Molekulsko modeliranje bakterijskih dipeptidil-peptidaza III

Tomin, Marko

Doctoral thesis / Disertacija

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:561583

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Marko Tomin

Molekulsko modeliranje bakterijskih dipeptidil-peptidaza III

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Marko Tomin

Molecular modelling of bacterial dipeptidyl-peptidases III

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Marko Tomin

Molekulsko modeliranje bakterijskih dipeptidil-peptidaza III

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Dr. sc. Sanja Tomić

Zagreb, 2018.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Marko Tomin

Molecular modelling of bacterial dipeptidyl-peptidases III

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Dr. sc. Sanja Tomić

Zagreb, 2018

Ova disertacija izrađena je u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju te kasnije Laboratoriju za biokemiju proteina i molekulsko modeliranje Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Sanje Tomić u sklopu Sveučilišnog doktorskog studija kemije pri Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.
Računi su izvedeni na radnim stanicama u sklopu Laboratoriju za biokemiju proteina i molekulsko modeliranje Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković, računalnom serveru Isabella te Hrvatskoj nacionalnoj mreži računala (CRO-NGI) u sklopu Sveučilišnog računskog centra Sveučilišta u Zagrebu (SRCE).

Iskreno zahvaljujem dr. sc. Sanji Tomić na pruženoj prilici i vodstvu tijekom izrade ove doktorske disertacije te na znanju koje mi je prenijela.

Zahvaljujem dr. sc. Mariji Abramić i dr. sc. Borislavu Kovačeviću na stručnim savjetima i znanju koje su mi uvijek rado prenosili.

Hvala dr. sc. Antoniji Tomić i dr. sc. Marini Grabar Branilović na mnoštvu savjeta, strpljenju i razumijevanju.

Na ustupanju kristalografski određenih struktura te pomoći pri interpretaciji istih zahvaljujem Igoru Sabljiću.

Svim članovima Laboratorija za kemijsku i biološku kristalografiju te Laboratorija za biokemiju proteina i molekulsko modeliranje puno hvala na ugodnoj radnoj atmosferi i prijateljskim odnosima.

Velika hvala mojim roditeljima i Sonji na ljubavi i podršci te svim mojim prijateljima koji su učinili ove godine zabavnijima.

Sadržaj

SAŽETAK ..... **IX**

ABSTRACT ..... **X**

§ 1. UVOD **1**

1.1. Cilj i opseg rada **1**

§ 2. LITERATURNI PREGLED **3**

2.1. Dipeptidil-peptidaza III **3**

2.1.1. DPP III iz Bacteroides thetaiotaomicron *8*

2.1.2. DPP III iz Caldithrix abyssi *10*

2.2. *Bacteroides thetaiotaomicron* **12**

2.3. Caldithrix abyssi **13**

2.4. Teorijska osnovica **13**

2.4.1. Računalna kemija *13*

2.4.2. Molekulsko-mehaničke metode *14*

2.4.3. Kvantno-mehaničke metode *15*

2.4.4. Molekulsko-dinamičke simulacije *20*

2.4.5. Račun Gibbsovih energija *27*

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO **30**

3.1. Simulacije slobodnog enzima *Bt*DPP III i Cys0 mutanta **30**

3.2. Simulacije kompleksa enzima *Bt*DPP III i C450S mutanta sa supstratima **32**

3.3. Simulacije kompleksa enzima *Bt*DPP III s inhibitorima **32**

3.4. Simulacije slobodnog enzima *Ca*DPP III **33**

3.5. Simulacije kompleksa enzima *Ca*DPP III sa supstratima **34**

3.6. Simulacije kompleksa enzima *Ca*DPP III s inhibitorima **34**

3.7. Parametri ubrzane molekulske dinamike **34**

3.8. Kvantno-mehanički račun mehanizma katalize *Bt*DPP III na modelnom sustavu **37**

3.9. Analiza rezultata **38**

3.9.1. Geometrijski parametri i vodikove veze *38*

3.9.2. Analiza glavnih komponenata *38*

3.9.3. MM-PBSA račun slobodne energije *39*

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA **40**

4.1. Struktura i dinamika DPP III iz *Bacteroides thetaiotaomicron* **40**

4.1.1. Dinamika mutanta Cys0 ..... *53*
4.1.2. Vezanje liganada i supstratna specifičnost BtDPP III te utjecaj mutacije C450S *54*
4.1.3. Inhibicija BtDPP III *65*
4.2. Mehanizam katalize *Bt*DPP III na modelnom sustavu **69**
4.3. Struktura i dinamika DPP III iz *Caldithrix abyssi* **77**
4.3.1. HEISGH mutant i uloga pentapeptidnog motiva *84*
4.3.2. Vezanje liganada i supstratna specifičnost CaDPP III i HEISGH mutanta *87*
4.3.3. Inhibicija CaDPP III *93*
§ 5. ZAKLJUČAK **96**
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ (PREMA POTREBI) **98**
§ 7. LITERATURNI IZVORI **102**
§ 8. DODATAK ..... **XI**
§ 9. ŽIVOTOPIS ..... **XIV**

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

MOLEKULSKO MODELIRANJE BAKTERIJSKIH DIPEPTIDIL-PEPTIDAZA III

Marko Tomin
Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb

Dipeptidil-peptidaza III (DPP III) dvodomenski je protein, metalopeptidaza iz porodice M49, koja u aktivnom mjestu sadrži ion cinka te otcjepljuje dipeptide s N-kraja svojih supstrata. Fokus ove doktorske disertacije bilo je proučavanje strukture i dinamike dviju bakterijskih DPP III: iz mezofila *Bacteroides thetaiotaomicron* i iz termofila *Caldithrix abyssi*, te njihovih kompleksa sa sintetičkim supstratima i odabranim inhibitorima. Metodama molekulske dinamike izučavane su konformacijske promjene dugog dosega unutar enzima i pritom je ispitana uspješnost nekoliko polja sila u reproduciranju eksperimentalnih struktura i očekivanih gibanja. Usporedbom strukture i dinamike proteina iz termofilnog i mezofilnog mikroorganizma pružen je uvid u strukturnu osnovu za termalnu stabilnost DPP III iz *Caldithrix abyssi*. Određeni su biološki relevantni načini vezanja supstrata, odnosno inhibitora, što je omogućilo povezivanje supstratne specifičnosti i aktivnosti pojedinih ortologa sa strukturnim karakteristikama kompleksa i fleksibilnosti enzima. Dobiveni rezultati korišteni su za izradu modelnog sustava DPP III iz *Bacteroides thetaiotaomicron* koji je podvrgnut kvantno-mehaničkim računima te je predložen mehanizam hidrolize peptidne veze kataliziran od strane navedene peptidaze.

(124 stranice, 70 slika, 22 tablice, 141 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: dipeptidil-peptidaza III/DPP III/molekulska dinamika/supstratna specifičnost/termofil/mehanizam reakcije/peptidaza

Mentor: dr. sc. Sanja Tomić, znanstvena savjetnica, IRB, nasl. red. prof. PMF

Rad prihvaćen: 04. travnja 2018.

Ocjenitelji: Dr. sc. Branimir Bertoša, izv. prof., Prirodoslovno-matematički fakultet
Dr. sc. Zlatko Mihalić, red. prof., Prirodoslovno-matematički fakultet
Dr. sc. Marija Abramić,znanstvena savjetnica (u mirovini),Institut Ruđer Bošković
Dr. sc. David Matthew Smith, znanstveni savjetnik, Institut Ruđer Bošković

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

MOLECULAR MODELLING OF BACTERIAL DIPETIDYL PEPTIDASES III

Marko Tomin
Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb

Dipeptidyl peptidase III (DPP III) is a two-domain protein, a metallopeptidase from the M49 family which contains a zinc ion within its active site and cleaves dipeptides from the N-terminus of its substrates. The aim of this thesis was was to study the structure and flexibility of DPP III from the mesophilic bacterium *Bacteroides thetaiotaomicron* and the thermophile *Caldithrix abyssi* as well as their complexes with synthetic substrates and selected inhibitors. Several force fields have been tested in order to determine the most suitable one for studying the long-range conformational motions of the enzyme. Comparison of results obtained for a termophile with those of a mesophile revealed the structural reasons for thermal stability of DPP III from *Caldithrix abyssi*. The biologically relevant binding modes of substrates and inhibitors were identified and correlated with structural characteristics of the respective complexes, as well as with the enzyme flexibility. These results were used to build a model system of the *Bacteroides thetaiomicron* DPP III which was used in a quantum mechanics study in order to propose the reaction mechanism of the peptide bond hydrolysis.

(124 pages, 70 figures, 22 tables, 141 references, original in Croatian)

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

Keywords: dipeptidyl peptidase III/DPP III/molecular dynamics/substrate specificity/thermophile/reaction mechanism/peptidase

Supervisor: Dr. Sanja Tomić, Prof., Scientific Advisor, Ruđer Bošković Institute

Thesis accepted: April 4th 2018

Reviewers: Dr. Branimir Bertoša, Prof., Faculty of Science
Dr. Zlatko Mihalić, Prof., Faculty of Science
Dr. Marija Abramić, Scientific Advisor (retired), Ruđer Bošković Institute
Dr. David Matthew Smith, Scientific Advisor, Ruđer Bošković Institute

§ 1. UVOD

Dipeptidil-peptidaza III (DPP IIII) citosolni je enzim koji katalizira reakciju hidrolize peptidne veze te otcjepljuje dipeptide s N-kraja svojih supstrata. Prirodni supstrati su joj oligopeptidi duljine 3–10 aminokiselina.[1] Za njezinu katalitičku aktivnost neophodan je ion metala, te je prema bazi MEROPS uvrštena u obitelj metalopeptidaza M49.[2] Karakteristike porodice M49 su dva strukturna motiva, HEXXGH te EEXR(K)AE(D) odgovorna za koordinaciju metalnog iona, u prirodnim uvjetima iona cinka,[3] i hidrolizu peptidne veze.[4]

Određivanje kristalne strukture kvaščeve i humane DPP III pokazalo je da se taj protein sastoji od dvije domene odvojene širokim procjepom,[5-7] a mjesto za vezanje cinka nalazi se s unutarnje strane procjepa, u gornjoj domeni. Eksperimentalna i računalna istraživanja humane DPP III (hDPP III) pokazala su da je taj enzim podložan konformacijskim promjenama dugog dosega,[5,8-10] pri čemu dolazi do primicanja domena te formiranja podmjesta za vezanje supstrata. Ova vrlo izražena fleksibilnost enzima se smatra jednim od razloga široke supstratne specifičnosti dipeptidil-peptidazâ III.

O fiziološkoj ulozi DPP III trenutno nije poznato mnogo. Iako je *in vitro* dokazan afinitet prema pojedinim biološki aktivnim peptidima poput angiotenzina[11] enkefalina i endomorfina[12] u sisavaca, uloga *in vivo* ostaje nejasna. Povišene koncentracije enzima su pronađene u leđnoj moždini štakora, što sugerira moguću ulogu u regulaciji boli.[13] Iako su riješene kristalne strukture dviju bakterijskih, kvaščeve te DPP III iz gljive grmače,[6,7,14,15] o ulogama DPP III u ovim organizmima vrlo je malo poznato. Postojeće kinetičke i mutacijske analize ukazuju na važnost Cys450 za katalitičku aktivnost DPP III iz *Bacteroides thetaiotaomicron* (*Bt*DPP III).[16] Neke od aminokiselina čija je uloga u aktivnosti humanog ortologa neprijeporna očuvane su, potpuno ili djelomično, i u bakterijskim DPP III: Tyr318[10,17] (Tyr287 u *Bt*DPP III; Tyr242 u DPP III iz *Caldithrix abyssi*), Glu451 (Glu449 u *Bt*DPP; Glu380 u *Ca*DPP III) i His568 (His533 u u *Bt*DPP; His460 u *Ca*DPP III).

1.1. Cilj i opseg rada

Cilj ovog rada bio je, polazeći od kristalografski određenih struktura proteina, računalnim metodama detaljno istražiti strukturu i dinamiku dipeptidil-peptidaze III iz bakterija

Bacteroides thetaiotaomicron i *Caldithrix abyssi*, te način vezanja liganda u aktivno mjesto i njegov utjecaj na konformacijske promjene enzima. Usporedbom strukturnih i dinamičkih karakteristika *Ca*DPP III s karakteristikama enzima iz mezofilnih organizama, *Bt*DPP III i hDPP III pokušano je objasniti termalnu stabilnost *Ca*DPP III.

Konformacijske promjene dugog dosega proučavane su molekulsko-dinamičkim (MD) simulacijama s eksplicitnim tretiranjem svih atoma (eng. *all-atom MD*). Kako bi se učinkovitije pretražila ploha potencijalne energije promatranih sustava korištene su, pored konvencionalnih, i MD simulacije s dodanim potencijalom (eng. *accelerated MD*).[18] Ispitana je uspješnost nekoliko polja sila za opis *Bt*DPP III, te je njihova učinkovitost u uzorkovanju konformacijskog prostora kvantificirana analizom glavnih komponenata.

Metodama molekulskog uklapanja (eng. *docking*) nadopunjenim dugim MD simulacijama i računima afiniteta vezanja ispitani su načini vezanja supstrata i inhibitora u blizinu aktivnog mjesta *Bt*DPP III i *Ca*DPP III. Enzimska aktivnost i supstratna specifičnost navedenih enzima ispitana je eksperimentalno korištenjem sintetičkih supstrata, dipeptidilnih derivata 2-naftilamida,[7,16] te su navedeni spojevi korišteni i u računalnim studijama. Tako su proučeni kompleksi *Bt*DPP III s Arg_2-2-naftilamidom (RRNA) i Lys-Ala-2-naftilamidom (KANA), te kompleksi *Ca*DPP III s RRNA i Gly-Arg-2-naftilamidom (GRNA). Od inhibitora proučavani su tinorfin (Val-Val-Tyr-Pro-Trp) te, u slučaju *Bt*DPP III, hidroksamatni inhibitori Phe-Gly-NHOH i Tyr-Phe-NHOH. Vjerojatnost, a time i biološka relevantnost pojedinog način vezanja supstrata procijenjena je na temelju izračunatih slobodnih energija vezanja (MM-PBSA, engl. *Molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area*) pri čemu je pretpostavljeno da je entropijski doprinos za sve načine vezanja približno jednak. Kod usporedbe afiniteta vezanja srodnih supstrata pretpostavili smo da su razlike u doprinosu konformacijskoj entropiji zanemarive. Dobiveni rezultati uspoređeni su s postojećim kinetičkim mjerenjima.

Na osnovi rezultata simulacija kompleksa *Bt*DPP III s RRNA te poznate kristalne strukture zatvorene forme proteina konstruiran je modelni sustav na kojem je kvantno-mehaničkim metodama određen najvjerojatniji mehanizam reakcije. Model je obuhvatio aminokiselinske ogranke koji sudjeluju u koordinaciji iona cinka i prijenosu vode, odnosno stabiliziraju supstrat putem vodikovih veza. Kao minimalni (modelni) supstrat korišten je CH_3CO-Gly-NCH_3.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Dipeptidil-peptidaza III

Šezdesetih godina prošlog stoljeća opisana su četiri tipa dipeptidil-peptidaza koje hidroliziraju dipeptidilne derivate 2-naftilamina u sisavaca.[19] Do danas je broj dipeptidil-peptidaza narastao na jedanaest (naknadno je pokazano da se u slučaju DPP II i DPP VIII radi o istom enzimu[20]). Dipeptidil-peptdidaze su hidrolaze koje otcjepljuju dipeptide s N-kraja svojih supstrata (peptida). Prema supstratnoj specifičnosti, lokaciji unutar stanice te osjetljivosti na inhibitore razvrstane su u deset skupina (tablica 1).

Tablica 1. Sistematičan pregled poznatih dipeptidil-peptidazâ.

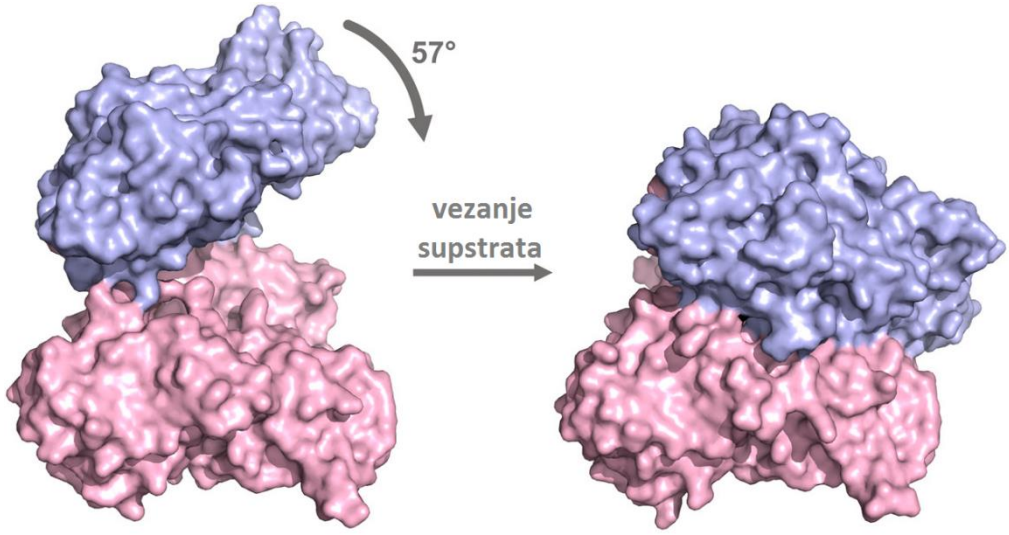
Naziv	Katalitički tip peptidaze	Lokacija u stanici
Dipeptidil-peptidaza I[21]	Cisteinska peptidaza	Lizosom
Dipeptidil-peptidaza II/VII[20]	Serinska peptidaza	Lizosom; citoplazmatske vezikule
Dipeptidil-peptidaza III[22]	Metalopeptidaza	Citoplazma
Dipeptidil-peptidaza IV[23]	Serinska peptidaza	Membrana
Dipeptidil-peptidaza V[24]	Serinska peptidaza	Periplazma
Dipeptidil-peptidaza VI[25]	Serinska peptidaza	Citoplazma; membrana; jezgra
Dipeptidil-peptidaza VIII[26]	Serinska peptidaza	Citoplazma
Dipeptidil-peptidaza IX[27]	Serinska peptidaza	Citoplazma; membrana
Dipeptidil-peptidaza X[28]	Serinska peptidaza	Membrana
Dipeptidil-peptidaza XI[29]	Serinska peptidaza	Nije definirana

Dipeptidil-peptidaza III prvi put je izolirana iz ekstrakta goveđe hipofize, gdje je identificirana na temelju specifične aktivnosti prema Arg_2-2-naftilamidu.[30] Pri otkriću pridan joj je naziv dipeptidil-arilamidaza III, dok su se kasnije koristili i termini dipeptidil-aminopeptidaza III i enkefalinaza B. Prema naputku Komisije za nomenklaturu Internacionalne unije za biokemiju i molekularnu biologiju od 1992. godine se koristi naziv dipeptidil-peptidaza III.

Na temelju očuvanih pet karakterističnih aminokiselinskih slijedova[31] danas je uvrštena u obitelj metalopeptidaza M49 prema MEROPS bazi podataka. Među ovim sljedovima posebno se ističu heksapeptidi HEXXGH te EEXR(K)AE(D) koji sadrže aminokiselinske ogranke odgovorne za vezanje iona cinka u aktivnom mjestu te su nužni za katalitičku aktivnost.[31,32] Enzimska aktivnost DPP III ovisna je o prisutnosti dvovalentnog metalnog kationa. U prirodnim uvjetima to je ion cinka, a dodavanjem iona kobalta aktivnost enzima znatno se povećava.[1,22] Zanimljivo je da, pored kelirajućih, sulfhidrilni reagensi vrlo učinkovito inhibiraju DPP III, što sugerira važnost –SH skupina u katalizi.[22,30,33,34] Ciljanom mutagenezom identificirani su cisteinski ostaci čija modifikacija uzrokuje inaktivaciju štakorske[35] te ljudske DPP III.[36,37]

Osim u goveđoj hipofizi, DPP III je pronađena i u drugim tkivima sisavaca: mozgu i jetri štakora,[11,33] svinjskim mišićima,[38,39] ljudskoj posteljici,[34] leći[40] i eritrocitima,[22] no nađena je i kod nižih eukariota (kvasac[41] i sluzava plijesan[42]). Analizom genoma utvrđena je prisutnost DPP III u mnogim bakterijskim organizmima. Do danas su vršena eksperimentalna istraživanja na rekombinantnoj DPP III iz *Bacteroides thetaiotaomicron,*[16] *Porphyromonas gingivalis*[43] i *Caldithrix abyssi*.[7] Kinetička mjerenja provedena korištenjem dipeptidil-2-naftilamida ukazuju na znatno manju aktivnost bakterijskih dipeptidil-peptidaza III u odnosu na humani ortolog,[7,16] pri čemu je aktivnost *Ca*DPP III najniža.

Do danas su kristalografski određene strukture ljudske DPP III, [5] DPP III iz kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*)[14], bakterija *Bacteroides thetaiotaomicron*[6] i *Caldithrix abyssi*[7] te iz gljive grmače (*Armillariella tabescens*)[15]. Sve strukture ukazuju da je DPP III monomer sastavljen od dvije domene: gornje (katalitičke) koja sadrži ion cinka te donje. Rješavanjem većeg broja struktura u slučaju hDPP III i *Bt*DPP III dokazano je postojanje tzv. "otvorene" forme proteina, u kojoj su domene odvojene procjepom, te "zatvorene" forme u kojima su one primaknute (slika 1).



Slika 1. Otvorena (lijevo) i zatvorena (desno) konformacija ljudske dipeptidil-peptidaze III. Slika je preuzeta iz rada Bezzere i suradnika.[5]

Molekulsko-dinamičkim simulacijama humane DPP III također je dokazano postojanje obje forme u otopini te prelazak otvorene forme u zatvorenu,[10] dok je kombinacijom molekulsko-dinamičkog i kvantno-mehaničkog pristupa zatvorena struktura identificirana kao katalitički aktivna.[44] Usporedbom dinamike slobodnog enzima i kompleksa utvrđena je razlika u načinu zatvaranja (prelaska otvorene u zatvorenu formu),[9] te da prisustvo liganda potiče zatvaranje enzima.[10]

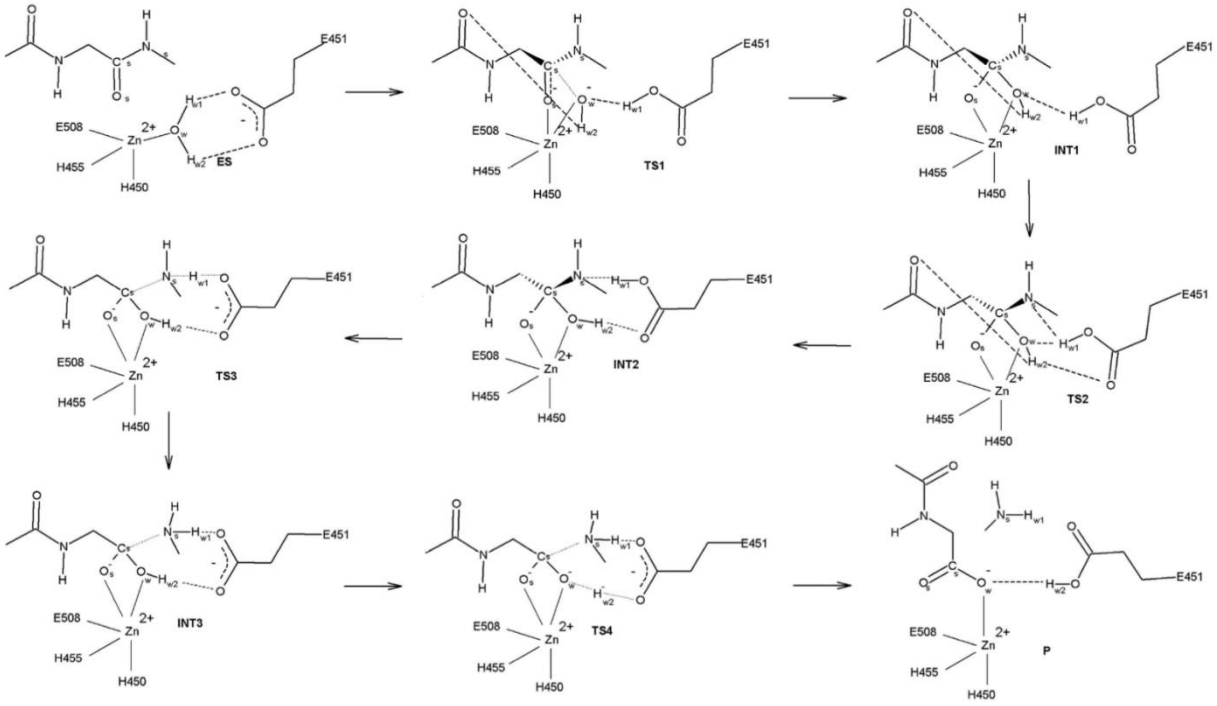
Predominantna pojavnost DPP III u citosolu stanica te široka supstratna specifičnost enzima upućuju na ulogu DPP III u završnim koracima unutarstaničnog katabolizma proteina.[1,22] Za DPP III iz sisavaca *in vitro* je pokazan afinitet za biološki aktivne peptide poput angiotenzina[11] i endomorfina[12], no *in vivo* uloga u njihovoj razgradnji nije potvrđena. Kod modularne hipertenzije kod miševa miševa u koje je injektirana DPP III zabilježena je razgradnja angiotenzina II bez većih nuspojava,[45] što DPP III čini potencijalno važnim u tretiranju povišenog krvnog tlaka (hipertenzije). Osim toga, zbog pojačane ekspresije u karcinomom zahvaćenim tkivima, smatra se i potencijalnim biomarkerom za pojedine vrste raka, poglavito jajnika i maternice u ljudi.[46,47] Iako je uočena korelacija povećane razine DPP III tijekom kataraktogeneze u štakora, nije jasno postoji li uzročno-posljedična veza.[48]

Novija istraživanja upućuju na ulogu dipeptidil-peptidaze III u obrani od oksidativnog stresa preko signalnog puta Nrf2–Keap1,[49,50] a pokusi na miševima podvrgnutim oksidativnom stresu sugeriraju migraciju DPP III u jezgru stanice.[51] Interakcija DPP III i proteina Keap1 odvija se preko očuvanog motiva ETGE na površini DPP III, prisutnog kod DPP III sisavaca. Prajapati i

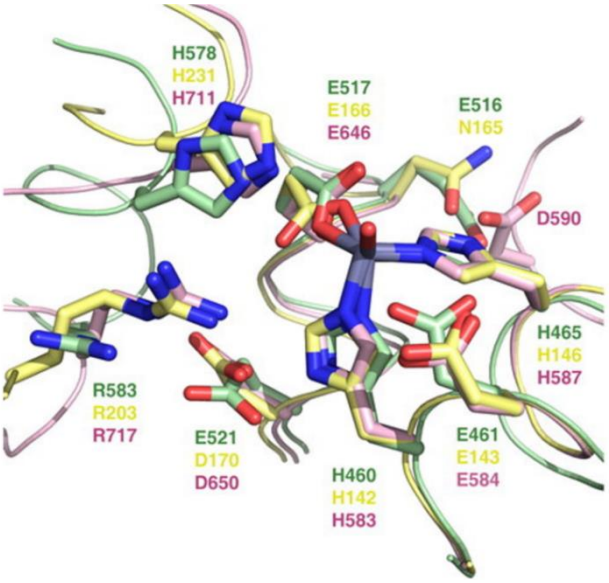
suradnici sugerirali su ulogu humane DPP III i u regulaciji razine iona kalcija u organizmu.[52] Predloženi mehanizam djelovanja pretpostavlja interakciju hDPP III s receptorom AT1R.

Fiziološka uloga dipeptidil-peptidaze III u bakterija za sada nije poznata. Skorašnja istraživanja upućuju na važnost DPP III za rast i virulenciju oralnog patogena *Porphyromonas gingivalis*. Ova asaharolitična bakterija koristi peptide kao izvor energije, čime cijeli niz dipeptidil-peptidaza postaje izrazito važan za razumijevanje njenog metabolizma.[53,54]

Mehanizam kojim dipeptidil-peptidaza III katalizira hidrolizu peptidne veze predložen je za humanu DPP III[4] (slika 2), pri čemu je kao polazište korištena pretpostavka o njegovoj sličnosti s već poznatim mehanizmom o cinku ovisne endopeptidaze termolizina.[55] Naime, usporedbom kristalnih struktura utvrđeno je da ostaci koji koordiniraju cink u termolizinu, kao i oni koji sudjeluju u nukleofilnom napadu molekule vode imaju svoje ekvivalente u ljudskoj DPP III (slika 3). Kod hDPP III voda se aktivira glutamatom Glu451 te dolazi do nukleofilnog napada molekule vode na karbonilni ugljik peptidne veze. Nakon formiranja C-O veze, dolazi do inverzije konfiguracije na dušikovom atomu, a nastanom dviju vodikovih veza sustav se "zaključava" u datoj konfiguraciji. Smatra se da je upravo ovaj korak ključan za enzimsku reakciju.[4] Inverziju slijedi protonacija dušikovog atoma te, naposljetku, otcjepljivanje amina (u slučaju modelnog supstrata).



Slika 2. Mehanizam hidrolize peptidne veze katalizirane humanom DPP III. ES označava kompleks enzim-supstrat, TS1 prijelazno stanje za nukleofilni napad, TS2 prijelazno stanje za za inverziju konfiguracije na dušikovu atomu i "zaključavanje" kompleksa u određenu konformaciju, nakon čega sustav spontano evoluira u konačno stanje. TS3 i TS4 iščezavaju nakon korekcije za energiju nulte točke, a opisuju reorganizaciju kompleksa i otcjepljivanje amina. INT1–INT3 su međuprodukti a P produkt. Preuzeto iz rada Tomić i suradnika.[4]

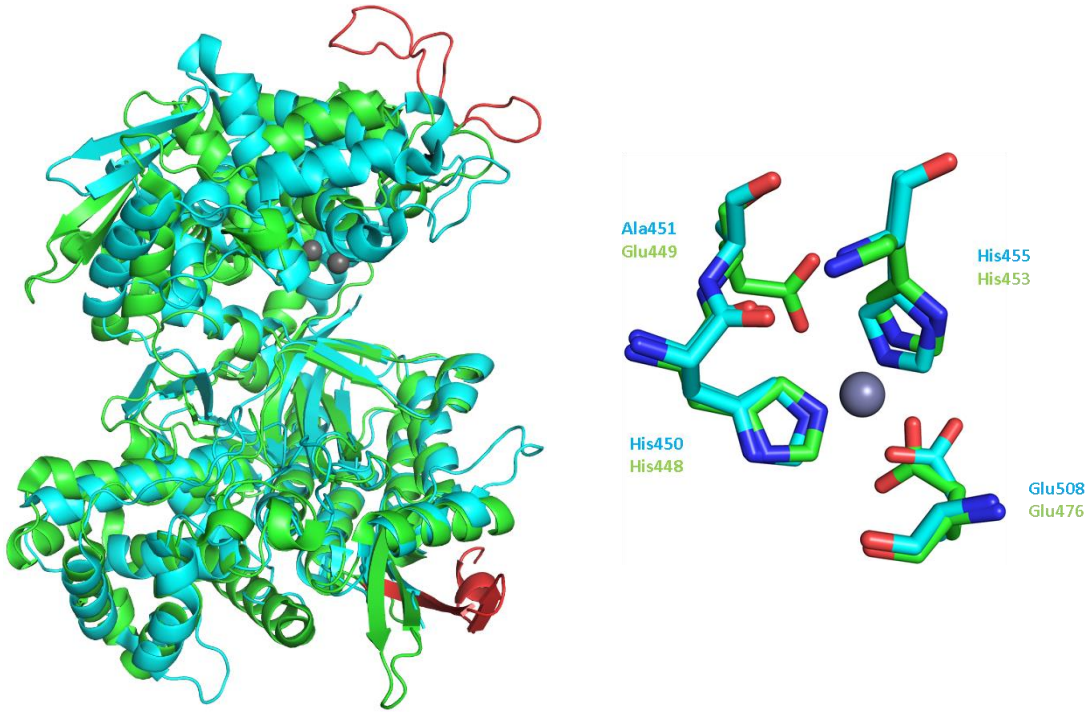


Slika 3. Preklopljene strukture mjesta za vezanje cinka kvaščeve DPP III (zeleno), termolizina (žuto) i neprilizina (ružičasto). Slika je preuzeta iz rada Barala i suradnika.[14]

2.1.1. DPP III iz Bacteroides thetaiotaomicron

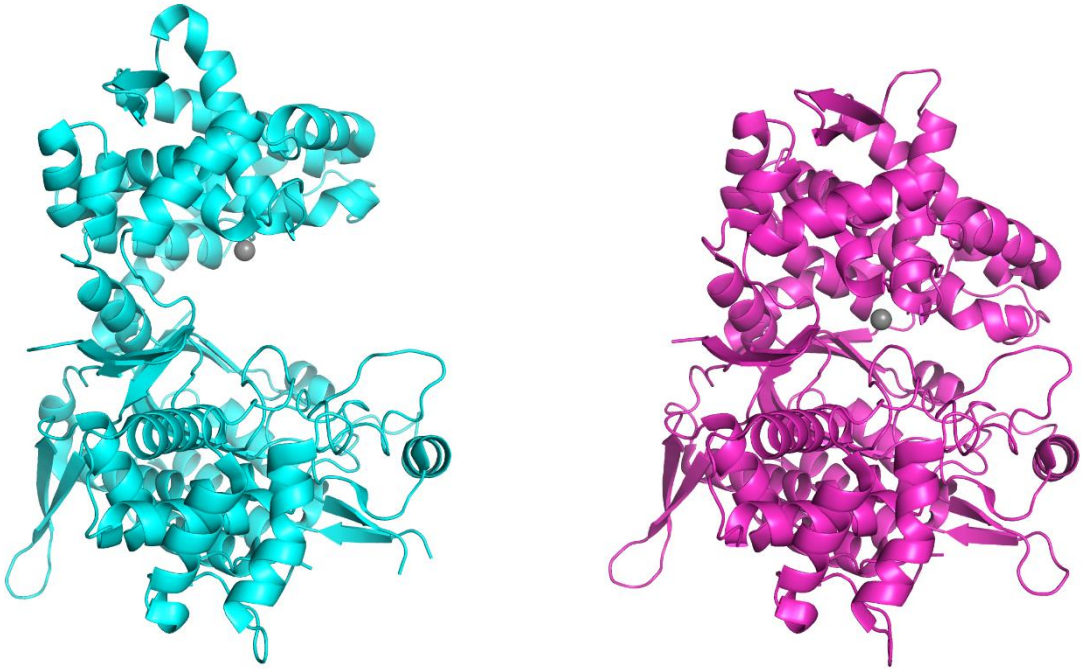
Dipeptidil-peptidaza III iz ljudskog simbionta *Bacteroides thetaiotaomicron* prva je eksperimentalno karakterizirana bakterijska DPP III.[16] *Bt*DPP III se sastoji od 675 aminokiselinskih ostataka, teoretska molarna masa joj je približno 72 kDa, a izoelektrična točka izmjerena je pri pH 4,6. U istraživanjima *in vitro* ovaj enzim hidrolizira Arg_2-2-naftilamid, Ala-Arg-2-naftilamid, Phe-Arg-2-naftilamid i Ala_2-2-naftilamid.[16] Pri 37 °C optimalan pH za enzimsku hidrolizu ovih supstrata iznosi 8,0.

Iz kristalografski određenih struktura *Bt*DPP III vidljivo je da se radi o monomernom proteinu sastavljenom od dvije domene odvojene širokim procjepom (udaljenost Asp193–Lys468 iznosi ~41 Å u "otvorenoj" kristalnoj strukturi) (PDB kod: 5NA7). Strukutra *Bt*DPP III[6] slična je onoj humanog ortologa[5] (slika 4), iako je identičnost sekvenci svega 17%. RMSD njihovih 3D struktura je oko 4,4 Å i u velikoj je mjeri posljedica drugačije orijentacije domena; naime, ukoliko se zasebno promatraju RMSD vrijednosti gornje (definirane aminokiselinskim ostacima 328–364 i 404–626) i donje (definirane aminokiselinskim ostacima 24–327, 365–403 i 627–675) domene, one iznose 3,0, odnosno 2,0 Å.[6] Najupadljivije razlike 3D strukture humane i *Bt*DPP III odnose se na manjak velikog dijela petlje koja u hDPP III povezuje motive HEXXGH i EEXR(K)AE(D) (Gly454–Ile474 u *Bt*DPP III; Gly456–Tyr506 u hDPP III), a sadrži ETGE motiv, te na nedostatak dviju β-ploča i jedne α-zavojnice u donjoj domeni *Bt*DPP III (slika 4). Uloga ovih segmenata strukture nije razjašnjena.



Slika 4. Lijevo: "otvorena" kristalna struktura humane DPP III (zeleno, PDB kod: 3FVY) preklopljena s "otvorenom" kristalnom strukturom *Bt*DPP III (plavo, PDB kod: 5NA7). Dijelovi prisutni samo u hDPP III naglašeni su crvenom bojom. Ioni cinka prikazani su kao sive kuglice. Desno: mjesto za vezanje cinka E451A mutanta humane DPP III (štapići sa svijetloplavo obojenim ugljikovim atomima; PDB kod: 5EGY) preklopljeno s mjestom za vezanje cinka u *Bt*DPP III (štapići sa zeleno obojenim ugljikovim atomima; PDB kod: 5NA8). Ion cinka humane DPP III izostavljen je iz prikaza. Slike su izrađene u programu PyMol.[56]

Postojanje "zatvorene" kristalne strukture mutanta u kojem su svi cisteini prevedeni u serine (PDB kod: 5NA6) ukazuje da i *Bt*DPP III uslijed konformacijskih promjena dugog dosega prolazi kroz proces "zatvaranja" (slika 5). Prilikom toga udaljenost Asp193–Lys468 se smanjuje s 41 Å na 24 Å, dok se kut među domenama smanjuje za 28 stupnjeva (kod hDPP III promjena kuta iznosi čak 60°).[6] Proces zatvaranja potpomognut je izlaskom velikog broja molekula vode iz procjepa čime se entropija sustava povećava; naime uređenost molekula vode manja je izvan proteina. Aminokiselinski ostaci Ala330–Thr334, Glu357–Val366, Ala414–Gly418 te Arg618–Asn623 predstavljaju mehanički zglob ("šarku"; engl. *hinge*) oko kojeg dolazi do zakretanja domena. Kako je za humani ortolog pokazano da je "zatvorena" forma katalitički aktivna, na osnovu strukturne sličnosti i očuvanosti aktivnog mjesta, pretpostavlja se da je to slučaj i kod *Bt*DPP III, te su na temelju strukture kompleksa hDPP III–tinorfin (PDB kod: 3T6B) i sravnjenja sekvenci predložena podmjesta S1 i S2 za *Bt*DPP III.[57]



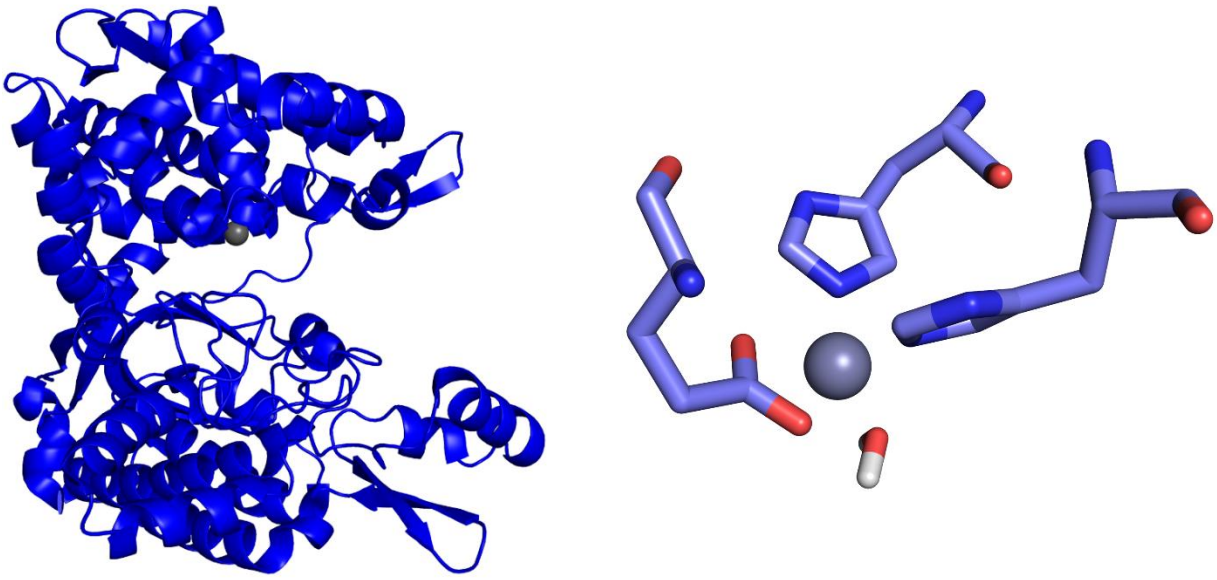
Slika 5. Lijevo: "otvorena" kristalna struktura *Bt*DPP III (PDB kod: 5NA7). Desno: "zatvorena" kristalna struktura *Bt*DPP III (PDB kod: 5NA8). Ioni cinka prikazani su kao sive kuglice. Slike su izrađene u programu PyMol.[56]

Ciljanom mutagenezom na *Bt*DPP III pokazana je važnost Cys450 za inaktivaciju enzima sulfhidrilnim reagensima; uz to, C450S mutant pokazuje znatno smanjenu enzimsku aktivnost prema supstratu Arg_2-2-naftilamidu u usporedbi s divljim tipom (za divlji tip (engl. *wild type*, wt) enzima K_m=2,5±0,9 μM i k_{cat}=5,0±2,9 s^{-1}; za C450S mutant K_m=3,5±0,6 μM i k_{cat}=0,6±0,1 s^{-1}).[16] Kinetičkim i računalnim ispitivanjima na humanom ortologu dokazana je važnost Tyr318 za katalitičku aktivnost[10,17] (u *Bt*DPP III ekvivalent Tyr287). Pretpostavlja se da je Tyr287 dio podmjesta S1.[57] Uočena je i važnost Asp372 u hDPP III,[58] kojem je analogan Ser340 u *Bt*DPP III.

2.1.2. DPP III iz Caldithrix abyssi

Dipeptidil-peptidaza III iz *Caldithrix abyssi* građena je od 558 aminokiselina, što upućuje na znatno manji enzim od ostalih do danas okarakteriziranih ortologa, koji sadrže 675 do 886 aminokiselina.[6,43] Optimalni uvjeti za hidroliziranje sintetskog supstrata Arg_2-naftilamida su pH 7,0 pri 50 °C, što je u skladu s teromofilnošću *C. abyssi*. Za razliku od kvaščeve, humane i *Bt*DPP III, *Ca*DPP III značajno hidrolizira i Gly-Arg-2-naftilamid.[7]

Kao i kod *B. thetatiotaomicron*, kristalna struktura *Ca*DPP III otkriva dvije strukturne domene odvojene procjepom (slika 6).[7] U aktivnom mjestu sadrži jedinstveni pentapeptidni motiv HEISH, čime se razlikuje od DPP III iz kvasca, *Bacteroides thetaiotaomicron* i čovjeka koji sadrže heksapeptidni, HEXXGH, motiv. Pentapeptidni motivi su uočeni i kod biljnih DPP III (koje sadrže i tzv. NUDIX domenu,[59] karakterističnu za Nudix hidrolaze[60]), te kod niza bakterija čije DPP III nisu proučavane. Ion cinka u aktivnom mjestu koordiniran je s dva histidina iz motiva ^{379}HEISH, bidentatno s glutamatom E442 iz ^{441}EECKAD motiva te s molekulom vode.



Slika 6. Kristalna struktura *Ca*DPP III (lijevo) i prikaz mjesta za vezanje cinka (desno). Slike su izrađene programom PyMol.[56]

Povećana termalna stabilnost proteinâ povezuje se s povećanim udjelom strukturiranih dijelova, α-zavojnica i β-ploča,[61,62] većom zastupljenošću prolina,[63] većom hidrofobnošću, manjim brojem polarnih i većim brojem nabijenih aminokiselina,[64] a stabilnost proteina pozitivno je korelirana i s brojem intramolekularnih nekovalentnih interakcija.[64-66] Sve ove strukturne karakteristike uočene su i kod *Ca*DPP III (tablica 2).

Tablica 2. Usporedba strukturnih karakteristika DPP III iz *B. thetaiotaomicron* i *C. abyssi*. Podaci su preuzeti iz rada Sabljića i suradnika.[7]

	***Bt*DPP III**		***Ca*DPP III**		**Relativna vrijednost****	
	Aps.	Rel. (%)	Aps.	Rel. (%)	*Bt* (%)	*Ca* (%)
Aminokiseline u α-zavojnici	374	57,80	332	63,36	91,2	100
Aminokiseline u β-ploči	86	13,29	82	15,65	84,9	100
Broj prolina	23	3,4	26	4,7	72,3	100
Polarni ogranci	122	18,0	87	15,6	100	86,7
Nabijeni ogranci*	130	19,3	130	23,3	82,8	100
Hidrofobni ogranci	288	42,7	247	43,7	97,7	100
Vodikove veze[a]	741	1,145	606	1,156	99,1	100
Slabe vodikove veze[b]	502	0,776	431	0,823	94,3	100
Ionske interakcije[c]	94	0,145	92	0,176	82,4	100
Hidrofobne interakcije[c]	1814	2,804	1614	3,080	91,0	100
Aromatske interakcije	127	0,196	113	0,216	90,7	100

[a]Granične vrijednosti: 3,9 Å, $\Theta > 90°$; [b]Raspon vrijednosti: 3,6–3,9 Å, $90° > \Theta > 130°$; [c]Granična vrijednost: 4 Å
*Glu, Arg, Lys
**Skalirano prema najvećem iznosu

2.2. *Bacteroides thetaiotaomicron*

Bacteroides thetaiotaomicron anaerobna je, Gram-negativna, bakterija te jedan od najzastupljenijih mikroorganizama u probavnog trakta sisavaca, čineći čak do 6% ukupnog broja prisutnih bakterija.[67,68] Na miševima je dokazana važnost uloge *B. thetaiotaomicron* pri uspostavljanju crijevnog ekosustava.[69]

B. thetaiotaomicron probavlja najsloženiji glikan u ljudskoj prehrani; pektinski polisaharid ramnogalakturononan-II.[70] Važnost mikroflore, čije je *B. thetaiotaomicron* značajan predstavnik, u probavi vrlo je dobro ilustrirana u radu Wostmanna i suradnika, koji su pokazali da štakori bez crijevne mikroflore (engl. *germ-free*) zahtijevaju do 30% veći kalorijski unos kako bi održavali tjelesnu masu.[71] S ostatkom crijevne flore *B. thetaiotaomicron* sudjeluje u obrani od patogena[72], na primjer inhibira ekspresiju Shiga toksina 2 (Stx2) kod infekcije enterohemoragičnom *E. coli*,[73] a ima znatan utjecaj i na funkciju mukozne barijere te regulira ekspresiju imunoglobulina A. Uz to, pretpostavlja se da *B. thetaiotaomicron* i izravno utječe na imunološki sustav, no mehanizam djelovanja trenutno nije poznat.[74] Valja spomenuti i da uzrokuje pojačanu ekspresiju i aktivnost matrilizina koji sudjeluje u aktivaciji prodefenzinâ.[75] No, *B. thetaiotaomicron* je i oportunistički patogen, rezistentan na znatan broj antibiotika.[76,77]

Iako je obligatni anaerob, centralni metabolizam *B. thetaiotaomicron* nije ireverzibilno inhibiran u aerobnim uvjetima.[78] Razumijevanje otpornosti na aerobne uvjete izrazito je važno za razumijevanje potencijala svih pripadnika roda *Bacteroides* kao oportunističkih patogena zbog prisutnosti kisika u ranim fazama infekcije tkiva.[79] *B. thetaiotaomicron* pokazuje znatnu aerotoleranciju pa tako njegova fumarat-reduktaza ne stvara reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species, ROS*),[80] a prilikom izloženosti oksidativnom stresu, kao odgovor *B. thetaiotaomicron* eksprimira velik broj proteina.[81] Moguća uloga DPP III u obrani pripadnika roda *Bacteroides* od oksidativnog stresa, implicirana je istraživanjima na višim organizmima.[49-51]

2.3. Caldithrix abyssi

Caldithrix abyssi je anaerobna, Gram-negativna bakterija čiji je genom sekvenciran u sklopu GEBA (*Genomic Encyclopedia of Bacteria and Archaea*) projekta.[82,83] Izolirana je 2003. godine iz hidrotermalnog izvora u Srednjeatlantskom hrbatu. Za razliku od organizama čije su DPP III ranije proučavane, *C. abyssi* je termofil čiji su uvjeti optimalnog rasta određeni na 60 °C te pri pH 6,8–7,0.[84]

Može rasti litotropno, prevodeći vodik i nitrate u amonijak, ili pak anaerobno oksidirati acetat.[85] Pokazano je da raste i na proteinima bogatim podlogama, koristeći fermentaciju peptida kao izvor energije.[84,86] Uspješno je uzgojena i na ekstraktima kvaščevih, sojinih i goveđih proteina, dok na podlogama koje su sadržavale etanol, metanol ili šećere nije zabilježen njen rast.[85] Smatra se kako je fleksibilan metabolizam (obzirom na nutrijente) jedan od načina prilagodbe ekstremnim uvjetima.

2.4. Teorijska osnovica

2.4.1. Računalna kemija

Računalna kemija, odnosno molekulsko modeliranje, grana je kemije koja koristi računala pri proučavanju modelâ molekula ili molekulskih sustava. Uz kvantnu mehaniku, obuhvaća molekulsku mehaniku, simulacije (npr. molekulsku dinamiku), Monte Carlo metode, uklapanje (dokiranje), te cijeli niz metoda analize rezultata kako bi se proniklo u, ili predvidjelo, ponašanje promatranih kemijskih sustava. Metode molekulskog modeliranja dijelimo na klasične ili empirijske, u kojima je energija definirana o empirijskim parametrima ovisnom jednadžbom (npr. molekulska mehanika), te kvantno-mehaničke. Kvantno-mehaničke metode

se dijele na *ab initio,* koje su u potpunosti utemeljene na kvantno-mehaničkim principima, semiempirijske u kojima se dio članova aproksimira parametrima dobivenim iz eksperimentalnih podataka, te metode bazirane na teoriji funkcionala gustoće (engl. *density functional theory,* DFT). Točnost metoda i njihova računalna zahtjevnost obrnuto su proporcionalne, te se one pažljivo odabiru ovisno o veličini sustava i dostupnim računalnim resursima.

Naglim razvojem računala kroz posljednjih nekoliko desetljeća računalna kemija postala je ravnopravna i komplementarna eksperimentalnim metodama. Njene prednosti su mogućnost proučavanja kratkoživućih stanja koja ostaju van dohvata eksperimentalnih metoda, te jednostavno tretiranje eksperimentalno zahtjevnih sustava (poput, recimo, kemije u svemiru ili reakcija izrazito otrovnih vrsta).

2.4.2. Molekulsko-mehaničke metode

Prilikom opisivanja većih sustava tretiranje svakog atoma kvantno-mehaničkim pristupom nije moguće uz trenutno dostupne računalne resurse. Stoga se pribjegava metodama molekulske mehanike koji zanemaruju subatomsku strukturu, tj. atomi se tretiraju kao točkasti naboji, a ukupna energija sustava je funkcija njihovih položaja.

Svaki atom definiran je pripadajućim parametrima (masa, van der Waalsov radijus, konstante sile) koji su izvedeni iz eksperimentalno dostupnih podataka ili iz kvantno-mehaničkih računa. Kako su u početku parametri bili isključivo eksperimentalnog porijekla, metode koje se zasnivaju na polju sila nazivaju se *empirijske* metode. Alternativno, kod velikih sustava, ili pri provođenju vrlo dugih simulacija, više atoma može se grupirati u 'zrno' koje je također definirano svojim parametrima. U tom slučaju govorimo o metodama krupnog zrna (engl. *coarse-grained modelling*). Ukupna potencijalna energija sustava definira se kao suma veznih (energija istezanja veze, promjena valentnog i torzijskog kuta) i neveznih (elektrostatske i van der Waalsove interakcije) doprinosa te je data izrazom 1, odnosno 1a, ili složenijim (npr. kada se u nevezne interakcije uključuje i potencijal vodikovih veza, a u vezne potencijal koji vodi računa o izvan-ravninskim deformacijama ili pak sadrži mješovite članove).

$$U_{total} = U_{vezna} + U_{nevezna} \tag{1}$$

$$U_{total} = U_{veza} + U_{kut} + U_{torzija} + U_{el} + U_{vdW} \tag{1a}$$

Parametri i funkcija kojom je definirana ukupna energija čine polje sila. Energija istezanja veze i promjene valentnog kuta najčešće je dana funkcijom oblika harmonijskog potencijala, gdje energija raste odstupanjem od ravnotežnih vrijednosti r_{eq} i Θ_{eq}. Kako bi se postigao realniji opis većih istezanja veza, u nekim poljima sila koristi se Morseova funkcija za potencijalnu energiju. Torzijska energija najčešće se opisuje periodičkim funkcijama, dok su van der Waalsove interakcije obično opisane Lennard-Jonesovim potencijalom. Elektrostatski doprinos energiji računa se kao interakcija točkastih naboja sukladno Coulombovom zakonu (izraz 2).

$$U_{total} = \sum k_v(r - r_{eq}) + \sum k_k(\theta - \theta_{eq}) + \sum \sum_n \frac{1}{2} V_n[1 + \cos(n\omega - \gamma)] + \sum_{i=1}^{N} \sum_{j=i+1}^{N} \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}} + \sum_{i=1}^{N} \sum_{j=i+1}^{N} 4\varepsilon_{ij} \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^{6} \quad (2)$$

Uslijed zanemarivanja elektronske strukture atoma, molekulska mehanima ima znatna ograničenja kao što je npr. nemogućnost proučavanja kidanja i nastajanja veza (te samim time rekcijskih mehanizama), no usprkos tome našla je široku primjenu u proučavanju velikih sustava kao što su biomakromolekule i njihovi kompleksi.

2.4.3. Kvantno-mehaničke metode

Prema prvom postulatu kvantne mehanike, stanje sustava je u potpunosti opisano valnom funkcijom $\Psi(\mathbf{x},t)$. Varijable valne funkcije su koordinate svih čestica u sustavu i njihov spin te vrijeme, koje se pri proučavanju stacionarnih stanja zanemaruje. Iako valna funkcija nema izravno fizikalno značenje, umnožak valne funkcije i njenog kompleksnog konjugata (izraz 3) predstavlja gustoću vjerojatnosti da će se sustav naći u određenoj točki faznog prostora. Sukladno Schrödingerovoj jednadžbi, relacija između energije sustava i pripadne geometrije dana je izrazom 4, koji govori da je energija sustava vlastita vrijednost hamiltonijana, dok je valna funkcija njegov vlastiti vektor.

$$\boldsymbol{P}(\boldsymbol{r}, t) = \Psi^*\Psi = |\Psi|^2 \quad (3)$$

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (4)$$

Hamiltonijan možemo rastaviti na operator kinetičke energije ($\hat{T}$) te potencijalne energije ($\hat{V}$), koji dalje možemo rastaviti na doprinose interakcija jezgra-elektron, elektron-elektron i jezgra-jezgra (izrazi 5–10). Egzaktan izračun energije interakcija elektronâ nije moguć te je analitičko rješavanje Schrödingerove jednadžbe moguće samo za jednoelektronske sustave.

$$\hat{H} = \hat{T}_e + \hat{T}_n + \hat{V}_{ne} + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{nn} = \hat{H}_{el} + \hat{T}_n + \hat{V}_{nn} \tag{5}$$

$$\hat{T}_e = -\frac{\hbar}{2m_e}\sum_{i=1}^{n}\nabla_i^2 \tag{6}$$

$$\hat{T}_n = -\frac{\hbar}{2m_k}\sum_{k}\nabla_k^2 \tag{7}$$

$$\hat{V}_{ne} = -\sum_{i=1}^{n}\sum_{\mu=1}^{N}\frac{Z_\mu e^2}{r_{i\mu}} \tag{8}$$

$$\hat{V}_{ee} = \sum_{i<j}^{n}\frac{e^2}{r_{ij}} \tag{9}$$

$$\hat{V}_{nn} = \sum_{\mu=1}^{N}\sum_{\nu=\mu}^{N}\frac{Z_\mu Z_\nu e^2}{r_{\mu\nu}} \tag{10}$$

Born-Oppenheimerova aproksimacija pretpostavlja da je gibanje elektrona i jezgara raspregnuto, tj. da su jezgre statične u odnosu na elektrone, čime član $\hat{T}_n$ iz izraza 5 iščezava, te da je doprinos interakcija jezgra-jezgra konstantan za određeni raspored jezgara (geometriju). Uvodi se kako bi valnu funkciju bilo moguće rastaviti na nuklearnu (koja ovisi samo o koordinatama jezgara, **R**) i elektronsku (varijable su koordinate elektrona dok su koordinate jezgara parametri), te konstruirati plohu potencijalne energije na način da se svakoj geometriji (definiranoj rasporedom jezgara) pridruži pripadna energija (izraz 11).

$$\Psi_{tot}(\boldsymbol{R},\boldsymbol{r}) = \Psi_n(\boldsymbol{R})\Psi_e(\boldsymbol{R},\boldsymbol{r}) \tag{11}$$

Uz ove aproksimacije rješavanje vremenski neovisne Schrodingerove jednadžbe nekog sustav svodi se na rješavanje Schrödingerove jednadžbe za elektrone (izraz 12), čija je vlastita vrijednost veličina koju nazivamo potencijalnom energijom (E_{el}) za dani raspored jezgri.

Koordinate elektrona, **r**, su varijable valne funkcije, dok su koordinate jezgara, **R**, parametri. Rješenje tzv. elektronske Schrödingerove jednadžbe nije jednoznačno budući postoji velik broj funkcija Ψ_{el} s pripadnim vlastitim vrijednostima E_{el} koje ju zadovoljavaju. Sukladno varijacijskom principu, najbolji odabir funkcije predstavljat će ona koja rezultira najmanjom energijom.

$$\left(\hat{H}_{el} + \hat{V}_{nn}\right)\Psi_{el}(\boldsymbol{r}|\boldsymbol{R}) = E_{el}\Psi_{el}(\boldsymbol{r}|\boldsymbol{R}) \tag{12}$$

Najjednostavniji pristup konstruiranju valne funkcije je Hartreejeva metoda. Naime, ukoliko se interakcija elektrona opiše pomoću uprosječenog potencijala, višeelektronska valna funkcija može se rastaviti na jednoelektronske valne funkcije, orbitale (izraz 13). Svaka jednoelektronska valna funkcija pritom mora zadovoljavati izraz 14, gdje je $\hat{h}_i$ jednoelektronski hamiltonijan.

$$\Psi_H = \psi_1\psi_2 \ldots \psi_N \tag{13}$$

$$\hat{h}_i\psi_i = \varepsilon_i\psi_i \tag{14}$$

Jednoelektronske valne funkcije koje u obzir uzimaju i prostorne koordinate i spin elektrona nazivamo spinorbitalama.

$$\chi_k(\boldsymbol{x}_i) = \chi_k(\boldsymbol{r}_i, \omega_i) = \chi_k(i) \tag{15}$$

U skladu s Paulijevim principom isključivosti, ukupna valna funkcija mora biti antisimetrična obzirom na izmjenu elektrona. U Hartree-Fockovom pristupu valna funkcija stoga ima oblik determinante (Slaterova determinanta) čiji su članovi spinorbitale (izraz 16). Naime, svojstvo determinante je da zamjena dva retka rezultira promjenom njenog predznaka.

$$\Psi(\boldsymbol{x}_1, \boldsymbol{x}_2, \ldots, \boldsymbol{x}_n) = \frac{1}{\sqrt{n!}}\begin{vmatrix} \chi_1(1) & \chi_2(1) & \ldots & \chi_n(1) \\ \chi_1(2) & \chi_2(2) & \ldots & \chi_n(2) \\ \ldots & \ldots & \ldots & \ldots \\ \chi_1(n) & \chi_2(n) & \ldots & \chi_n(n) \end{vmatrix} \tag{16}$$

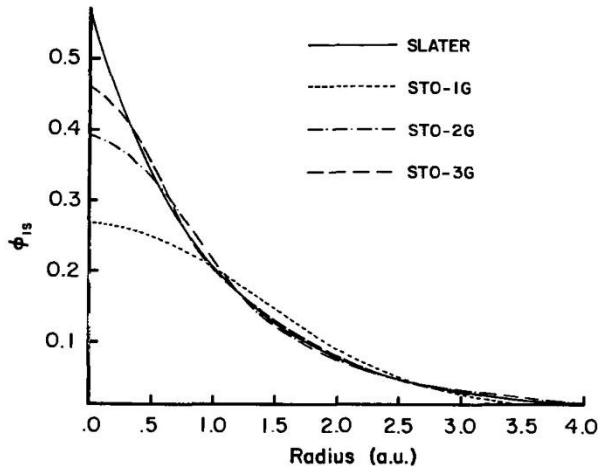
Primjer Slaterove determinante koja opisuje osnovno stanje za *n* elektrona sparenih u *n*/2 prostornih orbitala dan je izrazom izrazom 17.

$$\Psi(\boldsymbol{x}_1, \boldsymbol{x}_2, \ldots, \boldsymbol{x}_n) = \frac{1}{\sqrt{n!}} \begin{vmatrix} \psi_1(1)\alpha(1) & \psi_1(1)\beta(1) & \ldots & \psi_{n/2}(1)\alpha(1) & \psi_{n/2}(1)\beta(1) \\ \psi_1(2)\alpha(2) & \psi_1(2)\beta(2) & \ldots & \psi_{n/2}(2)\alpha(2) & \psi_{n/2}(2)\beta(2) \\ \ldots & \ldots & \ldots & \ldots & \ldots \\ \psi_1(n)\alpha(n) & \psi_1(n)\beta(n) & \ldots & \psi_{n/2}(n)\alpha(n) & \psi_{n/2}(n)\beta(n) \end{vmatrix} \quad (17)$$

Roothan i Hall 1951. uvode koncept zamjene atomskih orbitala jednostavnijim funkcijama, to jest njihovom linearnom kombinacijom (izraz 18). Takve funkcije (φ_i) nazivamo osnovnim fukcijama, odnosno osnovnim skupom (*K* takvih funkcija).

$$\psi_i = \sum_{\mu=1}^{K} c_{\mu i} \varphi_i \quad (18)$$

Kao osnovne funkcije koriste se tzv. Slaterove orbitale (engl. *Slater-type orbital*, STO), koje nalikuju na atomske orbitale vodika, i Gaussove orbitale (engl. *Gaussian-type orbitals*, GTO). U praksi se uglavnom koriste linearne kombinacije Gaussovih orbitala jer je suma nekoliko GTO vrlo dobra aproksimacija STO (slika 7), a mnogo je pogodnija za računalnu implementaciju. Takve funkcije nazivaju se primitivnim Gaussianima. Umnožak dviju Gaussovih orbitala može se rastaviti na (konačnu) sumu Gaussiana, čime se račun može ubrzati za 4 do 5 puta, a GTO (izraz 19) brže trnu nego STO (izraz 20), što također smanjuje potrošnju računalnih resursa.



Slika 7. Reprezentacija orbitala Slaterovog tipa orbitalama Gaussovog tipa. Slika je preuzeta iz knjige Modern Quantum Chemistry Szabe i Ostlunda.[87]

$$\chi_{\zeta nlm}(r, \theta, \varphi) = NY_{lm}(\theta, \varphi) r^{2n-2-l} e^{-\zeta r^2} \quad (19)$$

$$\chi_{\zeta nlm}(r,\theta,\varphi) = NY_{lm}(\theta,\varphi)r^{n-1}e^{-\zeta r} \quad (20)$$

Ukoliko jednu Slaterovu orbitalu zamijenimo linearnom kombinacijom tri primitivna Gaussiana, govorimo o STO-3G osnovnom skupu. Kod Popleovog sustava notacije[88] osnovne skupove dijelimo prema tome koliko osnovnih funkcija opisuje jednu orbitalu. Kada se za opis orbitale koristi jedna osnovna funkcija govorimo o minimalnom osnovnom skupu (engl. *single split*), ili single-ζ (single-zeta) skupu. Razlikujemo još i *double split* skupove (u kojima su orbitale opisane s dvije osnovne funkcije) te *triple split* skupove (orbitale su opisani s tri osnovne funkcije). Kako kemijska svojstva od interesa ponajviše ovise o vanjskim elektronima, česta je praksa da se, radi uštede računalnih resursa, vanjski elektroni opišu matematički točnije od unutarnjih. Tada se koristi K-NLG, odnosno K-NLMG notacija, koja govori da su unutarnje orbitale opisane jednom osnovnom fukcijom sastavljenom od K primitivnih Gaussiana, dok su vanjske orbitale opisane linearnom kombinacijom dvije, odnosno 3 osnovne fukcije sastavljeme od N i L, odnosno N, L i M primitvnih Gaussiana.

Računalne metode temeljene na kvantnoj mehanici tradicionalno se dijele na semiempirijske, u kojima se pojedini članovi aproksimiraju eksperimentalnim podacima, te *ab initio* metode, koje su u potpunosti bazirane na teoriji. *Ab initio* metode razlikuju se po načinu tretiranja elektron-elektron interakcija, pa tako razlikujemo Hartree-Fock metode (u prvoj iteraciji zanemaruju elektron-elektron interakcije), post-Hartree-Fock metode (Møller–Plessetova perturbacijska teorija, metode konfiguracijske interakcije i tzv. *coupled cluster* metode). Često se kao posebna kategorija metoda izdvaja teorija funkcionala gustoće (DFT) koja počiva na drugačijim teorijskim postavkama, no neizravno uključuje eksperimentalno određene podatke ili rezultate dobivene *ab initio* računima uz visoku razinu teorije. Pri izradi ovog doktorskog rada korištene su DFT metode jer su, za naše potrebe, predstavljale najbolji omjer računalne zahtjevnosti i pouzdanosti rezultata, a uspješno su korištene i u opisu mehanizma reakcije kod humanog ortologa.[4]

Teorija funkcionala gustoće polazi od pretpostavke da je energija osnovnog stanja sustava određena elektronskom gustoćom, koja je funkcija tek tri prostorne koordinate. Teorijski temelji ovoj metodi udareni su 1964. godine kada su Hohenberg i Kohn dokazali da je energija osnovnog stanja jednoznačno određena pripadnom elektronskom gustoćom, tj. da je energija funkcional gustoće. Već se u Thomas-Fermijevom pristupu (1927.) funkcional energije sastojao od člana za kinetičku energiju elektrona, člana za energiju privlačenja elektrona i jezgara i člana za energiju odbijanja elektrona (21).

$$E[\rho(\boldsymbol{r})] = T_{ni}[\rho(\boldsymbol{r})] + V_{ne}[\rho(\boldsymbol{r})] + V_{ee}[\rho(\boldsymbol{r})] \quad (21)$$

Odstupanje ovakvog teorijskog konstrukta od realnog sustava Kohn i Sham su opisali uvođenjem dva dodatna člana, neklasične korekcije za kinetičku energiju elektrona, $\Delta T[\rho]$, i neklasične korekcije za energiju interakcije elektrona, $\Delta V_{ee}[\rho]$, koji se često grupiraju u tzv. izmjensko-korelacijski član (E_{xc}) (izraz 22).

$$E[\rho(\boldsymbol{r})] = T_{ni}[\rho(\boldsymbol{r})] + V_{ne}[\rho(\boldsymbol{r})] + V_{ee}[\rho(\boldsymbol{r})] + E_{xc}[\rho(\boldsymbol{r})] \quad (22)$$

Za razliku od *ab initio* metoda, teorija funkcionala gustoće ne zasniva se na rješavanju Schrödingerove jednadžbe, već traženju jednoelektronskih funkcija (Kohn-Shamove orbitale) koje reproduciraju pravu elektronsku gustoću. Iako taj model ne podrazumijeva nikakve aproksimacije, problem s njegovom implementacijom je nepoznavanje izraza za izmjensko-korelacijski član. On se aproksimira, pri čemu se parametri obično odabiru kako bi čim bolje reproducirali eksperimentalne rezultate.

Prva DFT metoda bila je aproksimacija lokalne gustoće (engl. *local density approximation*, LDA), u kojoj je elektronska gustoća predstavljena uniformnim elektronskim plinom. Znatno bolje su metode kod kojih funkcional osim o (lokalnoj) gustoći, ovisi i o njenom gradijentu (GGA), odnosno o drugoj derivaciji gustoće (meta-GGA metode). Veliki broj novijih funkcionala uključuje i dio točne (HF) energije izmjene (hibridni GGA i meta-GGA funkcionali), odnosno dio korelacijske (MP2) korekcije energije (dvostruko hibridne metode).

2.4.4. Molekulsko-dinamičke simulacije

Pri proučavanju (bioloških) makromolekulskih sustava lociranje strukture najniže energije (globalnog minimuma) nije od presudne važnosti. Realni sustavi koji se modeliraju sastoje se od velikog broja molekula različitih struktura (konformacija), te eksperimentalno određene veličine odgovaraju statističkom prosjeku pri određenoj temperaturi. U cilju što vjerodostojnijeg opisa eksperimentalnih vrijednosti, nužno je razmatranje većeg broja struktura promatranog sustava. To se postiže potpunijim uzorkovanjem plohe potencijalne energije (engl. *potential energy surface*, PES), odnosno generiranjem reprezentantivnog ansambla struktura pri određenoj temperaturi *T*. Za generaciju takvih ansambla najčešće se koriste *Monte Carlo* metode ili molekulsko-dinamičke (MD) simulacije. *Monte Carlo* metode temelje se na (slučajnim) perturbacijama molekule, te ne daju uvid u dinamičke procese u promatranom

sustavu, poput konformacijskih promjena. Kako je jedan od ciljeva ove disertacije proučavanje konformacijskih promjena dugog dosega, metoda od izbora bila je molekulska dinamika.

U MD simulacijama sustav je opisan poljem sila, a konformacijsko uzorkovanje temelji se na promatranju razvoja (gibanja) sustava kroz vrijeme. Pri početku MD simulacija svakom atomu (definiranom koordinatama x, y i z) pridruži se brzina u skladu s Maxwell-Boltzmannovom raspodjelom (izraz 23) pri temperaturi na kojoj se vrši simulacija (k_b je Boltzmannova konstanta, m_i i v_i masa atoma te pripadna brzina, a T temperatura), te se rješavanjem jednadžbi gibanja, najčešće Newtonovih, (izraz 24) opisuje njihovo gibanje. Sila, **F**, je povezana s potencijalnom energijom izrazom 25, te se vremenska evolucija sustava može povezati s potencijalnom energijom izrazom 26.

$$P(v_i) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi k_b T}} e^{-\frac{m_i v_i^2}{2k_b T}} \tag{23}$$

$$m_i \boldsymbol{a}_i = m_i \frac{\partial^2 \boldsymbol{r}}{\partial t^2} = \boldsymbol{F}_i \tag{24}$$

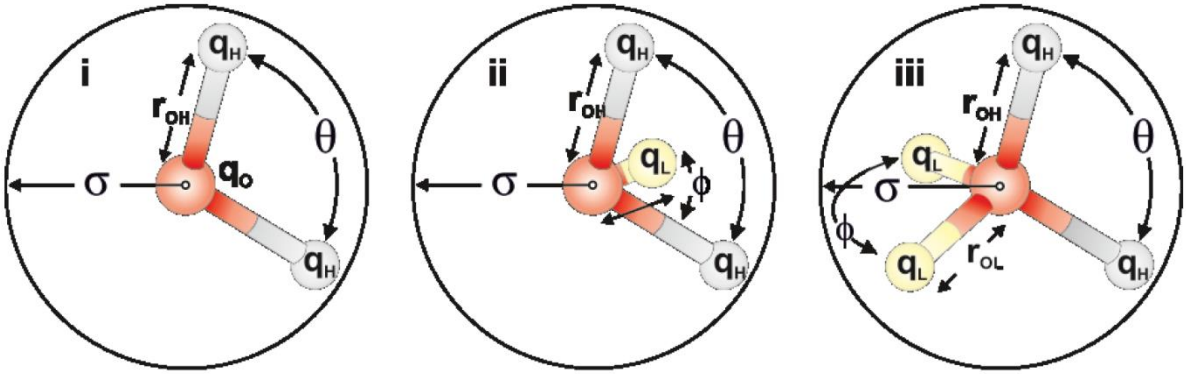
$$\boldsymbol{F}_i = -\nabla U \tag{25}$$

$$m_i \frac{\partial^2 \boldsymbol{r}}{\partial t^2} = -\nabla U \tag{26}$$

Rješavanjem ovih diferencijalnih jednadžbi (integriranjem po malim vremenskim koracima Δt) dobiva se niz struktura koje opisuju gibanje promatranog sustava u određenom vremenu, a naziva se trajektorijom. Molekulska dinamika zasniva se na ergotskoj hipotezi, koja pretpostavlja da će sva (najvjerojatnija) mikrostanja sustava biti uzorkovana ukoliko se promatra kroz dovoljno dug vremenski period. Vremenski korak pri simulaciji sustava mora biti kraći od najbržeg gibanja u sustavu, koje je kod biomolekula najčešće vibracija C-H veze. Kako je period ove vibracije približno 10^{-14} sekundi, obično se koriste vremenski koraci od jedne femtosekunde. Kako bi se smanjio broj izračuna potreban za simulaciju određenog vremenskog perioda, razvijeni su algoritmi kojima se fiksira udaljenost C-H vezâ, što omogućuje korištenje vremenskog koraka 2–5 fs. Najčešće se koriste algoritmi SHAKE[89] (i njegove modifikacije) te LINCS.[90]

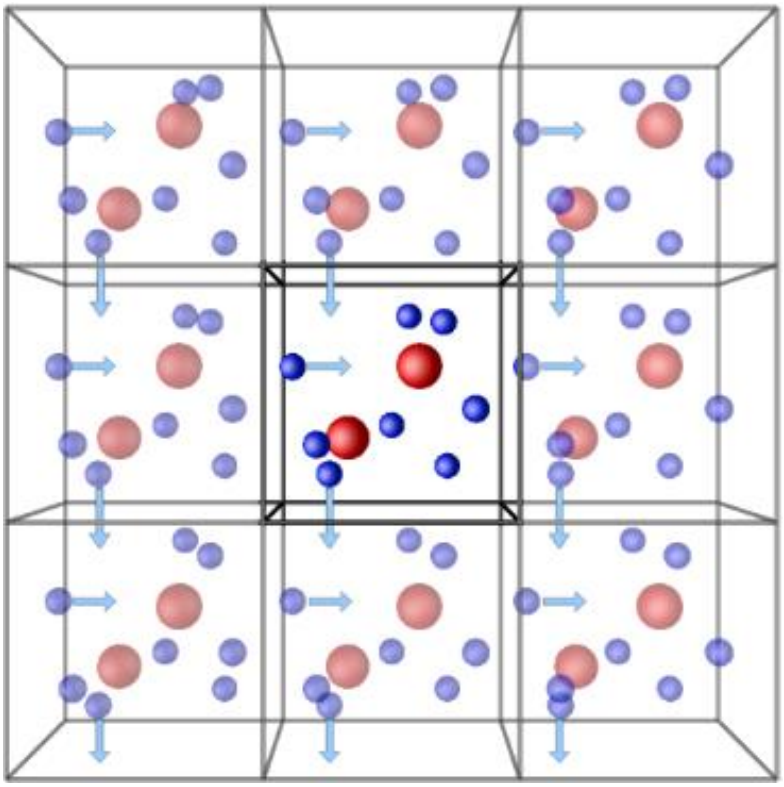
Prilikom proučavanja biomakromolekula, od interesa je njihovo ponašanje u fiziološkim uvjetima što, uz pojedine iznimke poput transmembranskih proteina, podrazumijeva vodeni medij. Zbog snažnog međudjelovanja molekula polarnog otapala s nabijenim aminokiselinskim

ostacima, mogućnosti postojanja premošćujućih molekula vode među njima, entropijskog doprinosa uslijed translokacije molekula vode prilikom konformacijskih promjena i sličnih efekata, nužno je otapalo uključiti eksplicitno. Molekula, odnosno sustav molekula, od interesa smješta se u tzv. kutiju (engl. *box*) molekula vode, gdje je kutija obično kocka ili krnji oktaedar (kojim se postiže očuvanje sferne simetrije uz upotrebu manjeg broja molekula vode). Kako se broj molekula vode potreban za otapanje (solvataciju) srednje velikog proteina mjeri u desetcima tisuća, razvijeni su mnogobrojni modeli molekule vode. Jedan od najčešće korištenih modela je tzv. SPC (engl. *simple point charge*), u kojem su duljine veza i kut među atomima fiksni, dok se elektrostatske interackije definiraju kroz tri točkasta naboja (slika 8). Interakcije među atomima kisika aproksimiraju se Lennard-Jonesovim potencijalom. Drugi često korišteni tip je TIP*n*P voda, gdje *n* označava broj točkastih naboja pridruženih molekuli vode. TIP3P model vode je konceptualno isti kao SPC, no s poboljšanim parametrima.[91] Kasnije razvijeni TIP4P i TIP5P modeli defniraju vodu s 4, odnosno 5 točkastih naboja (slika 8) što rezultira točnijim predviđanjem ponašanja molekula vode.[92] Parametri (iznos naboja, duljina veza te kuta) razlikuju se među TIP*n*P modelima.



Slika 8. Shematski prikaz TIP3P, odnosno SPC (lijevo), TIP4P (sredina) te TIP5P (desno) modela vode. Preuzeto iz rada Florove i suradnika.[93]

Kako bi se izbjegli neželjeni rubni efekti nastali korištenjem kutije otapala, koriste se periodični rubni uvjeti (engl. *periodic boundary conditions*, PBC). Metoda je to u kojoj se promatrani sustav okruži njegovim kopijama (slika 9) i čestice u promatranoj kutiji interagiraju s tzv. virtualnim česticama u kopijama osnovne kutije (sustav nije okružen vakuumom). Ukoliko neka čestica iziđe iz simulirane kutije, identična će virtualna čestica (njena slika) ući u promatranu kutiju (slika 9) čime se osigurava očuvanje broja čestica i mase u promatranoj kutiji.



Slika 9. Primjena periodičnih rubnih uvjeta. Sustav je u svakom smjeru okružen svojm slikama, te prilikom izlaska čestice iz promatranog sustava nova (virtualna) čestica u njega ulazi. Slika je preuzeta iz doktorske disertacije dr. Le Rouxa.[94]

Ukoliko se promatra sustav odvojen od okoline, u njemu su broj čestica (*N*) i volumen (*V*) konstantni. MD simulacijama takvog sustava uz korištenje Newtonovih jednadžbi gibanja, generira se niz mikrostanja iste energije, tj simulira se mikrokanonski (*NVE*) ansambl. Prema ergotskoj hipotezi prosjek neke (fizikalne) veličine tada mora biti jednak prosjeku ansambla. Međutim, eksperimentalni uvjeti u većini slučajeva, podrazumijevaju konstantan tlak i temperaturu te se MD simulacijama želi generirati ili kanonski (*NVT*) ili izobarno-izotermni (*NPT*) ansambl.

Obzirom da je temperatura funkcija raspodjele energije po česticama u sustavu, najjednostavniji pristup regulaciji temperature je modifikacija kinetičke energije čestica. Ovisno o pristupu razlikujemo termostate s jakim i slabim sprezanjem, te stohastičke termostate. Kod termostata s jakim sprezanjem temperatura se mijenja vrlo naglo (izraz 27), te oni nisu podesni za generiranje kanonskog ansambla.

$$v = v_0 \sqrt{\frac{T_0}{T}} \tag{27}$$

U metodama slabog sprezanja neizravno se skaliraju brzine čestica. Često korišten termostat sa slabim sprezanjem je Berendsenov termostat, kojim se simulira uranjanje sustava u kupelj konstantne (željene) temperature (izraz 28), a intenzitet interakcije sustava i kupelji regulira se tzv. konstantom sprezanja (τ_T). Faktor skaliranja kod Berendsenovog termostata dan je izrazom 29, pri čemu je T_0 temperatura kupelji (željena temperatura). Važno je naglasiti da se uporabom Berendsenovog barostata ne postiže pravi kanonski ansambl.

$$\frac{dT(t)}{dt} = \frac{1}{\tau_T}\big(T_0 - T(t)\big) \tag{28}$$

$$\lambda^2 = 1 + \frac{\Delta t}{\tau_T}\left(\frac{T_0}{T(t)} - 1\right) \tag{29}$$

Od stohastičkih termostata najpoznatiji je onaj Langevinov. On se zasniva na interakciji fiktivnih čestica s promatranim sustavom, odnosno izmjeni kinetičke energije kroz sudare. Te su čestice opisane Langevinovom dinamikom (izraz 30), gdje je *R(t)* stohastički član. Kao što je vidljivo iz izraza 31, na sve čestice djeluje nasumična sila $\mathbf{W}_i$, koja je posljedica sudara, te sila trenja $\gamma\mathbf{p}_i$, gdje je γ "koeficijent trenja". Korištenjem Langevinovog termostata dobiva se "pravi" kanonski ansambl, no moment čestica nije očekivan te se zbog toga ne sugerira njegovo korištenje prilikom računa dinamičkih veličina.

$$m\frac{d^2\mathbf{r}}{dt^2} = -\nabla U - \gamma m\frac{d\mathbf{r}}{dt} + R(t)\sqrt{2\gamma k_B T} \tag{30}$$

$$m\frac{d^2\mathbf{r_i}}{dt^2} = -\nabla U - \gamma \boldsymbol{p}_\mathrm{i} + \mathbf{W}_i(t) \tag{31}$$

Održavanje konstantnog tlaka (nužno za *NPT* ansambl) vrši se skaliranjem udaljenosti među česticama (koje može biti izotropno i anizotropno) i njihovih brzina. Jedan od konceptualno najjednostavnijih barostata je Berendsenov barostat koji funkcionira po principu analognom istoimenom termostatu. Sustav je spregnut s vanjskim tlakom prema izrazu 32, gdje je τ_P konstanta sprezanja. Promjena volumena sustava opisan je izrazima 33 i 34.

$$\frac{dp}{dt} = \frac{p_0 - p}{\tau_P} \tag{32}$$

$$\frac{d\boldsymbol{r}}{dt} = v + \alpha\boldsymbol{r} \tag{33}$$

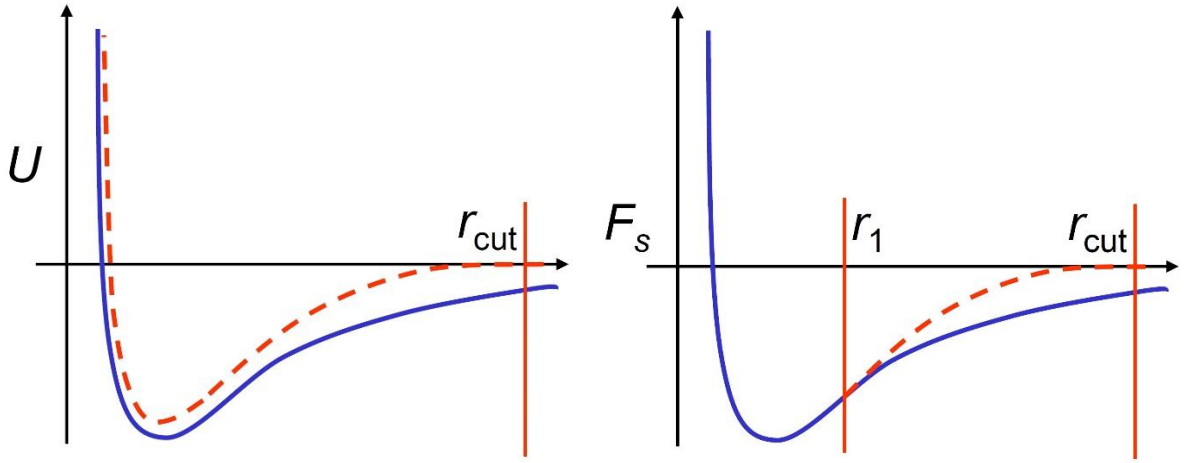
$$\frac{dV}{dt} = 3\alpha V \tag{34}$$

Promjena volumena sustava usljed promjene tlaka ovisi o kompresibilnosti sustava β (izraz 35). Iz izraza 32 i izraza 35 parametar α moguće je izraziti pomoću kompresibilnosti i konstante sprezanja (izraz 36).

$$\frac{dp}{dt} = -\frac{1}{\beta V}\frac{dV}{dt} = -\frac{3\alpha}{\beta} \tag{35}$$

$$\alpha = -\frac{\beta(p_0 - p)}{3\tau_P} \tag{36}$$

Broj neveznih interakcija u sustavu skalira se s kvadratom broja atoma, te predstavlja računalno najzahtjevniji doprinos energiji sustava. Iz izraza 2 uočava se kako kod računa van der Waalsovih sila iznos privlačnih interakcija opada s r^6, a odbojnih s r^{12}, dok broj interakcija raste proporcionalno s r^2 (površinom sfere oko promatranog atoma). To za posljedicu ima relativno brzo konvergiranje iznosa van der Waalsovih interakcija, što se može učiniti još manje računalno zahtjevnim uz uvođenje određene granične udaljenosti (engl. *cut-off distance*). Kod elektrostatskih interakcija energetski doprinos opada s r^{-1}, što konvergenciju čini nemogućom budući broj interakcija raste proporcionalno s kvadratom udaljenosti. Kao i kod van der Waalsovih interakcija, doseg računanja elektrostatskih interakcija može se definirati graničnom udaljenošću. Zanemarivanje elektrostatskih interakcija nakon određene udaljenosti često rezultira poteškoćama u optimizaciji ili strukturalnim artefaktima, te se koriste metode tzv. mekog gašenja ili funkcija sklopke (engl. *switch*) (slika 10).



Slika 10. Kontinuirano "mekano gašenje" funkcije (lijevo) i uvođenje funkcije sklopke (desno).[95]

Kod korištenja periodičnih rubnih uvjeta elektrostatski doprinos može se izračunati primjenom Ewaldove sumacije. Ona se zasniva na razdvajanju energetskog doprinosa na dva člana koji opisuju kratki te dugi doseg, od kojih jedan brzo trne u realnom, a drugi u recipročnom (Fourierovom) prostoru (izraz 37). Ewaldova metoda je kasnije modificirana uvođenjem brze Fourierove transformacije (PME,[96,97] engl. *particle mesh Ewald*) kako bi se ubrzao izračun za sustave s velikim brojem atoma.

$$\varphi(\boldsymbol{r}) = \varphi_{KD}(\boldsymbol{r}) + \varphi_{DD}(\boldsymbol{r}) \tag{37}$$

Standardni izrazi korišteni u molekulskoj dinamici (izraz 2) mogu se modificirati kako bi se postigao željeni efekt tijekom simulacije, te tada govorimo o MD metodama s posebnim namjenama. Od takvih pristupa u izradi ove disertacije korištena je molekulska dinamika s dodanim potencijalom (engl. *accelerated molecular dynamics*, aMD).[18,98] Brzina pretraživanja konformacijskog prostora određena je visinama barijera koje sustav mora prijeći. Kod aMD pristupa se energetske barijere među konformacijama nastoje smanjiti uvođenjem dodatnog potencijala skaliranog prema energiji (izraz 38 i slika 11).

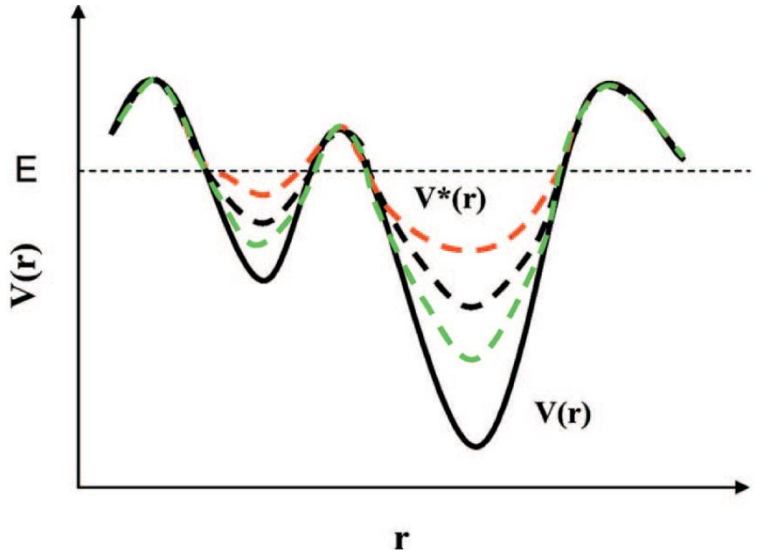
$$\Delta U(r) = \begin{cases} 0, & U(r) \geq E \\ \dfrac{\left(E - U(r)\right)^2}{\alpha + \left(E - U(r)\right)}, & U(r) < E \end{cases} \tag{38}$$

Parametrom α regulira se "zaglađivanje" plohe potencijalne energije sustava (slika 11), a on se, kao i granična energija *E*, određuje na temelju prosječne energije sustava izračunate iz

konvencionalnih MD simulacija. Velika prednost ubrzane molekulske dinamike u odnosu na ostale slične metode poboljšanog uzorkovanja konformacijskog prostora, je to što ne zahtijeva *a priori* poznavanje reakcijske koordinate, kao ni oblik plohe potencijalne energije. Često se energija poticaja dodaje torzijskom članu i ukupnoj energiji. Torzijskom doprinosu kako bi se olakšale konformacijske promjene, a ukupnoj energiji kako bi se ubrzala gibanja otapala (čija je tromost u računalnim simulacijama uglavnom veća od realne) npr. reorganizacija molekula vode oko (dijela) molekule.

Kako dodani potencijal nije isti u svakom koraku, vremenski koraci u aMD simulacijama nisu linearni, odnosno njihov izraz raste eksponencijalno s dodanimm potencijalom (izraz 39). U koracima u kojima se ne dodaje potencijal, $\Delta V[\boldsymbol{r}(t_i)]$ je 0, odnosno $\Delta t_i^* = \Delta t$.

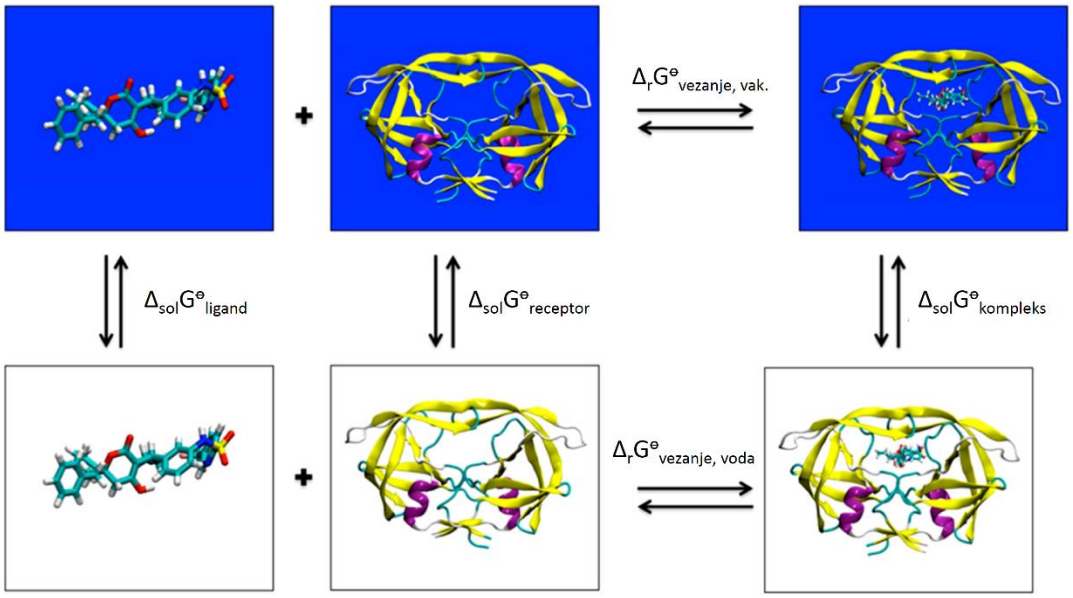
$$\Delta t_i^* = \Delta t e^{\beta \Delta V[\boldsymbol{r}(t_i)]} \tag{39}$$



Slika 11. Shematski prikaz utjecaja dodanog potencijala na plohu potencijalne energije. Crvena iscrtkana linija predstavlja modificirani potencijal s najmanom vrijednosti parametra α, crna sa srednjom, a zelena s najvećom. Slika je preuzeta iz rada Hamelberga i suradnika.[98]

2.4.5. Račun Gibbsovih energija

Jedna od najraširenijih metoda za izračun energije solvatacije enzima te energijâ vezanja liganada je MM-PBSA (engl. M*olecular mechanics–Poisson-Boltzmann surface area*).[99] U njoj se energija vezanja određuje u vakuumu te se korigira za energetski doprinos solvatacije (slika 12).



Slika 12. Termodinamički ciklus kod određivanja energije vezanja MM-PBSA metodom. Plava pozadina predstavlja specije u vodenom mediju, a bijela u vakuumu. Slika je preuzeta iz rada Millera i suradnika.[100]

Sukladno danom termodinamičkom ciklusu, energija vezanja računa se prema izrazu 40, odnosno 41. Reprezentantivne strukture liganda, receptora i kompleksa mogu se generirati ili dekompozicijom trajektorije kompleksa, u kojem slučaju govorimo o MM-PBSA računu jedne trajektorije (engl. *single-trajectory MM-PBSA*) ili odvojenim simulacijama receptora, liganda i kompleksa, što se naziva MM-PBSA računom triju trajektorija (engl. *triple-trajectory MM-PBSA*). Potonji pristup se preporučuje u situacijama kada ligand znatno utječe na enzim, najčešće induciranjem velikih konformacijskih promjena.

$$\Delta_r G^{\ominus}_{vezanje,H_2O} = G^{\ominus}_{kompleks} - G^{\ominus}_{receptor} - G^{\ominus}_{ligand} \tag{40}$$

$$\Delta_r G^{\ominus}_{vezanje,H_2O} = \Delta_r G^{\ominus}_{vezanje,vak.} + (\Delta_{sol} G^{\ominus}_{kompleks} - \Delta_{sol} G^{\ominus}_{receptor} - \Delta_{sol} G^{\ominus}_{ligand}) \tag{41}$$

Entalpijski doprinos Gibbsovoj energiji vezanja u uvjetima konstantnog tlaka i volumena jednak je potencijalnoj energiji sustava, koja se računa pomoću polja sila, tj. molekulske mehanike (MM). Entropijski doprinos aproksimira se vibracijskom i rotacijskom frekvencijom određenim pomoću analize normalnih modova, no prilikom usporedbe sličnih sustava (npr. vezanja niza strukturno sličnih liganada u aktivno mjesto) često se zanemaruje uz pretpostavku da su entropijski doprinosi tih liganada približno isti. Polarni se doprinos računa pomoću

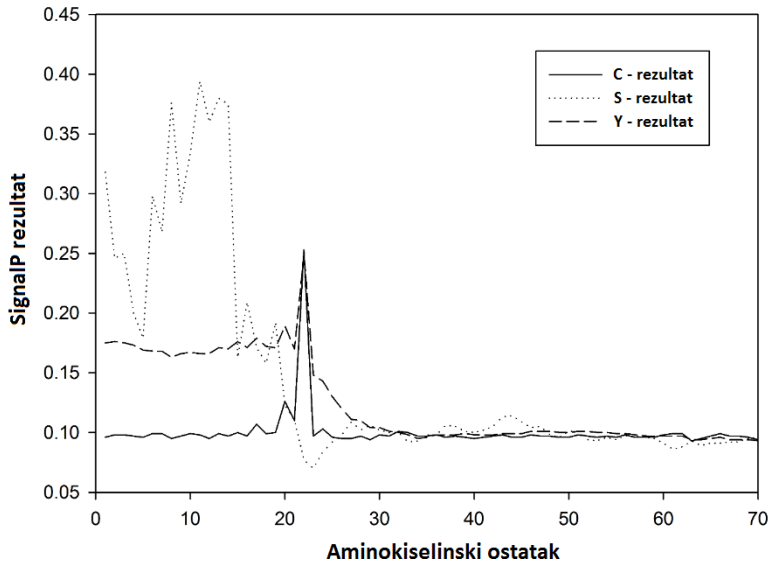
linearne Poisson-Boltzmannove jednadžbe (PB), dok se nepolarni određuje iz površine dostupne otapalu (engl. *solvent-accessible surface area*, SASA) prema izrazu 42, gdje su γ i β empirijski određeni parametri.

$$\Delta_{sol}H^{\circ}_{np} = \gamma SASA + \beta \tag{42}$$

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Simulacije slobodnog enzima *Bt*DPP III i Cys0 mutanta

Kristalografski određena zatvorena struktura selenometioninom obilježenog mutanta kojem su svi cisteini prevedeni u serine (Cys0 mutant) dipeptidil-peptidaze III iz *Bacteroides thetaiotaomicron* (PDB kod: 5NA7)[6] korištena je kao polazna struktura za MD simulacije. Za potrebe provođenja simulacija, kako bi se dobio divlji tip enzima, serinski aminokiselinski ostaci 158, 189, 425 i 450 mutanta prevedeni su u cisteinske, a selenometioninski (83, 103, 122, 165, 207, 513, 517, 534, 556 i 660) u metioninske . Za ove izmjene korišten je *tleap* modul[101] programskog paketa AMBER14.[102] Slijed od 23 aminokiseline koji u kristalnoj strukturi nedostaje s N-terminusa enzima podvrgnut je analizi na SignalP[103] serveru. Rezutati ukazuju da aminokiseline Met1–Lys15 vjerojatno sačinjavanju signalnu sekvencu (slika 13), te su one isključene iz daljnih razmatranja. Slijed Thr16–Lys23 rekonstruiran je programom Modeller 9.14,[104] koristeći humani ortolog (PDB kod: 3FVY)[5] kao predložak. Svi aminokiselinski ostaci Arg su pozitivno, a ostaci Asp negativno nabijeni, u skladu s fiziološkim uvjetima. Protonacijska stanja histidina određena su ručno na način da se maksimizira broj potencijalnih vodikovih veza.



Slika 13. Predviđanje signalne sekvence *Bt*DPP III. C-rezultat predviđa mjesto cijepanja, S-rezultat govori o vjerojatnosti da je pojedina aminokiselina dio signalne sekvence, dok Y predstavlja kombinaciju (geometrijsku sredinu) C- i S-rezultata.

Za parametrizaciju enzima korištena su tri polja sila dostupna u AMBER14 programskom paketu: ff03,[105] ff12SB[106] te ff14SB.[107] Ion cinka opisan je van der Waalsovim radijusom i nabojem korištenima u prijašnjim radovima na srodnim sustavima.[58,108] Solvatacija sustava provedena je eksplicitno, umetanjem enzima u krnji oktaedar s TIP3P molekulama vode.[91] Kako bi se osigurala elektroneutralnost sustava, dodana su 23 iona natrija.[109]

Na opisani način priređeni sustav optimiziran je u tri ciklusa; 1500 optimizacijskih koraka u kojima je gibanje soluta (enzima) bilo ograničeno harmoničkim potencijalom s konstantom sile od 134 $kJmol^{-1}Å^{-1}$, 2500 optimizacijskih koraka u kojima su otapalo i okosnica proteina bili relaksirani dok je gibanje iona cinka u aktivnom mjestu bilo ograničeno istim potencijalom, te naposljetku 1500 optimizacijskih koraka pri kojima niti jedan način gibanja nije bio ograničen.

Optimizirani sustav je tijekom 50 ps zagrijan s 0 na 300 K uz korištenje *NVT* ansambla nakon čega je provedena ekvilibracija te molekulsko-dinamičke simulacije uz korištenje *NPT* uvjeta u trajanju od 200 ns. Kod uporabe ff03 i ff12SB polja sustav je bio simuliran koristeći konvencionalnu (ili standardnu) molekulsku dinamiku (engl. *conventional molecular dynamics*, cMD), dok je u slučaju ff14SB korištena i konvencionalna, ali i molekulska dinamika s dodanim potencijalom[18] (engl. *accelerated molecular dynamics*, aMD). Kako se pretpostavljalo da će opisani sustav prolaziti kroz velike konformacijske promjene, korišten je pristup u kojem se dodaju dva potencijala; jedan na torzijski član a drugi na ukupnu energiju (engl. *dual-boost approach*; MD simulacije s dvostrukim poticajem).[98] Time se postiže brža reorganizacija vode, koja je u takvim situacijama (vremenski) limitirajući faktor. Za regulaciju temperature korišten je Langevinov termostat[110] uz frekvenciju sudara od 1 ps^{-1}, dok je tlak održavan Berendsenovim barostatom.[111] Vremenski korak tijekom zagrijavanja iznosio je 1 fs, dok je kod produkcijskih simulacija, uz primjenu SHAKE algoritma[89,112] za restrikciju C-H vibracija, korišten korak od 2 fs.

C450S mutant, čija hidrolitička aktivnost je znatno manja od one divljeg tipa,[16] priređen je iz prethodne (gore opisanim načinom dobivene) polazne strukture divljeg tipa enzima za molekulsko-dinamičke simulacije korištenjem programa *tleap* u sklopu programskog paketa AMBER14.

Cys0 mutant priređen je iz kristalne strukture te je simuliran 200 ns koristeći konvencionalnu molekulsku dinamiku i ff12SB polje sila. Svi simulacijski uvjeti istovjetni su onima za divlji tip enzima.

3.2. Simulacije kompleksa enzima *Bt*DPP III i C450S mutanta sa supstratima

Proučavani su kompleksi *Bt*DPP III sa sintetskim supstratima Arg_2-2-naftilamidom (RRNA), koji se pokazao kao najbolji dosad poznati supstrat *Bt*DPP III, i Lys-Ala-2-naftilamidom (KANA), čija je relativna brzina hidrolize za red veličine manja.[16] Za njihov opis korišteno je polje sila gaff[113] (engl. *general Amber force field*), dok su nedostajući parametri određeni Antechamber[114] modulom u sklopu programskog paketa AMBER14. Za određivanje atomskih naboja korištena je AM1-BCC metoda[115,116] koja se bazira na računanju naboja semiempirijskom AM1 metodom, nakon čega se uvode korekcije kako bi se dobili točniji naboji (engl. *bond charge corrections*, BCC).

Polazna struktura u simulacijama kompleksa *Bt*DPP III–RRNA izgrađena je ručno, polazeći od strukture kompleksa humanog ortologa s RRNA[44] koja je bazirana na kristalografski određenoj strukturi hDPP III s tinorfinom.[5] Kako bi se postiglo optimalno smještanje supstrata unutar enzima, kao polazna struktura *Bt*DPP III korištena je otvorena forma koja je prethodno minimizirana i ekvilibrirana. *Bt*DPP III–RRNA kompleks simuliran je 200 ns koristeći standardnu dinamiku i ff12SB polje sila te aMD i ff14SB polje sila.

Kompleks *Bt*DPP III s KANA priređen je iz strukture kompleksa *Bt*DPP III–RRNA s najnižom energijom vezanja. On je simuliran 100 ns uz korištenje istih metoda i uvjeta kao kompleks s RRNA. Postupak minimizacija i ekvilibracije te svi ostali uvjeti kod oba kompleksa bili su identični onima korištenim pri opisu slobodnog enzima.

C450S mutant *Bt*DPP III priređen je korištenjem tleap modula programskog paketa AMBER16. Polazna struktura C450S mutanta s RRNA izgrađena je iz strukture *Bt*DPP III–RRNA kompleksa s najnižom energijom vezanja te je on simuliran 10 ns konvencionalnom dinamikom kako bi se mogli odrediti parametri za aMD simulacije, koje su provedene u trajanju od 100 ns.

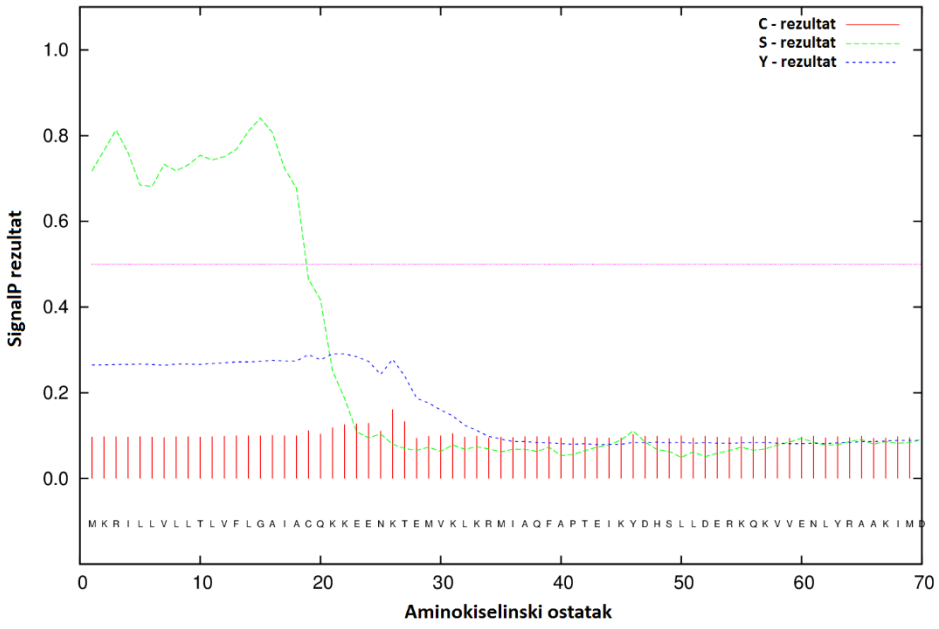
3.3. Simulacije kompleksa enzima *Bt*DPP III s inhibitorima

Računalno su proučavani inhibitori Phe-Gly-NHOH i Tyr-Phe-NHOH, za koje je eksperimentalno utvrđeno da im se inhibicijska moć razlikuje za red veličine,[57] te tinorfin (Val-Val-Tyr-Pro-Trp). Kompleksi s Phe-Gly-NHOH i Tyr-Phe-NHOH priređeni su iz *Bt*DPP III–RRNA kompleksa s najnižom energijom vezanja, dok je kompleks *Bt*DPP III s tinorfinom priređen iz kristalografski određene strukture kompleksa hDPP III s tinorfinom.[5]

Kompleksi s Phe-Gly-NHOH i Tyr-Phe-NHOH simulirani su po 100 ns uz ff14SB polje sila konvencionalnom dinamikom dok su kod tinorfina provedene i aMD simulacije u trajanju od 100 ns. Postupak minimizacija i ekvilibracije te svi ostali uvjeti kod oba kompleksa identični su onima korištenim pri opisu slobodnog enzima.

3.4. Simulacije slobodnog enzima *Ca*DPP III

Kristalografski određena struktura divljeg tipa *Ca*DPP III korištena je kao polazna točka u simulacijama slobodnog enzima. Sekvenca aminokiselina koja je nedostajala s N-terminusa enzima (Met1–Lys31) analizirana je pomoću Signal P servera (slika 14) kojim je utvrđeno da aminokiseline Met1–Ala18 vrlo vjerojatno čine signalni slijed, te su izuzete iz daljnjeg razmatranja. Cys19–Lys31 slijed rekonstruiran je programom Modeller 9.14,[104] koristeći humani ortolog (PDB kod: 3FVY)[5] kao predložak.



Slika 14. Predviđanje signalne sekvence kod *Ca*DPP III. C-rezultat predviđa mjesto cijepanja, S-rezultat govori o vjerojatnosti da je pojedina aminokiselina dio signalne sekvence, dok Y predstavlja kombinaciju (geometrijsku sredinu) C- i S-rezultata.

Protonacijska stanja aminokiselinskih ostataka određena su na isti način kao i kod *Bt*DPP III. Sustav je opisan ff14SB poljem sila koristeći standardnu molekulsku dinamiku i ubrzanu dinamiku s dvostrukim poticajem; ioni cinka i otapalo tretirani su na način opisan kod *Bt*DPP III, dok je elektroneutralnost sustava postignuta dodatkom ionâ natrija. Korišteni su isti

optimizacijski ciklusi, dok je ekvilibracija rađena u dva dijela; 30 ns zagrijavanja s 0 na 300 K te 170 ps uravnoteženja pri 300 K uz optimizacijske korake od 1 fs. Regulacije temperature i tlaka te restrikcija C-H vibracija implementirane su na način opisan u prethodnim poglavljima. Za izvođenje svih simulacija korišten je Amber16 programski paket.[117]

3.5. Simulacije kompleksa enzima *Ca*DPP III sa supstratima

Kao supstrati od interesa odabrani su RRNA i Gly-Arg-2-naftilamid (GRNA) budući *Ca*DPP III, za razliku od većine ostalih ortologa porodice M49, pokazuje značajnu hidrolitičku aktivnost i prema GRNA.[7] Polazna struktura kompleksa *Ca*DPP III–RRNA izgrađena je iz kristalografski određene strukture *Ca*DPP III te prethodno opisanih kompleksa RRNA s *Bt*DPP III i hDPP III,[44,118] dok je kompleks s GRNA priređen iz struktura dobivenih simulacijom kompleksa *Ca*DPP III–RRNA. Za opis supstrata korišteno je *gaff2* polje sila, a nedostajući parametri određeni su korištenjem Antechamber modula u sklopu Amber16 programskog paketa uz iste postavke kao i za komplekse *Bt*DPP III. Kompleksi su simulirani 100 ns standardnom molekulskom dinamikom, te nakon toga još 100 ns ubrzanom dinamikom s dvostrukim poticajem.

3.6. Simulacije kompleksa enzima *Ca*DPP III s inhibitorima

Kompleks *Ca*DPP III s inhibitorom priređen je kombiniranjem rezultata prethodno izvršenih simulacija sa supstratima te kristalografski određene strukture hDPP III s tinorfinom.[5] Kompleksi s hidroksamatnim inhibitorimaH-Phe-Gly-NHOH i H-Tyr-Phe-NHOH simulirani su 100 ns standardnom molekulskom dinamikom uz polje sila ff14SB. Kompleks s tinorfinom neovisno je simuliran 100 ns standardnom i 100 ns ubrzanom molekulskom dinamikom uz isto polje sila. Uvjeti tijekom simulacija bili su identični onima kod supstrata.

3.7. Parametri ubrzane molekulske dinamike

Parametri za ubrzanu molekulsku dinamiku određeni su na temelju uobičajenih MD simulacija sustava (tablica 3). Vrijednosti energetskih pragova $E_{threshP}$ i $E_{threshD}$ te pripadnih parametara α_P i α_D izračunate su na način opisan u radu Piercea i suradnika (izrazi 43 - 46).[18] $\overline{E_{pot}}$ i $\overline{E_{tor}}$ predstavljaju srednje vrijednosti potencijalne, odnosno torzijske energije izračunate iz konvencionalnih simulacija, N_{atm} i N_{res} odgovaraju broju atoma u sustavu i broju aminokiselinskih ostataka soluta, dok su E_{atm} i E_{res} jedinične energije dodane za svaki atom,

odnosno aminokiselinski ostatak. Za njihove vrijednosti uzete su 1 kcalmol^{-1} po ostatku te 0,1 kcalmol^{-1} po atomu obzirom da se takav izbor pokazao najprikladnijim za humani ortolog.[119]

$$E_{threshP} = \overline{E_{pot}} + N_{atm}E_{atm} \tag{43}$$

$$\alpha_P = N_{atm}E_{atm} \tag{44}$$

$$E_{threshD} = \overline{E_{tor}} + N_{res}E_{res} \tag{45}$$

$$\alpha_D = \frac{1}{5}N_{res}E_{res} \tag{46}$$

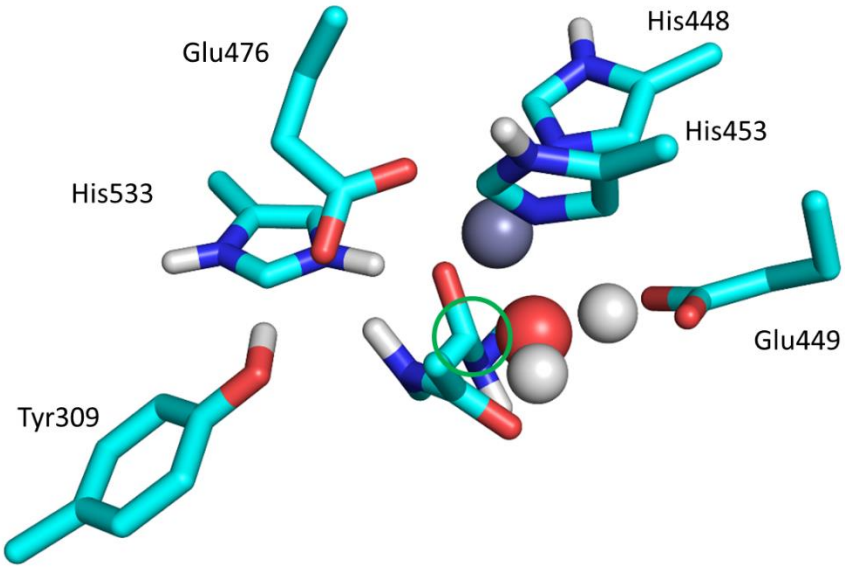
Tablica 3. Pregled parametara korištenih u ubrzanim MD simulacijama *Bt*DPP III, *Ca*DPP III i njihovih kompleksa sa sintetskim supstratima, odnosno inhibitorima. Sve energije date su u kcalmol^{-1}. $\overline{E_{pot}}$ i $\overline{E_{tor}}$ su srednje vrijednosti potencijalne, odnosno torzijske energije u standardnim MD simulacijama, dok su E_{threshP} i E_{threshD} energijski pragovi ispod kojih se dodaje poticajni potencijal. Parametrima α_P i α_D regulira se iznos dodanog potencijala.

Sustav	N_{atm}[a]	$\overline{E_{pot}}$	$E_{threshP}$	α_P	N_{res}[b]	$\overline{E_{tor}}$	$E_{threshD}$	α_D
*Bt*DPP III	86622	-263552	-254890	8662	660	8463	9123	132
*Bt*DPP III - RRNA	80589	-243986	-235927	8059	661	8522	9183	132
C450S *Bt*DPP III - RRNA	82023	-263092	-254890	8662	661	8462	9123	132
*Bt*DPP III - KANA	84330	-256216	-247783	8433	661	8510	9171	132
*Bt*DPP III - tinorfin	82291	-249597	-241367	8229	664	8540	9203	132
*Ca*DPP III	53599	-159315	-153955	5360	541	7027	7567	108
*Ca*DPP III - RRNA	66574	-20014	193356	6657	543	7080	7624	108
HEISGH *Ca*DPP III[c] - RRNA	66126	-198437	-191758	6612	543	7066	7612	108
*Ca*DPP III - GRNA	70296	-211870	-204840	7029	543	7089	7631	108
*Ca*DPP III - tinorfin	70494	-212461	-205392	7049	547	7109	7667	109

[a]Broj atoma u sustavu
[b]Broj aminokiselinskih ostataka soluta
[c]Mutant *Ca*DPP III u kojem je jedinstveni pentapeptidni motiv HEISH zamijenjen heksapeptidnim motivom HEISGH

3.8. Kvantno-mehanički račun mehanizma katalize *Bt*DPP III na modelnom sustavu

Polazna struktura modelnog sustava priređena je koristeći rezultate MD simulacija kompleksa *Bt*DPP III s RRNA, poznatu strukturu modelnog sustava na kojem je proučavan mehanizam hDPP III[4] te kristalnu strukturu *Bt*DPP III.[6] Kao modelni supstrat odabran je minimalni model dipeptida, CH_3CO-Gly-$NHCH_3$. Kao model aktivnog mjesta uzeti su aminokiselinski ogranci Tyr309, His448, Glu449, His453, Glu476 i His533 te ion cinka (slika 15). Na mjesto Cβ atoma ovih aminokiselina uvedena je metilna skupina čiji je položaj fiksiran u prostoru. Za protonacijsko stanje His533 uzeto je ono u kojem su oba dušika protonirana jer se vodik vezan za Nε pokazao važnim u stabilizaciji međuprodukata kod humanog ortologa.[4]



Slika 15. Modelni sustav za proučavanje katalitičkog mehanizma *Bt*DPP III. Ugljikov atom karbonilne skupine na kojem dolazi do adicije vode što naposlijetku uzrokuje cijepanje peptidne veze naznačen je zelenom kružnicom. Ion cinka prikazan je kao tamno-siva kuglica. Slika je izrađena programom PyMol.

Pri opisu sustava korišten je B97D funkcional.[120] Za opis atoma ugljika, vodika, dušika i kisika upotrijebljen je 6-31G(d) osnovni skup, dok je za ion cinka korišten skup efektivnog potencijala jezgre (engl. *effective core potential*, ECP) LANL2DZ.[121] Za sve izračune korišten je program Gaussian09.[122] Otapalo je tretirano implicitno, PCM pristupom uz SMD formalizam.[123] Vibracijska analiza svih identicifiranih međuprodukata i prijelaznih stanja izvršena je uz iste uvjete.

3.9. Analiza rezultata

3.9.1. Geometrijski parametri i vodikove veze

Za određivanje svih geometrijskih parametara te analizu vodikovih veza korišten je cpptraj modul[124] programskog paketa AMBER14, odnosno AMBER16. Kao geometrijski parametri od interesa razmatrani su korijen srednjeg kvadrata odstupanja (engl. *root mean square deviation*, RMSD) i korijen srednjeg kvadrata fluktuacija (engl. *root mean square fluctuation*, RMSF), dani izrazima 47 i 48, radijus giracije (R_g, izraz 49) te udaljenosti među aminokiselinskim ostacima koje su definirane kao udaljenost među njihovim Cα atomima. Prilikom računanja R_g, RMSF i RMSD vrijednosti u obzir su uzeti samo atomi okosnice proteina kako bi se izbjegle velike varijacije u vrijednostima koje su posljedica stohastičkog gibanja bočnih ogranaka.

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N}\left(r_{i,A} - r_{i,B}\right)^2}{N}} \tag{47}$$

$$RMSF = \sqrt{\frac{\sum_{t_j}^{T}\left(x_i(t_j) - \tilde{x}_i\right)^2}{T}} \tag{48}$$

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum_i (R_i - R_{cm})^2}{N}} \tag{49}$$

Kod određivanja vodikovih veza kao granične vrijednosti uzeto je 135° za kut te 3,0 Å za udaljenost.

Površina molekule dostupna otapalu (engl. *solvent accessible surface area*, SASA) izračunata je korištenjem programa NACCESS.[125,126] Korištena je proba radijusa 1,40 Å

3.9.2. Analiza glavnih komponenata

Kako se tijekom dugih MD simulacija generira izrazito velik broj struktura, javila se potreba za matematičkom metodom kojom bi se reducirala složenost prikupljenih podataka te omogućilo uočavanja nekoreliranih, sistematičnih gibanja unutar proteina (poput reorijentacije domena ili konformacijskih promjena uslijed vezanja liganda). Metoda analize glavnih komponenata (engl. *principal component analysis*, PCA) reducira broj varijabli kojima je sustav opisan na način da generira nekorelirane varijable koje opisuju čim veću promjenu varijabilnosti u razmatranom skupu podataka.

Kod usporedbe polja sila, analiza glavnih komponenata je izvršena na način opisan u radu Roea i suradnika.[127] Nakon određivanja prosječne geometrije svih generiranih struktura (uz sva polja sila) sve su strukture superponirane na uprosječenu, te su glavne komponente generirane na temelju svih struktura. Naposljetku su trajektorije dobivene pojedinim poljem sila projicirane na dvije glavne komponente. Prilikom određivanja glavnih komponenata prvih 14 aminokiselina u *Bt*DPP III izuzete su iz razmatranja jer tvore nestrukturiranu regiju ("rep") čiji nasumični pomaci predstavljaju dominantan mod gibanja.

3.9.3. MM-PBSA račun slobodne energije

Za izračun energija vezanja liganda, kao i procjenu energije slobodnog enzima korištena je MMPBSA.py implementacija[100] MM-PBSA metode u sklopu programskih paketa AMBER14 i AMBER16. Energije su računate za svaki 5 ns dug segment trajektorija. Ionska jakost iznosila je 0,15 mM dok je dielektrična konstanta proteina bila 1,0, a otapala 80,0 (voda). Nepolarni doprinos energiji otapanja računat je dvočlanim pristupom koji uključuje kavitacijski i disperzijski doprinos.[128] Kod računa energija vezanja liganada korišten je pristup jedne trajektorije. Uz iste postavke izračunate su i pripadne MM-GBSA energije, koristeći poopćeni Bornov model (engl. *Generalized Born, GB*) koji su razvili Onufriev i suradnici.[129] Prilikom izračuna energija vezanja entropijski doprinos bio je zanemaren budući je cilj računa slobodnih energija bila usporedba strukturno sličnih supstrata, te je razumno pretpostaviti da se entropijski doprinosi u velikoj mjeri poništavaju. Uz to, račun entropije za sustave veličine promatranog izuzetno je računalno zahtjevan, a postoji osnovana sumnja da bi uveo znatno raspršenje (devijaciju) u rezultate[130,131] koji već imaju veliku standardnu devijaciju inherentnu MM-PBSA metodi.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Struktura i dinamika DPP III iz *Bacteroides thetaiotaomicron*

Polazna točka u izradi ove disertacije bila je kristalografski riješena struktura DPP III iz *Bacteroides thetaiotaomicron* (PDB kod 5NA6).[6] Usprkos niskoj identičnosti sekvenci s humanim ortologom, koja iznosi svega 17 %,[6] trodimenzionalne strukture su im slične, što je osobito vidljivo ako se usporede RMSD vrijednosti pojedinih domena (tablica 4).

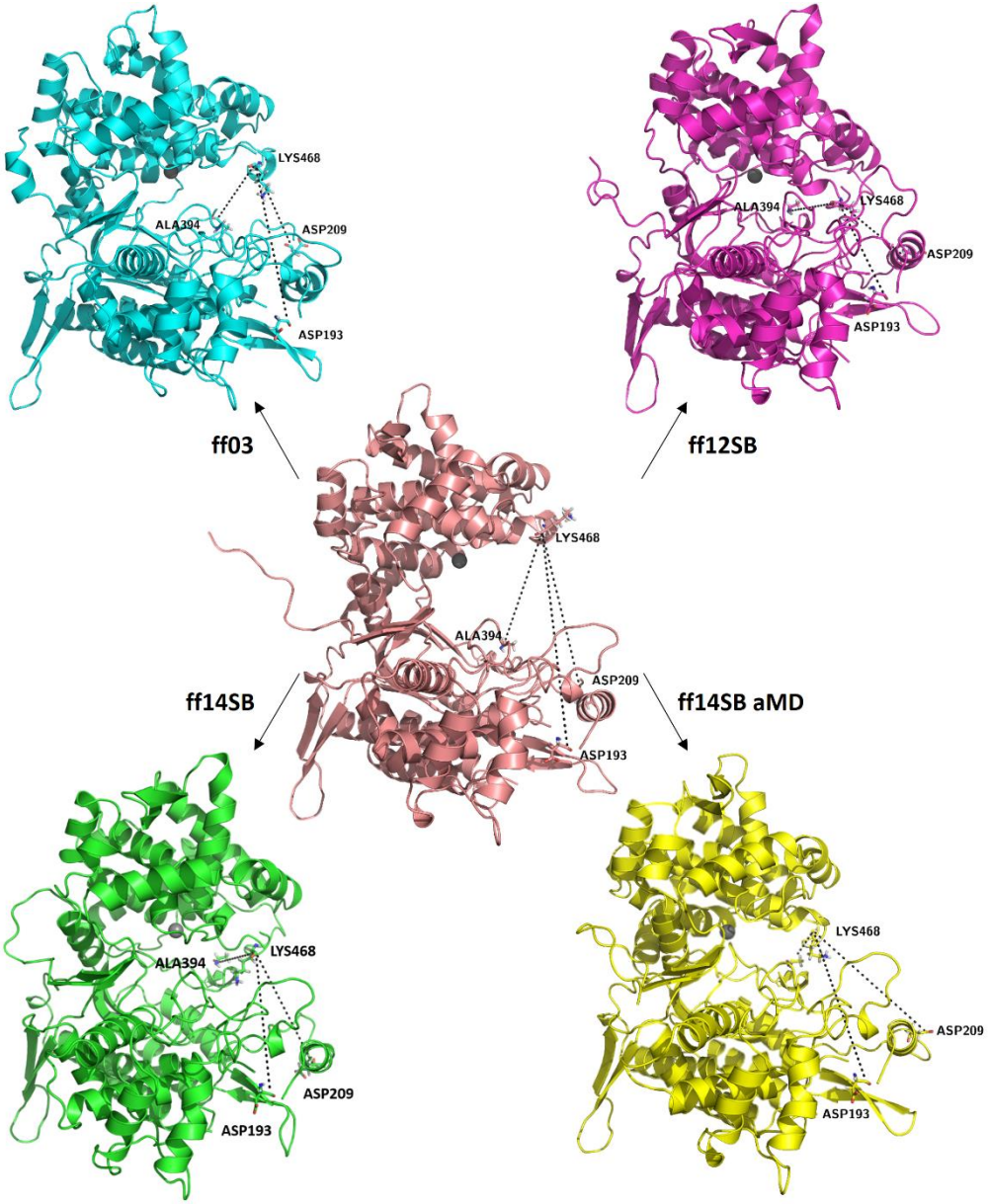
Tablica 4. RMSD vrijednosti *Bt*DPP III i pojedinih domena u odnosu na hDPP III. Podaci su preuzeti iz rada Sabljića i suradnika.[6]

Sustav	RMSD / Å
Cijeli enzim	4,4
Donja domena	2,0
Gornja domena	3,0

Procjep između domena, vidljiv u strukturi humanog ortologa,[5] prisutan je i kod *Bt*DPP III, a ispitivanja hidrolitičke aktivnosti prema sintetskim supstratima ukazuju na njenu široku supstratnu specifičnost.[16] Zbog navedenog i sličnosti s hDPP III, pretpostavljeno je postojanje konformacijskih promjena dugog dosega *Bt*DPP III sličnih onima utvrđenim za humani ortolog na temelju kristalografski određenih struktura[5] i računalnih studija.[10,44]

Pregledom postojeće literature vidljivo je da se za parametrizaciju hDPP III uspješno koristilo ff03[9,10,58], a u QM/MM računima i parm96[4] polje sila, no nema podataka o korištenju novijih polja sila poput ff12SB i ff14SB za opis DPP III. Stoga su vršene duge MD simulacije uz upotrebu ff03, ff12SB i ff14SB polja sila kako bi se ispitala njihova prikladnost za opis *Bt*DPP III, a u slučaju ff14SB testirana je i ubrzana molekulska dinamika s dvostrukim poticajem.

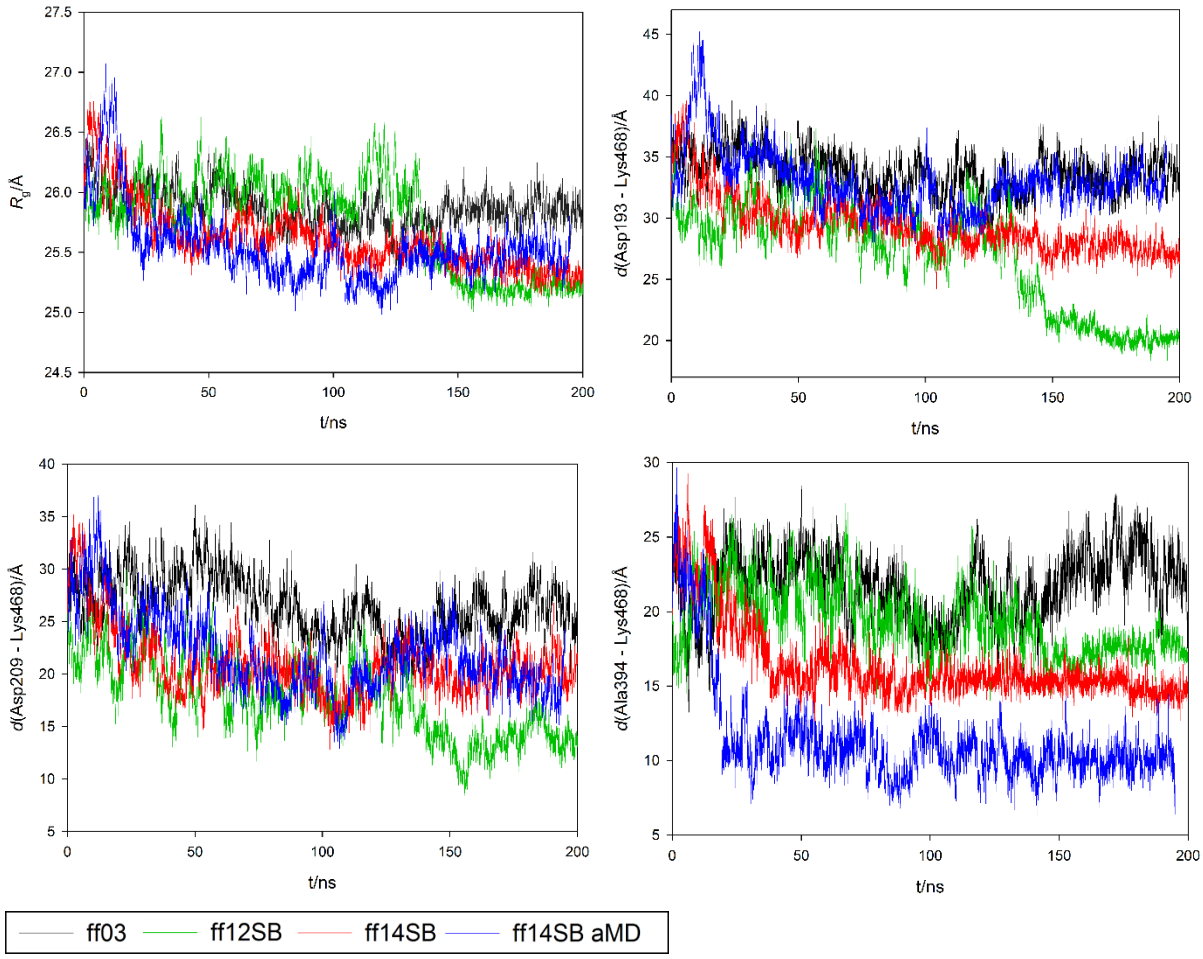
Tijekom 200 ns MD simulacija uz korištenje ff12SB i ff14SB polja sila došlo je do konformacijske promjene koja se može opisati kao "zatvaranje" proteina, odnosno primicanje domena, dok je kod upotrebe ff03 polja sila došlo do parcijalnog zatvaranja (slika 16).



Slika 16. Kristalna struktura *Bt*DPP III (u sredini) te strukture dobivene nakon 200 ns MD simulacija uz korištenje ff03 (gore lijevo), ff12SB (gore desno), ff14SB (dolje lijevo) te ff14SB polja sila uz ubrzanu dinamiku (dolje desno). Udaljenosti među aminokiselinama čijim se praćenjem kvantificira zatvaranje prikazane su kao isprekidane crne linije. Ion cinka prikazan je kao siva kuglica. Slika je izrađena uz pomoć programa PyMol.[56]

Ova konformacijska promjena bila je popraćena promjenom radijusa giracije (R_g) te promjenom udaljenosti među parovima aminokiselina Asp193–Lys468 (d_1), Asp209–Lys468 (d_2) i Ala394–Lys468 (d_3) (slike 16 i 17). Geometrijski parametri odabrani su kako bi bili analogni onima praćenim kod MD simulacija humanog ortologa.[10] Radijus giracije nije se

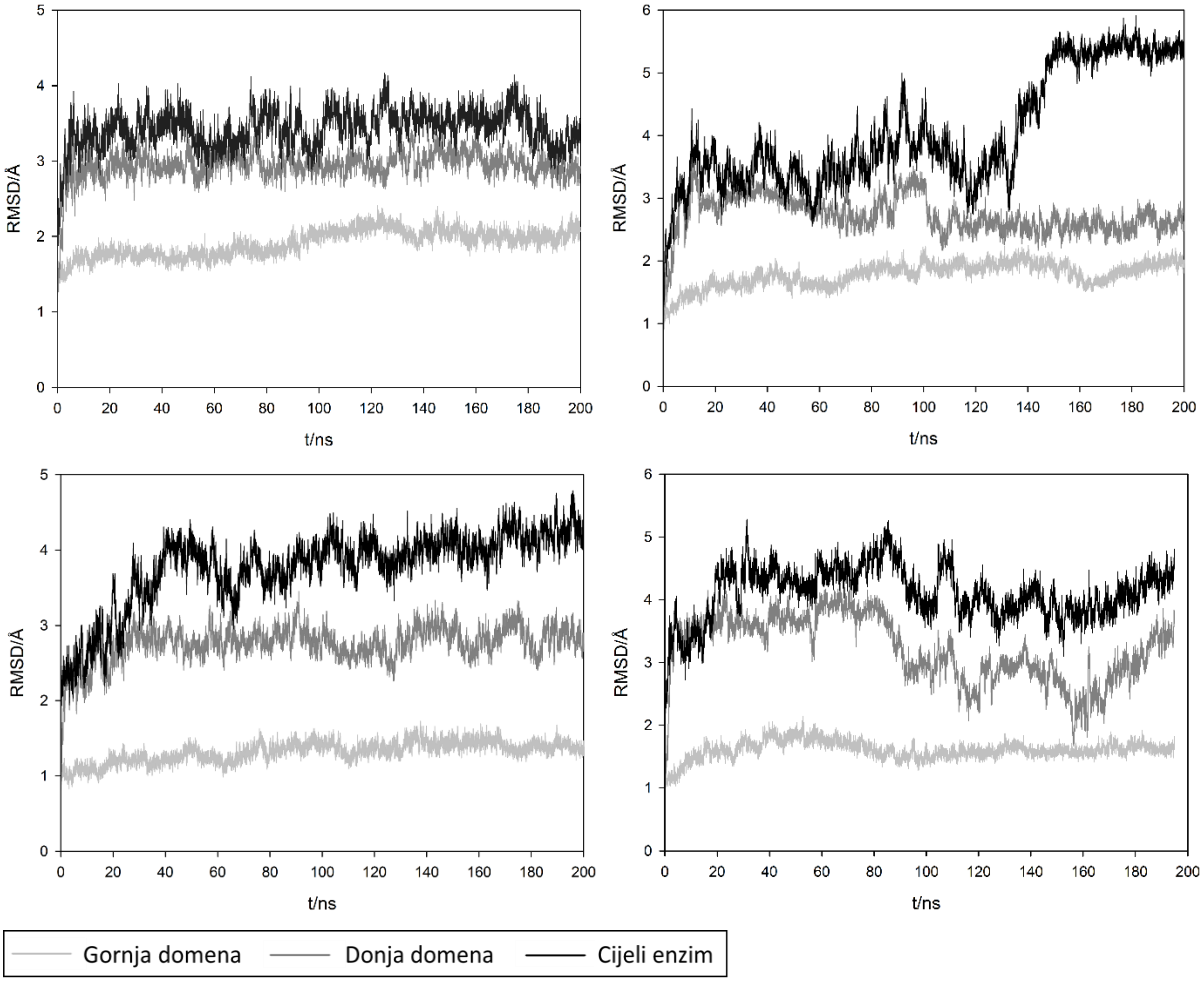
pokazao idealnom veličinom za praćenje gibanja domena jer *Bt*DPP III, za razliku od hDPP III, ima veći broj nestrukturiranih regija što rezultira velikim (nasumičnim) fluktuacijama R_g vrijednosti. No, nagli pad d_1, d_2 te d_3 udaljenosti zorno opisuje primicanje gornje i donje domene enzima. Udaljenost d_1 poglavito opisuje primicanje domena, dok su promjene d_2 i d_3 povezane sa "smicanjem", odnosno pomakom domena u ravnini okomitoj na smjer zatvaranja.



Slika 17. Promjena radijusa giracije te udaljenosti d_1, d_2 i d_3 tijekom 200 ns MD simulacija *Bt*DPP III uz korištenje ff03 (gore lijevo), ff12SB (gore desno) i ff14SB polja sila (dolje lijevo), te ff14SB polja sila uz ubrzanu molekulsku dinamiku (dolje desno).

Kako bi se provjerila pretpostavka da je konformacijska promjena sistematično usmjereno gibanje tijekom kojeg dolazi samo do primicanja domena, izračunate su RMSD vrijednosti za cijeli enzim te za pojedine domene (slika 18). Nakon inicijalne promjene, najvjerojatnije uzrokovane razlikom u kristalografskim i simuliranim uvjetima, uočljivo je kako struktura pojedine domena ostaje očuvana te se većina promjene RMSD vrijednosti cijelog proteina

uistinu može pripisati zatvaranju enzima. U slučaju aMD simulacija primjećuju se veće oscilacije RMSD vrijednosti koje su posljedica dodanog potencijala.



Slika 18. RMSD vrijednosti tijekom tijekom 200 ns MD simulacija *Bt*DPP III uz korištenje ff03 (gore lijevo), ff12SB (gore desno) i ff14SB polja sila (dolje lijevo), te ff14SB polja sila uz ubrzanu molekulsku dinamiku (dolje desno).[118]

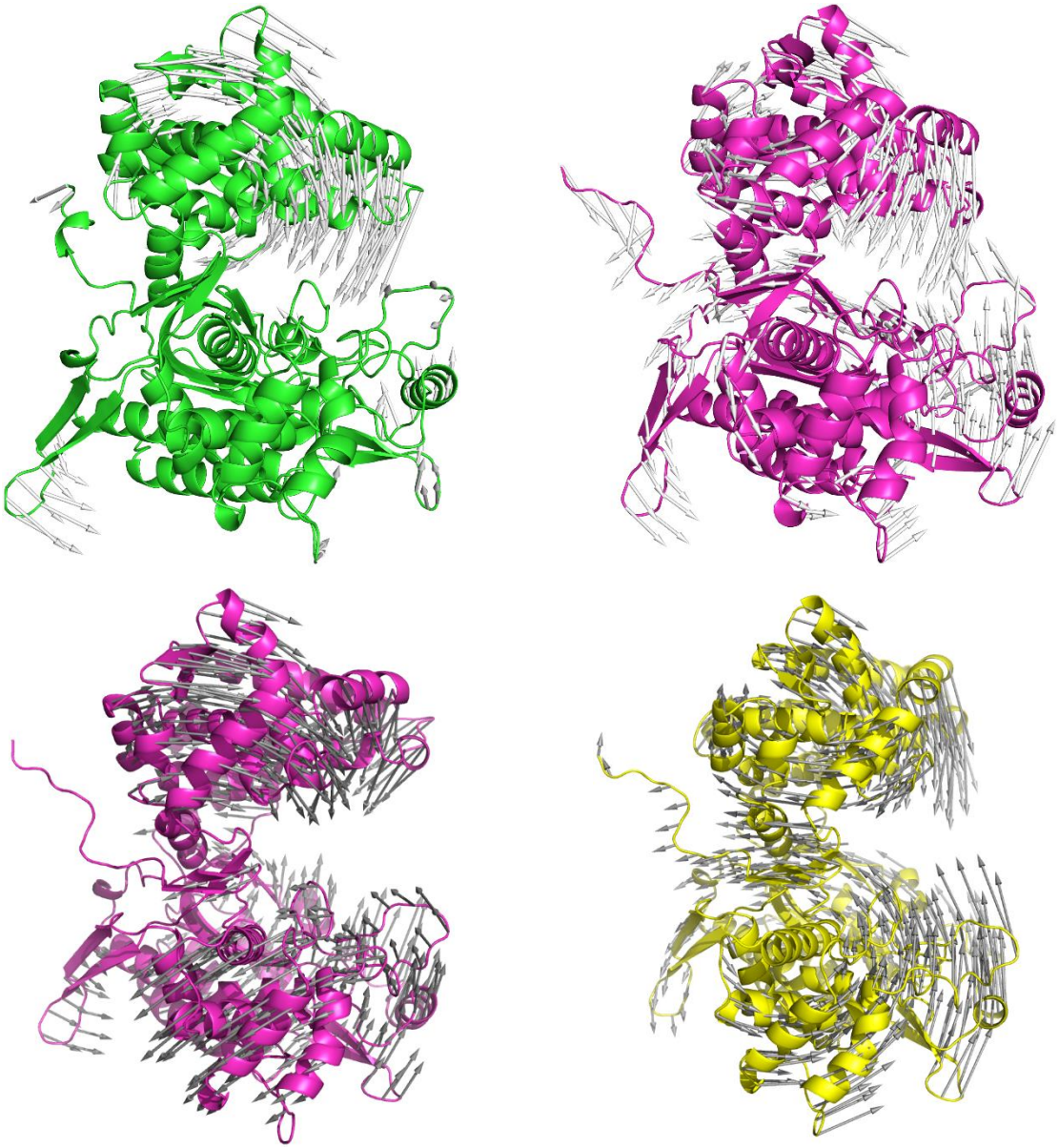
Konačne struktura enzima dobivenih pojedinim metodama, odabrane na temelju analize geometrijskih parametara, sugeriraju kako standardne MD simulacije uz polja sila ff12SB i ff14SB generiraju zatvorene strukture slične onoj eksperimentalno određenoj (tablica 5), za razliku od simulacija uz ff03 polje sila.

Tablica 5. Pregled geometrijskih parametara konačnih struktura određenih pojedinom metodom tijekom 200 ns MD simulacija.

Deskriptor	cWT[a]	cMD ff03	cMD ff12SB	cMD ff14SB	aMD ff14SB
R_g / Å	25	26	25	25	26
d_1(D193-K468) / Å	24	31	21	27	34
d_2(D208- K468) / Å	21	20	18	25	25
d_3(A394- K468) / Å	23	15	17	15	8

[a]Kristalografski određena zatvorena struktura *Bt*DPP III

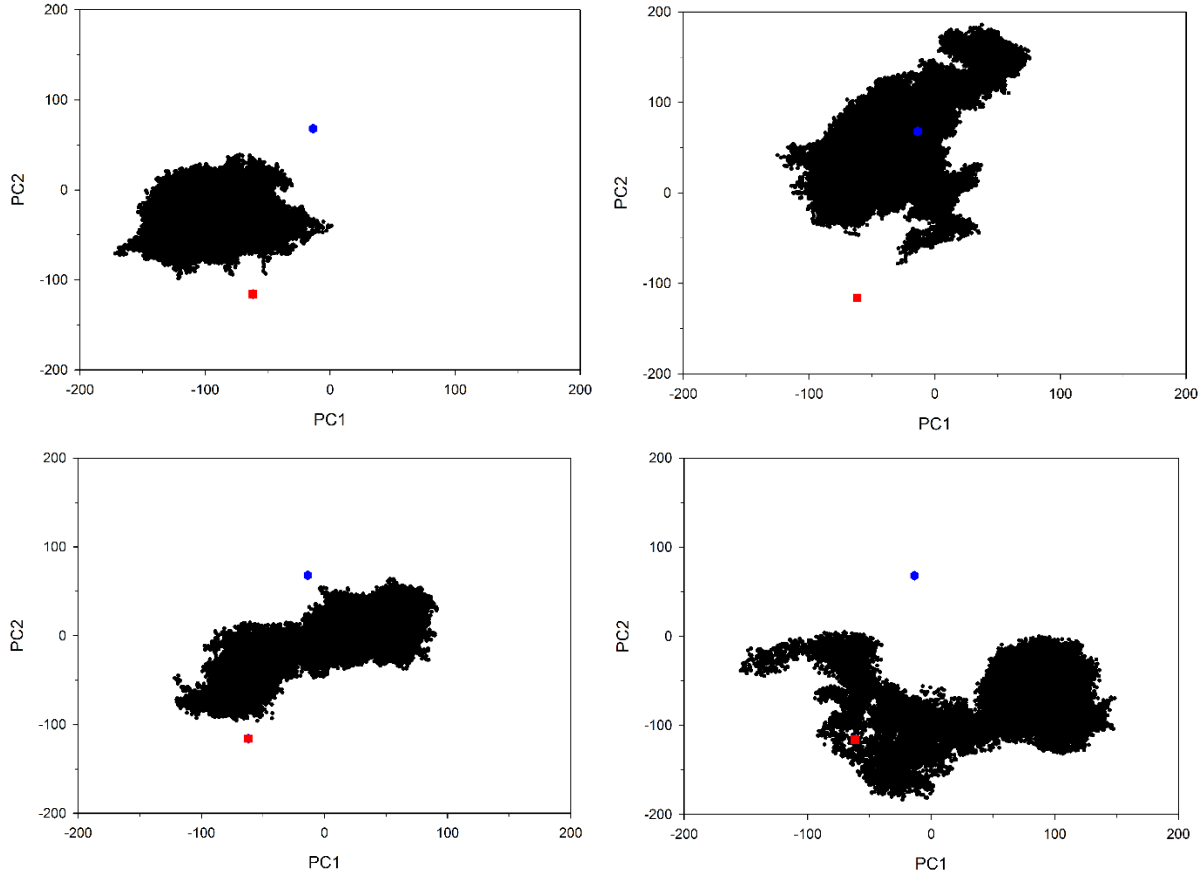
Uspješnost pojedinog polja sila u uzorkovanju konformacijskog prostora slobodnog enzima *Bt*DPP III kvantificirana je pomoću analize glavnih komponenata. Glavne komponente su generirane na način opisan u poglavlju 3.7.2, te prva glavna komponenta opisuje 43 %, a druga 30 % varijabilnosti sustava. Iz vizualizacije glavnih komponenata (slika 19) uočava se kako je primicanje domena dominantan način (mod) gibanja enzima, dok druga glavna komponenta opisuje "smicanje" domena, odnosno pomak u ravnini okomitoj na smjer zatvaranja. Sličan rezultat dobiven je i analizom glavnih modova provedenom pomoću servera grupe Delarue (slika 19).[132]



Slika 19. Vizualizacija prve (gore lijevo) i druge (gore desno) glavne komponente određene na temelju MD simulacija, te serverom Delarue grupe[132] predviđen prvi (dolje lijevo) i drugi (dolje desno) glavni mod gibanja. Duljina strelica (vektora) proporcionalna je njihovim iznosima.

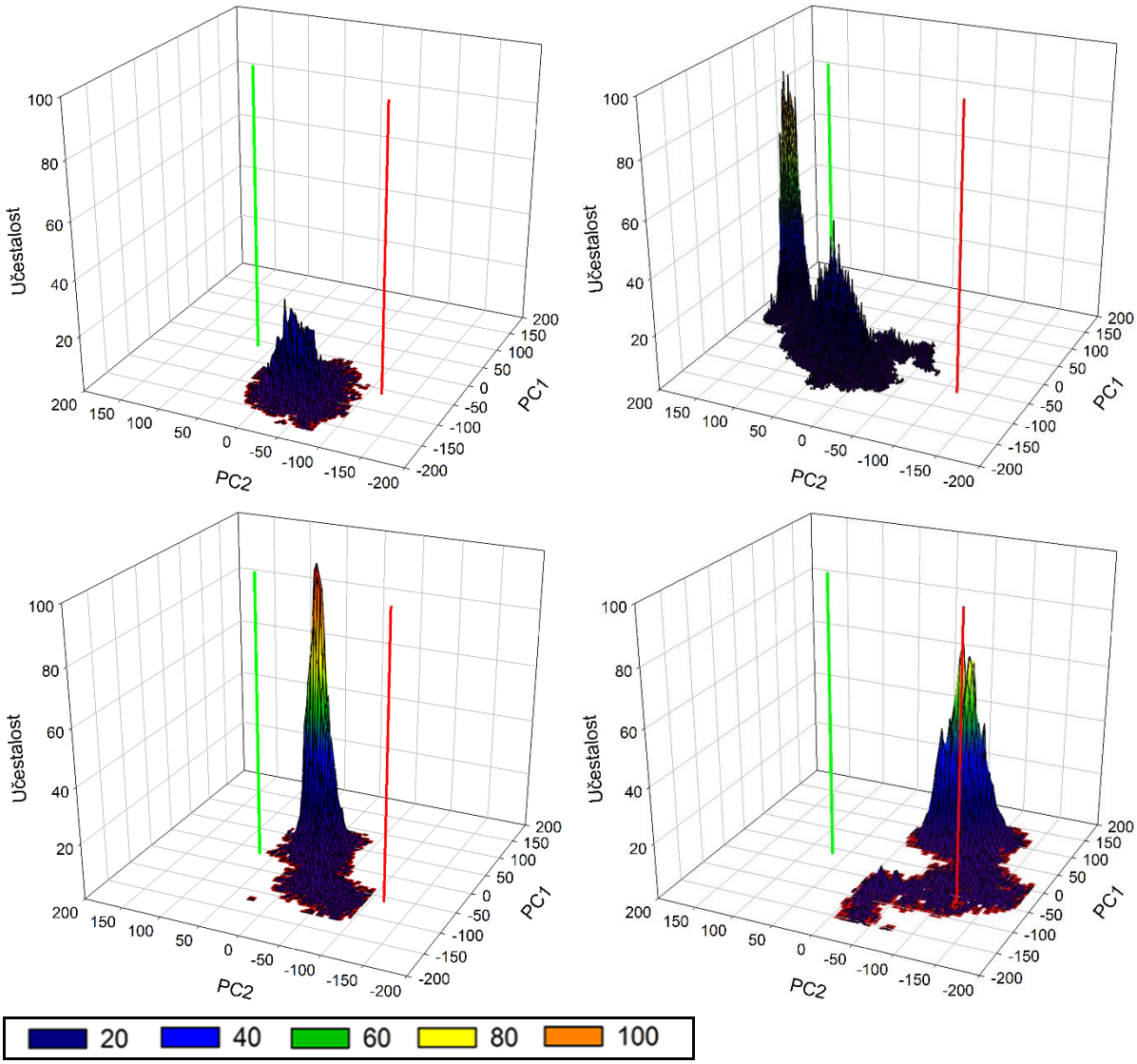
Vidljvo je da se u slučaju ff12SB, ff14SB te ff14SB polja sila uz ubrzanu dinamiku uzorkuje područje plohe potencijalne energije koje odgovara zatvorenoj formi enzima, dok kod ff03 polja sila to nije slučaj (slika 20). Uočava se da je ubrzanom molekulskom dinamikom dobiven mod gibanja različit od onog dobivenog standardnim MD simulacijama uz ff12SB i ff14SB polje sila. Postojanje više modova zatvaranja enzima opisano je i u sklopu humanog ortologa, gdje se mod zatvaranja uočen u prisutnosti supstrata razlikovao od onog u slobodnom enzimu.[10] Kako je uz upotrebu ff12SB polja sila reproduciran mod zatvaranja koji odgovara

kristalografskim podacima, a uz ff14SB pronađen alternativni mod vezanja, ove dvije metode korištene su u daljnjim simulacija kompleksa *Bt*DPP III sa supstratima i inhibitorima.

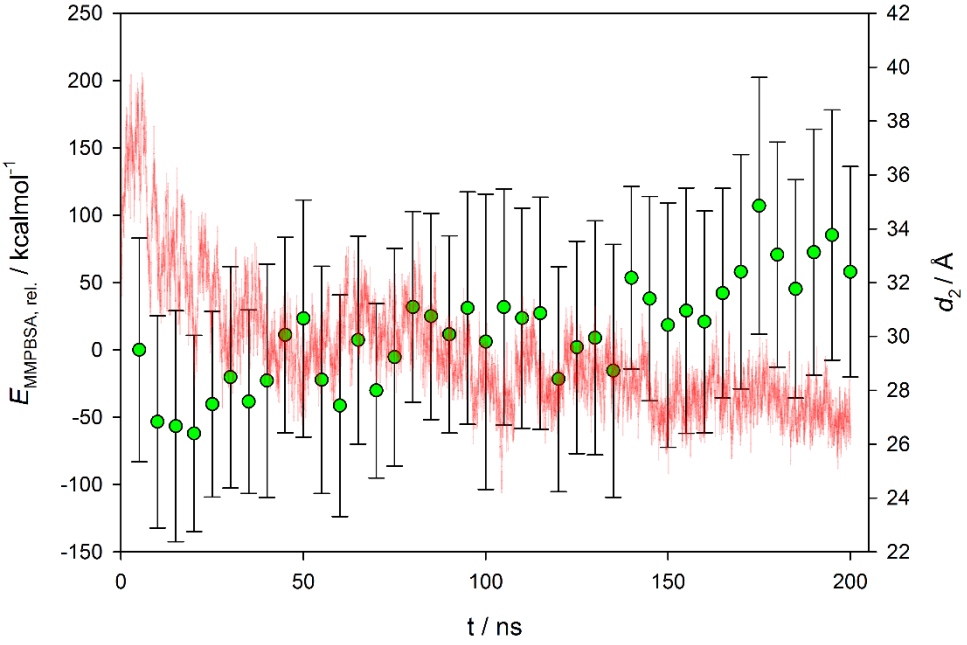


Slika 20. Strukture generirane tijekom 200 ns simulacija *Bt*DPP III uz korištenje ff03 (gore lijevo), ff12SB (gore desno) i ff14SB polja sila (dolje lijevo), te ff14SB polja sila uz ubrzanu molekulsku dinamiku (dolje desno) projicirane na dvije glavne komponente (PC1 i PC2). Kristalografski određena otvorena (PDB kod: 5NA7) i zatvorena (PDB kod: 5NA8) struktura prikazane su crvenom, odnosno plavom točkom.[118]

Kako je podrobnijom analizom dobivenih ploha potencijalne energije pokazano da sva polja sila koja uspješno opisuju zatvaranje proteina favoriziraju zatvorenu formu, tj. tijekom simulacija zatvorene forme učestalije su od "otvorenih" (slika 21), izračunate su pripadne energije enzima za svaki interval od 5 ns (slika 22). Usprkos velikim standardnim devijacijama, koje su posljedica većeg broja fleksibilnih (nestrukturiranih) regija, uočljiv je trend porasta relativne potencijalne energije sa zatvaranjem enzima, što je u skladu s rezultatima dobivenim za humanu DPP III.[10]

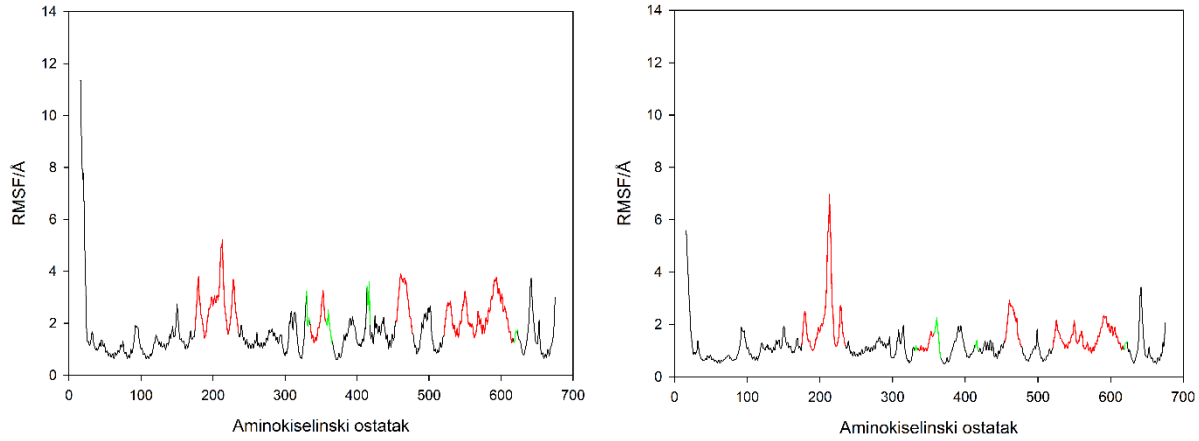


Slika 21. Histogrami 200 ns MD simulacija *Bt*DPP III uz korištenje ff03 (gore lijevo), ff12SB (gore desno) i ff14SB polja sila (dolje lijevo), te ff14SB polja sila uz ubrzanu molekulsku dinamiku (dolje desno). Kristalografski određena otvorena i zatvorena struktura prikazane crvenim, odnosno zelenim stupcem vrijednosti frekvencije 100.



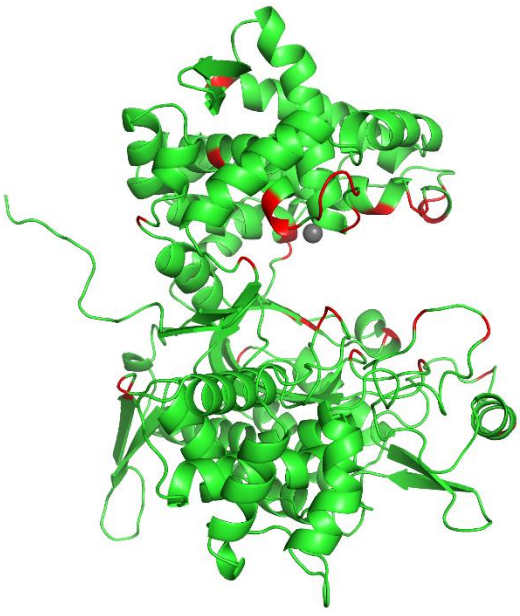
Slika 22. Relativne MM-PBSA energije *Bt*DPP III tijekom 200 ns aMD simulacija uz korištenje ff14SB polja sila. Energije su prikazane zelenim točkama uz pripadne standardne devijacije , a udaljenost d_2 prikazana je crvenom linijom.

Analiza RMSF vrijednosti aminokiselinskih ostataka tijekom 200 ns simulacija ukazuje kako kroz najveće promjene prolaze segmenti gornje (His335–Lys365, Ser455–Ala477, Val521–Ala617) i donje (Val175–Val235) domene koji sačinjavaju vanjski rub procjepa (slika 23). Nasuprot tome, aminokiseline koje sačinjavaju šarku (Ala330–Thr334, Glu357–Val366, Ala414–Gly418; Arg618–Asn623) uglavnom spadaju među manje fleksibilne regije, pogotovo u simulacijama uz ff14SB polje sila. Ovi rezultati u skladu su s pretpostavkom kako je dominantan mod gibanja zatvaranje proteina.



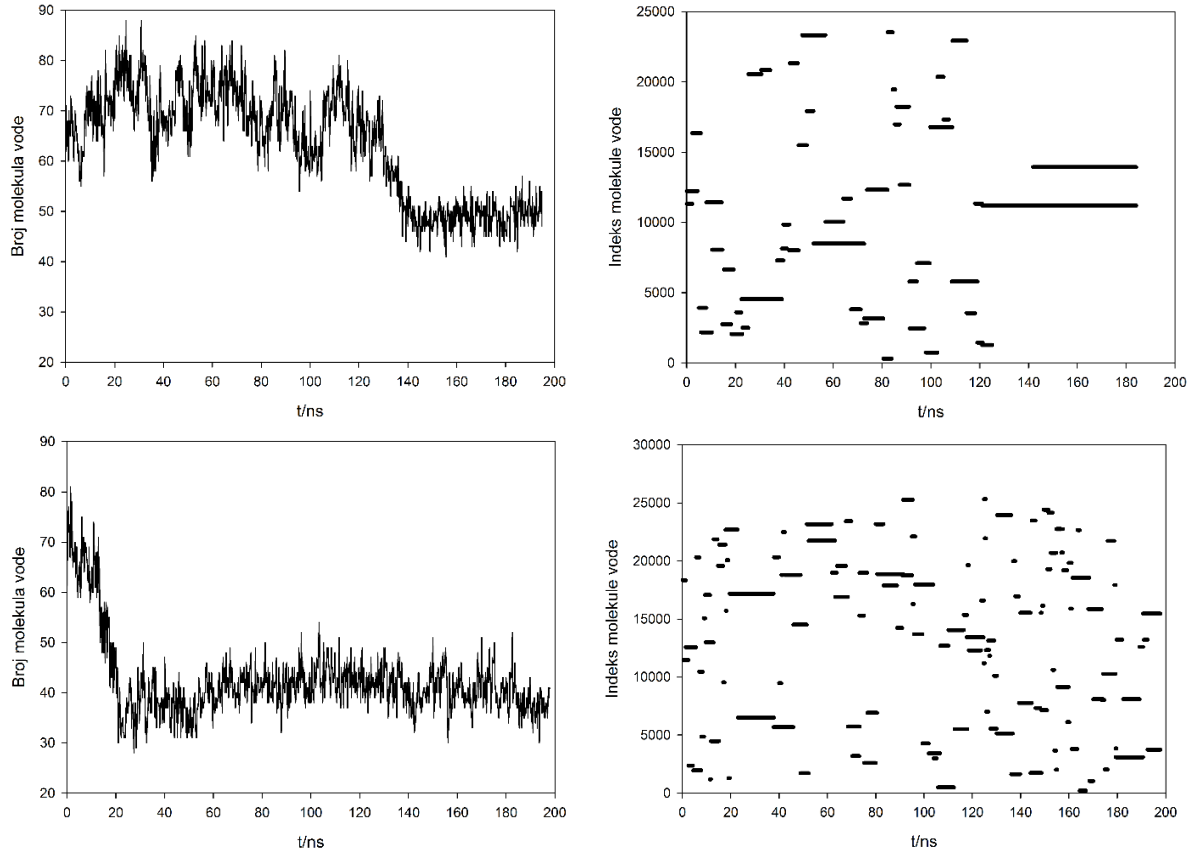
Slika 23. RMSF vrijednosti pojedinih aminokiselinskih ostataka *Bt*DPP III tijekom 200 ns konvencionalnih MD simulacija uz ff12SB i ff14SB polja sila. Najfleksibilnije regije istaknute su crvenom, a regije šarke zelenom bojom.

Usporedba površine dostupne otapalu (SASA) za pojedine aminokiselinske ostatke tijekom MD simulacija otkriva značajne razlike u skladu s promjenom forme enzima iz otvorene u zatvorenu. Najveće razlike otapalu dostupnih površina u tim formama određene su za ostatke u neposrednoj blizini aktivnog mjesta te na rubovima procjepa (slika 24). Ovakav rezultat upućuje na stvaranje izravnih interakcija među aminokiselinama gornje i donje domene.



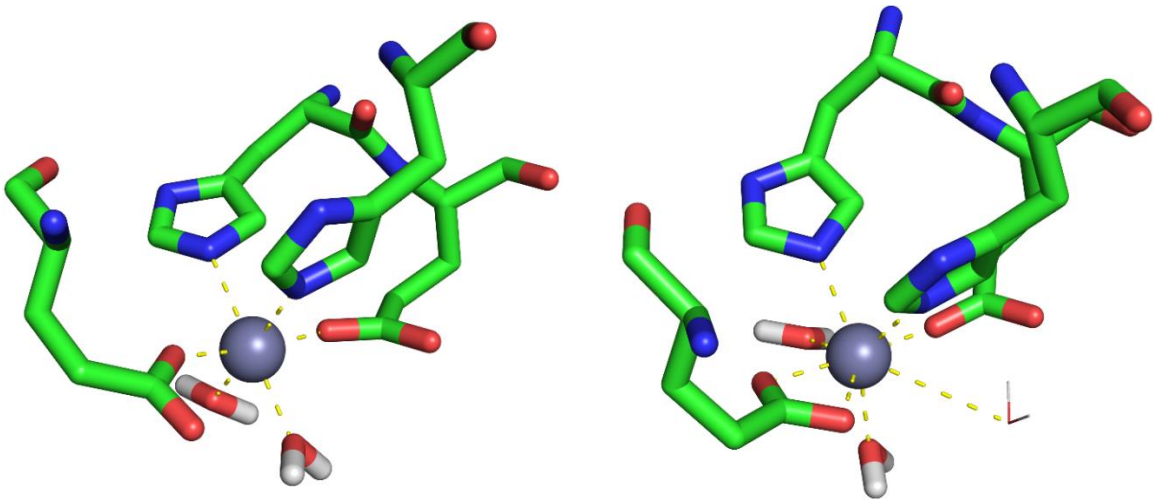
Slika 24. Polazna struktura *Bt*DPP III za molekulsko-dinamičke simulacije. Crvenom bojom naznačeni su aminokiselinski ostaci s najvećom razlikom SASA vrijednosti između otvorene i zatvorene forme. Slika je izrađena programom PyMol.[56]

Primicanje domena za posljedicu ima oslobađanje (izlazak) velikog broja molekula vode iz procjepa, pa se tako njihov broj tijekom 200 ns simulacija smanjio za preko 30 % (slika 25). Ukoliko se uzmu literaturno dostupni podaci o entropijskom doprinosu izlaska molekule vode koji variraju od 1,2 do 2,3 kcalmol^{-1},[133,134] entropijski doprinos zatvaranju proteina može se procijeniti na 24–46 kcalmol^{-1}, što kompenzira razliku potencijalnih energija otvorene i zatvorene forme (slika 22). Brzina smanjivanja broja molekula vode u procjepu ukazuje na brzinu zatvaranja enzima tijekom simulacija, pri čemu je ona najveća u aMD simulacijama uz ff14SB polje sila. Kako tijekom zatvaranja aktivno mjesto postaje manje dostupno, tako postupno prestaje i izmjena molekula vode u koordinacijskoj sferi cinka (slika 25). Uz ff14SB polje sila molekule vode se kontinuirano izmjenjuju u aktivnom mjestu, što je posljedica veće fleksibilnosti enzima i manje tromosti molekula vode uslijed dodanog potencijala.



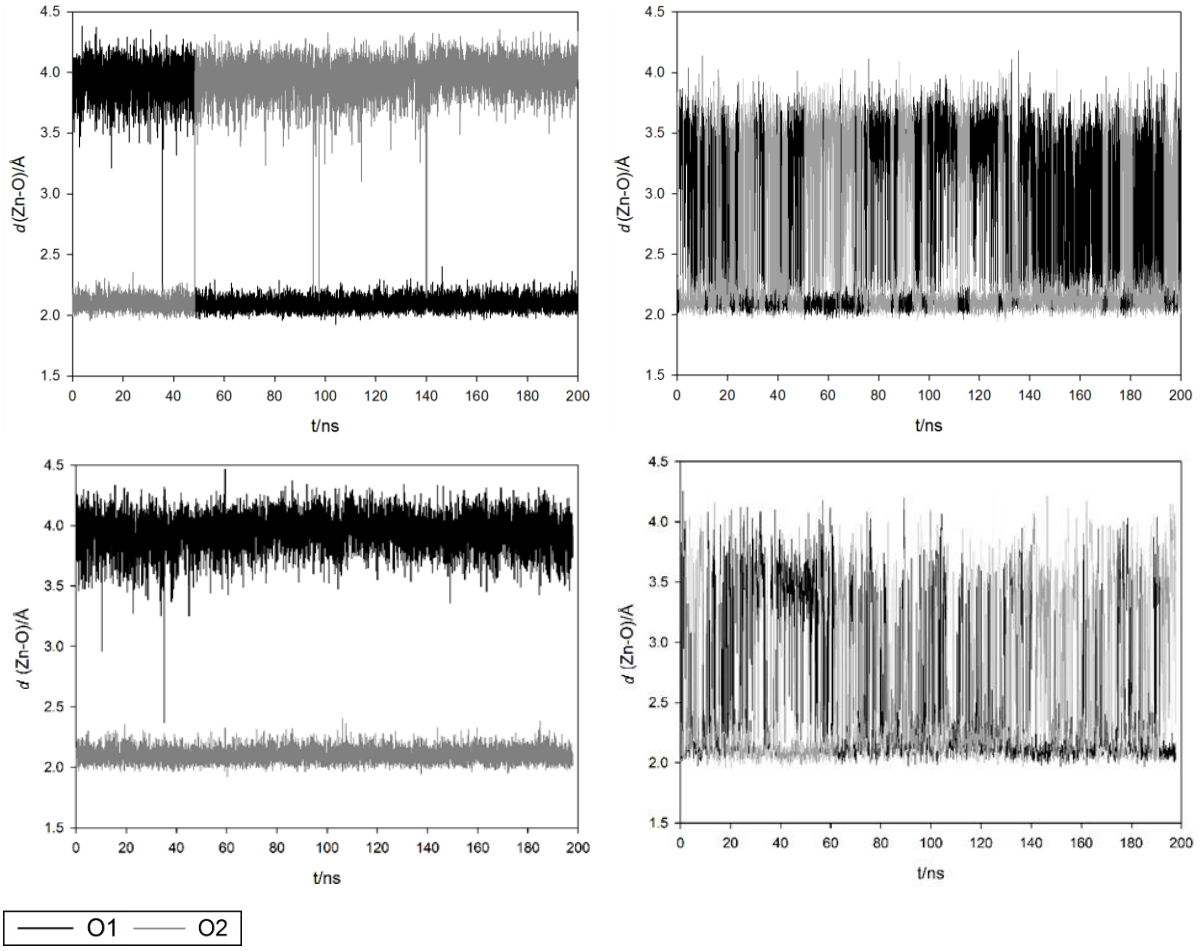
Slika 25. Lijevo: Broj molekula vode unutar sfere radijusa 10 Å oko iona cinka. Desno: Zadržavanje pojedinih molekula vode u koordinacijskoj sferi iona cinka. Molekula vode smatra se u koordinacijskoj sferi ukoliko se nalazi unutar 3,0 Å od iona cinka. Gornji red prikazuje rezultate simulacija uz ff12SB polje sila, a donji rezultate aMD simulacija uz ff14SB polje sila. Molekule vode prisutne u manje od 100 (kod ff12SB simulacija), odnosno 20 (kod ff14SB simulacija) generiranih struktura nisu prikazane radi jasnoće.

Uz dvije molekule vode, ion cinka u aktivnom mjestu koordiniran je i s dva histidinska ostatka (His448 i His453) te dva ostatka glutaminske kiseline (Glu449 i Glu476) (slika 26). Visoka plastičnost mjesta za vezanje cinka, uočena kod humanog ortologa,[44] prisutna je i u *Bt*DPP III, pa se tako prilikom izmjene vodâ u aktivnom mjestu Glu476 ponaša kao bidentatni ligand (slika 26).



Slika 26. Lijevo: Struktura mjesta za vezanje cinka nakon 200 ns, kad Glu476 monodentatno participira u koordinaciji iona cinka. Desno: Struktura aktivnog mjesta nakon približno 157 ns, blizu trenutka izmjene molekule vode. Bočni ogranak Glu476 bidentatno koodinira ion cinka. Vodikovi atomi nisu prikazani radi jasnoće. Slika je izrađena programom PyMol.[56]

Dok je fleksibilnost Glu476 uočena i u MD simulacijama uz ff12SB i u ubrzanim simulacijama uz ff14SB polje sila (slika 27), samo je u prvom slučaju uočena promjena u načinu na koji Glu449 koordinira Zn^{2+}. Tijekom prvih 50 ns MD simulacija on koordinira cink O1 atomom svoje karbonilne skupine, a nakon toga dolazi do pomaka koji rezultira izlaskom O1 te ulaskom O2 u koordinacijsku sferu (slika 27). Dodani potencijal ne utječe primjetno na fleksibilnost Glu476.



Slika 27. Udaljenosti iona cinka od kisikovih iona karboksilne skupine Glu449 (lijevo) i Glu476 (desno). Gornji red prikazuje rezultate za standardnuMD simulaciju uz ff12SB polje sila, a donji za ubrzanu MD simulaciju uz ff14SB polje sila.[118]

Kako je kod humanog ortologa opisana važnost Asp372 u zatvaranju proteina,[58] posebna pozornost posvećena je njegovu analogu Ser363 u *Bt*DPP III. Tijekom ranih faza simulacije (5–10 ns) dolazi do nastajanja Ser363–Asp446 vodikove veze, što za posljedicu ima stvaranje niza interakcijâ Ser363–Asp446–Arg333–Glu442, čime se potiče primicanje domena.

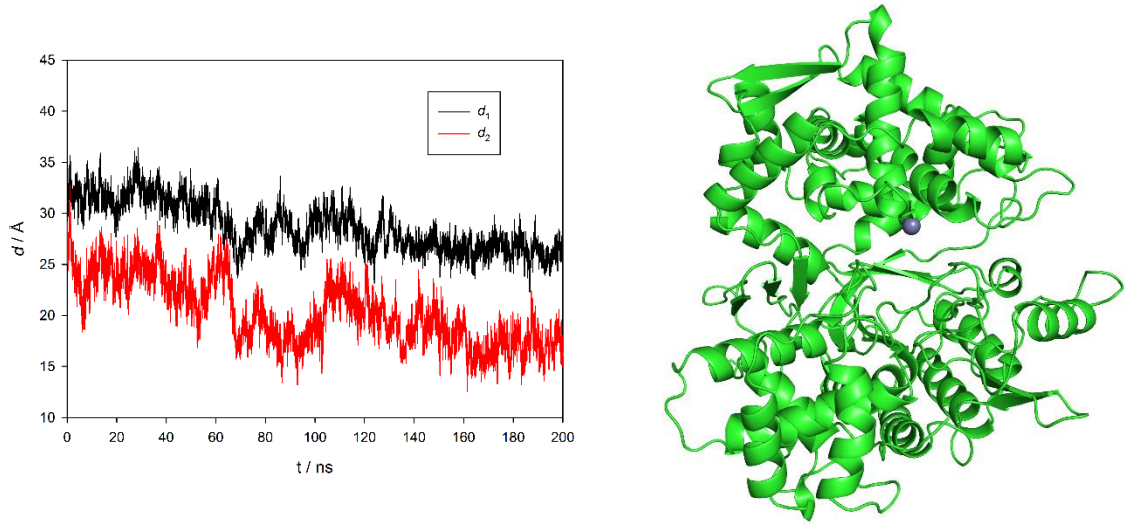
Aminokiselinski ostatak Tyr309 očuvan je kod svih pripadnika porodice M49, te se pretpostavlja da sačinjava podmjesto S1.[57] Važnost njegova analoga Tyr318 u hDPP III za katalitičku aktivnost dokazana je i kinetičkim[17] i računalnim[10] ispitivanjima. U MD simulacijama *Bt*DPP III, položaj Tyr309 znatno se mijenja, te tako u kristalnoj strukturi udaljenost njegova Cα atoma od iona cinka iznosi 12,0 Å, dok se nakon 200 ns MD simulacija poveća na 15,5 Å uz korištenje polja sila ff12SB, odnosno 19,9 Å uz korištenje polja sila

ff14SB. Tijekom simulacija stvara vodikove veze s Lys468 i Gly461, te sa Ser472 za kojeg se na temelju sravnjenja sekvenci hDPP III i *Bt*DPP III smatra da je dio podmjesta S2.[57]

4.1.1. Dinamika mutanta Cys0

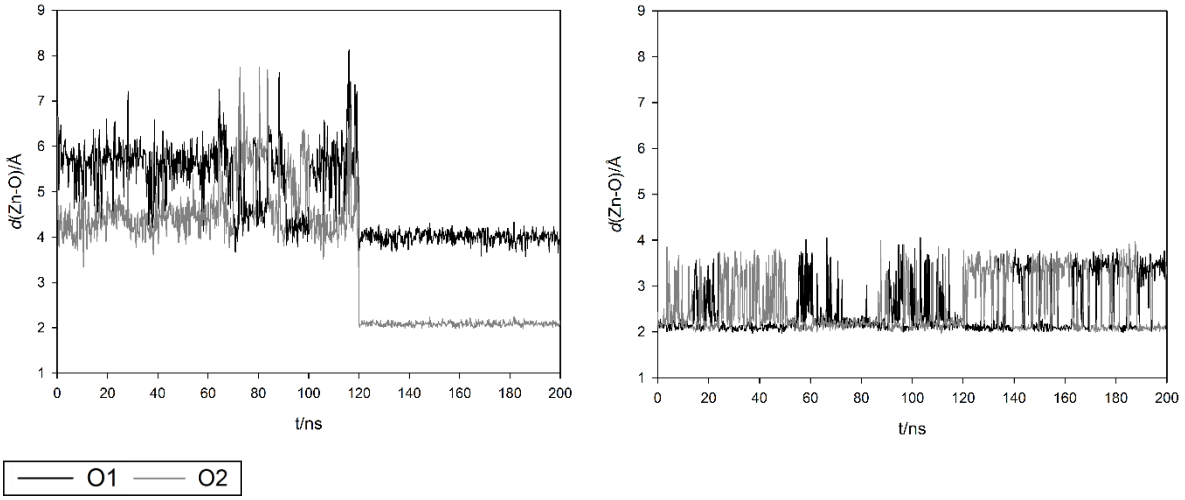
Zatvorena kristalna struktura *Bt*DPP III (PDB kod: 5NA8) riješena je za selenometioninom obilježeni peterostruki mutant Cys0 u kojem su svi cisteini zamijenjeni serinima.[6] Kako bi ispitali utjecaj tih mutacija na dinamiku enzima koristili smo duge MD simulacije.

Tijekom 200 ns došlo je do potpunog zatvaranja enzima kao i u slučaju divljeg tipa (slika 28), odnosno nije uočen utjecaj peterostruke mutacije na konformacijske promjene dugog dosega.



Slika 28. Udaljenosti d_1 (Asp193–Lys468) i d_2 (Asp209–Lys468) tijekom 200 ns simulacija Cys0 mutanta *Bt*DPP III (lijevo) te konačna struktura Cys0 mutanta nakon 200 ns simulacija (desno). Ion cinka prikazan je sivom kuglicom. Slika je izrađena u programu PyMol.

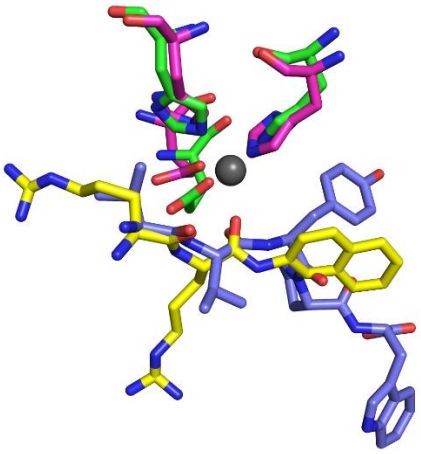
Upadljiva razlika u odnosu na divlji tip uočena je u koordinaciji cinka. Dok su kod divljeg tipa i Glu449 i Glu476 kontinuirano u koordinacijskoj sferi cinka, kod Cys0 mutanta Glu449 većinu simuliranog vremena ne koordinira ion cinka (slika 29). Najvjerojatniji razlog tome je interakcija Ser450 s Thr334, Val362 te Asp446, što okosnicu Glu449 drži dovoljno udaljenom da se onemogući interakcija bočnog ogranka sa Zn^{2+}. U otvorenim kristalnim strukturama ion cinka koordiniran je s His448 i His453, te monodentatno s Glu476, dok u zatvorenoj kristalnoj strukturi i Glu449 ulazi u koordinacijsku sferu Zn^{2+} kao monodentatni ligand, što je slično strukturama generiranim MD simulacijama.



Slika 29. Udaljenosti iona cinka od kisikovih iona karboksilne skupine Glu449 (lijevo) i Glu476 (desno) tijekom 200 ns simulacija Cys0 mutanta.

4.1.2. Vezanje liganada i supstratna specifičnost BtDPP III te utjecaj mutacije C450S

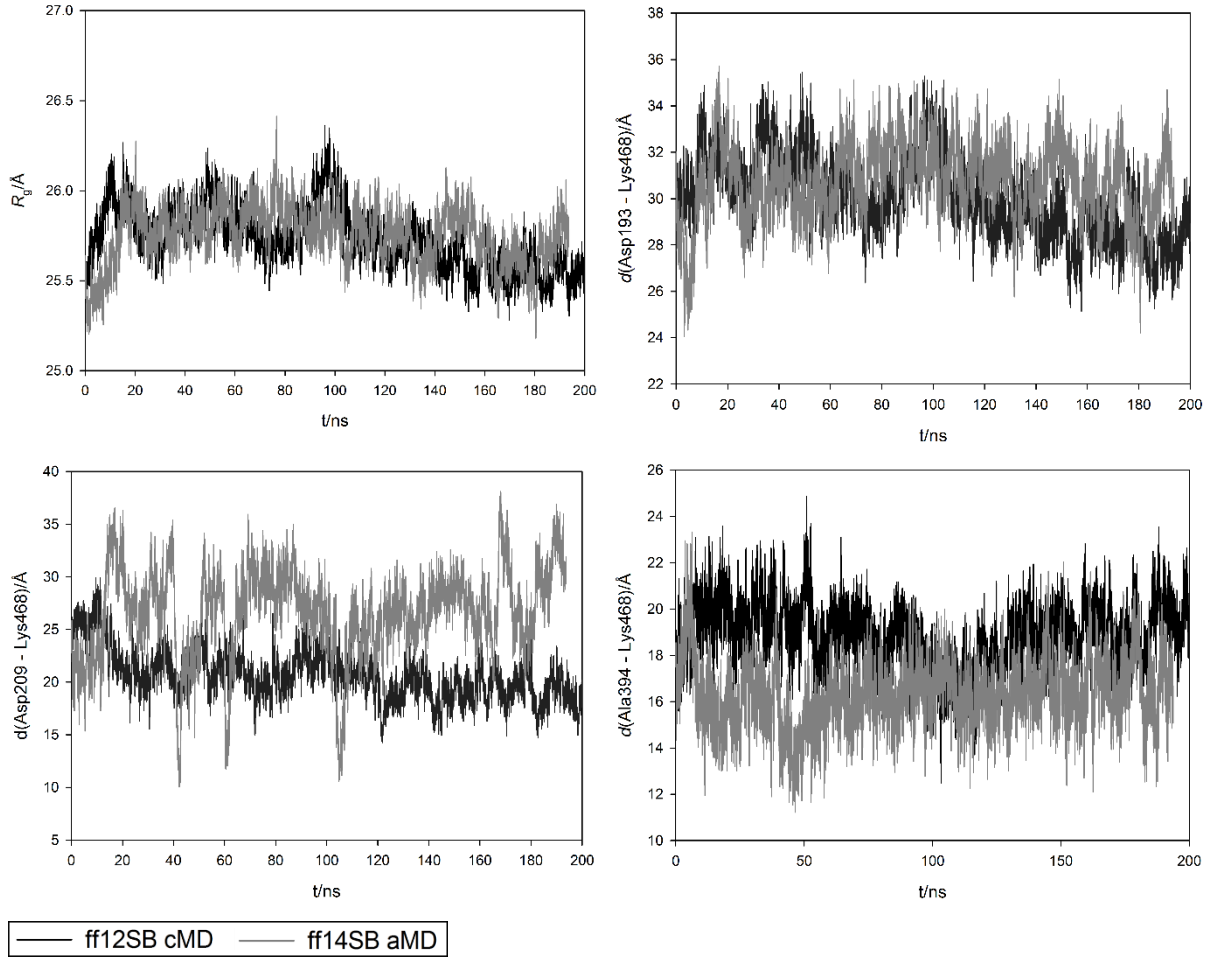
Za komplekse *Bt*DPP III sa supstratom nisu dostupne kristalografski određene strukture, pa je način vezanja supstratâ određen molekulskim modeliranjem. . Kako inicijalni položaj RRNA nije bilo moguće odrediti rigidnim molekulskim uklapanjem uz pomoć programa AutoDock[135] (slika D1), on je određen ručno po uzoru na smještaj tinorfina u kristalografski određenoj strukturi kompleksa hDPP III s tinorfinom (PDB kod: 3T6B) (slika 30), te je RRNA postavljen antiparalelno s β-pločama donje domene, pri čemu je korištena eksperimentalno određena struktura otvorenog enzima. Tako se omogućilo optimalno vezanje supstrata za podmjesta tijekom zatvaranja enzima



Slika 30. Aktivno mjesto kristalografski određene strukture kompleksa mutanta hDPP III (E451A) s tinorfinom preklopljeno s aktivnim mjestom konstruiranog *Bt*DPP III - RRNA

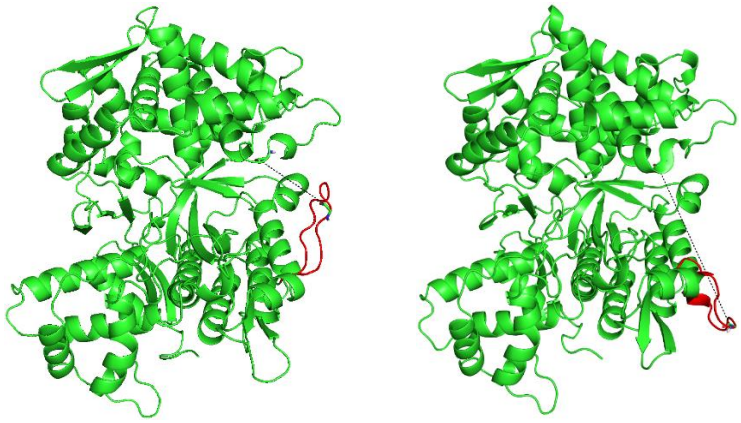
kompleksa.[118] Ugljikovi atomi *Bt*DPP III prikazani su ljubičasto, hDPP III zeleno, tinorfina plavo, a RRNA žuto. Ion cinka prikazan je sivom kuglicom. Zbog jednostavnosti prikaza izostavljeni su aminokiselinski ostaci enzima koji tvore podmjesta za vezanje supstrata, S2, S1 i S1'.

U slučaju humanog ortologa primjećeno je da ligand utječe na način (mod) zatvaranja enzima,[10] te su za komplekse *Bt*DPP III s ligandima praćeni isti geometrijski parametri kao i za slobodan enzim. Kao i u slučaju slobodnog enzima, radijus giracije nije se pokazao dobrim deskriptorom konformacijskih promjena, no iz udaljenosti d_1, d_2 i d_3 vidljivo je nekoliko značajnih promjena (slika 31) u odnosu na zatvaranje slobodnog enzima. Pri simulacijama uz ff12SB polje sila (dalje u tekstu: MD-ff12SB) uočeno je smanjenje d_1 i d_2 udaljenosti s vremenom što odgovara zatvaranju proteina, koje je primjetno brže nego kod slobodnog enzima (slika 17). Dok u ubrzanim simulacijama slobodnog enzima uz ff14SB polje sila (dalje u tekstu: aMD-ff14SB) dolazi do naglog pada d_3 vrijednosti, u kompleksu to nije slučaj, što također sugerira različite načine zatvaranja enzima sa i bez prisutnosti supstrata.



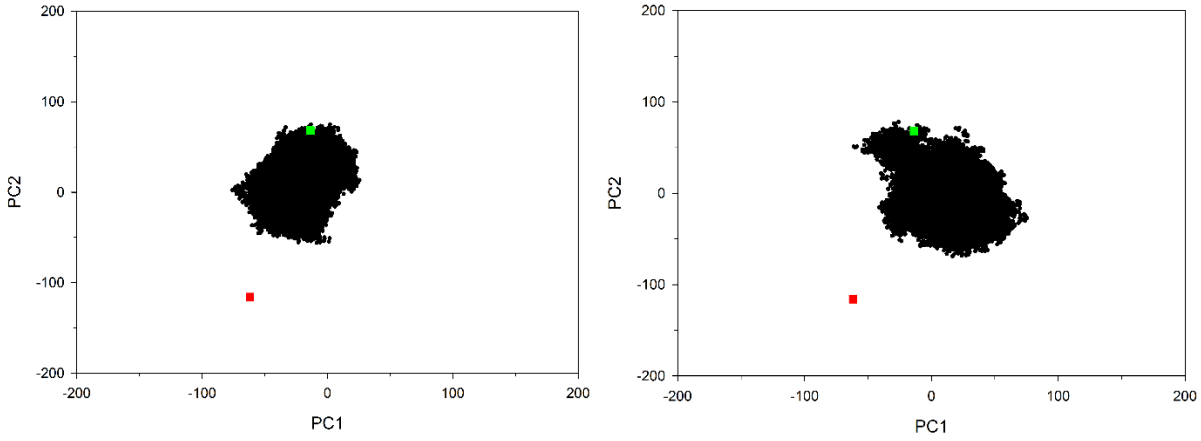
Slika 31. Promjena radijusa giracije te udaljenosti d_1, d_2 i d_3 tijekom 200 ns MD simulacija kompleksa *Bt*DPP III sa sintetskim supstratom RRNA uz korištenje ff12SB polja sila te ff14SB polja sila uz ubrzanu molekulsku dinamiku.

Velike oscilacije d_2 vrijednosti kompleksa tijekom ubrzanih simulacija mogu se pripisati translokaciji petlje Gly204–Tyr218 (slika 32). Ovakvo gibanje nije uočeno tijekom simulacija slobodnog enzima.



Slika 32. Translokacija petlje uočena u simulacijama kompleksa *Bt*DPP III - RRNA. Petlja je istaknuta crvenom bojom, a udaljenost d_3 crnom isprekidanom linijom.[118]

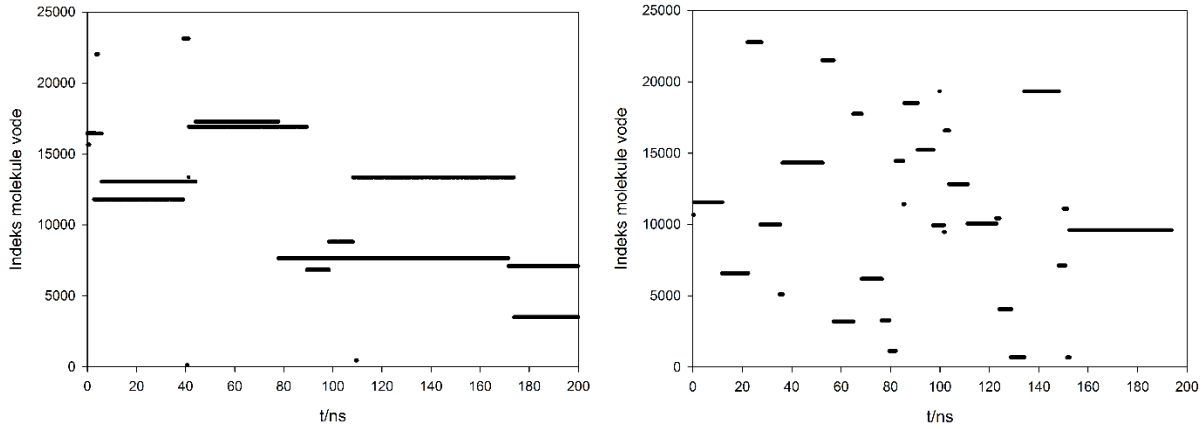
Analiza glavnih komponenata pokazuje pomak ravnoteže (raspodjele struktura) kâ zatvorenim strukturama (slika 33). Važno je uočiti kako u kompleksu, za razliku od slobodnog enzima, sve simulacije (MD-f12SB i aMD-ff14SB) rezultiraju istim modom zatvaranja koji odgovara kristalografski određenoj zatvorenoj strukturi.



Slika 33. Analiza glavnih komponenata za simulacije kompeksa *Bt*DPP III s RRNA: MD-ff12SB (lijevo) i aMD-ff14SB (desno). Kristalografski određena otvorena struktura označena je crvenim, a zatvorena zelenim kvadratom.

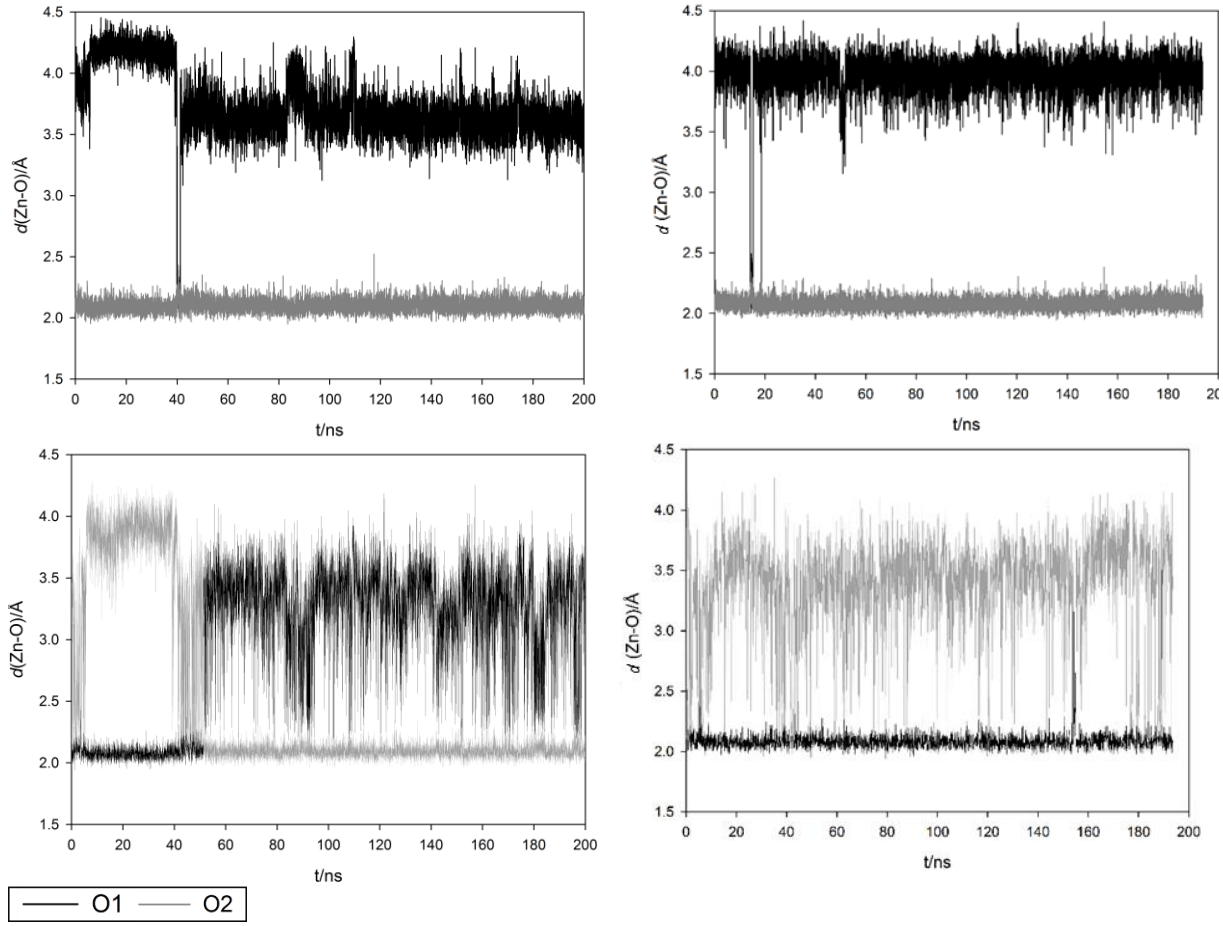
Izmjena voda u aktivnom mjestu kompleksa puno je slabije izražena nego kod slobodnog enzima (slike 34 i 25). U MD-ff12SB simulacijama vidljivo je nekoliko izmjena molekula vode koje su posljedica blagog otvaranja enzima uslijed reorijentacije supstrata. Nakon približno 110 ns RRNA zauzima svoj najpovoljniji položaj, što rezultira znatnim smanjenjem izmjena molekula voda u aktivnom mjestu enzima. U prilog ovoj pretpostavci idu i RMSF vrijednosti izračunate za molekulu RRNA, koje iznose 1,97 Å tijekom prvih 100 ns, a 1,28 Å tijekom

narednih 100 ns. Kod aMD-ff14SB simulacija situacija je nešto drugačija; vidljiv je veći broj izmjena tijekom cijelog vremena simulacije, što se može objasniti postojanjem dodanih potencijala koji potiču konformacijske promjene enzima i smanjuju inertnost molekula vode. Nadalje, tijekom simulacije broj molekula vode koje kordiniraju ion cinka varira između jedne i dvije.



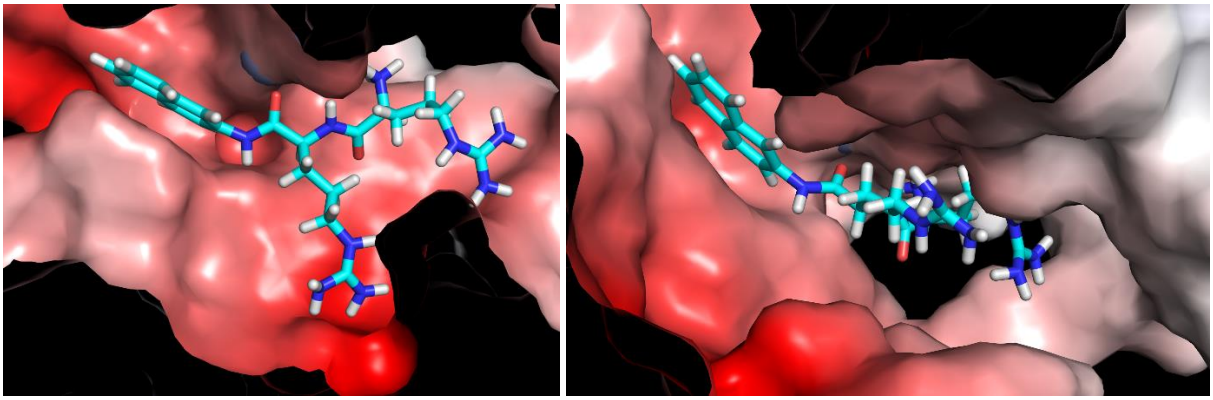
Slika 34. Zadržavanje pojedinih molekula vode u koordinacijskoj sferi iona cinka tijekom MD-ff12SB simulacija *Bt*DPP III–RRNA kompleksa (lijevo), te aMD-ff14SB simulacija (desno). Molekula vode smatra se u koordinacijskoj sferi ukoliko se nalazi unutar 3,0 Å od iona cinka. Molekule vode prisutne u manje od 100 generiranih struktura nisu prikazane radi jasnoće.

Obzirom na uočene razlike u ponašanju molekula vode u aktivnom mjestu, uspoređena su aktivna mjesta tijekom MD-ff12SB i aMD-ff14SB simulacija, s naglaskom na ponašanje glutamatâ Glu449 i Glu476. Dok je Glu449 isključivo monodentatni ligand u oba slučaja, Glu476 može biti i bidentatni ligand (u 17% generiranih struktura MD-ff12SB simulacijama, te u 12% struktura dobivenih aMD-ff14SB simulacijama) (slika 35). Ovi rezultati, te participacija O1 i O2 u koordinaciji cinka tijekom simulacija, u skladu su s pretpostavljenom plastičnosti aktivnog mjesta uočenoj i kod humanog ortologa DPP III.



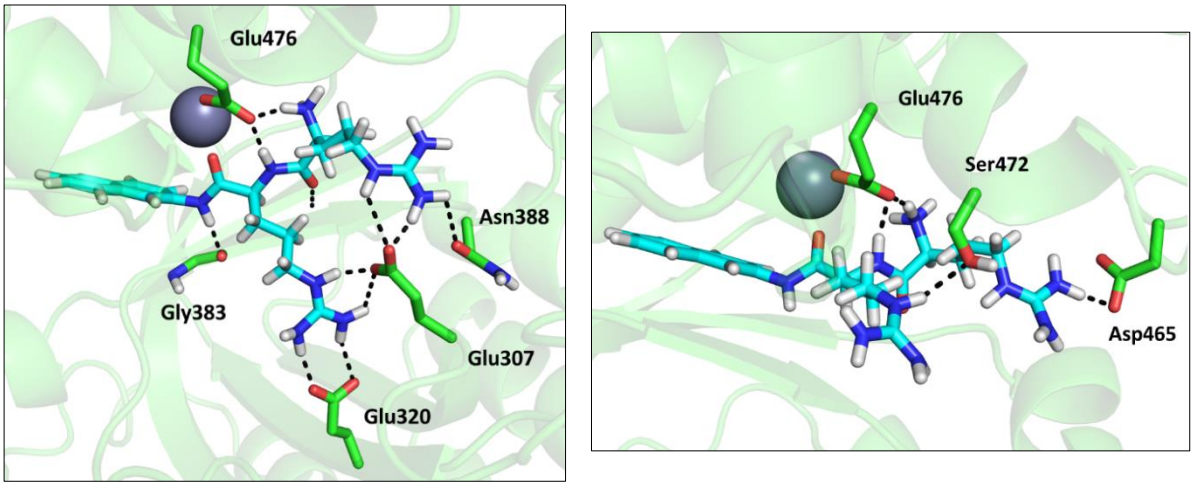
Slika 35. Udaljenosti iona cinka od kisikovih atoma karboksilne skupine Glu449 u MD-ff12SB (gore lijevo) i aMD-ff14SB (gore desno) simulacijama *Bt*DPP III–RRNA kompleksa. Analogne udaljenosti određene su za Glu476 (dolje lijevo i dolje desno).

Visok afinitet *Bt*DPP III prema RRNA može se djelomično objasniti elektrostatskim interakcijama (slika 36). Kako je okolina aktivnog mjesta izrazito negativno nabijena, pozitivno nabijeni bočni ogranci arginina kao i N-kraj tvore niz povoljnih elektrostatskih interakcija s enzimom. Supstitucija jednog od arginina bilo kojom drugom aminokiselinom nužno rezultira smanjenjem broja (stabilizirajućih) elektrostatskih interakcija što je u skladu s eksperimentalnim mjerenjima (npr. zamjenom jednog arginina fenilalaninom relativna brzina hidrolize smanji se za 70 %, dok kod zamjene asparaginskom kiselinom nema enzimske aktivnosti)[16]. Naftalenski prsten se, očekivano, smješta u relativno manje nabijeni "džep" enzima. Kod aMD-ff14SB simulacija dolazi do ulaska naftalenske jezgre dublje u nešto hidrofobniji džep veznog mjesta.



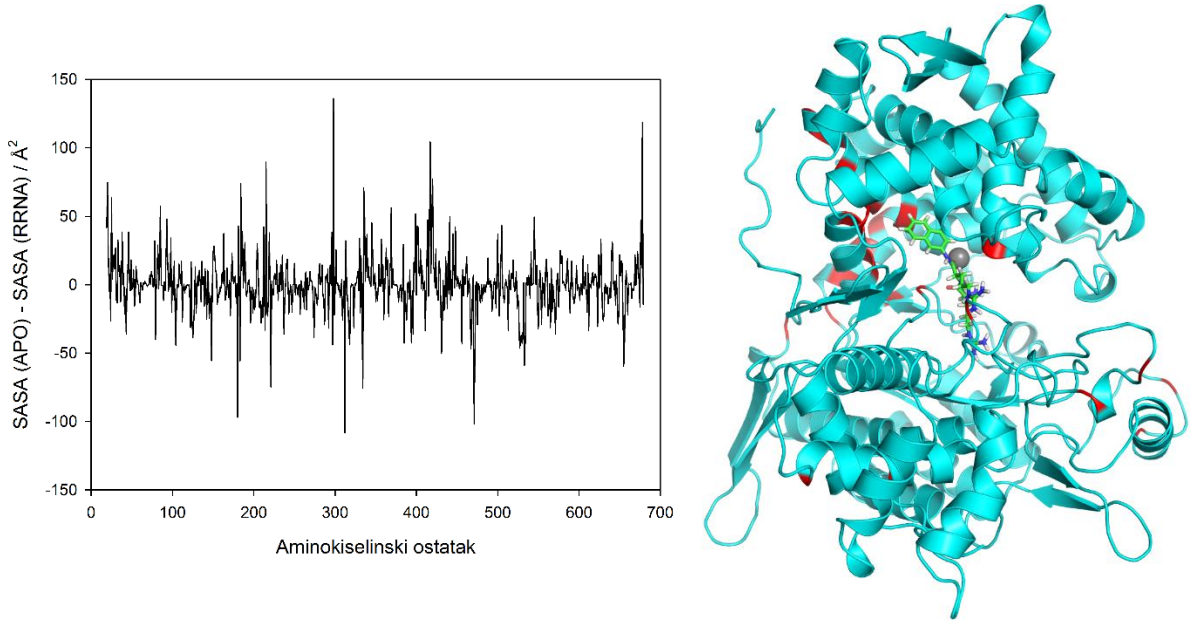
Slika 36. Elektrostatski potencijal mapiran na površinu enzima u *Bt*DPP III–RRNA kompleksu. Lijevo je prikazana struktura dobivena s MD-ff12SB, a desno s aMD-ff14SB simulacijama. Naboji su mapirani u rasponu od -15e do +15e. Slika je izrađena u programu PyMol, a mapiranje naboja izvršeno je APBS modulom.[136]

Kod aMD-ff14SB simulacija RRNA je postavljena antiparalelno Gly383–Leu386 segmentu β-ploče u donjoj domeni, dok u MD-ff12SB simulacijama stoji pod blagim kutem. Mod vezanja dobiven u MD-ff12SB simulacijama sugerira interakcije RRNA pretežno s aminokiselinama donje domene, poglavito s Glu307, Glu320, Gly383 i Glu476 (slika 37). Tijekom aMD-ff14SB simulacija RRNA tvori niz vodikovih veza s aminokiselinama gornje domene; Asp465, Ser472 i Glu476 (slika 37).



Slika 37. Način vezanja supstrata RRNA u aktivno mjesto *Bt*DPP III dobiven MD-ff12SB (lijevo) te aMD-ff14SB simulacijama (desno). Ion cinka prikazan je sivom kuglicom a vodikove veze crnim isprekidanim linijama. RRNA je istaknut plavim ugljikovim atomima. Slika je izrađena programom PyMol.

Usporedba površine dostupne otapalu kod zatvorene forme slobodnog enzima i kompleksa *Bt*DPP III–RRNA ukazuje na znatno niže vrijednosti u drugom slučaju, osobito u regijama na unutarnjoj strani procjepa te na šarkama. Ovi rezultati u skladu su sa predloženim podmjestima (S1 i S2) enzima[57] kao i sa nedavnim studijama izmjene vodik–deuterij na nizu DPP III ortologa,[137] te ukazuju na steričko zaklanjanje tih podmjesta supstratom (slika 38).



Slika 38. Lijevo: Razlika SASA vrijednosti pojedinih aminokiselinskih ostataka u slobodnom enzimu te *Bt*DPP III - RRNA kompleksu. Desno: Struktura *Bt*DPP III–RRNA kompleksa gdje su aminokiselinski ostaci s najvećom razlikom SASA vrijednosti u odnosu na slobodan enzim istaknuti crvenom bojom.[118] RRNA je prikazan sa zelenim uglikovim atomima, a cink je prikazan kao siva kuglica.

Kako bi se objasnila za red veličine eksperimentalno određena niža efikasnost hidrolize Lys-Ala-2-naftilamida (KANA) u odnosu na RRNA,[16] provedene su MD simulacije oba kompleksa. Iz najstabilnije strukture *Bt*DPP III–RRNA kompleksa priređena je polazna struktura *Bt*DPP III–KANA kompleksa te su provedene duge MD simulacije uz iste uvjete kao i kod kompleksa s RRNA. MM-PBSA račun slobodnih energija ukazuje na primjetno veći afinitet *Bt*DPP III prema RRNA nego prema KANA, što je u skladu s eksperimentalnim podacima (tablica 6). Kako su standardne devijacije izračunatih MM-PPBSA energija vrlo visoke zbog velike fleksibilnosti pojedinih regija, strukture najniže energije ohlađene su na 100 K i simulirane daljnjih 10 ns. Ovom procedurom znatno su smanjene standardne devijacije.

Tablica 6. Izračunate MM-PBSA i MM-GBSA energije vezanja za komplekse *Bt*DPP III sa sintetskim supstratima RRNA i KANA.[118] Sve energije i pripadne standardne devijacije dane su u kcalmol^{-1}.

Sustav	**Metoda**	***T*/K**	$\Delta E_{\text{MM-PBSA}}$	**SD**	$\Delta E_{\text{MM-GBSA}}$	**SD**
DPP III–RRNA	MD-ff12SB	300	-15,39	11,58	-23,19	8,04
DPP III–KANA	MD-ff12SB	300	-13,75	7,80	-27,33	4,38
DPP III–RRNA	aMD-ff14SB	300	-10,59	7,95	-24,52	5,61
DPP III–KANA	aMD-ff14SB	300	-7,09	5,40	-21,68	5,26
DPP III–RRNA	MD-ff12SB	100	-11,79	4,65	-29,40	2,23
DPP III–KANA	MD-ff12SB	100	-6,88	4,24	-28,78	2,04
DPP III–RRNA	aMD-ff14SB	100	-15,64	3,70	-29,04	2,47
DPP III–KANA	aMD-ff14SB	100	-12,18	3,32	-26,63	1,78

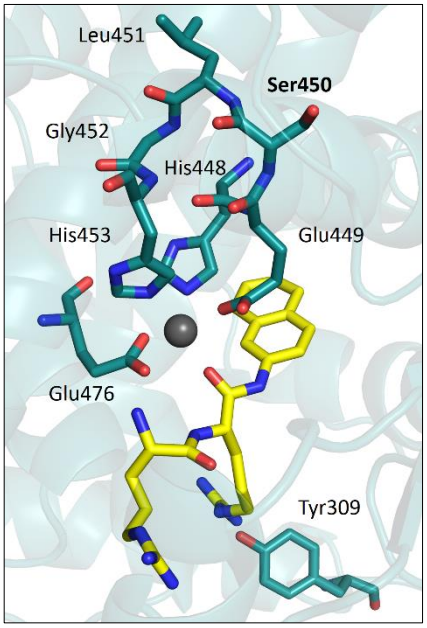
Izračunate energije vezanja povezane su sa strukturnim karakteristikama kompleksa pomoću analize vodikovih veza (tablica 7). RRNA tvori više vodikovih veza s *Bt*DPP III nego KANA, što je vidljivo na primjeru interakcija s Gly383 i Glu320, a stabilizirajuće interakcije koje tvori s enzimom tijekom MD simulacija prisutne su u većem broju generiranih struktura.

Tablica 7. Udio struktura kompleksa *Bt*DPP III s RRNA i KANA u kojima su prisutne vodikove veze supstrata s naznačenim aminokiselinskim ostacima.[118] Udjeli su izračunati za 5 ns dio trajektorije s najnižom pripadnom MM-PBSA energijom vezanja. Sve vrijednosti dane su u postotcima. Veze prisutne u manje od 15% generiranih struktura izuzete su iz razmatranja.

Akceptor	RRNA[a]	RRNA[b]	KANA[a]	KANA[b]
Glu307 (I)	31,08	19,28	47,48	-
Glu307 (II)	-	17,72	-	-
Glu307 (III)	-	15,36	-	-
Glu307 (IV)	-	15,20	-	-
Glu320 (I)	70,88	-	-	-
Glu320 (II)	-	-	-	-
Asp375	-	-	38,88	-
Gly383	71,84	-	-	-
Asn385	-	-	-	20,52
Glu476 (I)	98,72	97,44	66,76	87,08
Glu476 (II)	33,36	85,40	55,84	82,44
Glu476 (III)	-	-	31,28	-

[a]Rezultati dobiveni MD-ff12SB simulacijama
[b]Rezultati dobiveni aMD-ff14SB simulacijama

Od osobitog je interesa razjasniti utjecaj točkaste mutacije C450S na katalitičku aktivnost enzima. Iako Cys450 nije orijentiran prema supstratu (slika 39), divlji tip enzima ima 1,4 puta veću vrijednost K_m, i za red veličine manju aktivnost k_{cat}/K_m od mutanta.[16] U pokušaju da se objasne ovi eksperimentalni rezultati priređen je kompleks C450S mutanta s RRNA te su dobiveni rezultati uspoređeni s onima za divlji tip enzima.



Slika 39. Aktivno mjesto kompleksa C450S mutanta *Bt*DPP III s RRNA. RRNA je prikazan štapićima sa žutim ugljikovim atomima. Atomi vodika izostavljeni su iz prikaza radi jasnoće. Ion cinka prikazan je kao siva kuglica.

MM-PBSA energije izračunate na temelju struktura generiranih tijekom MD-ff12SB i aMD-ff14SB simulacija niže su za kompleks divljeg tipa *Bt*DPP III s RRNA no za kompleks C450S mutanta (tablica 8) te su u skladu s postojećim kinetičkim mjerenjima. Izrazito velike standardne devijacije nezaobilazna su posljedica korištenja MM-PBSA pristupa kod fleksibilnog enzima.

Tablica 8. Izračunate MM-PBSA i MM-GBSA energije vezanja za komplekse divljeg tipa *Bt*DPP III (naznačenog indeksom wt) te C450S mutanta s RRNA.[118] Sve energije i pripadne standardne devijacije dane su u kcalmol^{-1}.

Sustav	Metoda	K_m/μM	$\Delta E_{MM\text{-}PBSA}$	SD	$\Delta E_{MM\text{-}GBSA}$	SD
***Bt*DPP III$_{wt}$**	MD-ff12SB	2,5±0,9	-15,39	11,58	-2,19	8,04
C450S *Bt*DPP III	MD-ff12SB	3,5±0,6	-9,25	8,53	-17,58	6,17
***Bt*DPP III$_{wt}$**	aMD ff14SB	2,5±0,9	-10,59	7,95	-24,52	5,61
C450S *Bt*DPP III	aMD ff14SB	3,5±0,6	-6,00	8,62	-27,31	7,56

U skladu s rezultatima MM-PBSA računa, analiza vodikovih veza pokazala je da C450S mutant slabije interagira s RRNA nego divlji tip. Iako je dominantna stabilizirajuća interakcija s Glu476 prisutna u oba kompleksa, kod divljeg tipa RRNA tvori vodikove veze i s Glu320 te

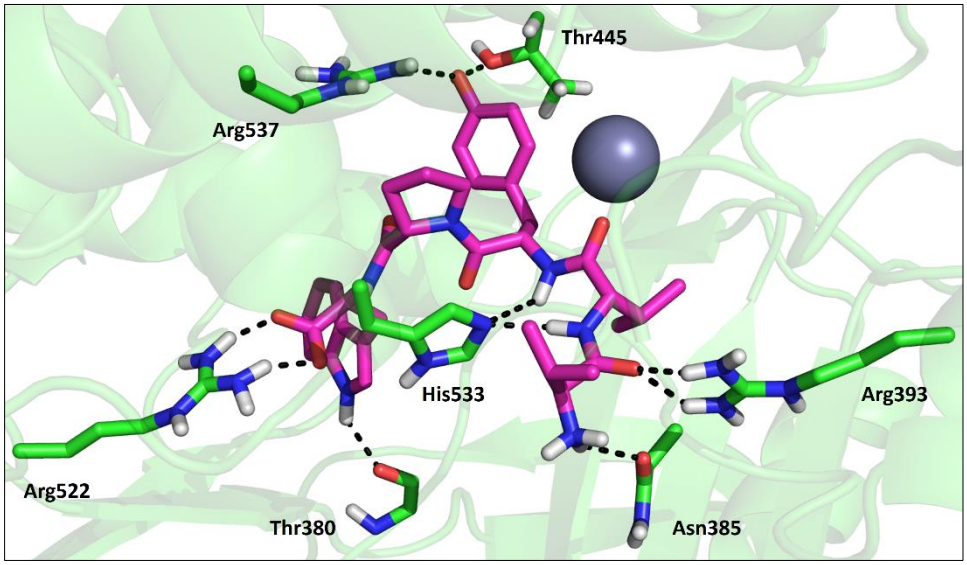
Glu307, a veza s Gly383 prisutnija je u znatno većem broju generiranih struktura (tablica 9). Vodikova veza s Glu449, prisutna u mutantu, ne predstavlja dovoljno stabilizirajući utjecaj da bi kompenzirala manjak dviju vodikovih veza prisutnih kod divljeg tipa.

Tablica 9. Udio struktura kompleksa divljeg tipa *Bt*DPP III (naznačenog indeksom wt) te C450S mutanta s RRNA u kojima su prisutne vodikove veze supstrata s naznačenim aminokiselinskim ostacima.[118] Udjeli su izračunati za 5 ns dio trajektorije s najnižom pripadnom MM-PBSA energijom vezanja. Sve vrijednosti dane su u postotcima. Veze prisutne u manje od 15% generiranih struktura izuzete su iz razmatranja.

Akceptor	***Bt*DPP III$_{wt}$ - RRNA**	**C450S *Bt*DPP III - RRNA**
Glu476 (I)	98,72	99,00
Gly383	71,84	14,44
Glu320	70,88	-
Glu476 (II)	33,36	21,60
Glu307	31,08	-
Glu449	-	77,84

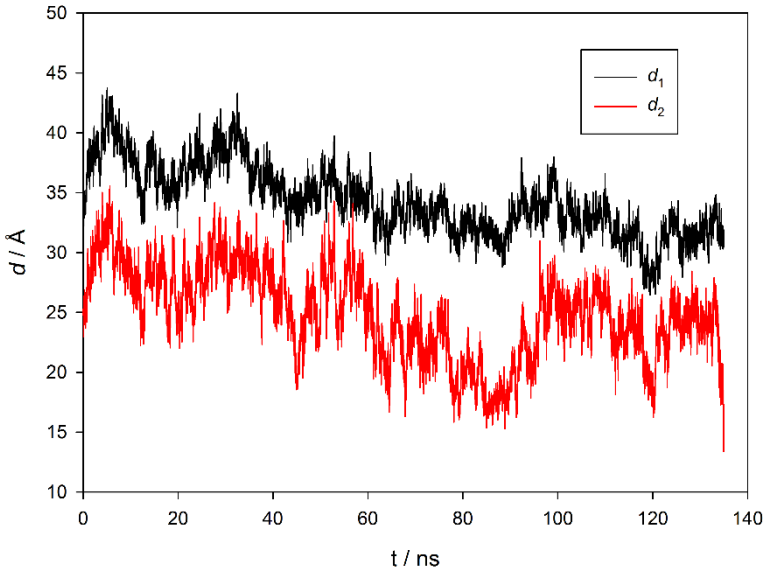
4.1.3. Inhibicija BtDPP III

Pentapeptid tinorfin (Val-Val-Tyr-Pro-Trp) pokazao se dobrim inhibitorom štakorske hDPP III,[137,138] no kinetička ispitivanja na *Bt*DPP III do danas nisu rađena. *Bt*DPP III – tinorfin kompleks sagrađen na temelju kristalne strukture humanog ortologa s tinorfinom podvrgnut je dugim MD simulacijama kako bi se odredio najpovoljniji oblik vezanja tinorfina (slika 40). Iznenađujuće, određena MM-PBSA energija vezanja bila je pozitivna (6,53 kcalmol^{-1} uz aMD simulacije i ff14SB polje sila), što sugerira da tinorfin nije dobar inhibitor *Bt*DPP III. Ovakvi rezultati potvrđuju zaključke nedavnih eksperimenata izmjene vodik–deuterij (HDX), koji ne nalaze velike razlike između izmjene protona s otapalom u slobodnom enzima i kompleksu *Bt*DPP III s tinorfinom.[137] Pretpostavljeni uzrok visoke energije vezanja je nemogućnost optimalnog smještanja tinorfina u aktivno mjesto *Bt*DPP III zbog prisutnosti voluminoznih ogranaka i skučenijeg veznog mjesta nego kod humanog ortologa.



Slika 40. Tinorfin vezan u aktivno mjesto *Bt*DPP III. Tinorfin je prikazam štapićima s ljubičastim ugljikovim atomima. Vodikove veze prikazane su crnim isprekidanim linijama, a ion cinka sivom kuglicom. Slika je izrađena programom PyMol.

Kako je enzim u polaznoj strukturi *Bt*DPP III–tinorfin kompleksa u otvorenoj formi, iz promjene d_1 i d_2 vrijednosti može se uočiti relativno brzo zatvaranje enzima (u odnosu na slobodan enzim), kao što je slučaj i kod kompleksa sa supstratima RRNA i KANA (slika 41). Uzrok tome je stvaranje vodikovih veza između liganda i aminokiselina gornje i donje domene, što rezultira njihovim primicanjem.



Slika 41. Promjena geometrijskih parametara tijekom aMD simulacija kompleksa *Bt*DPP III s tinorfinom.

Nedavna istraživanja na humanoj i *Bt*DPP III opisuju novu klasu hidroksamatnih inhibitora.[57] Budući da eksperimentalno nije određena ni jedna struktura enzima iz M49 obitelji s ovom vrstom inhibitora, upotrijebljene su MD simulacije kako bi se odredio njihov mod vezanja i eventualno pojasnili izmjereni kinetički parametri. Odabrana su dva hidroksamatna inhibitora, H-Tyr-Phe-NHOH i H-Phe-Gly-NHOH, čije se K_i vrijednosti razlikuju za red veličine. Računi MM-PBSA energija vezanja kvalitativno se slažu s izračunatim kinetičkim parametrima te povezuju jaču inhibicijsku moć H-Tyr-Phe-NHOH s nižom energijom vezanja (tablica 10).

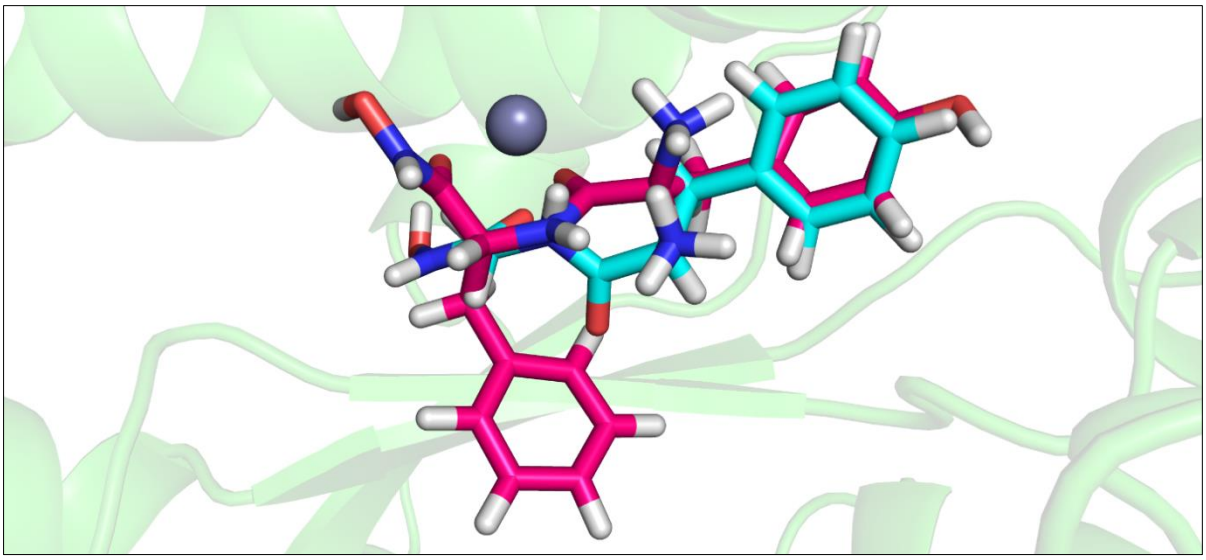
Tablica 10. Izračunate MM-PBSA i MM-GBSA energije vezanja za komplekse *Bt*DPP III s hidroksamatnim inhibitorima. Sve energije i pripadne standardne devijacije dane su u kcalmol^{-1}.

Inhibitor	K_i **/ μM**[57]	$\Delta E_{\text{MM-PBSA}}$	**SD**	$\Delta E_{\text{MM-GBSA}}$	**SD**
H-Phe-Gly-NHOH	0,795±0,088	-22,75	5,56	-22,84	4,97
H-Tyr-Phe-NHOH	0,062±0,002	-30,88	6,07	-33,75	3,76

Analiza vodikovih veza upućuje na podjednaku stabilizaciju oba inhibitora. H-Tyr-Phe-NHOH rjeđe tvori vodikove veze s Asn385, no to kompenzira stvaranjem niza interakcija s Glu476 te s Asn390 (tablica 11). Benzenske jezgra tirozina (iz H-Tyr-Phe-NHOH) i fenilalanina (iz H-Phe-Gly-NHOH) gotovo su identično pozicionirane (slika 42), no hidroksamatna skupina bolje je ukopana kod kompleksa s H-Tyr-Phe-NHOH zbog steričkih interakcija voluminoznog fenilalaninskog bočnog ogranka s enzimom.

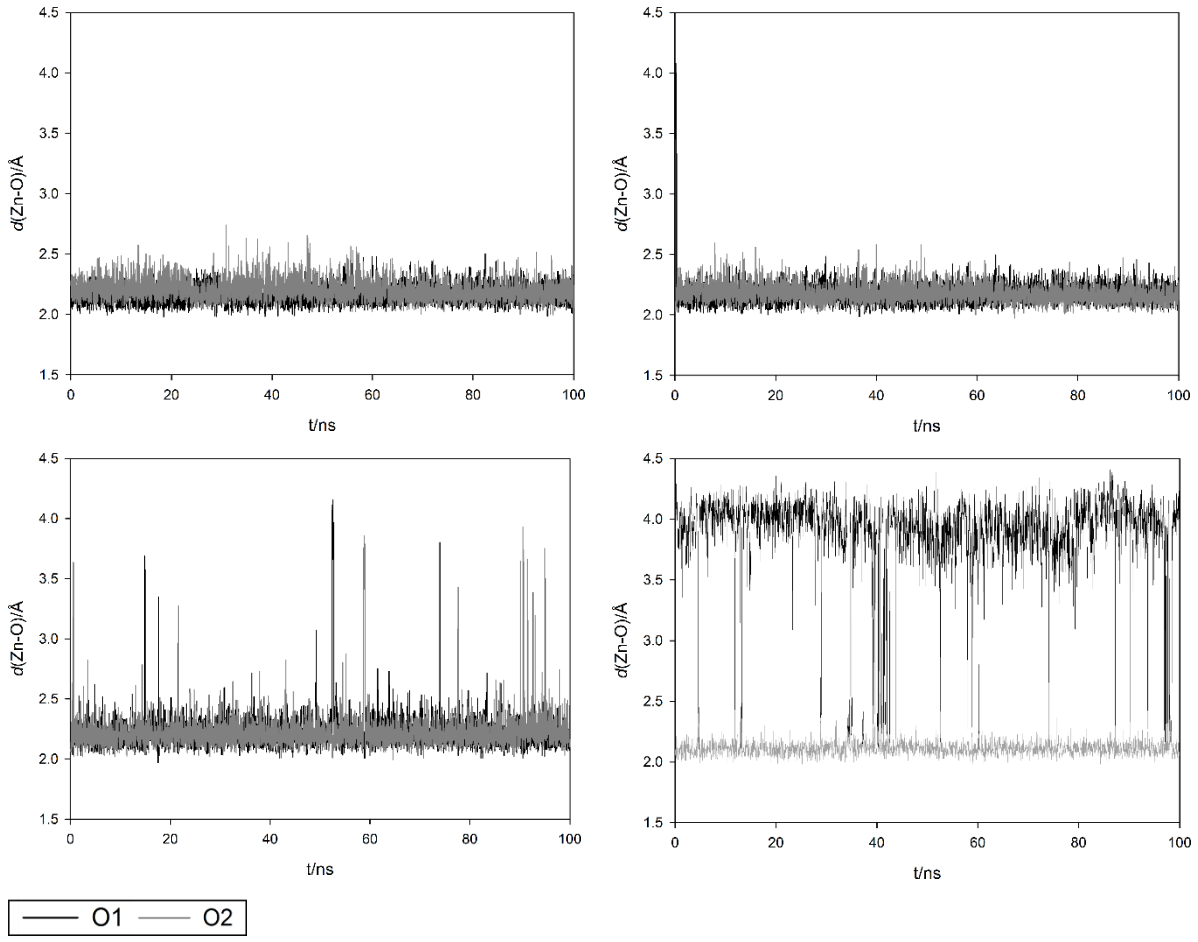
Tablica 11. Udio vodikovih veza pojedinih aminokiselinskih ostataka *Bt*DPP III u kompleksima s inhibitorima H-Phe-Gly-NHOH i H-Tyr-Phe-NHOH tijekom MD simulacija uz ff14SB polje sila. Udjeli vodikovih veza izračunat su za 5 ns dug dio trajektorije s najnižom pripadnom MM-PBSA energijom vezanja. Sve vrijednosti dane su u postotcima. Vodikove veze prisutne u manje od 5% generiranih struktura nisu razmatrane.

Aminokiselinski ostatak	N-Phe-Gly-NHOH	H-Tyr-Phe-NHOH
Asn385	82,44	25,52
Glu449	79,36	-
Gly383	5,28	-
Glu476 (I)	5,20	50,36
Glu476 (II)	-	31,56
Glu476 (III)	-	14,92
Asn390	-	15,48



Slika 42. Preklopljene strukture kompleksa *Bt*DPP III s hidroksamatnim inhibitorima N-Phe-Gly-NHOH (štapići s ružičastim ugljikovim atomima) i H-Tyr-Phe-NHOH (štapići s plavim ugljikovim atomima) dobivene MD simulacijama uz ff14SB polje sila. Ion cinka prikazan je kao siva kuglica.

Upadljiva razlika u orijentaciji H-Tyr-Phe-NHOH i H-Phe-Gly-NHOH uočava se u koordinaciji iona cinka. Naime, H-Tyr-Phe-NHOH koordinira ion cinka bidentatno, s dva atoma kisika karbonilne skupine, a H-Phe-Gly-NHOH monodentatno (slika 42). Kao posljedica navedenog, u kompleksu s H-Phe-Gly-NHOH oba glutamata enzima (Glu449 i Glu476) koordiniraju Zn^{2+} bidentatno, dok u kompleksu s H-Tyr-Phe-NHOH samo Glu449 bidentatno koordinira cink (slika 43).

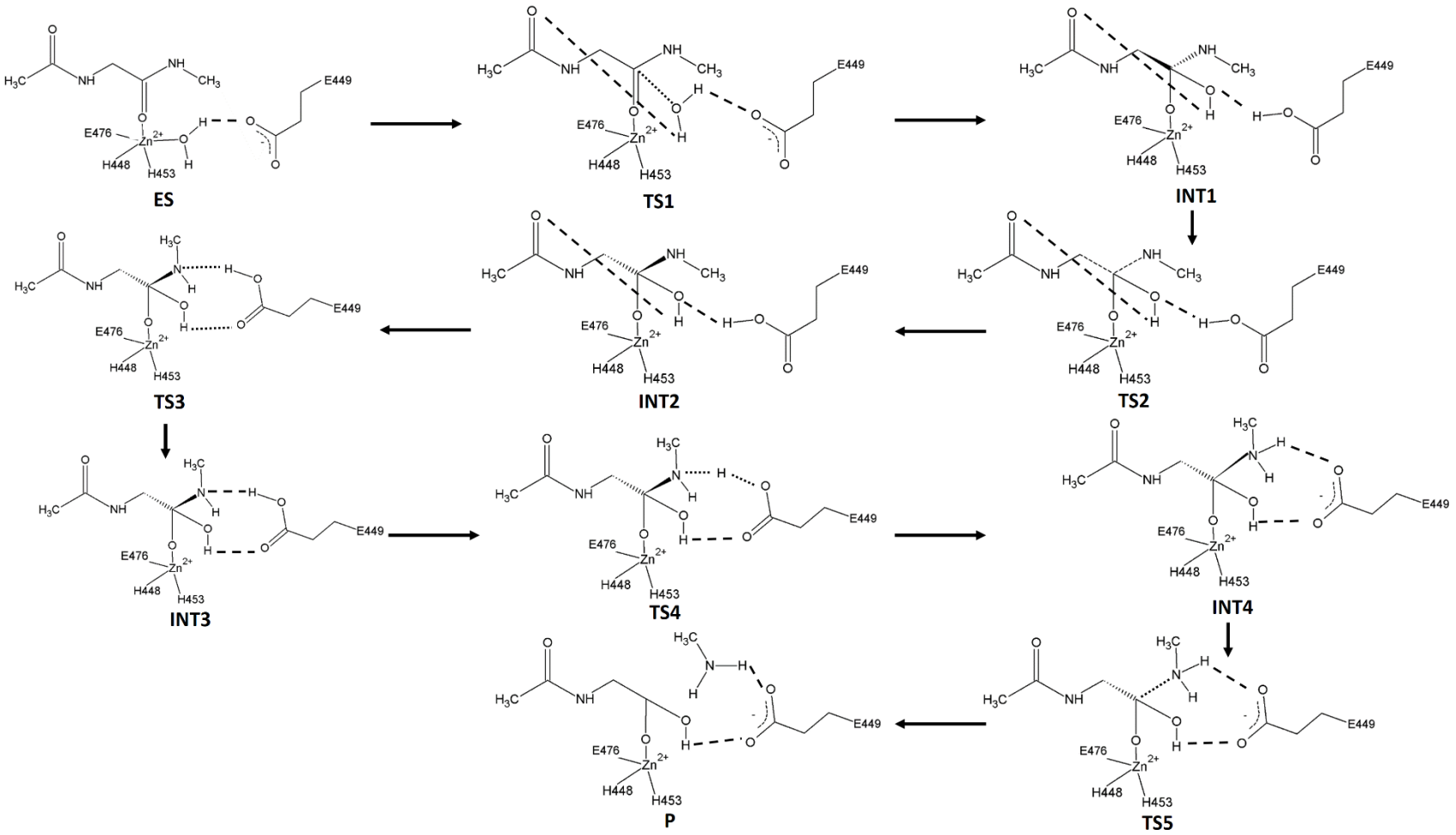


Slika 43. Udaljenosti iona cinka od kisikovih atoma karboksilne skupine Glu449 (lijevo) i Glu476 (desno) u kompleksu *Bt*DPP III s H-Phe-Gly-NHOH (gornji red) i H-Tyr-Phe-NHOH (donji red).

4.2. Mehanizam katalize *Bt*DPP III na modelnom sustavu

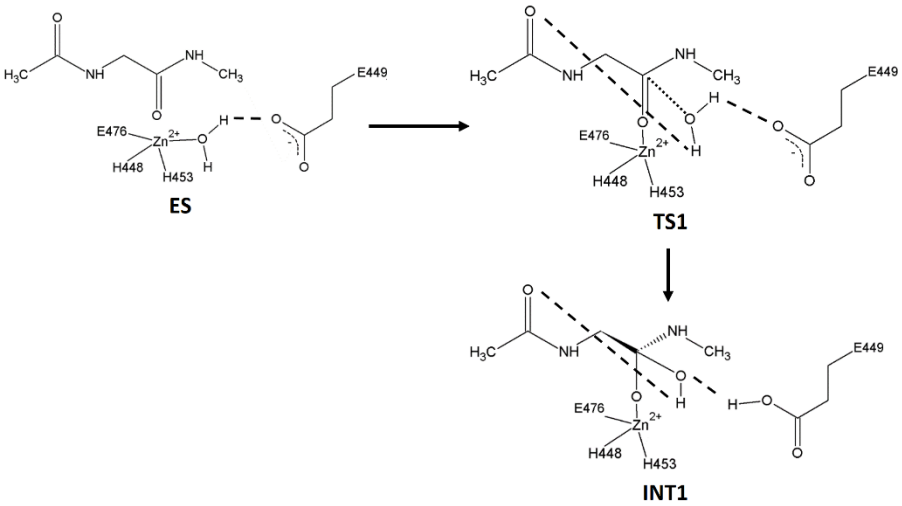
Modelni sustav za proučavanje mehanizma katalize priređen je na način opisan u poglavlju 3.8. Njegovom optimizacijom dobiven je polazni kompleks enzim–supstrat (ES), u kojem je koordinacijski broj cinka 4, što je u skladu s prethodnim kvantno-mehaničkim i kvantno-

mehaničkim–molekulsko-mehaničkim studijama na humanoj DPP III.[4] Na temelju sličnosti optimiziranih geometrija enzim-supstrat kompleksa kod ortologa, hDPP III i *Bt*DPP III, pretpostavljena je sačuvanost mehanizma katalize što je i pokazano na modelnom sustavu (slike 2 i 44, tablica D1).



Slika 44. Shematski prikaz predloženog mehanizma reakcije hidrolize peptidne veze katalizirane *Bt*DPP III enzimom. Radi jasnoće, His533 i Tyr309 izostavljeni su iz prikaza. Vodikove veze prikazane su isprekidanim, a veze u nastajanju (ili nestajanju) točkastim crnim linijama.

Prvi korak u mehanizmu je nukleofilni napad vode aktivirane glutamatom Glu449 na ugljik karbonilne skupine peptidne veze (slika 45). Uz energijsku barijeru od 90,1 kJmol^{-1}, ovaj korak određuje brzinu reakcije. Analogan korak predložen je i u mehanizmu humanim ortologom katalizirane reakcije, gdje također određuje brzinu reakcije.[4] Za razliku od hDPP III, u modelnom sustavu *Bt*DPP III molekula vode izlazi iz koordinacijske sfere cinka prilikom adicije.

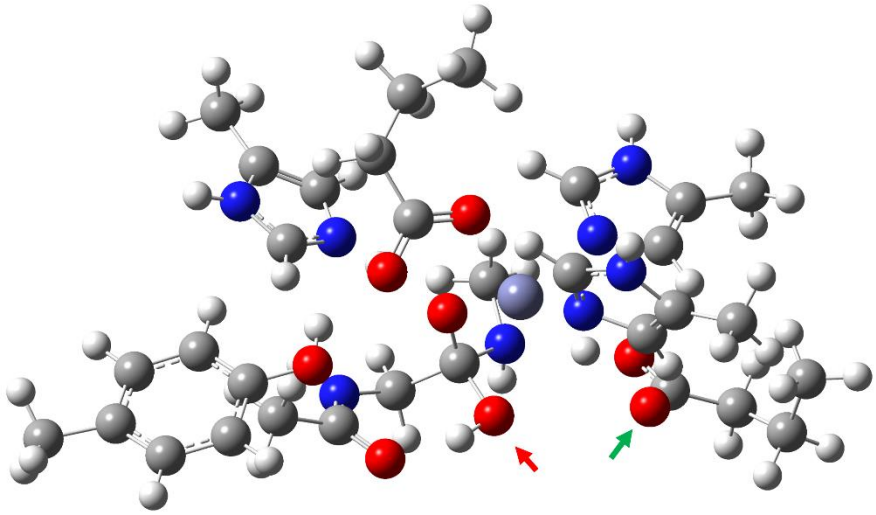


Slika 45. Prvi korak mehanizma hidrolize peptidne veze katalizirane *Bt*DPP III. Nukleofilni napad molekule vode na karbonilni ugljik peptidne veze. Vodikove veze naznačene su isprekidanim linijama, a veze u nastajanju ili nestajanju točkastim linijama.

U sljedećem koraku dolazi do inverzije konfiguracije na ugljikovom, odnosno dušikovom atomu peptidne veze pri čemu dolazi do promjene torzijskog kuta C-N_s-C_s-H_n s -118,1° u INT1 na 119,1° u INT2, gdje C predstavlja terminalni ugljikov, a H_n vodikov atom vezan za N_s (slika D2). Energetska barijera za ovaj prijelaz iznosi 66,7 kJmol^{-1}, dok je kod hDPP III iznosila 38,3 kJmol^{-1} u modelnom sustavu, odnosno 59,4 kJmol^{-1} kod tretiranja cijelog enzima QM/MM pristupom.

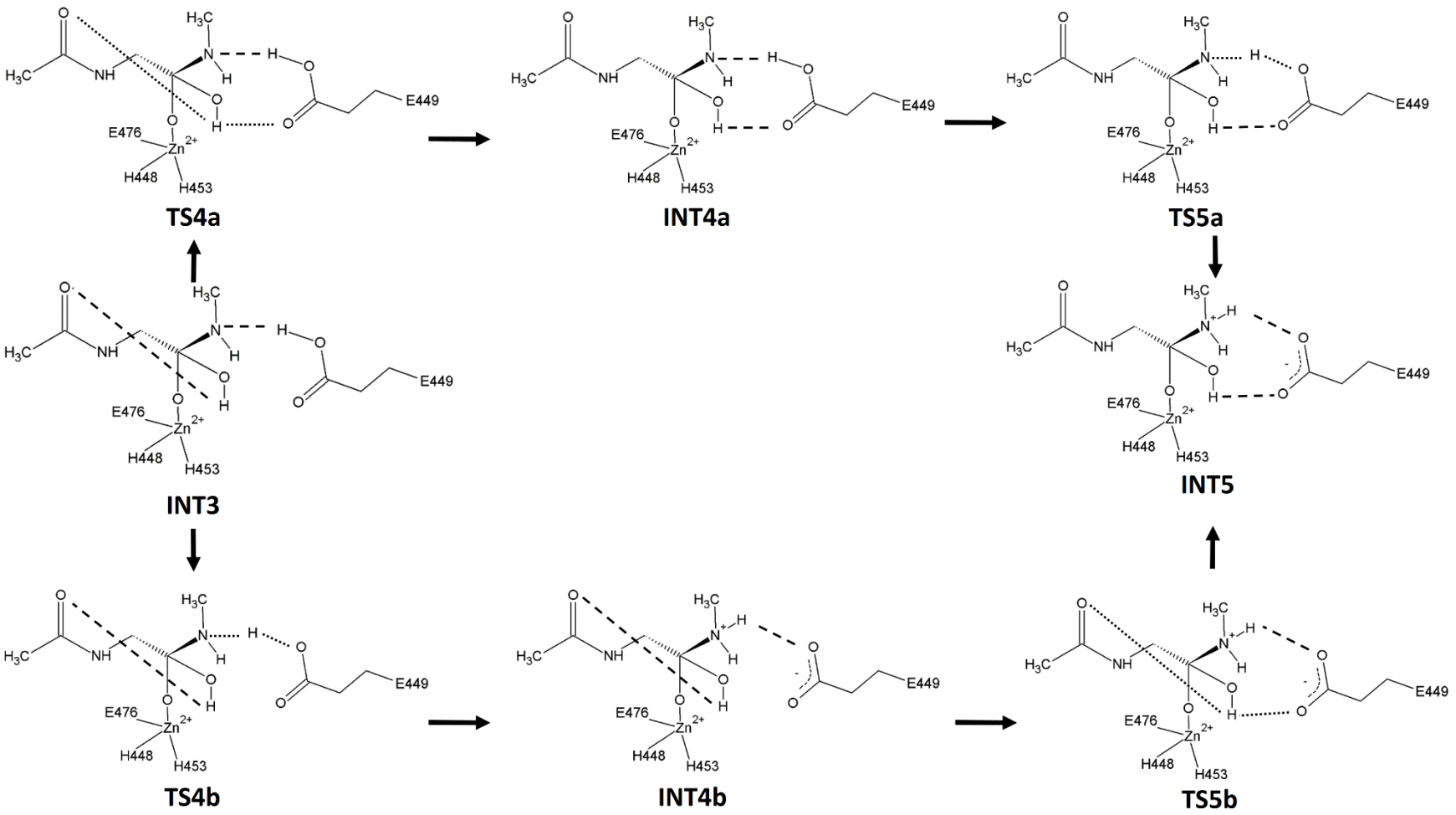
Prijelazno stanje TS3, koje odgovara pomaku karbonilne skupine čime bi došlo do "zaključavanja" supstrata u danoj konformaciji,[4] nije pronađeno. Moguće je da u reakcijskom putu kod *Bt*DPP III taj korak uistinu ne postoji, ili je navedena razlika posljedica nesavršenosti modela. Valja se podsjetiti kako je modelni sustav, u nedostatku kristalografski riješene strukture kompleksa *Bt*DPP III, dobrim dijelom baziran na rezultatima MD simulacija kompleksa *Bt*DPP III s RRNA. Također, pomak karbonilne skupine u humanom ortologu

uzrokuje usklađeno stvaranje vodikovih veza s dušikovim atomom supstrata, te hidroksilnom skupinom na C_s atomu, što u modelnom sustavu *Bt*DPP III nije moguće zbog orijentacije hidroksilne skupine koja tvori vodikovu vezu s karbonilnom skupinom prve peptidne veze supstrata (slika 46).



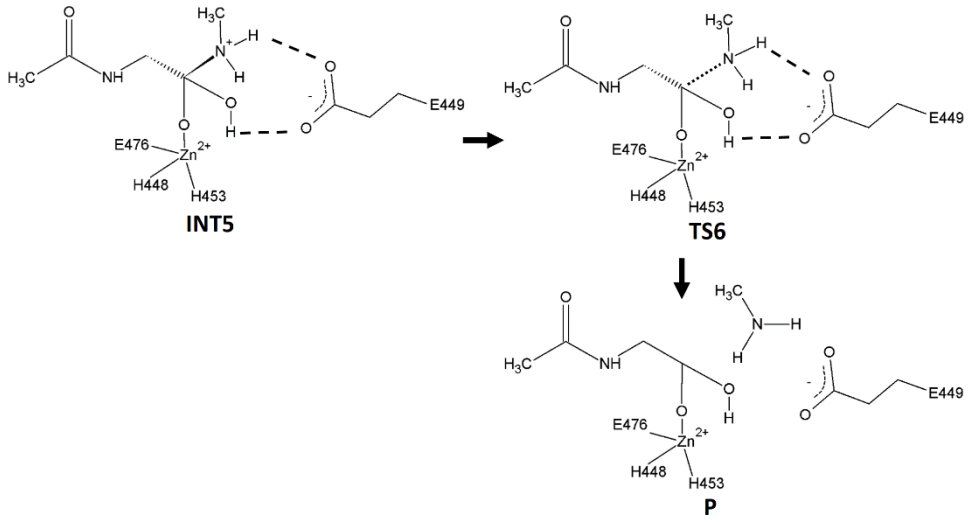
Slika 46. Međuprodukt INT3. Hidroksilna skupina koja u "zaključanoj" konformaciji hDPP III čini vodikovu vezu naznačena je crvenom, a odgovarajuća karboksilna skupina (akceptor vodikove veze) zelenom. Slika je izrađena programom GaussView.[139]

Za rotaciju spomenute –OH skupine identificirana su dva prijelazna stanja; jedno odgovara rotaciji prije (TS4a), a drugo nakon (TS5b) prijenosa protona s karbonilne na amino skupinu, te su u skladu s time za prijelaz INT3 u INT4 (prijenos protona s karbonilne na amino skupinu) predložena dva reakcijska puta i uvedeni novi nazivi stanja (slika 47). Tako INT4 u shemi prikazanoj na slici 44 postaje INT5, a TS5 postaje TS6 (slike 47 i 48). No budući da TS3 nije identificiran, ostaje nejasno odvijaju li se rotacija hidroksilne i pomak karbonilne skupine usklađeno.

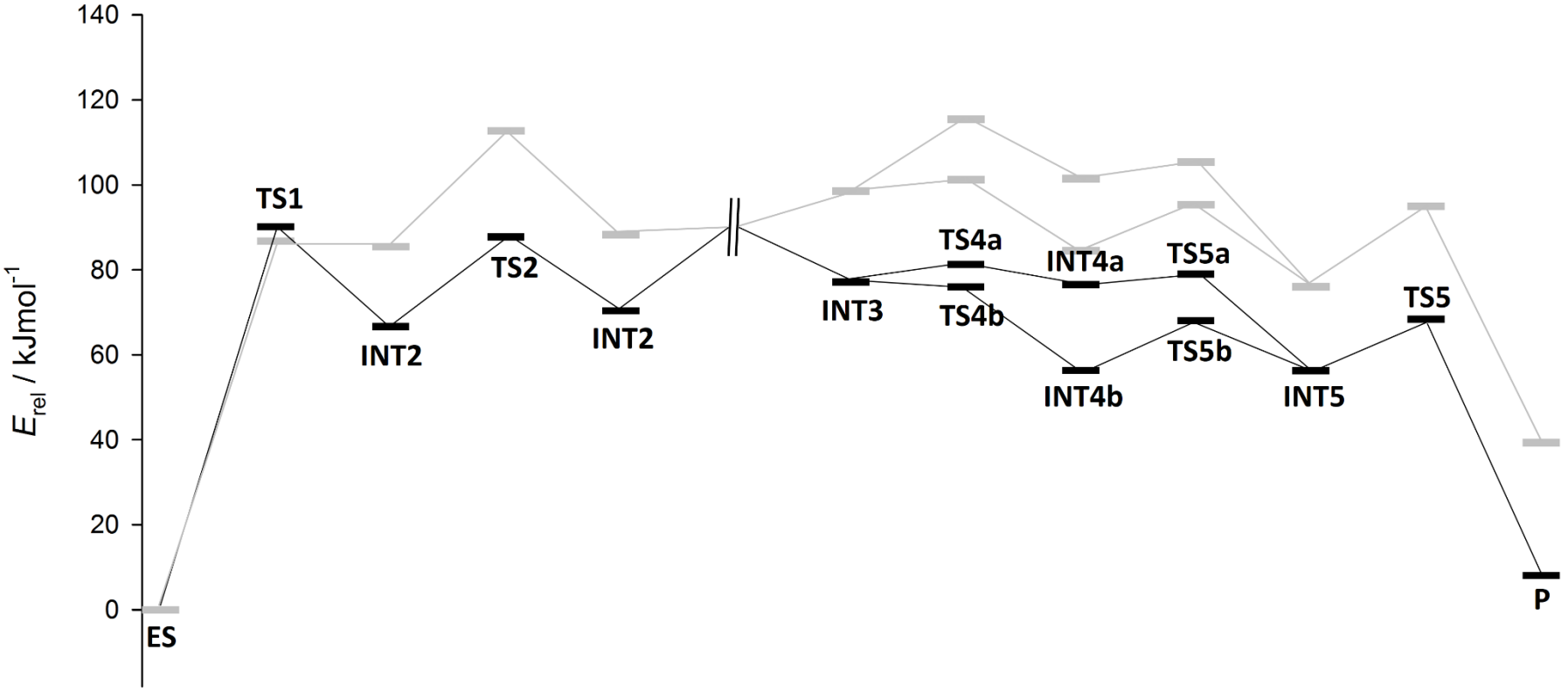


Slika 47. Shematski prikaz dva moguća reakcijska puta od INT3 do INT5 s različitim redoslijedima prijenosa protona i rotacije hidroksilne skupine. Vodikove veze naznačene su debelim isprekidanim linijama, a veze u nastajanju ili nestajanju točkastim linijama.

Iako su oba puta od INT3 do INT5 teoretski moguća, iz izračunatog energetskog profila reakcije (slika 49) vidljivo je kako je put preko međuprodukta INT4b energetski nešto povoljniji zbog nižih energija TS4b i TS5b. Štoviše, pri sobnoj temperaturi TS4b iščezava, tj. niže je energije od INT3 te sustav spontano evoluira u INT4b. Za razliku od humane DPP III, gdje je prijenos protona na amidni dušik supstrata usklađen sa cijepanjem C–N veze, kod modelnog sustava *Bt*DPP III identificirano je stanje koje sadrži protoniranu amino skupinu, a do izlaska metilamina dolazi u zasebnom koraku (slika 48).



Slika 48. Posljednji korak mehanizma hidrolize peptidne veze: izlazak amina. Vodikove veze naznačene su debelim isprekidanim linijama, a veze u nastajanju ili nestajanju točkastim linijama.



Slika 49. Energetski profil reakcije hidrolize peptidne veze izračunat na B97D/[6-31G(d) + LanL2DZ] razini teorije. Relativne energije bez korekcije za energiju nulte točke (ZPVE) prikazane su sivom, a relativne Gibbsove energije pri sobnoj temperaturi crnom bojom.

4.3. Struktura i dinamika DPP III iz *Caldithrix abyssi*

Za razliku od *Bt*DPP III, za koju su poznate otvorena i zatvorena kristalna struktura,[6] u slučaju *Ca*DPP III eksperimentalno je određena samo jedna struktura (PDB kod: 6EOM), koja odgovara parcijalno zatvorenom enzimu. Iako je *Ca*DPP III znatno manji od *Bt*DPP III te u aktivnom mjestu sadrži pentapeptidni ^{379}HEISH motiv umjesto uobičajenog heksapeptidnog, na osnovi sličnosti trodimenzionalnih struktura pojedinih domena (tablica 12) pretpostavljeno je da podliježe sličnim konformacijskim promjenama dugog dosega. Prisutnost međudomenskog procjepa te široka supstratna specifičnost prema sintetskim supstratima (dipeptidil-2-naftilamidi)[7] također podržavaju takvu pretpostavku.

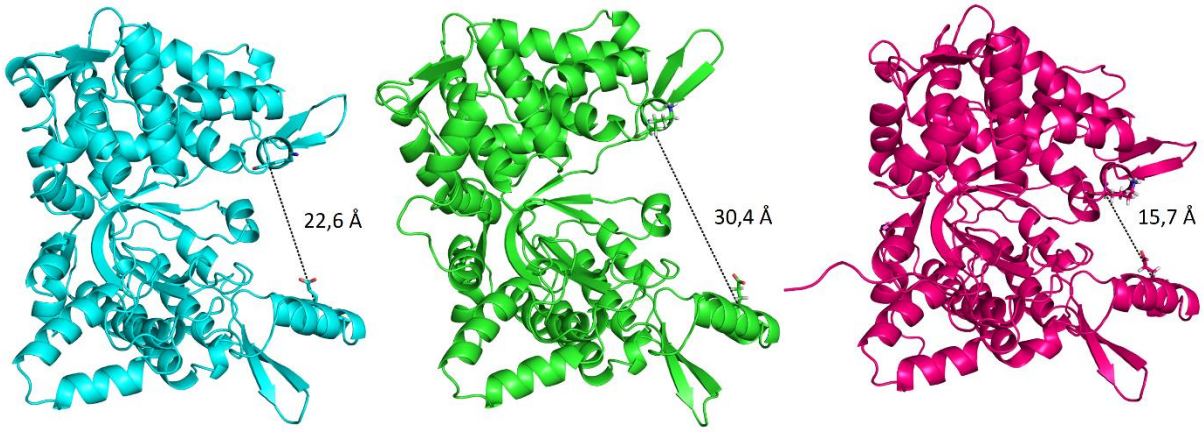
Tablica 12. RMSD vrijednosti izračunate za eksperimentalno određene strukture *Ca*DPP III i *Bt*DPP III, te pojedine njihove domene.[7]

Sustav	RMSD / Å
*Ca*DPP III prema otvorenoj *Bt*DPP III	4,58
*Ca*DPP III prema zatvorenoj *Bt*DPP III	3,73
Donje domene[a]	1,56
Gornje domene[a]	1,46

[a]Koristi se zatvorena struktura *Bt*DPP III

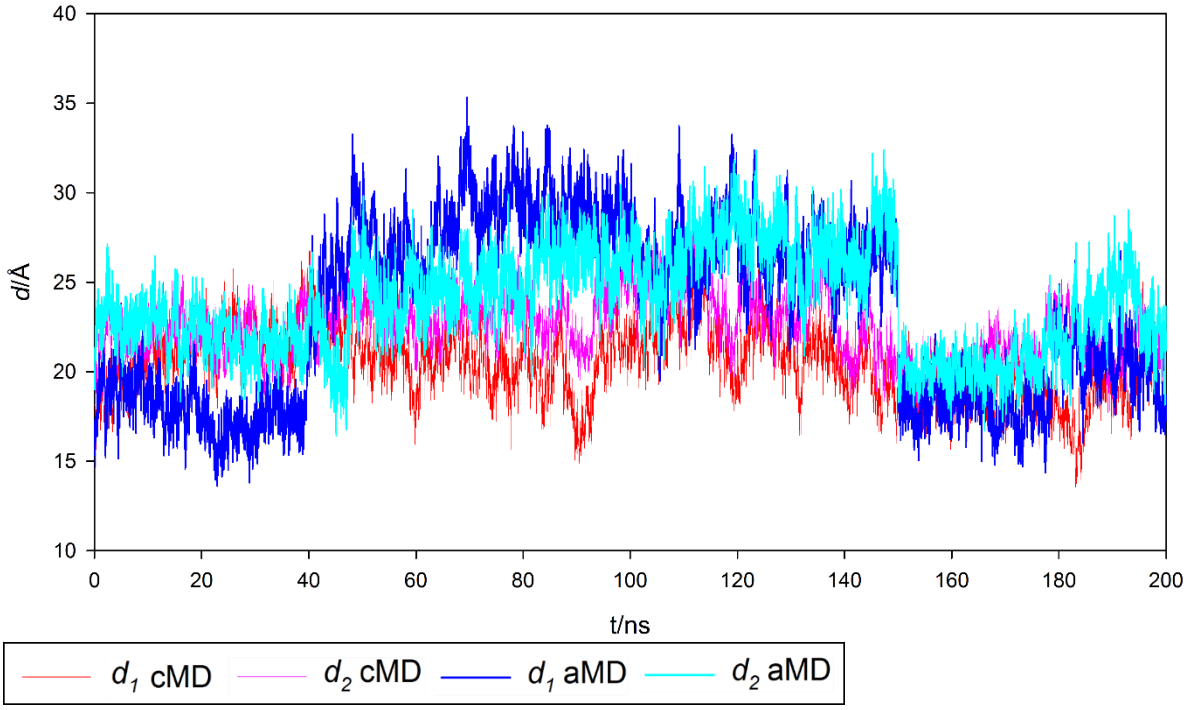
Istraživanja provedena za *Bt*DPP III i hDPP III[140] pokazala su da je ff14SB polje sila primjereno za opis DPP III ortologa, te je korišteno i za parametrizaciju *Ca*DPP III.

Tijekom dugih MD simulacija došlo je do značajnih konformacijskih promjena *Ca*DPP III. Tijekom standardnih MD simulacija uočeno je zatvaranje enzima (primicanje domena), dok je tijekom aMD simulacija uočeno i zatvaranje i ponovno otvaranje DPP III (slika 50). To je prvi slučaj da je tijekom MD simulacija nekog DPP III ortologa uočena tako brza reverzibilna promjena konformacije. Amplituda konformacijske promjene *Ca*DPP III (8 Å) znatno je manja no kod *Bt*DPP III (16 Å) i hDPP III (17 Å), što se može objasniti razlikama u njihovoj veličini te većom rigidnošću enzima.



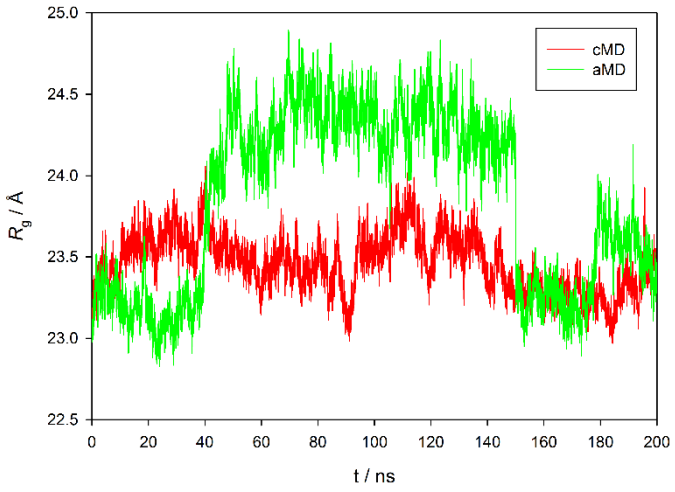
Slika 50. Kristalna struktura *Ca*DPP III (plavo), otvorena *Ca*DPP III struktura, dobivena aMD simulacijama, (zeleno) te zatvorena struktura, dobivena MD simulacijama (crveno). Udaljenost d_1 (E142–K404) prikazana je crnom isprekidanom linijom. Slika je izrađena u programu PyMol.

Za praćenje geometrijskih promjena tijekom simulacija korišteni su parametri analogni onima kod *Bt*DPP III: radijus giracije te udaljenosti d_1(E142–K404) i d_2(E330–K404). Važno je napomenuti kako je tijekom ekvilibracije sustava došlo do značajnog zatvaranja domena (udaljenost d_1 se smanjila s 22,6 na 15,4 Å), te se u produktivne MD simulacije krenulo s relativno kompaktnom, WT^{c}_{MD} strukturom. Otvaranje i zatvaranje sktrukture tijekom aMD simulacija popraćeno je značajnim promjenama d_1 i d_2 vrijednosti, dok tijekom standardnih MD simulacija nije došlo do većih konformacijskih promjena, tj. enzim je zadržao zatvorenu formu postignutu tijekom ekvilibracije (slika 51).



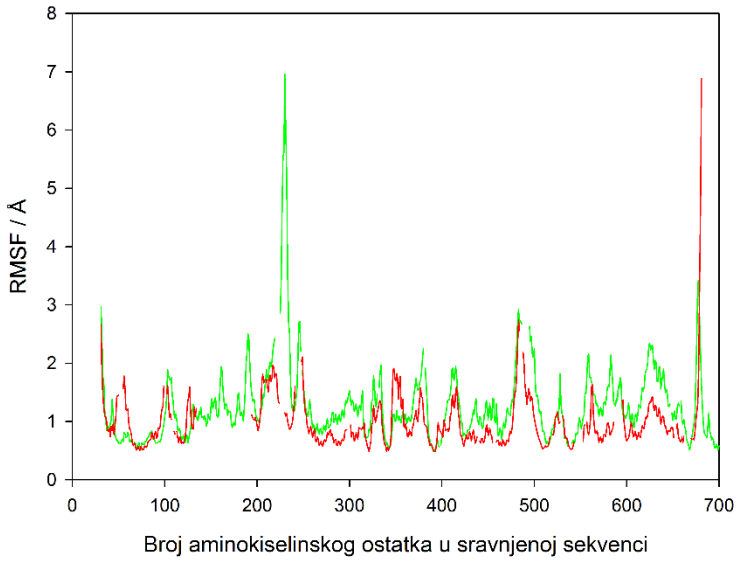
Slika 51. Promjena d_1(E142–K404) i d_2(E330–K404) udaljenosti tijekom 200 ns MD simulacija *Ca*DPP III.

Za razliku od *Bt*DPP III, kod *Ca*DPP III promjene radijusa giracije koreliraju s promjenama udaljenosti d_1 i d_2 (slika 52). Razlog tome je manji broj nestrukturiranih regija u *Ca*DPP III, osobito uz površinu enzima.



Slika 52. Promjena radijusa giracije tijekom 200 ns MD (crveno) i aMD (zeleno) simulacija *Ca*DPP III.

Fleksibilnost pojedinih aminokiselinskih ostataka tijekom simulacija sugerira da je *Ca*DPP III značajno rigidniji od *Bt*DPP III (slika 53). Ovakav rezultat u skladu je s povećanom termalnom stabilnošću *Ca*DPP III te većim brojem intramolekulskih interakcija (tablica 2).[7]



Slika 53. RMSF vrijednosti pojedinih aminokiselinkih ostataka za *Bt*DPP III (zeleno) i *Ca*DPP III (crveno) tijekom 200 ns MD simulacija uz polje sila ff14SB. Prvih 30 aminokiselina od N-kraja enzima nije razmatrano zbog velike fleksibilnosti.

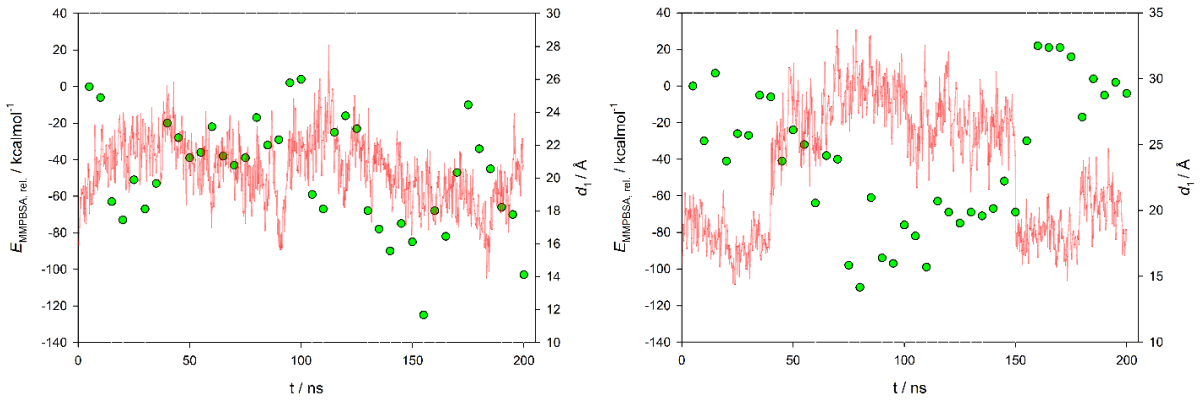
Analiza sekundarne strukture serverom STRIDE[141] pokazuje kako ona ostaje očuvana prilikom konformacijskih promjena dugog dosega (tablica 13). Također se uočava da je *Ca*DPP III znatno strukturiranija od svojih mezofilnih ortologa, što je u skladu s RMSF vrijednostima izračunatim za *Ca*DPP III i *Bt*DPP III (slika 53).

Tablica 13. Udio pojedinih elemenata sekundarne strukture u strukturama DPP III. Podaci su generirani pomoću STRIDE servera.[141]

Organizam	Struktura	Zavojnice/%	Ploče/%	Ostalo/%
Homo sapiens	**Otvorena (PDB kod: 3FVY)**	52,6	14,5	32,9
	Zatvorena (PDB kod: 5EGY)	49,5	14,2	36,3
Bacteroides	**Otvorena (PDB kod: 5NA7)**	52,4	13,1	34,5
thetaiotaomicron	**Zatvorena (PDB kod: 5NA8)**	50,1	13,4	36,5
	Zatvorena (MD)[a]	50,2	11,8	38,0
Caldithrix abyssi	**Kristalna (PDB kod: 6EOM)**	55,4	14,4	30,2
	Otvorena (MD)[b]	56,9	15,0	28,1
	Zatvorena (MD)[c]	55,4	14,4	30,2

[a]nakon 200 ns aMD simulacija uz ff14SB polje sila
[b]nakon 70 ns aMD simulacija uz ff14SB polje sila
[b]nakon 160 ns aMD simulacija uz ff14SB polje sila

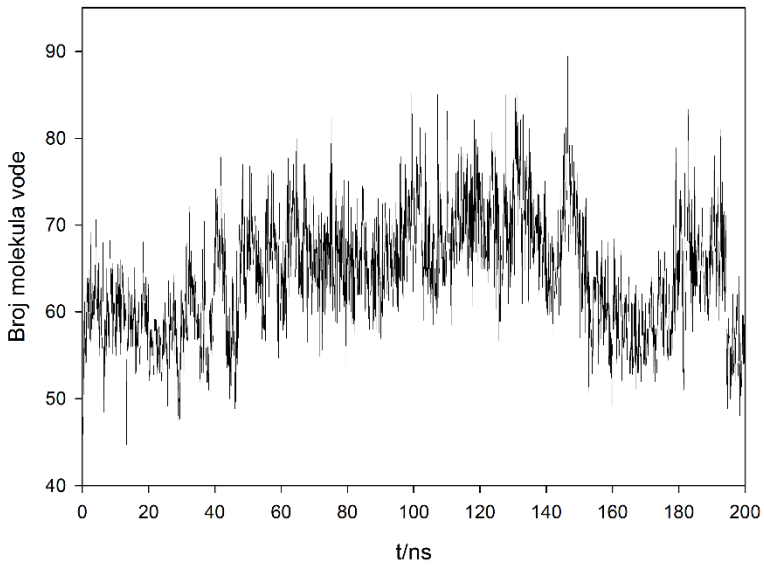
Izračunate MM-PBSA energije vezanja pokazuju isti trend kao i kod *Bt*DPP III, to jest sugeriraju da je zatvorena forma energetski nepovoljnija od otvorene (slika 54). Ovo je osobito vidljivo u slučaju aMD simulacija, gdje su i otvaranje i zatvaranje popraćeni znatnom promjenom MM-PBSA energija. Izračunate razlike energija slične su onima kod *Bt*DPP III (slika 22).



Slika 54. Relativne MM-PBSA energije *Ca*DPP III tijekom 200 ns MD simulacija (zelene točke) i pripadna promjena d_1 udaljenosti (crvena linija). Lijevo su prikazani podaci za standardne, a desno za aMD simulacije.

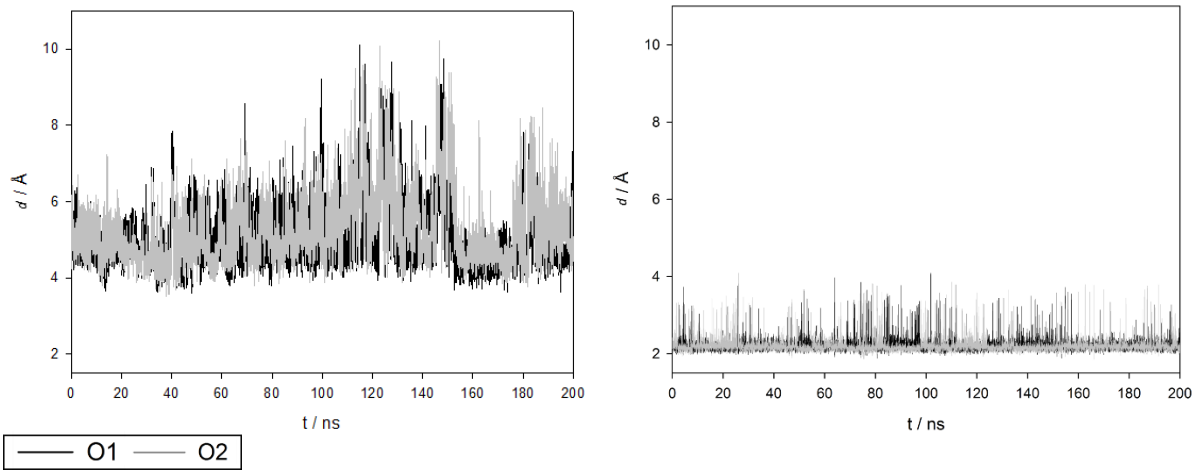
Kao i kod humanog i *B. thetaiotaomicron* ortologa, ova razlika u energiji otvorene i zatvorene forme kompenzira se entropijskim doprinosom otpuštanja molekula vode iz procjepa prilikom

zatvaranja. Iako je amplituda zatvaranja kod *Ca*DPP III manja nego kod *Bt*DPP III i hDPP III, broj molekula vode u procjepu znatno se smanji (slika 55). Maksimalna promjena, od oko 50 molekula vode, odgovara smanjenju energije od oko 60–115[133,134] kcal mol^{-1} koliko je otprilike i razlika potencijalnih energija između otvorene i zatvorene forme enzima.



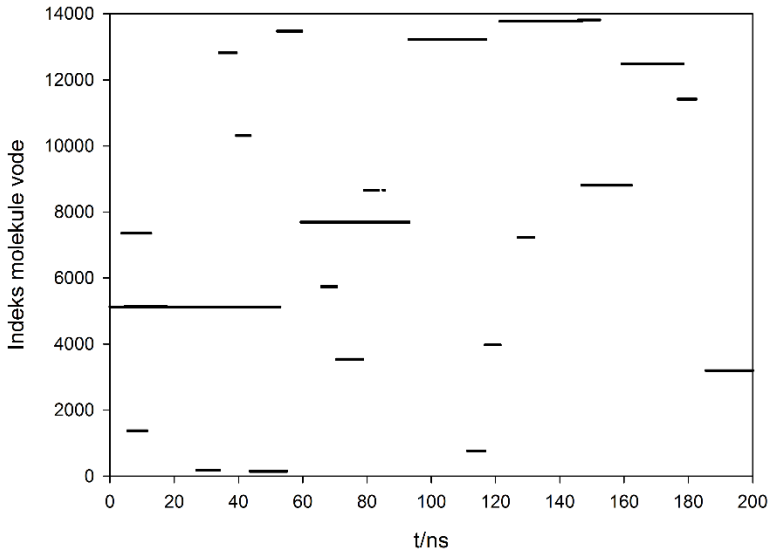
Slika 55. Broj molekula vode unutar sfere radijusa 10 Å oko iona cinka tijekom 200 ns aMD smulacija *Ca*DPP III uz ff14SB polje sila.

Ion cinka tijekom simulacija koordiniran je histidinima His379 i His383 iz očuvanog HEISH motiva te glutamatom Glu412 iz motiva EEXR(K)AE(D), također očuvanog u porodici DPP III. Za razliku od humanog ortologa i *Bt*DPP III, karboksilna skupina Glu380 iz HEXGH (HEXXGH) motiva ne ulazi u koordinacijsku sferu cinka (slika 56).



Slika 56. Udaljenosti iona cinka od kisikovih atoma karboksilne skupine Glu380 (lijevo) i Glu412 (desno) tijekom 200 ns MD simulacija slobodnog enzima *Ca*DPP III.

Kvantno-mehanički računi pokazuju kako je takva koordinacija iona cinka preduvjet za odvijanje reakcije hidrolize peptidne veze katalizirane od strane humanog ortologa.[4] Za razliku od humanog i *B. thetaiotaomicron* ortologa, tijekom simulacija *Ca*DPP III broj molekula vode u koordinacijskoj sferi cinka varira između jedne i tri (slika 57). Opažene brze izmjene molekula vode za vrijeme cijelog trajanja simulacija posljedica su brzih konformacijskih promjena enzima i nisu u tolikoj mjeri izražene kod hDPP III i *Bt*DPP III.[10,118]



Slika 57. Zadržavanje pojedinih molekula vode u koordinacijskoj sferi iona cinka. Smatra se da molekula vode koordinira ion cinka ukoliko se nalazi unutar 3,0 Å od njega.

Kod humanog je ortologa utvrđena važnost Asp372 za primicanje domena i Tyr318, za katalitičku aktivnost enzima[10,17,58] te je stoga posebna pozornost posvećena njihovim analozima

Ser297 i Tyr242 u *Ca*DPP III. Tyr242 nalazi se u blizini aktivnog mjesta te tijekom MD simulacija kontinuirano tvori vodikove veze s Glu240 koji se temeljem sravnjenja sekvenci s humanim ortologom smatra dijelom aktivnog podmjesta S2.[7] Ser297, lociran u gornjoj domeni, u ranim fazama zatvaranja interagira s Lys326, odnosno kasnije sa Ser334 iz donje domene, što potiče zatvaranje *Ca*DPP III.

4.3.1. HEISGH mutant i uloga pentapeptidnog motiva

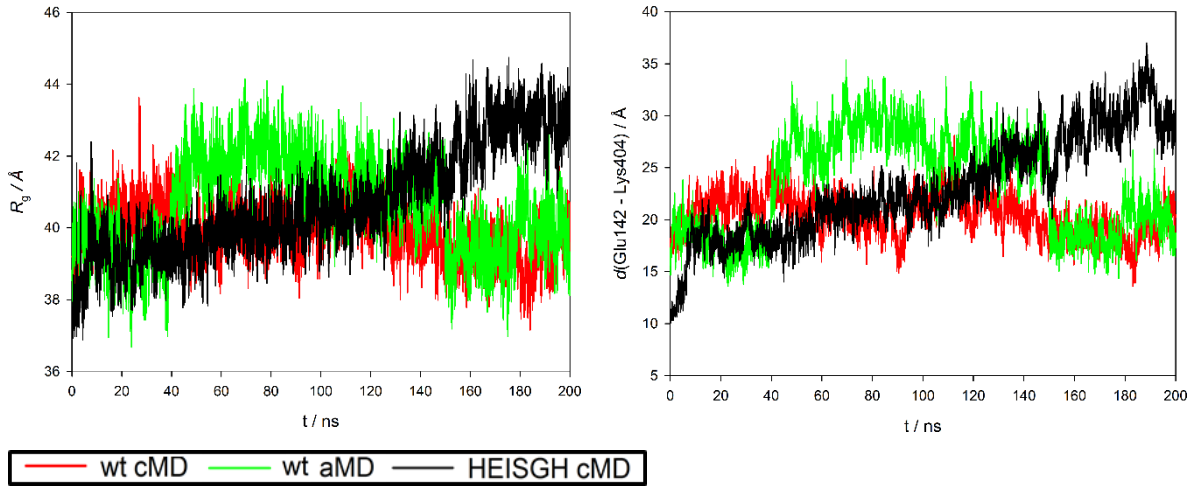
Nedavno provedene bioinformatičke analize otkrivaju kako je tradicionalno očuvani HEXXGH motiv u porodici DPP III kod nekih novoopisanih članova, poput *Ca*DPP III, reduciran na pentapeptidni HEXXH motiv. Kako bi se proučila važnost ovog motiva i njegova eventualna uloga u termalnoj stabilnosti enzima, priređeni HEISGH mutant podvrgnut je konvencionalnim MD simulacijama u trajanju od 200 ns.

Nije primjećen utjecaj mutacije (insercije Gly u pentapeptidni motiv HEISH) na sprječavanje otvaranja, odnosno zatvaranja enzima, niti narušavanje strukure pojedinih domena. Kompaktna struktura HEISGH mutanta nešto je otvorenija od one divljeg tipa dok kod otvorenih struktura nema značajnih razlika (tablica 14).

Tablica 14. Pregled geometrijskih parametara za eksperimentalno određenu strukturu *Ca*DPP III (WT_E) i za MD simulacijama dobivene, otvorene i zatvorene, strukture divljeg tipa (WT^o_{MD}, odnosno WT^c_{MD}) i HEISGH mutanta ($HEISGH^o$, odnosno $HEISGH^c$). Indeksi DD i GD kod RMSD vrijednosti označavaju donju, odnosno gornju domenu.

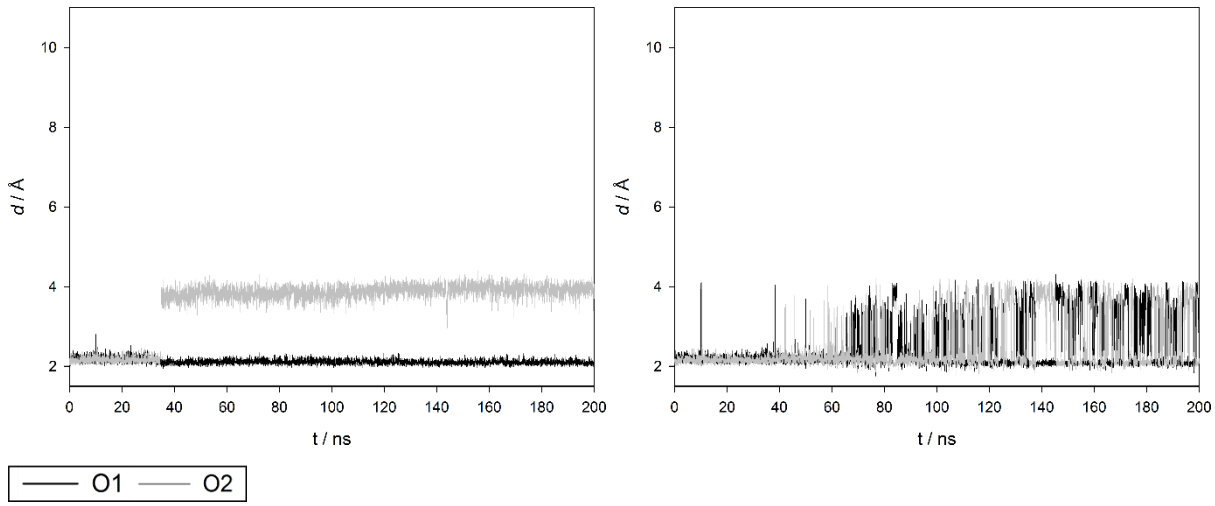
Geometrijski parametar	**WT_E**	**WT^c_{MD}**	**WT^o_{MD}**	**$HEISGH^o$**	**$HEISGH^c$**
R_g / Å	23,5	23,1	23,9	24,7	23,3
d_1(E142-K404) / Å	22,6	15,7	22,9	31,1	17,6
d_2(E330- K404) / Å	23,2	21,0	22,9	20,9	18,5
$RMSD_{DD}$ / Å	0	0,963	1,278	1,100	0,993
$RMSD_{GD}$ / Å	0	0,769	0,910	0,846	0,687

Iz promjene radijusa giracije i d_1 udaljenosti HEISGH mutanta vidljivo je da tijekom simulacije dolazi do otvaranja enzima u sličnoj mjeri kao i kod divljeg tipa (slika 58). Ekvilibracija sustava rezultira vrlo kompaktnom strukturom u slučaju mutanta (osobito vidljivo iz d_1 udaljenosti na početku *NpT* simulacije).



Slika 58. Promjena radijusa giracije i d_1 udaljenosti tijekom 200 ns simulacija slobodnog enzima *Ca*DPP III i HEISGH mutanta.

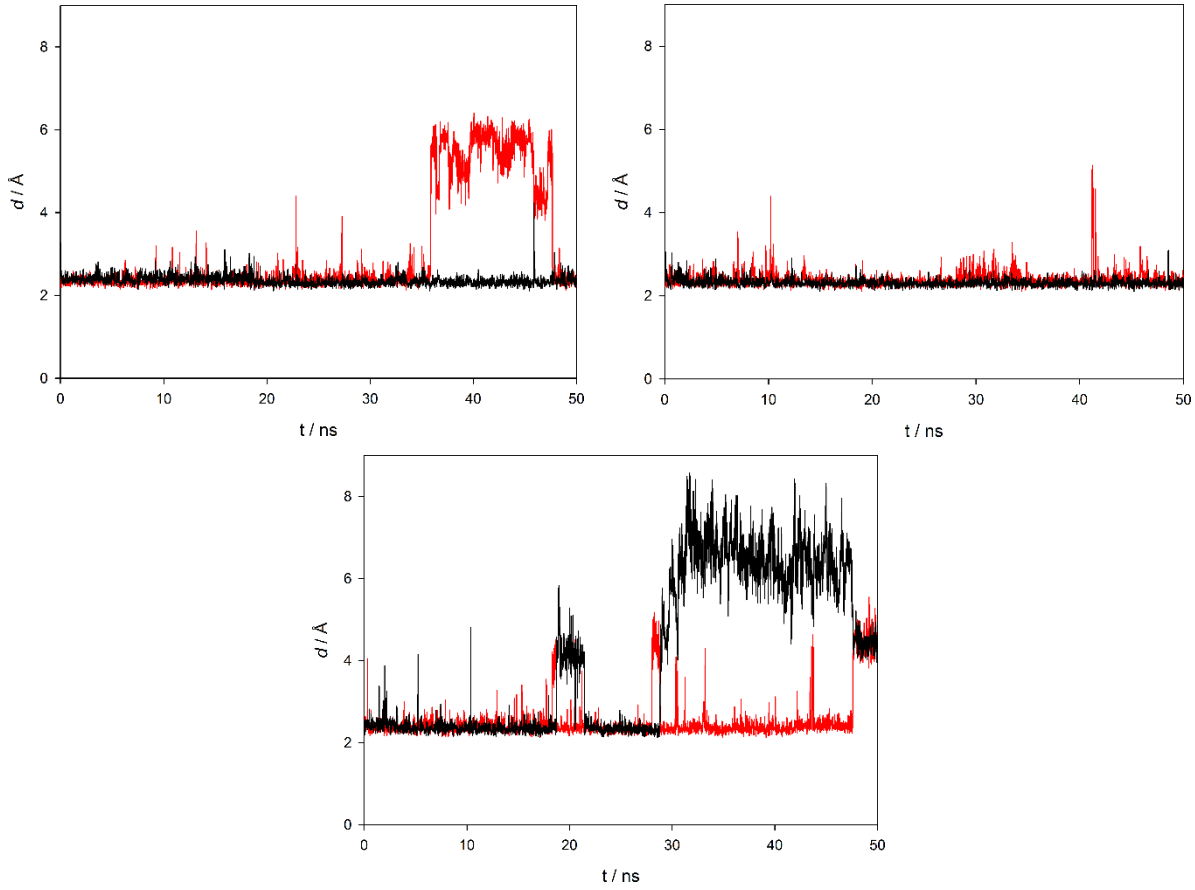
Koordinacija iona cinka u mutantu razlikuje se od one kod divljeg tipa (slika 56). Glu380 kod HEISGH mutanta ulazi u koordinacijsku sferu Zn^{2+} kao bidentatni ligand tijekom prvih 35 ns, nakon čega prelazi u monodentatni ligand (slika 59). Slično ponašanje analognih glutamatnih ostataka uočeno je kod hDPP III i *Bt*DPP III koji također sadrže heksapeptidni motiv u aktivnom mjestu. Smatra se da Glu380, odnosno njezini analozi u humanom (Glu451)[4] i *B. thetaiotaomicron* ortologu (Glu449, slika 45) sudjeluju u aktivaciji vode, te da strukture u kojima se Glu380 nalazi u koordinacijskoj sferi cinka nisu podesne za odvijanje reakcije hidrolize peptidne veze.



Slika 59. Udaljenosti iona cinka od kisikovih atoma karboksilne skupine Glu380 (lijevo) i Glu412 (desno) tijekom 200 ns MD simulacija HEISGH mutanta *Ca*DPP III.

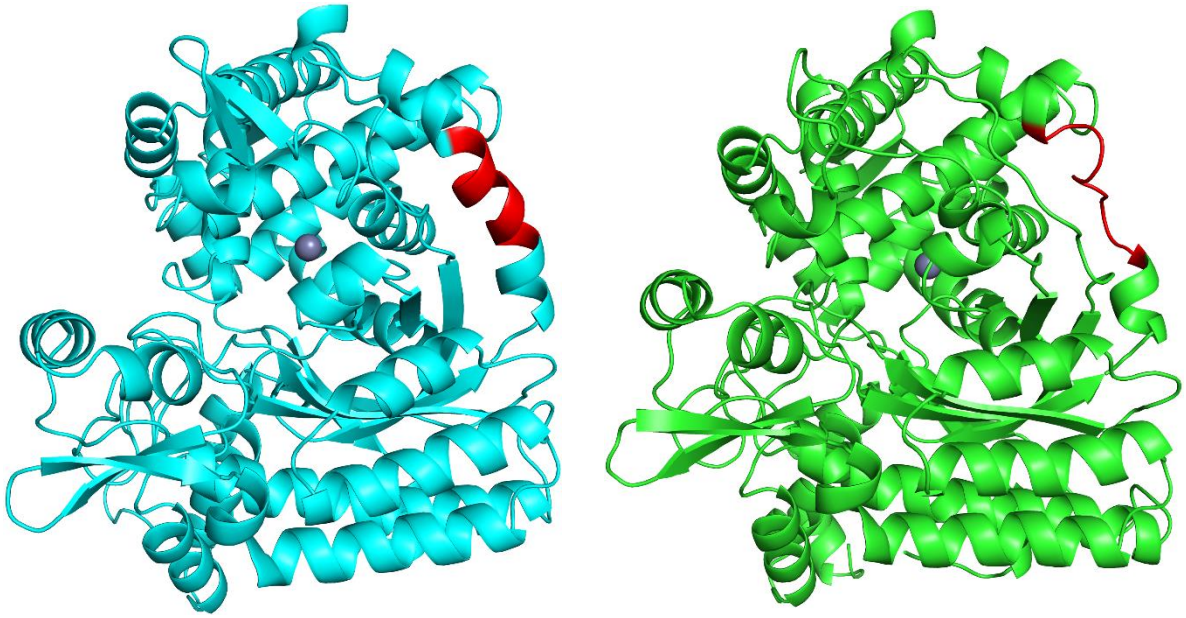
Kako bi se proučila potencijalna važnost pentapeptidnog motiva za termalnu stabilnost aktivnog mjesta, izvršen je niz kraćih (50 ns) MD simulacija HEISGH mutanta na 350, 370 i 400 K. Na osnovu prijašnjih radova na hDPP III i *Bt*DPP III pretpostavljeno je kako su interakcije Nε atoma histidina His379 i His384 (His383 u divljem tipu) s ionom cinka najslabije interakcije u aktivnom mjestu, te su tijekom simulacija pri povišenim teperaturama praćene upravo udaljenosti Nε atoma od iona cinka.

Iako je na 350 K uočen kratak period tijekom kojeg Nε atom histidina His379 ne koordinira ion cinka, raspad aktivnog mjesta uočen je tek na 400 K (slika 60).



Slika 60. Udaljenosti Nε atoma His379 (crvena linija) i His384 (crna linija) od iona cinka tijekom 50 ns MD simulacija na 350 K (gore lijevo), 370 K (gore desno) i 400 K (dolje).

Valja napomenuti kako tijekom simulacija pri povišenim temperaturama dolazi do gubitka sekundarne strukture u dijelovima proteina koji nisu u neposrednoj blizini HEISGH motiva (slika 61). Ovi rezultati ukazuju kako pentapeptid HEISH ne doprinosi termalnoj stabilnosti aktivnog mjesta.



Slika 61. Polazna struktura kod MD simulacija (lijevo) te struktura nakon 50 ns simulacija na 370 K. Zavojnica Lys267 - Leu275 istaknuta je crvenom bojom. Ion cinka prikazan je kao siva kuglica.

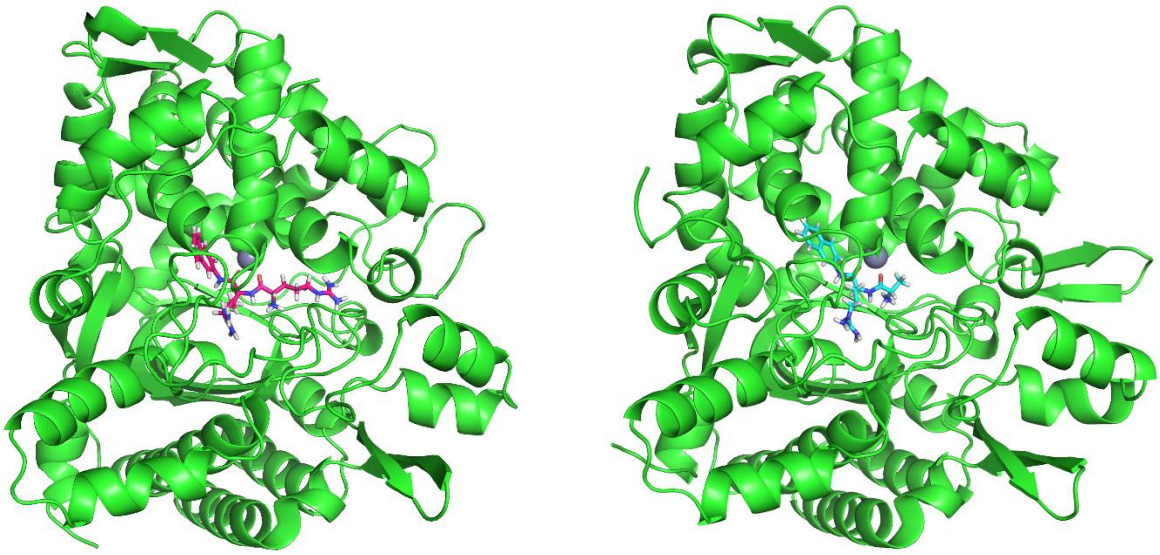
4.3.2. Vezanje liganada i supstratna specifičnost CaDPP III i HEISGH mutanta

Kinetička mjerenja pokazala su značajnu hidrolitičku aktivnost *Ca*DPP III prema Arg_2-2NA i Gly-Arg-2NA (GRNA).[7] Kako bi se eksperimentalni rezultati povezali sa strukturnim karakteristikama *Ca*DPP III, vezanje RRNA i GRNA u aktivno mjesto *Ca*DPP III praćeno je dugim MD simulacijama pri čemu su polazne strukture konstruirane na osnovu poznatih kompleksa: hDPP III s tinorfinom[5] i *Bt*DPP III–RRNA kompleksa prethodno dobivenog korištenjem MD simulacija.[118] Kao polazna struktura enzima uzeta je kompaktna WT^{c}_{EQ} struktura dobivena ekvilibracijom kristalne strukture.

Rezultati MD simulacija kompleksa sugeriraju da prisutnost supstrata pomiče raspodjelu uzorkovanih formi enzima prema kompaktnima pri čemu su simulacijama kompleksâ generirane znatno kompaktnije strukture nego simulacijama slobodnog enzima (tablica 15, slike 50 i 62).

Tablica 15. Pregled geometrijskih parametara za zatvorenu strukturu *Ca*DPP III generiranu MD simulacijama slobodnog enzima (WT^{c}_{MD}) te za strukture dobivene MD simulacijama kompleksa CaDPP III sa sintetskim supstratima RRNA i GRNA. Kao reprezentativne strukture kompleksa uzete su one s najmanjom pripadnom MM-PBSA energijom vezanja. RMSD vrijednosti izračunate su u odnosu na kristalnu strukturu. Indeksi DD i GD kod RMSD vrijednosti označuju donju, odnosno gornju domenu.

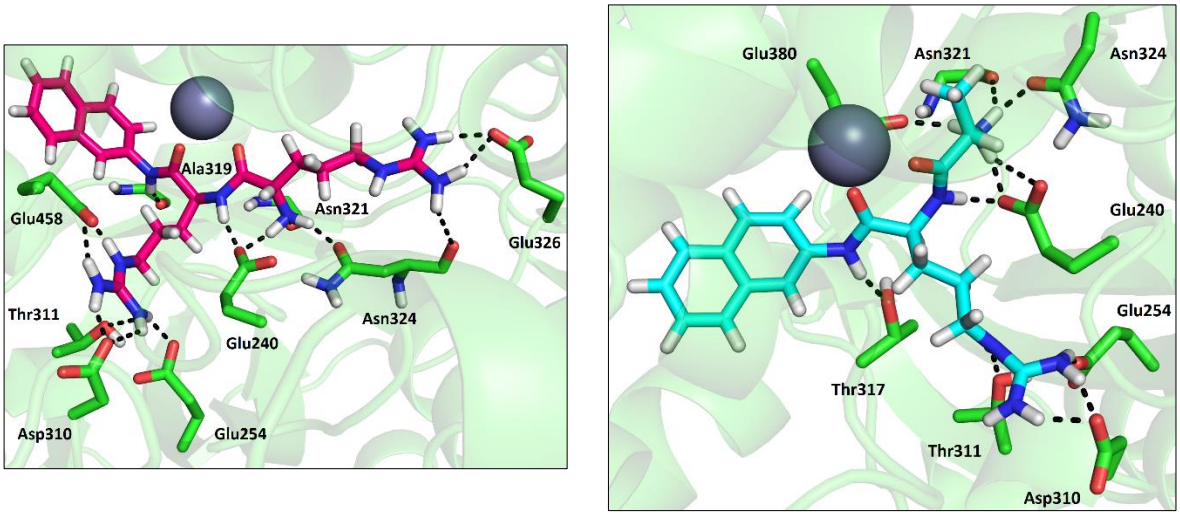
Geometrijski parametar	WT^{c}_{MD}	*Ca*DPP III - RRNA	*Ca*DPP III - GRNA
R_g / Å	23,1	22,4	22,5
d_1(E142-K404) / Å	15,7	10,8	10,8
d_2(E330- K404) / Å	21,0	20,7	18,5
$RMSD_{DD}$ / Å	0,963	0,851	0,971
$RMSD_{GD}$ / Å	0,769	1,070	0,883



Slika 62. Strukture kompleksa *Ca*DPP III sa sintetskim supstratima RRNA (lijevo) i GRNA (desno) s najnižim pripadnim MM-PBSA energijama vezanja. RRNA je prikazana ružičastim štapićima, a GRNA plavim. Ion cinka prikazan je kao siva kuglica. Slika je izrađena u programu PyMol.

Supstrati se u *Ca*DPP III smještaju na isti način kao u humanom i *Bt* ortologu, antiparalelno s β-pločom donje domene (slika 62). Za razliku od *Bt*DPP III–RRNA kompleksa, kod *Ca*DPP III supstrat koordinira ion cinka s oba karbonilna kisika (slika 63). Činjenica da su najniže MM-

PBSA energije vezanja izračunate za navedene supstrate u suglasnosti s kinetičkim podacima podacima (tablica 16) govori u prilog tome da je identificirani mod vezanja biološki relevantan.



Slika 63. Aktivno mjesto kompleksa *Ca*DPP III s RRNA (lijevo) i GRNA (desno). RRNA je prikazana ružičastim štapićima a GRNA plavim. Vodikove veze prikazane su crnim isprekidanim linijama. Ion cinka prikazan je kao siva kuglica. Slika je izrađena u programu PyMol.

Tablica 16. MM-PBSA i MM-GBSA energije vezanja za komplekse *Ca*DPP III s RRNA i GRNA. Sve date energije izražene su u kcalmol^{-1}.

		cMD		aMD[a]	
Ligand	K_M/μM[7]	$\Delta E_{MM\text{-}PBSA}$	$\Delta E_{MM\text{-}GBSA}$	$\Delta E_{MM\text{-}PBSA}$	$\Delta E_{MM\text{-}GBSA}$
RRNA	35,2±2,0	-86,0 (±9,8)	-103,4 (±7,1)	-89,0 (±10,6)	-106,6 (±7,6)
GRNA	328,9±36,5	-70,6 (±11,5)	-89,5 (±6,9)	-60,5 (±5,2)	-79,2 (±6,2)

[a]u aMD simulacijama u trajanju od 50 ns kao polazna točka korištena je struktura dobivena nakon 100 ns cMD simulacija

Detaljnija analiza vodikovih veza otkriva kako je većina stabilizirajućih interakcija prisutna kod oba kompleksa, poglavito one s Glu240, Glu254, Asp310, Asn324 te Asn321 (tablica 17). GRNA uz to tvori značajne (prisutne u više od 30% generiranih geometrija) vodikove veze sa Thr317 i Glu380, dok RRNA tvori vodikove veze s Ala319, Glu326 i Glu458. RRNA tvori veći broj vodikovih veza što je u skladu s izračunatim energijama vezanja te kinetičkim mjerenjima.[7] Aminokiselinski ostaci identificirani kao važni za stabilizaciju supstrata vrlo dobro se preklapaju s aktivnim podmjestima *Ca*DPP III predloženim na osnovu sravnjenja sekvenci s

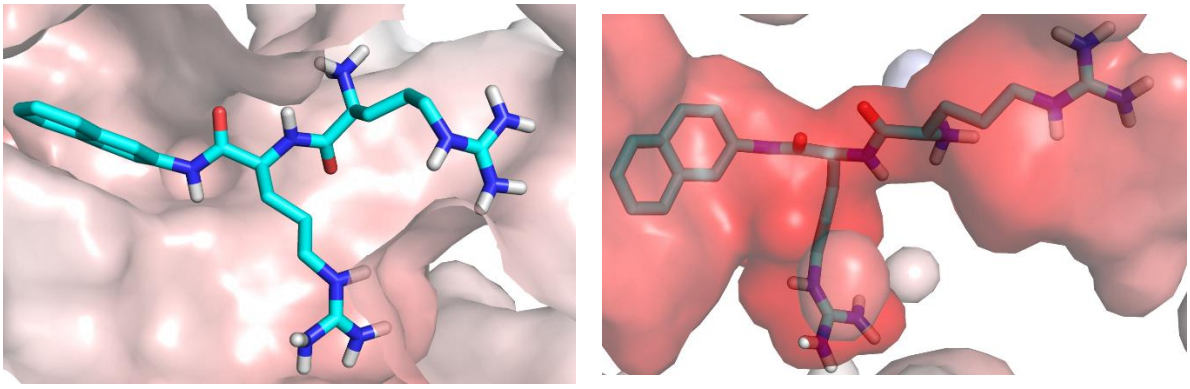
hDPP III i *Bt*DPP III.[7] Glu254, Asp310 i Glu458 čine dio aktivnog podmjesta S1, dok su Glu240, Asn321, Asn324 i Glu326 locirani u (pretpostavljenom) S2 podmjestu.

Tablica 17. Vodikove veze koje RRNA i GRNA tvore s divljim tipom *Ca*DPP III tijekom 150 ns MD simulacija te njihova zastupljenost u generiranim strukturama.[7] Sve vrijednosti dane su u postotcima. Ukoliko aminokiselinski ostatak tvori višestruke vodikove veze sa supstratom, dana je suma njihovih udjela.

Akceptor	**Arg_2-2NA**	**Gly-Arg-2NA**
Glu240	194,8	208,4
Glu254	90,8	87,6
Asp310	130,0	136,4
Thr311	17,6	39,2
Val315	-	13,6
Thr317	-	98,0
Ala319	90,0	-
Asn321	112,0	48,4
Asn324	104,4	65,6
Glu326	147,2	-
Glu380	-	64,4
Glu411	6,0	-
Glu458	163,2	-
Donor	**Arg_2-2NA**	**Gly-Arg-2NA**
Glu240	-	14,0
Val315	-	5,2
Thr317	8,8	-
Asn321	23,2	31,2

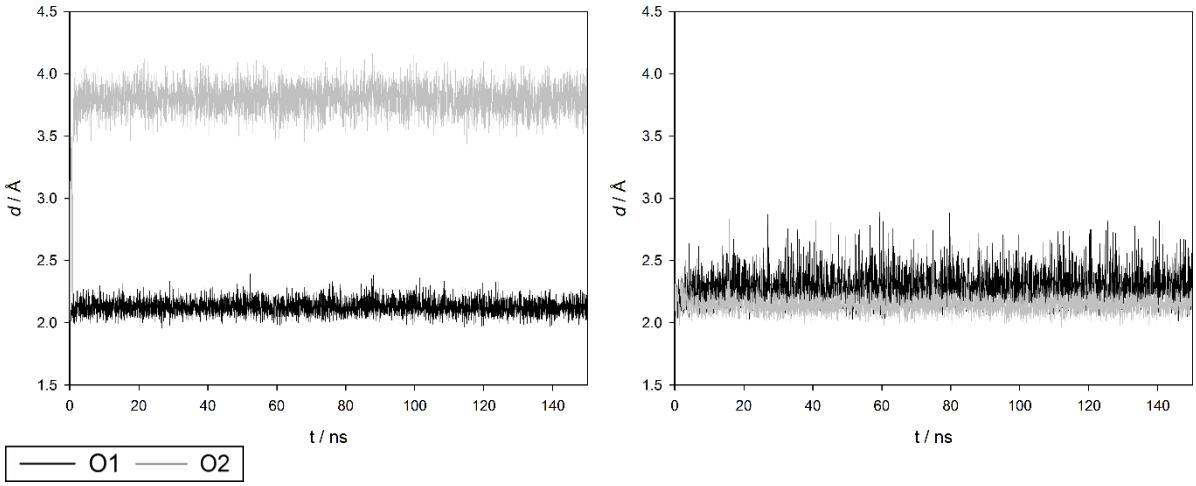
Elektrostatske interakcije u aktivnom mjestu *Ca*DPP III i *Bt*DPP III otkrivaju moguće uzroke izmjerenih kinetičkih parametara. Ukoliko se elektrostatski potencijal mapira uz iste kriterije, uočava se kako je aktivno mjesto *Ca*DPP III znatno negativnije (slika 64, tablica D2). Iako argininski ostaci ostvaruju velik broj stabilizirajućih elektrostatskih interakcija, smještanje hidrofobne naftalenske jezgre u izrazito negativno nabijen džep energetski je nepovoljno. Važnost elektrostatskih interakcija vrlo je dobro ilustrirana činjenicom da u slučaju zamjene

jednog argininskog ostatka glicinskim K_M vrijednost raste s 35,2 na 328,9 μM.[7] Veća gustoća negativnog naboja u aktivnom mjestu vrlo vjerojatno doprinosi velikoj razlici K_M vrijednosti određenih za *Bt*DPP III (2,5 μM)[16] te *Ca*DPP III (35,2 μM).[7]



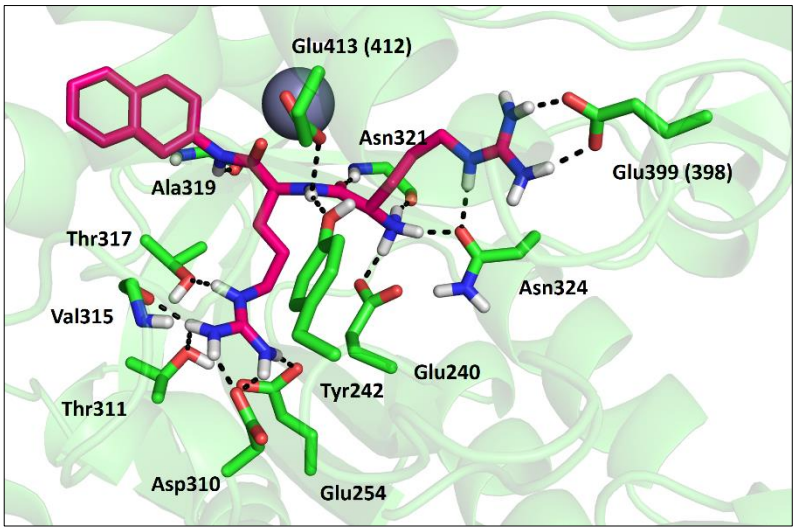
Slika 64. Elektrostatski potencijal mapiran na regije oko aktivnog mjesta *Bt*DPP III (lijevo) i *Ca*DPP III u kompleksu s RRNA (desno). Korištena je skala naboja od -30 do +30e. Slika je izrađena uz pomoć APBS modula u programu PyMol.

Glu380 u kompleksu *Ca*DPP III s RRNA koordinira ion cinka monodentatno tijekom 150 ns simulacije, kao i njegov analog Glu449 u *Bt*DPP III (slika 65). No, karboksilna skupina Glu412 u *Ca*DPP III ponaša se isključivo kao bidentatni, dok je Glu476 u *Bt*DPP III pretežito monodentatni ligand. Moguć uzrok tome mogla bi biti primjetno veća kompaktnost *Ca*DPP III–RRNA kompleksa, zbog koje je Glu412 pozicioniran bliže ionu cinka.



Slika 65. Udaljenost kisikovih atoma karbonilne skupine Glu380 (lijevo) i Glu412 (desno) tijekom 150 ns simulacija kompleksa *Ca*DPP III sa sintetskim supstratom RRNA.

Iako trenutno nema dostupnih kinetičkih podataka o aktivnosti HEISGH mutanta *Ca*DPP III, računalno je ispitan utjecaj prisutnosti heksapeptidnog motiva na način vezanja supstrata. Isti uvjeti i vrijeme simulacije kao kod divljeg tipa enzima, kod kompleksa mutanta s RRNA rezultiraju modom vezanja koji se ponešto razlikuje od onog za divlji tip (slika 63). Drugačije pozicioniranje RRNA u aktivnom mjestu može se objasniti pomakom Glu413 (Glu412 u divljem tipu), uslijed insercije glicina u HEISH motiv, što rezultira stvaranjem interakcija s RRNA u slučaju mutanta. U kompleksu s HEISGH mutantom samo jedan karbonilni kisik okosnice supstrata ulazi u koordinacijsku sferu cinka (slika 66), dok kod divljeg tipa to čine oba.



Slika 66. Aktivno mjesto kompleksa HEISGH mutanta *Ca*DPP III sa sintetskim supstratom RRNA (prikazanim ružičastim štapićima). Ion cinka prikazan je kao siva sfera; vodikove veze kao crne isprekidane linije. Brojevi aminokiselina navedeni u zagradama odgovaraju numeraciji aminokiselinskih ostataka u divljem tipu enzima.

Vodikove veze s Glu240, Glu254, Asp310, Ala319, Asn321 i Asn324, uočene kod kompleksa s divljim tipom enzima, prisutne su i kod HEISGH mutanta, dok one s Thr311, Glu326 i Glu458 nisu očuvane. Aminokiselinski ostaci Tyr242, Val315, Thr317 i Glu399 stvaraju vodikove veze s RRNA isključivo kod HEISGH mutanta (tablice 17 i 18). Izračun MM-PBSA energija vezanja sugerira slabiju aktivnost HEISGH mutanta prema RRNA na osnovu viših energija vezanja supstrata (tablica 19).

Tablica 18. Vodikove veze koje RRNA tvori s HEISGH mutantom *Ca*DPP III tijekom 150 ns MD simulacija te njihova zastupljenost u generiranim strukturama.[7] Sve vrijednosti dane su u postotcima. Ukoliko aminokiselinski ostatak tvori višestruke vodikove veze sa supstratom, dana je suma njihovih udjela.

Akceptor	**Arg_2-2NA**
Glu240	117,2
Tyr242	17,2
Glu254	73,6
Asp310	159,6
Val315	94,8
Thr317	51,6
Ala319	52,4
Asn321	98,4
Asn324	117,2
Glu399	157,2
Tyr408	6,8
Glu413	7,2
Donor	**Arg_2-2NA**
Glu240	16,0
Phe320	10,4
Asn321	64,4

Tablica 19. MM-PBSA i MM-GBSA energije vezanja za komplekse divljeg tipa i HEISGH mutanta *Ca*DPP III s RRNA. Sve date energije izražene su u $kcalmol^{-1}$.

Sustav	**cMD**		**aMD**	
	$\Delta E_{MM\text{-}PB}$	$\Delta E_{MM\text{-}GB}$	$\Delta E_{MM\text{-}PB}$	$\Delta E_{MM\text{-}GB}$
***Ca*DPP III**	-86,0 (±9,8)	-103,4 (±7,1)	-89,0 (±10,6)	-106,6 (±7,6)
HEISGH *Ca*DPP III	-81,9 0 (±11,2)	-94,5 (±7,6)	-54,0 (±10,3)	-64,55 (±8,1)

4.3.3. Inhibicija CaDPP III

Kinetički podaci o inhibiciji *Ca*DPP III tinorfinom ukazuju da se tinorfin veže za *Ca*DPP III slabije nego za humani i kvaščev ortolog.[137] Dugim MD simulacijama kompleksa u ovom doktorskom radu određen je u način vezanja tinorfina za *Ca*DPP III kako bi se usporedio s onim utvrđenim za supstrate.

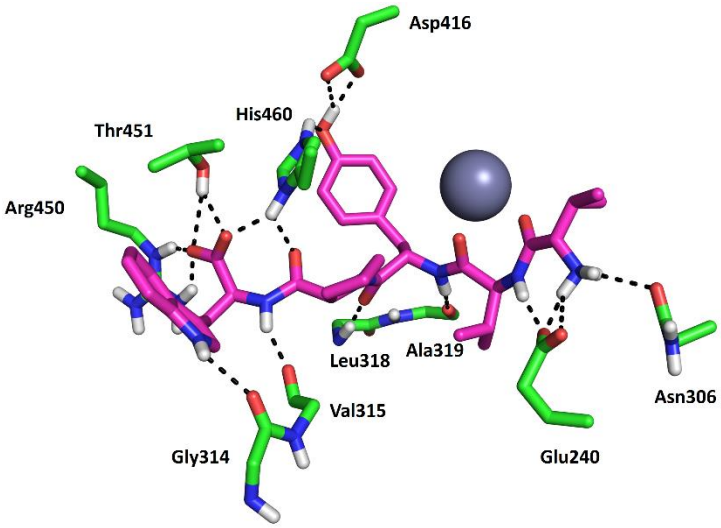
Kako je tinorfin znatno veći nego sintetski supstrati RRNA i GRNA, taj pentapeptid ostvaruje interakcije s dodatnim podmjestima na enzimu. Analizom vodikovih veza

identificiran je znatan broj aminokiselina koje sačinavaju podmjesto S_3' (tablica 20). Najrelevantije vodikove veze (prisutne u više od 30% generiranih struktura) tinorfin tvori s Glu240, Leu318, Ala319, Asn321, Asp416, Arg450, Thr451 i His460.

Tablica 20. Aminokiselinski ostaci *Ca*DPP III koji tvore vodikove veze s pojedinim aminokiselinskim ostacima tinorfina tijekom 200 ns MD simulacija.[137] Aminokiselinski ostaci za koje nije uočeno da doprinose stabilizaciji supstrata kod simulacija kompleksa s RRNA istaknuti su masno otisnutim slovima.

S_2 (NH3-Val)	**S_1 (Val)**	**S_1' (Tyr)**	**S_2' (Pro)**	**S_3' (Trp-COOH)**
Glu240	Glu240	**Thr317**	Tyr242	Leu113
Tyr242	Tyr242	**Leu318**	**Val315**	**Gly314**
Asn321	**Val315**	**Ala319**	**Thr317**	**Val315**
Leu322	**Thr317**	His375	**Leu318**	**Gln316**
Asn324	**Phe320**	Thr376	His460	**Leu318**
Arg329	**Asn321**	**Glu380**		**Lys346**
His383		Asp416		**Arg450**
Lys400		Phe444		**Thr451**
Tyr407		His460		**Arg453**
Glu411				**Phe454**
				Glu458
				His460

U usporedbi sa sintetskim supstratima, tinorfin ulazi znatno dublje u aktivno mjesto enzima (slika D3). Zahvaljujući duljoj peptidnoj okosnici stvara primjetno više vodikovih veza, osobito razmotre li se vodikove veze s okosnicom proteina (slika 67). Kod RRNA i GRNA samo dvije veze uključuju atome okosnice *Ca*DPP III, ona s Ala319 te sa Asn321 (slika 63).



Slika 67. Tinorfin (istaknut ružičastim štapićima) vezan u aktivno mjesto *Ca*DPP III. Najvažnije vodikove veze prikazane su crnim isprekidanim linijama, a ion cinka kao siva kuglica.

§ 5. ZAKLJUČAK

Dugim molekulsko-dinamičkim simulacijama ispitana je struktura i fleksibilnost dipeptidil-peptidaza III iz mezofilne bakterije *Bacteroides thetaiotaomicron* (*Bt*DPP III) i termofila *Caldithrix abyssi* (*Ca*DPP III) te njihovih kompleksa s odabranim supstratima i inhibitorima. Rezultati ovih istraživanja pružaju uvid u strukturne razloge za supstratnu specifičnost ovih enzima, kao i osnovu za razumijevanje povećane termalne stabilnosti *Ca*DPP III.

Konformacijske promjene dugog dosega uočene su tijekom simulacija oba ortologa te tijekom njih dolazi do primicanja domena, odnosno "zatvaranja" proteina. Razlike u brzini i amplitudi ovih gibanja do kojih dolazi uslijed vezanja supstrata u skladu su s postojećim HDX mjerenjima, dok strukture generirane molekulsko-dinamičkim simulacijama odgovaraju onima određenim kristalografski. Rezultati istraživanja upućuju kako kod oba ortologa u otopini postoji ravnoteža između otvorene i zatvorene forme enzima. Dok je otvorena forma energetski povoljnija, tijekom zatvaranja dolazi do dislociranja velikog broja molekula vode iz procjepa, čime raste entropija sustava, što kompenzira porast entalpije.

Prisutnost supstrata kod oba enzima potiče njihovo zatvaranje što je u skladu s pomicanjem ravnotežne raspodjele konformera uočenim kod humanog ortologa. Pokazano je da se ligand smješta slično kao i kod humane DPP III, gdje se supstrat veže antiparalelno s β-pločom iz donje domene. Analizama rezultata MD simulacija postojeći kinetički podaci korelirani su s izračunatim MM-PBSA energijama te sa supstrat-enzim interakcijama, u prvom redu vodikovim vezama. Elektrostatske interakcije znatno se razlikuju kod humanog, *B. thetaiotaomicron* i *C. abyssi* ortologa, što je posljedica različite zastupljenosti pozitivno, odnosno negativno nabijenih aminokiselinskih ostataka oko aktivnog mjesta te različitih dimenzija šupljinâ u koje se smješta supstrat. Simulacije kompleksa *Bt*DPP III s inhibitorima objašnjavaju znatno veću konstantu inhibicije određenu za hidroksamatni inhibitor Tyr-Phe-NHOH u odnosu na tinorfin. Na osnovu simulacija niza kompleksa, predložena su aktivna podmjesta S1 i S2 koja su u skladu, te nadopunjuju, postojeće pretpostavke temeljene na sravnjenju sekvenci ovih enzima s humanom DPP III. Kod *Bt*DPP III dominantne interakcije sa supstratima tvore Glu307, Glu320, Gly383 i Glu476, dok su kod *Ca*DPP III najprisutnije interakcije supstrata s Glu240, Glu254, Asp310, Asn321, Asn324, Glu326 te Glu480.

Aminokiselinski ostaci Tyr309 i Ser363 u eksperimentalnim su se istraživanjima pokazali važnima za aktivnost *Bt*DPP III. Tyr309 se nalazi u vrlo fleksibilnoj regiji enzima i tvori jake vodikove veze sa Ser472 koji se nalazi u aktivnom podmjestu S2, što ga izravno povezuje s utjecajem na katalitičku aktivnost. Ser363 tijekom ranih faza MD simulacije tvori vodikove veze s Asp446, te kaskadom vodikovih veza znatno doprinosi primicanju domena.

Izračuni energija vezanja sintetičkih supstrata (dipeptidil-2-naftilamida) sugeriraju da je aktivnost divljeg tipa *Ca*DPP III veća od one HEISGH mutanta. Pretpostavka da HEISH motiv ima ulogu u povećanoj termalnoj stabilnosti enzima nije potvrđena MD simulacijama. Povećana termalna stabilnost kod *Ca*DPP III može se objasniti znatno većim brojem nekovalentnih interakcija unutar enzima te malim udjelom nestrukturiranih regija enzima u odnosu na *Bt*DPP III i hDPP III. Rezultati molekulsko dinamičkih simulacija to jasno reflektiraju kroz male RMSF vrijednosti pojedinih aminokiselinskih ostataka.

Iz molekulsko-dinamičkih simulacija kompleksa *Bt*DPP III s Arg_2-2-naftilamidom priređen je modelni sustav na kome je određen mehanizam hidrolize peptidne veze kataliziran tim enzimom. Najviša energetska barijera, uz B97D/[6-31G(d)+LANL2DZ] razinu teorije, odgovara prvom koraku reakcije, tj. adiciji vode na karbonilnu skupinu peptidne veze. Drugi korak reakcije odgovara inverziji konfiguracije na ugljikovom, odnosno dušikovom atomu peptidne veze i energetski je manje zahtjevan. Slijedi prijenos protona s 449 na amidni dušik peptidne veze i rotacija hidroksilne skupine pripadne peptidne veze uz simultan pomak karboksilne skupine Glu449, pri čemu redoslijed navedenih koraka nije jednoznačan. U zadnjem koraku dolazi do cijepanja C-N veze te izlaska amina. Koordinacijski broj cinka tijekom reakcije hidrolize peptidne veze iznosio je 4.

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

Å	ångström, mjerna jedinica za duljinu; 1 Å = 10^{-10} m
aMD	molekulska dinamika s dodanim potencijalom (engl. *accelerated molecular dynamics*)
APBS	računalni program za izračun elektrostatskog potencijala (engl. *Adaptive Poisson-Boltzmann Solver)*
AT1R	angiotenzinski II receptor, tip 1 (engl. *Angiotensin II receptor type 1*)
BCC	korekcija pri izračunu naboja atoma (engl. *bond charge correction*)
Bt	bakterija *Bacteroides thetaiotaomicron*
*Bt*DPP III	dipeptidil-peptidaza III iz *Bacteroides thetaiotaomicron*
Ca	bakterija *Caldithrix abyssi*
*Ca*DPP III	dipeptidil-peptidaza III iz *Caldithrix abyssi*
cMD	konvencionalna (standardna) molekulska dinamika (engl. *conventional molecular dynamics*)
DFT	teorija funkcionala gustoće (engl. *density functional theory*)
DPP	dipeptidil-peptidaza
ECP	aproksimacija unutarnjih elektrona efektivnim potencijalom (engl. *effective core potential*)
ES	kompleks enzim–supstrat
gaff	polje sila (engl. *generalized Amber force field*)
gaff2	polje sila (engl. *generalized Amber force field 2*)
GGA	aproksimacija generaliziranog gradijenta (engl. *global gradient approximation*)
GEBA	projekt sistematičnog sekvenciranja genoma mikroorganizama (engl. *Genomic encyclopedia of bacteria and archaea*)
G-protein	guanin nukleotid vezujući protein
GRNA	sintetski supstrat Gly-Arg-2-naftilamid
hDPP III	humana dipeptidil-peptidaza III

HDX	izmjena vodik-deuterij (engl. *hydrogen-deuterium exchange*)
INT	međuprodukt (intermedijer)
KANA	sintetski supstrat Lys-Ala-2-naftilamid
Keap1	engl. *Kelch-like ECH-associated protein*)
LDA	aproksimacija lokalne gustoće (engl. *local density approximation*)
LINCS	algoritam ograničavanja gibanja vodikovih atoma tijekom MD simulacija (engl. *Linear Constraint Solver*)
MD	molekulska dinamika; molekulsko-dinamički
MM	molekulska mehanika
MD-ff12SB	konvencionalna molekulska dinamika uz ff12SB polje sila
aMD-ff14SB	molekulska dinamika s dodanim potencijalom uz ff14SB polje sila
MM-GBSA	metoda za izračun slobodne energije (engl. *molecular mechanics – generalized Born surface area)*
MM-PBSA	metoda za izračun slobodne energije (engl. *molecular mechanics – Poisson-Boltzmann surface area)*
NpT	izotermno-izobarni ansambl
NVE	mikrokanonski ansambl
NVT	kanonski ansambl
Nrf2	engl. *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*
NUDIX	nukleozid-difosfat vezan na X (engl. *nucleoside diphosphate linked to X*)
PB	Poisson-Boltzmann
PBC	periodični rubni uvjeti (engl. *periodic boundary conditions*)
PCA	analiza glavnih komponenata (engl. *principal component analysis*)
PCM	metoda polarizabilnog kontinuuma (engl. *polarizable continuum method*)
PDB	baza eksperinentalno određenih struktura proteina (engl. *protein data bank*)
PES	ploha potencijalne energije (engl. *potential energy surface*)
PME	Ewaldova metoda za izračun elektrostatskih interakcija (engl. *particle mesh Ewald*)
QM	kvantna mehanika; kvantno-mehanički
QM/MM	kvantno-mehanički–molekulsko-mehanički
R_g	Radijus giracije
RMSD	korijen srednjeg kvadrata odstupanja (engl. *root mean square deviation*)

RMSF	korijen srednjeg kvadrata fluktuacija (engl. *root mean square fluctuation*)
ROS	reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)
RRNA	sintetski supstrat Arg_2-2-naftilamid
SASA	površina dostupna otapalu (engl. *solvent accessible surface area*)
SHAKE	algoritam ograničavanja gibanja vodikovih atoma tijekom MD simulacija
SMD	set parametara za opis solvatacije (engl. *solute molecule density*)
SPC	općeniti model molekula vode (engl. *simple point charge*)
STO	orbitala Slaterovog tipa (engl. *Slater type orbital*)
STRIDE	metoda predviđanja sekundarne strukture proteina (engl. *structural identification*)
Stx2	tip Shiga toksina koji proizvode bakterije iz roda *Shigella*
TIP*n*P	modeli molekula vode u kojima su duljine veza i kutevi fiksirani, a elektrostatske interakcije definirane preko n točkastih naboja (engl. *transferrable intermolecular potential n-point*)
TS	prijelazno stanje (engl. *transition state*)

Popis oznakâ aminokiselinâ

Aminokiselina	**Troslovna kratica**	**Jednoslovna kratica**
glicin	Gly	G
alanin	Ala	A
valin	Val	V
leucin	Leu	L
izoleucin	Ile	I
serin	Ser	S
threonin	Thr	T
cistein	Cys	C
metionin	Met	M
prolin	Pro	P
asparaginska kiselina	Asp	D
asparagin	Asn	N
glutaminska kiselina	Glu	E
glutamin	Gln	Q

lizin	Lys	K
arginin	Arg	R
histidin	His	H
fenilalanin	Phe	F
tirozin	Tyr	Y
triptofan	Trp	W

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. M. Chen i A.J. Barrett, *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2. izdanje, Elsevier, London, 2004, str. 809–812.
2. N.D. Rawlings, A.J. Barrett i A. Bateman, *Nucleic Acids Res* **38** (2010) D227-233.
3. K. Fukasawa, K.M. Fukasawa, H. Iwamoto, J. Hirose i M. Harada, *Biochemistry* **38** (1999) 8299-8303.
4. A. Tomić, B. Kovačević i S. Tomić, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18** (2016) 27245-27256.
5. G.A. Bezerra, E. Dobrovetsky, R. Viertlmayr, A. Dong, A. Binter, M. Abramić, P. Macheroux, S. Dhe-Paganon i K. Gruber, *Proc Natl Acad Sci U S A* **109** (2012) 6525-6530.
6. I. Sabljić, N. Meštrović, B. Vukelić, P. Macheroux, K. Gruber, M. Luić i M. Abramić, *PLOS ONE* **12** (2017) e0187295.
7. I. Sabljić, M. Tomin, M. Matovina, I. Sučec, A. Tomašić Paić, A. Tomić, M. Abramić i S. Tomić, *PloS One* **13** (2018) e0192488.
8. P. Kumar, V. Reithofer, M. Reisinger, S. Wallner, T. Pavkov-Keller, P. Macheroux i K. Gruber, *Sci Rep* **6** (2016) 23787.
9. A. Tomić, M. Berynskyy, R.C. Wade i S. Tomić, *Mol Biosyst* **11** (2015) 3068-3080.
10. A. Tomić, M. Gonzalez i S. Tomić, *J Chem Inf Model* **52** (2012) 1583-1594.
11. C.-M. Lee i S. Snyder, *The Journal of Biological Chemistry* **257** (1982) 12043-12050.
12. M. Baršun, N. Jajčanin, B. Vukelić, J. Špoljarić i M. Abramić, *Biol Chem* **388** (2007) 343-348.
13. T. Chiba, Y.-H. Li, T. Yamane, O. Ogikubo, M. Fukuoka, R. Arai, S. Takahashi, T. Ohtsuka, I. Ohkubo i N. Matsui, *Peptides* **24** (2003) 773-778.
14. P.K. Baral, N. Jajčanin-Jozić, S. Deller, P. Macheroux, M. Abramić i K. Gruber, *J Biol Chem* **283** (2008) 22316-22324.
15. T. Xu, C. Xie, D. Yao, C.-Z. Zhou i J. Liu, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **494** (2017) 621-625.
16. B. Vukelić, B. Salopek-Sondi, J. Špoljarić, I. Sabljić, N. Meštrović, D. Agić i M. Abramić, *Biol Chem* **393** (2012) 37-46.

17. B. Salopek-Sondi, B. Vukelić, J. Špoljarić, Š. Šimaga, D. Vujaklija, J. Makarević, N. Jajčanin i M. Abramić, *Biol Chem* **389** (2008) 163-167.
18. L.C. Pierce, R. Salomon-Ferrer, F.d.O.C. Augusto, J.A. McCammon i R.C. Walker, *J Chem Theory Comput* **8** (2012) 2997-3002.
19. J.K. McDonald i A.J. Barrett, *Mammalian proteases: a glossary and bibliography, Vol. 2*, 1986, str. 1-6., 127-131.
20. M.-B. Maes, A.-M. Lambeir, K. Gilany, K. Senten, P.v. der Veken, B. Leiting, K. Augustyns, S. Scharpé i I. De Meester, *Biochemical Journal* **386** (2005) 315-324.
21. J.M.S. Clair, C.T. Pham, S.A. Villalta, G.H. Caughey i P.J. Wolters, *Journal of Clinical Investigation* **113** (2004) 628.
22. M. Abramić, M. Zubanović i L. Vitale, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **369** (1988) 29-38.
23. D.M. Yu, T.W. Yao, S. Chowdhury, N.A. Nadvi, B. Osborne, W.B. Church, G.W. McCaughan i M.D. Gorrell, *The FEBS journal* **277** (2010) 1126-1144.
24. Y. Ohara-Nemoto, S.M. Rouf, M. Naito, A. Yanase, F. Tetsuo, T. Ono, T. Kobayakawa, Y. Shimoyama, S. Kimura, K. Nakayama *et al.*, *J Biol Chem* **289** (2014) 5436-5448.
25. S. Radicke, D. Cotella, E.M. Graf, U. Ravens i E. Wettwer, *The Journal of physiology* **565** (2005) 751-756.
26. J. Park, K. Ajami, M. Denise i M.D. Gorrell, *Dipeptidyl peptidase 8 has post-proline dipeptidyl aminopeptidase and prolyl endopeptidase activities*, Springer, 2006, str. 93-102.
27. J.R. Bjelke, J. Christensen, P.F. Nielsen, S. Branner, A.B. Kanstrup, N. Wagtmann i H.B. Rasmussen, *Biochemical Journal* **396** (2006) 391-399.
28. S.Y. Qi, P.J. Riviere, J. Trojnar, J.-L. Junien i K.O. Akinsanya, *Biochemical Journal* **373** (2003) 179-189.
29. Y. Ohara-Nemoto, Y. Shimoyama, S. Kimura, A. Kon, H. Haraga, T. Ono i T.K. Nemoto, *Journal of Biological Chemistry* **286** (2011) 38115-38127.
30. S. Ellis i J. Nuenke, *The Journal of BIological Chemistry* **242** (1967) 4623-4629.
31. M. Abramić, J. Špoljarić i Š. Šimaga, *Period biol* **106** (2004) 161-168.
32. K. Fukasawa, K.M. Fukasawa, M. Kanai, S. Fujii, J. Hirose i M. Harada, *Biochem. J.* **329** (1998) 275-282.
33. I. Ohkubo, Y.-H. Li, T. Maeda, Y. Yamamoto, T. Yamane, P.-G. Du i K. Nishi, *Forensic Science International* **113** (2000) 147-151.

34. Y. Shimamori, Y. Watanabe i Y. Fujimoto, *Chem. Pharm. Bull.* **34** (1986) 3333-3340.
35. Y.H. Li, T. Maeda, T. Yamane i I. Ohkubo, *Biochem Biophys Res Commun* **276** (2000) 553-558.
36. M. Abramić, Š. Šimaga, M. Osmak, L. Čičin-Šain, B. Vukelić, K. Vlahoviček i L. Dolovčak, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36** (2004) 434-446.
37. Z. Karačić, J. Špoljarić, M. Rožman i M. Abramić, *Biol Chem* **393** (2012) 1523-1532.
38. M. Sentandreu i F. Toldra, *Food Chemistry* **102** (2007) 511-515.
39. M. Sentandreu i F. Toldra, *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 3977-3984.
40. A.A. Swanson, B. Albers-Jackson i K. McDonald, *Biochem Biophys Res Commun* **84** (1978) 1151-1159.
41. Y. Watanabe, Y. Kumagai i Y. Fujimoto, *Chem. Pharm. Bull.* **38** (1990) 246-248.
42. J. Huang, J. Kim, P. Ramamurthy i T.H.D. Jones, *Experimental Mycology* **16** (1992) 102-109.
43. A. Hromić-Jahjefendić, N. Jajčanin Jozić, S. Kazazić, M. Grabar Branilović, Z. Karačić, J.H. Schrittwieser, K.M.P. Das, M. Tomin, M. Oberer, K. Gruber *et al.*, *PLOS ONE* **12** (2017) e0188915.
44. A. Tomić i S. Tomić, *Dalton Trans* **43** (2014) 15503-15514.
45. X. Pang, A. Shimizu, S. Kurita, D.P. Zankov, K. Takeuchi, M. Yasuda-Yamahara, S. Kume, T. Ishida i H. Ogita, *Hypertension* **68** (2016) 630-641.
46. Š. Šimaga, D. Babić, M. Osmak, J. Ilić-Forko, L. Vitale, D. Miličić i M. Abramić, *European Journal of Cancer* **34** (1998) 399-405.
47. Š. Šimaga, D. Babić, M. Osmak, M. Šprem i M. Abramić, *Gynecologic Oncology* **91** (2003) 194-200.
48. H. Zhang, Y. Yamamoto, S. Shumiya, M. Kunimatsu, K. Nishi, I. Ohkubo i K. Kani, *The Histochemical Journal* **33** (2001) 511-521.
49. Y. Liu, J.T. Kern, J.R. Walker, J.A. Johnson, P.G. Schultz i H. Luesch, *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** (2007) 5205-5210.
50. B.E. Hast, D. Goldfarb, K.M. Mulvaney, M.A. Hast, P.F. Siesser, F. Yan, D.N. Hayes i M.B. Major, *Cancer Res* **73** (2013) 2199-2210.
51. S. Sobočanec, V. Filić, M. Matovina, D. Majhen, Z. Mačak Šafranko, M.P. Hadžija, Z. Krsnik, A.G. Kurilj, A. Šarić, M. Abramić *et al.*, *Redox Biol* **8** (2016) 149-159.

52. S.C. Prajapati, R. Singh i S.S. Chauhan, *Biol Chem* **397** (2016) 563-569.
53. T.K. Nemoto i Y. Ohara-Nemoto, *Japanese Dental Science Review* **52** (2016) 22-29.
54. T.K. Nemoto, Y. Ohara-Nemoto, G.A. Bezerra, Y. Shimoyama i S. Kimura, *J Biol Chem* **291** (2016) 5913-5925.
55. J. Blumberger, G. Lamoureux i M. Klein, *J. Chem. Theory Comput.* **3** (2007) 1837-1850.
56. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8, Schrödinger, LLC, 2017
57. A. Cvitešić, I. Sabljić, J. Makarević i M. Abramić, *J Enzyme Inhib Med Chem* **31** (2016) 40-45.
58. A. Tomić, M. Abramić, J. Špoljarić, D. Agić, D.M. Smith i S. Tomić, *J Mol Recognit* **24** (2011) 804-814.
59. Z. Karačić, B. Vukelić, G. Ho, I. Jozić, I. Sučec, B. Salopek-Sondi, M. Kozlović, S.E. Brenner, J. Ludwig-Müller i M. Abramić, *Biological chemistry* **398** (2017) 101-112.
60. T. Ogawa, K. Yoshimura, H. Miyake, K. Ishikawa, D. Ito, N. Tanabe i S. Shigeoka, *Plant Physiol* **148** (2008) 1412-1424.
61. V. Kumar, N. Sharma i T.C. Bhalla, *Journal of amino acids* **2014** (2014).
62. C. Vieille i G.J. Zeikus, *Microbiology and molecular biology reviews* **65** (2001) 1-43.
63. G. Sælensminde, Ø. Halskau i I. Jonassen, *Extremophiles* **13** (2009) 11.
64. X.-X. Zhou, Y.-B. Wang, Y.-J. Pan i W.-F. Li, *Amino acids* **34** (2008) 25-33.
65. L. Mandrich, L. Merone i G. Manco, *Protein and peptide letters* **16** (2009) 1189-1200.
66. A. Razvi i M.A. Scholtz, *Protein Science* **15** (2006) 1569–1578.
67. L.E. Comstock i M.J. Coyne, *Bioessays* **25** (2003) 926-929.
68. J. Xu, M.K. Bjursell, J. Himrod, S. Deng, L.K. Carmichael, H.C. Chiang, L.V. Hooper i J.I. Gordon, *Science* **299** (2003) 2074-2076.
69. L.V. Hooper, J. Xu, P.G. Falk, T. Midtvedt i J.I. Gordon, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96** (1999) 9833-9838.
70. D. Ndeh, A. Rogowski, A. Cartmell, A.S. Luis, A. Basle, J. Gray, I. Venditto, J. Briggs, X. Zhang, A. Labourel *et al.*, *Nature* **544** (2017) 65-70.
71. B.S. Wostmann, C. Larkin, A. Moriarty i E. Bruckner-Kardoss, *Laboratory animal science* **33** (1983) 46-50.
72. B. Stecher i W.D. Hardt, *Trends Microbiol* **16** (2008) 107-114.

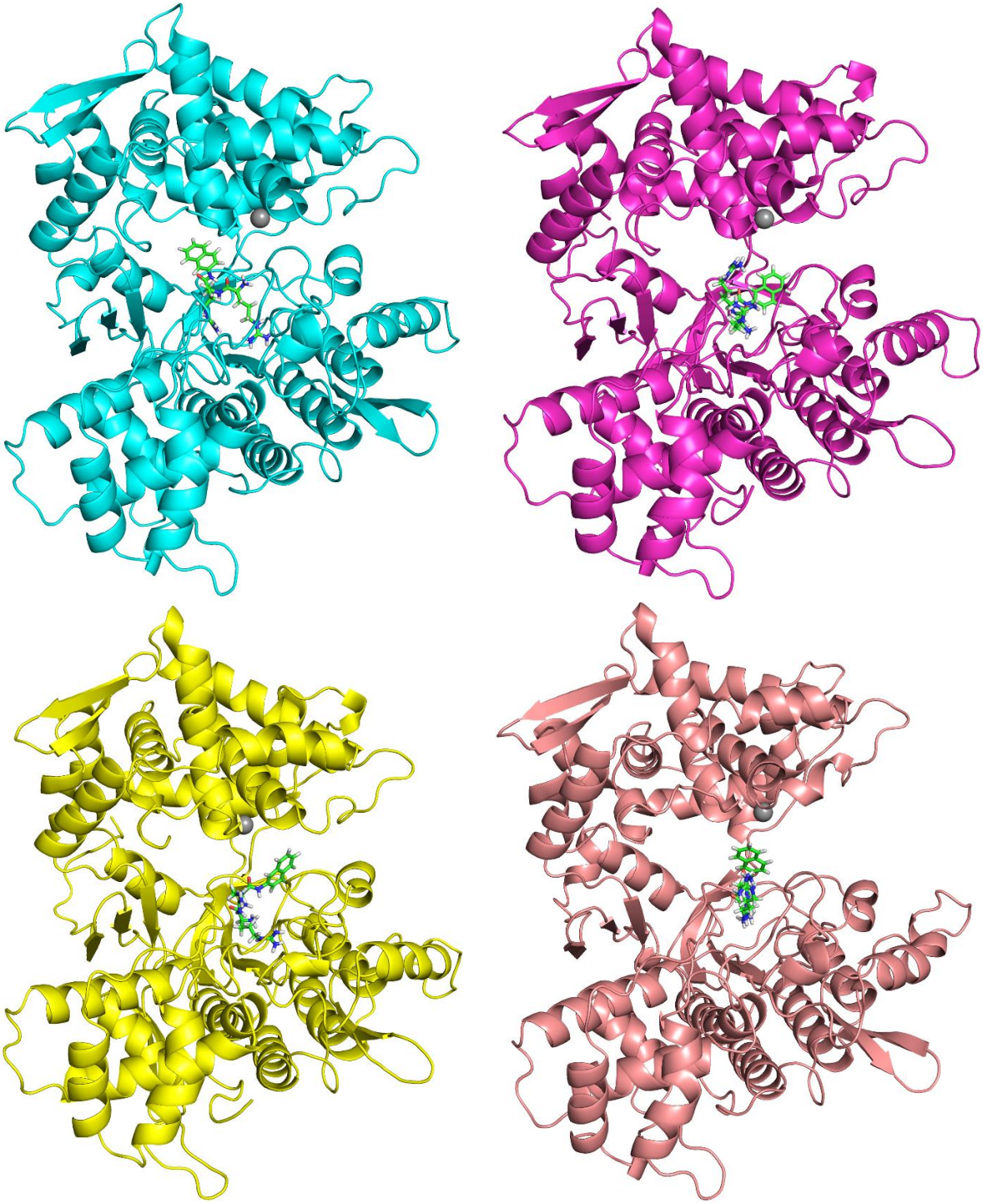
73. H. Iversen, T. Lindback, T.M. L'Abee-Lund, N. Roos, M. Aspholm i L. Stenfors Arnesen, *PLoS One* **10** (2015) e0118140.
74. M.A. Zocco, M.E. Ainora, G. Gasbarrini i A. Gasbarrini, *Digestive and Liver Disease* **39** (2007) 707-712.
75. Y.S. López-Boado, C.L. Wilson, L.V. Hooper, J.I. Gordon, S.J. Hultgren i W.C. Parks, *The Journal of cell biology* **148** (2000) 1305-1315.
76. I. Brook, *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **5** (2007) 991-1006.
77. E. Nagy i E. Urbán, *Clinical Microbiology and Infection* **17** (2011) 371-379.
78. N. Pan i J.A. Imlay, *Mol Microbiol* **39** (2001) 1562-1571.
79. P.Y. Tang, M.M. Dallas i M.H. Malamy, *Mol Microbiol* **32** (1999) 139-149.
80. Z. Lu i J.A. Imlay, *MBio* **8** (2017) e01873-01816.
81. A.C. Hochart-Behra, H. Drobecq, M. Tourret, L. Dubreuil i J. Behra-Miellet, *Anaerobe* **28** (2014) 18-23.
82. D. Wu, P. Hugenholtz, K. Mavromatis, R. Pukall, E. Dalin, N.N. Ivanova, V. Kunin, L. Goodwin, M. Wu, B.J. Tindall *et al.*, *Nature* **462** (2009) 1056-1060.
83. H.P. Klenk i M. Goker, *Syst Appl Microbiol* **33** (2010) 175-182.
84. M.L. Miroshnichenko, N.A. Kostrikina, K.A. Nadezhda, N.A. Chernyh, N.V. Pimenov, T.P. Tourova, A.N. Antipov, S. Spring, E. Stackebrandt i E.A.B. Bonch-Osmolovskaya, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **23** (2003) 323-329.
85. I.V. Kublanov, O.M. Sigalova, S.N. Gavrilov, A.V. Lebedinsky, C. Rinke, O. Kovaleva, N.A. Chernyh, N. Ivanova, C. Daum, T.B. Reddy *et al.*, *Front Microbiol* **8** (2017) 195.
86. D. Fedosov, D. Podkopaeva, M. Miroshnichenko, E. Bonch-Osmolovskaya, A. Lebedinsky i M.Y. Grabovich, *Microbiology* **75** (2006) 119-124.
87. A. Szabo i N.S. Ostlund, *Modern quantum chemistry: introduction to advanced electronic structure theory*, Courier Corporation, New York, 2012, str. 158.
88. R. Ditchfield, W.J. Hehre i J.A. Pople, *The Journal of Chemical Physics* **54** (1971) 724-728.
89. J.-P. Ryckaert, G. Cicciotti i H.J.C. Berendsen, *J. Comput. Phys.* **23** (1977) 327-341.
90. B. Hess, H. Bekker, H.J. Berendsen i J.G. Fraaije, *Journal of computational chemistry* **18** (1997) 1463-1472.
91. W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey i M.L. Klein, *The Journal of Chemical Physics* **79** (1983) 926.

92. M.W. Mahoney i W.L. Jorgensen, *The Journal of Chemical Physics* **112** (2000) 8910-8922.
93. P. Florová, P. Sklenovský, P. Banáš i M. Otyepka, *Journal of chemical theory and computation* **6** (2010) 3569-3579.
94. S. Le Roux, Étude par dynamique moléculaire ab-initio des verres de chalcogénures GeS2 et (M2S) 0.33 (GeS2) 0.66 M= Na, Ag, Université Montpellier II-Sciences et Techniques du Languedoc, 2008.
95. http://reaktiveplasmen.rub.de/files/lehre/md/02-2.pdf (preuzeto 21. 12. 2017. god.)
96. T. Darden, D. York i L. Pedersen, *The Journal of Chemical Physics* **98** (1993) 10089.
97. U. Essmann, L. Perera, M.L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee i L.G. Pedersen, *The Journal of Chemical Physics* **103** (1995) 8577.
98. D. Hamelberg, C.A. de Oliveira i J.A. McCammon, *J Chem Phys* **127** (2007) 155102.
99. P.A. Kollman, I. Massova, C. Reyes, B. Kuhn, S. Huo, L. Chong, M. Lee, T. Lee, Y. Duan i W. Wang, *Accounts of chemical research* **33** (2000) 889-897.
100. B.R. Miller, T.D. McGee, J. Swails, N. Homeyer, H. Gohlke i A. Roitberg, *J Chem Theory Comput* **8** (2012) 3314-3321.
101. D.A. Case, T.E. Cheatham, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K.M. Merz, Jr., A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang i R.J. Woods, *J Comput Chem* **26** (2005) 1668-1688.
102. R.D.A. Case, J.T. Berryman, R.M. Betz, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, T.A. Darden, R.E. Duke, T.J. Giese, H. Gohlke, A.W. Goetz *et al.*, AMBER 14, University of California, 2014
103. T.N. Petersen, S. Brunak, G. von Heijne i H. Nielsen, *Nat Methods* **8** (2011) 785-786.
104. A. Sali i T. Blundell, *Journal of Molecular Biology* **234** (1993) 779-815.
105. Y. Duan, C. Wu, S. Chowdhury, C.-M. Lee, G. Xiong, W. Zhang, R. Yang, P. Cieplak, R. Luo, L. Taisung *et al.*, *Journal of Computational Chemistry* **24** (2003) 1999-2012.
106. V. Hornak, R. Abel, A. Okur, B. Strockbine, A. Roitberg i C. Simmerling, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **65** (2006) 712-725.
107. J. Maier, C. Martinez, K. Kasavajhala, L. Wickstrom, K. Hauser i C. Simmerling, *J. Chem. Theory Comput.* **11** (2015) 3696-3713.
108. B. Bertoša, B. Kojić-Prodić, R.C. Wade i S. Tomić, *Biophys J* **94** (2008) 27-37.
109. I.S. Joung i T.E. Cheatham, *J Phys Chem B* **112** (2008) 9020-9041.
110. R.J. Loncharich, B.R. Brooks i R.W. Pastor, *Biopolymers* **32** (1992) 523-535.

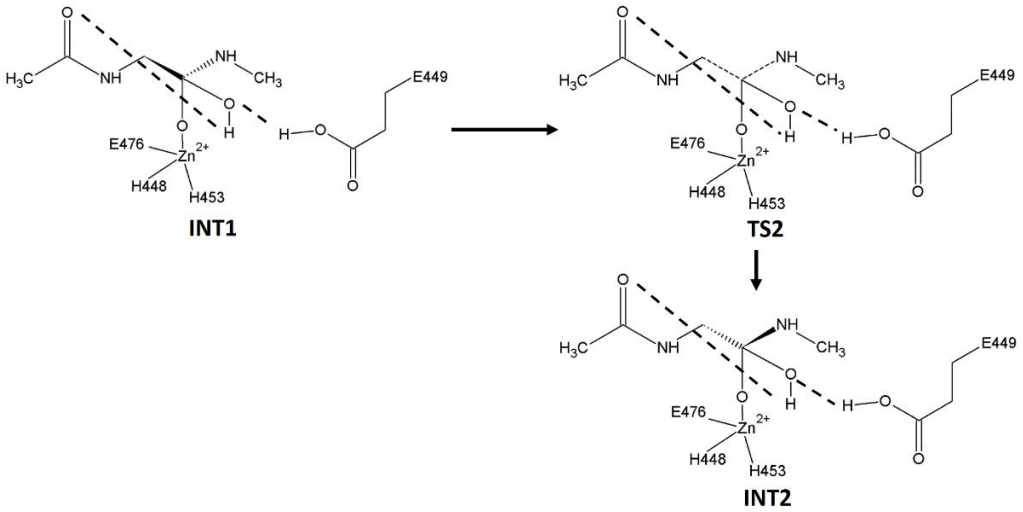
111. H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. van Gunsteren, A. DiNola i J.R. Haak, *The Journal of Chemical Physics* **81** (1984) 3684-3690.
112. S. Miyamoto i P.A. Kollman, *Journal of Computational Chemistry* **13** (1992) 952-962.
113. J. Wang, R.M. Wolf, J. Caldwell, P.A. Kollman i D.A. Case, *J Comput Chem.* **25** (2004) 1157-1174.
114. J. Wang, W. Wang, P.A. Kollman i D.A. Case, *J Mol Graph Model* **25** (2006) 247-260.
115. A. Jakalian, B.L. Bush, D.B. Jack i C.I. Bayly, *Journal of Computational Chemistry* **21** (2000) 132-146.
116. A. Jakalian, D.B. Jack i C.I. Bayly, *Journal of computational chemistry* **23** (2002) 1623-1641.
117. D.A. Case, R.M. Betz, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, T. Darden, R.E. Duke, T.J. Giese, H. Gohlke, A.W. Goetz, N. Homeyer *et al.*, AMBER16, University of California, 2016
118. M. Tomin i S. Tomić, *Molecular BioSystems* **13** (2017) 2407-2417.
119. A. Tomić, Primjena računalnih pristupa različitih stupnjeva složenosti u svrhu razumijevanja strukture, dinamike i aktivnosti ljudske dipeptidil-peptidaze III, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2015.
120. S. Grimme, *Journal of computational chemistry* **27** (2006) 1787-1799.
121. P.J. Hay i W.R. Wadt, *The Journal of Chemical Physics* **82** (1985) 299-310.
122. M. Frisch, G. Trucks, H. Schlegel, G. Scuseria, M. Robb, J. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci i G. Petersson, Gaussian 09 (Versions A. 01 and D. 01), Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009
123. A.V. Marenich, C.J. Cramer i D.G. Truhlar, *J. Phys. Chem. B* **113** (2009) 6378-6396.
124. D.R. Roe i T.E. Cheatham, *J. Chem. Theory Comput.* **9** (2013) 3084-3095.
125. B. Lee i M. Richards, *J. Mol. Biol.* **55** (1971) 379-400.
126. S.J. Hubbard i J.M. Thornton, NACCESS, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London, 1993
127. D.R. Roe, C. Bergonzo i T.E. Cheatham, *J. Phys. Chem. B* (2014) 3543−3552.
128. C. Tan, Y.-H. Tan i R. Luo, *J. Phys. Chem. B* **111** (2007) 12263-12274.
129. A. Onufriev, D. Bashford i D.A. Case, *Proteins* **55** (2004) 383-394.
130. N. Homeyer, F. Stoll, A. Hillisch i H. Gohlke, *Journal of chemical theory and computation* **10** (2014) 3331-3344.

131. T. Yang, J.C. Wu, C. Yan, Y. Wang, R. Luo, M.B. Gonzales, K.N. Dalby i P. Ren, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **79** (2011) 1940-1951.
132. E. Lindahl, C. Azuara i M. Delarue, *Nucleic Acids Res* **34** (2006) W52-W56.
133. S.-Y. Sheu i D.-Y. Yang, *J. Phys. Chem. B* **114** (2010) 16558–16566.
134. S.K. Pal, J. Peon, B. Bagchi i A. Zewail, *J. Phys. Chem. B* **106** (2002) 12376-12395.
135. G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell i A.J. Olson, *Journal of computational chemistry* **30** (2009) 2785-2791.
136. N.A. Baker, D. Sept, S. Joseph, M.J. Holst i J.A. McCammon, *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (2001) 10037-10041.
137. S. Kazazić, Z. Karačić, I. Sabljić, D. Agić, M. Tomin, M. Abramić, M. Dadlez, A. Tomić i S. Tomić, *RSC Advances* **8** (2018) 13310-13322.
138. M. Abramić, Z. Karačić, M. Šemanjski, B. Vukelić i N. Jajčanin-Jozić, *Biol Chem* **396** (2015) 359-366.
139. R. Dennington, T. Keith, J. Millam, K. Eppinnett, W.L. Hovell i R. Gilliland, GaussView, 2009
140. M. Matovina, D. Agić, M. Abramić, S. Matić, Z. Karačić i S. Tomić, *RSC Advances* **7** (2017) 36326-36334.
141. D. Frishman i P. Argos, *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **23** (1995) 566-579.

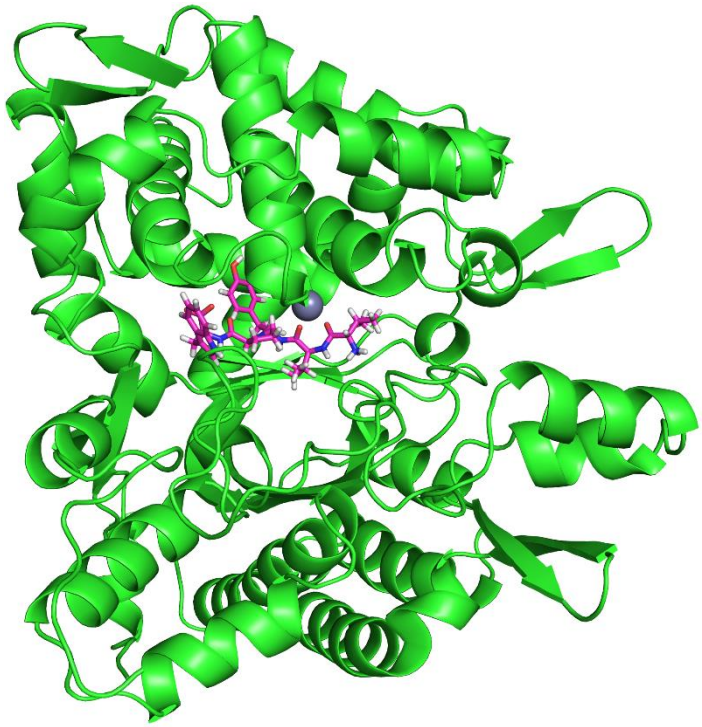
§ 8. DODATAK



Slika D1. Konačne strukture kompleksa *Bt*DPP III s RRNA nakon 45 ns MD simulacija odabranih polaznih struktura generiranih programom AutoDock. RRNA je prikazan zelenim štapićima, a ion cinka sivom kuglicom. Slika je izrađena u programu PyMol.



Slika D2. Drugi korak mehanizma hidrolize peptidne veze katalizirane *Bt*DPP III. Inverzija konfiguracije na dušikovom i kisikovom atomu. Vodikove veze označene su debelim isprekidanim linijama, a veze u nastajanju ili nestajanju točkastim linijama.



Slika D3. Struktura kompleksa *Ca*DPP III s tinorfinom najniže pripadne MM-PBSA energije. Tinorfin je prikazan ružičastim štapićima, a ion cinka sivom kuglicom. Slika je izrađena u programu PyMol.

Tablica D1. Pregled najvažnijih geometrijskih parametara za identificirane međuprodukte reakcije cijepanja peptidne veze katalizirane *Bt*DPP III na modelnom sustavu. O_w je kisikov atom vode u koordinacijskoj sferi iona cinka, C_s je ugljikov, a N_s je dušikov atom peptidne veze koja se cijepa u reakciji.

Udaljenost	**ES**	**INT1**	**INT2**	**INT3**	**INT4a**	**INT4b**	**INT5**	**P**
d(H453[a])/Å	2,17	2,21	2,23	2,22	2,20	2,21	2,19	2,15
d(H448[a])/Å	2,22	2,19	2,19	2,21	2,20	2,20	2,18	2,18
d(E449[b])/Å	2,11	2,15	2,13	2,12	2,12	2,13	2,12	2,12
d(Zn-O_w)/Å	2,12	2,99	2,97	3,00	3,05	3,05	2,99	3,24
d(O_w-C_s)/Å	3,11	1,50	1,48	1,44	1,45	1,42	1,42	1,26
d(C_s-N_s)/Å	1,34	1,46	1,48	1,50	1,51	1,61	1,61	3,50

[a]Udaljenost između iona cinka i Nε atoma histidina koji koordinira ion cinka
[b]Udaljenost između iona cinka i O1 atoma glutamata koji koordinira ion cinka

Tablica D2. Broj nabijenih aminokiselinskih ostataka udaljenih < 6 Å od tinorfina vezanog u aktivno mjesto.[7]

	hDPP III	***Bt*DPP III**	***Ca*DPP III**
Glu	6	4	7
Asp	1	2	2
∑	7	6	9
Arg	4	4	3
Lys	3	1	3
∑	7	5	6

§ 9. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 04. 05. 1990. godine u Rijeci gdje 2004. upisujem Prirodoslovno-matematičku gimnaziju Andrije Mohorovičića. 2008. sam maturirao te upisao Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu. Na diplomskom studiju odabrao sam smjerove Organska kemija i Analitička kemija te 2014. diplomirao na Zavodu za organsku kemiju Kemijskog odsjeka s diplomskim radom pod naslovom "Računalno ispitivanje mehanizma redukcije nitrobenzena". Po završetku studija volontirao sam na istom zavodu do kraja 2014. Doktorski studij kemije sam upisao 2015. godine, kada sam se i zaposlio na Institutu Ruđer Bošković kao stručni suradnik, te kasnije asistent na projektu "Povezanost fleksibilnosti, strukture i aktivnosti u porodici dipeptidil-peptidaza III" gdje radim do danas. Tijekom studija sudjelovao sam u izvođenju nastave iz kolegija Temelji organske kemije, Organska kemija, Praktikum organske kemije te Praktikum organske kemije 2.

2016. i 2017. godine bio sam jedan od predavača na radionici "Otkrivanje lijekova uz pomoć računala" u sklopu projekta "Istražujem svijet znanosti i inovacija" u organizaciji Zaklade znanje na djelu (ZZND) i Instituta Ruđer Bošković (IRB) i u suradnji s Agencijom za odgoj i obrazovanje, a 2017. jedan od predavača na radionici "Uvod u molekulsko modeliranje" te edukator na radionici "Otkrivanje lijekova uz pomoć računala" u sklopu ESF projekta "Ja RaSTEM!". Koautor sam pet znanstvenih radova koje citira baza *Web of science* te osam priopćenja na znanstvenim skupovima. Član sam Hrvatskoga kemijskog društva.

Popis objavljenih radova

1. S. Kazazić, Z. Karačić, I. Sabljić, D. Agić, **M. Tomin**, M. Abramić, M. Dadlez, A. Tomić i S. Tomić, *RSC Advances* **8** (2018) 13310-13322..
2. I. Sabljić*, **M. Tomin***, M. Matovina, I. Sučec, A. Tomašić-Paić, A. Tomić, M. Abramić i S. Tomić, *PLoS One* **13** (2018) e0192488.
3. A. Hromić-Jahjefendić, N. Jajčanin Jozić, S. Kazazić, M. Grabar Branilović, Z. Karačić, J.H. Schrittwieser, K.M.P. Das, **M. Tomin**, M. Oberer, K. Gruber et al., *PLoS One* **12** (2017) e0188915.
4. **M. Tomin** i S. Tomić, *Molecular BioSystems* **13** (2017) 2407-24177.
5. **M. Tomin**, I. Rončević i Z. Mihalić, *Croatica Chemica Acta* **89** (2016) 31-35.

Sažeci u zbornicima skupova

9. L. Bilić, M. Tomin, D. Barić, B. Kovačević, D. Smith, MD and DFT study of glycerol binding in B12-dependent diol dehydratase, *CSC Spring School in Computational Chemistry*, Espoo, Finska, 2018. (poster)

8. M. Tomin, S. Tomić, Mehanizam hidrolize peptidne veze na modelnom sustavu DPP III iz *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Simpozij studenata doktorskih studija PMF*, Zagreb, Hrvatska, 2018. (poster)

7. S. Tomić, S. Kazazić, M. Abramić, M. Tomin, D. Agić, Z. Karačić, M. Grabar-Branilović, H/D exchange and MD simulation study of dipeptidyl peptidase III intrinsic dynamics and ligand binding, 19th IUPAB and 11th EBSA Congress, Edinburgh, Škotska, 2017. (poster)

6. S. Tomić, S. Kazazić, M. Abramić, M. Tomin, D. Agić, Z. Karačić, M. Grabar-Branilović, H/D exchange and MD simulation study of dipeptidyl peptidase III intrinsic dynamics and ligand binding, 19th IUPAB and 11th EBSA Congress, Edinburgh, Škotska, 2017. (poster)

5. M. Tomin, S. Tomić, Conformational study of *Bacteroides thetaiotaomicron* dipeptidyl peptidase III, ICBMB, Venecija, Italija, 2016. (predavanje)

4. M. Tomin, S. Tomić, I. Sabljić, Conformational study of *Bacteroides thetaiotaomicron* dipeptidyl peptidase III complexes with synthetic substrates, 3rd European Crystallography School, Bol, Hrvatska, 2016. (poster)

3. M. Tomin, S. Tomić, I. Sabljić, Conformational study of *Bacteroides thetaiotaomicron* dipeptidyl peptidase III, Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, Zagreb, Hrvatska, 2016. (poster)

2. M. Tomin, S. Tomić, I. Sabljić, Conformational study of Bacteroides thetaiotaomicron dipeptidyl peptidase III, *29th European Crystallographic Meeting*, Rovinj, Hrvatska, 2015.

1. M. Tomin, I. Rončević, Z. Mihalić, Računalno proučavanje mehanizma redukcije nitrobenzena, *XXIV Hrvatski skup kemičara i kemijskih inžinjera*, Zagreb, Hrvatska, 2015.