju dodavanjem suviška liganda ili promjenom koncentracije soli ili pH⁸. Osim prirodnog afiniteta prema ligandu, moguće je koristiti i rekombinantne proteine koji sadrže afinitetni privjesak (engl. *tag*) pomoću kojeg se protein veže na kolonu. Primjer takvog privjeska je histidinski privjesak od najčešće 6 histidinskih ostataka, fuzioniran na N- ili C- kraj proteina, koji se specifično veže na metalno-kelatni nosač, odnosno ione nikla ili kobalta imobilizirane na nosače kemijom NTA-kelacije (kelacije pomoću nitrilotrioctene kiseline, engl. *nitrilotriacetic acid*). Elucija proteina s His-privjeskom s kolone provodi se suviškom slobodnog imidazola⁹.

2.3.2.3. Elektroforeza

Elektroforeza je tehnika za razdvajanje molekula u smjesi pod utjecajem električnog polja. Otopljene molekule se u električnom polju kreću brzinom određenom omjerom njihovog naboja i mase. Na primjer, ako dvije molekule imaju istu masu i oblik, ona s većim neto nabojem brže će se kretati prema elektrodi. Budući da mnogi proteini ili nukleinske kiseline koji se razlikuju po veličini i obliku imaju gotovo identične omjere naboja i mase, uspješno odvajanje proteina i nukleinskih kiselina može se postići elektroforezom u različitim gelovima (polukrute suspenzije u vodi). Elektroforetsko razdvajanje proteina najčešće se izvodi u poliakrilamidnim gelovima.

Osim uvjeta u kojima se razdvajaju nativni proteini (nativna elektroforeza), moguće je pri razdvajanju koristiti ionski detergent natrijev dodecil-sulfat, koji denaturira proteine i disocira multimerne proteine na podjedinice, te polipeptidnim lancima daje izduženu konformaciju sa sličnim omjerom naboja i mase, što čini metodu SDS-PAGE (poliakrilamidna gel-elektroforeza u prisutnosti natrijeva dodecil-sulfata, engl. *sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*) vrlo preciznom u procjeni veličine proteina. Molekulska masa proteina može se procijeniti usporedbom položaja, odnosno puta migracije proteina na gelu, s položajem proteina poznate molekulske mase⁸.

2.3.3. Proteinska kristalografija

Proteinska kristalografija je metoda koja omogućuje određivanje trodimenzijske strukture proteina. Budući da proteinska funkcija proizlazi iz strukture proteina, ova metoda daje vrlo koristan uvid u mehanizam kojim protein ostvaruje svoju funkciju ili interakcije s drugim proteinima, DNA ili malim molekulama, te je također od iznimne važnosti u računalnom istraživanju proteina. Rendgenskom kristalografijom su do sada određene strukture oko 160000 proteina, objavljenih u bazi PDB¹⁰. Uvjet za mogućnost određivanja strukture ovom metodom je dobivanje stabilnih i pravilnih kristala proteina od interesa, jer o pravilnosti kristalne rešetke ovisi kvaliteta signala prilikom difrakcije X-zraka. Za kristalizaciju proteina potrebna je otopina proteina visoke čistoće i koncentracije, a u kombinaciji s različitim metodama kristalizacije (primjerice difuzija para sjedeće ili viseće kapi) često se koriste komercijalni setovi kristalizacijskih otopina koji pospješuju proces kristalizacije. Atomi u kristalu proteina raspršuju rendgenske zrake, valnih duljina od oko 0,1-0,2 nanometara (nm), čime stvaraju uzorak difrakcije. Složenim metodama uzorak difrakcije interpretira se u elektronsku gustoću i konačno uklapanjem polipeptidnog slijeda rješava se trodimenzijska struktura proteina¹¹.

2.3.4. Raspršenje X-zraka pod malim kutom, SAXS

Raspršenje X-zraka pod malim kutom (engl. *small angle X-ray scattering*, SAXS) je metoda koja omogućuje strukturnu karakterizaciju bioloških makromolekula u otopini, no znatno niže razlučivosti od rendgenske kristalografije. SAXS modeli niske rezolucije (1–2 nm) mogu se odrediti *ab initio* ili usavršavanjem dostupnih struktura visoke razlučivosti i/ili homoloških

modela. SAXS je metoda kojom se mogu ispitivati strukture širokog raspona veličina, od manjih polipeptida do makromolekulskih kompleksa. Parametri oblika i težine mogu se odrediti izravno iz krivulja raspršenja što omogućuje brzu karakterizaciju uzorka. Ovi parametri uključuju: molekulsku masu, radijus giracije (R_g), volumen hidratizirane čestice (V_p) i maksimalni promjer čestica (D_{max}). Guinierova analiza je najjednostavnija metoda za određivanje intenziteta raspršenja $I(0)$ i radijusa giracije, R_g . Za monodisperznu otopinu globularnih makromolekula Guinierova je jednadžba definirana kao:

$$I(s) = I(0) \exp\left(-\frac{1}{3} R_g^2 s^2\right) \quad (17)$$

gdje je s ($s = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$) funkcija kuta između upadne i raspršene zrake, a $I(s)$ intenzitet nakon korekcije za pozadinu, koji je proporcionalan raspršenju na pojedinoj čestici uprosječenom za sve orijentacije u otopini¹².

2.3.5. Dinamičko raspršenje svjetlosti, DLS

Dinamičko raspršenje svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS) je metoda kojom se proučava difuzija makromolekula u otopini. Kretanje makromolekula ovisi o njihovoj veličini, temperaturi i viskoznosti otapala. Kada laserska svjetlost naide na makromolekule u otopini, upadna svjetlost raspršuje se u svim smjerovima, a intenzitet raspršenja bilježi detektor. Analizom fluktuacije intenziteta raspršene svjetlosti (uzrokovane Brownovim gibanjem makromolekula u otopini), može se dobiti koeficijent difuzije (D_τ) koji je povezan s hidrodinamičkom veličinom makromolekula. Metodom autokorelacije koreliraju se fluktuacije intenziteta raspršene svjetlosti u odnosu na vrijeme (ns- μ s) kako bi se utvrdilo koliko brzo intenzitet fluktuirao, što je povezano s difuzijskim ponašanjem makromolekula. Hidrodinamički radijus (d_h) definira se kao polumjer hipotetske sfere koja difundira istom brzinom kao i čestica koja se istražuje, a može se dobiti izračunati pomoću Stokes -Einsteinove jednadžbe:

$$D_\tau = \frac{k_B T}{6\pi\eta d_h} \quad (18)$$

gdje je k_B Boltzmannova konstanta (1.38×10^{-23} kg m² s⁻² K⁻¹), T je temperatura u K, a η viskoznost medija¹³.

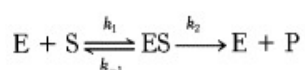
2.3.6. Spektroskopija cirkularnog dikroizma, CD

Spektroskopija cirkularnog dikroizma (CD) tehnika je u kojoj se mjeri razlika u apsorpciji lijeve i desne cirkularno-polarizirane svjetlosti u optički aktivnim uzorcima. CD se opaža za optički aktivne (kiralne) molekule, međutim, kiralnost se također može postići kovalentnim vezanjem kiralnog kromofora na molekulu ili se inducirati smještanjem kromofora u asimetrično okruženje.

Elektromagnetski valovi sadrže komponente električnog i magnetskog polja koje osciliraju okomito na smjer širenja svjetlosnog snopa. Smjer ovih komponenti definira polarizaciju valova. U nepolariziranom valu, električno i magnetsko polje osciliraju u različitim smjerovima. U linearno polariziranoj svjetlosti elektromagnetski val oscilira u jednoj ravni, dok se u cirkularno polariziranoj svjetlosti ravnine električnog i magnetskog polja nalaze u međusobno okomitom položaju, te se dvije ravnine spiralno zakreću kako svjetlosni snop propagira. Optički aktivne molekule karakterizira njihova kiralnost ili asimetrija u strukturi molekule. To uzrokuje da se brzina svjetlosti koja prolazi kroz optički aktivni uzorak razlikuje ovisno o indeksu loma. Stoga će se lijevo cirkularno polarizirana svjetlost širiti kroz kiralni uzorak različitom brzinom od desno polarizirane svjetlosti. Kad kiralna molekula različito apsorbira lijevo i desno polariziranu svjetlost, rezultirajući vektor električnog polja ocrtava elipsu. Ova eliptičnost kao funkcija valne duljine definira spektar cirkularnog dikroizma i služi za određivanje apsolutne konfiguracije spojeva ili strukture bioloških makromolekula. Ovom metodom se može odrediti udio pojedinih sekundarnih struktura proteina, primjerice α -zavojnica, β -nabranih ploča te okreta ili neuređenih dijelova proteina, zbog čega CD ima široku primjenu u strukturnoj analizi proteina i proteinskih kompleksa¹⁴.

2.3.7. Enzimska kinetika

Enzimska kinetika daje nam uvid u mehanizam kojim enzimi kataliziraju specifične kemijske reakcije. Uzmimo jednostavan primjer kada enzim, E, i supstrat, S, formiraju kompleks ES s konstantom brzine k_1 , dok je konstanta disocijacije kompleksa k_{-1} . Zatim dolazi do nastanka produkta P koji disocira s enzima, konstantom brzine k_2 . U uvjetima suviška supstrata u reakcijskoj smjesi, može se zanemariti povratna reakcija s konstantom k_{-2} .

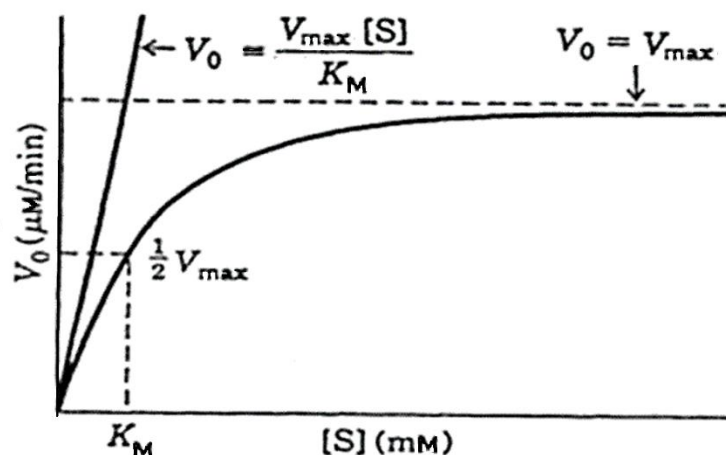


U uvjetima ustaljenog stanja, koncentracija međuprodukta, $[ES]$, je konstantna, odnosno katalitička mjesta na enzimu zasićena su supstratom te je $[ES]$ jednaka ukupnoj koncentraciji enzima $[E]_{uk}$. Tada je katalitička brzina jednaka umnošku koncentracije $[ES]$ i konstante k_2 ,

$$V_0 = k_2[ES] \quad (19)$$

Početna brzina katalize, V_0 , koja je definirana kao broj molova produkta nastalog u sekundi, ovisi o koncentraciji supstrata $[S]$ kako je prikazano na slici 6 te se prema Michaelis-Menten jednadžbi računa kao:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (20)$$



Slika 6. Prikaz modela Michaelis-Menten kinetike i parametara koji se mogu odrediti iz krivulje ovisnosti početnih brzina reakcije, V_0 , o koncentraciji supstrata, $[S]$. Preuzeto iz¹⁵.

Brzina katalize pri vrlo niskoj koncentraciji supstrata, kada je $[S]$ mnogo manje od K_M , raste linearno s povećanjem koncentracije supstrata, $V_0 = (V_{max}/K_M)[S]$. Pri visokoj koncentraciji supstrata, kada je $[S]$ mnogo veće od K_M , $V_0 = V_{max}$, odnosno brzina se asimptotski približava maksimalnoj brzini (V_{max}), neovisno o koncentraciji supstrata.

Michaelisova konstanta, K_M , je koncentracija supstrata $[S] = K_M$ pri kojoj se postiže brzina $V_0 = V_{max}/2$. K_M obuhvaća konstante brzine pojedinačnih koraka u gore prikazanoj katalitičkoj shemi s relacijom $K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$. To znači da je K_M jednaka konstanti disocijacije $[ES]$ ako je k_2 mnogo manja od k_{-1} , te tada ukazuje na afinitet kompleksa ES . Stoga je K_M važna karakteristika enzimski katalizirane reakcije i značajna je za biološku funkciju enzima.

Maksimalna brzina, V_{max} , omogućuje izračunavanje prometnog broja enzima, koji odgovara broju molekula supstrata pretvorenih u produkt molekulom enzima u jedinici vremena kada je enzim potpuno zasićen supstratom. Prometni broj enzima jednak je kinetičkoj konstanti k_2 , koja se naziva i k_{cat} . Iz maksimalne brzine, V_{max} , može se odrediti prometni broj enzima ako je poznata ukupna koncentracija enzima $[E]_{uk}$, i tada je $k_{cat} = V_{max}/[E]_{uk}$.

Kada je $[S] \ll K_M$, koncentracija slobodnog enzima, $[E]$, gotovo je jednaka ukupnoj koncentraciji enzima $[E]_{uk}$, te enzimsko brzina iznosi $V_0 = (k_{cat}/K_M)[S][E]_{uk}$. U tim uvjetima, k_{cat}/K_M je konstanta brzine interakcije S i E i može se koristiti kao mjera katalitičke učinkovitosti. Na primjer, korištenjem vrijednosti k_{cat}/K_M , može se usporediti specifičnost enzima za različite supstrate¹⁶.

2.3.8. Izotermna titracijska kalorimetrija, ITC

Izotermna titracijska kalorimetrija (ITC) je metoda koja se koristi u kvantitativnim studijama biomolekularnih interakcija, a vrlo je korisna jer može odrediti sve parametre vezanja istovremeno, u jednom eksperimentu. Temelji se na izravnom mjerenju topline koja se oslobađa ili apsorbira tijekom vezanja dvaju molekula, u njihovom nativnom obliku, bez potrebe za dodatnim obilježavanjem.

Prijenos topline se mjeri osjetljivim kalorimetrom, tijekom višekratnog titriranja liganda u ćeliju koja sadrži biomolekulu od interesa. U mikrokolorimetru postoje dvije ćelije, od kojih jedna sadrži vodu i djeluje kao referentna ćelija, a druga sadrži uzorak biomolekule (slika 7 A). Mikrokolorimetar konstantno drži ove dvije ćelije na potpuno istoj temperaturi. Senzor detektira temperaturnu razliku između ćelija kada dođe do vezanja i daje povratnu informaciju grijačima, koji kompenziraju tu razliku i vraćaju ćelije na jednaku temperaturu, pritom mjereći potrebnu energiju, a kada dođe do izjednačavanja signal se vraća na početnu vrijednost.

Ligand se nalazi u šprici, s vrlo preciznim mehanizmom za ubrizgavanje, koja je umetnuta u ćeliju s proteinom od interesa. Niz malih alikvota liganda ubrizgava se u proteinsku otopinu. Ako dolazi do vezanja liganda na protein, visokom osjetljivošću detektiraju se toplinske promjene, koje su izravno proporcionalne jačini vezanja (slika 7 B).

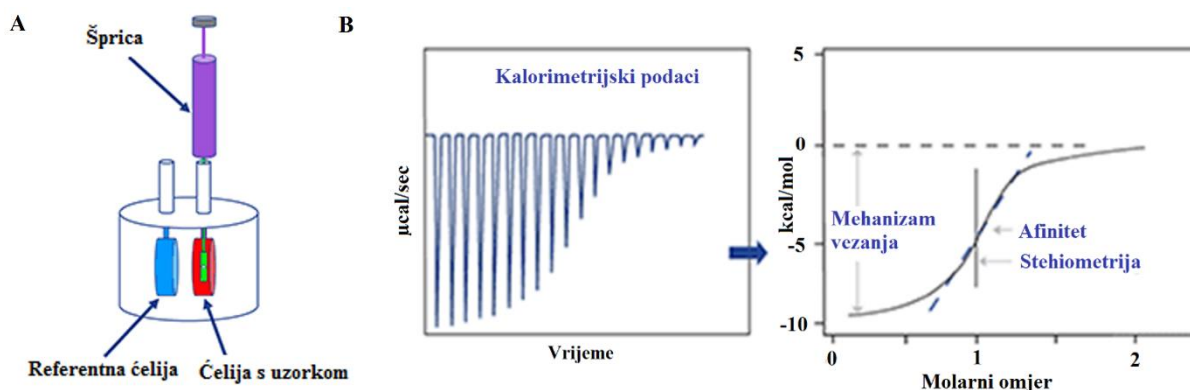
Kada je reakcija egzotermna, ćelija s uzorkom postaje toplija od referentne ćelije i daje silazni signal koji traje dok se ne kompenzira promjena topline. Obratno, endotermne reakcije daju uzlazni signal. Molarni omjer između liganda i proteina postupno se povećava nizom

injekcija liganda. Kako protein postaje sve više zasićen, sve se manje liganda veže prilikom titracije i promjena topline počinje se smanjivati. Kada ćelija s uzorkom sadrži suvišak liganda u odnosu na protein, reakcija dolazi do zasićenja i ne dolazi više do toplinske promjene nakon titracije.

Pri analizi rezultata, površine svakog od signala prilikom pojedine titracije se integriraju i konstruira se grafički prikaz njihove ovisnosti o molarnom omjeru liganda i proteina. Rezultirajuća izoterma može se uklopiti u vezni model iz kojeg se izvodi afinitet (K_d). Molarni omjer u točki infleksije izoterme vezanja daje nam reakcijsku stehiometriju.

Entalpija (ΔH) također se izvodi izravno iz izoterme i predstavlja količinu topline koja se oslobađa po molu vezanog liganda.

Daljnijim računom, iz K_d je moguće odrediti Gibbsovu slobodnu energiju vezanja (ΔG), $\Delta G = RT \ln K_d$, gdje je opća plinska konstanta $R = 8,314 \text{ J/molK}$. A također se iz jednadžbe $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ može odrediti i entropija reakcije. Stoga mjerenje prijenosa topline tijekom vezanja omogućuje precizno određivanje konstanti vezanja (K_d), reakcijske stehiometrije (N), Gibbsove slobodne energije vezanja (ΔG), entalpije (ΔH) i entropije (ΔS). Time se dobiva potpuni termodinamički profil molekularne interakcije¹⁷.



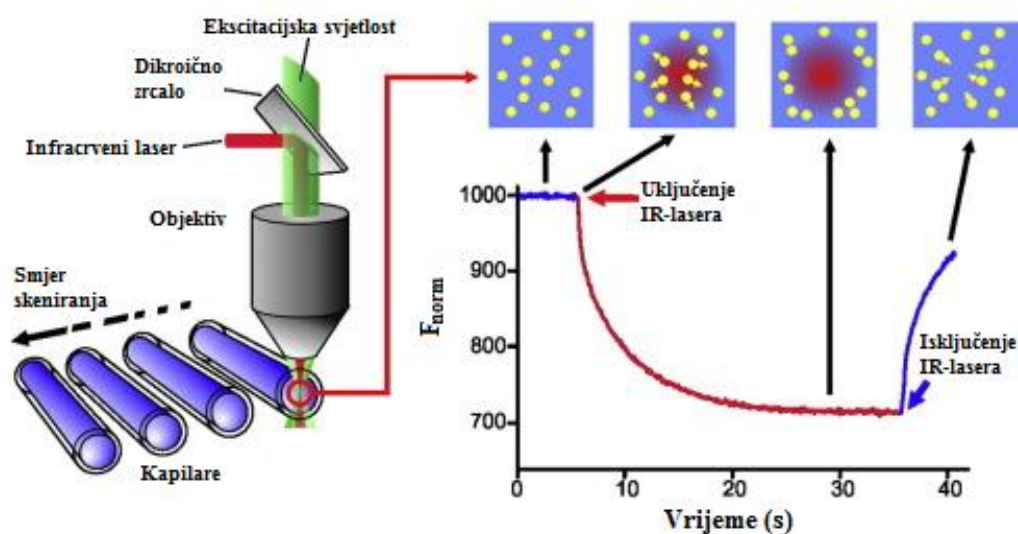
Slika 7. A) Skica mikrokolorimetra za eksperimente izotermne titracijske kalorimetrije, koji se sastoji od dvije ćelije, referentne, i ćelije koja sadrži uzorak biomolekule te je u nju umetnuta šprica iz koje se vrši titracija ligandom. B) Shema obrade rezultata mjerenja ITC. Prilikom svake titracije ligandom dolazi do reakcije vezanja, praćene toplinskom promjenom između mjerne i referentne ćelije koju uređaj kompenzira, nakon čega se vrijednost vraća na baznu liniju. Kod zasićenja ligandom toplinska promjena odgovara samo toplini razrijeđenja. Ovisnost toplinske promjene o koncentracijskim omjerima daje termodinamičke i kinetičke parametre vezanja. Preuzeto iz¹⁷.

2.3.9. Termoforeza, MST

Termoforeza na mikroskali ili mikrotermoforeza kao metoda praćenja interakcija biomolekula (engl. *MicroScale Thermophoresis*, MST) temelji se na praćenju usmjerenog kretanja fluorescentnih molekula kroz mikroskopske temperaturne gradijente u malim volumenima (μl). Dok je mala potrošnja proteinskog uzorka značajna prednost ove metode, nužnost obilježavanja biomolekule od interesa fluorescentnom bojom koja može utjecati na nativnu strukturu i sposobnost interakcije jedan je od nedostataka koji treba uzeti u obzir u dizajnu eksperimenta.

U uređaju za MST, termoforeza se inducira i detektira u malim staklenim kapilarama koje sadrže otopinu fluorescentnih molekula. Infracrveni (IR) laser s valnom duljinom emisije od 1480 nm fokusira se kroz objektiv na kapilaru kako bi proizveo mikroskopski temperaturni gradijent od 2–6 °C razlike u volumenu promjera $\sim 50 \mu\text{m}$. Tijekom induciranja temperaturnog gradijenta, fluorofori u otopini se pobuđuju i njihova emitirana fluorescencija se prikuplja na isti objektiv kao i infracrveni laser (slika 8).

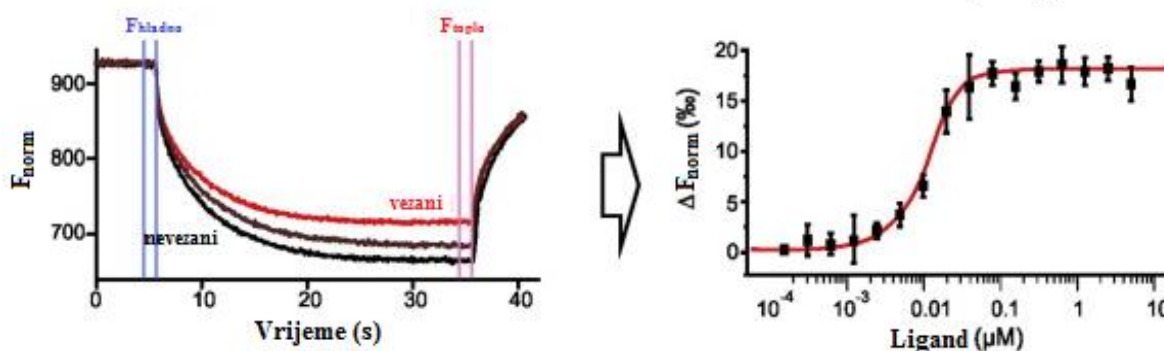
Temperaturna razlika ΔT u promatranom uzorku dovodi do migracije fluorescentno obilježenih biomolekula iz područja povišene temperature. Budući da termoforetska migracija ovisi o interakciji između molekule i otapala, u istom puferskom mediju, termoforeza ispituje veličinu, naboj i entropiju solvacije molekula.



Slika 8. Shematski prikaz optike u uređaju za MST. Fluorescencija unutar kapilare se pobuđuje i detektira kroz isti objektivi. Fokusirani IR-laser koristi se za lokalno zagrijavanje određene količine uzorka. Prati se termoforeza fluorescentnih molekula kroz temperaturni gradijent tijekom perioda laserske pobude. Tipičan signal MST eksperimenta sastoji se od početne vrijednosti, kada su molekule homogeno raspoređene u prostoru, zatim aktivacije IR lasera, kada se uočava temperaturni skok, tzv. T-skok, zbog nagle promjene svojstava fluorofora uslijed brze promjene temperature, nakon toga se prati termoforetsko kretanje fluorescentnih molekula iz zagrijanog područja uzorka, te nakon deaktivacije IR-lasera dolazi do inverznog T-skoka, nakon čega slijedi spontana difuzija molekula i postupno ispunjavanje promatranog područja. Preuzeto iz¹⁸.

Termoforeza proteina obično se značajno razlikuje od termoforeze kompleksa protein-ligand, a još značajnije protein-protein, zbog promjena u veličini, naboju i energiji solvacije kompleksa. Čak i ako vezanje ne mijenja značajno veličinu ili naboj proteina, može se detektirati vezanje na temelju promjena u entropiji solvacije molekula.

Za određivanje konstanti vezanja, više kapilara s konstantnom koncentracijom fluorescentne molekule i povećanjem koncentracije liganda skenira se uzastopno i mjeri se termoforeza. Promjene u termoforezi fluorescentnih molekula nakon vezanja na ligand tada se mogu koristiti za izračunavanje ravnotežnih konstanti vezanja (slika 9).



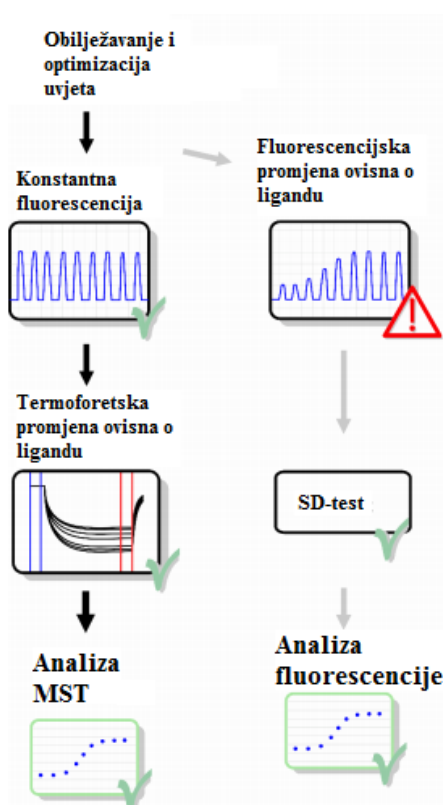
Slika 9. Primjer signala prilikom vezanja liganda na protein praćenog metodom MST. Termoforetsko kretanje fluorescentne molekule (crno, "nevezani") mijenja se nakon vezanja na nefluorescentni ligand (crveno, "vezani"), što rezultira različitim tragovima. Za analizu, promjena termoforeze izražava se kao promjena normalizirane fluorescencije (ΔF_{norm}), koja je definirana kao F_{toplo}/F_{hladno} (vrijednostima fluorescencije između definiranih područja označenih crvenim i plavim oznakama). Titracija različitim koncentracijama nefluorescentnog liganda rezultira postupnom promjenom termoforeze, te se iz grafičkog prikaza ovisnosti ΔF_{norm} o koncentraciji liganda u odgovarajućoj kapilari dobiva krivulja vezanja iz koje se može odrediti konstanta vezanja. Preuzeto iz¹⁸

Početna fluorescencija bi trebala biti jednaka u svim kapilarama budući da je ista količina fluorescentne molekule dodana u svaku kapilaru. U rijetkim slučajevima moguće je da dodatak liganda uzrokuje gašenje/pojačavanje fluorescencije koje ovisi o koncentraciji liganda. Tada se ne može analizirati sama termoforeza fluorescentne molekule uslijed pobude laserom, no u nekim slučajevima, promjena početne fluorescencije može se iskoristiti za određivanje konstante vezanja.

Ako dolazi do promjene početne fluorescencije ovisne o ligandu, mogući su razlozi:

1. Nespecifična adsorpcija na kapilare
2. Nespecifična adsorpcija na stijenke tubica u kojima se miješa uzorak
3. Agregacija fluorescentne molekule nakon dodavanja liganda
4. Gašenje ili pojačavanje fluorescencije uzrokovano ligandom

Kako bi se potvrdilo specifično vezanje liganda kao uzrok promjene u početnoj fluorescenciji molekule, izvodi se test denaturacije SDS-om (SD-test). Ako je nakon denaturacije fluorescencijski intenzitet za niske i visoke koncentracije liganda identičan, može se zaključiti da je promjena fluorescencije inducirana vezanjem (slika 10). Proces denaturacije dovodi do otpuštanja liganda s fluorescentne molekule, pa se njena fluorescencija regenerira denaturacijom. Uobičajeni razlozi promjena fluorescencije izazvanih ligandom su gašenje/stimulacija samog fluorofora, ako se ligand veže u njegovoj neposrednoj blizini, ili indukcija strukturnih promjena biomolekule. Promjena intenziteta fluorescencije se stoga može izravno koristiti za određivanje afiniteta vezanja¹⁸.

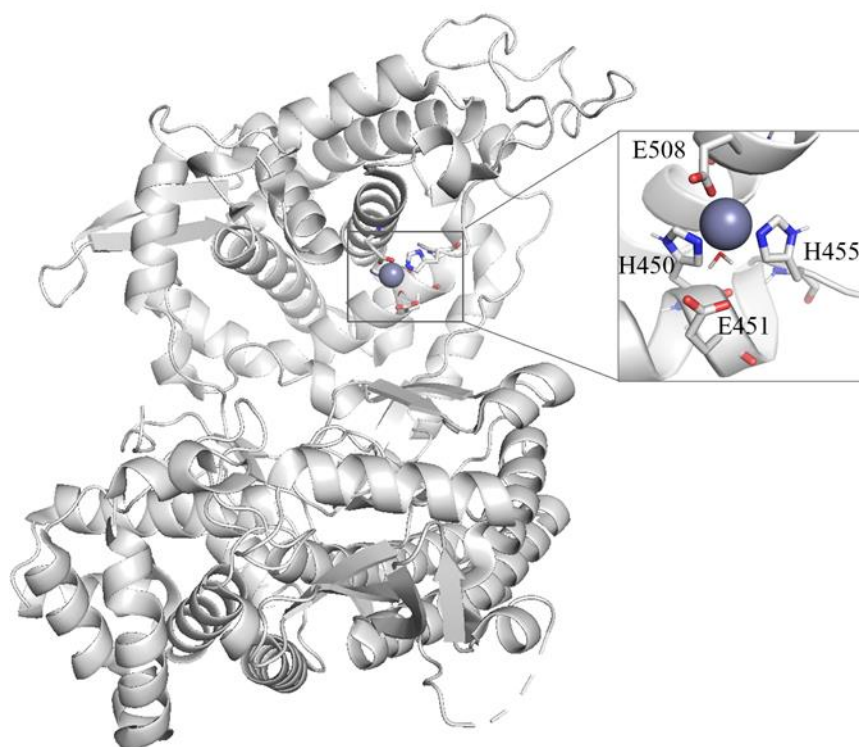


Slika 10. Upute proizvođača NanoTemper za proceduru mjerenja interakcija metodom termoforeze MST ili alternativno praćenjem fluorescencijske promjene uslijed vezanja. Preuzeto iz¹⁹.

2.4. Dipeptidil-peptidaza III

DPP III (EC 3.4.14.4) je citosolni monomerni protein sa 737 aminokiselinskih ostataka i relativnom molekulskom masom $M_r \sim 82,5$ kDa. Spada u skupinu metalo-egzopeptidaza iz obitelji M49, karakterističnih po jedinstvenim motivima, heksapeptidima HEXXXH i EECRAE koji sudjeluju u koordinaciji cinka te su kod DPP III ključni za katalizu uzastopnog cijepanja dipeptida s N-kraja peptida^{20,21}. Prema načinu koordinacije cinkovog iona i položaju katalitičkih ostataka ona je strukturno i funkcionalno slična nesrodnim cink-peptidazama termolizinu i neprilizinu, što ukazuje na sličnost u njihovom mehanizmu katalize²². DPP III je evolucijski očuvana od bakterija sve do biljaka i životinja²³, uključujući čovjeka kod kojeg je zastupljena u gotovo svakom tkivu, što ukazuje na njezin jedinstven biološki značaj²⁴.

Molekula DPP III sastoji se od pretežno helikalne gornje domene i donje domene koja u središnjem dijelu sadrži dvije paralelne β -nabrane ploče, sastavljene od pet β -vrpci, okružene α -zavojsnicama. Domene su odvojene širokim procjepom, a vezno mjesto s katalitičkim ionom Zn^{2+} nalazi se u gornjoj domeni uz sami procjep. Dva histidina, His450 i His455, te Glu508 iz drugog očuvanog motiva ⁵⁰⁷EEXR(K)AE(D)⁵¹² koordiniraju cink u aktivnom mjestu, dok je Glu451, koji se također nalazi u heksapeptidnom motivu, odgovoran za opću baznu katalizu preko aktivirane molekule vode koja zauzima četvrto koordinacijsko mjesto cinka u tetraedarskoj koordinaciji²² (slika 11).



Slika 11. Struktura humane DPP III u otvorenoj konformaciji s označenim aktivnim mjestom. Prikaz aktivnog mjesta DPP III u neveznoj konformaciji u kojem je Zn (kuglica) koordiniran s dva histidina, His450 i His455, i glutamatom, Glu508, te molekulom vode koja je vezana na Glu451 (štapićasti prikaz).

DPP III pokazuje aktivnost prema peptidima dužine 3-10 aminokiselina, a najveću prema supstratima s 4-8 aminokiselina, i to s relativno širokom supstratnom specifičnošću. Za ispitivanje aktivnosti enzima DPP III *in vitro* najčešće se koristi sintetski supstrat Arg-Arg-2-naftilamid (Arg₂-2NA)²⁵.

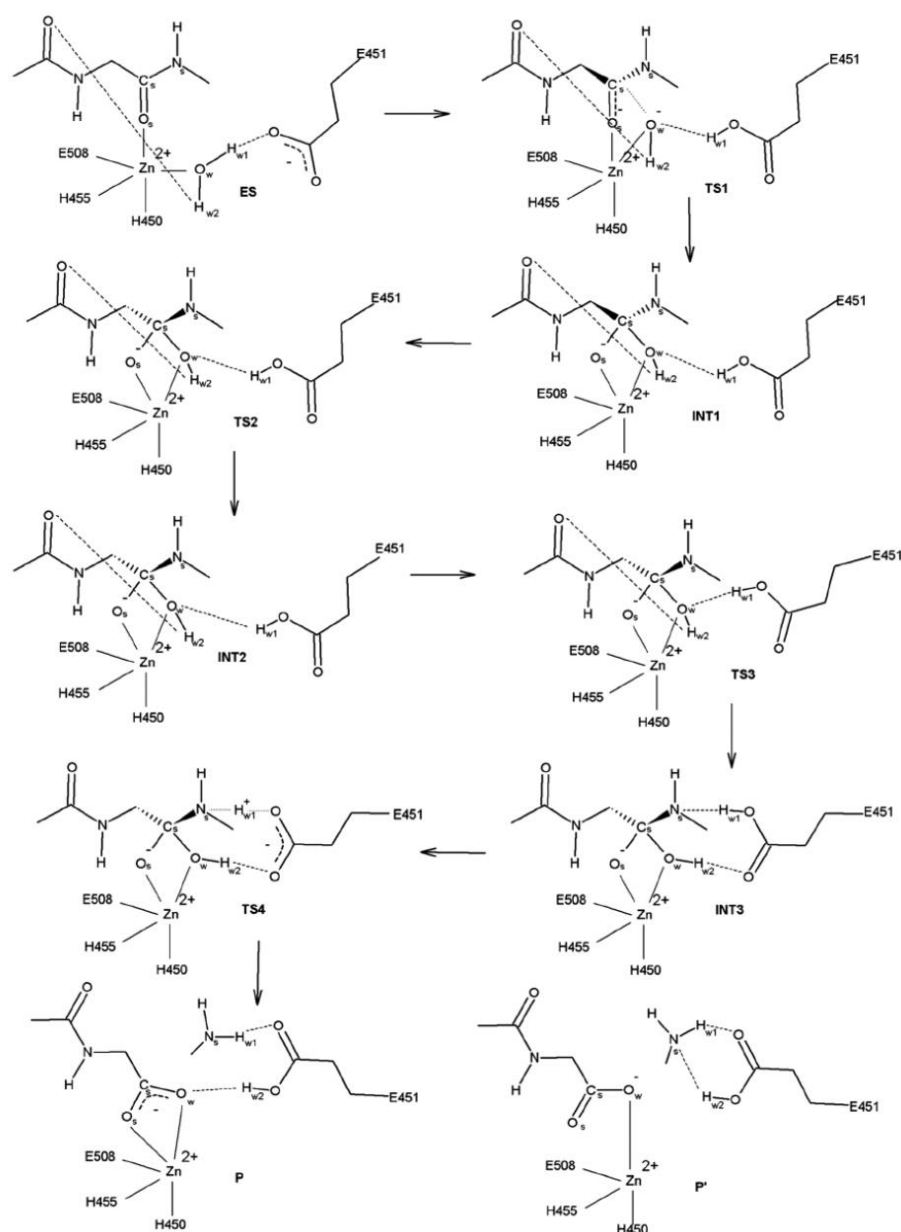
Kristalografskim metodama određen je velik broj struktura DPP III u apo obliku (bez vezanog liganda) i u kompleksu s peptidnim ligandima, te je potvrđeno da DPP III može postojati u dvije konformacije: otvorenoj i zatvorenoj. Otvorena konformacija, u kojoj je katalitički ion cinka vezan na gornju domenu udaljen 15 Å od položaja gdje se veže supstrat, uočena je u apo strukturama, dok je zatvorena konformacija uočena u kompleksu s peptidima. Peptidni supstrati smještaju se u procjep te vezanjem supstrata dolazi do konformacijske promjene prilikom koje se domene proteina međusobno približe i zatvore procjep, a da pri tome sekundarne strukture pojedinih domena ostaju očuvane. Ovo zatvaranje strukture omogućuje

pravilno pozicioniranje supstrata za enzimsku katalizu uz stvaranje vodikovih veza između supstrata i gornje domene proteina, čime nastaje aktivan kompleks enzima i supstrata.

Približavanje dvaju domena endoterman je proces, no, zbog entropijskog doprinosa otpuštanja velikog broja molekula vode iz procjepa prilikom zatvaranja, ukupna promjena Gibbsove energije je negativna²⁶. Simulacijama molekulske dinamike uočeno je da su otvorena i zatvorena konformacija DPP III u ravnoteži u nevezanom obliku, ali da prisustvo liganda pomiče ravnotežu prema zatvorenoj konformaciji^{27,28}. Stoga je razumljiva sposobnost DPP III da veže peptide različitog sastava i duljine sa širokom supstratnom specifičnošću.

Ciljana mutageneza ljudske DPP III supstitucijom His568 s Asn pokazala je da je taj ostatak ključan za enzimsku aktivnost, dok je supstitucija Tyr318 s Phe također značajno smanjila katalitičku efikasnost enzima uz isti supstrat. Trp300, također evolucijski očuvan u obitelji M49, sudjeluje u vezanju liganada i također je nužan za ostvarivanje katalitički aktivne strukture aktivnog mjesta²⁹.

Računalnim metodama određeno je da je tijekom reakcije hidrolize koordinacijski broj cinka 5, pri čemu u koordinaciji sudjeluju His450, His455, Glu508, supstrat i voda. Prvi korak u reakciji hidrolize peptidne veze u aktivnom mjestu DPP III je nukleofilni napad molekule vode, prethodno deprotonirane od strane Glu451, na karbonilni ugljik peptidne veze koja se cijepa. Oksianionski međuprodukt stabiliziran je elektrostatskim interakcijama sa Zn^{2+} i vodikovom vezom s His568, a u stabilizaciji sudjeluje i Tyr318 koji ostvaruje vodikovu vezu s prvom NH skupinom supstrata³⁰ (slika 12).



Slika 12. Mehanizam reakcije hidrolize peptidne veze humane DPP III (ES: kompleks enzim-supstrat, TS1- 4: prijelazna stanja, INT1-3: međuprodukti i P, P': produkti). Preuzeto iz³¹.

S obzirom na relativno nespecifičnu hidrolitičku aktivnost prema kratkim peptidima, smatra se da je glavna uloga DPP III u stanicama sudjelovanje u posljednjim fazama katabolizma proteina u citosolu. Također postoje i dokazi njene uključenosti u regulaciju krvnog tlaka i boli, cijepanjem bioaktivnih peptida kao što su njeni *in vitro* supstrati angiotenzini, enkefalini i endomorfini. Međutim, biološka uloga DPP III još je uvijek nedovoljno istražena^{24,32}. Osim toga, javljaju se dokazi da je DPP III uključena i u neka patofiziološka stanja, uključujući rak.

Pojačana aktivnost i razine DPP III nađeni su u malignim tkivima endometrija u usporedbi s normalnim tkivom³³, a povećana aktivnost DPP III povezana je i s pojačanom agresivnošću karcinoma jajnika³⁴. Nadalje, aktivnost DPP III može doprinijeti smanjenju prezentacije antigena na površini nekrotičnih tumorskih stanica umanjujući imunogeni odgovor³⁵. Gen DPP3 prepoznat je kao dio genskog potpisa koji je predložen kao značajan za predviđanje ishoda karcinoma kod čovjeka³⁶ te kao jedan od 21 gena usko povezanih s recidivom karcinoma dojke³⁷.

2.5. Signalni put odgovora na oksidacijski stres

Eukariotske stanice izložene su reaktivnim oksidacijskim radikalima, bilo iz endogenih ili egzogenih izvora. Radikali kisika i ostale kemijski reaktivne molekule oštećuju biološke makromolekule, DNA i proteine. Oksidacijska oštećenja mogu dovesti do pojave tumora, upale, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti te uzrokuju starenje. Mehanizam zaštite stanica od oksidacijskih oštećenja uključuje koordiniranu aktivaciju skupine citoprotektivnih gena, čiji produkti omogućuju stanicama da neutraliziraju reaktivne molekule i ponovno uspostave staničnu redoks homeostazu. Ovakav citoprotektivni genski sustav reguliran je na razini transkripcije, preko transkripcijskog faktora NRF2 koji se veže na tzv. elemente antioksidacijskog odgovora (engl. *antioxidant response elements* (ARE)).

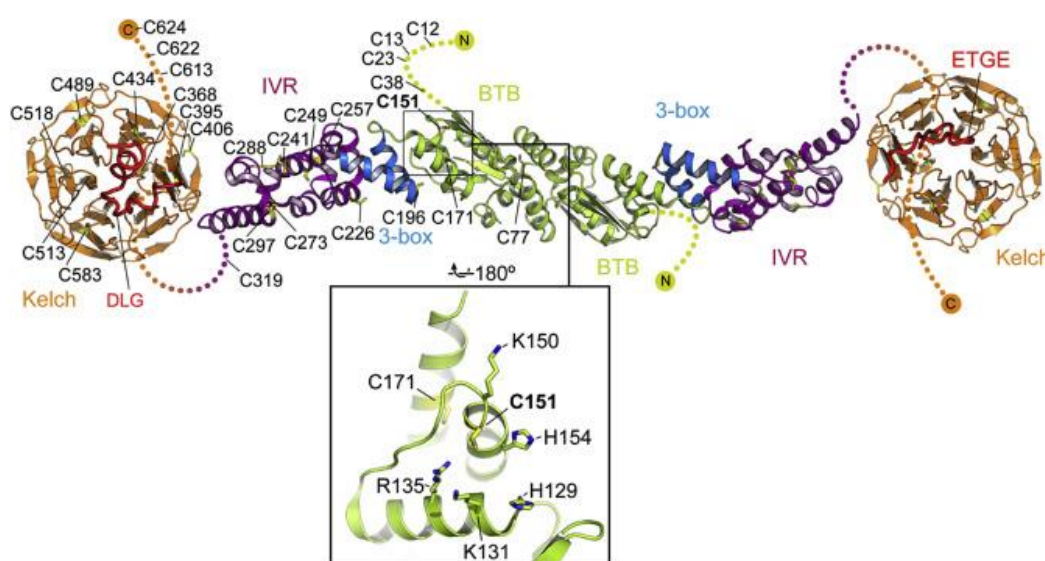
KEAP1 regulira i staničnu lokalizaciju i razinu NRF2 prisutnu u stanicama. Vezanjem na aktinski citoskelet posreduje u zadržavanju NRF2 u citoplazmi, što onemogućuje njegovu translokaciju u jezgru i transkripcijsku aktivnost.

C-terminalna domena Kelch proteina KEAP1 (slika 13) veže domenu Neh2 NRF2, kojoj zbog intrinzične neuređenosti kristalografska struktura nije poznata. U uvjetima homeostaze, kompleks E3 ubikvitin-ligaze, koji se sastoji od NRF2, KEAP1, Cul3, E3 ubikvitin-protein ligaze, i E2 ubikvitin-konjugirajućeg enzima (slike 14 i 15), pozicionira specifične lizinske ostatke u domeni Neh2 NRF2 za modifikaciju ubikvitinacijom i označuju NRF2 za razgradnju. NRF2 u konstitutivnim uvjetima kontinuirano prolazi proteasomsku degradaciju. Oksidacijski stres i modifikacija cisteinskih ostataka na KEAP1, kao i kompetitivno vezanje drugih proteina interaktora, rezultiraju akumulacijom neubikvitiniranog NRF2 u stanici. Translokacijom u jezgru i vezanjem u kompleksu s proteinima MAF na prepoznatljive sljedove ARE

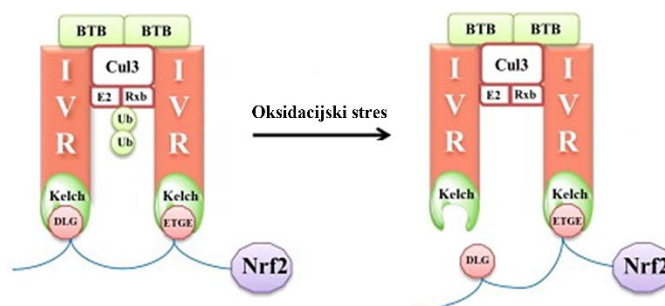
citoprotektivnih gena, NRF2 potiče transaktivaciju gena kritičnih za adaptivni odgovor na oksidacijski stres^{38–40}.

Put NRF2/ARE regulira ekspresiju više od 500 gena. Ciljni geni obuhvaćaju enzime detoksifikacije faze I i II, transportne proteine, proteasomske podjedinice, šaperone, faktore rasta i njihove receptore, kao i neke druge transkripcijske faktore. Ovi enzimi su odgovorni primjerice za popravak i uklanjanje oštećenih proteina, preživljavanje stanica i smanjenje oksidacijskog oštećenja⁴¹.

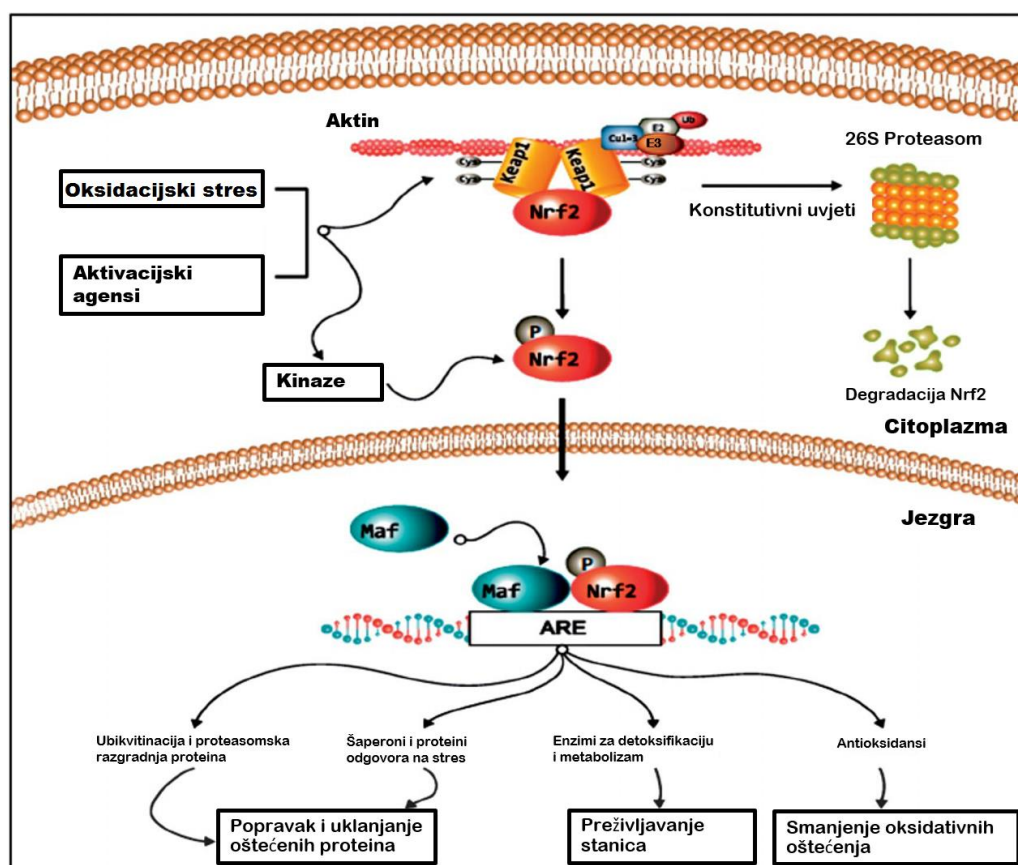
Homodimer KEAP1 djeluje kao represor NRF2 vezanjem na očuvane motive ETGE i DLG unutar regulacijske domene Neh2 monomera NRF2 (slika 14). Iako se motivi ETGE i DLG vežu na domenu Kelch proteina KEAP1 na sličan način, motiv ETGE ima znatno veći afinitet i drži NRF2 vezanim na KEAP1, dok motiv DLG služi za zaključavanje vezane konformacije. Ispravno postavljanje lizina domene Neh2 NRF2 u toj konformaciji ključno je za učinkovitu ubikvitinaciju NRF2 i usmjeravanje u razgradnju. Takav mehanizam omogućuje regulaciju selektivnim zaključavanjem i otključavanjem kompleksa KEAP1 – NRF2 u normalnim i u uvjetima oksidacijskog stresa⁴² (slika 15).



Slika 13. Model strukture homodimera KEAP1, konstruiran prema strukturama BTB i BACK domena KLHL11 (PDB ID: 3I3N) za BTB i IVR domene te domene Kelch proteina KEAP1 u kompleksu s motivom ETGE (PDB ID: 2FLU) ili motivom DLG (PDB ID: 3WN7). Cisteinski ostaci KEAP1 su modelirani na strukturu KLHL11 i numerirani kao u sekvenci humanog KEAP1. Isječak prikazuje okruženje visoko reaktivnog C151 (PDB ID: 4CXI), s okolnim bazičnim ostacima koji su prikazani kao štapići i numerirani. Prilagođeno prema slici iz ⁴⁰.



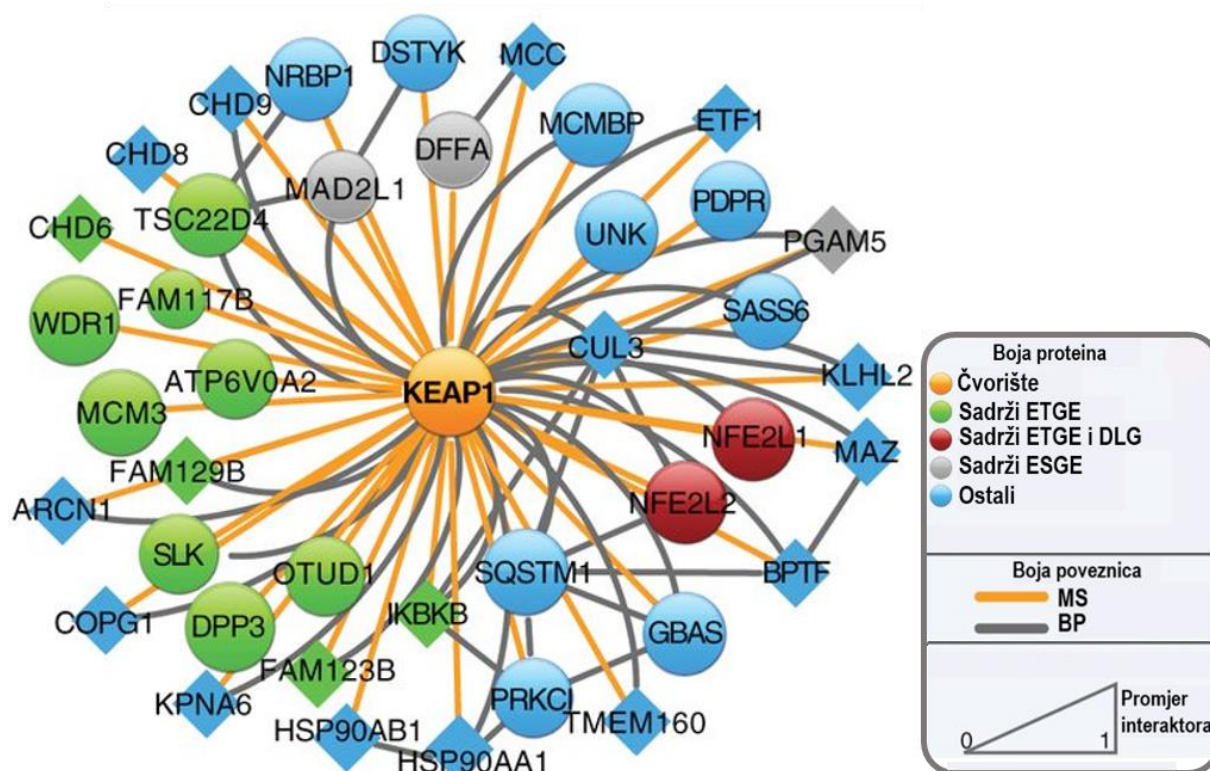
Slika 14. Model vezanja KEAP1 – NRF2 preko dva motiva, ETGE i DLG. U uvjetima oksidacijskog stresa dolazi do otpuštanja motiva slabijeg afiniteta DLG čime je onemogućeno pozicioniranje NRF2 za ubikvitinaciju. Slika prilagođena iz ³⁹.



Slika 15. Shematski prikaz regulacije aktivnosti NRF2. Kompleks NRF2, KEAP1, Cul3, E3 ubikvitin-protein ligaze, i E2 ubikvitin-konjugirajućeg enzima vezan je u konstitutivnim uvjetima na aktinski citoskelet u citoplazmi. Ubikvitinacija usmjerava NRF2 za kontinuiranu razgradnju. U uvjetima oksidacijskog stresa ili indukcijom agensima, NRF2 se oslobađa iz kompleksa i translocira se u jezgru gdje potiče transkripciju ključnih citoprotektivnih gena. Prema slici iz ⁴¹.

Jedinstvena struktura KEAP1, koja poput adaptora omogućuje selektivno vezanje većeg broja proteina, odgovorna je za njegovu ulogu ključnog čvorišta odgovora na oksidacijski stres. Takvi proteini čvorišta (engl. *hub*), koji imaju visok stupanj povezivanja, nužni su za funkcionalnost i integritet proteinskog interaktoma. C-terminalna domena Kelch proteina KEAP1, veličine ~ 32 kDa sa strukturom β -propelera veže ~ 100 ostatka dugu, intrinzično neuređenu domenu Neh2 NRF2 preko dvaju veznih motiva različitim afinitetom⁴³.

Proteomički su identificirani vezni partneri KEAP1 koji kompetiraju za vezanje s NRF2 (slika 16). Od 42 potencijalna interaktora KEAP1, za 17 je utvrđeno da sadrže motive ETGE ili ESGE. Stoga je pretpostavljen model kompetitivne regulacije interakcija KEAP1 – NRF2 proteinima koji sadrže ove motive, te mogu aktivirati transkripcijsku aktivnost NRF2 i u konstitutivnim uvjetima. Kao i kod NRF2, motivi ETGE/ESGE kompetitivnih interaktora KEAP1 nalaze se u neuređenim regijama tih proteina⁴⁴. Upotrebom pristupa koji kombinira eksperimentalne i računalne metode ispitivane su interakcije strukturiranog središta, domene Kelch KEAP1, s do tada identificiranim intrinzično neuređenim veznim partnerima WTX, p62, PGAM5, PALB2, FAC1, PTMA i IKK β . Utvrđeno je da osim NRF2, domena Kelch KEAP1 može specifično vezati neuređene regije drugih partnera koji dijele slične vezne motive, sa širokim rasponom afiniteta vezanja⁴³.



Slika 16. Shematski prikaz mreže interakcija proteina KEAP1 određene afinitetnom kromatografijom i masenom spektrometrijom (MS) u radu Hast i sur. 2013 te prema podacima iz baza podataka (BP). Interaktori su definirani bojom i veličinom prema slijedu odnosno bodovanju vjerojatnosti interakcije programom SPOTLITE, a poveznice bojom linije prema izvoru podataka. Za razliku od kružnih, pravokutni čvorovi predstavljaju granične vjerojatnosti za potvrdu interakcija. Crveno označeni su geni za proteine NRF1 (NFE2L1) i NRF2 (NFE2L2). Prema slici iz ⁴⁴.

Aktivacija NRF2 može imati dvojaki efekt, može zaštititi normalne stanice od oštećenja tijekom oksidacijskog stresa, međutim, kod stanica raka, u kojima je oksidacijsko oštećenje posljedica djelovanja ksenobiotika poput kemoterapijskih lijekova, ovaj mehanizam može potaknuti rezistenciju na terapiju⁴⁵. Somatske mutacije nekog od proteina ovog signalnog puta, KEAP1, CUL3 ili NRF2, kao i epigenetske, metaboličke ili promjene u broju kopija gena, mogu utjecati na ovaj signalni put^{45,46}. Također, identificirani su kompetitivni interaktori proteina KEAP1 koji sadrže motive ETGE ili STGE, uključujući DPP III, koji mogu utjecati na proteinske interakcije i prijenos informacija u odgovoru na oksidacijski stres⁴⁵.

2.6. Uključenost DPP III u signalni put KEAP1 – NRF2

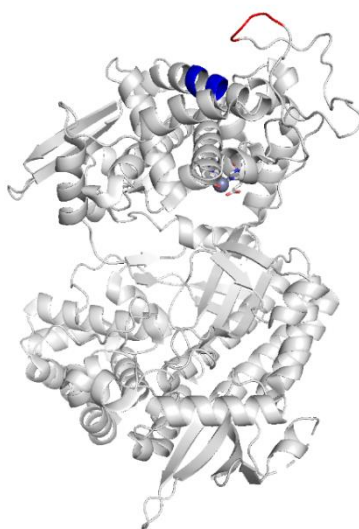
Poznato je da su tumori povezani s poremećajima u procesima signalizacije, a potvrđeno je da DPP III vezanjem na KEAP1 sudjeluje u signalnom putu KEAP1 – NRF2, koji je narušen u mnogim stanicama raka, gdje ekspresija ciljnih gena NRF2 dovodi do rezistencije na kemoterapijske lijekove.

Prve implikacije uključenosti DPP III u odgovor na oksidacijski stres proizašle su iz identifikacije gena koji su uključeni u transkripcijsku aktivaciju ARE. Prekomjerna ekspresija DPP III ima pozitivan utjecaj na aktivaciju ARE, te je gen za DPP III prepoznat kao jedan od gena koji nije izravno povezan sa signalnim putom odgovora na oksidacijski stres, ali njegova prekomjerna ekspresija aktivira signalni put KEAP1 – NRF2⁴⁷. Nadalje, amplifikacija DPP III pronađena je u brojnim stanicama raka, u kojima može povećati aktivnost NRF2 i otpornost na oksidacijski stres^{44,48}.

Noviji radovi pokazali su da endogena DPP III ulazi u interakciju s KEAP1 u ovisnosti o oksidacijskom stresu, na način da je interakcija stimulirana vodikovim peroksidom. Također su utvrdili da DPP III stabilizira KEAP1 te da je ključna za brzinu indukcije aktivnosti NRF2 u estrogen receptor (ER)-pozitivnim stanicama raka dojke MCF7. Prekomjerna ekspresija DPP III u raku dojke i povišena razina mRNA DPP III pozitivno koreliraju s nizvodnom ekspresijom ciljnih gena NRF2 te negativnom prognozom kod ER-pozitivnog raka dojke, što sugerira DPP III kao potencijalni biomarker za prognozu i terapiju kod raka dojke⁴⁹. Osim genske amplifikacije, zabilježene su i brojne mutacije DPP III u karcinomu, a dostupne su i na cBioPortal-u⁴⁸.

Sve veća količina eksperimentalnih dokaza o sudjelovanju DPP III u razvoju raka pluća i dojke ukazuje da bi DPP III mogla biti uključena u razvoj raka putem deregulacije puta NRF2-KEAP1^{44,49}, međutim, pozadina i mehanizam ovog procesa do sada su nerazjašnjeni.

Poznato je da je motiv ETGE ključan za vezanje DPP III na domenu Kelch proteina KEAP1 (slika 17). Rezultati molekulskog uklapanja i simulacije MD potvrđuju model vezanja DPP III na domenu Kelch motivom ETGE, smještenim u dijelu fleksibilne petlje kojim je ona inače vodikovim vezama snažno vezana za tijelo proteina^{26,28}.



Slika 17. Prikaz strukture DPP III (PDB ID: 3FVY). Motiv ETGE označen je crveno, a mjesto kontakta na tijelu proteina plavo.

§ 3. MATERIJALI I METODE

3.1. Pretraživanje baze podataka cBioPortal

Baza cBioPortal^{48,50,51} za genomiku raka je on-line alat za vizualizaciju i analizu podataka iz *high-throughput* istraživanja genomike raka, kao što su genetske, epigenetske, ekspresijske i proteomske studije. Trenutno portal sadrži podatke iz 188 neredundantnih objavljenih studija raka, uključujući velike projekte poput Atlasa genoma raka (*The Cancer Genome Atlas*, TCGA) i Međunarodnog konzorcija za genome raka (*International Cancer Genome Consortium*, ICGC). Genomski tipovi podataka dostupni na cBioPortal-u uključuju somatske mutacije, promjene broja genskih kopija, ekspresiju mRNA i mikroRNA (miRNA), metilaciju DNA, ekspresiju proteina i proteinske modifikacije. Pomoću sučelja je moguće interaktivno pretraživati genetske promjene uzoraka, gena i signalnih putova te ih povezati s kliničkim rezultatima⁴⁸. Ova baza korištena je za odabir mutacija u genima DPP3 i KEAP1, čiji će utjecaj na afinitet vezanja ovih dvaju proteina biti testiran. Pretražene su sve neredundantne studije u bazi za svaki od željenih gena, te su pregledani rezultati koji obuhvaćaju točkaste mutacije. Posebna je pažnja posvećena mutacijama u regijama koje mogu biti uključene u mehanizme interakcije DPP III i domene Kelch proteina KEAP1.

3.2. Metode molekulskog modeliranja

3.2.1. Parametrizacija i simulacije MD

Sve simulacije provedene su pomoću programskog paketa AMBER16⁵², a simulirani sustavi parametrizirani su upotrebom polja sila ff14SB⁵³ dostupnog u tom paketu, dok je cinkov ion unutar aktivnog mjesta proteina DPP III opisan korištenjem nedavno razvijenog hibridnog veznog/neveznog modela za ion cinka kod metalopeptidaza⁵⁴. Promatrane biološke molekule otopljene su u oktaedru korištenjem TIP3P molekula vode i neutralizirane Na⁺ ionima, a dodatni Na⁺ i Cl⁻ ioni dodani su radi postizanja željene koncentracije soli⁵⁵. Ostaci Arg i Lys u svim modelima bili su pozitivno nabijeni, dok su Glu i Asp ostaci negativno nabijeni, kao što je očekivano u fiziološkim uvjetima. Protonacijska stanja histidinskih ostataka određena su individualno na osnovu njihovog potencijala da formiraju vodikove veze sa susjednim

aminokiselinskim ostacima ili koordiniraju ion Zn^{2+} unutar aktivnog mjesta. Prije produktivnih simulacija MD provedene su minimizacija i ekvibracija. Sustav je minimiziran u 3 ciklusa s različitim ograničenjima. Prvi ciklus (1500 koraka minimizacije) korišten je za relaksaciju molekula vode, dok su položaji atoma proteina i cinkov ion (u simulacijama s cijelim proteinom DPP III) ograničeni korištenjem harmoničkog potencijala s konstantom sile od $32 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$. U drugom ciklusu (2500 minimizacijskih koraka) cinkov ion i molekule otapala su relaksirane, dok je položaj atoma proteina ograničen korištenjem iste konstante sile kao u prethodnom koraku. Konačno, cijeli je sustav minimiziran u trećem ciklusu (1500 koraka) bez dodatnih ograničenja. Tijekom ekvibracije, MD sustava je simulirana uz lagano zagrijavanje od 0 do 300 K tijekom 100 ps pomoću NVT ansambla, nakon čega je slijedila 1 ns simulacije na 300 K pomoću NPT ansambla. Za simulacije zagrijavanja i ekvibracije korišten je vremenski korak od 1 fs.

U produktivnim simulacijama MD korišten je algoritam SHAKE⁵⁶ za restrikciju C-H vibracija, što je omogućilo korištenje vremenskog koraka od 2 fs. Produktivne simulacije MD provedene su pomoću NPT ansambla. U simulacijama je tlak reguliran Berendsenovim barostatom⁵⁷, a temperatura kontrolirana korištenjem Langevinova termostata⁵⁸.

Simulacije ASMD⁵⁹ provedene su u 5 koraka s po 10 replika za svaki korak. Nakon svakog koraka struktura najbliža Jarzynskijevom prosjeku⁶⁰ korištena je kao početna točka u sljedećem skupu paralelnih simulacija. Za simulacije ASMD korišten je NVT ansambl koji je zasnovan na simulacijama koje su proveli Bureau i sur. 2015⁶¹, dok su ostali parametri simulacije bili isti kao za klasične simulacije MD.

3.2.2. Konstrukcija domene KelchC

U računalnim simulacijama korištena je domena KelchC koja sadrži C-terminalnu regiju proteina, čija struktura nije kristalografski određena. Kristalografski određena struktura domene Kelch bez C-kraja (PDB ID: 2FLU) korištena je kao uzorak, a model je sagrađen programom Modeller 9.14⁶².

3.2.3. Vezanje petlje ETGE DPP III na Kelch

Model petlje ETGE, 24 aminokiselinska ostatka dug peptid koji odgovara segmentu DPP III Phe469-Gly492, FNFDQETVINPETGEQIQSWYRSG, generiran je pomoću programa Pepbasic3D⁶³. Nakon minimiziranja i ekvibracije, peptid je simuliran 200 ns te je konačna struktura (smotana) korištena za simulacije ASMD vezanja peptida na domenu Kelch (PDB ID: 2FLU) pri čemu je njihova početna udaljenost bila 22 Å. Provedeno je 5 ciklusa ASMD (sa silom privlačenja 3 kcal/mol) s po 10 zasebnih simulacija u svakom ciklusu (ukupno 10 ns po ciklusu). Kompleks domene Kelch s peptidom dugačkim 11 ak, koji odgovara segmentu petlje Val476-Gln486, izgrađen je iz kompleksa Kelch – peptid 24 ak, dobivenog simulacijama ASMD, uklanjanjem aminokiselinskih ostataka na krajevima peptida. Rezultirajući kompleksi (s peptidom od 24 ak i 11 ak) relaksirani su tijekom 3 nezavisne simulacije MD u trajanju od po 100 ns. Na temelju MM-PBSA računa u svakom od ciklusa određena je najpovoljnija konformacija koja je zatim tijekom 50 ns ohlađena na 100 K. Slijedilo je 50 ns simulacija na 100 K te ponovno zagrijavanje na 300 K u trajanju od 50 ns. Dobivena struktura korištena je kao polazna točka za produktivne simulacije MD na 300 K u trajanju od ukupno 300 ns. Energetski doprinosi interakcija izračunati su metodom MM-PBSA na posljednjih 30 ns simulacija.

3.2.4. Odvajanje petlje ETGE DPP III

Petlja ETGE DPP III u proteinu je čvrsto pričvršćena uz površinu strukturiranog dijela jakim intramolekulskim elektrostatskim (Arg-Glu) interakcijama i vezanje na domenu Kelch jedino je moguće ako dođe do njenog oslobađanja. Sila potrebna za to određena je prethodno simulacijama ASMD kako bi se analizirao njen doprinos relativnim afinitetima vezanja različitih homologa DPP III na Kelch. Simulacije su provedene za divlji tip DPP III te za mutirane varijante R623W i R624W, i to u otvorenoj, zatvorenoj i djelomično otvorenoj konformaciji⁶⁴.

Klasične simulacije MD u vodi, u 3 nezavisna ponavljanja od 50 ns, provedene su zatim s varijantama DPP III s dvostrukim mutacijama, R623A/R624A i R623W/R624A, u poluotvorenoj konformaciji, kako bi se ispitaio kumulativni utjecaj sile kojom ova dva aminokiselinska ostatka drže petlju ETGE pričvršćenu uz tijelo proteina.

3.2.5. Struktura kompleksa za simulacije MD

Strukture kompleksa DPP III- Kelch pripremljene su u Pymolu⁶⁵ koristeći kristalografsku i modeliranu strukturu kompleksa Kelch s peptidom ETGE DPP III kao predložak, te su uspoređene s podacima prikupljenim metodom SAXS⁶⁴. Na temelju toga odabran je model kompleksa DPP III-Kelch, koji je korišten za simulacije MD kompleksa s divljim tipovima proteina, kao i mutiranim varijantama, ukupnog trajanja 700 ns.

3.2.6. Uvođenje mutacija u proteinske strukture

Mutirane varijante odabrane u bazi cBioPortal, kao one s potencijalnim utjecajem na vezanje Kelch – DPP III, priređene su iz prethodnih polaznih struktura divljeg tipa proteina DPP III ili Kelch, odnosno njihovog kompleksa, korištenjem programa tleap⁶⁶ u sklopu programskog paketa AMBER16. Pritom su položaji atoma okosnice ostatka koji se supstituira zadržani, dok su položaji atoma bočnih ogranka aminokiselinskih ostataka generirani nasumično programom. Tijekom daljnjih priprema i simulacija MD korišteni su simulacijski parametri i metode istovjetne onima za divlji tip proteina.

3.2.7. Analiza rezultata

Trajektorije prikupljene u simulacijama MD analizirane su tako da su računate promjene geometrijskih parametara i vodikovih veza tijekom simulacija, te su računati relativni afiniteti vezanja u obliku MM-PBSA i MM-GBSA računa slobodne energije.

Analizirani geometrijski parametri obuhvaćali su:

1. korijen srednjeg kvadrata odstupanja (engl. *root mean square deviation, RMSD*):

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_i - r_{i0})^2} \quad (21)$$

koji prikazuje srednje odstupanje vektora položaja svih atoma okosnice r_i u trenutku t od njihovog referentnog položaja r_{i0} .

2. korijen srednjeg kvadrata fluktuacija (engl. *root mean square fluctuation, RMSF*)

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t=1}^T (r_{i(t)} - r_{i0})^2} \quad (22)$$

koji prikazuje vremenski prosjek odstupanja vektora položaja svih atoma (okosnice) pojedinog atoma od referentnog (usrednjenog) položaja r_{i0} tijekom simulacije MD.

3. korijen srednje vrijednosti udaljenosti atoma od centra mase, radijus giracije (R_g)

$$R_g = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_i - r_{com})^2} \quad (23)$$

4. udaljenosti među aminokiselinskim ostacima koje su definirane kao udaljenost među njihovim C_α atomima.

Prilikom računanja $RMSD$, $RMSF$ i R_g uračunati su samo atomi okosnice proteina kako bi se izbjegle velike varijacije u vrijednostima koje su posljedica stohastičkog gibanja bočnih ograna. Granične vrijednosti kod računanja vodikovih veza bile su 135° za kut te $3,0 \text{ \AA}$ za udaljenost. Za određivanje svih geometrijskih parametara te analizu vodikovih veza korišten je modul `cpptraj`⁶⁷ programskog paketa AMBER16.

3.2.7.1. *MM-PBSA i MM-GBSA račun slobodne energije*

Za izračun energija vezanja Kelch – peptid ETGE ili Kelch – DPP III korištena je metoda MM-PBSA u sklopu programskog paketa AMBER16. MM-PBSA energije računaju se pomoću modula `MMPBSA.py`⁶⁸. Ionska jakost iznosila je $0,15 \text{ mM}$ dok je dielektrična konstanta proteina bila $1,0$, a otapala $80,0$ (voda). Uz iste postavke izračunate su i pripadne MM-GBSA energije, koristeći poopćeni Bornov model (engl. *Generalized Born*, GB)⁶⁹. Prilikom izračuna energija vezanja entropijski doprinos je zanemaren jer bi zbog veličine promatranog sustava to bilo računalno vrlo zahtjevno te bi zbog velikih pomaka u strukturnom rasporedu vezanih partnera tumačenje rezultata bilo znatno zahtjevnije.

3.3. Eksperimentalni dio

3.3.1. Materijali i oprema

Kemikalije:

agar, akrilamid-bisakrilamid smjesa (30:1), ampicilin, amonijev persulfat (APS), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Coomassie boja R-250, di-tio treitol (DTT), etanol, Fast Blue BN sol, glicerol, D-glukoza, imidazol, izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG), kanamicin, kloramfenikol, LB medij, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, β -naftilamin, natrijev dodecilsulfat (SDS), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NaCl, Ni-NTA agaroz (Qiagen), fluorescentna boja NT-647 RED-MALEIMIDE / RED-NHS (NanoTemper), β -merkaptetoetanol, metanol, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED), tris(hidroksimetil)aminometan (TRIS), tris(2-karboksietil)fosfin (TCEP), Tween 20, ZnCl_2

Enzimi:

Restriksijski enzimi: NdeI, BamHI (Fast digest, Thermo Scientific), DpnI (Agilent Technologies)

DNA-polimeraze: Phusion High Fidelity Dna Poly (Invitrogen)

Nukleaze: DNaseI (Sigma Aldrich)

Lizozim (Carl Roth)

Komercijalni setovi:

Setovi za molekularnu biologiju: In-Fusion HD Cloning (Takara Bio), QuikChange II XL (Agilent Technologies), CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific), Gel and PCR Clean-Up System (Promega),

GeneJET Plasmid MiniPrep Kit (Thermo Scientific)

Setovi za kristalizaciju: Index, Crystal Screen, SaltRX (Hampton Research), JCSG+ (Qiagen), Morpheus HT-96, Clear Strategy I i II, MIDAS (Molecular Dimensions)

Proteinski markeri: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Scientific), NativeMark™ Unstained Protein Standard (Thermo Scientific)

Bakterijski sojevi:

XL10-Gold (Agilent Technologies), BL21-CodonPlus(DE3)-RIL+ (Stratagene)

Instrumenti i aparature:

ITC: VP-ITC, PEAQ-ITC (MicroCal)

MST: Monolith NT.115 (NanoTemper)

nanoDSF: Prometheus (NanoTemper)

SAXS: SAXSspace (Anton Paar)

DLS: Zetasizer Nano series (Malvern)

Kristalizacijski robot: Oryx 8 (Douglas Instruments)

PCR: Prime Thermal Cycler (Techne)

Aparature za elektroforezu: Mini Protean Tetra Cell (Bio-Rad), PhastSystem (Pharmacia)

Spektrofotometri: BioDrop Duo (BioDrop), J-815 CD spektrofotometar (Jasco)

Fluorimetri: Cary Eclipse Fluorescence (Agilent Technologies)

Sustav za kromatografiju proteina: FPLC Äkta Pure (Pharmacia)

Termomikser: Eppendorf Thermomixer R (Thermo Scientific)

Centrifuge: Sorvall RC-5B (Sorvall), Eppendorf 5415 R (Eppendorf), Hettich Universal 320 R (Hettich); sonikator Labsonic M (B. Braun Biotech International);

Koncentratori: Amicon-Ultra 15 (30000 MWCO, Merck Millipore Ltd.); Vivaspin 20 (10000 MWCO, Sartorius)

Filtri: 0,22 i 0,45 µm (Carl Roth)

Kolone za odsoljavanje: PD-10 (Pharmacia), Zeba Micro Spin (Thermo Scientific)

Programi:

SnapGene, Graph Pad Prism 5.0., MO.Affinity Analysis v2.3., Dichroweb^{70,71}, Origin (OriginLab)

3.3.2. Metode

3.3.2.1. Ekspresijski vektori i mutageneza

Gen za ljudsku DPP III (UniProt: Q9NY33) divljeg tipa (DT) kloniran je u ekspresijski vektor pLATE31, s histidinskim privjeskom na C-kraju (ExpASy-ProtParam podaci: 745 ak, Mw 83526.11, pI 5.18, Abs 0.1% (=1 g/l) 1.211). Domena Kelch proteina KEAP1 (UniProt: Q14145, ostaci 321-609) klonirana je u plazmid pET15b, s histidinskim privjeskom na N-kraju (310 ak, Mw 33915.94, pI: 6.45, Abs 0.1% (=1 g/l) 1.720). Oba ekspresijska vektora sadrže gen za ampicilinsku rezistenciju.

Geni za konstrukte domene Kelch s dodatnim sekvencama na C ili oba, C i N-kraja, umnoženi su lančanom reakcijom polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) pomoću seta In-Fusion HD Cloning i specifičnih početnica naručenih od proizvođača MacroGen, s kalupa plazmidne DNA pGADT7-KEAP1. Dobiveni umnoženi inserti pročišćeni su na Thermo Scientific GeneJet gel extraction and DNA cleanup Micro Kit kolonicama prema uputama proizvođača. Restrikcija plazmida pET-15b-Kelch (R470C) u In-Fusion kloniranju provedena je odgovarajućim FastDigest restrikcijskim enzimima, NdeI i BamHI (prema protokolu Thermo Scientifica). Provjera uspješnosti ugradnje ciljnog gena u vektor provedena je reakcijom PCR s početnicama T7F i T7R (tablica 1) izravno iz bakterijskih kolonija.

Mutacije su u gene za DPP III i Kelch uvedene korištenjem komercijalnog seta za mutagenezu QuickChange Kit II XL pomoću specifičnih početnica koje sadrže željene mutacije (tablica 1). Početnice su naručene od proizvođača MacroGen. Korištene su za umnažanje vektora PCR-om, tako da u konačnici sadrže željenu mutaciju. Početni vektori divljeg tipa se cijepaju enzimom *DpnI*, te se vrši kemijska transformacija stanica XL10-Gold iz seta QuickChange i selekcija transformanata na ampicilinskim pločama. Iz pojedinačnih kolonija je izolirana plazmidna DNA upotrebom seta GeneJET Plasmid Mini-Prep Kit i sekvenciranjem ciljanih gena (MacroGen) je provjerena prisutnost željene mutacije. Sekvence su analizirane programom SnapGene.

Tablica 1. Početnice korištene za provjeru sekvenci (T7F, T7R) te za ciljanu mutagenezu u genima za DPP III i Kelch metodom QuickChange. Za svaku od uvedenih mutacija navedene su početnica u glavnom (F, forward) i komplementarnom (R, reverse) lancu, u smjeru 5'→3'.

	POČETNICE
komercijalne	
T7F	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7R	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
mutacije DPP III	
E451K	F- 5'-CAGGTGGGCTGCACAAGCTGCTGGGCCATGGC- 3' R- 5'-GCCATGGCCAGCAGCTTGTGAGGCCACCTG- 3'
P479S	F- 5'-GAAACAGTGATCAACTCAGAGACGGGCGAGC-3' R- 5'-GCTCGCCCGTCTCTGAGTTGATCACTGTTTC- 3'
E480Q	F- 5'-GTGATCAACCCACAGACGGGCGAGCAG- 3' R- 5'-CTGCTCGCCCGTCTGTGGGTTGATCAC- 3'
T481M	F- 5'-GATCAACCCAGAGATGGGCGAGCAGATTC- 3' R- 5'-GAATCTGCTCGCCCATCTCTGGGTTGATC- 3'
G482C	F- 5'-CAACCCAGAGACGTGCGAGCAGATTCAG-3' R- 5'-CTGAATCTGCTCGCACGTCTCTGGGTTG-3'
Q484H	F- 5'-GAGACGGGCGAGCACATTCAGAGCTGGTATC-3' R- 5'-GATACCAGCTCTGAATGTGCTCGCCCGTCTC-3'
R620C	F- 5'-GGGCAAGCCTGCTCTAGAGTGCTTCCTGCGGAGACTTCAGGTGC-3' R- 5'-GCACCTGAAGTCTCCGCAGGAAGCACTCTAGAGCAGGCTTGCCC-3'
R623L	F- 5'-GCTCTAGAGCGCTTCCTGCTGAGACTTCAGGTGCTGAAGTCC-3' R- 5'-GGACTTCAGCACCTGAAGTCTCAGCAGGAAGCGCTCTAGAGC-3'
R623W	F- 5'-GCTCTAGAGCGCTTCCTGTGGAGACTTCAGGTGCTGAAGTCC-3' R- 5'-GGACTTCAGCACCTGAAGTCTCCACAGGAAGCGCTCTAGAGC-3'
R638L	F- 5'-GATGTGGCCGGAGGGCTGGCCCTGTACGAGG-3' R- 5'-CCTCGTACAGGGCCAGCCCTCCGGCCACATC-3'
R638W	F- 5'-GATGTGGCCGGAGGGTGGGCCCTGTACGAGG-3' R- 5'-CCTCGTACAGGGCCACCCCTCCGGCCACATC-3'
R703C	F- 5'-CCATCCTCTGGGAAACACTCAGAGAAGGATCGG -3' R- 5'-CCGATCCTTCTCTGAGTGTTTCCCAGAGGATGG -3'
R703H	F- 5'-GTCCATCCTCTGGGAAATGCTCAGAGAAGGATCGG -3' R- 5'-CCGATCCTTCTCTGAGCATTTCCCAGAGGATGGAC -3'
mutacije Kelch	
R326D	F- 5'-GCCCAAGGTGGGCGACCTGATCTACACCGC -3' R- 5'- GCGGTGTAGATCAGGTCGCCCACCTTGGGC-3'
R470C	F- 5'- GTGGCTGTCTCAATTGTCTCCTTTATGCCG-3' R- 5'- CGGCATAAAGGAGACAATTGAGGACAGCCAC-3'
G333C	F- 5'- CACCGCGGGCTGCTACTTCCGACAG-3' R- 5'- CTGTCGGAAGTAGCAGCCCGCGGTG-3'
R415C	F- 5'- GCCCCGTAAGTGCATCGGGGTGGGG-3' R- 5'- CCCCACCCCGATGCAGTTACGGGGC-3'
G480W	F- 5'- GGGGGGCTTTGACTGGACAAACCGCC-3' R- 5'- GGCGGTTTGTCCAGTCAAAGCCCCC-3'
Y525C	F- 5'- CTGCTGGGGGCTGTGATGGTCAGGAC-3' R- 5'- GTCCTGACCATCACAGCCCCCAGCAG-3'

3.3.2.2. *Transformacija bakterija i ekspresija proteina*

Za potrebu heterologne ekspresije proteina izvršena je elektroporacijska transformacija soja bakterije *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL+ (Stratagene) plazmidima s proteinima divljeg tipa i varijantama s točkastim mutacijama. Transformanti su selektirani na ampicilinskim pločama te uzgojeni u prekonoćnim bakterijskim kulturama u tekućem mediju LB s dodatkom ampicilina (konačne koncentracije $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) pri 37°C i 250 okretaja u minuti (rpm). Te kulture su korištene za inokulaciju ekspresijske kulture volumena 500 ml u mediju istog sastava i pri istim uvjetima. Ekspresijske kulture uzgajane su do optičke gustoće na 600 nm (OD_{600}) $\sim 0,6$. Nakon 30 min hlađenja na 18°C , ekspresija proteina inducirana je dodatkom IPTG-a u konačnoj koncentraciji $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$. Ekspresija je trajala 20 h na temperaturi 18°C . Centrifugiranjem na 6000 rpm u trajanju 20 min bakterijske stanice odvojene su od medija i pohranjene na -20°C do pročišćavanja.

3.3.2.3. *Pročišćavanje proteina*

Bakterijski talozi resuspendirani su pri 4°C u puferu za lizu (50 mM Tris, 300 mM NaCl, $\text{pH}=8,0$) te su propuštanjem kroz homogenizator ili sonikacijom razbijene bakterijske stanice. Lizati su centrifugirani na 11 000 rpm kako bi se odvojili topivi proteini od taloga staničnih ostataka. Topiva frakcija iznad taloga filtrirana je preko filtera s porama promjera $0,45 \mu\text{m}$ prije nanošenja na Ni-NTA kolonu. Volumen kolone iznosio je 1-2 ml, ovisno o količini bakterijskih stanica. Afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozima⁷² pročišćavana su oba proteina, DPP III i Kelch, divljeg tipa i mutirane varijante. Lizat je nanošen na kolonu (ekvilibriranu u puferu za lizu) uz protok $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, nakon čega je slijedilo ispiranje uz protok $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ puferom za ispiranje (pufer za lizu uz dodatak 20 mmol L^{-1} imidazola), te su proteini konačno eluirani u puferu s 300 mM imidazolom (50 mM Tris HCl, 300 mM NaCl, 300 mM imidazol, $\text{pH}=8,0$). Koncentracija proteina određena je BioDrop-om, mjerenjem proteinske apsorbancije A280 prilagođene koeficijentu Abs 0.1%. Daljnje pročišćavanje izvršeno je gel-filtracijskom kromatografijom na sustavu za kromatografiju proteina FPLC Åkta (Pharmacia), na koloni Superdex S200 16/60. Prikupljene frakcije proteina analizirane su pomoću SDS-PAGE, na 10%-tnom gelu na aparaturi Mini Protean Tetra Cell (BioRad). Nativna elektroforeza provedena je na sustavu za elektroforezu PhastSystem (Pharmacia), na gradijentnim gelovima s 8-15%-tnim ili 4-25%-tnim poliakrilamidom. Gelovi su bojani bojom Coomassie Brilliant

Blue R-250. Proteinski alikvoti, ukoliko nisu odmah korišteni za eksperimente, pohranjeni su na -80 °C.

3.3.2.4. *Analiza proteina elektroforezom na gelu*

Za mjerenje proteinskih interakcija, a posebice za eksperimente kristalizacije proteinskih kompleksa, važno je utvrditi oligomerizacijsko stanje proteina u otopini. SDS-PAGE analizom, te nativnom gel elektroforezom analizirano je oligomerizacijsko stanje DPP III, te domene Kelch nakon različitih koraka pročišćavanja (afinitetne kromatografije te gel filtracije), te uz dodatak različitih reducensa (DTT, TCEP) u pufer tijekom pročišćavanja ili odsoljavanja.

3.3.2.5. *Proteinska stabilnost u otopini*

Agregacija i multimerizacija proteina analizirana je metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (*dynamic light scattering*, DLS). DLS se temelji se na Brownovom gibanju čestica raspršenih u otopini koje se nasumično gibaju u svim smjerovima, te sudaraju s molekulama otapala. Ti sudari uzrokuju prijenos energije, koja potiče kretanje čestica. Prijenos energije je približno konstantan i ima veći učinak na manje čestice. Kao rezultat toga, manje se čestice gibaju brže od većih. Uz poznavanje ostalih parametara koji utječu na kretanje čestica u otopini, moguće je mjerenjem brzine čestica odrediti hidrodinamički radijus. DLS mjerenja su izvršena na uređaju *Zetasizer Nano series* u vremenu od 15 minuta za svaki uzorak, na sobnoj temperaturi u volumenu od 70 µL. Uzorci su bili DT proteina Kelch i DPP III, njihove mutirane varijante, te kompleksi Kelch – DPP III u omjeru 1:1, u puferu 50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,5.

3.3.2.6. *Cirkularni dikroizam, CD*

Uzorci proteina za CD pripremljeni su izmjenom pufera u fosfatni pufer (10mM Na₂HPO₄, 10mM NaH₂PO₄) na Zeba Micro Spin kolonicama. Ukupni volumen uzoraka u mjernoj ćeliji od 50 µL sadržavao je različite omjere proteina DPP III i Kelch s početnim molarnim koncentracijama DPP III 7.95 µM, Kelch 51.8 µM. Mjerenja su izvršena na spektrometru Jasco J-815. Analiza je provedena u programu Dichroweb⁷⁰ sa standardnim referentnim vrijednostima⁷³.

3.3.2.7. *Peptidi petlje ETGE DPP III*

Peptidi duljine 24 (sekvence FNFDQETVINPETGEQIQSWYRSG) i 11 aminokiselinskih ostataka (sekvence VINPETGEQIQ) odabrani su za mjerenje zasebnog koraka vezanja petlje DPP III na domenu Kelch. Peptidi su kupljeni od proizvođača ProteoGenix, čistoće > 90% u liofiliziranom obliku te su otopljeni u puferu u kojem su dalje provedena mjerenja.

3.3.2.8. *Kristalografska struktura domene Kelch s peptidom ETGE DPP III*

Kristalizacija domene Kelch ljudskog KEAP1 u kompleksu s peptidom od 11 ak provedena je metodom difuzije para sjedeće kapi pomoću robota Oryx 8. Uzorak proteina bio je koncentracije 20 mg mL⁻¹, u puferu 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM TCEP, pH 7,5, u kojem je otopljen i peptid. Kap je pripremljena miješanjem proteina i peptida dugog 11 ak (molarni omjer 1:1) s otopinom precipitanta u jednakim količinama. Kristali su se pojavili nakon 2 tjedna ravnoteže na 289 K. Prikupljanje podataka, obrada, te rješavanje strukture molekularnom zamjenom i utočnjavanje strukture uz uklapanje peptidne molekule opisano je u radu Matić i sur. 2020. Struktura Kelch – peptid ETGE DPP III deponirana je u PDB (PDB ID: 6TG8), s rezolucijom 2,70 Å.

3.3.2.9. *Mjerenja SAXS za kompleks DPP III-Kelch*

Za mjerenje SAXS pripremljen je uzorak kompleksa Kelch – DPP III koncentracije 140 μM u puferu 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM TCEP, pH 7,5. Mjerenja su provedena na instrumentu SAXSspace, Anton Paar, u Grazu u Austriji, te je analizirano raspršenje $I(0)$, radijus giracije, R_g , maksimalna dimenzija D_{max} i funkcija raspodjele interatomskih udaljenosti $P(r)$ ⁶⁴.

3.3.2.10. *Analiza enzimske aktivnosti i određivanje kinetičkih parametara DPP III*

Za testiranje peptidazne aktivnosti DPP III koristi se standardni sintetski supstrat Arg₂-2NA, s kojim su izvršena mjerenja specifične aktivnosti te enzimske kinetike za divlji tip, DT, i mutirane varijante DPP III.

Aktivnost je mjerena u volumenu od 1 ml, u puferu 0,1 M Tris, pH 8,6, uz dodatak 15 µL 5 mM CoCl₂. Reakcijska smjesa pripremljena je na 37 °C te je dodano 50 µL supstrata Arg₂-2NA, čime počinje računanje vremena reakcije. Prekidanje reakcije postiže se dodatkom 200 µL otopine FBB soli. Aktivnost je određena u ustaljenom stanju (nakon 15 min) očitanjem apsorbancije na 530 nm na BioDropu i računom prema formuli:

$$Aktivnost = \frac{A_{530} \cdot V}{t(min) \cdot c} \quad (24)$$

U mjerenjima kinetike peptidazne aktivnosti DPP III mjerene su početne brzine reakcije, na 25 °C i pri pH 8,6, u prisutnosti 50 µM CoCl₂, kako je ranije opisano⁷⁴. Oslobađanje produkta 2NA mjereno je na fluorescencijskom spektrofotometru Cary Eclipse (Agilent Technologies, SAD) uz ekscitaciju na 332 nm i emisiju na 420 nm. Kinetički parametri za Michaelis-Menten kinetiku (slika 6) određeni su nelinearnom regresijskom analizom podataka u programu GraphPad Prism 5⁷⁵.

3.3.2.11. Izotermna titracijska kalorimetrija, ITC

Termodinamički parametri za vezanje peptida ETGE DPP III na domenu Kelch određeni su ITC-om u skladu s podacima dostupnim u literaturi za mjerenja ITC s peptidima NRF2 s motivima DLG i ETGE⁴² te peptidima drugih proteina koji se vežu na KEAP1⁴³.

Mjerenja ITC interakcija Kelch – peptid, s domenom Kelch DT te mutiranim varijantama, provedena su na uređaju MicroCal PEAQ-ITC, a Kelch – DPP III na uređaju VP-ITC, pri 25 °C u puferu sastava 20 mM Tris-HCl, pH 7,5.

Za titracije Kelch – peptid na uređaju MicroCal PEAQ-ITC, domena Kelch u ćeliji bila je koncentracije 20-30 µM (u volumenu ~200 µL), i titrirana je otopinama peptida od 200-400 µM (volumen injekcijske šprice ~40 µL), ovisno o jačini signala prilikom vezanja (za interakcije sa slabijim signalom korištene su veće koncentracije). Broj titracija u pojedinom mjerenju bio je 18, a volumen pojedine titracije 2 µL. Brzina miješanja iznosila je 500 rpm, razmak među titracijama 2 min, uz 1 min počeka prije prve titracije te visoku osjetljivost odziva.

Za vezanje Kelch – DPP III mjerenja na VP-ITC su provedena s domenom Kelch u ćeliji koja je titrirana s DPP III te također s DPP III u ćeliji titriranom domenom Kelch. Protein u ćeliji bio je u koncentracijama 15-30 µM (volumen ćelije iznosi ~1400 µL), a protein kojim je

titriran u koncentraciji od 150-250 μM (volumen injekcijske šprice $\sim 300 \mu\text{L}$). Broj titracija po mjerenju bio je 29, a volumen pojedine titracije 5 μL . Brzina miješanja iznosila je 300 rpm, razmak među titracijama 5 min, uz približno 50 min ekvibracije prije prve titracije, te je podešena visoka osjetljivost odziva.

Termodinamički parametri određeni su obradom podataka iz titracijskih krivulja (slika 7 B), za mjerenja na PEAQ-ITC integriranim softverom za analizu (*MicroCal ITC Analysis Software*), a za mjerenja na uređaju VP-ITC u programu Origin⁷⁶.

3.3.2.12. *MST i fluorescencijska promjena uslijed vezanja*

Budući da se mjerenjima ITC nije sa sigurnošću mogla odrediti konstanta vezanja, testirana je metoda termoforeze, MST. Termoforeza se odnosi na gibanje molekule u otopini kao odgovor na gradijent temperature stvoren pobudom laserom. Masa kompleksa dviju molekula, od kojih je jedna obilježena i njeno se gibanje prati, veća je od mase zasebne molekule, te je termoforeza kompleksa u pravilu sporija nego kod nevezanih molekula. Na temelju toga mjeri se vezanje molekula u otopini u ovisnosti o njihovim molarnim omjerima i računa konstanta disocijacije, K_d . Mjerenja su provedena na uređaju Monolith NT.115, na 23 °C u puferu 50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8,2, 0,05% Tween, u kapilarama Monolith NT.115 za Kelch – DPP III, dok su za mjerenja vezanja Kelch – peptid korištene kapilare NT.115 Premium. Za mjerenje MST s mutiranim varijantama DPP III, domena Kelch bila je fluorescentno obilježena, dok je za mjerenje MST s mutiranim varijantama domene Kelch fluorescentno bila obilježena DPP III. Obilježavanje je izvedeno pomoću komercijalnih setova prema uputama proizvođača NanoTemper, i to RED-MALEIMIDE za Kelch i RED-NHS za DPP III. Korištena je Nano-RED laserska ekscitacija snage 20% i snaga MST 40% za iniciranje termoforetskog gibanja u kapilarama. Koncentracija obilježenog proteina Kelch DT bila je 50 nM, dok je koncentracija neobilježenog liganda DPP III divljeg tipa i mutiranih inačica varirana serijskim razrjeđenjem u nizu od 16 kapilara. U obrnutom eksperimentu, koncentracija obilježene DPP III bila je 20 nM, dok je koncentracija Kelch varirana serijskim razrjeđenjem. Sva mjerenja izvršena su u triplikatima. Međutim, konstanta vezanja na Kelch mogla se odrediti metodom termoforeze samo za vezanje peptida, dok je vezanje DPP III uzrokovalo promjenu fluorescencije bez laserske pobude, što je onemogućilo praćenje termoforeze. No prema uputama proizvođača (slika 10), početna promjena fluorescencije može također biti korištena za analizu vezanja, što

je iskorišteno u ovom radu. Za potvrdu ovisnosti fluorescencijske promjene o vezanju proteina korišten je prema uputama proizvođača test SD, kojim se potvrđuje da promjena fluorescencije nije mjerljiva nakon denaturacije proteina SDS-om i zagrijavanjem na 96 °C tijekom 10 min. Vezanje DT i mutiranih varijanti Kelch-a na obilježenu DPP III mjereno je termoforezom. Određeni su relativni afiniteti vezanja divljeg tipa i odabranih mutiranih varijanti DPP III i domene Kelch pomoću programa MO.Affinity Analysis v2.3⁷⁷.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

Kako bi se ispitala uloga DPP III u oksidacijskom stresu i nastanku karcinoma, ispitivana je njena interakcija s domenom Kelch proteina KEAP1. U prethodnom računalnom istraživanju kompleksacije Kelch – DPP III⁷⁸ opisan je model kompleksa dobiven molekulskim modeliranjem. Na temelju modela strukture kompleksa tada je proučavan utjecaj mutacija u strukturi proteina interaktora na vezanje među njima metodama molekulskog modeliranja. U ovom radu taj je model kompleksa Kelch – DPP III unaprijeđen i proučavan u kombinaciji s eksperimentalnim metodama.

4.1. Odabir mutacija u bazi cBioPortal

Brojne mutacije u genima za DPP III i KEAP1 su pronađene u bazi cBioPortal za genomiku tumora⁴⁸. Podaci u bazi nude uvid u mutacije pronađene u stanicama karcinoma, što bi moglo pomoći u predviđanju mogućih "funkcionalnih" mutacija u proteinima, potencijalno odgovornih za varijacije u afinitetu njihove interakcije.

Pri odabiru mutacija pretraživan je skup svih neredundantnih podataka, a odabrane su mutacije proteina DPP III i domene Kelch proteina KEAP1 prikazane u tablicama 2 i 3.

Uz to što su pronađene u bazi cBioPortal, određene mutacije se spominju u dostupnoj literaturi^{79,80}, kao potencijalno vezane uz promjene afiniteta vezanja KEAP1 na NRF2 ili neke druge proteine interaktore. Ostale mutacije odabrane su na temelju strukturne analize modelnog kompleksa Kelch – DPP III ili na temelju pretpostavke da je konformacijska promjena odvajanja petlje ETGE DPP III od tijela proteina ključna u procesu vezanja.

Tablica 2. Popis mutacija u proteinu DPP III odabranih za istraživanja.

Vrsta tumora	Mutacija	Tip	Broj kopija	Frekvencija alela	Broj mutacija u uzorku
Adenokarcinom prostate	E451K	Supstitucija	Diploidan	0,06	967
Kožni melanom	P479S	Supstitucija	Heterozigotna delecija	0,25	4282
Urotelijalni karcinom mokraćnog mjehura	E480Q	Supstitucija		0,15	218
Rak crijeva	T481M	Supstitucija	Diploidan		96
Adenokarcinom pluća	G482C	Supstitucija	Povećan	0,24	1583
Rak endometrija maternice	Q484H	Supstitucija	Diploidan	0,33	10493
Muciozni adenokarcinom debelog crijeva i rektuma	R510W	Supstitucija	Heterozigotna delecija	0,40	66
Adenokarcinom pluća	V514M	Supstitucija	Diploidan		68
Kronična limfocitna leukemija	V514M	Supstitucija		0,33	13
Adenokarcinom želučanog mukusa	R620C	Supstitucija	Diploidan	0,46	1308
Kožni melanom	R623L	Supstitucija	Diploidan	0,13	1260
Karcinom endometrija maternice	R623W	Supstitucija	Diploidan	0,37	12211
Adenokarcinom pluća	R703C	Supstitucija	Diploidan	0,13	665
Invazivni duktalni karcinom dojke	R703H	Supstitucija	Povećan	0,57	145

Tablica 3. Popis mutacija u proteinu KEAP1 (domeni Kelch) odabranih za istraživanja.

Vrsta tumora	Mutacija	Tip	Broj kopija	Frekvencija alela	Broj mutacija u uzorku
Adenokarcinom pluća	G333C	Supstitucija	Diploidan	0,70	38
Adenokarcinom pluća	G333C	Supstitucija	Diploidan	0,07	6
Adenokarcinom pluća	G333C	Supstitucija	Diploidan	0,44	9
Adenokarcinom pluća	G333C	Supstitucija	Heterozigotna delecija	0,56	144
Karcinom pločastog epitela pluća	G333C	Supstitucija	Heterozigotna delecija	0,26	582
Adenokarcinom pluća	R415C	Supstitucija	Diploidan	0,13	11
Adenokarcinom pluća	R415C	Supstitucija	Diploidan	0,47	85
Kožni melanom	R470C	Supstitucija		0,18	551
Adenokarcinom pluća	R470C	Supstitucija	Diploidan	0,34	20
Karcinom pločastog epitela pluća	R470C	Supstitucija	Diploidan	0,41	16
Karcinom pločastog epitela pluća	R470C	Supstitucija		0,21	321
Karcinom pločastog epitela pluća	R470C	Supstitucija		0,42	326
Karcinom pločastog epitela pluća	R470C	Supstitucija		0,41	321
Karcinom pločastog epitela pluća	R470C	Supstitucija		0,33	297
Karcinom pločastog epitela pluća	R470C	Supstitucija			18
Kožni melanom	R470C	Supstitucija	Povećan	0,16	504
Karcinom pločastog epitela glave i vrata	R470C	Supstitucija	Heterozigotna delecija	0,55	131
Adenokarcinom pluća	R470C	Supstitucija	Heterozigotna delecija	0,39	183
Karcinom pločastog epitela pluća	R470C	Supstitucija	Diploidan	0,33	194
Karcinom pločastog epitela pluća	R470C	Supstitucija	Heterozigotna delecija	0,23	507
Kožni melanom	R470C	Supstitucija	Povećan	0,10	2920
Adenokarcinom pluća	G480V	Supstitucija	Diploidan	0,30	11
Adenokarcinom pluća	G480W	Supstitucija	Diploidan	0,62	10
Neuroendokrini karcinom velikih stanica	G480W	Supstitucija	Diploidan	0,29	6
Adenokarcinom pluća	G480W	Supstitucija	Diploidan	0,80	6
Adenokarcinom pluća	G480W	Supstitucija	Heterozigotna delecija	0,82	103
Adenokarcinom pluća	G480W	Supstitucija	Heterozigotna delecija	0,28	123
Karcinom pločastog epitela pluća	G480W	Supstitucija	Heterozigotna delecija	0,49	285
Kožni melanom	G480W	Supstitucija	Diploidan	0,10	1662
Karcinom pločastog epitela glave i vrata	Y525C	Supstitucija	Diploidan	0,24	89
Hepatocelularni karcinom	Y525C	Supstitucija	Heterozigotna delecija	0,06	139

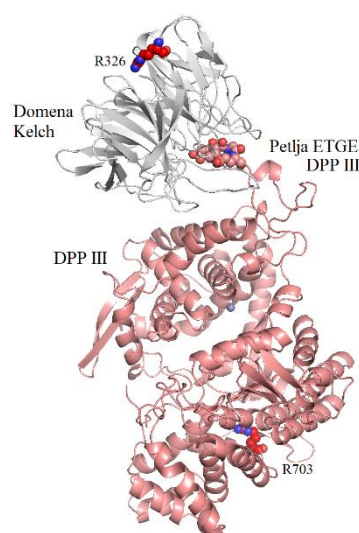
4.2. Molekulsko modeliranje strukture kompleksa Kelch – DPP III

Prvi model korišten u istraživanju utjecaja mutacija na interakcije u kompleksu Kelch – DPP III bio je model objavljen u radu Gundić i sur. 2016.⁷⁸ Taj model korišten je inicijalno u ovom radu za modeliranje mutiranih kompleksa te su provedene simulacije MD kompleksa divljeg tipa i mutiranih varijanti.

4.2.1. Simulacije MD s prethodno objavljenim modelom kompleksa

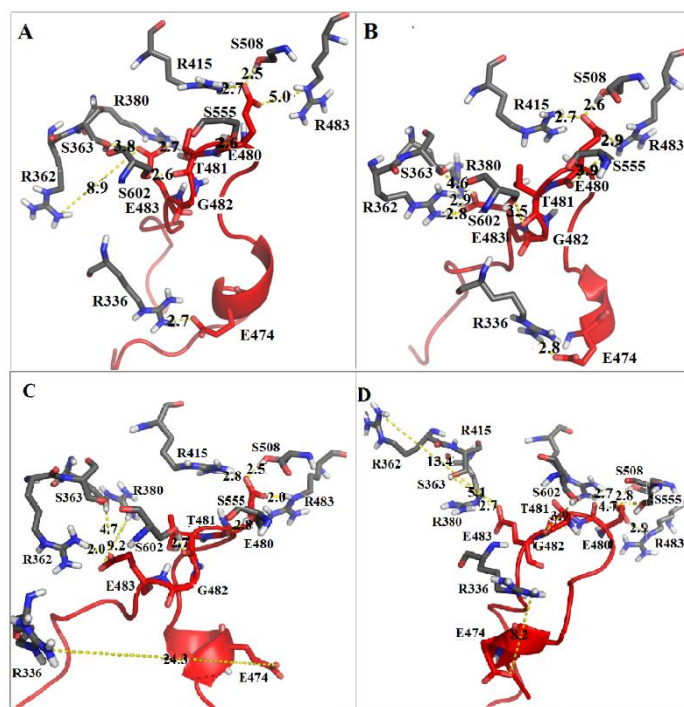
Na temelju podataka iz dostupne literature ili predviđanja u cBioPortalu (tablica 2) odabrane su kao zanimljive za ispitivanje molekulskim modeliranjem mutacije DPP III (R703H i R703C) i KEAP1 (R326D), koje se nalaze relativno daleko od veznog mjesta u strukturi kompleksa, pod pretpostavkom da će se na taj način uočiti posljedice tih mutacija koje ne mogu biti predviđene isključivo na temelju strukturne analize. Položaj mutacija u strukturi prikazan je na slici 18.

Pomoću simulacija MD ispitivano je kako te točkaste mutacije utječu na strukturu i dinamiku kompleksa Kelch – DPP III. Položaj petlje ETGE i interakcije koje ostvaruje s veznim mjestom domene Kelch u proteinima DT i mutiranim varijantama prikazan je na slici 19.



Slika 18. Modelna struktura kompleksa Kelch – DPP III, s naznačenim motivom ETGE u veznoj petlji. Ostaci R326 u domeni Kelch i R703 u DPP III, koji su supstituirani za komparativnu studiju simulacijama MD, označeni su crveno.

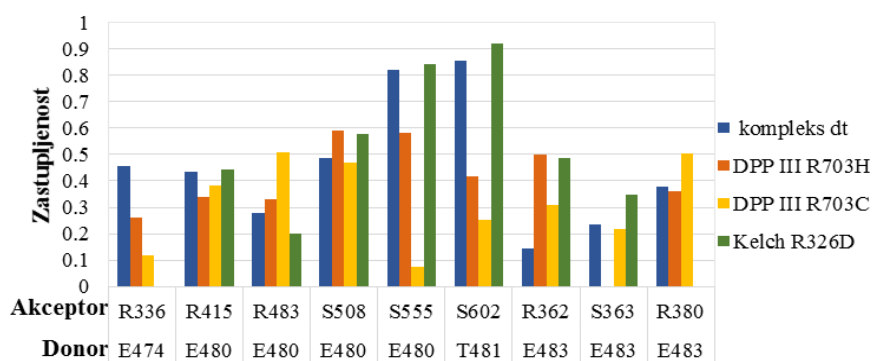
Identificirano je 9 ostataka domene Kelch, navedenih u tablici 4, koji najčešće ostvaruju interakcije s petljom DPP III, posebno s motivom ETGE. 4 arginina (R415, R483, R363 i R380) i 2 serina (S508 i S363) uključeni su u interakcije s bočnim lancima glutamata u motivu E⁴⁸⁰TGE⁴⁸³. Serini (S555 i S602) stabiliziraju okosnicu ETGE motiva, a dodatni kontakti uspostavljeni su između glutamata E474 i arginina R336 (tablica 4, slika 20).



Slika 19. Interakcije u kompleksima Kelch – DPP III, A) DPP III DT, B) DPP III R703H, C) Kelch R326D, D) DPP III R703C, istaknut je motiv ETGE u veznoj petlji (crveno) te aminokiseline domene Kelch (sivo) koje ostvaruju interakciju s petljom.

Tablica 4. Zastupljenost vodikovih veza tijekom simulacija MD kompleksa Kelch – DPP III, divljeg tipa proteina i mutiranih varijanti.

Akceptor (DPP III)	Donor (Kelch)	kompleks DT	DPP III R703H	DPP III R703C	Kelch R326D
E474	R336	0,45	0,26	0,12	0
E480	R415	0,44	0,34	0,38	0,44
E480	R483	0,28	0,33	0,51	0,20
E480	S508	0,49	0,59	0,47	0,58
E480	S555	0,82	0,58	0,07	0,84
T481	S602	0,85	0,41	0,25	0,92
E483	R362	0,14	0,50	0,31	0,48
E483	S363	0,23	0	0,22	0,34
E483	R380	0,38	0,36	0,50	0



Slika 20. Grafikon raspodjele vodikovih veza u kompleksima Kelch – DPP III, za DT i mutirane varijante interaktora.

Najveće uočene razlike u interakcijama Kelch – DPP III posljedica su različite orijentacije petlje ETGE te međusobnog otklona proteina DPP III i Kelch u kompleksu. To rezultira slabom zastupljenošću vodikovih veza koje su prethodno opisane u strukturnim analizama vezanja proteina interaktora ili njihovih peptida u vezno mjesto domene Kelch.

Uočeni su trendovi povećane nestabilnosti interakcija kod mutiranih varijanti u odnosu na DT proteina, ali zbog nedovoljne kvalitete početnog modela ovi rezultati nisu pouzdani.

Nesigurnost u položaj petlje ETGE u veznom mjestu domene Kelch u kompleksu navela nas je da pokušamo drugim metodama molekulskog modeliranja i strukturne kemije bolje istražiti vezanje Kelch – DPP III, te na temelju rezultata postaviti točniji model kompleksa.

4.2.2. Modeliranje strukture kompleksa domene Kelch s petljom ETGE DPP III

U bazi PDB dostupne su strukture domene Kelch s peptidima ostalih proteina interaktora, uključujući Nrf2. Stoga je pretpostavljeno da će biti moguće kristalografski odrediti strukturu kompleksa domene Kelch s peptidom koji odgovara petlji ETGE DPP III.

Usto, za velik broj proteina interaktora dostupni su eksperimentalni podaci o relativnim afinitetima vezanja na domenu Kelch. Stoga je smatrano korisnim simulirati kompleks domene Kelch s peptidom koji odgovara petlji ETGE DPP III, uz simulacije s cijelim proteinom DPP III. Na taj način moguće je testirati hipotezu da neke mutacije u domeni Kelch ne utječu na promjenu afiniteta vezanja isključivo kroz interakciju s veznim motivom ETGE već i kroz interakciju s udaljenim dijelovima strukture DPP III.

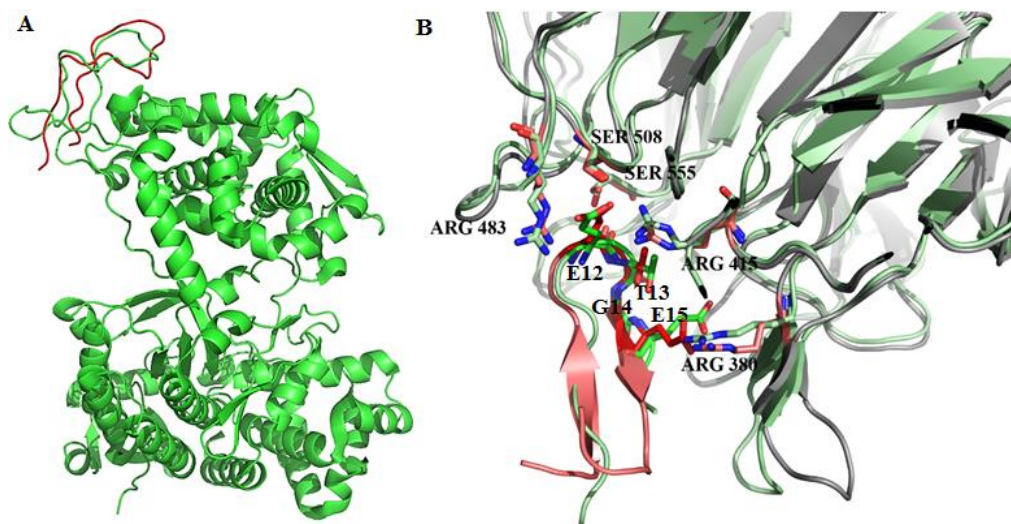
Kako bi se ispitali osnovni preduvjeti za kristalizacijske eksperimente smatrano je korisnim utvrditi računalno strukturu peptida u otopini, simulirati njegovo vezanje i predvidjeti strukturu kompleksa.

U svrhu boljeg razumijevanja sposobnosti odabranog peptida da i u realnim uvjetima eksperimenta oponaša petlju ETGE DPP III te da na realističan način interagira s domenom Kelch, provedena je simulacija zasebnog peptida u vodenoj otopini iz početne linearizirane strukture.

Početna linearizirana struktura peptida petlje DPP III duga 24 ak, generirana je serverom Pepbasic3D, provedena je minimizacija, ekvilibracija te 200 ns simulacije MD. Konačna, smotana konformacija peptida uspoređena je s kristalografskom strukturom DPP III (PDB ID: 3FVY). Potvrđeno je da dolazi do smatanja u konformaciju sličnu onoj u kristalografskoj strukturi (slika 21 A).

Zatim je ta struktura korištena za simulacije ASMD vezanja peptida na domenu Kelch pri čemu je njihova početna udaljenost bila 22 Å, a konačna udaljenost centra mase veznog motiva i veznog mjesta je iznosila približno 4 Å. Srednja vrijednost $\Delta_r G$ iznosila je $-7,1 \pm 1,4$ kcal/mol, a srednji upotrebljeni rad $10,6 \pm 1,6$ kcal/mol. Najpovoljnija konformacija dobivena je relaksacijom kompleksa i hlađenjem te ponovnim zagrijavanjem kako bi se omogućile veće konformacijske promjene strukture.

Peptid ETGE DPP III se nakon simulacija ASMD vezao u središnju šupljinu okruženu sa šest β -ploča koje okružuju i čine vezno mjesto domene Kelch (slika 21 B) te način vezanja peptida ETGE DPP III odgovara kristalografskom položaju peptida NRF2. Ostatak E12 peptida ostvaruje interakcije s bočnim ograncima Arg415, Arg483 i Ser508, dok karboksilatni atomi kisika E15 ostvaruju interakcije s bočnim ograncima Arg380 i Ser363. Atomi okosnice T13 također tvore vodikove veze sa Ser602.



Slika 21. A) Preklapanje peptida od 24 ak u konformaciji dobivenoj tijekom MD simulacija u vodi sa strukturom DPP III (PDB ID: 3FVY), B) Kompleks domene Kelch (siva) s peptidom duljine 24 ak (crvena) nakon simulacija ASMD i MD, preklapljen s kompleksom domene Kelch s peptidom ETGE NRF2 (PDB ID: 2FLU) (svijetlo zelena). Ostaci najzaslužniji za povoljne interakcije u kompleksu prikazani su štapićima.

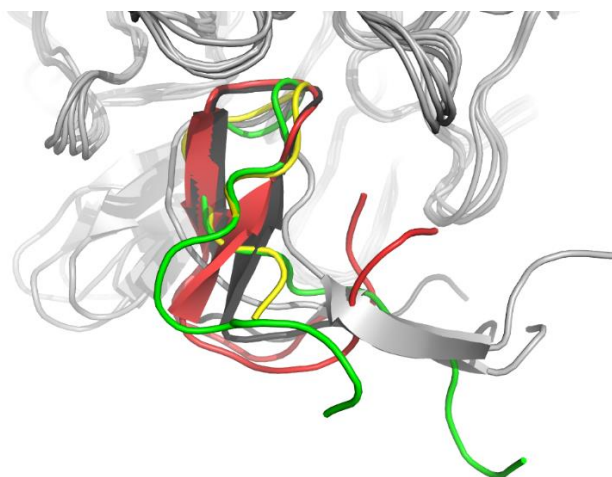
Struktura dobivena ASMD simulacijom, s najnižom slobodnom energijom vezanja, korištena je kao ishodište za klasične MD simulacije sa skraćenom strukturom peptida od 11 ak i početnom s 24 ak. Provedene su po 3 simulacije sa svakim od peptida. Rezultati su prikazani u tablicama 5 i 6. Uočene su vrlo visoke vrijednosti standardne devijacije zbog slobodnih dijelova peptida udaljenijih od veznog motiva ETGE koji su vrlo fleksibilni i uzrokuju veće konformacijske promjene, dok je dio petlje neposredno uz motiv ETGE, neovisno o duljini simuliranog peptida, stabilno pozicioniran u veznom mjestu domene Kelch (slika 22).

Tablica 5. MM-PBSA izračuni $\Delta_r G$ tijekom posljednjih 30 ns od konačnih 150 ns produktivnih simulacija MD kompleksa peptida od 24 ak s domenom Kelch, s odgovarajućim vrijednostima standardne devijacije. *RMSD* je izračunat za domenu Kelch s referentnom strukturom 2FLU.

MD 24 ak	$\Delta_r G$ (kcal /mol)	St. Dev.	<i>RMSD</i> Kelch
1	-26	10	1,9
2	-19	7	1,9
3	-17	8	1,8

Tablica 6. MM-PBSA izračuni $\Delta_r G$ tijekom zadnjih 30 ns konačnih 150 ns produktivnih simulacija MD kompleksa peptida od 11 ak s domenom Kelch, s odgovarajućim vrijednostima standardne devijacije. *RMSD* je izračunat za domenu Kelch u odnosu na strukturu 2FLU.

MD 11 ak	$\Delta_r G$ (kcal /mol)	St. Dev.	<i>RMSD</i> Kelch
1	-7	12	1,8
2	-4	6	2,0
3	-6	9	1,7

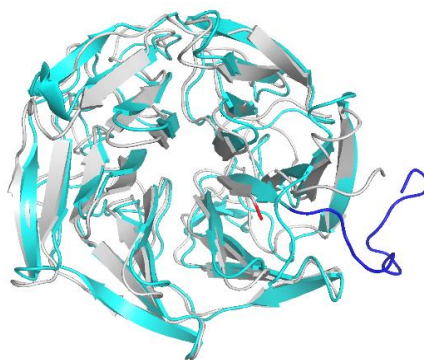


Slika 22. Usporedba peptidnih konformacija u veznom mjestu domene Kelch. Konformacija petlje ETGE DPP III u strukturi 3FVY (zeleni), konformacija peptida od 24 ak dobivenog simulacijama ASMD (siva), ista struktura nakon dodatnih 100 ns klasičnih MD simulacija (crna) i struktura peptida od 11 ak nakon opuštanja tijekom 100 ns MD (žuta), te konačna peptidna konformacija za peptid od 24 ak dobivena nakon produktivne MD simulacije (crveni).

4.2.3. Modeliranje domene KelchC

U prethodnom modelu domene Kelch, napravljenom na temelju dostupne kristalografske strukture, nedostaje fleksibilna C-terminalna sekvenca KEAP1. Zbog toga dolazi do nerealistične interakcije N-kraja domene Kelch s C-krajem, te se dovodi u pitanje vjerodostojnost provedenog modeliranja, a time i učinak simuliranih mutacija na strukturu proteina. Posebice je to uočeno kod simulacije mutirane varijante domene Kelch R326D gdje ovaj ostatak tvori vodikovu vezu izravno s karboksilnom skupinom skraćenog C-kraja. Nedavno su određene brojne nove kristalografske strukture domene Kelch proteina KEAP1 u kompleksu s peptidom ili inhibitorom (PDB: 5X54, 4ZY3, 5FNQ, 5FNR, 5FNS, 5FNT, 5FNU, 5FZJ, 5FZN), ali ni jedna od njih ne sadrži strukturu C-terminalne regije.

Stoga je struktura C-terminalne regije modeliranjem dodana na prethodno korištenu strukturu domene Kelch programom Modeller 9.14⁶². Struktura je optimizirana te podvrgnuta kratkotrajnim MD simulacijama. Utvrđeno je da je C-terminalna regija vrlo fleksibilna (slika 23), što je i u skladu s dotadašnjim kristalografskim podacima koji ukazuju da njena struktura nije mogla biti određena u rendgenskoj difrakcijskoj analizi.



Slika 23. Preklopljene strukture domene Kelch bez C-terminalne regije (siva) s označenim završetkom polipeptidnog lanca blizu centralne šupljine prstenaste strukture domene Kelch (crvena), te domene KelchC (cijan) s C-terminalnom regijom (plava). C-terminalna regija je fleksibilna, ali ostvaruje dinamične interakcije sa susjednim β -pločama.

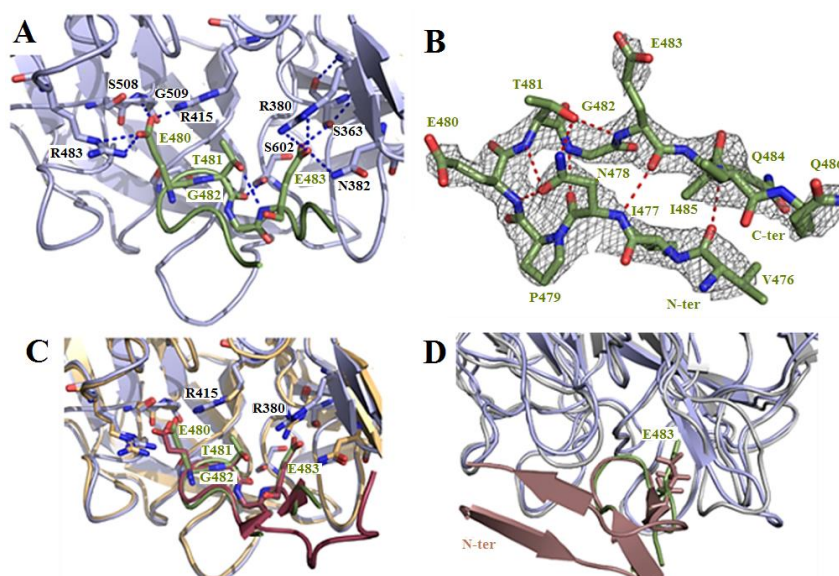
4.3. Kristalografsko određivanje strukture kompleksa Kelch – ETGE peptid

Kristali kompleksa DPP III - Kelch su slabo difraktirali tako da nije bilo moguće odrediti njegovu strukturu, kristalizacija domene Kelch s peptidom od 24 ak također nije bila uspješna, no uspješno je određena struktura domene Kelch u kompleksu s peptidom od 11 ak, koji odgovara petlji DPP III s motivom ETGE, rendgenskom difrakcijskom analizom.

Struktura rezolucije 2,70 Å (PDB ID: 6TG8) pružila je dodatne informacije o interakcijama između petlje ETGE DPP III i domene Kelch proteina KEAP1 (slika 24). Interakcije uključuju 9 vodikovih veza i 7 ionskih mostova. Slično kao u kristalnoj strukturi Kelch – NRF2 peptid, bočni lanci glutamata Glu480 i Glu483 iz peptida ostvaruju specifične interakcije s domenom Kelch. No interakcija Glu480(OE2)- (NH₂)Arg415 pronađena u ovoj strukturi, nije prisutna u Kelch – NRF2 kompleksu. To je posljedica različite orijentacije karboksilne skupine Glu480 zakrenute za -70 ° u odnosu na orijentaciju u kompleksu Kelch – NRF2 (slika 24 C). Okosnica peptida od 11 ak čini 5 vodikovih veza s domenom Kelch, od čega su 4 peptidna ostatka (Pro479, Glu480, Thr481 i Gln484) akceptori vodikove veze, a 1, (Gln484) donor. Isti kontakti prisutni su u strukturi Kelch–NRF2.

Osim Glu483, čija se orijentacija nešto razlikuje u kompleksu Kelch – peptid sa 24 ak prethodno dobivenog MD simulacijama, orijentacija petlje ETGE određena za kompleksa Kelch – peptid s 11 ak i 24 ak simulirane u vodi savršeno odgovara strukturi određenoj difrakcijom rendgenskih zraka (slika 24 D) čime je potvrđena vjerodostojnost provedenih simulacija.

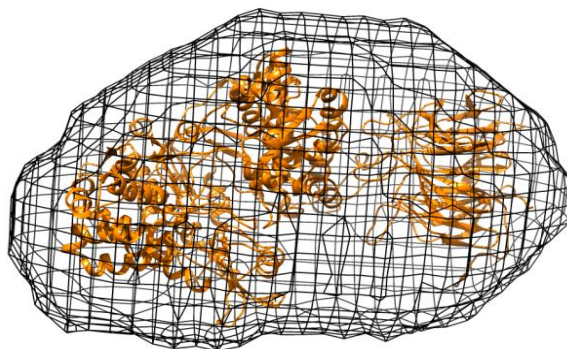
Provedena istraživanja potvrdila su da vezanje peptida oponaša vezanje fleksibilne petlje nakon oslobađanja vodikovih veza koje drže ETGE motiv pričvršćen na tijelo proteina, te je na temelju toga pretpostavljeno da otpuštanje petlje s tijela DPP III može predstavljati nužan korak za vezanje DPP III na domenu Kelch proteina KEAP1.



Slika 24. A) Ostaci domene Kelch i ETGE motiva u kristalografskoj strukturi koji su uključeni u izravne interakcije prikazani su kao štapići. Polarne interakcije unutar 3,5 Å prikazane su plavim isprekidanim linijama, B) peptid od 11 ak s intramolekulskim vodikovim vezama prikazanim crvenim isprekidanim linijama. Mapa gustoće elektrona $2F_o - F_c$ prikazana je kao mreža, C) Preklapanje kompleksa peptid NRF2 (smeđe) - Kelch (narančasta) (PDB ID: 2FLU) i peptida DPP III (zeleni) - Kelch (svijetlo plava), (PDB ID: 6TG8), D) Preklapanje kompleksa peptida od 24 ak (smeđe) s domenom Kelch (siva) dobivenog simulacijama MD i peptida od 11 ak (zeleni) u kristalografskoj strukturi. Glu483 predstavljen je štapićima u oba peptida.

4.4. SAXS analiza kompleksa Kelch – DPP III

SAXS analiza kompleksa DPP III - Kelch potvrdila je 1: 1 stehiometriju ove interakcije s pripadajućom eksperimentalnom molekulskom masom od 118,8 kDa (teorijska vrijednost je 117 kDa) (slika 25). Najniža energetska struktura dobivena nakon 150 ns simulacija MD u vodi korištena je za uklapanje u gustoću elektrona određenu SAXS mjerenjima. Nešto šira gustoća elektrona oko područja domene Kelch u području interakcije DPP III - Kelch u kompleksu u skladu je s različitim međusobnim orijentacijama (kutevima odklona) proteina uočenih i tijekom simulacija MD.



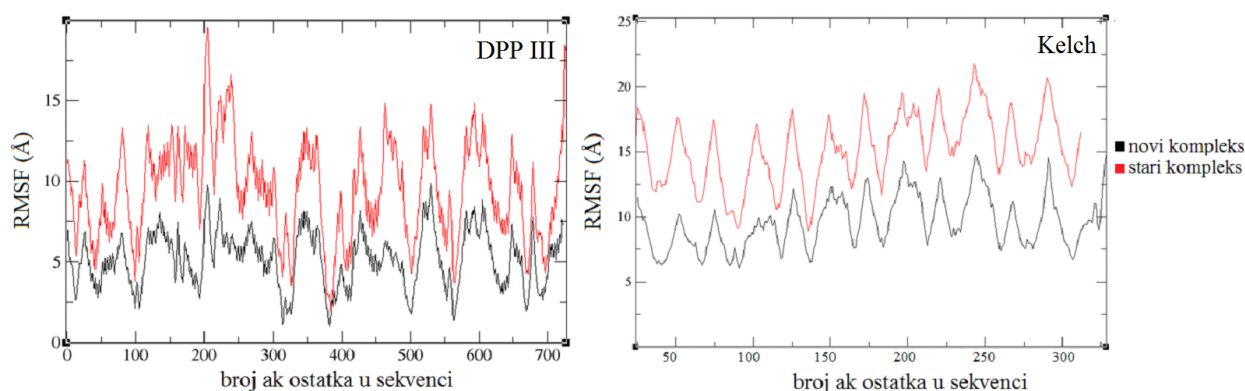
Slika 25. Rezultati SAXS analize kompleksa Kelch – DPP III. Model s najnižom energijom kompleksa Kelch – DPP III (narančasta) dobiven nakon 150 ns simulacije u vodi uklopljen u elektronsku gustoću određenu SAXS mjerenjima.

4.5. Simulacije MD s novim modelom kompleksa Kelch – DPP III

Novi model kompleksa Kelch – DPP III sadrži potpunu sekvencu C-kraja domene Kelch, te je baziran na rezultatima kristalografske analize kompleksa Kelch – peptid ETGE DPP III. Stoga ovaj model vjernije prikazuje interakcije koje DPP III putem petlje ETGE i ostalih dijelova strukture ostvaruje s domenom Kelch.

U ovom modelu postignuta je znatno veća stabilnost kompleksa, prvenstveno kroz stabilizaciju koja se uočava kroz vrijednosti *RMSF* i učestalost vodikovih veza tijekom simulacija (slika 26, tablica 7).

Smanjenje *RMSF* uočava se na cjelokupnoj sekvenci, a posebice u području petlje ETGE (470-490 ak) što potvrđuje veću stabilizaciju petlje u veznom mjestu domene Kelch. Također se u domeni Kelch uočava stabilizacija fleksibilnih regija nasuprot veznog mjesta gdje su postignute dodatne interakcije modelirane C-terminalne regije s β -pločama u prstenastoj strukturi.

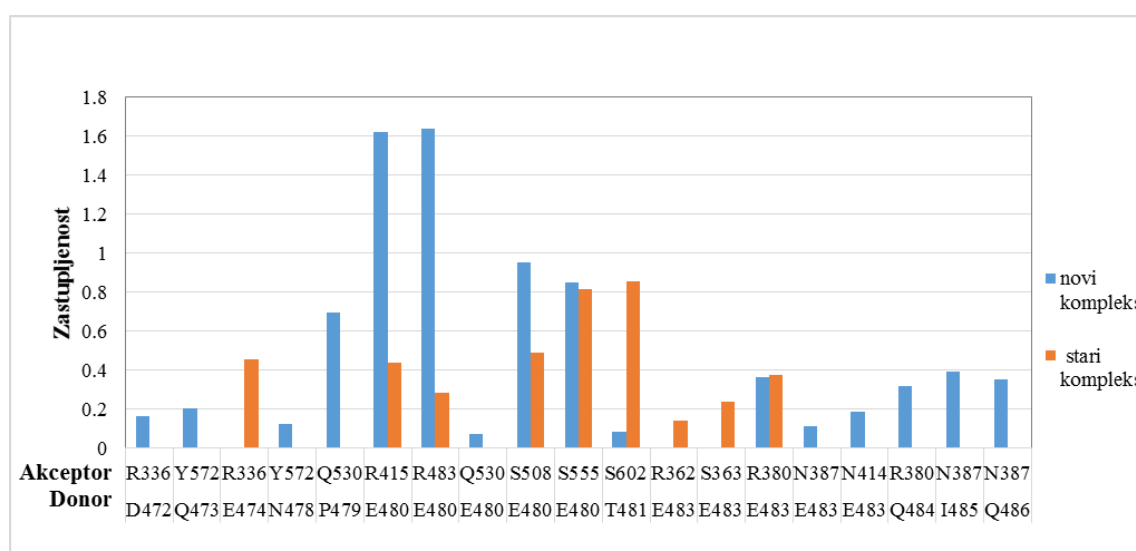


Slika 26. Usporedba *RMSF* vrijednosti aminokiselinskih ostataka DPP III i domene Kelch određenih tijekom 300 ns simulacija MD novog (crna) i starog (crvena) kompleksa Kelch – DPP III.

Analiza zastupljenosti vodikovih veza tijekom simulacije pokazala je znatno veću stabilizaciju novosagrađenog kompleksa vodikovim vezama u odnosu na stari (opisan u poglavlju 4.2.1) (tablica 7, slika 27). Najznačajnija je razlika u 4-5 puta većoj stabilizaciji interakcije E480 iz motiva ETGE s ostacima R415 i R483 domene Kelch, što je također uočeno u kristalografskim strukturama kompleksa. Također je dvostruko povećana stabilnost interakcije E480 sa S508, dok je interakcija E480 sa S555 ostala jednako zastupljena, kao i interakcija E483 s R380. Značajno smanjenje stabilnosti interakcije u novom kompleksu u odnosu na stari uočava se između T481 i S602.

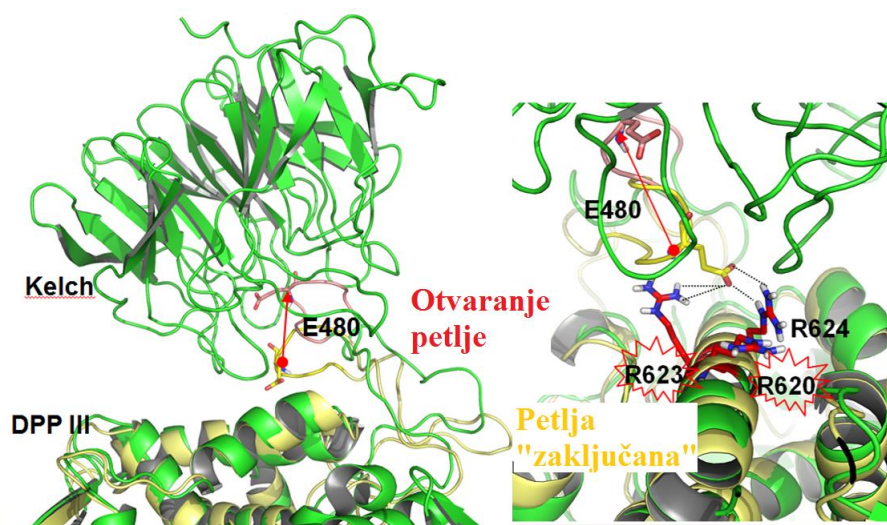
Tablica 7. Zastupljenost vodikovih veza tijekom simulacija MD novog i starog modela kompleksa Kelch – DPP III divljeg tipa.

Akceptor (DPP III)	Donor (Kelch)	novi kompleks	stari kompleks
D472	R336	0,16	0
Q473	Y572	0,20	0
E474	R336	0	0,46
N478	Y572	0,12	0
P479	Q530	0,69	0
E480	R415	1,62	0,44
E480	R483	1,64	0,28
E480	Q530	0,07	0
E480	S508	0,95	0,49
E480	S555	0,85	0,82
T481	S602	0,08	0,86
E483	R362	0	0,14
E483	S363	0	0,23
E483	R380	0,36	0,38
E483	N387	0,11	0
E483	N414	0,18	0
Q484	R380	0,32	0
I485	N387	0,39	0
Q486	N387	0,35	0



Slika 27. Grafikon zastupljenosti vodikovih veza tijekom MD simulacija kompleksa Kelch – DPP III.

Vezni motiv $^{480}\text{ETGE}^{483}$ DPP III, odgovoran za njeno vezanje na domenu Kelch proteina KEAP1, smješten je u središnjem dijelu 24 ak duge petlje koja se nalazi na vrhu gornje domene DPP III (slika 28). Tijekom simulacija slobodnog proteina DPP III motiv ETGE tvori preko E480 snažne interakcije sa strukturiranim dijelom proteina, točnije argininskim ostacima R620, R623 te R624, što sugerira da je njegovo otpuštanje ključan korak koji prethodi nastanku kompleksa KEAP1 – DPP III.

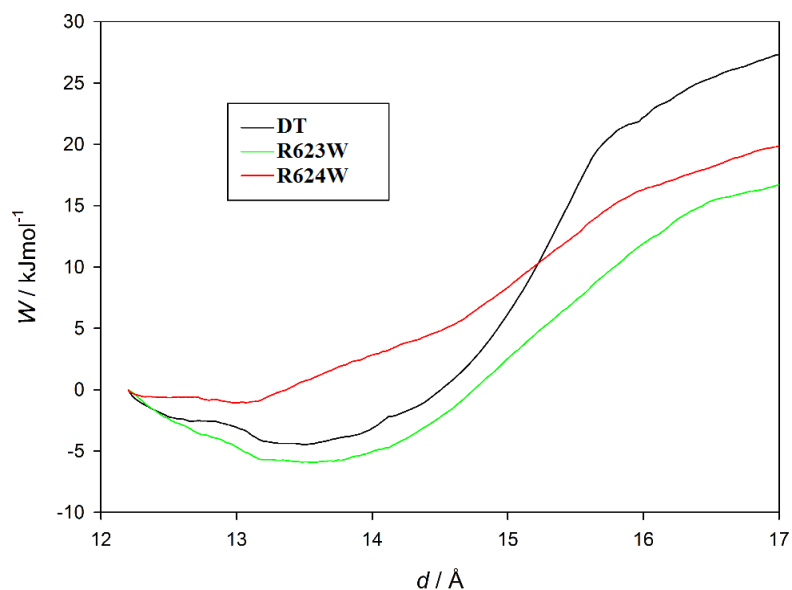


Slika 28. Otvoravanje petlje s motivom $^{480}\text{ETGE}^{483}$ (rozo) u gornjoj domeni DPP III prilikom vezanja u kompleks s domenom Kelch (zeleno), ostaci (3 arginina) drže petlju “zaključanom” za tijelo gornje domene DPP III u nevezanoj konformaciji (žuto).

4.5.1. Simulacije MD varijanti DPP III s mutacijama u strukturiranom dijelu (R623W, R623A, R624W i R624A)

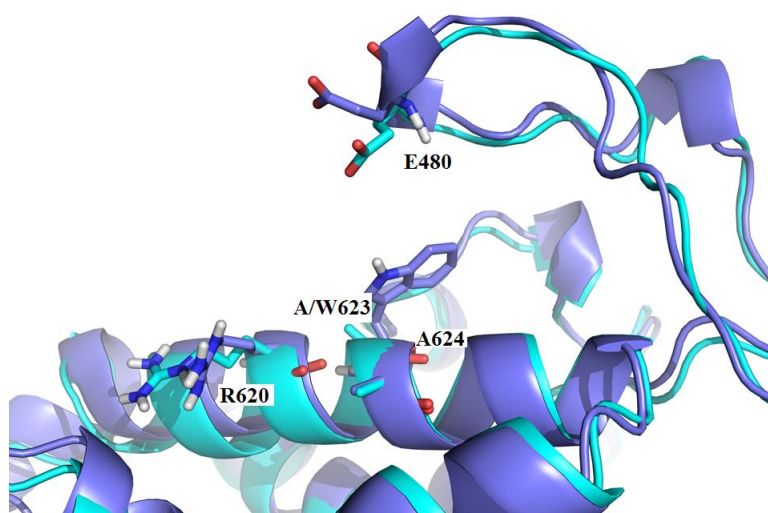
Hipoteza da je otpuštanje petlje ETGE s tijela proteina ključan korak koji prethodi nastanku kompleksa KEAP1 – DPP III ispitana je simulacijama divljeg tipa i mutiranih varijanti DPP III. Za ovo ispitivanje provedene su mutacije argininskih ostataka na tijelu proteina koji “zaključavaju” petlju snažnim interakcijama s E480 iz ETGE motiva.

Utjecaj ostataka na položajima 623 i 624 na odvajanje petlje ETGE proučavan je simulacijama ASMD. Utvrđeno je da je u slučaju mutiranih inačica DPP III R623W i R624W rad potreban za oslobađanje petlje znatno manji (za 10,6 odnosno 7,4 kJ mol⁻¹) od onog određenog za divlji tip DPP III koji iznosi 27,3 kJ mol⁻¹ (slika 29).



Slika 29. Rad potreban za odvajanje petlje ETGE od strukturiranog dijela kod divljeg tipa DPP III te mutiranih varijanti R623W i R624W. Konačne vrijednosti dobivene ASMD-om su 27,3, 16,7 i 19,9 kJ mol⁻¹.

Tijekom klasičnih MD simulacija DPP III s dvostrukim mutacijama, R623A / R624A i R623W / R624A u vodi, otvaranje petlje uočeno je tijekom najmanje jednog od 3 neovisna ponavljanja 50 ns dugih simulacija (slika 30) dok se tijekom MD simulacija divljeg tipa DPP III to nije dogodilo.



Slika 30. Otpuštanje petlje ETGE DPP III uočeno tijekom MD simulacija s dvostrukim mutacijama R623A / R624A (cijan) i R623W / R624A (ljubičasta).

Ovim rezultatima potvrđena je pretpostavka da mutacije u argininskim ostacima strukturiranog dijela DPP III, uključujući varijantu R623W pronađenu u tumorskom tkivu, mogu utjecati na lakše otpuštanje petlje ETGE s tijela DPP III i pospješiti njeno vezanje na domenu Kelch KEAP1.

4.5.2. Kompleksi Kelch – DPP III s varijantama DPP III pronađenim u bazi cBioPortal

U bazi cBioPortal za genetiku raka pronađene su mutacije u genu DPP III koje se pojavljuju u tumorskim tkivima. Među njima su za simulacije MD kompleksa DPP III s domenom Kelch odabrane mutacije u motivu ETGE E480Q, T481M, G482C, te mutacije neposredno ispred motiva ETGE, P479S.

Provedeno je ukupno 700 ns (2 neovisne simulacije s od 200 ns i jedna od 300 ns) produktivnih MD simulacija za svaki sagrađeni kompleks Kelch – DPP III. Relativni afinitet procijenjen na temelju izračunatih MM-GBSA energija (tablica 8) upućuje na veću stabilnost kompleksa divljeg tipa proteina u odnosu na komplekse domene Kelch s ostalim varijantama pri čemu je najnepovoljnija energija vezanja za varijantu E480Q.

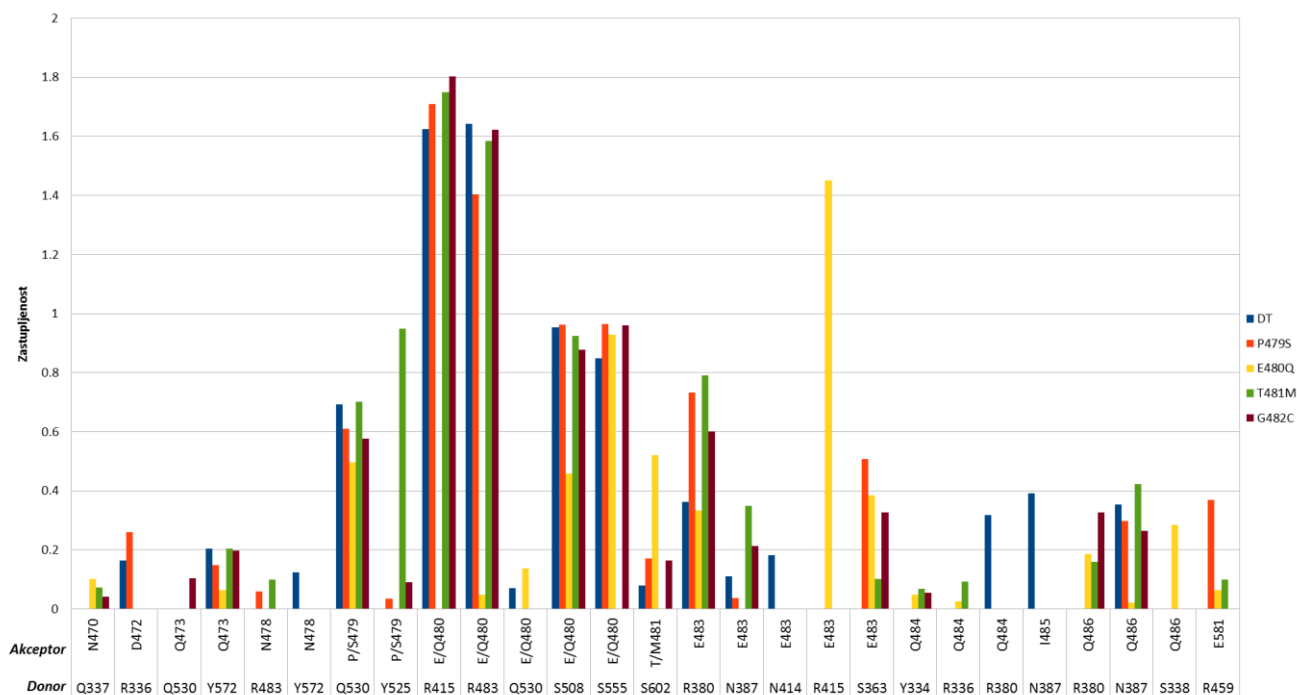
Tijekom simulacija kompleksa Kelch – DPP III E480Q uočava se značajnija promjena u intermolekularnim interakcijama. Zastupljenost vodikovih veza prikazana je u tablici 9 i na slici 31.

Tablica 8. Relativne vezne energije dvaju proteina interaktora u kompleksu Kelch – DPP III izračunate metodom MM-GBSA u intervalima od 20 ns. Navedene su minimalne vrijednosti za svako od neovisnih ponavljanja, a standardna devijacija iznosi približno 8 kcal/mol.

DPP III-varijanta	Simulacije	vrijeme/ns	MM-GBSA-min (kcal/mol)
DT	1	300	-51
	2	200	-80
	3	200	-73
	ukupno	700	-80
P479S	1	300	-51
	2	200	-41
	3	200	-48
	ukupno	700	-51
E480Q	1	300	-42
	2	200	-36
	3	200	-42
	ukupno	700	-42
T481M	1	300	-63
	2	200	-52
	3	200	-63
	ukupno	700	-63
G482C	1	300	-55
	2	200	-56
	3	200	-45
	ukupno	700	-56

Tablica 9. Zastupljenost vodikovih veza uspostavljenih tijekom simulacija MD kompleksa Kelch – DPP III DT i mutiranih varijanti.

Akceptor (DPP III)	Donor (Kelch)	DT	P479S	E480Q	T481M	G482C
N470	Q337	0	0	0,10	0,07	0,04
D472	R336	0,16	0,26	0	0	0
Q473	Q530	0	0	0	0	0,10
Q473	Y572	0,20	0,15	0,06	0,20	0,20
N478	R483	0	0,06	0	0,10	0
N478	Y572	0,12	0	0	0	0
P/S479	Q530	0,69	0,61	0,50	0,70	0,58
P/S479	Y525	0	0,03	0	0,95	0,09
E/Q480	R415	1,62	1,71	0	1,75	1,80
E/Q480	R483	1,64	1,40	0,05	1,59	1,62
E/Q480	Q530	0,07	0	0,14	0	0
E/Q480	S508	0,95	0,96	0,46	0,92	0,88
E/Q480	S555	0,85	0,97	0,93	0	0,96
T/M481	S602	0,08	0,17	0,52	0	0,16
E483	R380	0,36	0,73	0,33	0,79	0,60
E483	N387	0,11	0,04	0	0,35	0,21
E483	N414	0,18	0	0	0	0
E483	R415	0	0	1,45	0	0
E483	S363	0	0,51	0,39	0,10	0,33
Q484	Y334	0	0	0,05	0,07	0,05
Q484	R336	0	0	0,03	0,09	0
Q484	R380	0,32	0	0	0	0
I485	N387	0,39	0	0	0	0
Q486	R380	0	0	0,19	0,16	0,33
Q486	N387	0,35	0,30	0,02	0,42	0,26
Q486	S338	0	0	0,28	0	0
E581	R459	0	0,37	0,06	0,10	0



Slika 31. Grafikoni raspodjele vodikovih veza u kompleksima DPP III-Kelch, za DT DPP III i mutirane varijante.

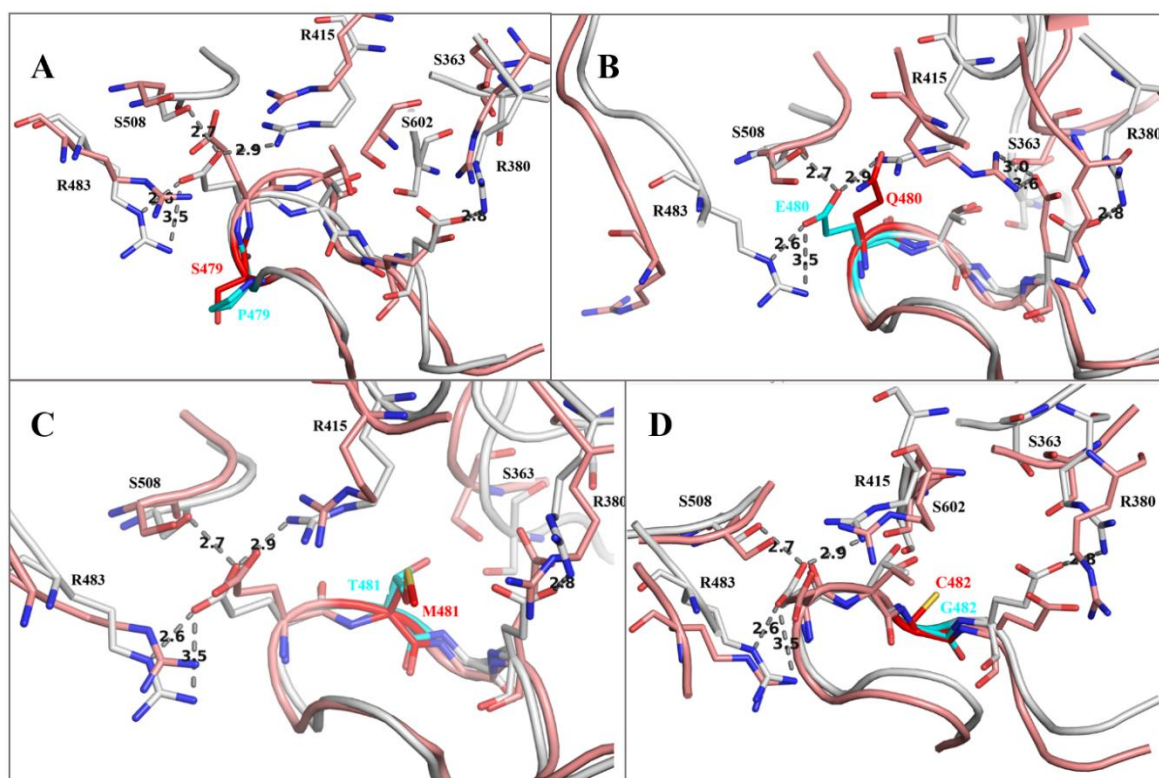
Mutacija P479S u proteinu DPP III ne pokazuje vrlo značajan utjecaj u smislu gubitka interakcija s domenom Kelch u odnosu na divlji tip proteina (slika 32 A). Zamjetno je da dolazi do promjena u konformaciji petlje koja je izraženija u području ostataka T481 i E483 što dovodi do određenog povećanja u interakcijama tih ostataka sa S602, odnosno R380 i S363 u odnosu na DT.

Najznačajnija je promjena uočena u slučaju mutacije E480Q gdje gubitak interakcije Q480 s R415 dovodi do reorijentacije R415 prema E483, drugom glutamatu u motivu ETGE (slika 32 B). Uz to, Q483 ove mutirane varijante ostvaruje tek zanemarive interakcije s R483 u domeni Kelch u odnosu na DT, pa tijekom simulacija dolazi do udaljavanja R483 od veznog mjesta za motiv ETGE. Jedine interakcije koje ostaju očuvane između Q480, u odnosu na E480, i domene Kelch su one sa serinskim ostacima S555 i tek djelomično S508. To je u skladu s najnepovoljnijom energijom vezanja dobivenom MM-GBSA računom za kompleks s ovom varijantom.

Međutim, kod ove varijante uočava se nešto veća zastupljenost interakcija T481 sa S602, te vrlo velika zastupljenost interakcija E483 s R419 i sa S363. Prema računu MM-GBSA može se

zaključiti da te interakcije nisu jednako povoljne i da ne mogu nadoknaditi utjecaj supstitucije E480Q na opisane interakcije.

Moguće pojašnjenje je kompeticija interakcija E483 - R380 i E483 - R415 što unosi nestabilnost u konformaciju petlje ETGE. Ovaj trend može se uočiti tijekom prvih 100 ns simulacija, ako se promatraju periodi od 20 ns (tablica 10, slika 33). Naime, vidljivo je da dolazi do snažne interakcije E483 s R415, nakon čega ona brzo pada i nakon 60 ns uspostavlja se ravnoteža interakcija E483 - R415 i E483 - R380, zbog čega je ukupna zastupljenost interakcije E483 s R380 približno 2 puta manja nego kod DT ili ostalih mutiranih varijanti.

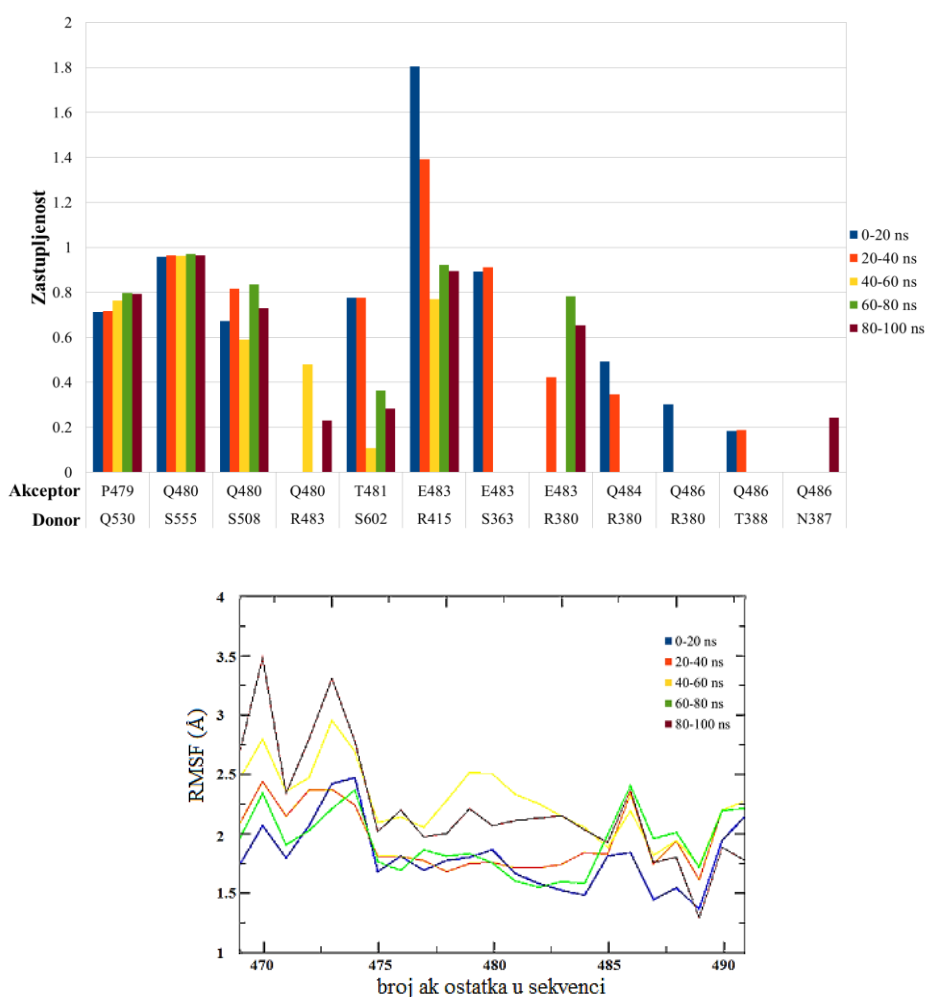


Slika 32. Interakcije motiva ETGE DPP III s domenom Kelch uspostavljene tijekom simulacija MD kompleksa Kelch – DPP III s DT DPP III i mutiranim varijantama A) P479S, B) E480Q, C) T481M, D) G482C. Struktura kompleksa s divljim tipom DPP III (siva) preklopljena je s kompleksima u kojima je DPP III mutiran (roza), s mutiranim ostatkom (crvena) prikazanim u odnosu prema izvornom (cijan).

Interakcija mutiranog ostatka iz veznog motiva DPP III, Q480, s R483 u domeni Kelch praćena je analizom *RMSF* motiva ETGE i petlje DPP III u kompleksu. Povećana *RMSF* je posljedica udaljavanja R483, koji se nalazi na rubu veznog mjesta domene Kelch, kod ove varijante gdje nema interakcije velikog afiniteta kao s E480. Stoga ova interakcija postaje nestabilna i vidljivo je da dolazi do njenog formiranja i otpuštanja tijekom simulacija.

Tablica 10. Zastupljenost vodikovih veza tijekom prvih 100 ns simulacija MD kompleksa Kelch – DPP III E480Q u intervalima od po 20 ns.

Akceptor (DPP III)	Donor (Kelch)	0-20 ns	20-40 ns	40-60 ns	60-80 ns	80-100 ns
P479	Q530	0,71	0,72	0,76	0,80	0,79
Q480	S555	0,96	0,96	0,96	0,97	0,96
Q480	S508	0,67	0,82	0,59	0,84	0,73
Q480	R483	0	0	0,48	0	0,23
T481	S602	0,78	0,78	0,11	0,36	0,28
E483	R415	1,81	1,39	0,77	0,92	0,89
E483	S363	0,89	0,91	0	0	0
E483	R380	0	0,42	0	0,78	0,65
Q484	R380	0,49	0,35	0	0	0
Q486	R380	0,30	0	0	0	0
Q486	T388	0,18	0,19	0	0	0
Q486	N387	0	0	0	0	0,24
E581	R459	0,10	0	0,10	0	0



Slika 33. (gore) Grafikon raspodjele vodikovih veza u kompleksu DPP III varijante E480Q s domenom Kelch, u periodima od 20 ns tijekom 100 ns produktivnih simulacija MD, (dolje) *RMSF* u petlji ETGE DPP III tijekom istih perioda.

Zamjena T481M pokazuje manji učinak na vezne interakcije (slika 32 C), što je donekle očekivano obzirom da je u dosadašnjim istraživanjima pokazano da se proteini s motivom ESGE također mogu vezati na domenu Kelch proteina KEAP1. Dok DT DPP III ostatkom T481 ostvaruje vrlo prolazne interakcije sa S602 domene Kelch, ta interakcija nije stabilna s M481. Najveća razlika u interakcijama tijekom simulacija s mutiranom inačicom T481M je povećanje interakcija P479 s Y525, te E483 s R380 i N387.

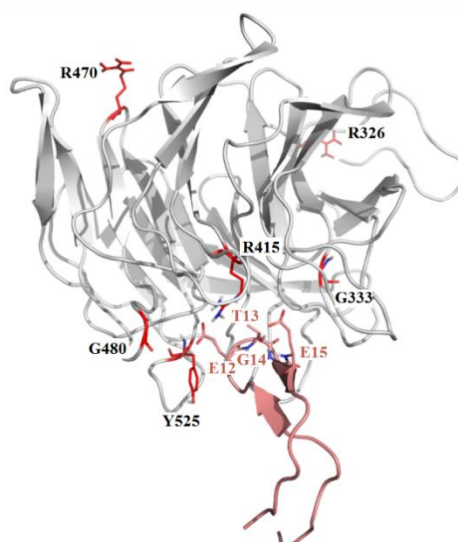
Unatoč slabijem afinitetu vezanja predviđenom računom MM-GBSA mutacija G482C nije pokazala značajniju promjenu u interakcijama petlje ETGE s veznim mjestom domene Kelch (slika 32 D).

Za razliku od DPP III, NRF2 ima umjesto prolina na poziciji neposredno ispred motiva ETGE glutamat, dakle umjesto PETGE slijeda kod DPP III, NRF2 ima slijed EETGE. Ta je razlika znatno veća nego mutacija P479S i može više doprinosti razlici u afinitetima ova dva proteina prema domeni Kelch.

Najveći učinak supstitucije E480Q je očekivan jer taj ostatak ostvaruje velik broj interakcija u veznom mjestu domene Kelch. Međutim, postoji vjerojatnost da ovom metodom nije moguće utvrditi je li izračunata razlika u veznom afinitetu znak da se DPP III s ovom supstitucijom ne veže na protein KEAP1, budući da nije moguće za sustav ove veličine simulirati dovoljno dugo da bi se uočilo odmicanje veznih partnera.

4.5.3. Proučavanje utjecaja mutacija domene Kelch na vezanje peptida ETGE

Na temelju strukture kompleksa divljeg tipa domene Kelch s DPP III izgrađene su strukture kompleksa u kojima je jedan aminokiselinski ostatak domene Kelch mutiran, pri čemu su odabrane mutacije iz baze cBioPortal R326D, G333C, R415C, R470C, G480W te Y525C (slika 34). Neke od tih mutacija nalaze se blizu veznog mjesta domene Kelch te je za njih moguće pretpostaviti utjecaj na vezanje, dok su druge mutacije odabrane kao zanimljive zbog dostupnih podataka iz drugih tipova analiza o njihovoj onkogenosti.



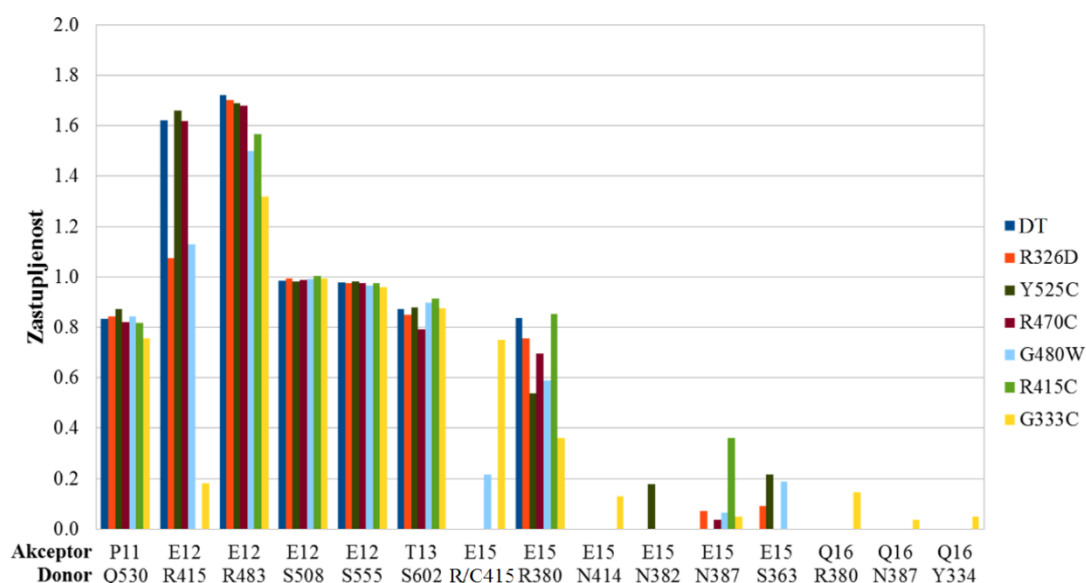
Slika 34. Položaji odabranih mutacija u domeni Kelch proteina KEAP1 (siva) prikazani na kompleksu domene s peptidom ETGE DPP III (roza) u veznom mjestu.

Simulacije MD za mutirane varijante domene Kelch u kompleksu s peptidom od 24 ak, kao i analiza MM-PBSA provedene su kako je prethodno opisano za DT (potpoglavlje 4.2.2.) te su računi $\Delta_r G$ dani u tablici 11.

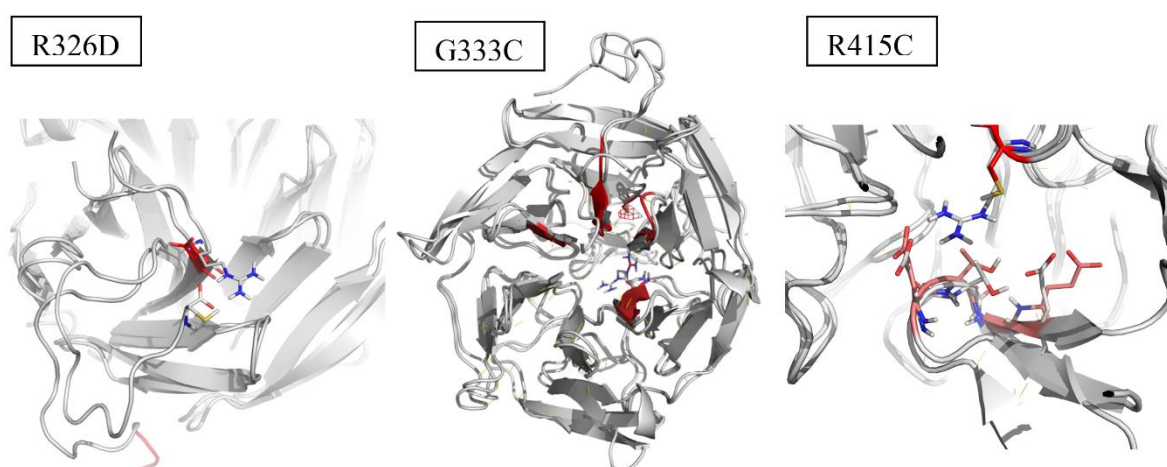
Analizirana je zastupljenost vodikovih veza tijekom simulacija kompleksa peptida s DT domene Kelch i njenim varijantama s točkastim mutacijama, kako bi se bolje razumjela razlika u veznim energijama (slika 35). Utvrđeno je da mutacija G333C dovodi do nestabilnosti središnjeg dijela prstenaste strukture domene Kelch, dok mutacija R326D dovodi do promjene u interakcijama s C-terminalnim dijelom, što također može destabilizirati strukturu (slika 36). Najnepovoljnijom se pokazala mutacija R415C koja se nalazi u veznom mjestu zbog koje dolazi do gubitka značajne interakcije R415 s E12 u peptidu, koji odgovara E480 u strukturi DPP III (slike 35 i 36).

Tablica 11. Račun relativnih energija vezanja ($\Delta_r G$) peptida na DT domene Kelch i njene mutirane varijante metodom MM-PBSA. Za pojedinu prosječnu energiju kompleksa i receptora korišten je prosjek vrijednosti izračunatih za 3 neovisne simulacije kompleksa, dok je za energiju liganda korišten prosjek svih neovisnih simulacija, budući da se u svim simulacijama radi o istom ligandu, odnosno peptidu ETGE DPP III.

Kompleks Kelch – peptid		DT	R326D	G333C	R415C	R470C	G480W	Y525C
$\Delta_r G$ (kompleks)/ kcal/mol	1	-7625	-7498	-7582	-7452	-7451	-7606	-7635
	2	-7687	-7506	-7628	-7429	-7455	-7609	-7618
	3	-7627	-7526	-7561	-7463	-7476	-7610	-7645
	prosje(3)	-7646	-7510	-7590	-7448	-7461	-7608	-7633
$\Delta_r G$ (receptor)/ kcal/mol	1	-6840	-6744	-6824	-6710	-6673	-6850	-6858
	2	-6896	-6740	-6861	-6701	-6678	-6820	-6841
	3	-6858	-6757	-6793	-6707	-6693	-6827	-6851
	prosje(3)	-6865	-6747	-6826	-6706	-6681	-6832	-6850
$\Delta_r G$ (ligand)/ kcal/mol	1	-758	-758	-760	-757	-774	-763	-772
	2	-771	-746	-772	-741	-765	-766	-775
	3	-752	-767	-761	-758	-770	-758	-778
	prosje(21)	-763						
$\Delta_r G$ (K-R-L)/ kcal/mol		-19	-16	-1	21	-16	-13	-20



Slika 35. Grafikon raspodjele vodikovih veza u kompleksu Kelch – peptid ETGE DPP III. Histogrami prikazuju zastupljenost interakcija u kompleksima različitih varijanti domene Kelch s peptidom.



Slika 36. Usporedba interakcija koje uspostavljaju ostaci domene Kelch divljeg tipa i mutiranih varijanti s peptidom. Prikazane su interakcije u kompleksima s varijantama za koje se MM-PBSA energije najviše razlikuju u odnosu na DT. Dijelovi strukture mutiranih varijanti označeni crvenom bojom istaknuti su zbog najvećeg utjecaja na promjene u interakcijama koje uspostavljaju s vezanim peptidom (R326D i R415C) ili znatno utječu na stabilnost domene Kelch (G333C).

4.5.4. Proučavanje utjecaja mutacija domene Kelch na vezanje DPP III

Kompleksi gore opisanih varijanti domene Kelch s DPP III su optimizirani te su, nakon zagrijavanja i ekvibracije gustoće otapala (vode), provedene po 3 nezavisne produktivne MD simulacije za svaki kompleks. Kompleks s mutacijama G333 i G480W, smještenim izvan veznog mjesta, simulirani su ukupno 500 ns, a kompleksi s mutacijama ostataka R415 i Y525, koje se nalaze u samom veznom mjestu, 300 ns. Energije MM-GBSA izračunate su na strukturama sakupljenim tijekom zadnjih 30 ns simulacija za svako od neovisnih ponavljanja (tablica 12). Relativni afiniteti navedenih kompleksa mogu se procijeniti usporedbom dobivenih energija s rezultatima prethodno određene vezne energije za kompleks divljeg tipa koja je iznosila -80 kcal/mol.

Kao i u kompleksu Kelch R415C – peptid, u kompleksu s DPP III također se uočava potpuni gubitak interakcije ostatka na poziciji 415 s E480 DPP III nakon uvedene supstitucije (tablica 13, slika 37). Može se zaključiti da mutacija R415C ima najnepovoljniji učinak na vezanje domene Kelch s DPP III, odnosno njenom petljom ETGE.

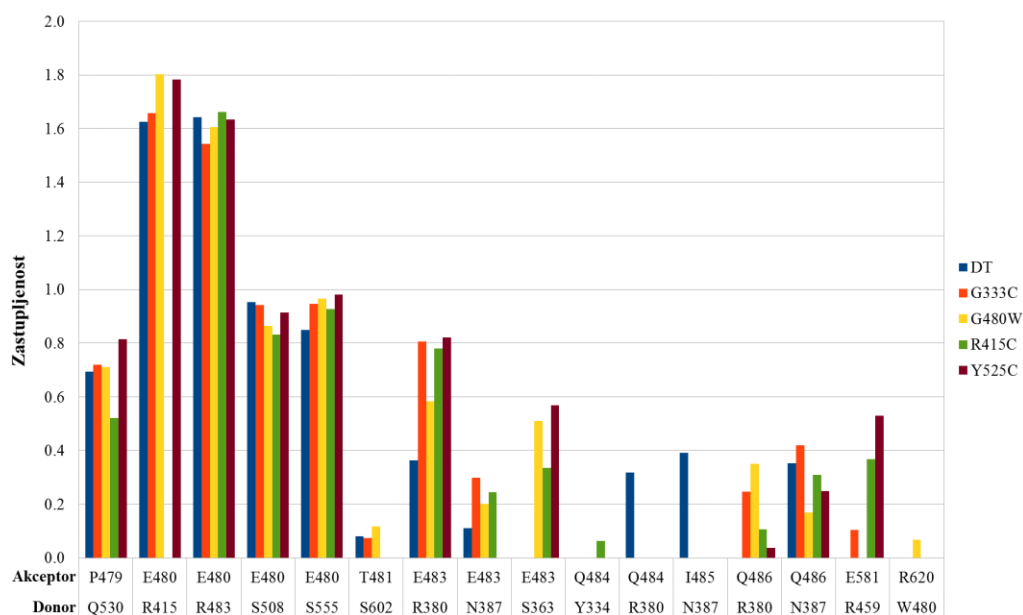
Za varijantu G480W vezanje je nepovoljno u odnosu na divlji tip, ali od svih proučavanih mutacija ova ima najmanji učinak na promjenu afiniteta zbog dodatne interakcije koju W480 uspostavlja s argininima u strukturiranom dijelu gornje domene DPP III koji u slobodnoj DPP III vežu motiv ETGE, posebice R620 (slika 38), a što nije uočeno ni u jednom drugom kompleksu. Također, može se uočiti da je za simulacije s DT domene Kelch niža vezna energija postignuta samo u jednoj od neovisnih simulacija, dok su u preostale dvije te energije nepovoljnije.

Tablica 12. MM-GBSA aproksimacija slobodnih energija vezanja u kcal/mol za mutirane varijante kompleksa Kelch – DPP III, izračunatih u intervalima od 20 ns. Navedene su minimalne vrijednosti za svako od neovisnih ponavljanja, a standardna devijacija iznosi približno 8 kcal/mol.

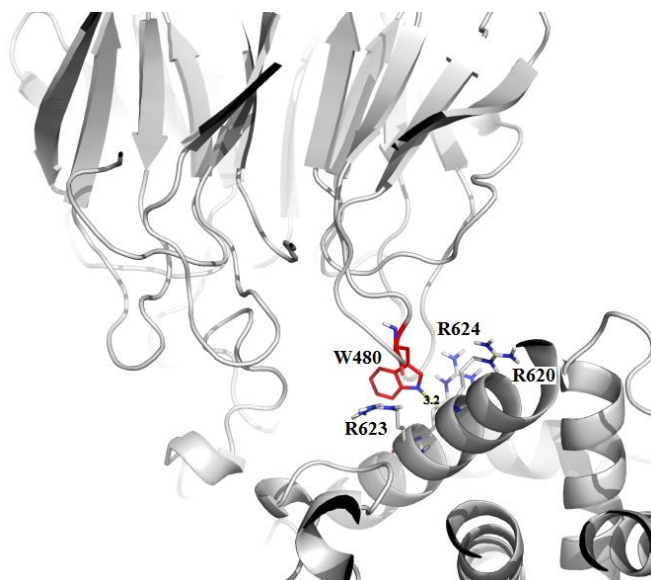
DPP III- varijanta KEAP1	Simulacija	vrijeme/ns	MM-GBSA- minimum (kcal/mol)
DT	1	300	-51
	2	100	-80
	3	100	-44
	ukupno	500	-80
G333C	1	300	-51
	2	100	-40
	3	100	-40
	ukupno	500	-51
G480W	1	300	-65
	2	100	-61
	3	100	-60
	ukupno	500	-65
R415C	1	100	-30
	2	100	-35
	3	100	-51
	ukupno	300	-51
Y525C	1	100	-59
	2	100	-49
	3	100	-42
	ukupno	300	-59

Tablica 13. Zastupljenost vodikovih veza tijekom simulacija MD kompleksa Kelch – DPP III s domenom Kelch divljeg tipa i mutiranim varijantama.

Akceptor (DPP III)	Donor (Kelch)	DT	G333C	G480W	R415C	Y525C
P479	Q530	0,69	0,72	0,71	0,52	0,82
E480	R415	1,62	1,66	1,80	0	1,78
E480	R483	1,64	1,54	1,61	1,66	1,63
E480	S508	0,95	0,94	0,86	0,83	0,91
E480	S555	0,85	0,95	0,97	0,93	0,98
T481	S602	0,08	0,07	0,12	0	0
E483	R380	0,36	0,81	0,58	0,78	0,82
E483	N387	0,11	0,30	0,20	0,25	0
E483	S363	0	0	0,51	0,33	0,57
Q484	Y334	0	0	0	0,06	0
Q484	R380	0,32	0	0	0	0
I485	N387	0,39	0	0	0	0
Q486	R380	0	0,25	0,35	0,11	0,04
Q486	N387	0,35	0,42	0,17	0,31	0,25
E581	R459	0	0,10	0	0,37	0,53
R620	W480	0	0	0,07	0	0



Slika 37. Grafikon zastupljenosti vodikovih veza u kompleksu DPP III s domenom Kelch DT i mutiranim varijantama.



Slika 38. Interakcije koje uspostavlja ostatak W480 u mutiranoj varijanti domene Kelch G480W s DPP III. Mutirani ostatak obojen je crveno te je označena udaljenost dušikovog atoma triptofana od okosnice R620 u DPP III.

Interakcija uočena među udaljenijim elementima struktura DPP III i mutirane varijante Kelch R480W potencijalno daje novi strukturni uvid u mehanizme kojima mutacije pronađene u tumorima mogu povećati afinitet proteina KEAP1 za vezanje DPP III.

Kako bi se ispitali rezultati molekulskog modeliranja na kompleksima Kelch – DPP III, postavljene hipoteze testirane su eksperimentalnim metodama.

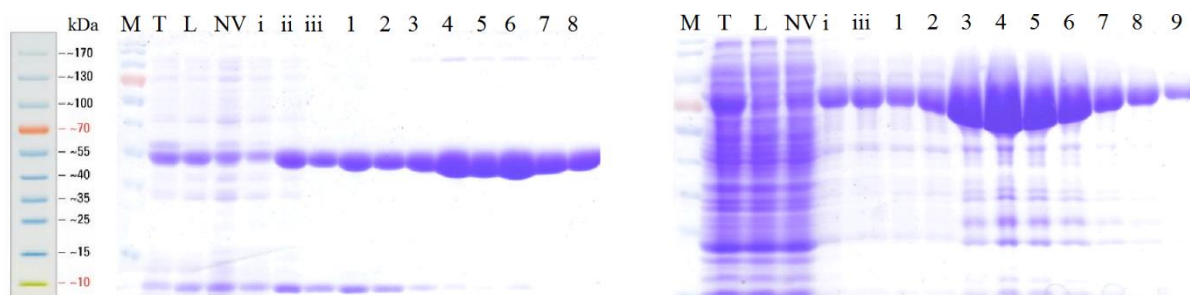
4.6. Priprema proteina za eksperimentalna istraživanja

Za eksperimentalne studije prvo je bilo potrebno pročistiti proteine, ispitati njihovu uniformnost i stabilnost, te zatim testirati koja je metoda povoljna za praćenje interakcija Kelch – DPP III.

4.6.1. Ekspresija, pročišćavanje i analiza proteina

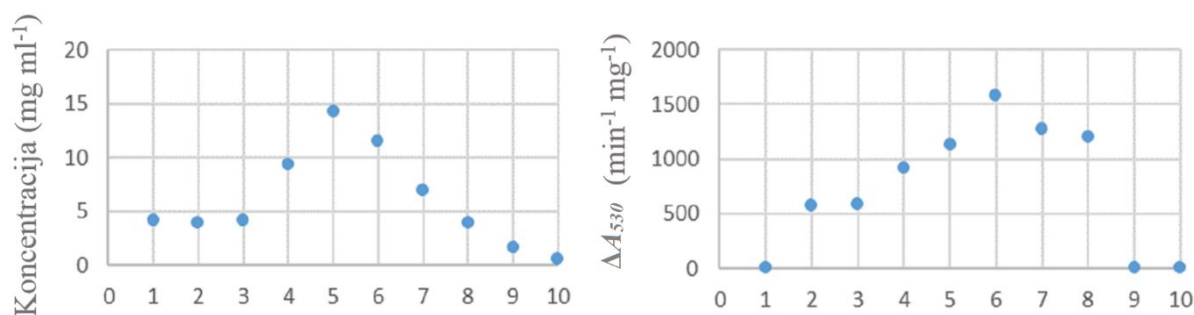
Zasebne kolonije transformiranih bakterija selektiranih na ampicilinskim pločama odabrane su za uzgoj prekonocnih kultura te su potom uzgojene u velikom volumenu za indukciju i ekspresiju proteina. Iz bakterijskih taloga dobivenih centrifugiranjem i uklanjanjem medija pročišćeni su proteini.

Pročišćavanje proteina s His-privjeskom provedeno je afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agaroznim kolonama. Proteini obilježeni His-privjeskom eluirani su zatim s kolone puferom s 300 mM imidazolom i prikupljeno je 10-15 frakcija od 0,5 ml, ovisno o količini proteina. Frakcije prikupljene u koracima pročišćavanja te pročišćenih proteina su analizirane SDS-PAGE elektroforezom (slika 39). Vrpce za pojedine proteine nalaze se na očekivanom položaju, ~34,5 kDa za domenu Kelch i ~83,5 kDa za DPP III.



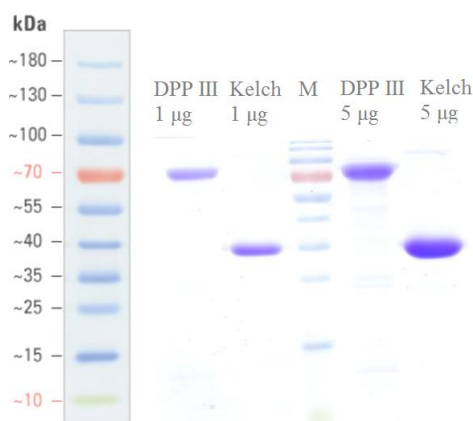
Slika 39. Analiza frakcija prikupljenih tijekom pročišćavanja Kelch (lijevo) i DPP III (desno) na SDS-PAGE (10%-tni gel), M-marker, T- stanični talog, L- lizat, NV-nevezana frakcija, i,ii,iii-ispiranje, 1-8/9 frakcije pročišćenog proteina (2 μ L). Dan je prikaz proteinskog markera s označenim veličinama proteina.

Određivanje koncentracije proteina provedeno je BioDropom te su koncentracije proteina uspoređene s aktivnošću proteina DPP III. Napravljen je test aktivnosti za glavne frakcije 2-8. Izmjerene aktivnosti u pojedinim frakcijama, detektirane kao promjena apsorbancije (ΔA_{530}) uslijed nastanka produkta, podudaraju se s vrijednostima koncentracija izmjerenih BioDrop-om (slika 40).



Slika 40. Koncentracije frakcija određene BioDrop-om (mass ext.) i aktivnost (ΔA_{530}) proteina DPP III DT, u frakcijama 1-10.

Nakon odsoljavanja glavnih frakcija, onih s najvišom koncentracijom i aktivnošću, i ugušćivanja proteina do koncentracija potrebnih za eksperimente, proteini DT DPP III i Kelch su ponovno analizirani SDS-PAGE elektroforezom (slika 41). Čistoća proteina zadovoljavajuća je za eksperimente.

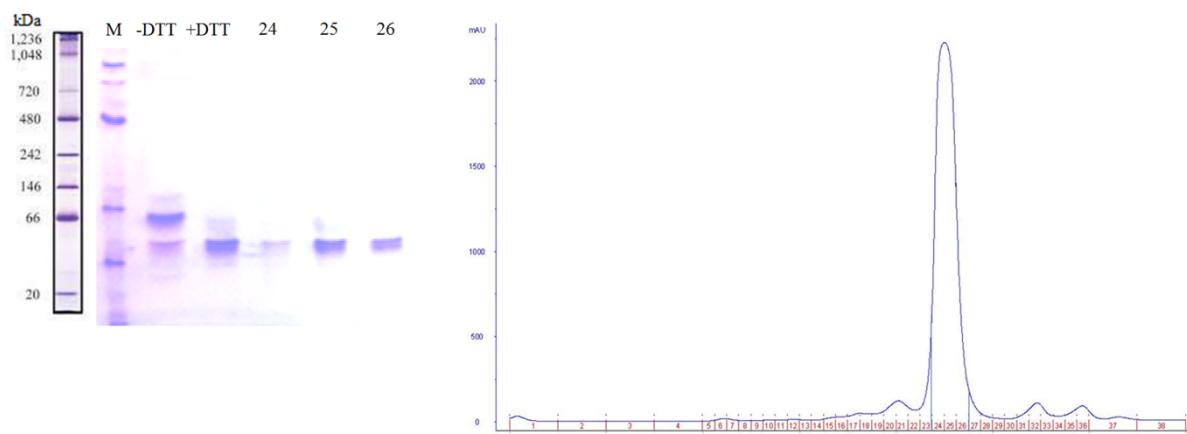


Slika 41. Konačni uzorci proteina za analize interakcija, na gel za analizu SDS-PAGE je nanešeno po 1 µg (lijevo od markera M) i 5 µg (desno od markera M) uzorka. Lijevo je prikazan marker za određivanje veličina proteina (PageRuler™ Prestained Protein Ladder).

4.6.2. Utjecaj reducensa na oligomerizacijsko stanje Kelch-a

Zasebna domena Kelch koristi se za eksperimente vezanja proteina s motivima ETGE na protein KEAP1⁴³ zbog povoljnije ekspresije u bakterijama. Međutim, kao što je poznato i iz prijašnjih radova, domena Kelch u otopini stvara dimere ili oligomere⁸¹. Budući da to nije povoljno za neke eksperimentalne metode ispitano je na koji način se može utjecati na oligomerizacijsko stanje Kelch-a.

Utvrđeno je da dodatak reducensa DTT utječe na oligomerizacijsko stanje Kelch-a na način da, za razliku od uzorka bez DTT-a gdje prevladava dimerni oblik proteina, nakon dodatka DTT-a prevladava monomerni oblik. U nastavku istraživanja korišten je reducens s duljom stabilnosti u otopini, TCEP. Dodatak ovog reducensa u pufer za odsoljavanje proteina nakon pročišćavanja sprječava dimerizaciju Kelch-a, a dodatni korak pročišćavanja gel filtracijskom kromatografijom omogućuje razdvajanje monomernog oblika proteina (slika 42).

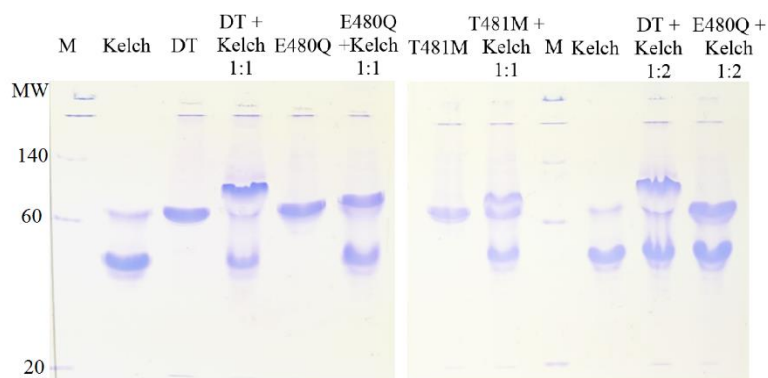


Slika 42. Nativna gel elektroforeza domene Kelch (lijevo, prikazan je marker NativeMark™ Unstained Protein Standard) bez dodatka reducensa, zatim nakon dodatka DTT-a i u frakcijama (24-26) prikupljenim na gel filtracijskoj kromatografiji u puferu s dodatkom TCEP-a, za koje je određena najviša apsorbacija UV (mAU)(desno).

U frakcijama pročišćenim gel filtracijskom kromatografijom postignuta je vrlo visoka čistoća proteina te je potvrđeno da nakon dodatka reducensa veličina proteina odgovara uglavnom monomeru Kelch-a. To je bilo posebno važno za kristalizacijske eksperimente. Međutim, uočeno je i da stajanjem proteina na 4 °C dolazi do ponovne dimerizacije i nakon pročišćavanja, moguće uspostavljanjem ravnoteže između monomerne i dimerne forme.

4.6.3. Ispitivanje vezanja domene Kelch DT s DPP III DT i njenim varijantama, s mutacijama u motivu ETGE, nativnom PAGE

Budući da je poznato da je motiv ETGE odgovoran za vezanje DPP III na domenu Kelch, ispitan je utjecaj mutacija u tom motivu na vezanje Kelch – DPP III. Vezanje proteina Kelch s DT DPP III te varijantama DPP III E480Q i T481M provjereno je nativnom gel elektroforezom (slika 43).



Slika 43. Analiza vezanja DPP III DT i varijanti E480Q i T481M s domenom Kelch nativnom PAGE. Na dva gela analizirani su istodobno zasebni protein Kelch i DT DPP III te varijante E480Q i T480M, zatim njihovi kompleksi u omjeru DPP III:Kelch 1:1 i 1:2. M – marker NativeMark, MW – molekulska masa (kDa).

Uočeno je da prilikom miješanja DT DPP III (85 kDa) i domene Kelch (34 kDa) nastaje kompleks koji se prepoznaje kao vrpca molekulske mase ~120 kDa. Za T481M uočeno je djelomično nastajanje kompleksa, dok za E480Q nije uočena vrpca koja bi ukazivala na vezanje s domenom Kelch.

Ovakav rezultat u skladu je s predviđanjima na temelju strukturnih analiza za interakcije Kelch – DPP III, koje pokazuju da E480 ostvaruje velik broj interakcija svojim bočnim ogrankom, dok su te interakcije narušene nakon supstitucije E480Q i dolazi do znatnijeg povećanja vezne energije. Za razliku od toga T481 ostvaruje interakcije s domenom Kelch uglavnom preko okosnice te supstitucija ne narušava dominantne interakcije motiva ETGE s veznim mjestom Kelch-a i nema toliko značajan učinak na energiju vezanja.

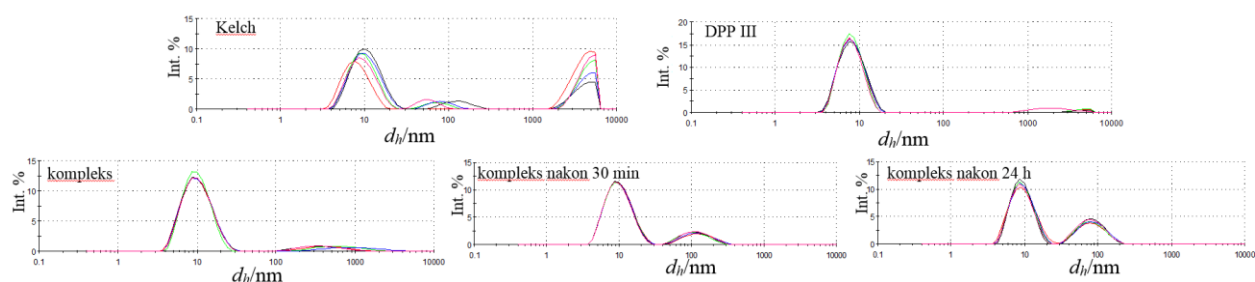
4.7. Ispitivanje struktura proteina i njihovih kompleksa DLS-om

Vezanje DT domene Kelch s DPP III mjereno je DLS-om i uočeno je da svaki protein zasebno pokazuje vrijednost hidrodinamičkog radijusa približno 10 nm, a da se nakon njihovog miješanja, u ovisnosti o vremenu smanjuje udio agregiranog proteina znatno većeg od monomernog proteina. Nakon kompleksacije, pojavljuje se sve veći udio čestica prvo radijusa približno 600 nm a zatim i radijusa približno 100 nm. U tom području uočava se vjerojatna pojava dimera domene Kelch, ali nakon miješanja dvaju proteina vjerojatno je da dolazi do

njihovog vezanja u kompleks jer je zastupljenost čestica te veličine znatno veća nego u samom uzorku s domenom Kelch (tablica 14, slika 44).

Tablica 14. Raspodjela hidrodinamičkih radijusa definirana postotkom intenziteta raspršene svjetlosti određena DLS-om, za DT Kelch i DPP III te njihov kompleks neposredno nakon miješanja dva proteina, nakon 30 min i nakon 24 h inkubacije.

	d_h / nm	Int. %	d_h / nm	Int. %	d_h / nm	Int. %
Kelch	9,9±1,1	59,7±7,4	86,9±32,1	6,0±1,1	4201,2±143,8	34,3±10,4
DPP III	8,3±0,2	96,1±2,9	3913,0±985,8	3,9±2,9		
kompleks	10,7±0,1	91,0±0,6	640,5±310,4	9,0±0,6		
kompleks 30 min	10,5±0,1	81,9±1,1	126,2±8,4	18,1±1,1		
kompleks 24 h	9,7±0,2	68,7±1,8	86,9±1,8	31,3±1,8		



Slika 44. Grafikoni raspodjele hidrodinamičkih radijusa određenih DLS-om za DT domenu Kelch (34,5 kDa), protein DPP III (83,5 kDa) te njihove smjese odmah nakon miješanja, nakon 30 min, te nakon 24 h. Prikazana je raspodjela intenziteta raspršene svjetlosti (izražena u %), prilikom vezanja u kompleks. Za izmjerene vrijednosti hidrodinamičkih radijusa intenzitet raspršene svjetlosti proporcionalan je broju čestica određenog hidrodinamičkog radijusa.

U svrhu ispitivanja strukture i stabilnosti varijanti domene Kelch s mutacijama koje potencijalno utječu na vezno mjesto za DPP III, provedena je njihova analiza DLS-om. Kao i kod divljeg tipa izolirane domene Kelch, uočava se dimerizacija ili multimerizacija (tablice 15 i 16, slika 45).

Za varijante G333C i G480W izmjeren je znatno veći hidrodinamički radijus nego za DT Kelch. To može ukazivati na veći stupanj multimerizacije, ali isto tako i na nestabilnost strukture koja uzrokuje agregaciju proteina u otopini, što može biti posljedica uvedene supstitucije.

Za varijante R415C i Y525C hidrodinamički radijus približno odgovara onom divljeg tipa domene Kelch kada se promatra raspodjela po volumnom postotku, no raspodjela radijusa po postotku intenziteta pokazuje također i pojavu većih čestica. Raspodjele su vrlo slične u uzorcima zasebnih varijanti Kelcha, kao i u uzorcima u kojima su pomiješane s DPP III. Uz mogućnost da ne dolazi do vezanja ovih varijanti domene Kelch na DPP III, mogući razlog je slična veličina dimera Kelcha i proteina DPP III.

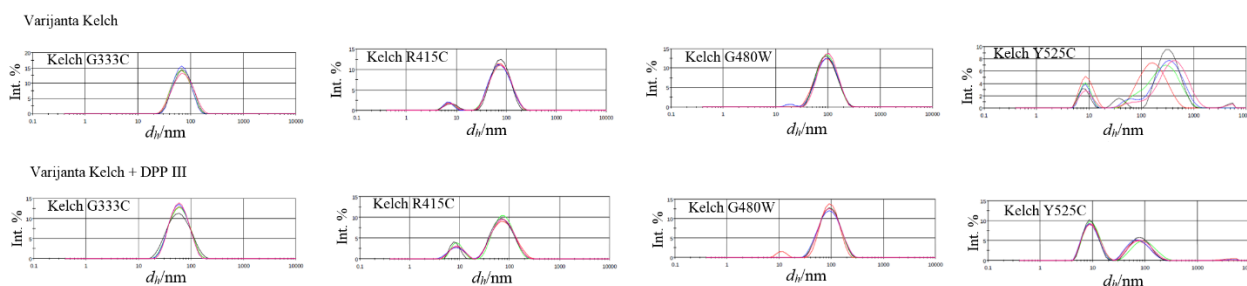
Zbog nedovoljno preciznog razlučivanja vrsta čestica u otopini ova metoda nije se pokazala kao povoljna za proučavanje vezanja varijanti Kelcha i DPP III.

Tablica 15. Raspodjela hidrodinamičkih radijusa određenih DLS-om za DT i mutirane varijante domene Kelch. Dan je postotak intenziteta raspršene svjetlosti za različite vrijednosti hidrodinamičkih radijusa.

Varijanta Kelch	d_h / nm	Int. %	d_h / nm	Int. %	d_h / nm	Int. %
Kelch DT	9,9±1,1	59,7±7,4	86,9±32,1	6,0±1,1	4201,2±143,8	34,3±10,4
Kelch G333C	73,4±2,64	100,0±0,0				
Kelch R415C	7,6±0,3	7,7±0,3	82,75±1,0	92,3±0,3		
Kelch G480W	103,8±1,7	99,6±0,9				
Kelch Y525C	8,9±0,44	16,7±5,0	96,8±79,2	18,0±38,8	370,3±58,4	64,6±36,3

Tablica 16. Raspodjela hidrodinamičkih radijusa određenih DLS-om za DT i mutirane varijante domene Kelch s DT DPP III. Dan je postotak intenziteta raspršene svjetlosti za različite vrijednosti hidrodinamičkih radijusa.

Varijanta u kompleksu	d_h / nm	Int. %	d_h / nm	Int. %
Kelch DT	10,7±0,1	91,0±0,6	640,5±310,4	9,0±0,6
Kelch G333C	64,8±0,7	100,0±0,0		
Kelch R415C	8,9±0,4	16,7±0,8	81,3±1,5	83,3±0,8
Kelch G480W	101,4±1,1	98,9±2,5		
Kelch Y525C	9,8±0,3	56,9±1,0	90,1±8,9	42,5±1,1



Slika 45. Grafikoni raspodjele zastupljenosti hidrodinamičkih radijusa određenih DLS-om za varijante domene Kelch zasebno (gore) i uz dodatak proteina DPP III u molarnom omjeru 1:1, mjenjenih neposredno nakon miješanja (dolje). Prikazan je postotak intenziteta raspršene svjetlosti za različite vrijednosti hidrodinamičkih radijusa.

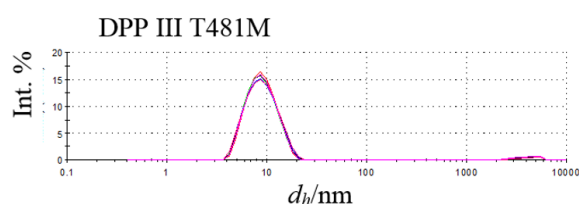
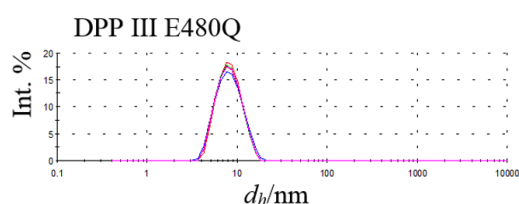
Hidrodinamička svojstva i vezanje dvaju varijanti DPP III, E480Q i T481M, s mutacijama u motivu ETGE, na domenu Kelch također su ispitana DLS-om.

Oba proteina s mutacijama zasebno pokazuju vrijednosti hidrodinamičkih radijusa približno 10 nm u analizi raspodjele veličine čestica prema intenzitetu raspršene svjetlosti, analogno DT DPP III. No snimanjem DLS spektara nakon miješanja domene Kelch s varijantama proteina DPP III ne uočava se signal veličine ~100 nm kao kod DT proteina. Odgovarajući signal ne pojavljuje se kod varijante E480Q niti nakon perioda inkubacije od 60 min, dok se za varijantu T481M nakon 60 min uočava pojava slabog signala koji je blizak promatranom za DT proteina (tablica 17 i slika 46).

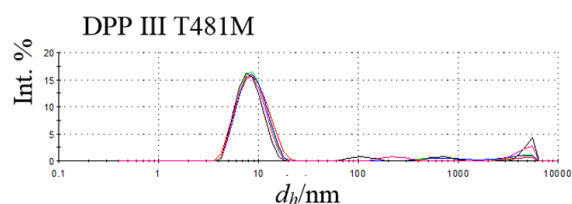
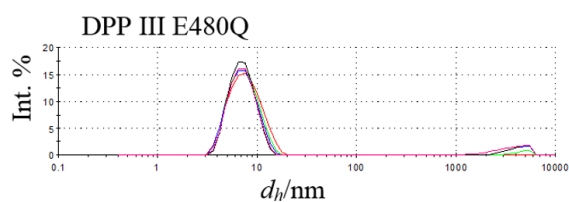
Iz toga bi se moglo zaključiti da se varijanta E480Q ne veže na domenu Kelch proteina KEAP1, te da je zapažena potencijalna interakcija varijante T481M vrlo slaba i sporo dolazi do njene formacije nakon miješanja dvaju proteina. To zapažanje odgovara prethodno uočenom u analizi nativnom PAGE te strukturnim analizama.

Tablica 17. Raspodjela hidrodinamičkih radijusa određenih DLS-om za DT i mutirane varijante DPP III zasebno i nakon miješanja s DT DPP III u molarnom omjeru 1:1 Prikazan je postotak intenziteta raspršene svjetlosti za različite vrijednosti hidrodinamičkih radijusa na temelju kojih se uočio nastanak kompleksa kod DT proteina.

	d_h / nm	Int. %	d_h / nm	Int. %	d_h / nm	Int. %
Kelch	9,9±1,1	59,7±7,4	86,9±32,1	6,0±1,1	4201,2±143,8	34,3±10,4
DPP III	8,3±0,2	96,1±2,9	3913,0±985,8	3,9±2,9		
DPP III E480Q	8,3 ± 0,1	100 ± 0				
DPP III T481M	9,2 ± 0,1	97,4 ± 0,5	4181 ± 43	2,6 ± 0,5		
kompleks varijanta:						
DPP III E480Q	7,5 ± 0,3	94,4 ± 4,2	4253 ± 395	5,6 ± 3,3		
DPP III T481M	8,8 ± 0,3	90,0 ± 5,0	460,5 ± 338,7	3,1 ± 0,3	4375,4 ± 429,6	6,2 ± 2,7
DPP III E480Q 60 min	7,1 ± 0,3	91,2 ± 1,9	634,9 ± 162,2	2,0 ± 1,3	4500 ± 780	6,8 ± 2,4
DPP III T481M 60 min	8,8 ± 0,2	93,8 ± 2,5	206,0 ± 56,0	1,6 ± 0,8	4232 ± 1236	4,5 ± 2,3



Kompleksi s domenom Kelch



Slika 46. Grafikoni raspodjele hidrodinamičkih radijusa određenih DLS-om za vezanje DT i mutiranih varijanti DPP III s domenom Kelch. Prikazana je raspodjela intenziteta raspršene svjetlosti za različite vrijednosti hidrodinamičkog radijusa.

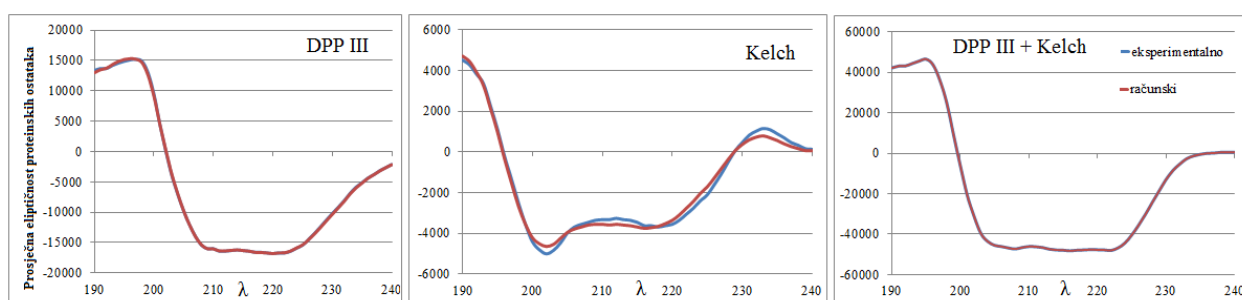
4.8. Cirkularni dikroizam

Cirkularnim dikroizmom određen je udio strukturiranih i neuređenih elemenata u proteinima DT DPP III i Kelch te u kompleksu koji nastaje njihovim vezanjem (tablica 18). Sukladno predviđanjima na temelju strukturnih podataka (slika 47), za DPP III je određeno da većinu strukture čine α -zavojnice, dok je domena Kelch građena od β -ploča s okretima i neuređenim regijama na vanjskim dijelovima strukture, uključujući vezno mjesto za motiv ETGE. Formiranjem kompleksa smanjuje se neuređenost i udio okreta u strukturama, koje se potencijalno stabiliziraju u α -zavojnice.

Uočava se vrlo dobro poklapanje eksperimentalnih i računskih krivulja, dok je najveće odstupanje dobiveno za domenu Kelch.

Tablica 18. Udio α -zavojnica i β -ploča, te okreta i neuređenih regija u strukturama DPP III, Kelch, te smjesi tih dvaju proteina, odnosno kompleksu koji nastaje njihovim vezanjem. Rezultati su dobiveni programom Dichroweb⁷⁰ sa standardnim referentnim vrijednostima⁷³.

	α -1	α -2	β -1	β -2	Okret	Neuređeno	Ukupno
DPP III	0,24	0,13	0,16	0,08	0,17	0,22	1
Kelch	0,01	0,06	0,23	0,14	0,22	0,33	0,99
Kompleks	0,37	0,08	0,16	0,11	0,07	0,21	1



Slika 47. Mjerenja cirkularnog dikroizma, tj. eliptične polarizacije zračenja u ovisnosti o valnoj duljini, u uzorcima DPP III, Kelch i smjesi dvaju proteina, odnosno kompleksu koji nastaje. Prikazani su eksperimentalni rezultati i računsko predviđanje na temelju zastupljenosti elemenata sekundarnih struktura u dostupnim kristalografskim strukturama obaju proteina te modelnoj strukturi kompleksa.

4.9. Peptidazna aktivnost mutiranih varijanti DPP III

U prethodno objavljenom istraživanju identificirane su mutirane varijante DPP III koje utječu na njenu peptidaznu aktivnost³⁰. Stoga je, prije ispitivanja relativnih afiniteta vezanja novo-konstruiranih mutiranih varijanti DPP III na Kelch, provedena kinetička analiza njihove peptidazne aktivnosti prema sintetskom supstratu Arg₂-2NA, te su određeni kinetički parametri (tablica 19).

Tablica 19. Kinetički parametri za Michaelis-Menten kinetiku određeni nelinearnom regresijskom analizom podataka u programu GraphPad Prism 5⁷⁵.

	DT	P479S	E480Q	T481M	G482C	Q484H	R620C	R623W	R623L
k_{cat} (s ⁻¹)	70,2±3,6	53,9±1,5	52,3±1,6	26,4±0,9	62,4±1,0	45,1±1,8	63,0±1,6	41,1±0,6	55,7±1,8
K_M (μM)	12,7±1,8	8,3±0,8	10,4±1,0	10,0±1,1	8,8±0,4	6,6±1,0	11,2±0,8	7,6±0,4	9,8±1,0
k_{cat}/K_M (s ⁻¹ /μM)	5,5	6,5	5,0	2,6	7,1	6,8	5,6	5,4	5,7

Sve ispitane varijante DPP III imaju nešto nižu vrijednost k_{cat} za hidrolizu sintetskog supstrata Arg₂-2NA od one divljeg tipa proteina, koja iznosi približno 70 s⁻¹, a najniža vrijednost izmjerena je za varijantu s mutacijom T481M, približno 26 s⁻¹.

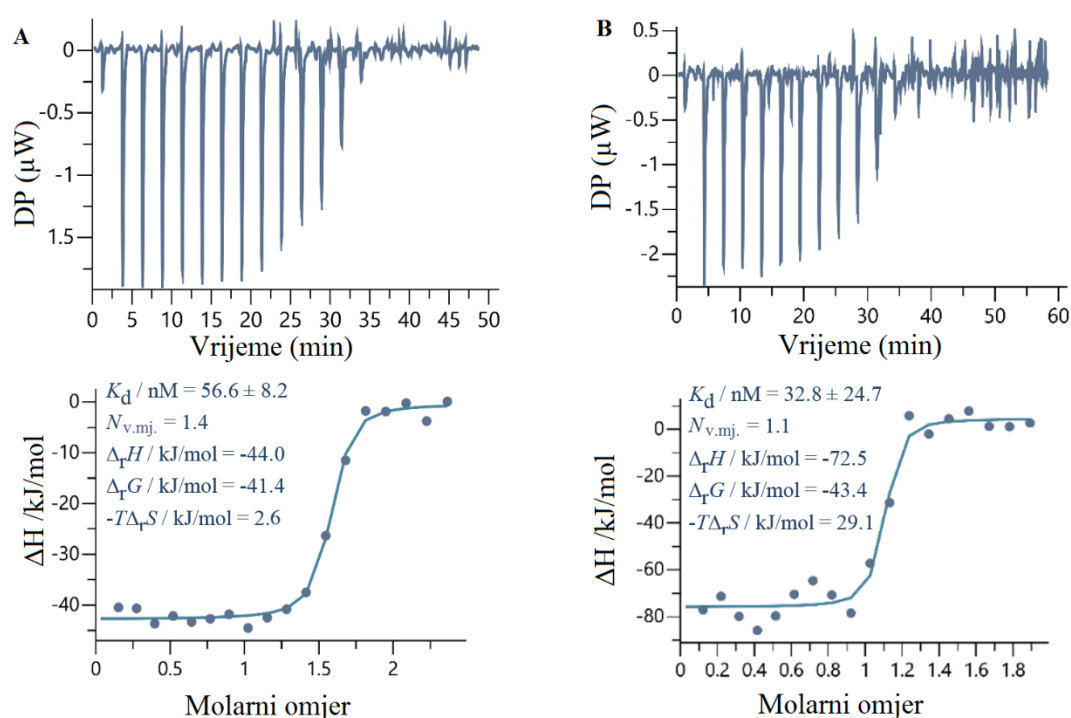
Kako su i vrijednosti K_M također niže za DPP III s točkastim mutacijama, (iako varijante R620C te E480Q i T481M (~10-11 μM) imaju približno jednaku vrijednost K_M kao divlji tip, (~13 μM), a najniže su vrijednosti izmjerene za varijante DPP III Q484H i R623W (~7 μM)), konstanta specifičnosti k_{cat}/K_M je za većinu varijanti približno jednaka kao i za DT. Najniža vrijednost izmjerena je za varijantu T481M (~2,6 s⁻¹/μM).

4.10. ITC mjerenja vezanja Kelch – peptid ETGE DPP III

U svrhu proučavanja vezanja DPP III na Kelch fleksibilnom petljom s motivom ETGE, korišteni su peptidi kraće, 11 ak, i duže, 24 ak, sekvence koji oponašaju petlju. Izotermnom titracijskom kalorimetrijom (ITC) na uređaju PEAQ-ITC su određene vrijednosti K_d za vezanje peptida od 11 i 24 ak na domenu Kelch i one iznose 57 i 33 nM (slika 48). Imajući na umu relativno veliku pogrešku kod mjerenja K_d za vezanje duljeg peptida, možemo zaključiti da je afinitet domene Kelch za vezanje oba peptida približno jednak.

Vrijednost K_d izmjerena je preciznije s peptidom 11 ak, te se vrijednosti s kraćim i duljim peptidom ne razlikuju značajno, uzimajući u obzir pogrešku kod rezultata mjerenja s duljim peptidom.

Entalpijski doprinos vezanja peptida ($\Delta_r H$) je vrlo povoljan, a entropijski doprinos ($-T\Delta_r S$) je pozitivan. S duljim peptidom izmjeren je povoljniji entalpijski doprinos, što sugerira veći broj interakcija i s ostacima udaljenijim od motiva ETGE. Smanjenje entropije nakon vezanja na domenu Kelch veće je za peptid od 24 ak nego za peptid od 11 ak, vjerojatno kao rezultat smanjenja konformacijske slobode.



Slika 48. Sirovi titracijski podaci (gore) i reprezentativne titracijske krivulje (dolje) za vezanje A) Kelch – peptid ETGE DPP III s 11 ak i B) Kelch – peptid ETGE DPP III s 24 ak. Prikazane su vrijednosti termodinamičkih parametara za vezanje svakog od peptida.

Termodinamički parametri za vezanje peptida ETGE na domenu Kelch određeni ITC-om i uspoređeni s izračunatim na temelju MD simulacija, odgovaraju podacima dostupnim u literaturi za ITC mjerenja s peptidima NRF2 s motivima DLG i ETGE⁴² i peptidima drugih proteina koji se vežu na KEAP1⁴³.

Izračunate vrijednosti termodinamičkih parametara ukazuju na značajan doprinos elektrostatskih interakcija u vezanju peptida na domenu Kelch, što je u skladu sa strukturnim

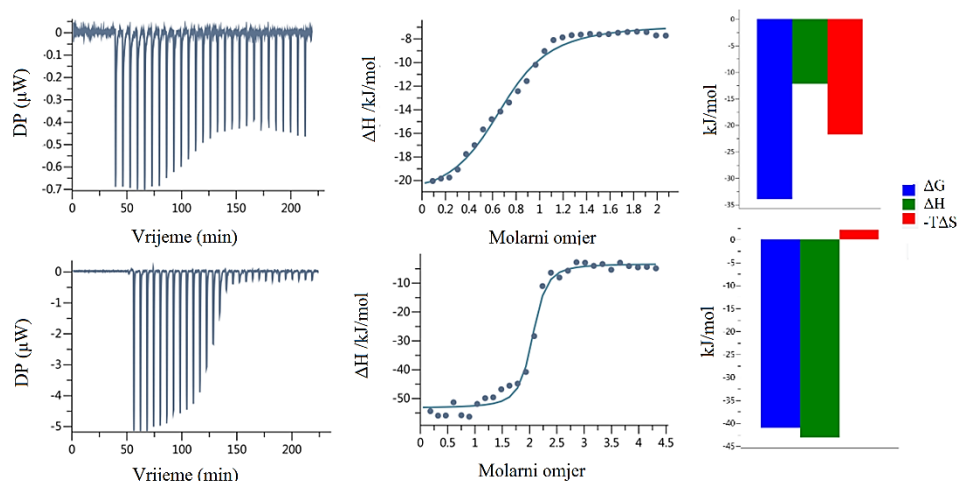
analizama koje pokazuju velik broj veza među argininskim ostacima domene Kelch i glutamatima iz motiva ETGE.

Uočena je značajna razlika u stehiometriji (N) od ~50 % prilikom vezanja kraćeg i duljeg peptida, što može biti posljedica razlike u određivanju koncentracije peptida. Za kraći peptid, koji ne sadrži triptofanske ostatke, nije bilo moguće odrediti koncentraciju mjerenjem apsorbancije BioDropom kao za protein i dulji peptid, te je korištena koncentracija prema izračunu proizvođača za otopinu liofiliziranog peptida. S obzirom da sekundarno mjesto vezanja peptida nije uočeno u kristalografskoj strukturi, malo je vjerojatno da ova razlika u stehiometriji ukazuje na specifičnu interakciju peptida s drugim veznim mjestom na domeni Kelch.

4.11. ITC mjerenja vezanja Kelch – DPP III

Termodinamička analiza vezanja DT Kelch – DPP III provedena je mjerenjima ITC tako da su uzorci proteina s His-privjescima pročišćeni afinitetnom kromatografijom i odsoljeni u pufer istog sastava, 20 mM Tris, pH=7,5, te ukoncentrirani do željenih koncentracija za eksperimente. Mjerenja su izvedena na uređaju VP-ITC na način da je u prvom slučaju domena Kelch u ćeliji (koncentracije ~ 20 μ M) titrirana proteinom DPP III (koncentracije ~ 200 μ M), a u drugom slučaju DPP III u ćeliji (koncentracije ~ 20 μ M) titrirana domenom Kelch (koncentracije ~ 200 μ M).

Reprezentativni rezultati (slika 49), izmjereni su u duplikatu te se na temelju njih može zaključiti da je vrijednost K_d za vezanje Kelch – DPP III reda veličine 10^{-6} M. Kada se usporede termodinamički parametri za titraciju domene Kelch proteinom DPP III s onima za titraciju zasebnom petljom ETGE, uočava se da su u slučaju protein-protein interakcija entalpijski i entropijski doprinosi negativni, što sugerira odvajanje motiva ETGE od tijela DPP III tijekom njenog vezanja na Kelch (slika 49). Odvajanje petlje ETGE od tijela DPP III, te istiskivanje vode prilikom njenog umetanja u vezno mjesto domene Kelch povećavaju entropiju vezanja. Dok je prvi korak entalpijski nepovoljan, doprinos drugog koraka znatno je povoljniji. Obrnuto, kada se DPP III u ćeliji titrira domenom Kelch, entalpijski doprinos je značajno povoljniji, a entropijski je doprinos zanemariv.

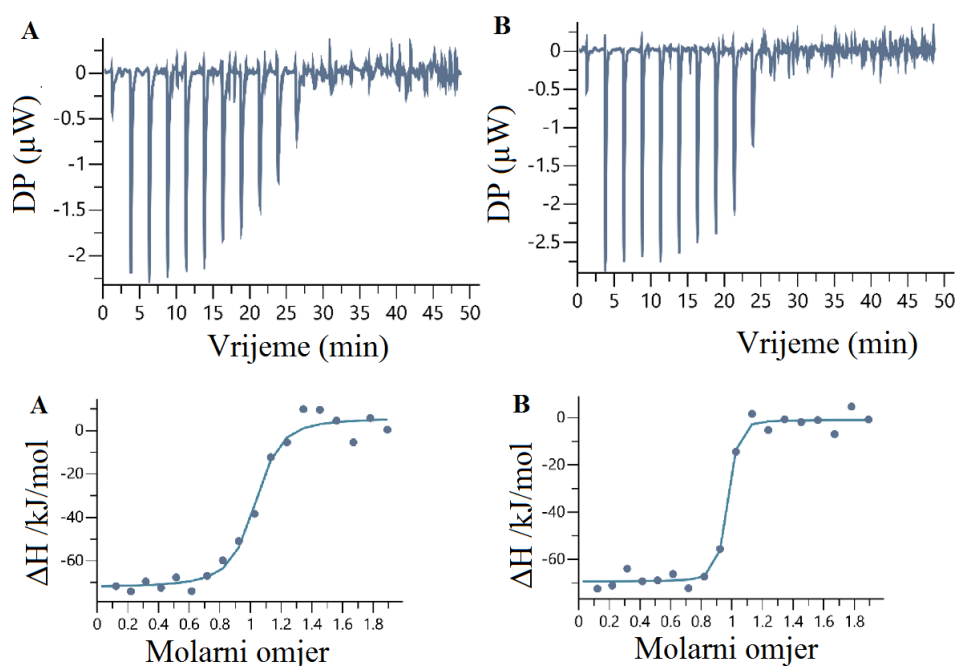


Slika 49. Titracijski podaci i izoterme vezanja najuspješnijih mjerenja titracije domene Kelch u ćeliji proteinom DPP III (gore), te DPP III u ćeliji domenom Kelch (dolje).

Ispitani su različiti uvjeti mjerenja interakcija, no nismo uspjeli replicirati rezultate mjerenja ITC za vezanje Kelch – DPP III u triplikatima, zbog velikih promjena u baznoj liniji tijekom titracija. To je pripisano mogućnosti da domena Kelch stvara dimere ili multimere te da proteini agregiraju tijekom dugotrajnog mjerenja uz miješanje u ćeliji. No moguće je i da postoji više koraka u procesu vezanja, za koje nije moguće odrediti pojedinačne termodinamičke parametre. Zbog nemogućnosti da se sa sigurnošću utvrdi razlika u vezanju različitih varijanti proteina, ovom metodom nisu mjerene interakcije s mutiranim varijantama.

4.12. Proučavanje utjecaja mutacija domene Kelch na vezanje peptida ETGE ITC-om

Mjerenja vezanja peptida na varijante Kelch s mutacijama R326D i R470C, u kojima su mutacije na površini proteina suprotnoj od veznog mjesta, su provedena na uređaju PEAQ-ITC s peptidom od 24 ak (slika 50).



Slika 50. Sirovi titracijski podaci (gore) i titracijske krivulje (dolje) za vezanje Kelch – peptid ETGE DPP III 24 ak za varijante Kelch A)R326D i B)R470C.

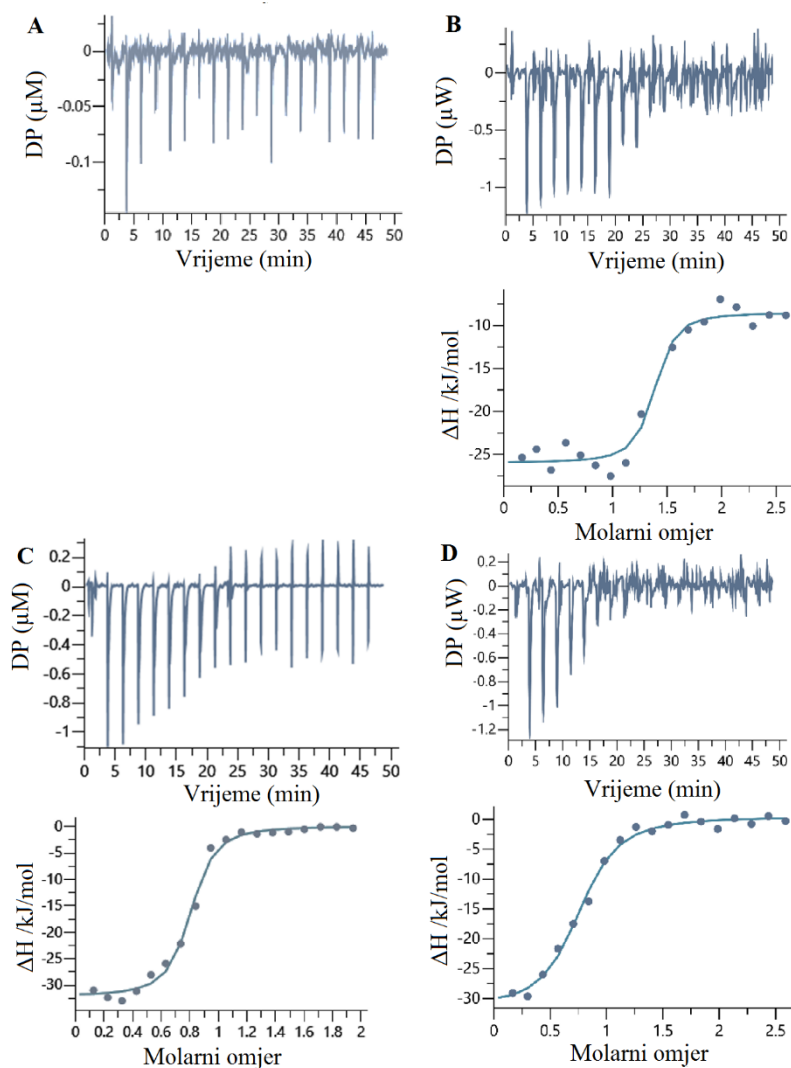
Za varijantu R470C nije uočena razlika u afinitetu vezanja u odnosu na DT domene Kelch, dok se varijanta R326D veže za red veličine slabije od DT proteina (tablica 20).

Tablica 20. Srednje vrijednosti termodinamičkih parametara sa standardnim devijacijama, određenim na uređaju PEAQ-ITC za 3 mjerenja ITC, titracijom proteina Kelch divljeg tipa i varijanti s mutacijama R326D i R470C peptidom ETGE DPP III od 24 ak. Korišten je model za jedno vezno mjesto.

	DT	R326D	R470C
K_d (mol dm ⁻³)	$(3,3 \pm 2,5) \times 10^{-8}$	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^{-7}$	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^{-8}$
N	1,05	0,98	0,91
$\Delta_r H$ (kJ mol ⁻¹)	$-72,5 \pm 6,2$	$-76,8 \pm 0,9$	$-67,2 \pm 0,6$
$\Delta_r G$ (kJ mol ⁻¹)	$-43,4 \pm 1,9$	$-39,4 \pm 0,4$	$-45,3 \pm 0,2$
$-T\Delta_r S$ (kJ mol ⁻¹)	$29,1 \pm 6,0$	$37,4 \pm 0,4$	$22,0 \pm 1,3$

Mjerenja s varijantama domene Kelch s mutacijama G333C, R415C, G480W i Y525C, u kojima se mutacije nalaze blizu veznog mjesta, su provedena ITC-om s peptidom ETGE-DPP III od 11 ak (slika 51).

Za varijantu G333C nije bilo moguće odrediti titracijsku krivulju i termodinamičke parametre, te se može zaključiti da ne dolazi do vezanja ili je ono vrlo slabo. Mutacije R415C i Y525 također znatno povećavaju K_d , za približno dva reda veličine, dok je najmanji utjecaj mutacije G480W, koja povećava K_d za red veličine u odnosu na DT domene Kelch (tablica 21).



Slika 51. Rezultati ITC mjerenja vezanja peptida ETGE DPP III za varijante Kelch A) G333C, B) R415C, C) G480W i D) Y525C. Za varijantu G333C nije izmjereno vezanje te su prikazani sirovi titracijski podaci, dok su za ostale varijante, za koje je izmjereno vezanje, dane krivulje vezanja.

Tablica 21. Vrijednosti K_d sa standardnom devijacijom određene iz 3 mjerenja na PEAQ ITC-u, titracijom proteina Kelch divljeg tipa i mutiranih varijanti peptidom ETGE DPP III od 11 ak. Korišten je model za jedno vezno mjesto. (NV-nema vezanja)

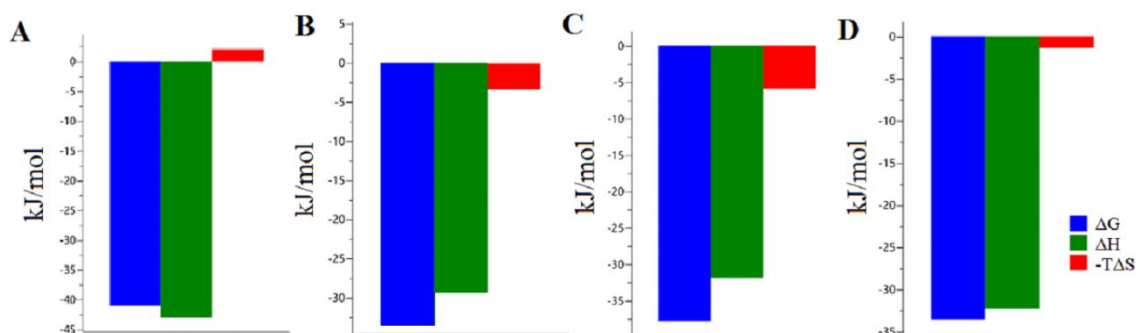
	DT	G333C	R415C	G480W	Y525C
K_d (mol dm ⁻³)	$(5,7 \pm 0,8) \times 10^{-8}$	NV	$(3,4 \pm 3,4) \times 10^{-6}$	$(1,8 \pm 0,6) \times 10^{-7}$	$(1,2 \pm 0,3) \times 10^{-6}$

Za 3 mutirane varijante Kelch u blizini aktivnog mjesta koje imaju najveći utjecaj na K_d izračunati su termodinamički doprinosi za proces vezanja peptida ETGE DPP III (tablica 22) i histogrami su uspoređeni s histogramom za DT proteina (slika 52).

Tablica 22. Vrijednosti termodinamičkih parametara za vezanje peptida ETGE DPP III od 11 ak na varijante domene Kelch s točkastim mutacijama.

	R415C	G480W	Y525C
$\Delta_r H / \text{kJ mol}^{-1}$	$-29,1 \pm 10,3$	$-32,2 \pm 0,3$	$-31,5 \pm 4,2$
$\Delta_r G / \text{kJ mol}^{-1}$	$-33,2 \pm 4,7$	$-38,7 \pm 1,0$	$-33,9 \pm 0,7$
$-T\Delta_r S / \text{kJ mol}^{-1}$	$-4,0 \pm 14,6$	$-6,5 \pm 0,6$	$-2,3 \pm 4,9$

Može se uočiti da sve 3 mutacije imaju entalpijski nepovoljan učinak na vezanje (povećanje entalpije vezanja $\sim 10 \text{ kJ mol}^{-1}$ u odnosu na DT), dok je entropijski učinak mutacija na vezanje Kelch – peptid ETGE potencijalno blago pozitivan. To se najviše uočava kod mutacije G480W, dok je za varijante s mutacijama R415C i Y525C, koje se nalaze u samom veznom mjestu za petlju ETGE te sudjeluju u interakcijama s njom, dobivena vrlo velika vrijednost pogreške te nije moguće ustanoviti razliku u odnosu na DT.



Slika 52. Histogrami termodinamičkih parametara za A)DT i mutirane varijante domene Kelch B)R415C, C)G480W i D)Y525C.

4.13. Proučavanje utjecaja mutacija domene Kelch na afinitet vezanja Kelch – DPP III MST-om

Metodom MST ispitani su afiniteti vezanja DT i mutiranih varijanti domene Kelch na obilježeni protein DPP III određivanjem vrijednosti K_d . Rezultati su prikazani u tablici 23.

Tablica 23. Vrijednosti konstante disocijacije, K_d , za vezanje DT i varijanti domene Kelch na obilježeni protein DPP III DT. Naveden je interval pouzdanosti K_d gdje je bilo moguće usporediti rezultate 3 mjerenja.

Kelch	K_d (mol dm ⁻³)
DT	$(1 \pm 0,3) \times 10^{-5}$
G333C	$\sim 2 \times 10^{-4}$
G480W	$(4 \pm 1,3) \times 10^{-6}$
R415C	$\sim 4 \times 10^{-8}$
Y525C	$\sim 6 \times 10^{-5}$

Za varijantu G480W uočeno je nešto povoljnije vezanje nego za domenu Kelch divljeg tipa u 3 ponavljanja. To je u skladu je s pretpostavkom na temelju simulacija MD da dodatna interakcija koju uspostavlja supstituirani ostatak W480 u domeni Kelch s argininskim ostacima u strukturiranom dijelu DPP III može doprinijeti vezanju Kelch – DPP III.

Za varijantu G333C izmjerena je znatno viša vrijednost K_d , u odnosu na DT, odnosno uočeno je vrlo slabo vezanje na protein DPP III. Za varijantu Y525C također je izmjereno približno 6 puta slabije vezanje na DPP III nego za DT domene Kelch. Zbog slabog vezanja približne vrijednosti K_d su se mogle zaključiti samo iz jednog od 3 nezavisna mjerenja, dok je termoforetska promjena u ostalim ponavljanjima bila nedovoljna da se odredi vezna krivulja. Može se zaključiti da je interakcija preslaba da bi se pratila ovom metodom.

Vrijednost K_d za R415C određena u 2 ponavljanja znatno je niža od DT proteina, ali je praćena visokim omjerom šuma i signala, te se ne može tvrditi da je pouzdano procijenjena. Moguće je da nestabilnost ovih varijanti domene Kelch uočena DLS-om utječe na mjerenje interakcija MST-om.

4.14. Proučavanje utjecaja mutacija DPP III na afinitet vezanja Kelch – DPP III MST-om

Vezanje DT kao i mutiranih varijanti proteina DPP III na DT domene Kelch obilježene fluorescentnom bojom proučavano je fluorescencijskom promjenom uslijed vezanja na uređaju za MST, te su određene konstante disocijacije K_d (tablica 24).

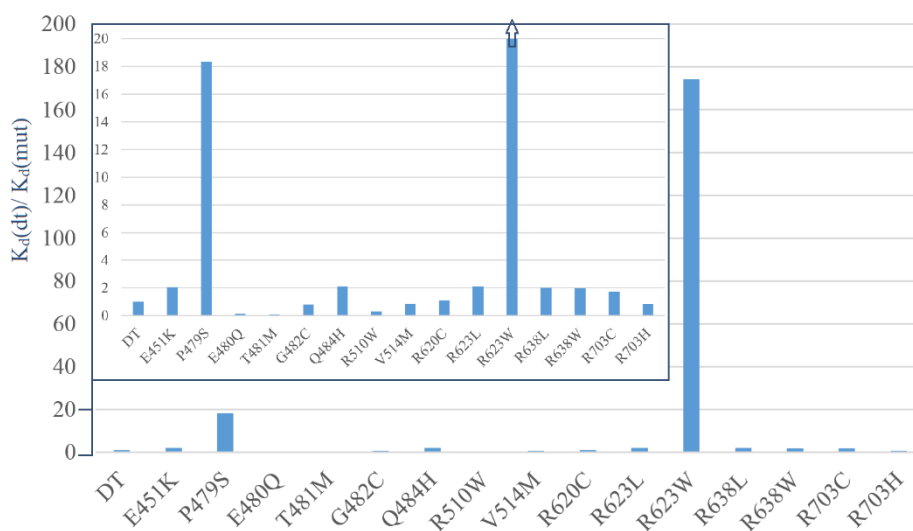
Tablica 24. Vrijednosti K_d za vezanje DPP III (DT i mutiranih varijanti)–Kelch izmjerene na temelju fluorescencijske promjene uslijed vezanja na uređaju Monolith NT.115. Mjerenja su provedena u triplikatima, te je također provedeno kontrolno mjerenje s varijantom DPP III s delecijom motiva ETGE. Prikazan je interval pouzdanosti K_d .

DPP III	K_d (mol dm ⁻³)
DT	$(8,3 \pm 1,1) \times 10^{-7}$
E451K	$(4,0 \pm 0,5) \times 10^{-7}$
P479S	$(4,5 \pm 4,9) \times 10^{-8}$
G482C	$(1,0 \pm 0,4) \times 10^{-6}$
Q484H	$(3,9 \pm 1,1) \times 10^{-7}$
R620C	$(7,5 \pm 1,9) \times 10^{-7}$
R623L	$(3,9 \pm 1,4) \times 10^{-7}$
R623W	$(4,7 \pm 18) \times 10^{-9}$
R638L	$(4,1 \pm 0,6) \times 10^{-7}$
R638W	$(4,1 \pm 0,5) \times 10^{-7}$
R703C	$(4,8 \pm 0,8) \times 10^{-7}$
R703H	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-6}$
Δ ETGE	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^{-5}$

Nakon ponovljenog obilježavanja domene Kelch i mjerenja promjene početne fluorescencije uslijed vezanja, vrijednost K_d za divlji tip DPP III bila je 4 puta niža, te su podaci mjerenja s novoobilježenim proteinom Kelch i DT te preostalim mutiranim varijantama DPP III dana u tablici 25. Iz navedenog razloga diskutiran je relativni utjecaj svih proučavanih mutacija na afinitet vezanja, prikazan u obliku omjera veličina $K_d(\text{DT})/K_d(\text{mut})$ (slika 53).

Tablica 25. Vrijednosti K_d za vezanje DPP III (DT i mutiranih varijanti)–Kelch izmjerene na temelju fluorescencijske promjene uslijed vezanja na uređaju Monolith NT.115. Mjerenja su provedena u triplikatima. Prikazan je interval pouzdanosti K_d .

DPP III	K_d (mol dm ⁻³)
DT	$(1,9 \pm 0,7) \times 10^{-7}$
E480Q	$(1,6 \pm 0,4) \times 10^{-6}$
T481M	$(2,3 \pm 0,4) \times 10^{-6}$
R510W	$(6,3 \pm 2,0) \times 10^{-7}$
V514M	$(2,3 \pm 0,9) \times 10^{-7}$



Slika 53. Histogramski prikaz omjera K_d određenih promjenom fluorescencije uslijed vezanja obilježene domene Kelch DT s DPP III DT i ispitivanim varijantama DPP III s točkastim mutacijama. Unutarnji histogram prikazuje izdvojenu regiju s omjerom 0-20 unutar kojeg su smještene vrijednosti većine varijanata.

Najveća razlika u odnosu na divlji tip uočena je za varijantu DPP III s mutacijom R623W, koja pokazuje preko 100 puta veći afinitet vezanja prema domeni Kelch u odnosu na divlji tip DPP III. Takav rezultat očekivan je na temelju pretpostavke da je R623 jedan od ostataka koji drže petlju ETGE DPP III, vezanom za tijelo proteina u slobodnom obliku, te da odvajanje petlje koje prethodi njenom vezanju na Kelch predstavlja ključan korak u ovom procesu.

Mutacija R623L, kao i R620C u drugom argininskom ostatku u blizini mjesta vezanja petlje ETGE na tijelo DPP III u slobodnom obliku, nije pokazala značajan učinak na K_d Kelch – DPP III. To se može objasniti redundancijom u argininskim ostacima koji mogu držati petlju vezanom, te pritom dolazi, kako je uočeno i u simulacijama MD, do zamjene argininskih ostataka koji ostvaruju interakcije kada je jedan od njih supstituiran. Stoga je u simulacijama spontano odvajanje petlje uočeno tek supstitucijom dvaju argininskih ostataka. U slučaju supstitucije R623W, kao što je uočeno tijekom simulacija MD, dolazi do steričkog ometanja primicanja ostalih arginina koji mogu interagirati s E480, te je utjecaj na odvajanje petlje, a time i povišenje afiniteta, izraženiji nego kod varijanti R623L i R620C.

Zamjetan je i utjecaj mutacije P479S, u prolinskom ostatku neposredno ispred motiva ETGE u petlji DPP III, na smanjenje K_d , približno za red veličine. U radu Cino i sur. 2013.⁴³ proučavano je kako različiti motivi mijenjaju afinitet vezanja proteina interaktora na KEAP1. Iako povoljnije vezanje nije predviđeno rezultatima molekuskog modeliranja, poznato je da protein NRF2, s najvišim poznatim afinitetom prema protein KEAP1 na položaju neposredno ispred motiva ETGE ima glutamat. Stoga bi ova supstitucija mogla djelovati na blago povećanje afiniteta zbog povoljne interakcije S479 s domenom Kelch na način sličan onom koji ostvaruje glutamatski ostatak na tom položaju kod proteina NRF2.

Izmjereni afinitet vezanja varijanti DPP III E480Q i T481M na Kelch za red veličine je slabije od onog divljeg tipa proteina. U usporedbi s rezultatom za varijantu DPP III s delecijom motiva ETGE, dobiveni afiniteti su ipak nešto veći, što ukazuje na nastajanje specifičnog kompleksa, ali sa znatno slabijim vezanjem, što je u skladu s prethodnim rezultatima native PAGE i DLS-a, kao i predviđanjima na temelju strukturnih analiza.

Ostale ispitivane mutacije ne pokazuju značajan učinak na promjenu afiniteta vezanja DPP III prema domeni Kelch proteina KEAP1. Među njima G482C, supstitucija unutar motiva ETGE, te R703H znatno udaljena od petlje ETGE DPP III, imaju nešto višu vrijednost K_d u odnosu na DT DPP III. Za supstituciju G482C može se pretpostaviti da bočni ogranak cisteina u odnosu na glicin negativno utječe na pozicioniranje motiva ETGE u veznom mjestu.

Osim R703H, mutacije koje se ne nalaze blizu petlje ETGE imaju nešto niže vrijednosti K_d . Među njima i varijanta E451K sa supstitucijom u katalitičkom mjestu DPP III koja dovodi do inaktivacije peptidazne aktivnosti. Stoga se može zaključiti da udaljeni elementi strukture, kao ni peptidaznog mjesta ne utječu značajno na vezanje DPP III na domenu Kelch proteina KEAP1.

§ 5. ZAKLJUČAK

Kombinacijom računalnih i eksperimentalnih metoda istražena je uloga mutacija DPP III i proteina KEAP1 na njihov međusobni afinitet (ili stabilnost njihovih kompleksa, točnije kompleksa DPP III i domene Kelch proteina KEAP1).

Vežanje DPP III za domenu Kelch ostvaruje se putem motiva ⁴⁸⁰ETGE⁴⁸³ koji se nalazi na petlji smještenoj na vrhu gornje domene DPP III. Struktura kompleksa domene Kelch s peptidom koji odgovara toj petlji određena je kristalografski (PDB ID: 6TG8) i molekulskim modeliranjem te je služila kao predložak za modeliranje kompleksa Kelch – DPP III u kojem domena Kelch sadrži potpunu sekvencu C-kraja.

Termodinamički parametri određeni za vežanje 11 i 24 ak dugih peptida ETGE na domenu Kelch, kao i K_d vrijednosti, 57 i 33 nM, odgovaraju podacima dostupnim u literaturi za ITC mjerenja s peptidom ETGE Nrf2 i peptidima drugih proteina s motivom ETGE/STGE.

Pomoću ubrzanih i klasičnih MD simulacija provedenih za divlji tip DPP III i njezine mutirane varijante, a u kombinaciji s eksperimentalnim mjerenjima afiniteta vežanja navedenih varijanti za domenu Kelch, pokazano je da je konformacijska promjena odvajanja petlje ETGE DPP III od tijela proteina ključna u procesu nastajanja kompleksa Kelch – DPP III. Naime da bi glutamati iz motiva ETGE uspostavili potrebne vodikove veze i elektrostatske interakcije s argininskim i serinskim ostacima domene Kelch nužno je odvajanje motiva ETGE od tijela proteina DPP III za koje se drži jakim intramolekularnim vodikovim vezama s argininskim ostacima R620, R623 te R624. Mutacije tih argininskih ostaka, uključujući varijantu pronađenu u tumorskom tkivu, R623W, rezultiraju lakšim otpuštanjem petlje ETGE i time pospješuju nastajanje kompleksa Kelch – DPP III.

U kompleksu, E480 iz motiva ETGE ostvaruje velik broj interakcija s aminokiselinama domene Kelch putem svog bočnog ogranka, pa supstitucijom E480Q one bivaju narušene. Za razliku, T481 ostvaruje interakcije s domenom Kelch uglavnom preko okosnice te supstitucija T481M ne narušava dominantne interakcije motiva ETGE s veznim mjestom Kelch-a. Time se mogu objasniti eksperimentalni rezultati koji su pokazali da se varijanta E480Q ne veže se na domenu Kelch proteina KEAP1, a da je interakcija varijante T481M vrlo slaba.

Mutacija P479S, u prolinskom ostatku neposredno ispred motiva ETGE u petlji DPP III, u eksperimentalnim mjerenjima blago povećava afinitet vezanja prema domeni Kelch, a udaljeni elementi strukture, kao ni peptidaznog mjesta ne utječu značajno na vezanje.

Varijante Kelch-a G333C, te R415C i Y525C koji se nalaze u veznom mjestu za petlju ETGE, vrlo se slabo vežu na protein DPP III, dok je za varijantu G480W određeno nešto povoljnije vezanje nego za domenu Kelch divljeg tipa. Modeliranje je pokazalo da W480 interagira s argininskim ostacima u strukturiranom dijelu DPP III te tako dodatno stabilizira kompleks Kelch – DPP III. Ovo saznanje daje novi strukturalni uvid u mehanizme kojima mutacije pronađene u tumorima mogu povećati specifični afinitet DPP III za vezanje na protein KEAP1.

§ 6. POPIS KRATICA

DPP III - dipeptidil-peptidaza III

KEAP1 - *Kelch-like ECH associated protein 1*

NRF2 - *Nuclear factor [erythroid-derived 2]-like 2 protein*

MD - molekulska dinamika

ASMD - ubrzana usmjerena molekulska dinamika (engl. *adaptive steered*)

MM-PBSA - Poisson-Boltzmanov model za računanje slobodne energije vezanja (engl. *molecular mechanics - Poisson-Boltzman surface area*)

SAXS - raspršenje X-zraka pod malim kutevima na molekulama u otopini (engl. *small angle X-ray scattering*)

ITC - izotermna titracijska kalorimetrija

MST - termoforeza na mikroskali (engl. *microscale thermophoresis*)

MM - molekularna mehanika

QM – kvantna mehanika

PDB – proteinska baza podataka (engl. *Protein Data Bank*)

ARE - elementi antioksidacijskog odgovora (engl. *antioxidant response elements*)

MM-GBSA poopćeni Bornov model za računanje slobodne energije vezanja (engl. *molecular mechanics - Generalized Born surface area*)

DT - divlji tip

DLS - dinamičko raspršenje svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*)

DTT - ditiotreitol

TCEP - tris(2-karboksietil)fosfin

SDS - natrijev dodecilsulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE - poliakrilamidna gel-elektroforeza u prisutnosti natrijeva dodecil-sulfata

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Chemical Bonds in Biochemistry. U: Freeman WH (ur.) *Biochemistry 5th Edition*, New York, 2002, NCBI Bookshelf, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22567/> (pristup 10. Rujan 2021).
 2. Florová P, Sklenovský P, Banáš P, Otyepka M. Explicit Water Models Affect the Specific Solvation and Dynamics of Unfolded Peptides While the Conformational Behavior and Flexibility of Folded Peptides Remain Intact. *J Chem Theory Comput.* 2010; 6(11):3569-3579.
 3. Monticelli L i Tieleman DP. Force Fields for Classical Molecular Dynamics. *Biomolecular Simulations.* 2012;197–213.
 4. Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije JGEM. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J Comput Chem.* 1997;18(12):1463-1472.
 5. van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP. A Brief Comparison Between *In Vivo* DNA Replication and *In Vitro* PCR Amplification. *Princ Tech Asp PCR Amplif.* 2008;9-15.
 6. Lui C, Cady NC, Batt CA. Nucleic Acid-based Detection of Bacterial Pathogens Using Integrated Microfluidic Platform Systems. *Sensors (Basel).* 2009;9(5):3713.
 7. QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual. www.genomics.agilent.com (pristup 10. Rujan 2021).
 8. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Purifying, Detecting, and Characterizing Proteins. Internetska objava 2000. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21589/> (pristup 10. Rujan 2021).
 9. His-tagged Proteins—Production and Purification | Thermo Fisher Scientific - HR. <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/his-tagged-proteins-production-purification.html> (pristup 10. Rujan 2021).
 10. RCSB PDB: Homepage. <https://www.rcsb.org/> (pristup 10. Rujan 2021).
 11. McPherson A, Gavira JA. Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallogr Sect F, Struct Biol Commun.* 2014;70(1):2.
 12. Mertens HD, Svergun D. Structural characterization of proteins and complexes using
-

- small-angle X-ray solution scattering. *J Struct Biol.* 2010;172(1):128-141.
13. Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev.* 2016;8(4):409.
 14. Circular Dichroism Spectroscopy - JASCO. <https://jascoinc.com/learning-center/theory/spectroscopy/circular-dichroism-spectroscopy/> (pristup 10. Rujan 2021).
 15. Heidari A. Novel experimental and three-dimensional (3D) multiphysics computational framework of michaelis-menten kinetics for catalyst processes innovation, characterization and carrier applications. 4(1):1-8.
 16. Berg JM, Tymoczko JL. The Michaelis-Menten Model Accounts for the Kinetic Properties of Many Enzymes U: Freeman WH (ur.) *Biochemistry 5th Edition*, New York, 2002, NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22430/> (pristup 10. Rujan 2021).
 17. Isothermal Titration Calorimetry | Biomolecular Interactions Analysis | Malvern Panalytical.
<https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/microcalorimetry/isothermal-titration-calorimetry> (pristup 10. Rujan 2021).
 18. Jerabek-Willemsen M, André T, Wanner R, Roth HM, Duhr S, Baaske P, Breitsprecher D. MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *J Mol Struct.* 2014;1077:101-113.
 19. User Starting Guide Monolith® NT.115.
https://www.isbg.fr/IMG/pdf/startingguide_nt115.pdf (pristup 10. Rujan 2021).
 20. Fukasawa KKM, Fukasawa KKM, 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.* 1999;38(26):8299-8303.
 21. Chen JM, Barrett AJ. Dipeptidyl-peptidase III. U: Barrett AJ, Woessner JF, Rawlings ND (ur.) *Handbook of Proteolytic Enzymes: Second Edition*. Vol 1. Elsevier Inc.; 2004:809-812.
 22. Baral PK, 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.* 2008;283(32):22316-22324.
 23. Kazazić S, Karačić Z, Sabljčić I, Agić D, Tomin M, Abramić M, Dadlez M, Tomić A, Tomić S. Conservation of the conformational dynamics and ligand binding within M49
-

- enzyme family. *RSC Adv.* 2018;8(24):13310-13322.
24. 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.* 2007;388(3):343-348.
25. Barrett AJ, Chen JM. *Dipeptidyl-Peptidase III*. U: Rawlings ND, Salvesen G (ur.) *Handbook of Proteolytic Enzymes: Third Edition*. Vol 1. Elsevier Ltd; 2013; 288: 1285-1289.
26. Bezerra GA, Dobrovetsky E, Viertlmayr R, Dong A, Binter A, Abramić M, Macheroux P, Dhe-Paganon S, Gruber K. Entropy-driven binding of opioid peptides induces a large domain motion in human dipeptidyl peptidase III. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(17):6525-6530.
27. Tomić A, Gonzalez M, Tomić S. The large scale conformational change of the human DPP III - substrate prefers the “closed” form. *J Chem Inf Model.* 2012; 52(6):1583-1594.
28. Tomić A, Berynskyy M, Wade RC, Tomić S. Molecular simulations reveal that the long range fluctuations of human DPP III change upon ligand binding. *Mol Biosyst.* 2015;11(11):3068-3080.
29. Špoljarić J, Salopek-Sondi B, Makarević J, Vukelić B, Agić D, Šimaga Š, Jajcanin-Jozić N, Abramić M. Absolutely conserved tryptophan in M49 family of peptidases contributes to catalysis and binding of competitive inhibitors. *Bioorg Chem.* 2009;37(3):70-76.
30. 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.* 2017;7(58).
31. 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.* 2016;18:27245-27256.
32. Prajapati SC, Chauhan SS. Dipeptidyl peptidase III: A multifaceted oligopeptide N-end cutter. *FEBS J.* 2011;278(18):3256-3276.
33. Šimaga Š, Babić D, Osmak M, Ilić-Forko J, Vitale L, Miličić D, Abramić M. Dipeptidyl peptidase III in malignant and non-malignant gynaecological tissue. *Eur J Cancer.* 1998;34(3):399-405.
-

-
34. Šimaga Š, Babić D, Osmak M, Šprem M, Abramić M. Tumor cytosol dipeptidyl peptidase III activity is increased with histological aggressiveness of ovarian primary carcinomas. *Gynecol Oncol.* 2003;91(1):194-200.
 35. Gamrekashvili J, Greten TF, Korangy F. Immunogenicity of necrotic cell death. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(2):273-283.
 36. He M, Mangiameli DP, Kachala S, Hunter K, Gillespie J, Bian X, Shen HCJ, Libutti SK. Expression signature developed from a complex series of mouse models accurately predicts human breast cancer survival. *Clin Cancer Res.* 2010;16(1):249-259.
 37. Chou HL, Yao CT, Su SL, Lee CY, Hu KY, Terng HJ, Shih YW, Chang YT, Lu YF, Chang CW, Wahlqvist ML, Wetter T, Chu CM. Gene expression profiling of breast cancer survivability by pooled cDNA microarray analysis using logistic regression, artificial neural networks and decision trees. *BMC Bioinformatics.* 2013;14.
 38. Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem.* 2009;284(20):13291-13295.
 39. Abed DA, Goldstein M, Albanyan H, Jin H, Hu L. Discovery of direct inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction as potential therapeutic and preventive agents. *Acta Pharm Sin B.* 2015;5(4):285-299.
 40. Dinkova-Kostova AT, Kostov RV, Canning P. Keap1, the cysteine-based mammalian intracellular sensor for electrophiles and oxidants. *Arch Biochem Biophys.* 2017;617:84-93.
 41. Kumar H, Kim IS, More SV, Kim BW, Choi DK. Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. *Nat Prod Rep.* 2014;31(1):109-139.
 42. Tong KI, Katoh Y, Kusunoki H, Itoh K, Tanaka T, Yamamoto M. Keap1 Recruits Neh2 through Binding to ETGE and DLG Motifs: Characterization of the Two-Site Molecular Recognition Model. *Mol Cell Biol.* 2006;26(8):2887-2900.
 43. Cino EA, Killoran RC, Karttunen M, Choy WY. Binding of disordered proteins to a protein hub. *Sci Rep.* 2013;3.
 44. Hast BE, Goldfarb D, Mulvaney KM, Hast MA, Siesser PF, Yan F, Hayes DN, Major MB. Proteomic analysis of ubiquitin ligase KEAP1 reveals associated proteins that inhibit NRF2 ubiquitination. *Cancer Res.* 2013;73(7):2199-2210.
-

-
45. Jaramillo M, Zhang D. The emerging role of the Nrf2–Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes Dev.* 2013;27:2179-2191.
 46. Taguchi K, Yamamoto M. The KEAP1–NRF2 System in Cancer. *Front Oncol.* 2017;7:1-11.
 47. Liu Y, Kern JT, Walker JR, Johnson JA, Schultz PG, Luesch H. A genomic screen for activators of the antioxidant response element. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(12):5205-5210.
 48. cBio Portal <http://www.cbioportal.org/> (pristup 10. Rujan 2021).
 49. Lu K, Alcivar AL, Ma J, Foo TK, Zywea S, Mahdi A, Huo Y, Kensler TW, Gatz ML, Xia B. NRF2 induction supporting breast cancer cell survival is enabled by oxidative stress-induced DPP3-KEAP1 interaction. *Cancer Res.* 2017;77(11):2881-2892.
 50. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal.* 2013;6(269):p11.
 51. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N. The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discov.* 2012;2(5):401-404.
 52. Case, David A., Betz, Robin, Cerutti, David. Cheatham, Thomas E. III, Darden, Tom, Duke, Robert E., Giese, T., Gohlke, Holger, Goetz, Andreas W., Homeyer, Nadine, Izadi, Saeed, Janowski, Pawel, Kaus, Joe, Kovalenko, Andriy, Lee, Taisung, LeGrand S, Lin, Charles, Luchko, Tyler, Luo, Ray, Madej, Ben, Mermelstein, Daniel, Merz, Kenneth M., Monard, Gerald, Nguyen, Nguyen, Hung T., Nguyen H, Omelyan, Igor, Onufriev, Alexey, Roe, Daniel R., Roitberg, Adrian, Sagui, Celeste, Simmerling, Carlos, Botello-Smith, Wesley, Swails, Jason, Walker, Ross C., Wang, Junmei, Wolf, Romain M., Wu, Xiongwu, Xiao, Li and Kollman PA. AMBER 2016. Internetska objava 2016.
 53. Maier JA, Martinez C, Kasavajhala K, Wickstrom L, Hauser KE, Simmerling C. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J Chem Theory Comput.* 2015;11(8):3696–3713.
 54. Tomić A, Horvat G, Ramek M, Agić D, Brkić H, Tomić S. New Zinc Ion Parameters Suitable for Classical MD Simulations of Zinc Metallopeptidases. *J Chem Inf Model.*
-

- 2019;59(8):3437–3453.
55. Joung IS, Cheatham TE. Determination of alkali and halide monovalent ion parameters for use in explicitly solvated biomolecular simulations. *J Phys Chem B*. 2008;112(30):9020–9041.
56. Ryckaert JP, Ciccotti G, Berendsen HJC. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J Comput Phys*. 1977;23(3):327-341.
57. Berendsen HJC, Postma JPM, Van Gunsteren WF, Dinola A, Haak JR. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys*. 1984;81:3684.
58. Loncharich RJ, Brooks BR, Pastor RW. Langevin dynamics of peptides: The frictional dependence of isomerization rates of N-acetylalanyl-N'-methylamide. *Biopolymers*. 1992;32(5):523-535.
59. Park S, Khalili-Araghi F, Tajkhorshid E, Schulten K. Free energy calculation from steered molecular dynamics simulations using Jarzynski's equality. *J Chem Phys*. 2003;119:3559.
60. Jarzynski C. Nonequilibrium equality for free energy differences. *Phys Rev Lett*. 1997;78:2690.
61. Bureau HR, Merz DR, HersHKovits E, Quirk S, Hernandez R. Constrained Unfolding of a Helical Peptide: Implicit versus Explicit Solvents. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127034.
62. Šali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*. 1993;234(3):779-815.
63. Télechéa, S., Rey, J., Stresing, V., Hervouet, S., Tufféry, P., Heymann D. SolyPep: a fast generator of soluble peptide. (*u pripremi*).
64. Matić S, Kekez I, Tomin M, Bogár F, Šupljika F, Kazazić S, Hanić M, Jha S, Brkić H, Bourgeois B, Madl T, Gruber K, Macheroux P, Matković-Čalogović D, Matovina M, Tomić S. Binding of dipeptidyl peptidase III to the oxidative stress cell sensor Kelch-like ECH-associated protein 1 is a two-step process. *J Biomol Struct Dyn*. Internetska objava 2020.
65. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC.
66. Case DA, Cheatham TE, Darden T, Gohlke H, Luo R, Merz Jr. KM, Onufriev A, Simmerling C, Wang B, Woods RJ. The Amber biomolecular simulation programs. *J*
-

- Comput Chem.* 2005;26(16):1668-1688.
67. Roe DR, Cheatham TE. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *J Chem Theory Comput.* 2013;9(7):3084–3095.
68. Miller BR, McGee TD, Swails JM, Homeyer N, Gohlke H, Roitberg AE. MMPBSA.py: An efficient program for end-state free energy calculations. *J Chem Theory Comput.* 2012;8(9):3314–3321.
69. Onufriev A, Bashford D, Case DA. Exploring Protein Native States and Large-Scale Conformational Changes with a Modified Generalized Born Model. *Proteins Struct Funct Genet.* 2004;55(2):383-394.
70. DichroWeb - Online Circular Dichroism Analysis.
<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml> (pristup 2. Lipanj 2021.)
71. Whitmore L, Wallace BA. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers.* 2008;89(5):392-400.
72. Špoljarić J, Tomić A, Vukelić B, Salopek-Sondi B, Agić D, Tomić S. Human Dipeptidyl Peptidase III: the Role of Asn406 in Ligand Binding and Hydrolysis. *Croat Chem Acta.* 2011;84(2):259-268.
73. Sreerama N, Woody RW. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem.* 2000;287(2):252-260.
74. Abramić M, Šimaga Š, Osmak M, Čičin-Šain L, Vukelić B, Vlahoviček K, Dolovčak LJ. Highly reactive cysteine residues are part of the substrate binding site of mammalian dipeptidyl peptidases III. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(3):434-446.
75. GraphPad Prism version 5.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, <https://www.graphpad.com>.
76. Origin, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA. <https://www.originlab.com/>
77. MO.Affinity Analysis v2.3 NanoTemper Technologies, Munich, Germany.
78. Gundić M, Tomić A, Wade RC, Matovina M, Karačić Z, Kazazić S i Tomić S. Human DPP III – Keap1 Interactions: A Combined Experimental And Computational Study. *Croat Chem Acta.* 2016; 89(2),217-228.
79. Bailey MH, Tokheim C, Porta-Pardo E, Sengupta S, Bertrand D, Weerasinghe A, Colaprico A, Wendl MC, Kim J, Reardon B, Ng PK, Jeong KJ, Cao S, Wang Z, Gao J,
-

- Gao Q, Wang F, Liu EM, Mularoni L, Rubio-Perez C, Nagarajan N, Cortés-Ciriano I, Zhou DC, Liang WW, Hess JM, Yellapantula VD, Tamborero D, Gonzalez-Perez A, Suphavilai C, Ko JY, Khurana E, Park PJ, Van Allen EM, Liang H; MC3 Working Group; Cancer Genome Atlas Research Network, Lawrence MS, Godzik A, Lopez-Bigas N, Stuart J, Wheeler D, Getz G, Chen K, Lazar AJ, Mills GB, Karchin R, Ding L. Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. *Cell*. 2018;173(2):371-385.e18.
80. Hast BE, Cloer EW, Goldfarb D, Li H, Siesser PF, Yan F, Walter V, Zheng N, Hayes DN, Majoret MB. Cancer-derived mutations in KEAP1 impair NRF2 degradation but not ubiquitination. *Cancer Res*. 2014;74(3):808-817.
81. Hörer S, Reinert D, Ostmann K, Hoevels Y, Nar H. Crystal-contact engineering to obtain a crystal form of the Kelch domain of human Keap1 suitable for ligand-soaking experiments. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2013;69(6):592-596.
-

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

Ime i prezime	Sara Matić
Datum i mjesto rođenja	09.07.1991., Zagreb

Radno iskustvo

Datum	16.12.2016.-
Mjesto	Zagreb, Hrvatska
Ustanova	Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Laboratorij za biokemiju proteina i molekulsko modeliranje
Radno mjesto	Asistent

Obrazovanje

Diplomski studij molekularne biologije

Datum	26.09.2013. – 29.06.2016.
Mjesto	Zagreb, Hrvatska
Ustanova	Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Zvanje	Magistra molekularne biologije (mag. mol. biol.)

Preddiplomski studij molekularne biologije

Datum	12.07.2010 – 13.09.2013.
Mjesto	Zagreb, Hrvatska
Ustanova	Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Zvanje	Sveučilišna prvostupnica (baccalaurea) molekularne biologije

Stručno usavršavanje

Boravak na TU Graz u grupi prof. Karla Grubera u sklopu bilateralne suradnje s Republikom Austrijom

Datum 02.05.2017. – 31.05.2017.
Mjesto Graz, Austrija
Ustanova Technische Universitat Graz

Istraživanje interakcija ionskih tekućina s makromolekulama računalnim metodama (ERASMUS+ traineeship)

Datum 01.11.2015. – 01.04.2016.
Mjesto Nove Hrad, Czech Republic
Ustanova Center for Nanobiology and Structural Biology

Radovi u časopisima

Blagojević B, Agić D, Serra AT, Matić Sara, Matovina M, Bijelić S, Popović BM. An *in vitro* and *in silico* evaluation of bioactive potential of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) extracts rich in polyphenols and iridoids. *Food chemistry*. 2021;335:127619, 8.

Stepanić V, Matić S, Amić A, Lučić B, Milenković Dejan, Marković Z. Effects of conjugation metabolism on radical scavenging and transport properties of quercetin – *In silico* study. *Journal of molecular graphics & modelling*. 2019;86:278-285.

Matić S, Jadrijević-Mladar Takač M, Barbarić M, Lučić B, Gall Trošelj K, Stepanić V. The Influence of In Vivo Metabolic Modifications on ADMET Properties of Green Tea Catechins-*In Silico* Analysis. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2018;107(11):2957-2964.

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 Advances*. (2017), 7(58); 36326-36334.

Harifi-Mooda AR, Ghobadi R, Matić S, Minofar B, Ćeha D. Solvation analysis of some Solvatochromic probes in binary mixtures of reline, ethaline, and glyceline with DMSO. *Journal of molecular liquids*. 2016;222:845-853.

Borthakur P, Boruah PK, Hussain N, Sharma B, Das MR, Matić S, Ćeha D, Minofar B. Experimental and Molecular Dynamics Simulation Study of Specific Ion Effect on the Graphene Oxide Surface and Investigation of the Influence on Reactive Extraction of Model Dye Molecule at Water–Organic Interface. *Journal of physical chemistry. C* .2016;120(26):14088-14100.

Radovi u postupku objavljivanja

Matić S, Kekez I, Tomin M, Bogár F, Šupljika F, Kazazić S, Hanić M, Jha S, Brkić H, Bourgeois B, Madl T, Gruber K, Macheroux P, Matković-Čalogović D, Matovina M, Tomić S. Binding of dipeptidyl peptidase III to the oxidative stress cell sensor Kelch-like ECH-associated protein 1 is a two-step process. *J Biomol Struct Dyn*. Internetska objava 2020.

Znanstveni skupovi i radionice

Matić S, Kekez I, Hanić M, Šupljika F, Matovina M, Tomić S. Mutations found in cancer affect DPP III - KEAP1 interactions. The 45th FEBS Congress, 2021, Virtual (međunarodni, postersko priopćenje)

Matić S, Tomin M, Hanić M, Matovina M, Tomić S. DPP III mutations affect its binding to KEAP1. FEBS-INSTRUCT-MOBIEU advanced course, 2020, Institut de Biologie Structurale (IBS), Grenoble, Francuska (međunarodni, postersko priopćenje)

Matić S, Tomin M, Kekez I, Hanić M, Matovina M, Tomić S. Uloga dipeptidil-peptidaze III u oksidacijskom stresu. Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, 2020, Prirodoslovno-matematički fakultet-Kemija, Zagreb, Hrvatska (domaći, usmeno priopćenje)

Dynamic Biosensors, 2019, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska (domaći, bez priopćenja)

Matić S, Matovina M, Šupljika F, Crnolatac Ivo, Tomić S. Karakterizacija interakcija DPP III s domenom Kelch proteina Keap1 - računalni i eksperimentalni pristup. Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a 2019. 2019, Prirodoslovno-matematički fakultet-Kemija, Zagreb, Hrvatska (domaći, postersko priopćenje)

Matić S, Matovina M, Šupljika F, Crnolatac Ivo, Tomić S. Karakterizacija interakcija DPP III s domenom Kelch proteina Keap1 - računalni i eksperimentalni pristup. 26th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers, 2019, Solaris Šibenik, Šibenik, Hrvatska (međunarodni, postersko priopćenje)

Microcal user meeting & workshop, 2018, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, Hrvatska (domaći, bez priopćenja)

12th NanoTemper Technologies Symposium & Workshop- East, 2018, Life Sciences Park JCI, Krakow, Poljska (međunarodni, bez priopćenja)

Radionica NanoTemper, 2018, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska (domaći, bez priopćenja)

Foundation skills for HPC in computational biomolecular research – BioExcel, 2017, Wellcome Genome Campus Hinxton, Hinxton, Ujedinjeno Kraljevstvo (međunarodni, bez priopćenja)

Matić S, Matovina M, Tomić S. Exploring the effect of mutations on interactions between Keap1 and DPP III by MD simulations. Integrating genomics and biophysics to comprehend functional genetic variation. 2017, University of Turin Palazzo del Rettorato, Torino, Italija (međunarodni, postersko priopćenje)

Matić S, Karačić Z, Gruber K, Tomić S. Combination of SAXS and molecular modeling in structure-function characterization of the plant DPP III orthologue. 7th visegrad symposium on structural systems biology, 2017, Center for Nanobiology and Structural Biology, Nove Hrad, Češka Republika (međunarodni, postersko priopćenje)
