

Vežanje iona prijelaznih metala u ljudskoj dipeptidil-peptidazi III

Matić, Antonia

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:874265>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-12**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Antonia Matic

Vežanje iona prijelaznih metala u ljudskoj dipeptidil-peptidazi III

DOKTORSKI RAD

Mentorica:
dr. sc. Sanja Tomić

Zagreb, 2024.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Antonia Matic

Binding of transition metal ions into human dipeptidyl peptidase III

Doctoral dissertation

Supervisor:
dr. sc. Sanja Tomić

Zagreb, 2024

Ova disertacija izrađena je u Laboratoriju za biokemiju proteina i molekularno modeliranje Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Sanje Tomić i neposredne voditeljice dr. sc. Zrinke Karačić, u sklopu Sveučilišnog doktorskog studija kemije pri Kemijskom odsjeku, Prirodoslovno matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Dio eksperimentalnog rada izveden je u Laboratoriju za fizikalnu kemiju i koroziju, Prehrambeno biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zavodu za fizikalnu kemiju, Prirodoslovno matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Zavodu za opću i anorgansku kemiju, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

Računi su izvedeni na računalnom klasteru Isabella i Supek u sklopu Sveučilišnog računskog centra (SRCE) Sveučilišta u Zagrebu. Disertacija je financirana sredstvima Hrvatske zaklade za znanost u sklopu projekta IP-2018-01-2936.

Zahvaljujem se mentorici dr.sc. Sanji Tomić na pruženoj prilici za izradu ove doktorske disertacije, hvala na vodstvu i pruženoj slobodi u mom istraživačkom radu.

Veliko hvala svim kolegicama koje su bile i onima koje su još uvijek dio Laboratorija za biokemiju proteina i molekulsko modeliranje i kolegama iz Laboratorija za kemijsku i biološku kristalografiju, na svim zajedničkim kavama, ručkovima i prepunom slatkim kutku, na savjetima i pomoći, na prekrasnoj radnoj i prijateljskoj atmosferi i na svakoj podršci bez koje bi bilo teško završiti ovaj put.

Posebno bi se zahvalila dr.sc. Zrinki Karačić koja je kao neposredni voditelj svoje znanje nesebično dijelila sa mnom, koja je imala jako puno strpljenja i razumijevanja, koja je sve ove godine živjela i sanjala metale zajedno sa mnom i nije odustala, te me gurala dalje kada nisam vidjela izlaz.

Zahvaljujem se dr.sc. Hrvoju Brkić i dr.sc. Dejanu Agić koji su me uveli u molekulsko modeliranje, hvala na svim savjetima i podršci.

Hvala kolegici dr.sc. Mirsadi Čehić koja se brinula da sve obaveze na faksu budu ispunjene, koja je slušala moje seminare i učila zajedno sa mnom.

Hvala prijateljicama Ivani Budić i Neveni Jurić koje su uvijek imale vremena za mene, te moj život u Zagrebu učinile ljepšim i izdržljivim.

Hvala Marijo i tebi koji si me nagovorio da se prijavim na natječaj za doktoranda.

Što god kažem za svoju obitelj nije dovoljno, neizmjereno hvala roditeljima, sestrama i nećaku Dominiku, koji me cijeli moj život podržavaju u svim mojim životnim odlukama, koji su stalno uz mene, koji su mi podrška i potpora, i uz koje je moj život ispunjen.

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem i Jovani i Marijani i Mateju i Kristijanu i Maji i Dragom i malenom Patriku i njegovim prezabrinutim roditeljima. Vama koji ste dolazili ne svojom voljom u moj mali stan i zvali ga čekaonica, jer taj stan uistinu takav je i bio. Svi ste nervozno čekali u njemu što će se dogoditi sutra. Zbog vas vrijedi ona „čovjek dok je zdrav može sve“ i to je ono što ste me nažalost naučili. I upravo ste vi jedan od razloga zbog kojeg nisam odustala. Ako se mene pita bilo vas je previše u ove četiri godine. A sada, ja čekam vas da mi dođete i kažete uspjeti smo! <3

Sadržaj

SAŽETAK.....	XIII
ABSTRACT	XV
§ 1. UVOD.....	17
§ 2. LITERATURNI PREGLED	20
2.1. Enzimi	20
2.1.1. <i>Klasifikacija peptidaza.....</i>	20
2.1.2. <i>Funkcija peptidaza.....</i>	21
2.1.3. <i>Metalopeptidaze.....</i>	23
2.1.4. <i>Dipeptidil-peptidaza III.....</i>	26
2.2. Pregled korištenih eksperimentalnih metoda	28
2.2.1. <i>Afinitetna kromatografija.....</i>	28
2.2.2. <i>Gel-filtracijska kromatografija.....</i>	28
2.2.3. <i>Elektroforeza.....</i>	29
2.2.4. <i>Spektroskopija zaustavljenog protoka.....</i>	29
2.2.5. <i>Spektrometrija mase s induktivno spregnutom plazmom.....</i>	31
2.2.6. <i>Izotermalna titracijska kalorimetrija.....</i>	32
2.3. Pregled korištenih računalnih metoda	35
2.3.1. <i>Molekulska mehanika.....</i>	36
2.3.2. <i>Molekulska dinamika</i>	38
2.3.3. <i>Kvantno mehaničke metode.....</i>	41
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	44
3.1. Materijali	44
3.2. Eksperimentalne metode	46
3.2.1. <i>Transformacija bakterijskih stanica</i>	46
3.2.2. <i>Ekspresija proteina</i>	46
3.2.3. <i>Razaranje stanica (liza stanica).....</i>	46
3.2.4. <i>Pročišćavanje proteina</i>	47
3.2.5. <i>Afinitetna kromatografija.....</i>	47
3.2.6. <i>Gel-filtracija.....</i>	47
3.2.7. <i>Analiza proteina elektroforezom.....</i>	48

§ Sadržaj	x
3.2.8. <i>Analiza enzimske aktivnosti</i>	48
3.2.9. <i>Odsoljavanje i ugušćivanje proteina</i>	49
3.2.10. <i>Priprema apo hDPP III</i>	49
3.2.11. <i>Priprema holo proteina</i>	49
3.2.12. <i>Usmjerena mutageneza</i>	50
3.2.13. <i>Imunotestovi (western blot)</i>	50
3.2.14. <i>Spektroskopija na spektrometru zaustavljenog protoka</i>	51
3.2.15. <i>Fluorimetrijsko određivanje konstante disocijacije metala</i>	51
3.2.16. <i>Spektrometrija mase s induktivno spregnutom plazmom</i>	53
3.2.17. <i>Izotermalna titracijska kalorimetrija (ITC)</i>	55
3.3. Računalne metode	56
3.3.1. <i>Modelirani sustavi</i>	56
3.3.2. <i>Kvantno mehanički računi</i>	59
3.3.3. <i>Metode polja sile</i>	61
3.3.3.1. <i>Priprema struktura hDPP III s dva iona metala i njihovih kompleksa s peptidom za molekulske dinamičke simulacije</i>	61
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	64
4.1. Eksperimentalni pristup	64
4.1.1. <i>Analiza pročišćenih proteina</i>	64
4.1.2. <i>Određivanje stehiometrije vezanja metala na hDPP III (ICP-MS)</i>	68
4.1.3. <i>Praćenje aktivnosti vezanja metala na hDPP III spektroskopijom zaustavljenog protoka</i>	69
4.1.4. <i>Konstante disocijacije mjerene fluorimetrijski</i>	72
4.1.5. <i>Određivanje stehiometrije vezanja metala na hDPP III (ITC)</i>	73
4.2. Računalni pristup	79
4.2.1. <i>Rezultati kvantno mehaničkih računa</i>	79
4.2.2. <i>Rezultati MD simulacije s dva iona cinka vezana u aktivno mjesto hDPP III</i>	83
4.2.2.1. <i>MD simulacije hDPP III s dva iona cinka u aktivnom mjestu</i>	84
4.2.2.2. <i>MD simulacije kompleksa hDPP III s dva iona cinka u aktivnom mjestu s peptidom IVYPW</i>	86
4.2.3. <i>Rezultati MD simulacija hDPPP s dva iona bakra vezana u aktivno mjesto</i>	87
§ 5. ZAKLJUČAK	101
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	104
§ 7. LITERATURNI IZVORI	106
§ 8. DODATAK	111
§ 9. ŽIVOTOPIS	113



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

VEZANJE IONA PRIJELAZNIH METALA U LJUDSKOJ DIPEPTIDIL-PEPTIDAZI III

Antonia Matić
Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, Zagreb

Cilj istraživanja bio je odrediti učinak vezanja različitih dvovalentnih iona metala: Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , u različitim koncentracijama, na aktivnost ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III), istražiti pretpostavku postojanja inhibitornog veznog mjesta metala i ukoliko je točna, identificirati ga. Istraživanja su provedena kombiniranjem različitih eksperimentalnih i računalnih metoda. Za potrebe eksperimentalnog istraživanja pripremljeni su holoenzimi s ionima Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} i Cu^{2+} . U tim uzorcima stehiometrija metal-protein određena je spektrometrijom masa s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) i izotermalnom titracijskom kalorimetrijom (ITC). Koristeći metodu spektroskopije zaustavljenog protoka, pratilo se smanjenje enzimske aktivnosti hDPP III uzrokovano viškom iona metala. Računalnim metodama, kvantno mehaničkim izračunima i molekulsko dinamičkim simulacijama, određeni su afiniteti različitih kationa metala prema aktivnom mjestu hDPP III, identificirana su inhibitorna vezna mjesta za ione bakra i cinka i određen je mehanizam izmjene metalnih iona vezanih u inhibitorno i katalitičko vezno mjesto.

(115 stranica, 45 slika, 19 tablica, 85 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: ljudska dipeptidil-peptidaza III/ kvantna mehanika/ ioni metala/ molekulska dinamika/

Mentor: dr. sc. Sanja Tomić, znanstveni savjetnik u trajnom zvanju

Rad prihvaćen: 7. veljače 2024.

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Aleksandra Maršavelski
2. dr. sc. Ivana Lešćić Ašler, v. zn. sur.
3. dr. sc. Ivo Crnolatac, v. zn. sur.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

BINDING OF TRANSITION METAL IONS INTO HUMAN DIPEPTIDYL PEPTIDASE III

Antonia Matic

Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, Zagreb

The aim of the study was to determine the binding effect of various divalent ionic metals: Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , in different concentrations, on the activity of human dipeptidyl peptidase III (hDPP III), to verify our assumption of the existence of an inhibitory metal binding site and, if correct, to identify this site. The investigations were carried out by combining different experimental and computational methods. For the experimental studies, holoenzymes with Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , and Cu^{2+} ions were prepared. In these samples, the metal-protein stoichiometry was determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and isothermal titration calorimetry (ITC). Stopped flow spectroscopy was used to monitor the decrease in hDPP-III enzyme activity due to an excess of metal ions. Computational methods, quantum mechanical calculations and molecular dynamics simulations were used to determine the affinities of different metal dications to the active site of hDPP III, to identify the inhibitory binding site for copper and zinc ions and to determine the mechanism of exchange of metal ions bound to the inhibitory and catalytic binding sites.

(115 pages, 45 figures, 19 tables, 85 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: human dipeptidyl peptidase III/ metal ions/ molecular dynamics/ quantum mechanics/

Supervisor: Dr. Sanja Tomić, Professor

Thesis accepted: February 7th 2024

Reviewers:

Dr. Aleksandra Maršavelski, Associate Professor
Dr. Ivana Leščić Ašler, Senior Research Associate
Dr. Ivo Crnolatac, Senior Research Associate

§ 1. UVOD

Enzim dipeptidil-peptidaza III (EC 3.4.14.4) pripada grupi egzopeptidaza, a katalizira odcjepljivanje dipeptida s N-terminalnog dijela peptidnog supstrata. Prisutna je u gotovo svim tkivima sisavaca i ima vrlo široku supstratnu specifičnost zbog čega se smatra da sudjeluje u završnim koracima staničnog katabolizma proteina. Zbog mogućnosti da efikasno katalizira hidrolizu pojedinih endomorfini i angiotenzina [1, 2] posljednjih je godina pokrenuto niz istraživanja vezanih za njezinu uključenost u regulaciju boli i tlaka [3, 4].

DPP III je prepoznata kao protein koji utječe na povećanje ekspresije gena za anti-oksidativni odgovor [5], najvjerojatnije svojim djelovanjem na Keap1-Nrf2 signalni put [6, 7]. Sve navedeno upućuje na važnost poznavanja stanične funkcije DPP III u svrhu razumijevanja nekih bolesti kod ljudi. Tako je npr. utvrđeno da nedostatak DPP III potencira gubitak koštane mase uzrokovan nedostatkom estrogena u miševima kojima su odstranjeni jajnici i koji su korišteni kao model za proučavanje osteoporoze u postmenopauzi [8]. Gen za DPP III dio je genskog potpisa za koji su He i sur. (2010.) ustanovili da može predvidjeti ishod izlječenja od raka dojke kod ljudi, a Chou i sur. (2013.) identificirali su ga kao jedan od 21 gena blisko povezanih s ponovnim javljanjem raka dojke.

Karakteristični motivi DPP III, "HEXXGH" i "EEXR(K)AE(D)", odgovorni su za vezanje iona metala u aktivno mjesto enzima. Iako je ion cinka bitan za peptidaznu aktivnost ljudske dipeptidil-peptidaze III, Fukasawa i sur. su pokazali da njegov suvišak inhibira aktivnost enzima [9]. U aktivno mjesto DPP III veže se jedan ion cinka, no dosadašnja istraživanja jasno upućuju na mogućnost vezanja još jednog iona metala koji svojim vezanjem inhibira enzimsku aktivnost DPP III. Vezanje drugog iona metala u tzv. inhibitorno vezno mjesto metala smješteno neposredno uz katalitički aktivno mjesto enzima, opaženo je u kristalografskim strukturama triju o cinku ovisnih enzima, kod kojih je, kao i kod DPP III, katalitički cink koordiniran s dva histidina i karboksilnom skupinom aminokiselina Glu ili Asp: karboksipeptidazi A, termolizinu i LpXC (PDB kodovi odgovarajućih struktura su 1CPX, 5EGY i 1P42). Young i Siemann pokazali su da kod izmjene metala u letalnom faktoru (LF) antraksa vezanje metala u inhibitorno vezno mjesto prethodi oslobađanju katalitičkog cinka [10]. Budući da ioni metala imaju značajnu ulogu u zdravlju čovjeka, važno

je razumjeti proces izmjene metala u različitim biološkim fenomenima kao što su homeostaza cinka, među-proteinska izmjena metala, detoksifikacija i sprečavanje vezanja pogrešnih iona metala za enzime. Primjenom iste logike kojom su Young i Siemann pretpostavili moguće mjesto vezanja inhibirajućeg iona Zn^{2+} u LF-u, možemo pretpostaviti postojanje inhibitornog veznog mjesta metala u DPP III. Međutim, ni jedna od dostupnih kristalnih struktura DPP III, ne sadrži dva iona cinka.

Jedan od ciljeva istraživanja je eksperimentalno pokušati potvrditi postojanje inhibitornog veznog mjesta, to jest, točno kvantificirati vezanje i afinitet u odnosu metal-protein.

Računalnim pristupom mogu se proučavati sustavi koji eksperimentalno nisu lako dostupni. U ranije provedenim simulacijama molekulske dinamike (MD) za DPP III koristili su se ranije razvijeni nevezni parametri za ion cinka za metalo proteine [14, 15], a koji su opisivali interakcije metal-ligand samo kao elektrostatsku i van der Waalsovu interakciju. Iako su rezultati navedenih MD simulacija u skladu s eksperimentalnim rezultatima (daju točne informacije o strukturi i fleksibilnosti proteina), u njima je cink pretežno koordiniran sa šest liganada dok je u strukturama DPP III određenim difrakcijom X-zraka cink tetra-koordiniran, s histidinima iz motiva $^{450}HEXXGH^{455}$, glutamatom iz motiva $^{507}EECRAE^{512}$ i molekulom vode (npr. 3FVY). Oktaedarska koordinacija iona cinka tijekom MD simulacija postignuta je ulaskom dodatne molekule vode i karboksilnog kisika glutamata E451 iz HEXXGH motiva. Kvantno mehanički/molekulska mehanički (QM/MM) računi kojima je određen mehanizam reakcije hidrolize peptida u aktivnom mjestu ljudske DPP III [16] također upućuju na tetraedarsku koordinaciju Zn^{2+} . Zbog svega navedenog, a kako bi se detaljno proučilo vezanje iona cinka za DPP III, odlučili smo razviti nove nevezne parametre koji će odražavati saznanja dobivena proučavanjem enzimske katalize i postojećih kristalnih struktura DPP III. Dobiveni parametri omogućili bi nam identifikaciju inhibitornog veznog mjesta cinka i praćenje ulaska i izmjene dodatnog iona cinka u aktivno mjesto DPP III.

Cilj istraživanja je utvrditi učinke različitih koncentracija metala: Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} na aktivnost ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) i identificirati inhibitorno vezno mjesto metala. Inhibicija hDPP III metalnim dikationima istraživat će se različitim eksperimentalnim i računalnim metodama. Za potrebe eksperimentalnog istraživanja pripremit će se holoenzimi s ionima Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} . U tim uzorcima stehiometrija metal-protein određivat će se spektrometrijom mase visoke rezolucije s induktivno

spregnutom plazmom (HR-ICP-MS) i izotermalnom titracijskom kalorimetrijom (ITC). Koristeći metodu zaustavljenog protoka, pratit će se smanjenje enzimske aktivnosti hDPP III uzrokovano viškom metalnih kationa. Računalnim metodama, kvantno mehaničkim izračunima i molekulsko dinamičkim simulacijama, odredit će se afinitet različitih metalnih kationa prema aktivnom mjestu hDPP III, identificirati inhibitorno vezno mjesto metala i odrediti mehanizam izmjene metala u enzimu.

Na temelju sličnosti aktivnog mjesta DPP III s drugim cink-ovisnim enzimima i rezultata do sada provedenih kinetičkih mjerenja pri različitim koncentracijama metala, pretpostavljeno je vezanje inhibitornog iona metala u blizini katalitičkog centra. U sklopu ovog znanstveno-istraživačkog rada na doktorskom studiju proučavana je interakcija proteina hDPP III s metalnim ionima, te su eksperimentalni rezultati potkrijepljeni računalnim rezultatima.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

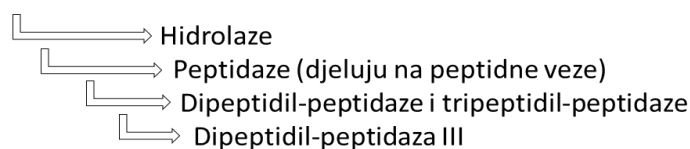
2.1. Enzimi

2.1.1. Klasifikacija peptidaza

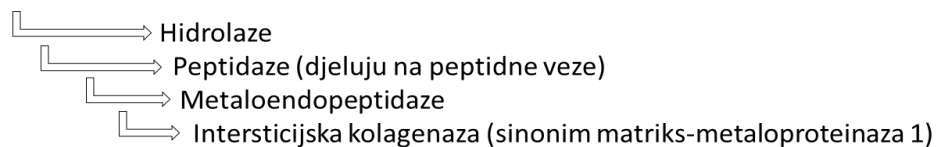
Prema IUBMB (eng. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) enzimi se dijele u 6 osnovnih skupina, ovisno o vrsti reakcije koju kataliziraju: oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze. Skupine se dijele na podskupine ili podklase koje se razlikuju po vrsti veze na kojoj se odvija reakcija. Podklase se mogu dalje podijeliti u pod-podklase i pripisuju im se serijski brojevi (slika 1). Peptidaze spadaju u podklasu hidrolaza, a osnovna funkcija im je kataliza hidrolize peptidne veze u proteinima ili peptidima (slika 2) [17]. Peptidaze se nalaze u svim živim organizmima i sudjeluju u izvanstaničnoj i unutarstaničnoj razgradnji proteina i peptida.

Svi enzimi imaju zasebnu oznaku vijeća za enzime EC (engl. *Enzyme Commission*), pa tako peptidaze nose oznaku EC 3.4, gdje prvi broj 3 predstavlja klasu, hidrolaze, a broj 4 podklasu, peptidaze [18].

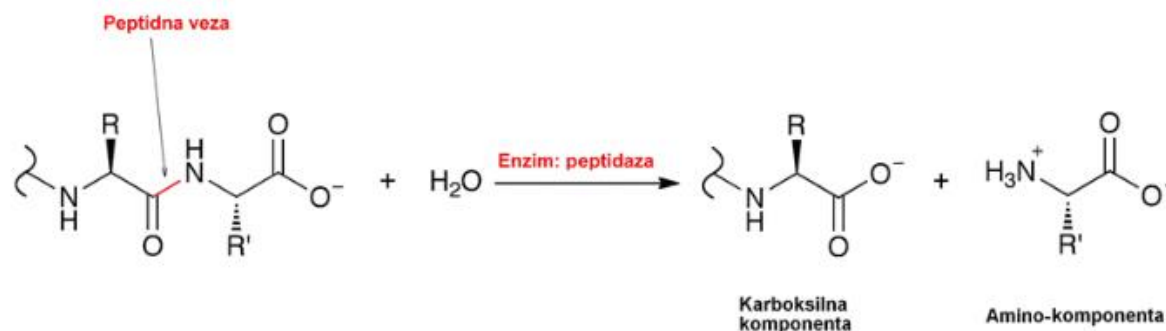
3.4.14.4



3.4.24.7



Slika 1. Primjer EC oznake za dvije metalopeptidaze prema vrsti reakcije, podklasi, pod-podklasi i serijskom broju.



Slika 2. Shematski prikaz reakcije hidrolize peptidne veze, gdje su s R i R' označeni bočni aminokiselinski ogranci koji su kovalentno vezani za C α atom, a razlikuju se ovisno o aminokiselinama.

Peptidna veza se može cijepati pri kraju ili unutar peptidnog lanca, te se tako peptidaze dijele na egzopeptidaze i endopeptidaze. Egzopeptidaze se dijele prema specifičnosti koju pokazuju prema N-kraju ili C-kraju peptidnog lanca i prema broju aminokiselina koje odcjepljuju. Egzopeptidaze koje odcjepljuju aminokiseline s N-kraja peptidnog lanca zovu se aminopeptidaze (odcjepljuju jednu aminokiselinu), dipeptidil-peptidaze (odcjepljuju dvije aminokiseline, to jest dipeptid) i tripeptidil-peptidaze (odcjepljuju tri aminokiseline). Egzopeptidaze koje odcjepljuju aminokiseline sa slobodnog C-kraja peptidnog lanca zovu se karboksipeptidaze (odcjepljuju jednu aminokiselinu), peptidil-dipeptidaze (dvije aminokiseline) i peptidil-tripeptidaze (tri aminokiseline).

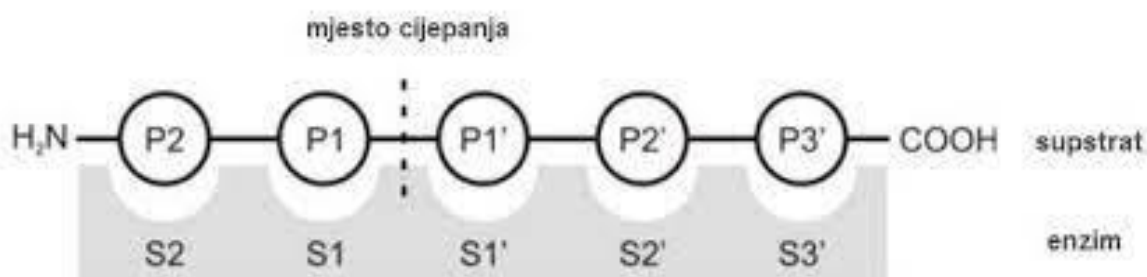
Sistematizirane informacije o peptidazama mogu se naći i u MEROPS bazi podataka. Enzimi su razvrstani prema sličnosti slijeda aminokiselina članova obitelji, a homologne obitelji grupirane su u klan. Obitelj može sadržavati jedan enzim ako nisu poznati homolozi tog proteina, a označava se slovom koje predstavlja katalitički tip peptidaze i jedinstvenim brojem tog enzima. Katalitički tipovi peptidaza su: aspartatne (A), cisteinske (C), glutamatne (G), metalopeptidaze (M), asparaginske (N), peptidaze miješanog tipa (P), serinske (S), treoninske (T) i peptidaze kojima je tip nepoznat (U) [19].

2.1.2. Funkcija peptidaza

Proteini imaju esencijalnu ulogu u strukturi i funkciji svih živih organizama, a građeni su od aminokiselina. Peptidaze su biološki katalizatori koji razgrađuju molekule proteina i peptida kako bi osigurali slobodne aminokiseline potrebne za sintezu novih proteina. Peptidaze su

evoluirale za obavljanje vitalnih funkcija unutar i izvan stanica. Važna funkcija je obrada proteina cijepanjem jedne ili više peptidnih veza unutar jednog proteina. Važnost peptidazne reakcije ukazuje i postojanje najmanje 8 (prema MEROPSu) katalitičkih tipova peptidaza, što sugerira da su peptidaze evoluirale više puta i na više načina. Kao takve organizmu daju mogućnost fine regulacije proteolitičkog aparata, jer na različite tipove peptidaza djeluju različiti tipovi inhibitora.

Aminokiselinski ostaci koji čine vezno mjesto peptidaze određuju koji se aminokiselinski ostaci supstrata mogu vezati na specifična vezna mjesta enzima. Supstratna specifičnost peptidaza opisuje se modelom i terminologijom prikazanim na slici 3. Od P1 do Pn označeni su aminokiselinski ostaci peptidnog supstrata prema N-kraju od peptidne veze koja se cijepa. Od P1' do Pn' označeni su aminokiselinski ostaci peptidnog supstrata prema C-kraju od peptidne veze koja se cijepa. Podmjesto u aktivnom mjestu enzima, u koja se smještaju odgovarajući aminokiselinski ostaci supstrata, nose oznake S1 do Sn, odnosno od S1' do Sn' [20].



Slika 3. Shematski prikaz vezanja supstrata u aktivno mjesto peptidaze. Aminokiselinski ostaci supstrata smješteni u aktivno mjesto proteina numerirani su od P1 do Pn prema N-kraju i od P1' do Pn' prema C-kraju supstrata. Položaji u aktivnom mjestu peptidaza u koje se smještaju aminokiselinski ostaci supstrata na N-kraju su numerirani sa S1 do Sn, a položaji u koje se vežu aminokiseline supstrata prema njegovom C-kraju sa S1' do Sn'. Slika preuzeta iz literature [21].

Peptidaze kod viših organizama utječu na replikaciju i transkripciju DNA, rast i diferencijaciju stanice, reorganizaciju staničnog skeleta, angiogenezu, neurogenezu, sudionici su u procesima zgrušavanja krvi, fibrinolize, ovulacije, fertilizacije, embrionalnog razvoja, zacjeljivanja rana, upalnih procesa, imunog odgovora, kontrole krvnog tlaka, starenja,

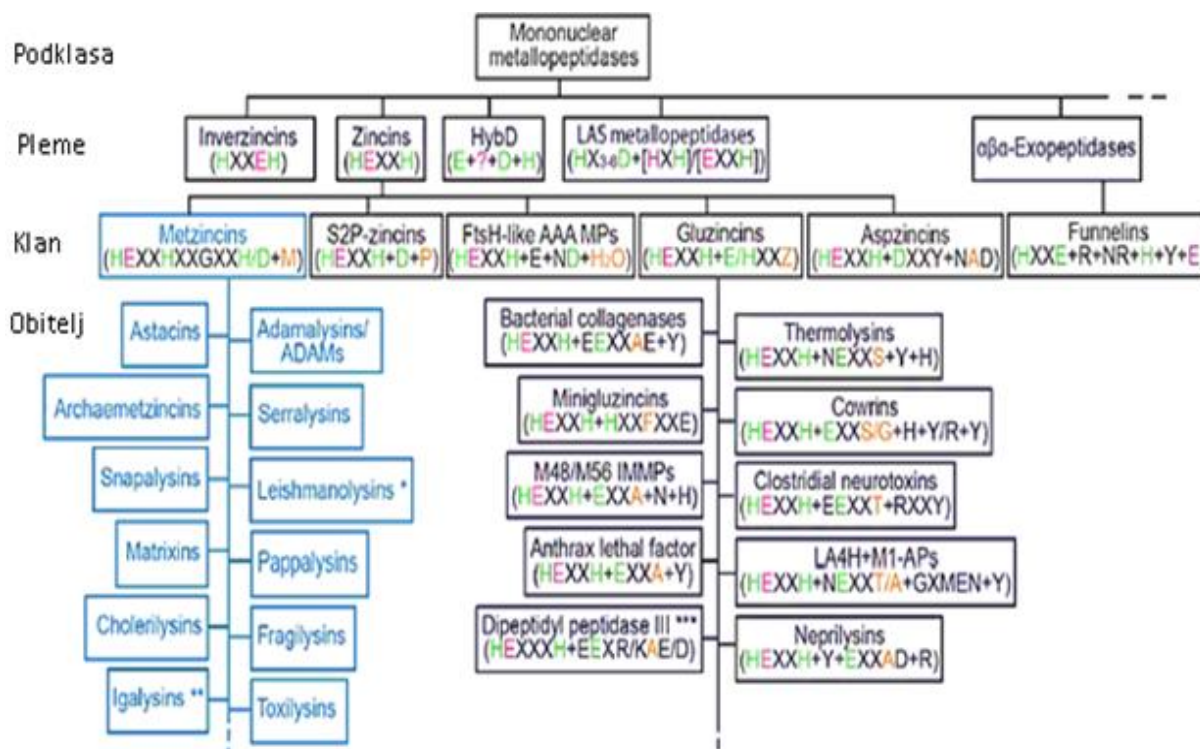
programirane smrti stanice (apoptoze) i nekroze. Zbog važnosti uloge peptidaza u funkciji stanica, promjene u peptidaznim sustavima rezultiraju mnogobrojnim patološkim stanjima kao što su rast i metastaze malignih tumora, neurodegenerativni poremećaji, te upalne i kardiovaskularne bolesti. Neke peptidaze mogu djelovati kao egzogeni faktor virulencije koji dovodi do slabljenja imunološkog sustava i uništavanja tkiva. Takve peptidaze su opažene tijekom mikrobnih infekcija koje uzrokuju tetanus, upalu pluća, tuberkulozu, AIDS, malariju, botulizam i bakterijski meningitis, i nakon trovanja uzrokovanog ugrizom zmijske. Detaljno poznavanje molekularnih značajki peptidaza i njihovih katalitičkih domena pomaže nam u razumijevanju njihovih radnih mehanizama i čini osnovu za dizajn novih lijekova [20,22].

2.1.3. Metalopeptidaze

Metalopeptidaze (MP) čine skupinu proteolitičkih enzima koji u katalitički aktivnom mjestu imaju dvovalentni ion metala. Sekvenciranjem ljudskog genoma ustanovljeno je da 194 gena kodira metalopeptidaze i da su one najveća skupina enzima proteolitičkog sustava [23]. Kation metala u aktivnom mjestu metalopeptidaza odgovoran je za katalitičku aktivnost proteina i obično omogućuje nukleofilni napad molekule vode na peptidnu vezu. Najčešći ioni metala prisutni u metaloenzimima su cink, kobalt, mangan, nikal i bakar. Ion metala uglavnom je koordiniran bočnim ograncima triju aminokiselina i molekulom vode. Aminokiseline čiji ostaci koordiniraju ion metala najčešće su histidin, asparaginska kiselina i glutaminska kiselina. Velik broj poznatih metalopeptidaza sadrži motiv His-Glu-Xaa-Xaa-His (HEXXH) koji čini dio veznog mjesta iona metala. Ovaj motiv osigurava dva histidinska ostatka od tri aminokiseline koje služe kao ligandi u koordinaciji iona metala [24].

Cink je najzastupljeniji ion metala u enzimski kataliziranim reakcijama hidrolize peptidne veze zbog fleksibilne koordinacijske geometrije i koordinacijskog broja (četiri do šest), fiziološke dostupnosti, mogućnosti polarizacije intermedijera, brze izmjene liganada, čvrstog vezanja za enzim, nedostatka redoks aktivnosti i nemogućnosti stvaranja reaktivnih radikala. MP su prema MEROPSu svrstane u 67 obitelji i 16 klanova. Mogu se podijeliti u dvije glavne skupine na temelju broja iona metala koji su potrebni za katalitičku aktivnost. Prva skupina su one s jednim ionom metala (mononuklearne metalopeptidaze), a druga s dva iona koji djeluju udruženo (binuklearne metalopeptidaze). Gotovo sve do sada opisane binuklearne metalopeptidaze su egzo-peptidaze, dok metalopeptidaze s jednim katalitičkim ionom metala mogu biti egzo-peptidaze ili endo-peptidaze [25].

Klasifikacija MP koju su utemeljili Cerda – Costa i sur. hijerarhijskog je tipa, a temeljena je na evoluciji i sličnosti struktura MP. MP se dijele na podklasu, pleme, klan i obitelji. Unutar skupine mononuklearnih metalopeptidaza su podklase koje su podijeljene na plemena, koja su svrstana prema strukturnoj formi na: „Inverzincins“, „Zincins“, srodnici faktora sazrijevanja hidrogenaze (HybD), LAS MP i $\alpha\beta$ -egzopeptidaze. Plemena se dijele na klanove, koji se dalje dijele na obitelji. Cijela klasifikacija prikazana je slikom 4.

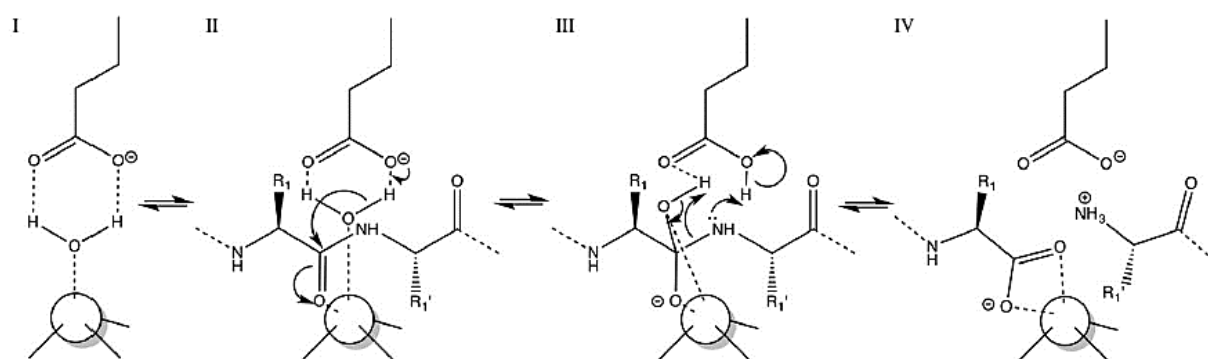


Slika 4. Klasifikacija mononuklearnih MP. Zeleno su označeni ostaci / ligandi koji se vežu za metal, ljubičasto opće baze ili kiseline koje imaju katalitičku ulogu, narančaste su boje ligandi koji zauzimaju položaj Met-okreta (eng. *Met-turn*) ili Ser / Gly-okreta ispod metalnog mjesta, X je oznaka za bilo koju aminokiselinu i ovdje prikazuje razmak unutar motiva, crnom su označeni aminokiselinski ostaci enzima koji doprinose stabilizaciji reakcijskog međuprodukta. Slika preuređena prema slici iz literature [20].

Za metaloenzime plemena „Zincins“ je karakteristično da enzimi u aktivnom mjestu sadrže ion cinka koordiniran s dva histidinska ostatka iz pentapeptidnog motiva HEXXH. Na drugom mjestu u motivu je uvijek glutaminska kiselina koja ima katalitičku funkciju. Za nekoliko obitelji iz plemena riješena je barem jedna kristalna struktura proteina, to jest

strukturni prototip. Strukturni prototipi svih obitelji sadrže dvije strukturne domene s aktivnim mjestom između njih. N-terminalna domena je ista u svim članovima, a sadrži α -zavojnice i β -nabranu ploču građenu od 6 β -vrpci. C-terminalne domene kod nekih članova, kao što su npr. termolizin i leishmanolizin čine kompleksne sekundarne strukture, a kod nekih, kao što je snapalizin, jednostavne.

S obzirom na treći ligand vezan na ion cinka, pleme „Zincins“ se dijeli u dva klana. Prvi klan je „Gluzincins“ u kojem je treći ligand ostatak glutaminske kiseline udaljene od HEXXH motiva 18 do 72 aminokiseline. Drugi klan je „Metzincins“ gdje je treći ligand histidin ili asparaginska kiselina koji se nalaze u proširenom motivu HEXXHXXGXX(HD). Očuvani glicin u proširenom motivu je neophodan za β -okret (engl. β -turn) koji primiče sve tri aminokiseline u koordinacijsku sferu cinka. Za peptidaze iz ovog klana je karakterističan specifičan β -okret ispod aktivnog mjesta koji sadrži očuvani metioninski ostatak, Met-okret [20,25]. Mehanizam katalize monometalnih MP i detaljni opis prikazani su slikom 5.



Slika 5. Općeprihvaćeni katalitički mehanizam monometalnih MP. U odsutnosti peptidnog supstrata (I) molekula katalitičkog otapala se veže na katalitički ion metala (bijela sfera) i opću bazu / kiselinu u aktivnom mjestu. Nakon smještanja supstrata u među-domensku pukotinu i nastajanja Michaelisovog kompleksa (II), polarizirana molekula otapala napada karbonilnu skupinu, što rezultira tetraedarskim reakcijskim intermedijerom (III). Slijedi pucanje veza unutar nastalog intermedijera uz dvostruki prijenos protona u novoformiranu α -amino skupinu i nastajanje produkta (IV). Slika preuzeta iz literature [20].

2.1.4. Dipeptidil-peptidaza III

Dipeptidil-peptidaza III (DPP III) je obitelj metalopeptidaza ovisna o cinku čiji su motivi "HEXXGH" i "EEXR(K)AE(D)" odgovorni za vezanje iona metala u aktivno mjesto enzima [9]. U bazi podataka MEROPS obitelj dipeptil-peptidaza III imenovana je i kao obitelj peptidaza M49.

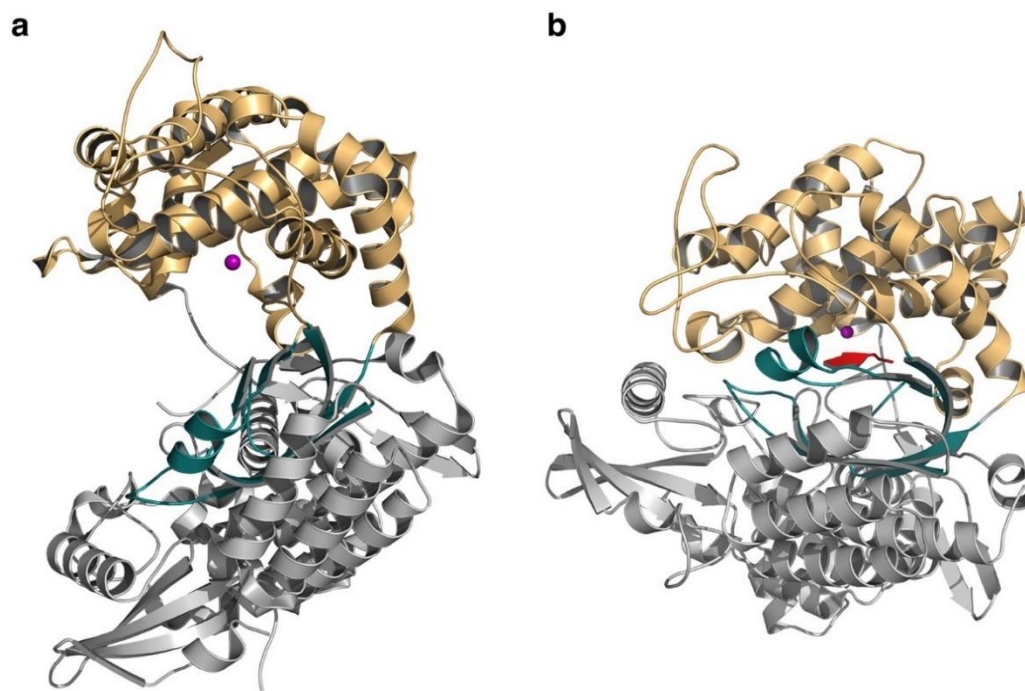
DPP III (EC 3.4.14.4; M49) je proteolitički enzim čija je aktivnost ovisna o ionu cinka, a katalizira odcjepljivanje dipeptida s N-terminalnog dijela peptidnog supstrata veličine 3 do 10 aminokiselina [23]. Prvi put je izolirana iz prednjeg režnja govede hipofize 1967. godine i identificirana reakcijom hidrolize nesupstituiranih dipeptidil-2-naftilamida kao treća po redu od dipeptidil-peptidaza, koja selektivno hidrolizira Arg-Arg-2-naftilamid. Postojeće kristalne strukture DPP III mogu se pronaći u banci podataka *Protein Data Bank* (PDB). Do sada su poznate strukture ljudske DPP III (PDB: 3FVY, 5EGY, 3T6B, 3T6J, 5E2Q, 5E33, 5E3A, 5E3C, 5EHH) [11, 21], kvaščeve (PDB: 3CSK), iz gljive (PDB: 5YFB, 5YFC, 5YFD) [12] i bakterijske (PDBI: 5NA6, 6NA7, 5NA8) [13].

DPP III se nalazi u tkivima sisavaca, te se pretpostavlja da sudjeluje u završnim koracima staničnog katabolizma proteina, a budući da cijepa niz endogenih neuropeptida i u većim koncentracijama nađena je u površinskim neuronima stražnjeg roga leđne moždine štakora, gdje se ujedno nalaze i enkefalin i endomorfín, smatra se da je uključena u modulaciju boli kod sisavaca [1].

Humana dipeptidil-peptidaza III (hDPP III) ima značajnu ulogu u razvoju ljudskih bolesti. Gen za hDPP III dio je genskog potpisa za koji je ustanovljeno da može predvidjeti ishod liječenja raka u ljudi [26] te je identificiran kao jedan od 21 gena blisko povezanih s ponovnim javljanjem raka dojke [27].

Molekula DPP III građena je od gornje i donje domene koje su odvojene širokim procjepom. Donji dio procjepa omeđen je dvjema paralelnim β -nabranim pločama sastavljenim od po pet β -vrpci i okruženim α -uzvojnica. U gornjoj domeni uz sam procjep nalazi se aktivno mjesto s vezanim katalitičkim ionom cinka. Dva histidina, His450 i His455 iz motiva HEXXGH te Glu508 iz već spomenutog očuvanog motiva EEXR(K)AE(D), koordiniraju cink u aktivnom mjestu. Glu451, koji se također nalazi u prvom heksapeptidnom motivu, direktan je sudionik reakcije budući da prenosi vodike s molekule vode koja zauzima četvrto koordinacijsko mjesto cinka u tetraedarskoj koordinaciji na dušiku peptidne veze koja se cijepa.

DPP III dolazi u dvije konformacije: otvorenoj i zatvorenoj. Prva kristalografski određena struktura DPP III bila je u otvorenoj konformaciji (slika 6a). Velika konformacijska promjena koja je dovela do zatvaranja međudomske pukotine primijećena je tijekom molekulske-dinamičkih simulacija proteina u vodenoj otopini pri čemu je zatvaranje entropijski potaknuto. Izbacivanjem molekula vode iz međudomske pukotine, entropija sustava se povećava. Približavanje dviju domena endoterman je proces, ali zbog entropijskog doprinosa otpuštanja velikog broja molekula vode iz procjepa prilikom zatvaranja, ukupna promjena Gibbsove energije je negativna [21]. Prva eksperimentalno određena struktura potpuno zatvorenog proteina bila je ona ljudske DPP III u kompleksu sa sintetskim opioidnim peptidom tinorfinom (VVYPW, slika 6b). Pokazalo se da vezanje peptida za β -nabranu ploču donje domene DPP III dodatno potiče zatvaranje proteina i osigurava pravilno pozicioniranje supstrata za enzimsku katalizu. Između supstrata i gornje domene proteina stvaraju se vodikove veze čime nastaje aktivan kompleks enzima i supstrata.



Slika 6. Struktura ljudske dipeptidil-peptidaze III. Gornje domene prikazane su zlatnom bojom, donje domene sivom, a β -jezgra s pet vrpci tamnozelenom bojom. Katalitički cinkov ion prikazan je kao ljubičasta kugla. (a) Prikaz strukture otvorene konformacije hDPP III. (b) Prikaz zatvorene konformacije hDPP III. Vezani peptid prikazan je crvenom bojom. Preuzeto iz literature [11].

2.2. Pregled korištenih eksperimentalnih metoda

2.2.1. Afinitetna kromatografija

Afinitetna kromatografija je metoda odjeljivanja koja se temelji na vezanju makromolekula s makromolekulama ili makromolekula s ligandima male molekulske mase, a vezivanje je specifično za određenu molekulu ili grupu molekula. Punilo kolone sadrži kuglice s kovalentno vezanim molekulama liganda na koje se reverzibilno vežu proteini. Ligandi mogu biti enzimski supstrati, specifično antitijelo ili druge male molekule koje se vežu za određene proteine. Pročišćavanjem smjese proteina na punilu kolone zaostaju samo proteini koji vežu ligand pričvršćen na kuglice, a preostali proteini, bez obzira na njihov naboj ili masu, proći će kroz kolonu. Afinitetno vezani proteini na koloni eluiraju se dodatkom suviška liganda, promjenom koncentracije soli ili mijenjanjem pH vrijednosti [28]. Osim vezanja za prirodne ligande, mogu se koristiti i rekombinantni proteini koji sadrže afinitetni privjesak (eng. *tag*), s kojim se vežu na kolonu. Primjer takvog privjeska je histidinski privjesak koji se sastoji od 6 (ili više) histidinskih ostataka vezanih za amino ili karboksilni kraj proteina. His privjesak specifično se veže na metalni nosač, ione nikla ili kobalta, ovisno o punilu, dok drugi proteini protječu kroz stupac. Protein se potom eluira sa stupca dodatkom suviška imidazola [29].

2.2.2. Gel-filtracijska kromatografija

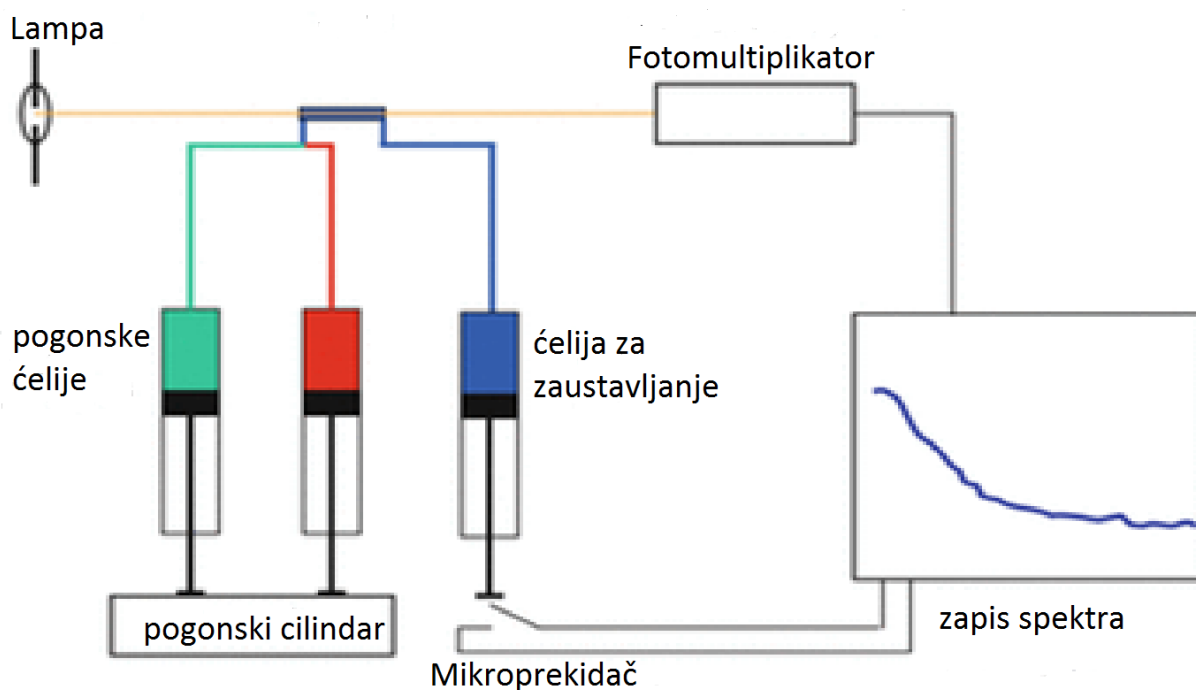
Gel filtracija je tekućinska kromatografija kojom se mogu odvojiti proteini različitih masa i veličina. Stacionarna faza je u obliku kuglica gela (poliakrilamida, dekstrana ili agaroze), a mobilna faza je tekuća, najčešće pufer. Gel je heterogeni sustav u kojem je tekuća faza sadržana unutar pora čvrste faze tj. matriksa. U gelovima za filtraciju se nalaze pore strogo kontrolirane veličine, a matriks bi trebao održavati kemijsku i fizikalnu stabilnost i inertnost [30]. Proteini, ovisno o veličini, prolaze između kuglica ili zaostaju u porama. Budući da manji proteini mogu ući u pore oni putuju sporije kroz kolonu i izlaze postupno, za razliku od većih proteina koji izlaze prvi. Ukupni volumen tekućine potreban za eluiranje proteina iz kolone ovisi o njegovoj masi - što je masa manja, to je potreban veći volumen elucije.

2.2.3. Elektroforeza

Elektroforeza je tehnika za razdvajanje molekula u smjesi pod utjecajem električnog polja. Bazira se na migraciji nabijenih proteina u električnom polju. Elektroforetsko razdvajanje proteina najčešće se izvodi u poliakrilamidnim gelovima. Najčešći korišteni tipovi elektroforeze su nativna elektroforeza za razdvajanje nativnih proteina i SDS-PAGE (poliakrilamidna gel-elektroforeza u prisutnosti natrijeva dodecil-sulfata), za razdvajanje proteina denaturiranih ionskim deterdžentom natrijevim dodecil-sulfatom, koji disocira multimerne proteine na podjedinice, a polipeptidnim lancima daje izduženu konformaciju sa sličnim omjerom naboja i mase. Molekulska masa proteina na SDS-PAGE gelu može se procijeniti usporedbom položaja migracije proteina na gelu, s položajem proteina poznate molekulske mase. Elektroforeza je najčešće korištena metoda za određivanje čistoće proteina, specifične aktivnosti proteina i količine proteina dobivene tijekom procesa pročišćavanja [31].

2.2.4. Spektroskopija zaustavljenog protoka

Spektroskopija zaustavljenog protoka (eng. *Stopped flow spectroscopy*) najčešće proučava brze reakcije u otopini u vremenskim razmacima u rasponu od 1 milisekunde do sto sekundi. Najčešće se koristi za određivanje reakcijskih mehanizama, procesa vezanja lijeka ili praćenje strukturnih promjena proteina, na primjer interakcije protein-protein, vezanje liganda, prijenos elektrona, prijenos energije fluorescentne rezonancije, smatanje proteina i enzimske, kemijske ili koordinacijske reakcije. Radi na principu brzog miješanja dva reagensa koji potom ispunjavaju ćeliju za promatranje gdje se 'zaustavljaju' i počinje prikupljanje podataka. Vrijeme između kraja miješanja dviju otopina i početka promatranja kinetike reakcije nazivamo „mrtvo vrijeme“. Ćelija s uzorkom se osvjetljava monokromatskim svjetlom. Napredovanje reakcije prati se promjenom snimljenog signala, fluorescencije ili apsorbancije, na određenoj valnoj duljini, u ovisnosti o vremenu. Metoda se može koristiti za pokazivanje učinka parametara kao što su temperatura, pH i koncentracija reagensa na kinetiku reakcije [32].



Slika 7. Shematski dijagram komponenta spektroskopije zaustavljenog protoka. Slika preuzeta i dorađena iz literature [32].

Fluorimetrijsko praćenje reakcije koristi kinetike nultog reda u kojima je brzina stvaranja produkta tijekom reakcije stalna. Jednadžba za brzinu reakcije:

$$v_0 = \frac{d[P]_t}{dt} = k_0 \quad (1)$$

gdje je $[P]_t$ koncentracija produkta u trenutku t , a k_0 konstanta brzine reakcije nultog reda. U početku reakcije, $t = 0$, k_0 je jednaka početnoj brzini v_0 (jedinice $\text{mol dm}^{-3} \text{s}^{-1}$).

Fotomultiplikator zapravo mjeri napon, koji je dan jednadžbom:

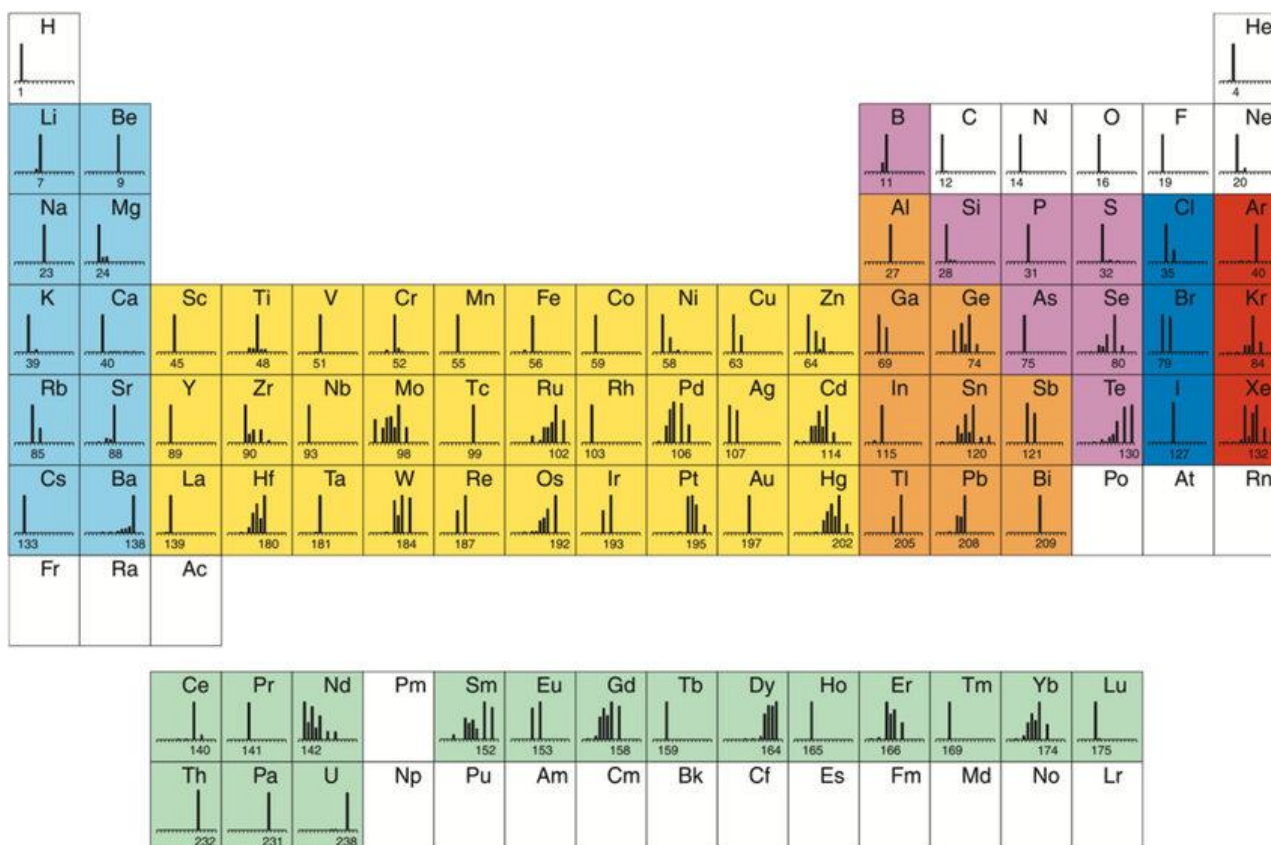
$$U[P]_t = f_{\lambda, U, P} [P]_t + U_0 = f_{\lambda, P} k_0 t + U_0 = k_0 t + U_0 \quad (2)$$

gdje je $U[P]_t$ napon izmjeren na fotomultiplikatoru u trenutku t , proporcionalan intenzitetu fluorescencije, U_0 napon na početku reakcije, $f_{\lambda, U, P}$ faktor proporcionalnosti između izmjerenog napona i koncentracije produkta (ovisi o pobudnoj valnoj duljini λ , naponu, U , na

fotomultiplikatoru i kemijskoj vrsti, P, (jedinice $V \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$)), k_0 je konstanta brzine reakcije nultog reda dobivena iz linearne ovisnosti $U[P]_t$ o vremenu (jedinice $V \text{ s}^{-1}$).

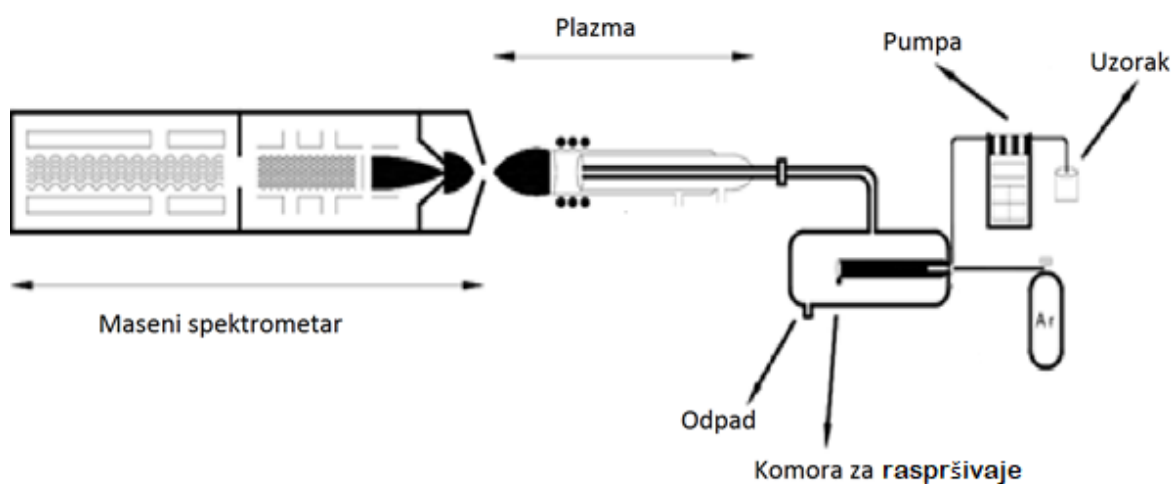
2.2.5. Spektrometrija mase s induktivno spregnutom plazmom

Spektrometrija mase s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) je suvremena metoda koja se koristi za mjerenje metala i metaloida u biološkim uzorcima. Kao ionizacijski izvor koristi se induktivno spregnuta plazma, a detekcija se odvija masenom spektrometrijom. Najčešće se koristi u poljima biomedicine, ekologije i geologije, a prednost joj je brzina analize, nizak limit detekcije i sposobnosti mjerenja izotopa. ICP-MS metodom mogu se provoditi kvalitativne i kvantitativne analize. Slika 8. prikazuje elemente čije je koncentracije u uzorku moguće kvantitativno analizirati pomoću ICP-MS metode [33].



Slika 8. Grupe elemenata koje se određuju pomoću metode ICP-MS, označene bojama. Značenje boja: svijetlo plava - alkalijski i zemno alkalijski metali; žuta - prijelazni metali; narančasta - ostali metali; roza - metaloidi; tamno plava - halogeni elementi; crvena - plemeniti plinovi; zelena - rijetki elementi lantanoidi i aktinoidi [34].

Uređaj se sastoji od sustava za uvođenje uzorka, ionizatora, induktivno spregnute plazme, optičkih leća, masenog spektrometra (analizator) i detektora. ICP-MS radi na principu uvođenja tekućeg uzorka kroz pumpe do komore u kojoj se putem raspršivača i visokotlačnog argona pretvara u aerosol. Tekući uzorak prelazi iz stanja aerosola u plinovito stanje i ionizira se što je bitno za daljnji tijek analize. Nastali ioni koji se nalaze u plazmi (na atmosferskom tlaku) se putem ionskih leća ubrzavaju i usmjeravaju u maseni spektrometar. U masenom spektrometru se ioni razdvajaju na temelju omjera mase i naboja. Detektor detektira ione koji izlaze iz spektrometra te izračunom svakog pojedinog omjera mase i naboja daje konačan rezultat u vidu masenog spektra.



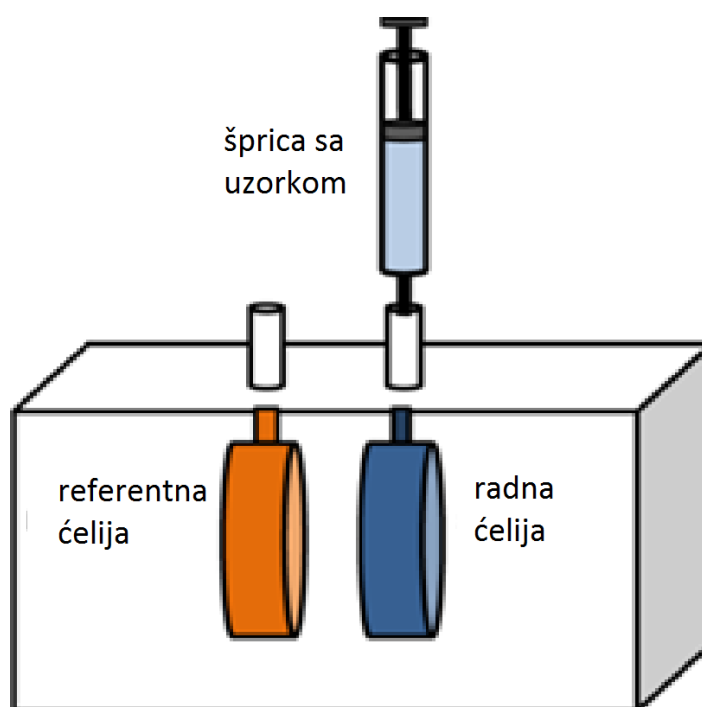
Slika 9. Shematski prikaz ICP-MS instrumenta. Preuzeto iz literature i preuređeno [35].

2.2.6. Izotermalna titracijska kalorimetrija

Izotermalna titracijska kalorimetrija (ITC) temelji se na fizikalnoj metodi mjerenja topline koja se oslobađa ili troši tijekom reakcije. To je analitička metoda u kojoj se pri konstantnoj temperaturi (izotermalni postupak), poznate količine liganda postepeno dodaju (titracija) u otopinu receptora (proteina), ili obrnuto, pri čemu dolazi do njihovog vezanja koje pak rezultira promjenom topline Δq u sustavu [36]. U slučaju kad se toplina oslobađa govorimo o egzotermnoj reakciji, a kad se apsorbira o endotermnoj [37].

U mikrokolorimetru se nalaze dvije ćelije, od kojih jedna sadrži vodu i djeluje kao referentna ćelija, a druga koja sadrži jako razrijeđen uzorak, radna ili reakcijska ćelija (slika 10). Uz ćelije se nalaze grijači kojima se razlika temperatura u ćelijama nastoji svesti na najmanju moguću vrijednost. Kada uslijed reakcije dođe do promjene temperature u

reakcijskoj ćeliji senzor daje povratnu informaciju grijačima koji kompenziraju nastalu razliku. Kada je reakcija egzotermna, potrebno je zagrijati referentnu ćeliju kako bi se temperature u ćelijama izjednačile. Navedeni postupak daje silazni signal koji traje dok se ne kompenzira razlika u temperaturama nastala zbog povećanja topline u reakcijskoj ćeliji. Za razliku od egzotermnih, endotermne reakcije daju uzlazni signal [38].



Slika 10. Shematski prikaz instrumenta za izotermalnu titracijsku kalorimetriju. Preuzeto iz literature i preuređeno [39].

Promjena topline (dq/dt) u ćelijama može se prikazati preko snage (P) grijalica koje se uz njih nalaze, a razlika snaga utrošenih na grijalicama uz reakcijsku i kompenzacijsku ćeliju odgovara entalpiji reakcije (jednadžba 3). Ukupna promjena entalpije, odnosno toplina koja se oslobađa ili troši tijekom kalorimetrijske reakcije (od vremena t_1 do t_2) dobiva se integriranjem izraza 3 po vremenu (jednadžba 4). Promjena topline proporcionalna je udjelu koncentracije proteina s vezanim ligandom, a povećana koncentracija liganda dovodi do zasićenja receptora i na kraju se oslobađa ili troši manje topline.

$$\frac{dq_{reakc}}{dt} - \frac{dq_{ref}}{dt} = P_{reakc} - P_{ref} \quad (3)$$

$$\Delta H = \int_{t_1}^{t_2} P_{reakc}(t) - P_{ref}(t) dt \quad (4)$$

Entalpija zatvorenog sustava kakav predstavlja reakcijska ćelija, može se pisati kao funkcija triju varijabli [40]:

$$H = H(p, T, \xi), \quad (5)$$

pri čemu se p odnosi na tlak, T na temperaturu, a ξ na molekularnu organizaciju sistema (odnosno udio tvari koja se tijekom reakcije transformira). Pri izobarnim uvjetima, totalni diferencijal te funkcije može se prikazati jednadžbom:

$$dH_p = dq = \left(\frac{\partial H}{\partial T}\right)_{p,\xi} dT + \left(\frac{\partial H}{\partial \xi}\right)_{p,T} d\xi \quad (6)$$

$\left(\frac{\partial H}{\partial T}\right)_{p,\xi}$ je izobarni toplinski kapacitet C_p otopine u ćeliji, a derivacija entalpije zbog promjene organizacije u molekularnom sustavu, $\frac{\partial H}{\partial \xi}$, odgovara reakcijskoj entalpiji $\Delta_r H$.

Deriviranjem jednadžbe (6) po vremenu dobivamo jednadžbu kojom se opisuje rad kalorimetra zatvorenog tipa:

$$\frac{dq}{dt} = C_p \frac{dT(t)}{dt} + \Delta_r H^0 \frac{d\xi}{dt} \quad (7)$$

gdje $\frac{dq}{dt}$ opisuje dinamiku promjene topline u reakcijskoj ćeliji, $C_p \frac{dT(t)}{dt}$ opisuje dinamiku promjene temperature u sustavu, a $\Delta_r H^0 \frac{d\xi}{dt}$ termokinetiku promatrane reakcije ($\frac{d\xi}{dt}$ je udio proteina, u molima, za koji se vezao ligand u jedinici vremena).

Budući da ćelija sadrži jako razrijeđenu otopinu reaktanta u n_l mola otapala, C_p smjese može se aproksimirati s toplinskim kapacitetom otapala $n_l C_{pl}^*$, pri čemu je C_{pl}^* molarni izobarni toplinski kapacitet otapala l . Dakle, može se pisati $C_p \frac{dT(t)}{dt} = n_l \cdot C_{pl}^* \frac{dT(t)}{dt}$.

Pomoću izotermalnog kalorimetra može se pored reakcijske entalpije $\Delta_r H^0$ odrediti konstanta vezanja (K_a) odnosno disocijacije ($K_d = 1/K_a$), entropija (ΔS) i stehiometrija reakcije (N). Time se dobiva potpuni termodinamički profil molekularne

interakcije. Vrijednost konstante disocijacije ($K_d = 1/ K_a$) određuje se indirektno, analizom krivulje koja prikazuje kako se količina oslobođene topline tijekom titracije mijenja s koncentracijom liganda. Iz K_d izračunava se promjena slobodne energije vezanja, ΔG ($K_d = e^{-\frac{\Delta G}{k_B T}}$ odnosno $K_d^{mol} = e^{-\frac{\Delta G^0}{RT}}$, gdje je ΔG^0 slobodna energija vezanja određena za nastanak 1 mola kompleksa). Promjena standardne entropije vezanja tada se može dobiti iz jednadžbe:

$$\Delta S^0 = -\frac{\Delta G^0 - \Delta H^0}{T} \quad (8)$$

gdje ΔH^0 označava standardnu entalpiju vezanja jednaku oslobođenoj toplini kada je jedan mol proteina vezan na jedan mol liganda. Promjenu reakcijske entalpije može se direktno povezati s brzinom kemijske reakcije, v_R ($\frac{mol}{dm^3 s}$):

$$\Delta_r H^0 \frac{d\xi}{dt} = \Delta_r H^0 v_R V \quad (9)$$

V je volumen ćelije u dm^3 .

Izraz na lijevoj strani gornje jednadžbe odgovara toplinskoj snazi, P_r .

$$P_r = \frac{dH_p}{dt} = \Delta_r H^0 \frac{d\xi}{dt} = \Delta_r H^0 v_R V \quad (10)$$

Iz gore navedenog vidi se da je izotermalna titracijska kalorimetrija pogodna metoda za mjerenje kinetičkih parametara.

2.3. Pregled korištenih računalnih metoda

Računalna kemija je područje istraživanja utemeljeno na kvantnoj kemiji [41] i usko je povezana s razvojem računala. Računalna kemija pruža mogućnost računanja i predviđanja niza svojstava molekula kao što su struktura, fleksibilnost, polarnost, itd. Metodama računalne kemije mogu se pratiti kemijske reakcije, kovalentno i ne-kovalentno udruživanje molekula, te simulirati njihovo ponašanje u prirodnom okruženju. Ovisno o veličini sustava i svojstvima koja se žele istražiti koriste se metode molekulskog modeliranja različitog stupnja složenosti, a dijele se na: empirijske (metode molekulske mehanike (MM) i molekulske

dinamike (MD), Monte Carlo metode, metode uklapanja itd.), semiempirijske i kvantno mehaničke (QM). Počevši od kraja dvadesetog stoljeća sve se više radi na razvoju višeskalarnih metoda molekuskog modeliranja od kojih su vjerojatno najpoznatije metode koje kombiniraju kvantnu i molekulsku mehaniku, hibridne QM/MM metode [42, 43].

2.3.1. Molekulska mehanika

Molekulska mehanika (MM) je empirijska metoda u kojoj se zanemaruje subatomska struktura molekula. Ukupna potencijalna (konformacijska) energija sustava ovisi o položajima atoma i dana je jednadžbom (11) ili nekom njezinom složenijom inačicom, ovisno o polju sila i složenosti sustava koji se promatra. Osnovni doprinosi potencijalnoj energiji sustava (vidi jednadžbu 11) su članovi koji opisuju vezne interakcije, odstupanja od ravnotežnih vrijednosti za duljine veza, i valentnih i torzijskih kuteva, te nevezne, elektrostatske i van der Waalove interakcije. Svaki od tih doprinosa dan je matematičkom funkcijom koja približno opisuje stvarnu ovisnost energije o promjeni određene varijable i ovisi o parametrima [44, 45] koji su svojstveni polju sila unutar kojega se sistem promatra, a dijele se na strukturne parametre i parametre sila.

$$U_{ukupno} = \sum_i U_i^{veza} + \sum_j U_j^{valentni\ kut.} + \sum_k U_k^{torzijski\ kut.veza} + \sum_{n,m} U^{vdw} + \sum_{n,m} U^{ele} \quad (11)$$

U prikazanoj jednadžbi i se odnosi na kovalentne veze u sustavu, j na valentne kuteve, a k na torzijske kuteve. Indeksi n i m označavaju međudjelovanje atoma u sustavu čija interakcija nije opisana s predhodna tri vezna člana, a odnose se na van der Waalove i elektrostatske interakcije.

Članovi koji opisuju odstupanje kovalentnih veza i valentnih kuteva od ravnotežnih vrijednosti najčešće su dani u obliku harmoničke funkcije (jednadžba 12):

$$U(r) = \sum_{veze} k(r_i - r_{0,i})^2 \quad (12)$$

gdje je k konstanta sile, r_i duljina kovalentne veze i , a $r_{0,i}$ idealna duljina te veze.

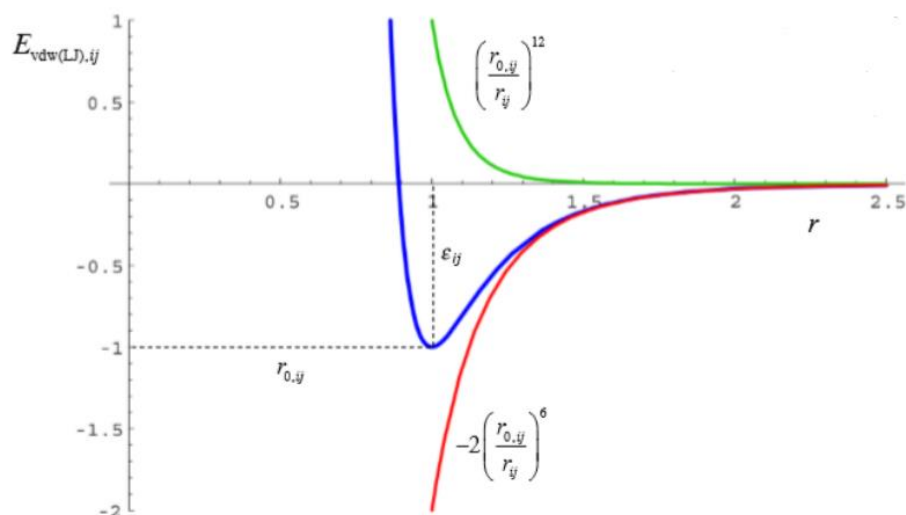
U velikim biomakromolekularnim sustavima najviše računalnog vremena troši se upravo na izračunavanje neveznih interakcija, pa se one nastoje opisati što jednostavnijim funkcijama. Tako se van der Waalsov član najčešće prikazuje u obliku Lennard – Jonesovog (LJ) izraza za potencijalnu energiju dvaju električki neutralnih atoma (jednadžba 13).

$$U(r) = \frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^6} \quad (13)$$

gdje je prvi član, $(1/r)^{12}$ posljedica odbojne sile među atomima, a drugi, $(1/r)^6$ privlačne sile. A i B su konstante specifične za promatrane atome i polje sila unutar koga se račun provodi, odnosno ukoliko A i B izrazimo kao funkcije $r_{0,ij}$ (udaljenost minimuma krivulje za potencijalnu energiju para LJ čestica od ishodišta koordinatnog sustava) i $\epsilon_{i,j}$ (minimuma energije), van der Waalsov član možemo napisati u obliku:

$$E_{vdw,(LJ)ij} = \sum_j \sum_j \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{r_{0,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_{0,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (14)$$

gdje je r_{ij} udaljenost atoma i i j , $r_{0,ij}$ referentna tj. 'idealna' van der Waalsova udaljenost atoma i i j približno jednaka zbroju van der Waalsovih radijusa, a konstanta $\epsilon_{i,j} = (\epsilon_{i,i} + \epsilon_{j,j})^{1/2}$.



Slika 11. Grafički prikaz ovisnosti energije van der Waalsove interakcije atoma i i j ($E_{\text{vdw(LJ)},ij}$), opisane Lennard – Jonesovim izrazom, o njihovoj međusobnoj udaljenosti r . Krivulja (plava) koja prikazuje LJ potencijalnu energiju para neutralnih atoma siječe x-os na udaljenosti σ od ishodišta, dok je $r_{0,ij}$ točka minimuma energija van der Waalsove interakcije, ϵ_{ij} .

Opisivanje elektrostatičkih interakcija u računalnoj kemiji najjednostavnije je bilo uvođenjem novih parametara tzv. parcijalnih naboja koji su suma stvarnog naboja nekog atoma i polarizacijskog naboja koji je posljedica kemijskog okruženja u kojem se atom nalazi.

Elektrostatska energija neveznog člana polja sile računa se kao potencijalna energija dvaju točkastih naboja:

$$V(r_{12}) = \frac{q_1 q_2}{4\pi\epsilon_0 r_{12}}, \quad (15)$$

gdje su q_1 i q_2 parcijalni naboji atoma 1 i 2, ϵ_0 je dielektrična konstanta sredstva, a r_{12} udaljenost između naboja 1 i 2.

2.3.2. Molekulska dinamika

Molekulska dinamika je metoda koja nam omogućuje da zagrijavanjem molekularnog sustava pratimo promjenu njegove strukture u vremenu. Zagrijavanjem sustava koji se sastoji od N atoma od apsolutne nule do neke temperature T njegova kinetička energija raste od 0 do $N \cdot 3 \frac{k_b T}{2}$ pri čemu je k_b Boltzmanova konstanta, a T temperatura u kelvinima. Eksperimentalno

gledano, ukupna kinetička energija koju posjeduju čestice u nekom sustavu iskazuje se pomoću termodinamičke temperature. Temperatura pri kojoj čestice određene tvari imaju dovoljnu kinetičku energiju da nadvladaju privlačne sile između njih i odvoje se jedne od drugih je temperatura vrelišta tvari [42]. Ovisno o temperaturi na kojoj želimo simulirati, molekulskom sustavu se dodaje određena energija i to tako da se atomima u sustavu pridruže odgovarajuće brzine, najčešće korištenjem Maxwell-Boltzmannove raspodjele prema kojoj je vjerojatnost da će atom mase m_i imati brzinu v_i dana izrazom:

$$P(v_i) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi k_b T}} e^{-\frac{m_i v_i^2}{2k_b T}} \quad (16)$$

Energija dodana sustavu zagrijavanjem se uslijed interakcije među atomima raspodjeljuje između potencijalne i kinetičke, a gibanje atoma prati se rješavanjem jednadžbi gibanja, najčešće Newtonovih (jednadžba 17), te se u kratkim vremenskim razmacima (Δt) za svaku česticu sustava (i) računa sila F_i koja u tom trenutku na nju djeluje i brzina kojom se ona giba. Uzastopnim ponavljanjem tog postupka prati se promjena sustava, npr. oblika nekog proteina, kroz vrijeme.

$$m_i a_i = m_i \frac{\partial^2 r}{\partial t^2} = F_i = -\nabla U \quad (17)$$

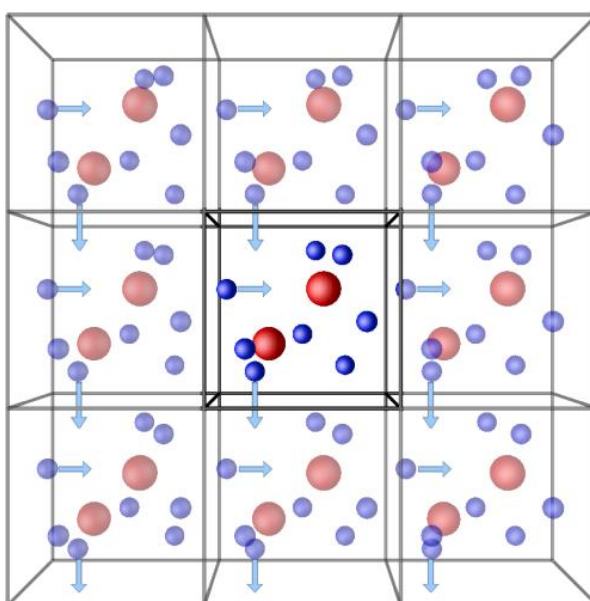
Molekulska dinamika daje nam uvid u vremenski ovisna događanja na nivou atoma i koristi se za modeliranje širokog spektra sustava.

Kako bi molekule proučavali u uvjetima što bližim realnim, simulacije se mogu provoditi na tri načina. Metode koje eksplicitno uzimaju u obzir pojedine molekule otapala oko otopljene vrste (metode eksplicitnog otapala), metode koje otapalo tretiraju kao kontinuum (implicitno otapalo) i metode u kojima se ta dva pristupa kombiniraju. Prisutnost otapala može promijeniti položaj kemijske ravnoteže promatranog sustava, ovisno o tome koju formu više stabilizira, što ovisi o polarnosti otopljene tvari i otapala, a što pak može utjecati na brzinu kemijskih reakcija.

Postupak otapanja molekula, odnosno kompleksa, provodi se smještanjem u kutiju, obično oblika krnjeg oktaedra, ispunjenu molekulama otapala. U slučaju bioloških makromolekula kao otapalo se najčešće koristi voda. Sustav se može i neutralizirati

dodavanjem protuiona (obično iona Na^+ ili Cl^-). Često korišteni modeli molekula vode su TIPnP (eng. *transferable intermolecular potential with n points*), gdje n označava broj točkastih naboja u molekuli pridruženih položajima kisika i vodika u molekuli vode, uz varijacije duljine veza i kuta među atomima [46].

Kako bi se izbjegli neželjeni rubni efekti koriste se periodični rubni uvjeti (engl. *periodic boundary condition*, PBC), pri čemu se simulirani sustav smatra jediničnom ćelijom trodimenzionalne rešetke [47]. Ako tijekom simulacije čestica (atom) izađe iz osnovne simulacijske kutije, njezina periodička slika tzv. „imaginarna“ čestica, će je zamijeniti.



Slika 12. Shematski prikaz sustava koji se simulira korištenjem periodičkih rubnih uvjeta, u slučaju kad čestica izađe iz simulacijske ćelije (u središnjem dijelu skice) njezina slika iz susjedne ćelije ulazi i postane realnom. Tako broj čestica u simulacijskoj ćeliji ostaje sačuvan. Preuzeto iz literature [48].

Kako bi se osigurali odgovarajući termodinamički uvjeti, kao što su konstantnost prosječne temperature i gustoća sustava (otapala), a time i tlak, koriste se regulatori temperature i tlaka (termostati i barostati) [49]. Na taj način postižu se uvjeti koji odgovaraju izobarno-izotermnom ansamblu (konstantni broj čestica N , konstantni tlak, P i temperatura, T), a koji su ujedno najbliži eksperimentalnim u slučaju kad se ovi provode u termostatiranim uvjetima i pri konstantnom, najčešće atmosferskom tlaku.

U simulacijama MD vremenski korak ograničen je trajanjem najbržeg gibanja u sustavu. Kod makromolekula to je u pravilu vibracija C-H veze čije je trajanje približno 10^{-14} sekundi, pa se u simulacijama koriste za red veličine manji vremenski koraci (1 fs). Uvođenje restrikcija na vibracije C-H veza omogućuje povećanje vremenskog koraka 2-5 puta. Algoritmi koji se najčešće koriste za restrikciju navedenih kovalentnih veza tijekom simulacije makromolekula su SHAKE i LINCS [50].

2.3.3. Kvantno mehaničke metode

Kvantno mehaničke metode (QM) omogućuju proučavanje molekularnih sustava na subatomske nivou, što zbog dodatnih stupnjeva slobode značajno povećava vrijeme potrebno za provođenje računa. Gotovo uvijek se koriste za modeliranje manjih molekula ili molekulskih sustava, uglavnom do nekoliko stotina atoma. Korištenjem kvantno mehaničkih metoda možemo proučavati elektronska stanja pojedinih molekula, osnovna i pobuđena, kemijske i enzimske reakcije, spektroskopska svojstva molekula te utjecaj vanjskih uvjeta, kao što su npr. promjena elektromagnetskog polja u kome se nalaze i utjecaj elektromagnetskog zračenja na ta svojstva [51]. Polazna točka za kvantno mehaničke račune je Schrödingerova jednačba koja u svom vremenski ovisnom obliku glasi:

$$\hat{H}\Psi(\mathbf{r},t) = -i\hbar\frac{\partial\Psi(\mathbf{r},t)}{\partial t} \quad (18)$$

\hat{H} je Hamiltonov operator ukupne energije, $\Psi(\mathbf{r},t)$ je ukupna valna funkcija sustava, \hbar reducirana Planckova konstanta ($\hbar=h/2\pi$), a masu kvantne (subatomske) čestice označavaju koordinate u prostoru i vremenu \vec{r} i t .

$\Psi(\mathbf{r},t)$ možemo napisati kao produkt dviju valnih funkcija pri čemu jedna ovisi samo o prostornim koordinatama, a druga samo o vremenu, $\Psi(\mathbf{r})$ i $\Psi(t)$. Vremenski neovisna Schrödingerova jednačba može se napisati kao:

$$\left\{ -\frac{\hbar^2}{2m}\nabla^2 + V \right\} \Psi(\mathbf{r}) = E\Psi(\mathbf{r}) \quad (19)$$

gdje je \hbar reducirana Planckova konstanta ($\hbar=h/2\pi$), m je masa elektrona, odnosno jezgre, ∇^2 je Laplaceov operator, a $\Psi(\mathbf{r})$ je ukupna valna funkcija sustava.

Schrödingerova jednačica egzaktno je rješiva samo za nekoliko jednostavnih problema poput čestice u kutiji, harmonijskog titrala ili vodikovog atoma. Kako bi mogli proučavati kvantno mehanička svojstva većih sustava uvodi se niz raznih aproksimacija, a jedna od najčešće korištenih kod proučavanja molekularnih sustava je Born-Oppenheimerova aproksimacija koja omogućuje odjeljivanje gibanja elektrona od gibanja jezgri. Primjenom Born-Oppenheimerove aproksimacije ukupna valna funkcija rastavlja se na nuklearnu i elektronsku valnu funkciju, što je opravdano činjenicom da jezgre atoma imaju puno veću masu od elektrona pa su time bitno tromije od elektrona, tj. elektroni se gotovo trenutačno prilagođavaju novom rasporedu jezgara. Dakle predmet računa je elektronska valna funkcija za dani raspored jezgri, pri čemu je Hamiltonijan dan izrazom: \vec{r}_i

$$H = -\frac{\hbar}{2m_e} \sum_i \nabla_i^2 - \sum_i \sum_\alpha \frac{Z_\alpha e^2}{4\pi\epsilon_0 |\vec{r}_i - \vec{r}_\alpha|} + \frac{1}{2} \sum_i \sum_{j \neq i} \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 |\vec{r}_i - \vec{r}_j|} \quad (20)$$

Elektronska valna funkcija određuje se metodom varijacije. Prema varijacijskom principu bilo koja približna valna funkcija, Φ , dati će višu energiju od 'prave' energije sustava. Približna valna funkcija dobije se linearnom kombinacijom osnovnih funkcija.

Slijedi optimizacija koeficijenata s ciljem minimiziranja energije koja je rezultat uvrštavanja približne valne funkcije u Schrödingerovu jednačicu i njenim rješavanjem. Tako dobivena približna valna funkcija najbolji je opis sistema uz upotrijebljeni skup osnovnih funkcija.

Jedna od najstarijih i najpoznatijih *ab initio* metoda jest Hatree-Fock (HF), koja je nastala razvojem teorije molekularskih orbitala. HF je aproksimativna metoda za utvrđivanje valne funkcije sustava s više elektrona, pri čemu se elektroni koji međusobno ne interagiraju promatraju u srednjem polju ostalih elektrona i jezgri, a ukupna valna funkcija dana je kao produkt jednoelektronskih valnih funkcija. Jednoelektronske valne funkcije koje opisuju položaj u prostoru i spin elektrona (α odnosno β) nazivamo spinorbitalama, npr. spinorbitala za elektron i u točki prostora r_i sa spinom α je: [52]

$$\chi(r_i, \omega) = \psi(r_i)\alpha(\omega) \quad (21)$$

U svrhu smanjenja računalnog vremena atomske orbitale se zamjenjuju jednostavnijim funkcijama koje nazivamo osnovnim skupom:

$$\psi_i = \sum_{\mu=1}^K c_{\mu i} \varphi_i \quad (22)$$

Kao osnovne funkcije koriste se tzv. Slaterove orbitale (STO) i Gaussove orbitale (GTO). Suma nekoliko GTO vrlo dobro aproksimira STO, a zbog svojih matematičkih svojstava znatno pojednostavljaju račun, pa se zato u praksi najčešće koriste.

Za razliku od *ab initio* metoda kvantne mehanike čiji je cilj odrediti elektronsku valnu funkciju sustava, metoda funkcionala gustoće (eng. *density functional theory*, DFT) bavi se elektroskom gustoćom ($\rho(\mathbf{r})$), a temelji se na Hohenberg-Kohnovom teoremu prema kojem je energija osnovnog stanja promatranog sustava u potpunosti određena elektronskom gustoćom. Cilj te metode je pronaći funkcional koji najbolje opisuje ovisnost energije sustava o elektronskoj gustoći. DFT metoda je s obzirom na računalno vrijeme koje zahtijeva usporediva s Hartree-Fock metodom, a rezultati koje daje bolji su jer u obzir uzima i elektronsku korelaciju. DFT metode razlikuju se po tome koji se funkcional koristi za izračun energije izmjene, a koji za energiju korelacije. U izradi ove doktorske disertacije korišten je funkcional B3LYP. Navedeni B3LYP funkcional predstavlja kombinaciju Becketovog funkcionala izmjene iz 1988. god. (označeno B) i Lee, Yang i Parr korelacijskog funkcionala (označeno LYP) te udjela HF funkcionala u elektronskoj izmjeni [53].

Kvantno mehanički računi mogu se izvoditi za sustav koji se nalazi u plinskoj fazi, odnosno u vakuumu ili u otapalu. U slučaju kada se računi izvode za sustav otapalo-otopljena tvar, zbog jednostavnosti računa otapalo se promatra kao polarizabilni kontinuum (eng. *Polarisable Continuum Model*, PCM), tj. zanemaruju se eksplicitne molekule otapala. Najčešće se koristi model D-PCM (eng. *Dielectric PCM*) koji otapalo opisuje kao polarizabilni dielektrik ili C-PCM (eng. *Conductor-like PCM*) koji otapalo opisuje kao sredstvo konstantne permitivnosti ϵ .

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Kemikalije:

amonijev peroksid, glicerol, glicin, imidazol, izopropil- β -D-1-tiogalakto-piranozid (IPTG), kanamicin, LB medij, metanol, mlijeko u prahu, natrijev dodecilsulfat (SDS), natrijev kakodilat, natrijev klorid, Ni-NTA agarozno punilo, *N,N,N',N'* - tetrametiletildiamin (TEMED), octena kiselina, otopina akrilamida/bisakrilamida 29:1 i tris baza (Carl Roth); amonijev acetat, amonijev persulfat (APS), β -merkaptioetanol, bromfenol plavo, Fast Blue BN sol (FBB), MOPS, piridin-2,6-dikarboksilna kiselina (DPA) i Tween 20 (Sigma-Aldrich); Arg2-2-naftilamid (Arg-Arg-2NA), (Bachem); PhastGel Blue R tablete (Pharmacia); EDTA (Kemika); 2-naftilamin (2-NA), 2-merkaptioetanol, standardne otopine nitrata metala (cink, bakar, kobalt, mangan) (Merck), standardi za ICP-MS (CLinCHek, Seronorm).

Stanice:

Escherichia coli, bakterijski soj: BL21-CodonPlus(DE3) – RIL (Stratagene)

Enzimi:

Lizozim iz bjelanjka (Carl Roth)

Nukleaze: DNazaI iz goveđe gušterače (Merck)

TEV proteaza (pročišćena u LBPM, IRB)

Komercijalni setovi:

Amersham ECL Prime Western Blot Detection reagens

CLinCHek, Seronorm (za ICP-MS)

QuikChange II XL Site-directed mutagenesis (Agilent);

Plazmidni vektori:

pET28MHL-hDPP3 s genom za ekspresiju divljeg tipa hDPP III (1-726 aminokiselina prema UniProt sekvenci Q9NY33) uz dodatni N-terminalni slijed MHHHHHHSSGRENLYFQ/G, gdje je HHHHHH N-terminalni His-tag afinitetni privjesak a ENLYFQ/G mjesto prepoznavanja TEV proteaze koja cijepa na mjestu označenom / (originalni plazmid je dar Karla Grubera)

plazmid pDZ2087 iz repozitorija addgene, za ekspresiju TEV proteaze (originalno iz laboratorija Davida Waugh)

Instumenti i aparature:

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

ITC: PEAQ-ITC (MicroCal)

Spektrofotometar: BioDrop Duo (Biochrom)

Fluorimetar: Cary Eclipse Fluorescence (Agilent Technologies)

Sustav za kromatografiju proteina: FPLC Äkta (Pharmacia)

Termomikser: Eppendorf Thermomixer R (Thermo Scientific)

Centrifuge: Sorvall RC-5B (Sorvall), Eppendorf 5415 R (Eppendorf), Hettich Universal 320 R (Hettich)

Sonikator Labsonic M (B. Braun Biotech International)

Koncentratori: Amicon-Ultra 15 (30000 MWCO, Merck Millipore Ltd.)

Filtri: 0,22 i 0,45 µm (Carl Roth)

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

Peristaltička pumpa P-1 (GE Healthcare)

Vrtložna miješalica Mini shaker (Fisher Scientific)

Vodena kupelj Labortechnik (Köttermann)

Elektroporator Gene Pulser XCell (Biorad)

Tresilica Innova™ 44 Incubator Shaker (Eppendorf)

Kolona HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade (GE Healthcare)

Instrument za spektroskopiju zaustavljenog protoka (SX20 spektrometar zaustavljenog protoka Applied Photophysics)

ICP-MS instrument Agilent 8800 (Agilent Technologies)

Programi:

PyMol, Graph Pad Prism 5.0, Gaussian, moduli programskog paketa AMBER16/20 (sander, pmemd.cuda, MMPBSA, cpptraj), ImageJ, ProData Viewer, Microcal PEAQ - ITC.

3.2. Eksperimentalne metode

3.2.1. Transformacija bakterijskih stanica

Transformacija bakterija s plazmidom izvedena je elektro-transformacijom 50 μL elektro-kompetentnih stanica *E. coli*, soja BL21-CodonPlus(DE3)-RIL+. U stanice je dodan 1 μL plazmida pET28MHL-hDPP III. Cijeli sadržaj je prenesen u sterilnu ohlađenu kivetu za elektroporaciju. Elektroporacija je izvedena u elektroporatoru primjenom napona od 2500 V u trajanju od oko 5 ms. Nakon uspješne elektroporacije u kivetu je dodan 1 mL Luria Bertani (LB) medija zagrijanog na 37 °C i suspenzija je inkubirana u termobloku 1h na 37 °C i 300 okretaja u minuti (rpm). LB medij sastoji se od smjese 10 g L⁻¹ triptona, 5 g L⁻¹ NaCl te 5 g L⁻¹ ekstrakta kvasca u destiliranoj vodi. Medij je steriliziran 20 minuta pri temperaturi od 121°C i tlaku od 1 bar te ohlađen prije uporabe. Nakon inkubacije sadržaj je nanesen na krute hranjive podloge (LB medij s 1,5% agara) s kanamicinom za selekciju, konačne koncentracije 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Podloga s nanesenim bakterijama je potom inkubirana na 37 °C preko noći. Nakon uspješne transformacije stanice su sutradan spremne za ekspresiju.

3.2.2. Ekspresija proteina

Kolonije s pripremljene hranjive podloge su sterilnim štapićem prenesene u LB/kanamicinski tekući medij i inkubirane preko noći na 37 °C i 250 okretaja u minuti (rpm). Tako inkubirane kulture korištene su za ekspresiju. 10 mL prekonocne kulture dodano je u 500 mL tekućeg LB medija, u tikvama s dodanim kanamicinom (konačne koncentracije 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Ekspresijske kulture su uzgajane u tresilici na 37 °C i 250 rpm, te praćene spektrofotometrijski do vrijednosti optičke gustoće (OD, eng. *optical density*) između 0,6 i 0,8, pri 600 nm. Nakon hlađenja na 20 °C tijekom 30 minuta, ekspresija proteina je inducirana dodatkom IPTG u konačnoj koncentraciji od 0,25 mM. Ekspresija je nastavljena tijekom narednih 20 h na 18 °C i 130 rpm. Završetkom ekspresije uslijedilo je centrifugiranje kultura pri 4 °C na 3354 $\times g$ tijekom 20 minuta čime su bakterijske stanice odvojene od medija u obliku taloga, te pripremljene za pročišćavanje.

3.2.3. Razaranje stanica (liza stanica)

Bakterijski talog resuspendiran je na ledu u 5 puta većem volumenu pufera za lizu (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM imidazola, pH 8,0), potom mu je dodan lizozim konačne

koncentracije 1 mg mL^{-1} . Smjesa je sonicirana $3 \times 2 \text{ min}$ uz 60 % amplitudu i 2 s pulsiranje, kako bi se razbile bakterijske stanice. Kako bi se razgradila DNA iz razorenih stanica, pripremljenom lizatu je dodana DNaza konačne koncentracije $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ i otopina je inkubirana na sobnoj temperaturi uz miješanje na miješalici 20 min. Lizat je potom centrifugiran 45 min na $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ i $14500 \times g$ kako bi se odvojili topljivi proteini od precipitata staničnih ostataka. Izbistreni lizat je potom profiltriran kroz filter s porama promjera $0,45 \text{ } \mu\text{m}$ i pohranjen za pročišćavanje na koloni.

3.2.4. Pročišćavanje proteina

Dobiveni rekombinantni protein ima histidinski privjesak na N-kraju, te je pročišćen korištenjem dviju kromatografskih metoda: afinitetne kromatografije i gel-filtracije. Nakon svake kromatografske metode, čistoća proteina provjerena je elektroforezom na poliakrilamidnom gelu i određivanjem enzimske aktivnosti standardnim testom.

3.2.5. Afinitetna kromatografija

Pročišćavanje proteina započelo je afinitetnom kromatografijom na koloni sa Ni-NTA agarozom. Korišten je volumen kolone 6 mL za oko 50 mL lizata bakterijskih stanica. Lizat je nanesen na Ni-NTA kolonu, koja je predhodno ekvilibrirana u puferu za lizu (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM imidazola, pH 8,0), pri brzini protoka od $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ reguliranoj peristaltičkom pumpom, nakon čega je uslijedila elucija pri brzini protoka pufera za ispiranje (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 20 mM imidazola, pH 8,0) od $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, a dobiveni proteini su eluirani u puferu sa smanjenim udjelom soli (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 300 mM imidazola, pH 8,0). Sve frakcije su skupljane u epruvete po 1 mL, a koncentracija proteina određena mjerenjem apsorbancije proteina na 280 nm, pri ekstincijskom koeficijentu, $\epsilon = 1,226 \text{ L g}^{-1}$ (prema ProtParam); 83,7 kDa, na mikrovolumnom spektrofotometru BioDrop. Sakupljene proteinske frakcije su analizirane pomoću SDS-PAGE, na 10 %-tnom gelu na aparaturi za elektroforezu.

3.2.6. Gel-filtracija

His privjesak s N-kraja hDPP III uklonjen je dodatkom TEV proteaze konačne koncentracije $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ i sve dijalizirano preko noći u puferu za digestiju (200 mM Tris-HCl, 2,5 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 8,0). Reakcijska smjesa je inkubirana 20 h na $4 \text{ } ^\circ\text{C}$. Daljnje

pročišćavanje provedeno je gel-filtracijskom kromatografijom na FPLC Åkta protein-kromatografskom sustavu (Pharmacia), korištenjem kolone Superdex S200 16/60. Kolona je uravnotežena i ispirana Tris puferom (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,4) u kojem su zatim eluirane frakcije i skupljane u epruvete po 2 mL, protokom kolone 0,7 mL min⁻¹ i pri 4 °C. Sakupljene proteinske frakcije su ponovo analizirane na poliakrilamidnom gelu i alikvoti proteina pohranjeni su na -80 °C.

3.2.7. Analiza proteina elektroforezom

Gel kojim se analizira čistoća pročišćenih proteina sastoji se od dva dijela: gela za sabijanje i gela za razdvajanje. Prilikom nanošenja uzoraka na gel uzorci su denaturirani te im je dodana boja. Naneseni uzorak je sadržavao 10 mg mL⁻¹ frakcije uzorka dobivenog pročišćavanjem, 10 µL 2× tretirajućeg pufera (engl. *treatment buffer*) (0,125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol, 2% β-merkaptetanol, 0,03 mM bromfenol plavo) te nadopunjen s mQ vodom do volumena 20 µL. Potom su uzorci denaturirani inkubacijom u termobloku na 96°C, 10 minuta. Nakon što su se ohladili, cijeli volumen pripremljenog uzorka nanesen je na gel pomoću automatske pipete. Sustav za elektroforezu spojen je na izvor struje što proteinima omogućuje migraciju unutar električnog polja. Početni napon iznosio je 120 V, a nakon što bi uzorci ušli u gel za razdvajanje napon je povećan na 180 V. Nakon što bi boja migrirala do kraja gela, gel se prebacivao u kadnicu za bojenje. Gel je bojan bojom Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) (pripremljenom iz PhastGel Blue R tablete) u vodenoj kupelji pri 50°C, 10 min, te je potom ispiran vodom i stavljan u plastičnu kadnicu s odbojivačem (MeOH (v/v=30%), HAc (v/v =10%), H₂O (v/v =60%)) na temperaturi 50°C, na oko 30 min. Nakon odbojavanja gela, vizualno je utvrđen položaj vrpce i određena je uspješnost pročišćavanja proteina.

3.2.8. Analiza enzimske aktivnosti

Testiranje enzimske aktivnosti hDPP III bazira se na nastanku 2-naftilamina (2NA) nakon djelovanja enzima hDPP III na supstrat Arg₂-2NA. 2NA se detektira spektrofotometrijski nakon reakcije diazokopulacije sa Fast Blue B (FBB) soli pri čemu dolazi do razvijanja ružičaste boje. Aktivnost je mjerena u reakcijskoj smjesi volumena 1 mL, u puferu 0,1 M Tris, pH 8,6. Reakcijska smjesa (koja je sadržavala protein, pufer i mQ vodu) inkubirana je 2 min na 37 °C, a potom je dodano 50 µL supstrata Arg₂-2NA, čime je započeta reakcija.

Prekidanje reakcije, nakon 15 min, postiže se dodatkom 200 μL otopine FBB soli. Aktivnost je određena nakon 15 min inkubacije na sobnoj temperaturi, očitanjem apsorbancije pri 530 nm na BioDropu i računom prema jednadžbi:

$$\text{Aktivnost} = \frac{A_{530}V(\text{mL})}{t(\text{min})c(\text{mg mL}^{-1})} \quad (23)$$

3.2.9. Odsoljavanje i ugušćivanje proteina

Za odsoljavanje proteina korištena je PD-10 kolona (GE Healthcare). Kolona je prvo isprana s 25 mL vode, a potom uravnotežena s 25 mL pufera (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,5). Nakon što bi iz kolone izašao sav pufer nanošeno je po 2,5 mL uzorka proteina. Kada bi volumen proteina ušao u kolonu dodavano je 3,5 mL pufera za odsoljavanje. Potom se skupljala frakcija proteina i određivala koncentracija proteina na uređaju BioDrop.

Ugušćivanje proteina provedeno je na Amicon Ultra 15 (30 MWCO) koncentratoru koji sadrži membranu koja propušta molekule manje od 30 kDa, te je preko nje moguće ugušćivanje željenog proteina. Epruvete su prvo ispirane puferom u kojem se nalaze proteini, uz centrifugiranje na 2800 $\times g$ pri 4 °C u trajanju od 10 min. Potom su se epruvete praznile i u njih se dodavao protein te opet centrifugirao na 2800 $\times g$ pri 4 °C. Postupak se ponavljao sve do željenog volumena.

3.2.10. Priprema apo hDPP III

Protein bez metala (apo protein) pripremljen je iz divljeg tipa (DT) hDPP III. DT hDPP III je dijaliziran u crijevima za dijalizu (10 MWCO) 24 sata na sobnoj temperaturi u puferu sastava 25 mM amonijevog acetata, 10 mM etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA), 1 mM dipikolinske kiseline (DPA), pH 7,4. Uklanjanje viška EDTA i DPA provedeno je sekvencijalnim ispiranjem s 25 mM amonijevim acetatom, pH 7,4 u Amicon Ultra 15 (30 MWCO) kolonama u centrifugi na 4 °C i 2800 $\times g$. Pripremljeni apo protein pohranjen je na --80 °C.

3.2.11. Priprema holo proteina

Apo protein (približno 6 μM protein) inkubiran je 1 h s otopinama metalnih nitrata Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} i Mn^{2+} u 25 mM amonijevom acetatnom puferu, pH 7,4, nakon čega je višak metala

odmah uklonjen ispiranjem istim puferom na Amicon Ultra 15 (30 MWCO) kolonama. Konačne koncentracije proteinskog uzorka određene su mjerenjem na BioDropu i razrijeđene do masene koncentracije od 0,05 mg mL⁻¹ u istom acetatnom puferu. Pripremljeni uzorci holo proteina dalje su korišteni za ICP-MS mjerenja.

3.2.12. Usmjereni mutageni

Usmjereni mutageni provedeni su koristeći komplet QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit prema uputama proizvođača. Početnice koje sadrže željenu mutaciju (tablica 1) su otopljene u sterilnoj mili Q vodi do koncentracije 100 µM i pohranjene na -20 °C do upotrebe. Sekvence mutagenih početnica, s izmijenjenim bazama malim slovima i podcrtanim izmijenjenim kodonima navedene su u tablici 1.

Tablica 1. Početnice korištene za pripremu mutanata hDPP III

hDPP III_H455Y_F	CACGAGCTGCTGGGTtAtGGCTCCGGCAAACCTG
hDPP III_H455Y_R	CAGTTTGCCGGAGCCaTaACCCAGCAGCTCGTG
hDPP III_H568Y_F	CAACTGGCGCCAAGCCtAtATGCAGGCCCGTTTCG
hDPP III_H568Y_R	CGAAACGGGCCTGCATaTaGGCTTGGCGCCAGTTG
hDPP III_E316A_F	GTCTTACATTGGTTTCATCGcgTCTTACCGTGATCCTTTCG
hDPP III_E316A_R	CGAAAGGATCACGGTAAGAcgCGATGAAACCAATGTAAGAC
hDPP III_E508D_F	CGAGTCTCTACGAGGAtTGTCGTGCAGAGTCTG
hDPP III_E508D_R	CAGACTCTGCACGACAaTCCTCGTAGGAGCTCG

Sekvenca pune duljine gena mutanata određena je sekvenciranjem (Macrogen Europe). Proteini su eksprimirani i pročišćeni korištenjem istog protokola kao i divlji tip.

3.2.13. Imunotestovi (western blot)

Kako bi se potvrdilo da je uklanjanje His privjeska iz hDPP III uspješno obavljeno provedene su western blot analize uzoraka proteina. Jedan do dva mikrograma proteina nanoseno je na 12% gel i provedena je SDS-PAGE elektroforeza [54], a prijenos na PVDF membranu izveden je prema Towbinu [55, 56], koristeći Bio-Rad Mini-Protean Tetra Cell i Mini Trans-Blot sustav. Membrana je obojena amido crnilom i blokirana puferom za blokiranje (5% (w/v) mlijeko u prahu u 20 mM Tris-HCl puferu sa 150 mM NaCl i 0,1% (v/v) Tween 20, pH 7,5). Za detekciju je korištena otopina razrijeđenog (razrijeđenje od 1:5000) mišjeg antitijela Profinia anti-His (Biorad 620-0203) kao primarnog protutijela i razrijeđenog kozjeg anti-

mišjeg antitijela IgG (H+L) HRP-konjugata (Proteintech SA00001-1) (razrjeđenje od 1:20000) kao sekundarnog antitijela, pri čemu su antitijela razrijeđena u puferu za blokiranje. Slijedila je kemiluminiscencija provedena upotrebom Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagens-a (Cytiva) i detektirana na Alliance Q9 mini (Uvitec), s vremenom izlaganja od 30 s do 5 min. Kako bi se kvantificirale detektirane vrpce, upotrijebljena je interna kalibracijska krivulja s His privjeskom obilježenim hDPP III i TEV proteazom. Analiza je provedena pomoću programa ImageJ.

3.2.14. Spektroskopija na spektrometru zaustavljenog protoka

Krivulje tijekom hidrolize Arg-Arg-2NA u prisutnosti različitih iona metala generirane su praćenjem intenziteta fluorescencije supstrata spektroskopijom na spektrometru zaustavljenog protoka (SX20 spektrometar zaustavljenog protoka Applied Photophysics) s dvije šprice. Jedna šprica je bila napunjena hDPP III proteinom konačne koncentracije 10 nM i otopinom metalnih nitrata (cinka, bakra, kobalta ili mangana) iz bazične otopine koncentracije 15 mM i razrijeđena u puferu (40 mM Tris-HCl, pH 7,5) do konačne koncentracije 500 μ M. Druga šprica je sadržavala supstrat (200 μ M Arg-Arg-2NA). Referentna reakcija sadržavala je 200 nM protein i 200 μ M supstrat. Sva mjerenja su provedena na sobnoj temperaturi na jednoj valnoj duljini, 332 nm i 320 V.

3.2.15. Fluorimetrijsko određivanje konstante disocijacije metala

Konstanta disocijacije proteina s cinkom, bakrom i kobaltom određena je mjerenjem aktivnosti enzima s metalnim nitratima u puferu (20 mM Tris-HCl, pH 7,4), s DPA kao kelatorom. Eksperimenti su izvedeni na Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technology), koji mjeri otpuštanje fluorescentnog β -naftilamina nakon cijepanja sintetskog supstrata Arg-Arg-2NA. Svi eksperimenti izvedeni su pod istim uvjetima, na sobnoj temperaturi, korištenjem elektromagnetskog zračenja valne duljine ekstinkcije 332 nm dok je valna duljina emisije bila 420 nm, tijekom 60 s. Eksperimenti su izvođeni u volumenu od 3 mL standardne otopine metalnih nitrata s 10 nM enzima hDPP III, 0,8 mM supstrata Arg-Arg-2NA, 10 mM DPA kelatora. Za izračun koncentracije slobodnih iona metala korištene su konstante stabilnosti kompleksa metal-DPA koje se nalaze u literaturi, pri pH 7,4 za Zn^{2+} ($\beta_1 = 10^7$, $\beta_2 = 10^{13}$), Cu^{2+} ($\beta_1 = 10^{10}$, $\beta_2 = 1,99 \times 10^{16}$) [57], i za Co^{2+} ($\beta_1 = 10^7$, $\beta_2 = 3,2 \times 10^{12}$) [9], prema jednadžbama 27-29 [58]. K_d može biti izražen kao:

$$K_d = \frac{[apoP][M]_{free}}{[MP]} \quad (24)$$

gdje je [apoP] koncentracija proteina bez metala, $[M]_{free}$ koncentracija slobodnih iona metala i [MP] ravnotežna koncentracija holoproteina.

Ako je ion metala bitan za katalitičku funkciju proteina, tada se relativna aktivnost može izraziti kao:

$$\text{Relativna aktivnost} = \frac{[MP]}{[MP] + [apoP]} \quad (25)$$

Umetanjem prve jednadžbe u drugu dobijemo:

$$\text{Relativna aktivnost} = \frac{[M]_{free}}{[M]_{free} + K_d} \quad (26)$$

Prema tome, K_d se može odrediti procjenom aktivnosti proteina kao funkcije koncentracije slobodnog iona metala, koja se može izraziti jednadžbom:

$$[M]_{free} = \frac{[M]_{tot}}{1 + \beta_1[DPA] + \beta_2[DPA]^2} \quad (27)$$

odnosno

$$\beta_2[DPA]^2 + \beta_1[DPA] + \left(1 - \frac{[M]_{tot}}{[M]_{free}}\right) = 0 \quad (28)$$

gdje je $[M]_{tot}$ ukupna koncentracija metala, [DPA] koncentracija slobodnog kelatora, a β_1 i β_2 konstante stabilnosti kompleksa metal – DPA, $M(DPA)$ i $M(DPA)_2$. Ukupna koncentracija DPA, $[DPA]_{tot}$ izražava se jednadžbom:

$$\begin{aligned} [DPA]_{tot} &= [DPA] + [M(DPA)] + 2[M(DPA)_2] \\ &= [DPA] + [M]_{free}(\beta_1[DPA] + 2\beta_2[DPA]^2) \end{aligned} \quad (29)$$

Prva aproksimacija konstante disocijacije, $K_{d,app}$, određena je u pomoću GraphPad Prism 5 programa za analizu podataka, korištenjem sigmoidalne 4PL nelinearne regresije, te odgovara koncentracijama slobodnih iona Zn^{2+} , Cu^{2+} i Co^{2+} potrebnih za postizanje polovice maksimalne aktivnosti enzima. Nakon toga provedena je korekcija za interakciju metala s puferom korištenjem literaturnih vrijednosti [59] afiniteta metala prema puferu 20 mM Tris-HCl, kao što su $\log K_{MB} = 2,27$ za Zn^{2+} , 1,47 za Cu^{2+} i 1,73 za Co^{2+} pri pH 7,4, prema jednadžbama 30 i 31.

$$K_d = K_{d,app} / Q_{MB} \quad (30)$$

$$Q_{MB} = 1 + K_{MB} [pufer] \quad (31)$$

Budući da nisu bili dostupni podaci za konstante vezanja kompleksa mangana i DPA, nije izmjerena konstanta disocijacije za mangan.

3.2.16. Spektrometrija mase s induktivno spregnutom plazmom

Apo i holo proteini pripremljeni su prema opisanom protokolu, a sadržaj metala mjeren je pomoću ICP-MS instrumenta Agilent 8800 (Agilent Technologies, SAD) prema uvjetima prikazanim u tablici 2.

Priprema uzoraka proteinskih pripravaka za mjerenje

Neposredno prije analize elemenata ICP-MS-om uzorci proteinskih pripravaka razrijeđeni su alkalnom otopinom (0,7 mM amonijaka, 0,01 mM EDTA i 0,07 % (v/v) Tritona X-100) 4 puta (0,6 mL uzorka i 1,8 mL alkalne otopine) te im je dodan unutarnji standard (Ge, Rh, Tb, Lu i Ir) u koncentraciji od $3 \mu\text{g L}^{-1}$.

Priprema standardnih otopina metala

Iz monoelementnih standardnih otopina Zn, Cu, Co, Mn i Ni (PlasmaCAL, SCP Science, Kanada) pripremljena je smjesa elemenata u 5 % HNO_3 (v/v). Tako pripremljene standardne otopine služile su za pripremu radnih standarda korištenih za izradu kalibracijskih krivulja. Radni standardi pripremani su kao i sami uzorci neposredno prije analize u alkalnoj otopini. Otopinama radnih standarda kao i uzorcima dodan je unutarnji standard u koncentraciji od $3 \mu\text{g L}^{-1}$.

Optimiziranje uvjeta rada na ICP-MS

Mjerni parametri i osjetljivost instrumenta podešavaju se prije svake ICP-MS analize. Osjetljivost instrumenta podešava se pomoću otopine koja sadrži 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ elemenata litija (Li), magnezija (Mg), kobalta (Co), itrija (Y), cerija (Ce), talija (Tl) i selenija (Se). Kako bi se podesila odgovarajuća osjetljivost prati se odziv detektora na masama 7 (Li), 89 (Y) i 205 (Tl), koje pokrivaju mjerno područje detektora u području niskih, srednjih i visokih masa te istovremeno i omjeri dvostruko nabijenih iona ($^{140}\text{Ce}^{2+}/^{140}\text{Ce}^{+}$) i oksida elemenata ($^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^{+}/^{140}\text{Ce}^{+}$) u odnosu na jednostruko nabijene ione. Optimalni uvjeti su kada se postigne zadovoljavajuća osjetljivost uz minimalno nastajanje dvostruko nabijenih iona (<2,5 %) i iona oksida (<1,8 %). Tipični optimirani uvjeti za analizu elemenata ICP-MS metodom prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Uvjeti rada ICP-MS uređaja Agilent 8800.

Parametri	
snaga radiofrekventnog generatora (RF)	1550 W
dubina uzorkovanja	8,0 mm
horizontalna os plamenika	-0,4 mm
vertikalna os plamenika	0,2 mm
brzina peristaltičke pumpe	0,1 rps
protok plazma plina	15 L min ⁻¹
protok plina za oplahivanje	0,1 L min ⁻¹
protok plina nosača	1,05 L min ⁻¹
raspršivač	<i>MicroMist</i> (kvarc)
komora za raspršenje	<i>Scott</i> (kvarc), hlađenje na 2°C
konusi: vrsta i promjer otvora	Ni <i>Sampling cone</i> , promjer otvora 1 mm Ni <i>Skimmer cone</i> , promjer otvora 0,4 mm
granice za dvostruko nabijene ione i okside	$^{140}\text{Ce}^{2+}/^{140}\text{Ce}^{+} < 2,2 \%$ $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^{+}/^{140}\text{Ce}^{+} < 1,4 \%$
kolizijski plin	He
protok kolizijskog plina	8 mL min ⁻¹
napon na leći 1	0 V
napon na leći 2	-160 V
mjereni izotopi analita	^{55}Mn , ^{59}Co , ^{63}Cu , ^{68}Zn

Za kontrolu točnosti i preciznosti ICP-MS metode rabljeni su komercijalno dostupni referentni materijali seruma (*Recipe ClinChek® Serum Control lyophilised Level I, II*, i *Seronorm™ Trace Elements Serum Level I, II*). Svi referentni materijali su rekonstituirani dodatkom ultračiste vode prema propisanom protokolu i korišteni su za potvrdu točnosti i preciznosti metode. Neposredno prije mjerenja referentni materijali seruma i plazme razrijeđeni su 20 puta sa spomenutom alkalnom otopinom te im je dodan unutarnji standard u koncentraciji od $3 \mu\text{g L}^{-1}$. Analizirani elementi u referentnim uzorcima bili su unutar $\pm 9\%$ od certificiranih vrijednosti.

3.2.17. Izotermalna titracijska kalorimetrija (ITC)

Mjerenja ITC izvedena su na mikrokolorimetru Malvern PEAQ-ITC (MicroCal). Eksperimenti su provedeni u dva pufera: 50 mM natrijevom kakodilatu, pH 7,4 i 50 mM MOPS-NaOH puferu, pH 7,4. Sve standardne otopine iona metala bile su nitrati. Protein je dijaliziran i soli metala otopljene su u istoj puferskoj otopini koja je korištena za daljnja razrijeđenja. Za izravnu titraciju, otopina proteina koncentracije 20-40 μM bila je u ćeliji volumena 200 μL , a otopina metala koncentracije 200-400 μM bila je u šprici volumena 40 μL . Za reverzne titracije, otopina proteina koncentrirana je pomoću uređaja za koncentraciju, Amicon Ultra 15 (30 MWCO) kolona, do koncentracije 120-500 μM i napunjena u špricu, dok je otopina metala koncentracije 10-60 μM bila u ćeliji. Svi eksperimenti izvedeni su pri istim uvjetima na temperaturi od 25°C . Referentna snaga, visoke povratne sprege bila je 30 μW , brzina miješanja 500 rpm, a razmak između injekcija 150 s, s početnom odgodom od 60 s kako bi se omogućilo uspostavljanje ravnoteže. Eksperimenti za korekciju topline razrijeđivanja (pufer-pufer, peptid-pufer, pufer-protein) provedeni su za sve pokuse. Tijekom analiza, svi signali dobiveni kontrolnim eksperimentima su oduzeti od signala dobivenih eksperimentima vezanja. Za analizu podataka korišten je softver za analizu MicroCal PEAQ – ITC. Vrijednosti K_d određene su računalnim programom proizvođača instrumenta, te korigirane za poznate konstante interakcije metal-pufer [59] korištenjem gore navedenih jednadžbi (29) i (30). K_{MB} vrijednosti dobivene su iz prethodnih radova [59-61], a one koje nisu izmjerene na pH 7,4 preračunate su korištenjem puferskih pKa vrijednosti, kao što je opisano u literaturi [60].

3.3. Računalne metode

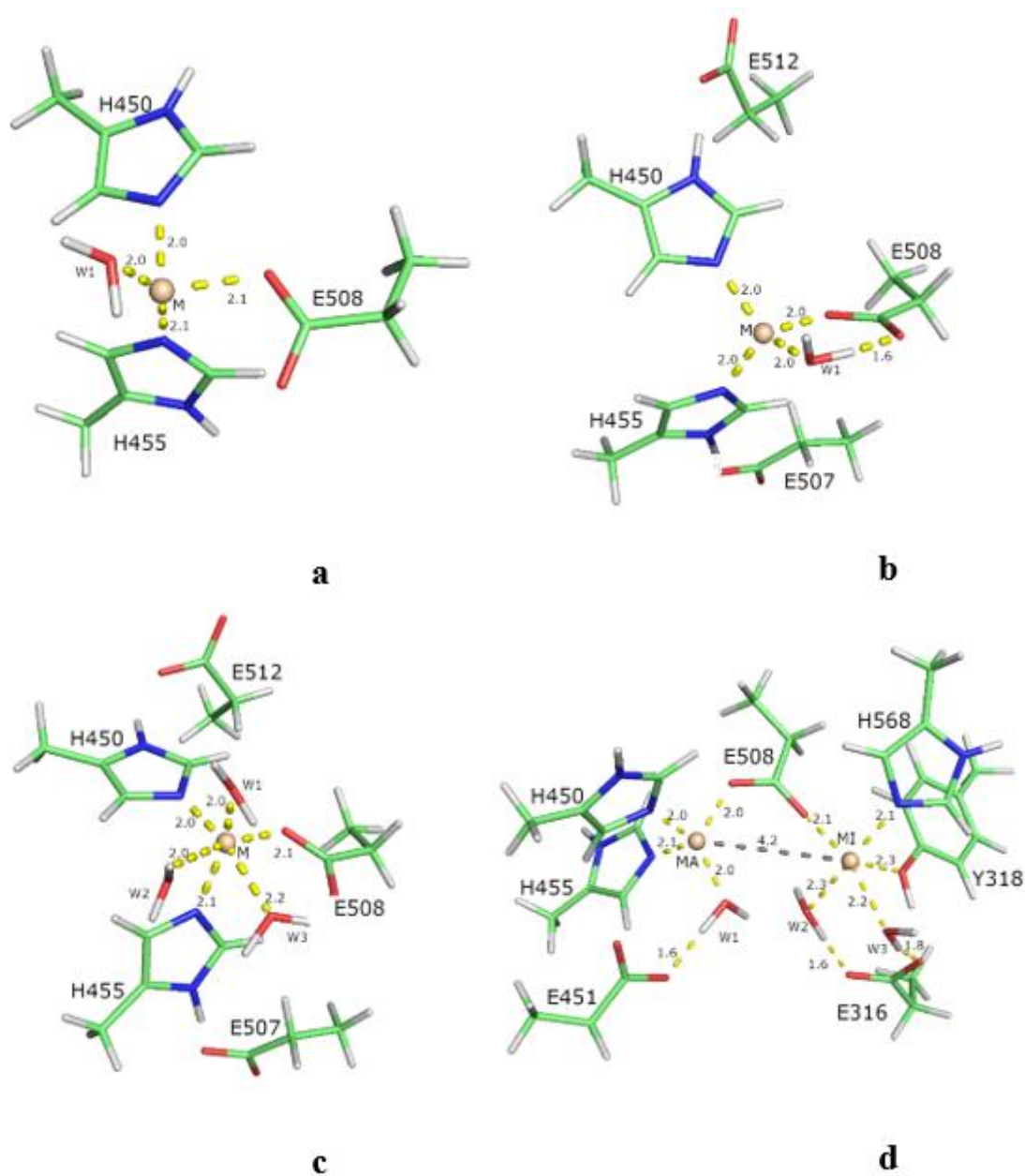
3.3.1. Modelirani sustavi

Kako bi istražili mogu li drugi dvovalentni kationi metala kao što su Cu^{2+} , Co^{2+} i Mn^{2+} zamijeniti nativni cink i kako prisutnost molekula vode i aminokiselinskih ostataka druge koordinacijske sfere utječe na ovaj proces pripremljen je niz (12) modelnih struktura aktivnog mjesta enzima hDPP III s vezanim ionom metala u aktivnom mjestu. Točnije, po tri strukture za svaki od promatranih iona metala, Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} i Mn^{2+} . Budući da je eksperimentalno utvrđeno da veće koncentracije ovih iona metala inhibiraju enzimatsku aktivnost hDPP III, istraživani su i mogući načini vezanja drugog (tzv. inhibitornog) iona metala u blizini katalitičkog mjesta iona cinka, te kako vezanje dodatnog iona metala, Zn^{2+} ili Cu^{2+} utječe na strukturu veznog mjesta i na vezanje supstrata. U tu svrhu pripremljene su modelne strukture aktivnog mjesta hDPP III s dva iona cinka i s dva iona bakra.

Optimizacija modelnih struktura i račun frekvencija provedeni su programskim paketom gaussian 09 primjenom teorije funkcionala gustoće (eng. *Density functional theory*, DFT) u kombinaciji s modelom solvatacije temeljenim na gustoći (engl. *Solvation Model based on Density*, SMD) [62]. Sve strukture, zbog usporedbe, su optimizirane i u vakuumu. Detaljnije u nastavku.

3.3.1.1. Modeli korišteni u kvantno mehaničkim računima

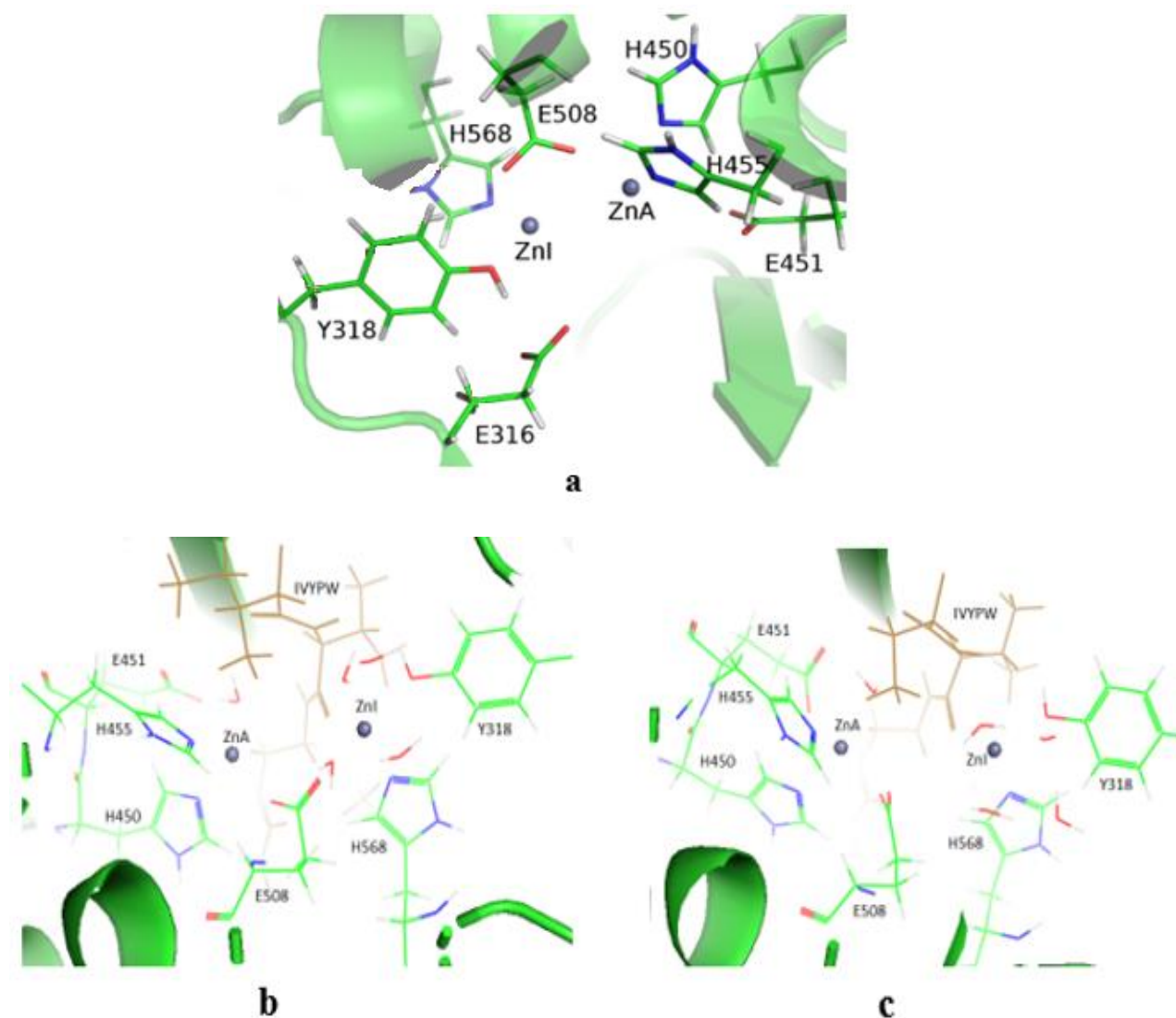
Zatvorena struktura hDPP III (PDB_id 5EGY) služila je kao predložak u izradi modela s jednim ionom metala, a za izradu modela s dva iona metala, pored navedene strukture, korištena je struktura termolizina s dva iona cinka u aktivnom mjestu (PDB_id 1LND), određena difrakcijom X-zraka. Najjednostavniji model sastojao se od iona metala, jedne molekule vode i bočnih lanaca aminokiselinskih ostataka iz prve koordinacijske sfere metala, H450, H455 i E508 (slika 13a), pri čemu su histidini modelirani kao 4-metil-imidazoli, a glutamat kao propionat. Složeniji model uključivao je i dva dodatna aminokiselinska ostatka iz druge koordinacijske sfere metala, E507 i E512 (slika 13b), a treći, najsloženiji model sadržavao je još dodatno dvije molekule vode (slika 13c). Model s dva iona metala (slika 13d) uključivao je aminokiselinske ostatke koji koordiniraju ione metala, katalitički (H450, H455 i E508) i inhibitorni (E508, H568, Y318, E316 i E451), te tri molekule vode, pri čemu je položaj inhibitornog iona metala određen u Pymolu preklapanjem strukture hDPP III i kristalne strukture termolizina s dva iona metala u aktivnom mjestu (PDB_id 5EGY i 1LND).



Slika 13. Modeli korišteni u kvantno mehaničkim računima. Modeli vezanja katalitičkih iona metala u hDPP III prikazani su na slikama (a-c), a model hDPP III s dva vezana iona metala prikazan je na slici (d). U svim strukturama (a-c) položaji iona metala M^{2+} (M^{2+} predstavlja ione Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} i Mn^{2+}) označeni su sferom, a aminokiseline i molekule vode prikazane su kao štapići. U modelu (d), katalitički aktivan ion metala označen je s MA, a inhibitorni ion s MI. Udaljenosti su prikazane u Å.

3.3.1.2. *Strukture korištene u molekulsko dinamičkim simulacijama*

Osim na modelima aktivnog mjesta hDPP III, vezanje inhibitornog iona metala u hDPP III proučavano je korištenjem strukture čitavog enzima u vodenoj otopini iona Na^+ i Cl^- . Korištenjem molekulsko dinamičkih simulacija ispitano je vezanje Cu^{2+} i Zn^{2+} u aktivno mjesto hDPP III i izmjena iona metala vezanog u dodatno, inhibitorno vezno mjesto s ionom vezanim u katalitičko vezno mjesto (slika 14a). Također, kako bi se istražilo učinak vezanja dodatnog iona metala u aktivno mjesto hDPP III na vezanje peptidnih supstrata u hDPP III, pripremljene su i dvije modelne strukture kompleksa hDPP III s dva iona metala i peptidom sličnim hemorfinu, IVYPW, pri čemu je kao predložak korištena optimizirana struktura hDPP III s dva iona cinka i eksperimentalno određena struktura kompleksa hDPP III – IVYPW (PDB_id 5E3C). Tako priređene strukture kompleksa (CPLX1 i CPLX2, slika 14b,) korištene su dalje u molekulsko dinamičkim simulacijama [63]. Razlike struktura CPLX1 i CPLX2, detaljnije su opisane u poglavlju 4.2.2.2.



Slika 14. Dio struktura aktivnog mjesta hDPP III. a) model aktivnog mjesta hDPP III s dva iona cinka (S1), b) i c) modeli kompleksa aktivnog mjesta hDPP III s dva iona cinka i ligandom IVYPW, b) CPLX1 i c) CPLX2. Aminokiseline koje koordiniraju ione cinka i molekule vode, prikazane su kao štapići. Katalitički ion cinka (ZnA) i inhibitorni ion cinka (ZnI) prikazani su kao sive sfere, a ligand IVYPW je prikazan štapićima obojen smeđe.

3.3.2. Kvantno mehanički računi

Geometrije konstruiranih modela optimizirane su korištenjem DFT metode u kombinaciji s modelom solvatacije temeljenim na kontinuumu gustoće (SMD) dielektrične konstante ϵ ($\epsilon_1 = 4$) kako bi se simuliralo proteinsko okruženje aktivnog mjesta. Pokazalo se da DFT izračuni

mogu pouzdano reproducirati geometrije bioloških sustava, kao i termodinamičke podatke povezane uz njihovu transformaciju [64-66]. Izračuni su provedeni u programu Gaussian 09 [67] korištenjem B3LYP funkcionala i baznog skupa 6-31G(3d,p). B3LYP koristi nelokalni korelacijski funkcional prema Lee, Yang i Parr [68] i hibridni funkcional razmjene tri parametra koji je predložio Becke [69]. Na taj su način dobivene energije, optimiziranih sustava. Prema prethodnim studijama, razina teorije B3LYP/6-31G(3d,p) predstavlja dobru ravnotežu između točnosti i utrošenog računalnog vremena za dobivanje vjerodostojnih strukturnih parametara za sustave koji predstavljaju biološke sustave s metalima, kao što su Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} i Mn^{2+} kao i za izračun termodinamičkih veličina vezanih za njihovu transformaciju [64-66].

Izračuni frekvencije izvedeni su na istoj B3LYP/6-31G(3d,p) razini teorije kako bi se potvrdilo da minimizirana struktura predstavlja pravi lokalni minimum na površini plohe potencijalne energije metalnog kompleksa. Razlike u potencijalnoj energiji (E_{el}) i entropiji (S) te korekcija za termalni doprinos (E_{th}) korištene su za izračun razlika u Gibbssoj energiji (G) između promatranih sustava s različitim ionima metala u aktivnom mjestu enzima, prema jednadžbi:

$$\Delta G = \Delta E_{el} + \Delta E_{th} - T\Delta S \quad (32)$$

Relativni afinitet različitih metala prema aktivnom mjestu hDPP III uz $\epsilon_1 = 4$ izračunat je pomoću jednadžbe 33, a za sustav u vakuumu jednadžbom 34.

$$\Delta G = \Delta G_{\epsilon_1}([M2+P]) - \Delta G_{\epsilon_1}([M1+P]) - \Delta G_{\epsilon_1}([M2+voda]) + \Delta G_{\epsilon_1}([M1+voda]), \quad (33)$$

$$\Delta G = \Delta G_{\epsilon_3, \epsilon_2}([M1+P]) - \Delta G_{\epsilon_3, \epsilon_2}([M2+P]) - \Delta G_{\epsilon_2}([M1+voda]) + \Delta G_{\epsilon_2}([M2+voda]) \quad (34)$$

gdje je $\epsilon_1 = 4$, $\epsilon_2 = 78$ i $\epsilon_3 = 1$, M1 Zn^{2+} , a M2 je Cu^{2+} , Co^{2+} ili Mn^{2+} .

Za generiranje slika molekularnih struktura korišten je program PyMOL (PyMOL verzija 1.5.x Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC, New York, NY, SAD).

3.3.3. Metode polja sile

Za parametrizaciju proteina s cinkovim, odnosno bakrovim ionima korištena su polja sile ff14SB [70], odnosno ff19SB [71]. Parametrizacija i izračuni za modele sa cinkom, odnosno bakrom provedeni su u sklopu programa AMBER16 [72] i AMBER20 [73]. Ranije je utvrđeno da se koordinacija iona cinka u DPP III iz različitih organizama i tkiva, kao i u drugim enzimima ovisnim o cinku sa sličnim mjestom vezanja metala, najpouzdanije reproducira pomoću novorazvijenih hibridnih vezno / neveznih modela [74]. Međutim, kako bi se istražila stabilnost hipotetskog inhibitornog iona metala i pratilo kretanje iona metala unutar proteina, potrebno je koristiti nevezne parametre. U tu svrhu razvijeni su novi nevezni parametri za ion cinka, a za bakar su korišteni standardni nevezni parametri dostupni unutar programskog paketa AMBER20. Početne strukture otopljene su u kutiji oblika krnjeg oktaedra ispunjenog molekulama vode TIP3P [75], dok su natrijevi ioni dodani kako bi se postigla elektroneutralnost.

3.3.3.1. Priprema struktura hDPP III s dva iona metala i njihovih kompleksa s peptidom za molekulske dinamičke simulacije

1. Strukture s cinkom

Minimizacija je provedena u 5 ciklusa s različitim ograničenjima. U prvom ciklusu optimizacije (1500 koraka), molekule vode su relaksirane, dok je gibanje ostatka sustava ograničeno s harmoničkom konstantom sile od $64 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$. U drugom ciklusu (2500 koraka), na ione cinka i aminokiselinske ostatke (Y318, H568, E508) koordinirane s ionima cinka, primijenjena je konstanta sile $32 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$. U trećem ciklusu (1500 koraka), konstanta sile na cinkov ion i okosnicu proteina smanjena je na $6 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$, dok je sila na ostatke smanjena na $12 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$. U četvrtom ciklusu (1500 koraka) samo su katalitički cinkov ion (ZnA) i njegovi koordinirajući ostaci bili ograničeni (cink sa $6 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ i njegovi ligandi s $12 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$). U petom ciklusu (3000 koraka) cijeli sustav je minimiziran bez dodatnih ograničenja.

Optimizirani sustav zagrijavan je od 0 do 300 K i uravnotežen kroz 5 faza. U prvoj fazi, sustav je zagrijavan od 0 K do 300 K tijekom 10 ps koristeći NVT ansambl s korakom integracije od 1 fs. Tijekom ove faze gibanje atoma proteinske okosnice ograničeno je korištenjem harmoničke sile konstante $22 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$, ioni cinka bili su ograničeni s $12 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ i koordinirajući ostaci inhibitornog iona cinka (ZnI) s $12 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$, a E508

s 64 kcal mol⁻¹ Å⁻¹. Nakon toga je uslijedilo 70 ps simulacija NPT ansambla gdje su ograničenja od 12 kcal mol⁻¹ Å⁻¹ primijenjena samo na cinkove ione i aminokiselinske ostatke koji ih koordiniraju. U trećoj fazi sustav je simuliran 140 ps, s ograničenjima smanjenim na 6 kcal mol⁻¹ Å⁻¹ za cinkove ione i ostatke (osim za E508 gdje ostaje ograničenje od 12 kcal mol⁻¹ Å⁻¹), a u četvrtoj fazi 100 ps uz ograničenje samo na ione cinka (6 kcal mol⁻¹ Å⁻¹). U završnoj fazi uravnoteženja sustav je simuliran 700 ps bez dodatnih ograničenja, osim što je za ograničavanje kovalentnih veza koje uključuju vodikove atome vezane za ugljik, kao i tijekom daljnjih simulacija, korišten algoritam SHAKE. Tlak je održavan Berendsenovim barostatom [76] na 1 atm, dok je prosječna temperatura sustava održavana na 300 K pomoću Langevinovog termostata [77].

2. Strukture s bakrom

Sustavi su optimizirani u tri ciklusa s različitim ograničenjima. U prvom ciklusu minimizacije (1500 koraka), usmjerenom na preraspodjelu molekula otapala, protein i cinkov ion bili su ograničeni harmoničkim potencijalom s konstantom sile od 32 kcal mol⁻¹ Å⁻¹. U drugom ciklusu (3500 koraka), samo je okosnica proteina bila ograničena konstantom sile od 12 kcal mol⁻¹ Å⁻¹, dok je cijeli sustav minimiziran u trećem ciklusu (2500 koraka) bez dodatnih ograničenja. Sustavi su zagrijavani u četiri koraka od 0 do 300 K, od 0-100 K, od 100-200 K i od 200-300 K tijekom 50 ps. Nakon toga je uslijedilo ekvilibriranje od 3 ns na 300 K. Vremenski korak od 0,5 fs korišten je za simulacije zagrijavanja i 1 fs za simulacije ekvibracije.

U MD simulacijama korišten je algoritam SHAKE [78] i vremenski korak od 2 fs. Tijekom zagrijavanja korišten je NVT skup, dok su ekvibracija i proizvodni MD izvedeni s NPT skupom, s graničnom vrijednošću od 11 Å. Tijekom simulacija, temperatura je kontrolirana pomoću Langevinovog termostata [77] s vremenskim intervalom između skaliranja temperature od 0,5 ps tijekom zagrijavanja i ekvibracije gustoće i od 1 ps tijekom MD simulacija. Tlak je kontroliran pomoću Berendsenovog barostata [76] s vremenom opuštanja od 1,0 ps. Provedeno je ukupno 4 μs produktivnih klasičnih MD simulacija za različite hDPP III strukture s dva bakra.

Analiza podataka

Izračuni geometrijskih parametara (RMSD, Rgyra i RMSF) i analiza energija linearne interakcije (LIE) provedeni su korištenjem cpptraj modula [79] programskog paketa AmberTools20. Slike su generirane pomoću PyMOL-a (PyMOL Molecular Graphics System, verzija 1.5.0.4, Schrödinger LLC, New York, NY, SAD).

Slobodne energije vezanja iona cinka procijenjene su pomoću MMGBSA proračuna, korištenjem GB modela Onufrieva i sur. [80]. Izračuni su izvedeni s MMPBSA.py modulom [81] dostupnim unutar paketa programa AMBER16. Geometrija struktura uzorkovanih tijekom MD simulacija analizirana je CPPTRAJ modulom programskog paketa AmberTools [62].

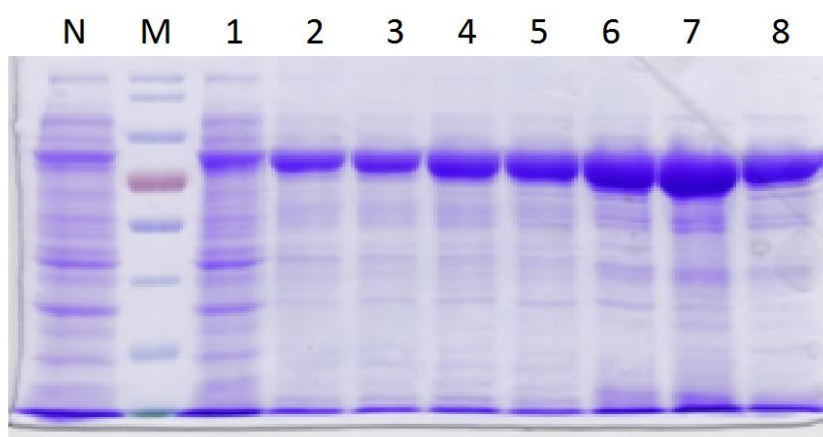
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

Za eksperimentalne studije najprije je bilo potrebno prirediti pročišćene proteine, vrlo visoke čistoće i bez His-privjeska, kako bi se izbjegle sve kontaminacije i smetnje u daljnjim ispitivanjima. Korištene eksperimentalne metode su vrlo osjetljive i kod većine je nužna stabilnost proteina kako bi se mogla mjeriti njegova enzimska aktivnost. Za potrebe ove doktorske disertacije provedene su računalne metode: MD simulacije i kvantno mehanički izračuni, te eksperimentalne metode: afinitetna i gel-filtracijska kromatografija, izotermalna titracijska kalorimetrija (ITC), spektroskopija zaustavljenog protoka, mjerenja na instrumentu spektrometrije mase s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) i fluorimetrijska spektroskopija kako bi se odredila stehiometrija, izmjene i afinitet vezanja iona metala na hDPP III.

4.1. Eksperimentalni pristup

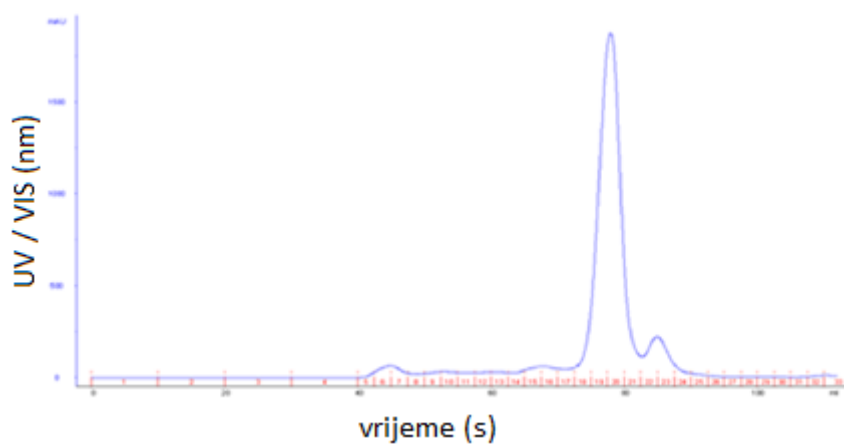
4.1.1. Analiza pročišćenih proteina

Frakcije prikupljene u koracima pročišćavanja proteina su analizirane SDS-PAGE elektroforezom. Slike gelova prikazuju uzorke nakon afinitetne kromatografije na koloni Ni-NTA (slika 15) i gel-filtracije na koloni Superdex S200 na FPLC Akti (slika 16). Slika 15 prikazuje gel na kojem su uzorci nevezane frakcije, uzorci ispiranja i uzorci elucija. U svim analizama korišten je marker PageRuler Prestained Protein Ladder s rasponom veličine fragmenta 25-180 kDa. Crvena vrpca markera (jažica M, slika 15) označava 75 kDa, vrpca koja odgovara hDPP III nalazi se malo iznad budući da predviđena relativna molekulska masa hDPP III iznosi ~83,5 kDa. Frakcije koje su korištene za daljnje pročišćavanje uzorka nalaze se u jažicama označenim od 2 do 8.

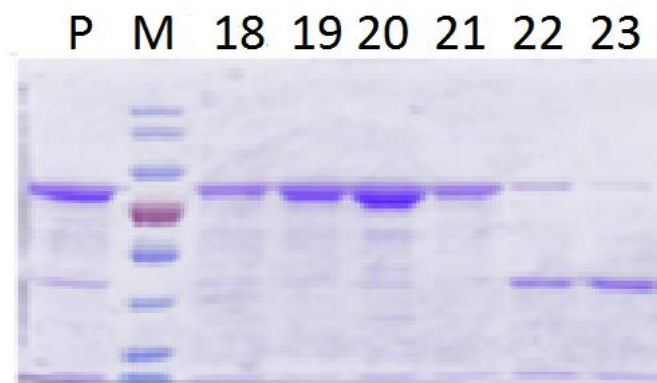


Slika 15. Analiza frakcija prikupljenih tijekom pročišćavanja hDPP III, afinitetnom kromatografijom, na SDS-PAGE (10%-tni gel), M-marker, N-nevezana frakcija, 1 ispiranje, 2-8 elucija (frakcije pročišćenog proteina).

Frakcije s najvišim koncentracijama su spojene i odsoljene na PD-10 koloni, a proteinima u uzorku odcijepljen je His-privjesak dodatkom TEV proteaze. Reakcijska smjesa je ugušćena do volumena 1,5 mL i pročišćena gel-filtracijom (slika 16). Dobivene frakcije su ponovno analizirane SDS-PAGE elektroforezom (slika 17).

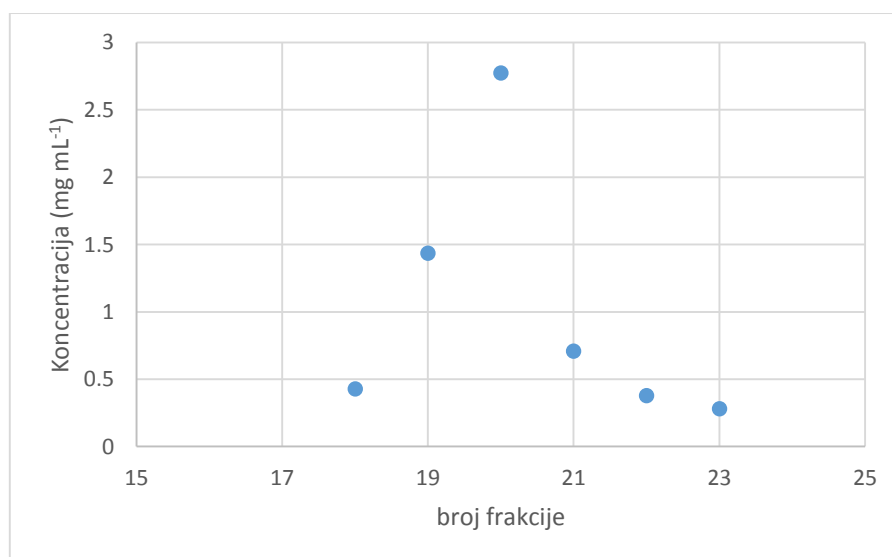


Slika 16. Kromatogram gel-filtracije hDPP III prethodno pročišćene afinitetnom kromatografijom.



Slika 17. Analiza frakcija hDPP III prikupljenih nakon gel-filtracije, na SDS-PAGE (10%-tni gel), P-početni uzorak proteina koji je nanošen na kolonu, M-marker, 18-23 frakcije pročišćenog proteina.

Koncentracije proteina određene su na BioDropu, te su uspoređene s očitanjem A_{280} detektora na FPLC-u. Mjerenja su pratila isti trend i međusobno su usporediva.



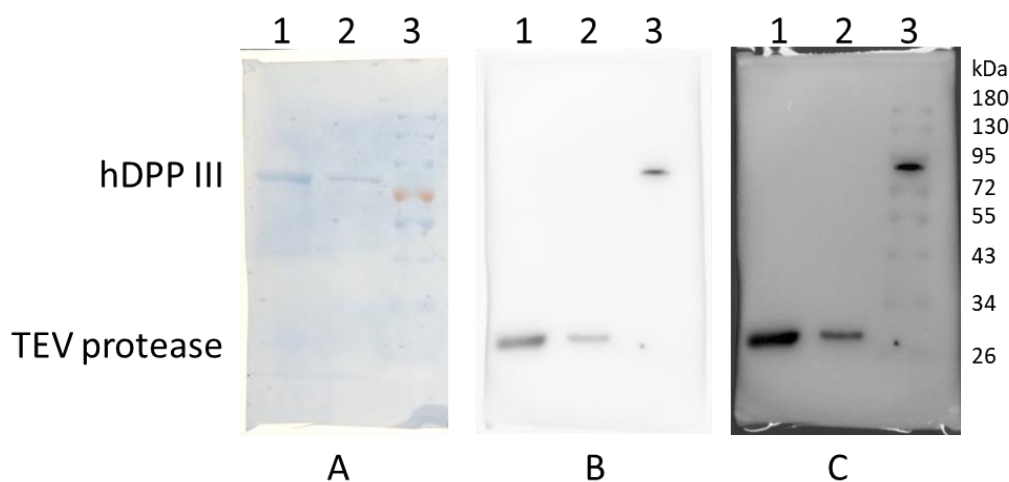
Slika 18. Grafički prikaz koncentracija frakcija (18-23) određenih BioDropom.

Pročišćeni protein je nativni, divljeg tipa (eng. *Wild type*, WT) hDPP III s ionom metala cinka u svom aktivnom mjestu. Za eksperimentalne studije bilo je potrebno pripremiti i apo protein, tj. protein bez iona metala u aktivnom mjestu, kako bi se pratilo vezanje iona drugih metala. To je učinjeno nakon uklanjanja His-privjeska.

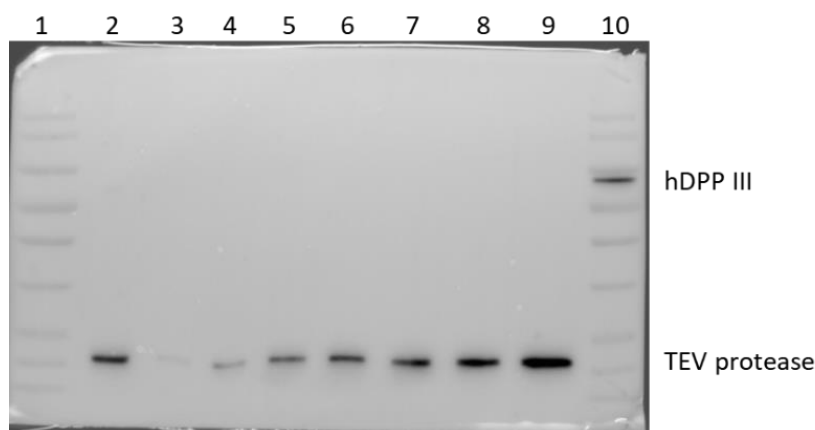
4.1.1.1.

Analiza prisutnosti His privjeska - western blot

Uspješnost uklanjanja His privjeska iz proteina testirana je western blotom. Budući da je poznato da His privjesak veže ione metala [82] trebalo ga je ukloniti kako bi se što preciznije mogao odrediti broj kationa metala koji se vežu za enzim hDPP III. Za odcjepljivanje His privjeska korištena je TEV proteaza. Uklanjanje His privjeska s hDPP III potvrđeno je pomoću imunokemijske metode ali je zapažena i kontaminacija s TEV proteazom (slika 19). Za kvantificiranje preostale TEV proteaze u uzorku, upotrijebljena je kalibracijska krivulja s 10-200 ng TEV proteaze, snimljena na istoj membrani kao i ispitivani uzorak (slika 20). Količina kontaminirajućeg proteina izračunata je iz kalibracijske krivulje i utvrđeno je da iznosi 67 ng TEV proteaze u uzorku od 1000 ng hDPP III. U slučaju da hDPP III i TEV proteaza vežu dva iona metala [63, 82], ovi izračuni sugeriraju da bi kontaminacija TEV proteazom mogla promijeniti očekivanu količinu vezanog metala u uzorku proteina za najviše 13%, ali ne za cjelobrojnu vrijednost. Postupak je proveden za sve uzorke i dao je slične rezultate.



Slika 19. Reprezentativna analiza prisutnosti His privjeska western blot metodom. Trake: 1 - 2000 ng hDPP III; 2 - 1000 ng hDPP III; 3 - PageRuler proteinski marker sa 100 ng His - označenog hDPP III kao referencom. Slike A-C prikazuju istu membranu. Prikaz (A) membrana obojena amido crnom bojom, (B) rezultat detekcije kemiluminiscencije i (C) slika preklapanja koja prikazuje položaj detektiranih traka s prethodno obojenim markerima.



Slika 20. Reprezentativni western blot za kvantifikaciju TEV proteaze. Kemiluminescentna detekcija nakon 1 minute i 15 sekundi izlaganja, preklopljena markerom. Trake: 1 - PageRuler marker, 2 - 1000 ng hDPP III, 3 - 10 ng TEV proteaze, 4 - 25 ng TEV proteaze, 5 - 50 ng TEV proteaze, 6 - 1000 ng hDPP III, 7 - 75 ng TEV proteaze, 8 - 100 ng TEV proteaze, 9 - 200 ng TEV proteaze, 10 - PageRuler marker sa 100 ng hDPP III označenog s His privjeskom, kao referenca.

4.1.2. Određivanje stehiometrije vezanja metala na hDPP III (ICP-MS)

Mjerenja su provedena u 25 mM amonijevom acetatu na pH 7,4, pri koncentraciji mase proteina od 0,1 do 0,2 mg mL⁻¹. Holo proteini su pripremljeni dodatkom 6 mola iona metala na jedan mol proteina, a potom ispirani puferom za uklanjanje nevezanih iona metala. Rezultati su prikazani u tablici 3. Mjerenja pokazuju da nativni protein nije zasićen metalom cinka, kao što je bilo pretpostavljeno na temelju mjerenja aktivnosti. Rezultati pokazuju da su koncentracije metala u nativnom proteinu vrlo slične onima u apo proteinu. Nakon vezanja metala u protein najveći izmjereni omjer metala i proteina bio je 2:1 za bakar. Samo jedan mol Zn²⁺ bio je vezan na jedan mol proteina. Rezultati potvrđuju da protein hDPP III ima visok afinitet vezanja za Cu²⁺ i Zn²⁺, što prikazuju cjelobrojne vrijednosti odnosa metal-protein, dok su za Co²⁺ i Mn²⁺ mjerene vrijednosti ispod 1, odnosno oko 0,3 za kobalt i 0,02 – 0,03 za mangan. Rezultati prisutosti dva iona bakra za protein potvrđuju mogućnost postojanja dodatnog mjesta za vezanja iona metala u hDPP III. Sva mjerenja su ponovljena pri istim uvjetima s drugom serijom istog proteina.

Tablica 3. Omjeri iona metala i molekula proteina (N) izmjereni ICP-MS uređajem za holo enzime hDPP III. Rezultati su prikazani kao prosjek i standardna devijacija dvaju mjerenja.

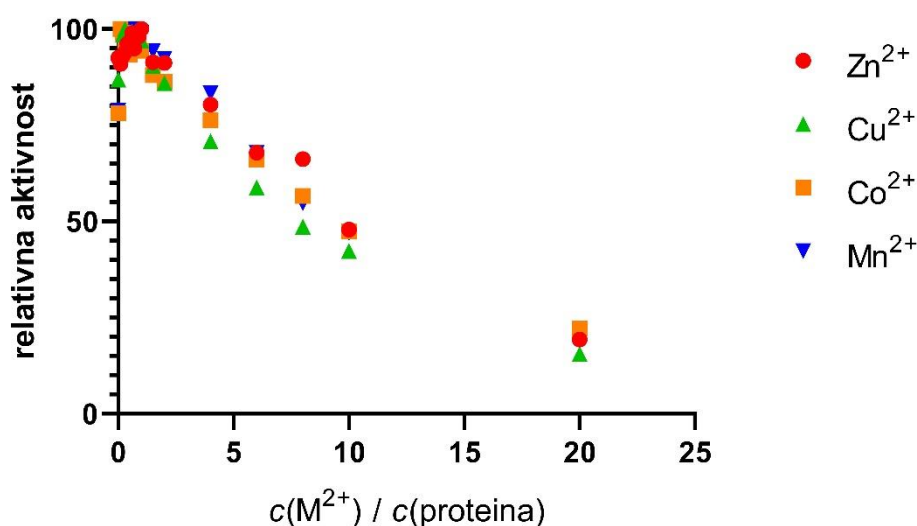
hDPP III	N(Zn ²⁺)	N(Cu ²⁺)	N(Co ²⁺)	N(Mn ²⁺)
nativna	0,07 ± 0,04	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
apo	0,02 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,00 ± 0,00
apo + Zn ²⁺	1,07 ± 0,16	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,02
apo + Cu ²⁺	0,05 ± 0,05	2,03 ± 0,09	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01
apo + Co ²⁺	0,37 ± 0,17	0,03 ± 0,03	0,33 ± 0,01	0,00 ± 0,00
apo + Mn ²⁺	0,32 ± 0,03	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,04	0,03 ± 0,01

Zanimljivo je da je vezan samo jedan ion cinka. To ukazuje na veći afinitet vezanja bakra za dodatno vezno mjesto (inhibitorno) ili kinetički labilnije vezanje cinka na inhibitorno mjesto što dovodi do izmjene s ionom vezanim na aktivno mjesto pri čemu ion cinka iz aktivnog mjesta napušta aktivno mjesto i migrira prema otvoru interdomenske pukotine, što je već ranije sugerirano molekularnim simulacijama. Mangan nije ostao vezan za enzim, što ukazuje na slabo vezanje tog metala za hDPP III. Kobalt je utvrđen u samo 30% molekula proteina što je bilo neočekivano budući su ranija istraživanja pokazala da kobalt aktivira hDPP III [57], vjerojatno vezanjem na katalitičko mjesto metala. Objašnjenje bi moglo biti u činjenici da je afinitet kobalta prema katalitičkom mjestu bitno niži od afiniteta cinka, a u proteinima inkubiranim s manganom i kobaltom, izmjerena je znatna količina cinka u uzorcima, između 20% i 40%. Izvor cinka u tim uzorcima nije bilo moguće utvrditi jer su svi uzorci tretirani istim postupkom i nije pronađen dodatni cink u uzorcima apo i nativnih proteina. Najjednostavnije objašnjenje prisutnosti cinka u tim uzorcima je da su male količine kelatora DPA i EDTA zasićene dodatkom viška metala ostale u tretiranim uzorcima.

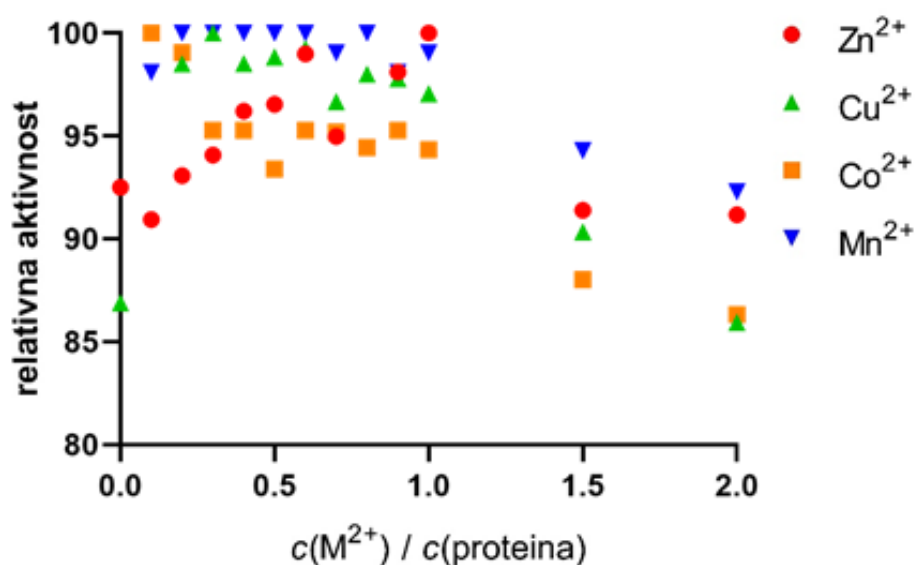
4.1.3. Praćenje aktivnosti vezanja metala na hDPP III spektroskopijom zaustavljenog protoka

Prva mjerenja su provedena inkubiranjem apo hDPP III s otopinom metala. Mjerenja su provedena na pH 7,4 u različitim puferima: 1. 25 mM natrij kakodilat, 2. 40 mM Tris-HCl, 3. 25 mM amonijev acetat. Rezultati nisu bili pozitivni, odnosno nije dobivena krivulja aktivacije niti inhibicije s apo proteinom.

Budući da je metodom ICP-MS pokazano da je nativni protein vrlo sličan apo proteinu, odnosno da nije zasićen metalima, za daljnja mjerenja korišten je nativni protein. Mjerenja su provedena u 40 mM Tris-HCl puferu, pH 7,4, pri koncentraciji proteina 20 nM. Instrumentom za spektroskopiju zaustavljenog protoka praćena je krivulja hidrolize Arg-Arg-2NA u prisutnosti različitih metalnih iona (cinka, bakra, kobalta i mangana). Nativni uzorak hDPP III inkubiran je s otopinom nitrata cinka, bakra, kobalta i mangana. U svim mjerenjima uočena je aktivacija do omjera metal:protein od 1:1, nakon čega je došlo do postupne inaktivacije. Slične krivulje aktivnosti dobivene su za sve metale (slika 21), s malim razlikama u područjima gdje je omjer metala i proteina bio manji od 1:1 (slika 22). Jedini metal koji je pokazao porast aktivnosti do ekvimolarnih koncentracija bio je Zn^{2+} . Za ostale metale, Cu^{2+} , Co^{2+} i Mn^{2+} , aktivnost je bila stabilna do omjera 1:1, nakon čega je nastupila inhibicija.

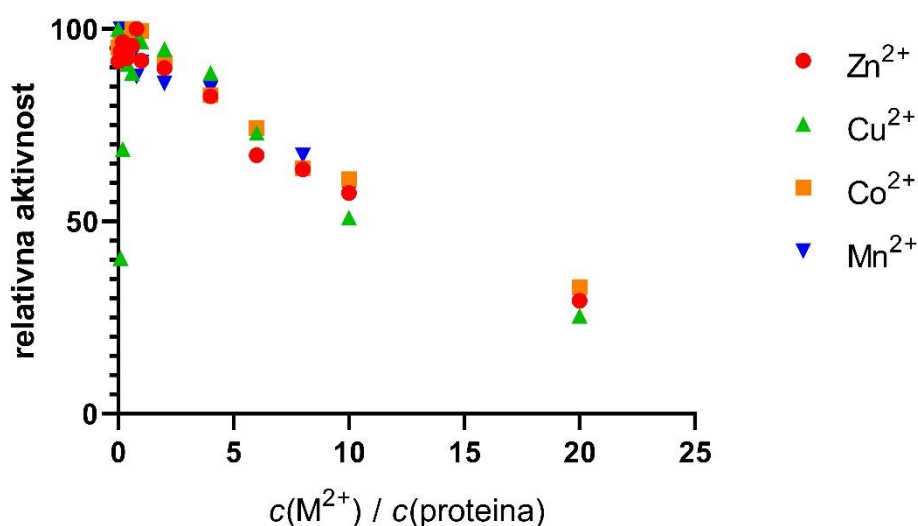


Slika 21. Relativna aktivnost enzima kao funkcija koncentracije metala, praćeno na 332 nm u 40 mM Tris-HCl puferu, pH 7,4.

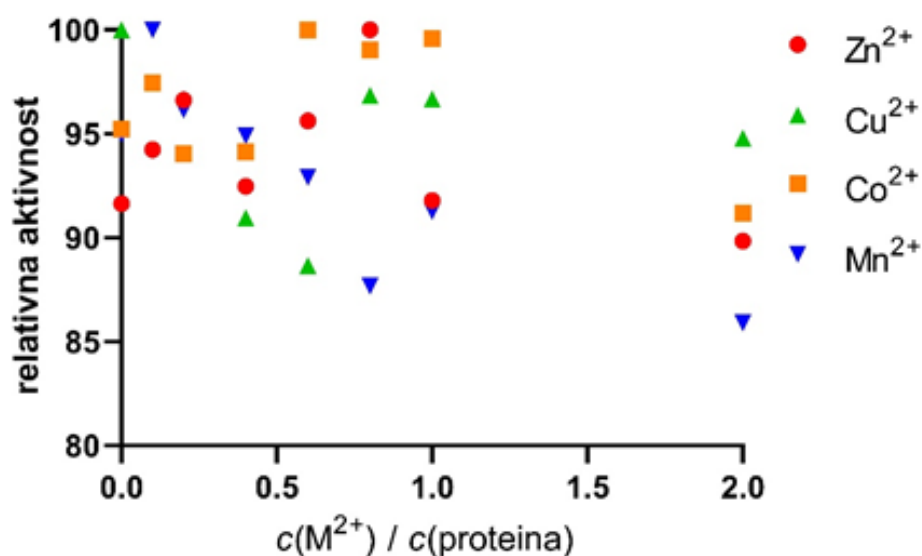


Slika 22. Relativna aktivnost enzima kao funkcija koncentracije metala pri ekvimolarnim koncentracijama metala i proteina u 40 mM Tris-HCl puferu, pH 7,4 - uvećani prikaz.

Mjerenja su ponovljena u puferu 25 mM natrij kakodilatu, pH 7,4. Dobiveni rezultati su vrlo slični prethodnima. Cink i kobalt pokazuju blagu aktivaciju do ekvimolarnog omjera proteina prema metalu, nakon koje slijedi inhibicija, dok bakar i mangan odmah pokazuju blagu inhibiciju bez prethodne postepene aktivacije proteina.



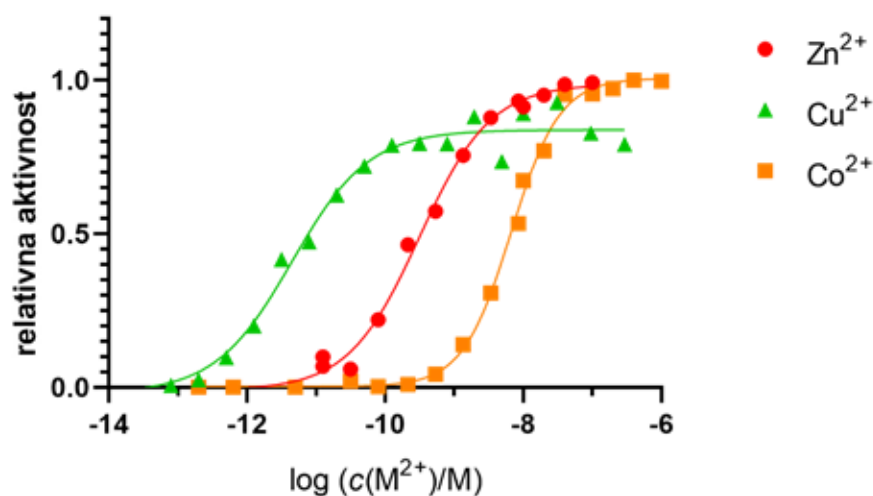
Slika 23. Relativna aktivnost enzima kao funkcija koncentracije metala, praćeno na 332 nm u puferu 25 mM natrij kakodilatu, pH 7,4.



Slika 24. Relativna aktivnost enzima kao funkcija koncentracije metala pri ekvimolarnim koncentracijama metala i proteina u 25 mM natrij kakodilatu, pH 7,4 - uvećani prikaz.

4.1.4. Konstante disocijacije mjerene fluorimetrijski

Na slici 25 dani su rezultati mjerenja konstante disocijacije metala mjerenjem enzimske aktivnosti. Iz grafa su nelinearnom regresijom određene konstante disocijacije, koje su zatim korigirane za interakciju metala i pufera. Konačne vrijednosti su: $6,7 \times 10^{-11}$ M za Zn²⁺, $2,8 \times 10^{-12}$ M za Cu²⁺ i $3,2 \times 10^{-9}$ M za Co²⁺. Tako određene konstante odnose se samo na vezanje metala u aktivno mjesto enzima.

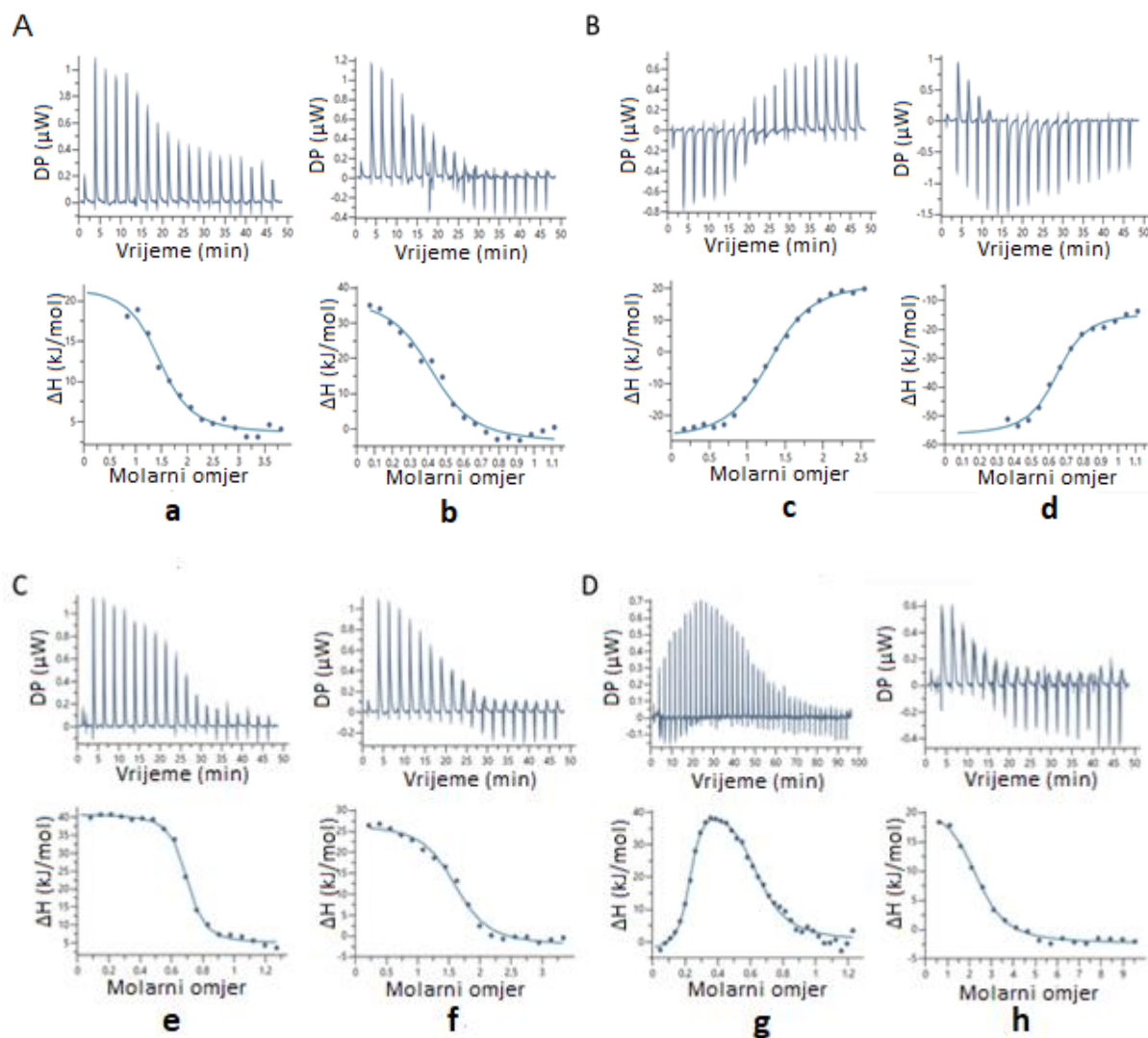


Slika 25. Određivanje konstante disocijacije native hDPP III s metalima (Zn²⁺, Cu²⁺ i Co²⁺).

Teoretski bi se na ovaj način mogle odrediti i konstante vezanja metala u dodatno vezno mjesto, uz pretpostavku da njegovo vezanje utječe na aktivnost enzima (inhibicija), ali bilo bi potrebno koristiti neki drugi ligand, koji bi omogućio kontrolu koncentracije slobodnih metalnih iona pri višim koncentracijama. Stoga je bilo potrebno drugom metodom pokušati opisati vezanje metala na eventualno dodatno vezno mjesto.

4.1.5. Određivanje stehiometrije vezanja metala na hDPP III (ITC)

Mjerenja su provedena u dva pufera, 50 mM natrijevom kakodilatu, pH 7,4 i 50 mM MOPSu, pH 7,4 pri koncentraciji proteina u rasponu od 5×10^{-4} M do 2×10^{-4} M i koncentracijama metalnih otopina od 6×10^{-5} M do 1×10^{-5} M. ITC metoda bi trebala dati opis svih termodinamičkih parametara interakcije i omogućiti kvantitativno određivanje broja iona metala koji se vežu za protein te jakost tih interakcija. Rezultati mjerenja titracija hDPP III s ionima metala prikazani su kao prosječna vrijednost i standardna devijacija najmanje dva, a uglavnom tri ili četiri mjerenja (slika 26). Osim direktnom, protein-metal interakcije ispitane su i reverznim titracijama iona metala s proteinom.



Slika 26. Titracija hDPP III s ionima metala. Izoterme vezanja (gornji red) i podaci s prikladnim krivuljama (donji red) prikazani su (slijeva na desno) za izravnu (metal na protein), odnosno obrnutu (protein na metal) titraciju za Zn^{2+} (A), Cu^{2+} (B), Co^{2+} (C) i Mn^{2+} (D).

Za sve metale osim kobalta, rezultati stehiometrije i oblik izotermalne krivulje ukazuju na postojanje dva vezna mjesta (tablica 4). Afinitet vezanja Zn^{2+} i Cu^{2+} u aktivno mjesto hDPP III bio je prevelik za mjerenje opisanom metodom. Stehiometrija vezanja određena za Co^{2+} nije cjelobrojna, što je u skladu s ICP-MS mjerenjima, a iznosi 0,63 iona metala po proteinskoj molekuli. Reakcija vezanja je endotermna (slika 26C).

Tablica 4. Vrijednosti termodinamičkih parametara utvrđenih za interakcije metala i proteina određene pomoću ITC metode u 50 mM natrij kakodilatnom puferu pri pH 7,4, za izravne titracije. Rezultati su prikazani kao prosjek i standardna devijacija triju mjerenja.

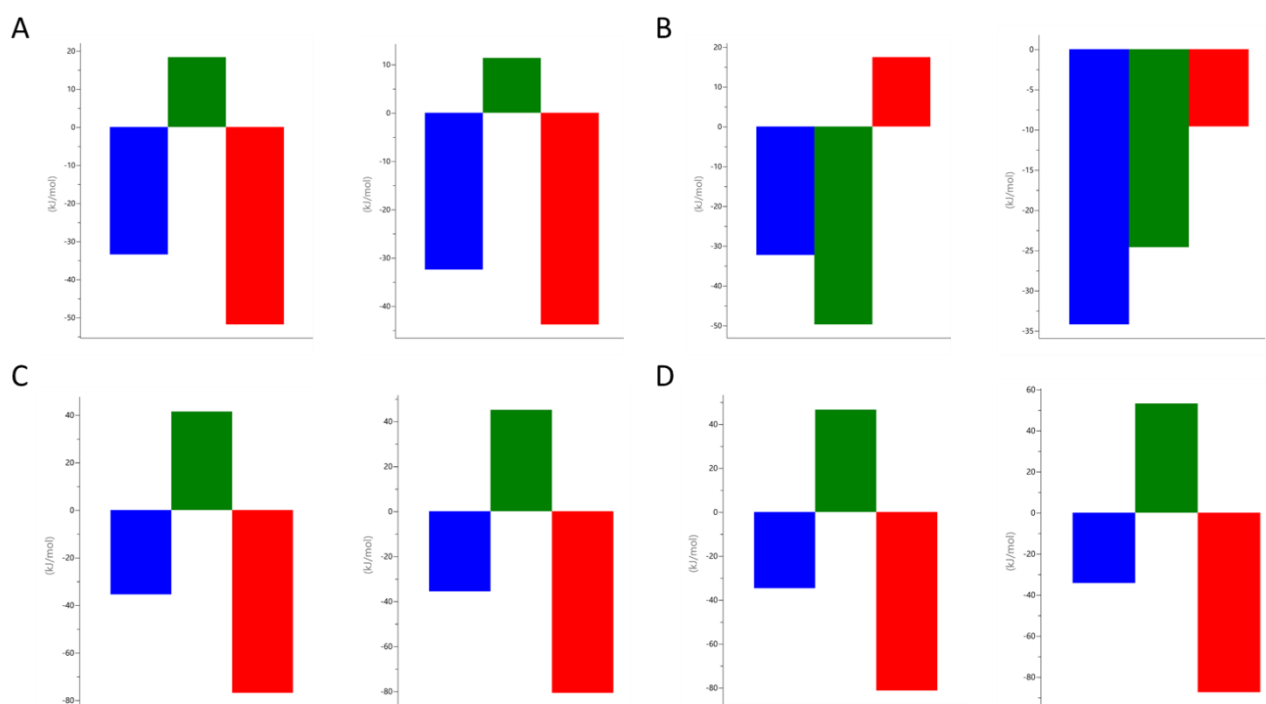
	n	$K_d/\mu\text{M}$	$\Delta_r H/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta_r G/\text{kJ mol}^{-1}$	$-T \Delta_r S/\text{kJ mol}^{-1}$	Pretpostavljeno mjesto vezanja
Zn^{2+}	$1,46 \pm 0,07$	$1,0 \pm 0,8$	18 ± 2	-34 ± 1	-52 ± 1	dodatno
Cu^{2+}	$1,2 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,7$	$-49,8 \pm 0,3$	$-32,2 \pm 0,7$	$17,6 \pm 0,5$	dodatno
Co^{2+}	$0,63 \pm 0,04$	$0,13 \pm 0,02$	39 ± 1	$-36,7 \pm 0,5$	-78 ± 1	aktivno
Mn^{2+} (1)	$0,22 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,05$	-42 ± 1	$-38,0 \pm 0,5$	4 ± 2	aktivno
Mn^{2+} (2)	$0,44 \pm 0,04$	$1,0 \pm 0,1$	$47,0 \pm 0,5$	$-34,3 \pm 0,4$	$-81,2 \pm 0,5$	dodatno

Rezultati reverzne titracije u korelaciji su s rezultatima izravne titracije (tablice 4 i 5). Za mangan, rezultati ukazuju na dva vezna mjesta po proteinu, ali s ukupnim sadržajem metala po proteinu manjim od 1. Za prvo, aktivno, vezno mjesto, vrijednost K_d bila je slična onoj za kobalt, ali za drugo, inhibitorno, vezno mjesto, bila je značajno viša. Vežanje mangana na prvo mjesto je egzotermno, dok je na drugo mjesto endotermno (slika 27). Za cink, rezultati upućuju da postoje dva vezna mjesta, ali nisu dobivene kvantitativne vrijednosti za vežanje posebno prvog i posebno drugog veznog mjesta kao kod mangana. Stehiometrija vežanja je 1,5 iona cinka po molekuli proteina za izravnu titraciju i 2,5 iona cinka za obrnutu titraciju. Rezultati su se mogli odrediti samo za vežanje na drugo, inhibitorno, mjesto, budući da je Zn^{2+} u aktivno mjesto vezan značajno većim afinitetom.

Za bakar se izravna i reverzna titracija proteina nisu podudarale, što se može odmah uočiti na dijagramu (slika 26). U oba slučaja ukupna stehiometrija bila je $n > 1$, što upućuje da se bakar osim u aktivno veže i u inhibitorno mjesto, vežanje je egzotermno. Sumnja se da su na dobivene rezultate utjecali neki drugi čimbenici koji su ometali vežanje metala na hDPP III, npr. vežanje iona bakra na pufer ili na zaostali histidinski privjesak. Drugi potencijalni razlog za ovu razliku je osim vežanja Cu^{2+} u inhibitorno vezno mjesto i visok afinitet Cu^{2+} za vezno mjesto u donju domenu hDPP III.

Tablica 5. ITC rezultati reverznih titracija u 50 mM natrijevom kakodilatnom puferu pH 7,4.

	n	$K_d / \mu\text{M}$	$\Delta_r H / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta_r G / \text{kJ mol}^{-1}$	$-T \Delta_r S / \text{kJ mol}^{-1}$	Pretpostavljeno vezno mjesto
Zn^{2+}	$2,470 \pm 0,170$	$3,50 \pm 1,99$	$14,6 \pm 4,5$	$-31,4 \pm 1,6$	$-45,9 \pm 3,0$	dodatno
Cu^{2+}	$1,713 \pm 0,131$	$0,984 \pm 0,292$	$-23,5 \pm 3,1$	$-34,4 \pm 0,8$	$-11,0 \pm 3,6$?
Co^{2+}	$0,616 \pm 0,042$	$0,720 \pm 0,193$	$44,5 \pm 0,9$	$-35,2 \pm 0,6$	$-79,6 \pm 1,6$	aktivno
Mn^{2+} (1)						
Mn^{2+} (2)	$0,442 \pm 0,013$	$0,945 \pm 0,091$	$52,2 \pm 1,5$	$-34,5 \pm 0,2$	$-86,6 \pm 1,2$	dodatno



Slika 27. Signature plot - Gibbsova energija plavo, entalpija zeleno i entropija crveno prikazani su (slijeva na desno) za izravnu (metal na protein), odnosno obrnutu (protein na metal) titraciju za Zn^{2+} (A), Cu^{2+} (B), Co^{2+} (C) i Mn^{2+} (D).

Konačne vrijednosti K_d dane su u tablici 6. Ioni kobalta vezali su se samo u aktivno mjesto, a nM vrijednost konstante disocijacije K_d u skladu je s vrijednostima dobivenim fluorimetrijskom analizom. Vrijednosti K_d za vezanje cinka i bakra na inhibitorno vezno mjesto su reda veličine 10^{-7} M odnosno 10^{-8} M. Ti su afiniteti četiri reda veličine niži od fluorimetrijski izmjerenih afiniteta za katalitičko mjesto.

Tablica 6. Konstante disocijacije vezanja iona metala na hDPP III, određene ITC-om.

Ion metala	pufer	K_d / M	$\log K_{MB}$	Q_{MB}	K_d / M	Vezno mjesto
Zn^{2+}	Na-kakodilat	$9,6 \times 10^{-7}$	2,14	8,0	$1,2 \times 10^{-7}$	dodatno
Zn^{2+}	MOPS-NaOH	$8,8 \times 10^{-6}$	3,22	84	$1,0 \times 10^{-7}$	dodatno
Cu^{2+}	MOPS-NaOH	$5,5 \times 10^{-6}$	3,8	313	$1,8 \times 10^{-8}$	dodatno
Co^{2+}	Na-kakodilat	$1,3 \times 10^{-7}$	2,27	10,4	$1,3 \times 10^{-8}$	aktivno

Mjerenja izravne i reverzne titracije na ITC-u su ponovljena u 50 mM MOPS-NaOH puferu, pH 7,4 za Zn^{2+} i Cu^{2+} (tablica 7). Rezultati za bakar se kao i u slučaju mjerenja u kakodilatnom puferu nisu slagali s rezultatima mjerenja direktnom-izravnom titracijom. U reverznoj titraciji nije bilo moguće odrediti stehiometrijski broj vezanja bakra na protein. Međutim, parametri izmjereni u izravnoj titraciji u oba pufera su u skladu, s najvećom razlikom uočenom u stehiometriji ($n = 1,2$ u natrijevom kakodilatnom puferu i $n = 0,8$ u MOPS-NaOH).

Tablica 7. ITC rezultati - Zn^{2+} i Cu^{2+} u 50 mM MOPS puferu pH 7,4, vrijednosti izravne i reverzne titracije.

	N	$K_d / \mu\text{M}$	$\Delta_r H / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta_r G / \text{kJ mol}^{-1}$	$-T \Delta_r S / \text{kJ mol}^{-1}$	Pretpostavljeno vezno mjesto
izravna						
Zn^{2+}	$1,505 \pm 0,293$	$8,768 \pm 4,213$	$19,9 \pm 6,9$	$-29,0 \pm 1,5$	$-49,0 \pm 5,8$	dodatno
Cu^{2+}	$0,800 \pm 0,096$	$5,450 \pm 1,446$	$-49,7 \pm 6,1$	$-30,1 \pm 0,7$	$19,6 \pm 5,6$	dodatno
reverzna						
Zn^{2+}	$2,663 \pm 0,153$	$1,750 \pm 0,827$	$6,2 \pm 2,0$	$-33,0 \pm 1,1$	$-39,7 \pm 0,3$	dodatno
Cu^{2+}		$8,080 \pm 5,117$?

4.1.5.1.

Mutanti

ITC mjerenja provedena su i na tri mutanta hDPP III: E508D, H455Y i dvostrukom mutantu E316A H568Y kako bi se testirala predviđanja o aminokiselinskim ostacima koji tvore dodatno vezno mjesto. Rezultati nisu pokazali značajnu razliku u vezivanju iona cinka na divlji tip i mutante hDPP III, ni u stehiometriji, ni u K_d vrijednostima (tablica 8). Međutim, K_d vrijednost se značajno povećala za ione bakra (tablica 9) što sugerira da se rezultati izravnih titracija s divljim tipom mogu protumačiti kao vezanje Cu^{2+} na dodatno vezno mjesto (podaci u tablici 4). U obrnutoj titraciji s Cu^{2+} , vjerojatno je izmjerena nepoznata, kompetitivna interakcija metala s puferom.

Tablica 8. ITC rezultati – izravne titracije mutanti i Zn^{2+} . Vrijednosti termodinamičkih parametara za interakcije Zn-protein s hDPP III mutantima pomoću ITC-a u 50 mM natrijevog kakodilatnog pufera pH 7,4. Podaci za divlji tip dani su radi usporedbe.

	N	$K_d / \mu M$	$\Delta_r H / kJ mol^{-1}$	$\Delta_r G / kJ mol^{-1}$	$-T \Delta_r S / kJ mol^{-1}$
Divlji tip	$1,46 \pm 0,072$	$0,957 \pm 0,829$	$17,9 \pm 2,3$	$-34,2 \pm 1,4$	$-52,1 \pm 1,0$
E508D	$1,313 \pm 0,274$	$1,873 \pm 0,278$	$19,3 \pm 2,8$	$-32,7 \pm 0,4$	$-52,0 \pm 2,9$
E316A H568Y	$1,817 \pm 0,131$	$2,887 \pm 1,654$	$16,1 \pm 4,8$	$-32,0 \pm 1,5$	$-48,1 \pm 3,3$
H455Y	$1,370 \pm 0,056$	$2,147 \pm 0,455$	$18,9 \pm 3,3$	$-32,4 \pm 0,6$	$-51,4 \pm 3,8$

Tablica 9. ITC rezultati – izravne titracije mutanti i Cu^{2+} . Vrijednosti termodinamičkih parametara za interakcije Cu-protein s hDPP III mutantima pomoću ITC-a u 50 mM natrijevog kakodilatnog pufera pH 7,4. Podaci za divlji tip dani su radi usporedbe.

	N	$K_d / \mu M$	$\Delta_r H / kJ mol^{-1}$	$\Delta_r G / kJ mol^{-1}$	$-T \Delta_r S / kJ mol^{-1}$
Divlji tip	$1,23 \pm 0,095$	$2,393 \pm 0,663$	$-49,8 \pm 0,3$	$-32,2 \pm 0,7$	$17,6 \pm 0,5$
E508D	$0,697 \pm 0,134$	$8,127 \pm 4,684$	$-91,8 \pm 11,6$	$-29,3 \pm 1,4$	$62,6 \pm 12,8$
E316A H568Y	$0,751 \pm 0,507$	$14,2 \pm 2,2$	$-87,5 \pm 15,2$	$-27,7 \pm 0,4$	$59,8 \pm 15,5$
H455Y		$32,3 \pm 4,6$			

4.2. Računalni pristup

4.2.1. Rezultati kvantno mehaničkih računa

Korišteni su QM izračuni na pojednostavljenim modelima metalnog centra hDPP III kako bi se odredilo mogu li drugi dvovalentni kationi kao što su Cu^{2+} , Co^{2+} i Mn^{2+} zamijeniti nativni cink i kako prisutnost molekula vode i aminokiselinskih ostataka druge koordinacijske sfere

utječe na ovaj proces. Budući da se pokazalo da veće koncentracije ovih iona metala inhibiraju enzimatsku aktivnost hDPP III, proučavano je vezanje po dva metala iste vrste, Zn^{2+} i Cu^{2+} , u aktivno mjesto enzima, pri čemu je drugi ion metala vezan u dodatno (pretpostavljeno inhibitorno) vezno mjesto smješteno u neposrednoj blizini veznog mjesta katalitičkog iona.

Odabrane udaljenosti u strukturama između aminokiselina, metala i molekula vode koje aproksimiraju aktivno mjesto hDPP III: model 1, model 2, model 3 i model 4 (slika 13) s ionima metala (Zn, Cu, Co i Mn) prije (I) i nakon optimizacije geometrije dane su u tablicama 10-13, a prikazane su ångströmom, Å.

Tablica 10. Odabrane udaljenosti u modelu 1 s ionima metala (Zn, Cu, Co i Mn) prije (I) i nakon optimizacije.

Model1	<i>I</i>	<i>Zn</i>	<i>Cu</i>	<i>Co</i>	<i>Mn</i>
M-H450	2,0	2,0	2,0	2,0	2,1
M-H455	2,1	2,0	2,0	2,0	2,1
M-E508	2,1	2,1	2,0	2,0	2,1
M-w1	2,0	2,0	2,3	2,1	2,1
E508-w1	3,6	1,6	3,0	1,7	1,6

Tablica 11. Odabrane udaljenosti u modelu 2 s ionima metala (Zn, Cu, Co i Mn) prije (I) i nakon optimizacije.

Model2	<i>I</i>	<i>Zn</i>	<i>Cu</i>	<i>Co</i>	<i>Mn</i>
M-H450	2,0	2,0	2,0	2,0	2,1
M-H455	2,0	2,0	2,0	2,0	2,1
M-E508	2,0	2,0	2,1	2,0	2,1
M-w1	2,1	2,0	2,3	2,0	2,1
E508-w1	1,6	1,6	2,9	1,6	1,6

Tablica 12. Odabrane udaljenosti u modelu 3 s ionima metala (Zn, Cu, Co i Mn) prije (I) i nakon optimizacije.

Model3	<i>I</i>	<i>Zn</i>	<i>Cu</i>	<i>Co</i>	<i>Mn</i>
M-H450	2,0	2,0	2,0	2,1	2,1
M-H455	2,1	2,0	2,0	2,1	2,1
M-E508	2,1	2,0	2,3	2,1	2,2
M-w1	2,0	3,4	2,1	2,3	2,3
M-w2	2,5	3,1	2,8	2,2	2,2
M-w3	2,2	2,1	2,0	2,3	2,3
E508-w1	3,6	4,5	3,5	1,8	1,6
E508-w3	1,2	1,6	1,5	1,8	1,6

Tablica 13. Odabrane udaljenosti u modelu 4 s ionima metala (Zn, Cu) prije (I) i nakon optimizacije.

Model4	<i>I</i>	<i>2Zn</i>	<i>2Cu</i>
MA-MI	4,2	5,5	5,2
MA-H450	2,0	2,1	2,0
MA-H455	2,1	2,1	2,0
MA-E508	2,0	2,0	1,9
MI-E508	2,1	3,6	3,8
MI-H568	2,1	2,0	1,9
MI-Y318	2,3	2,1	2,2
MA-w1	2,0	1,9	2,1
MI-w2	2,3	2,0	2,0
MI-w3	2,2	1,9	1,8
E451-w1	1,6	2,6	1,7
E316-w2	1,6	1,8	1,8
E316-w3	1,8	2,6	1,0

Kako bi odredili relativni afinitet iona metala Cu^{2+} , Co^{2+} i Mn^{2+} u odnosu na afinitet nativnog iona metala Zn^{2+} prema aktivnom mjestu hDPP III, izračunate su relativne Gibbsove slobodne energije prema jednadžbi 35, uz $\epsilon_1 = 4$ i SMD, a rezultati prikazani u tablici 14.

$$\Delta G = \Delta G ([\text{M1}+\text{P}]) - \Delta G ([\text{M2}+\text{P}]) - \Delta G ([\text{M1}+\text{voda}]) + \Delta G([\text{M2}+\text{voda}]) \quad (35)$$

gdje je M1 Cu^{2+} , Co^{2+} ili Mn^{2+} , M2 Zn^{2+} , a P protein.

Tablica 14. Relativne Gibbsove slobodne energije (u usporedbi sa Zn^{2+}) metala za mjesto vezivanja hDPP III. Izračuni su izvedeni prema jednadžbi 35, korištenjem tri modela različite složenosti za aproksimaciju aktivnog mjesta proteina. A) prikaz izračuna s $\epsilon = 4$, B) optimizacija energije u vakuumu praćena izračunom energije s $\epsilon = 78$.

Ion metala (M^{2+})	Relativni afinitet / kcal mol ⁻¹		
A			
	Model 1	Model 2	Model 3
Cu^{2+}	-5,65	0,63	-2,51
Co^{2+}	3,77	4,39	-31,38
Mn^{2+}	11,30	15,06	33,89
B			
Cu^{2+}	-10,67	-4,39	2,51
Co^{2+}	5,02	-1,26	9,41
Mn^{2+}	12,55	13,18	25,1

Relativna Gibbsova slobodna energija za vezanje Cu na inhibitorno aktivno mjesto kada je aktivno mjesto zauzeto, izračunata prema jednadžbi (36) je 28,68 kcal mol⁻¹:

$$\Delta G = \Delta G ([2M1+P]) - \Delta G ([2M2+P]) - \Delta G ([M1+P]) - \Delta G ([M1+voda]) + \Delta G ([M2+P]) + \Delta G([M2+voda]) \quad (36)$$

gdje je M1 Cu^{2+} , Co^{2+} ili Mn^{2+} , M2 Zn^{2+} , a P protein.

4.2.2. Rezultati MD simulacije s dva iona cinka vezana u aktivno mjesto hDPP III

1. Modeli s cinkom

Za potrebe MD simulacija hDPP III s aktivnim mjestom u koji su vezana dva iona cinka [83] korišteni su ranije razvijeni 6-12 parametri za ione cinka [84] s modificiranim nabojima na ionima metala i katalitičkom glutamatu E451, te parametri koji koriste lažne atome na koje je preraspodijeljen dio naboja iona metala, a temelji se na modelu lažnog atoma (tzv. 'dummy atom model') kojeg je razvila Duarte i sur. [85] (tablica 15), model D1. U modelu lažnog

atoma (model D2) cinkov ion zamijenjen je sa šest kationskih lažnih atoma (nevidljivi su za van der Waalsove interakcije) kovalentno vezanih na središnji atom kojem su pridruženi van der Waalsovi parametri cinka. [63] (tablica 15).

Tablica 15. Model iona metala korišten u ovom radu D2 uspoređen sa predloškom modela D1.

Model	naboji				
	Zn				E451
	Ukupan	središnja točka (nosi vdW parametre)	središnja točka (prenosi vdW parametre)	točke na x i y osi oktaedra	
D1	2	-1	0,5	0,5	
D2	1,325	-0,475	0,1	0,4	-0,65

4.2.2.1. MD simulacije hDPP III s dva iona cinka u aktivnom mjestu

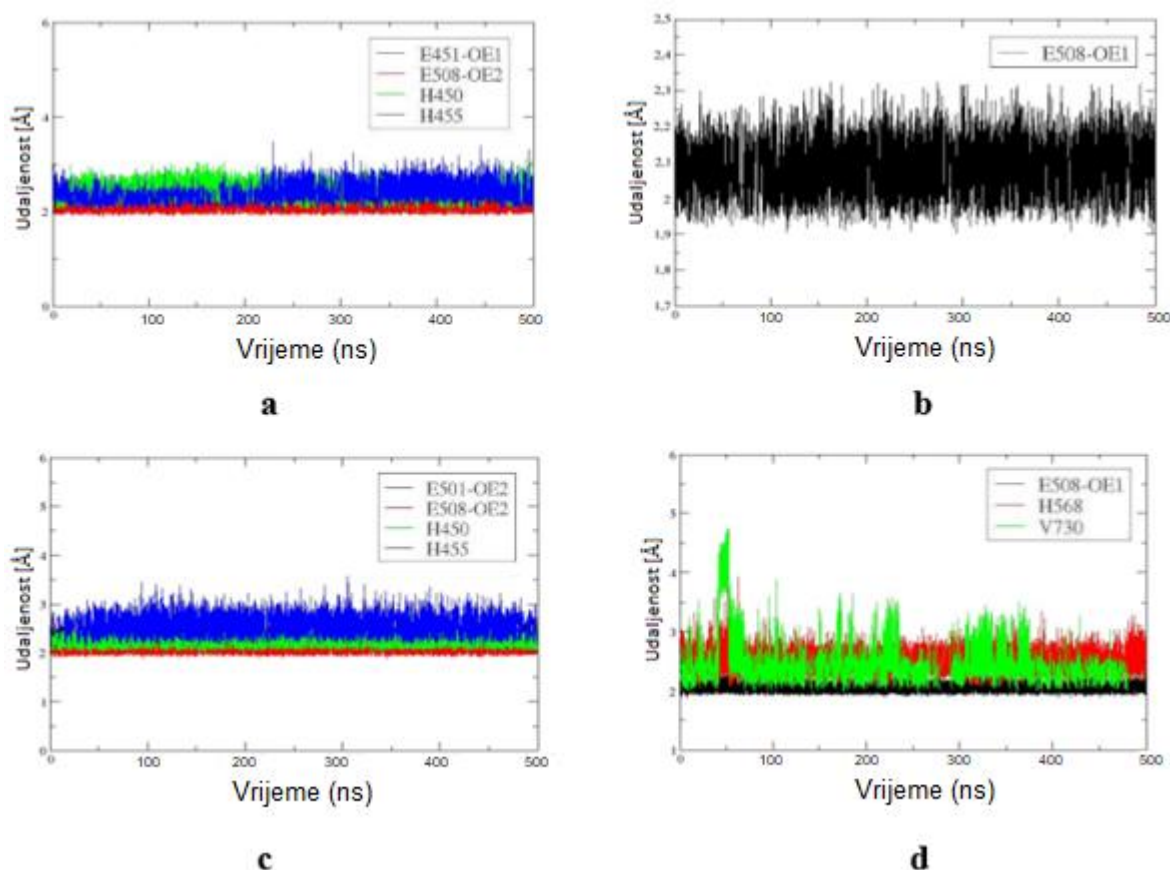
Provedene su MD simulacije s D1 i D2 modelima na S1 sustavu korištenjem različitih polja sile i solvatirani u vodenoj otopini s ionima Na⁺. Vrijednosti dobivene za strukture najzastupljenije tijekom pojedine MD simulacije dane su u tablici 16. Podebljanim slovima označeni su metalni ligandi prisutni u početnim strukturama. Energije MMGBSA izračunate su na dijelovima trajektorije gdje koordinacija iona metala odgovara najzastupljenijoj koordinaciji tijekom simulacije.

Tablica 16. Simulacije izvedene pomoću modela lažnih atoma (D1 i D2) za ione cinka.

	Model	$\langle \text{Zn}_A - \text{Zn}_I \rangle$ (Å)	ZnA ligand	ZnI ligand	MMGBSA(kcal/mol)		
					Receptor: hDPP III Ligand: ZnA + ZnI	Receptor: hDPP III Ligand: ZnA	Rec: hDPP III + ZnA Ligand: ZnI
D1	S1 ff14SB	$\langle \text{Zn}_A - \text{Zn}_I \rangle$ (Å)	H450, H455, E508^M, E451^M	H568, E316^B, E508^M, Y315	-292 ± 11	-164 ± 6	-108 ± 7
	S1 ff03	5,4 ± 0,1 51% 5,1 ± 0,1 49%	H450, H455, E508^M, E451^M	E316 ^M , E508^M, H568	-320 ± 8	-187 ± 6	-121 ± 6
D2	S1 ff03	3,5 ± 0,2	E508^M, H450, H455	E316 ^M , E508^M	-144 ± 6	-80 ± 5	-47 ± 7
	S1 ff03	4,9 ± 0,5	E508^M, H450, H455	E316 ^M , E508^M, H568	-166 ± 8	-81 ± 5	-50 ± 10
	S1 ff14SB	5,4 ± 0,3	H450, H455, E508^M	E316 ^M , E508^M	-122 ± 8	-67 ± 5	-48 ± 7
	S2 ff14SB	4,7 ± 0,5	H450, H455, E508^M	E316^M, E508^M	-116 ± 7	-68 ± 5	-43 ± 5
	S1 ff14SB	4,1 ± 0,3	H450, H455, E508^M	E508^M	-102 ± 9	-69 ± 4	-23 ± 6
	S1 ff14SB	4,7 ± 0,1	H450, H455, E508^M, E451^M	H568, E508^M, V730	-160 ± 7	-96 ± 5	-57 ± 5
	CPLX1 ff14SB	5,2 ± 0,3	H450, H455, E508^{M,B}, E451	E508^M	-114 ± 7	-93 ± 5	-18 ± 4
	CPLX2 ff14SB	5,4 ± 0,3	H450, H455, E508^{M,B}	H568, E508^{M,B} °HM-O2 nd	-150 ± 8	-85 ± 5	-39 ± 4

4.2.2.2. MD simulacije kompleksa hDPP III s dva iona cinka u aktivnom mjestu s peptidom IVYPW

Simulirane su dvije početne strukture hDPP III (s dva cinka) – IVYPW kompleksa, CPLX1 i CPLX2 [63] korištenjem D2 modela za ion cinka. U strukturi CPLX1, ZnA je koordiniran s H450, H455 i E508, dok je ZnI koordiniran s Y318, E508, H568 (slika 14). U CPLX2 ZnA je koordiniran s H450, H455, E508, E451 i jednom molekulom vode, dok je ZnI koordiniran s H458 i E508 (monodentantno ili bidentantno) te s kisikom karbonilne skupine druge aminokiseline peptidnog liganda i s dvije molekule vode (slika 28). Zanimljivo je da je E451 ušao u ZnA koordinacijsku sferu već tijekom ekvilibracije CPLX1. S druge strane, u ranoj fazi MD simulacija CPLX2, E451 je izašao, a E508 je ušao u koordinacijsku sferu ZnA, odnosno ZnI. Bočni lanac Y318 se zarotirao i udaljio od iona metala dok je ligand ostao blizu svog početnog položaja, vezan antiparalelno za peterolančanu beta ploču iz donje (nekatalitičke) proteinske domene, i u većini simulacija koordinira ZnI.



Slika 28. Koordinacija iona cinka tijekom 500 ns MD simulacija CPLX1 (a i b) i CPLX2 (c i d) u slučaju kad je za parametrizaciju (prikaz) iona cinkovih iona korišten D2 model.

Srednje udaljenosti cinkovih iona ZnA i ZnI, prevladavajući oblik koordinacije i srednje energije vezanja oba i svakog pojedinog iona cinka u aktivno mjesto hDPP III tijekom MD simulacija kompleksa hDPP III strukture s dva cinkova iona i peptida IVYPW dani su u tablici 17, za strukture (koordinacija iona metala) koje su bile najviše zastupljene tijekom MD simulacije. MMGBSA energije također su izračunate na dijelovima trajektorije gdje koordinacija iona metala odgovara najzastupljenijoj koordinaciji tijekom simulacije.

Tablica 17. Simulacije izvedene pomoću modela lažnih atoma D2 za ione cinka.

	Model	$\langle \text{ZnA} - \text{ZnI} \rangle$ (Å)	ZnA ligand	ZnI ligand	MMGBSA (kcal/mol)		
					Receptor: hDPP III Ligand: ZnA + ZnI	Receptor: hDPP III Ligand: ZnA	Rec: hDPP III+ ZnA Ligand: ZnI
D2	CPLX1	5,2±0,3	H450, H455, E508, E451	E508	-114±7	-93±5	-18±4
	CPLX2	5,4±0,3	H450, H455, E508	H568, E508	-150±8	-85±5	-39±4

Strukture proteina oba modela CPLX1 i CPLX2 vrlo su stabilne tijekom MD simulacija. RMSD je uglavnom oko 1,5 Å i Rgyr između 25,0 Å i 25,5 Å (vidi slike u dodatku 42-45). Možemo zaključiti da vezanje dodatnog iona cinka učvršćuje strukturu proteina. Podebljanim slovima označene su aminokiseline koje koordiniraju ione cinka u početnoj konformaciji.

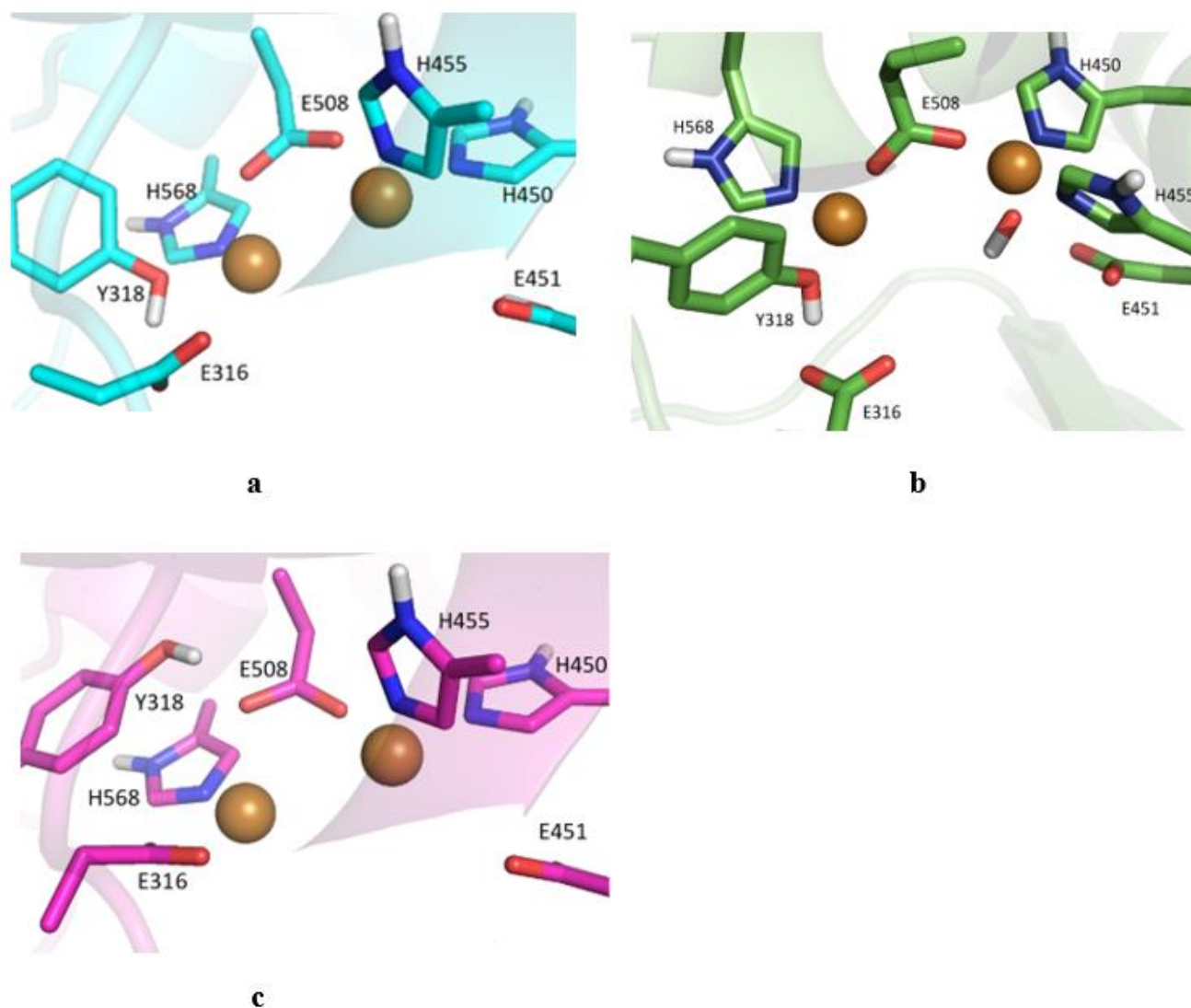
4.2.3. Rezultati MD simulacija hDPPP s dva iona bakra vezana u aktivno mjesto

Provedene su MD simulacije optimiziranih struktura proteina hDPP III s dva iona bakra kako bi se istražila relativna stabilnost različitih hDPP III struktura s dva iona metala i istražilo vezanje iona bakra na hDPP III. Simulacije su provedene za tri različita načina vezanja iona bakra u aktivno mjesto, S1, S1' i S2 (slika 29). Ukupno je provedeno oko 4 μs MD simulacija s tri različite početne strukture hDPP III s po dva iona bakra (tablica 18 i slika 29) u aktivnom

mjestu. U svima strukturama Cu1 (Cu1 označava ion bakra vezan na mjesto katalitičkog iona cinka, a Cu2 ion bakra u pretpostavljenom inhibitornom veznom mjestu) se nalazi na položaju katalitičkog iona cinka i koordiniran je s H450, H455 i E508. U SM1 strukturi Cu2 je koordiniran s Y318, H568 i E508 čija karboksilna skupina premošćuje Cu1 i Cu2, dok je u strukturi SM2 Cu2 umjesto s Y318, koordiniran s E316. U strukturi SM1' Cu ioni su koordinirani s istim aminokiselinskim ostacima kao u modelu 1, ali su Cu1 i Cu2 uz E508 premošteni i sa OH- (slika 29).

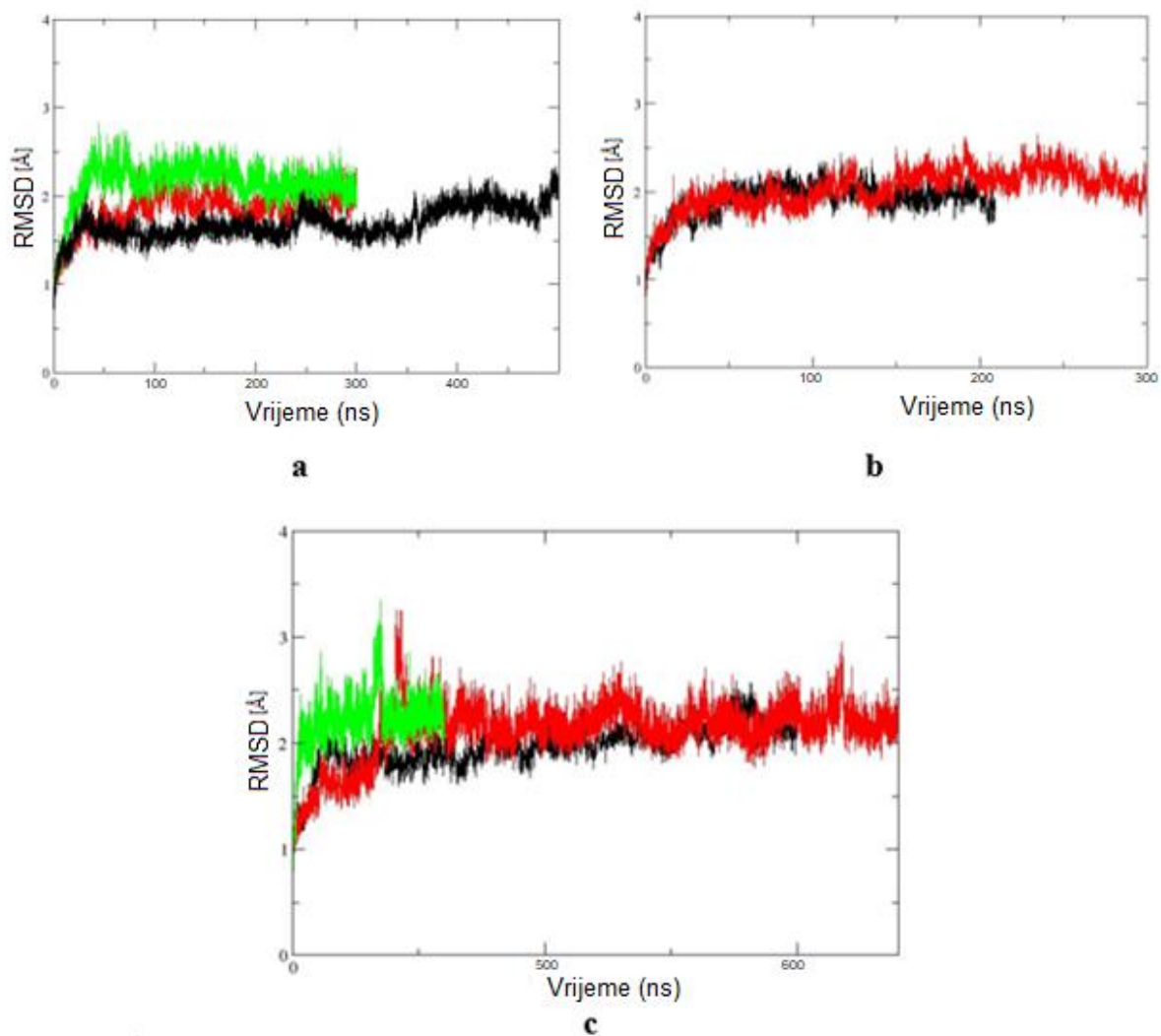
Tablica 18. Oznake za MD simulacija svake od navedenih struktura hDPP III s 2 iona bakra.

Oznaka simulacije (naziv strukture + broj replike)	Vrijeme (ns)
SM1-1	300
SM1-2	500
SM1-3	300
SM1'-1	300
SM1'-2	200
SM2-1	1200
SM2-2	300
SM2-3	1000

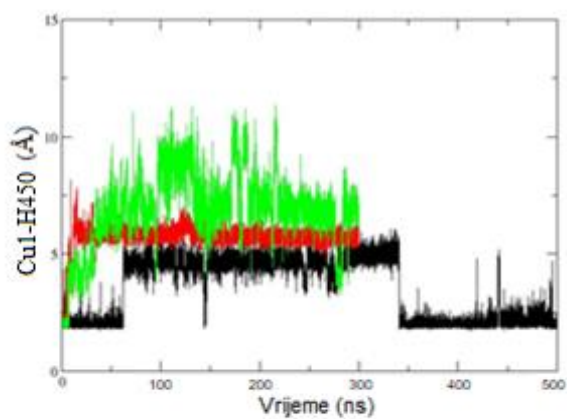


Slika 29. Strukture hDPP III s dva iona Cu dobivene nakon optimizacije i korištene u MD simulacijama: a) SM1, b) SM1' i c) SM2. Cu ioni prikazani su kao kuglice, a OH- i aminokiselinski ostaci koji koordiniraju ione metala kao štapić.

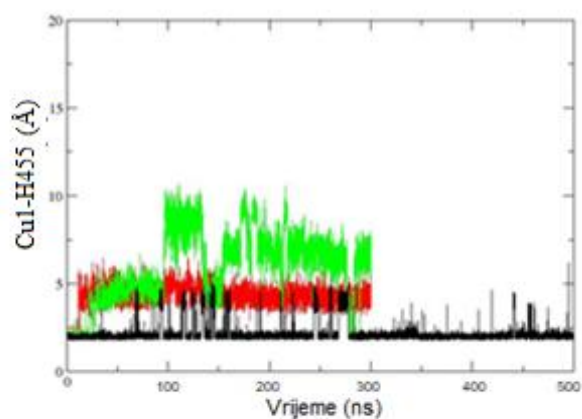
Proteinska okosnica svih struktura ostala je stabilna tijekom MD simulacija (slika 30), što ne vrijedi za početne položaje iona metala. Najveće fluktuacije iona Cu1 utvrđene su u strukturi SM1 (slika 31). U jednoj replici, SM1-3, Cu1 je napustio katalitičko mjesto (slika 31c), a u jednoj od tri simulirane replike ove strukture, SM1-1, Cu1 i Cu2 izmijenili su položaje (slika 32; ovo je bila jedina simulacija u kojoj je došlo do izmjene Cu iona).



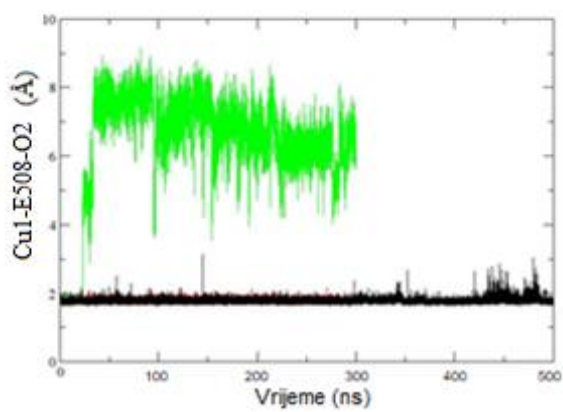
Slika 30. RMSD proteinske okosnice tijekom MD simulacija hDPP III s ionima bakra a) SM1-1 (crveno), SM1-2 (crno) i SM1-3 (zeleno), b) SM1'-1 (crveno), SM1'-2 (crno) i c) SM2-1 (crveno), SM2-2 (zeleno) i SM2-3 (crno).



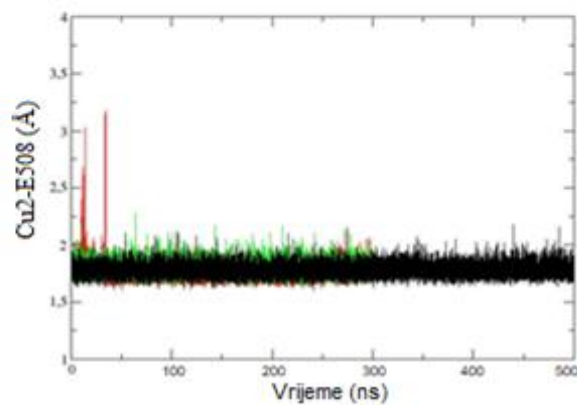
a



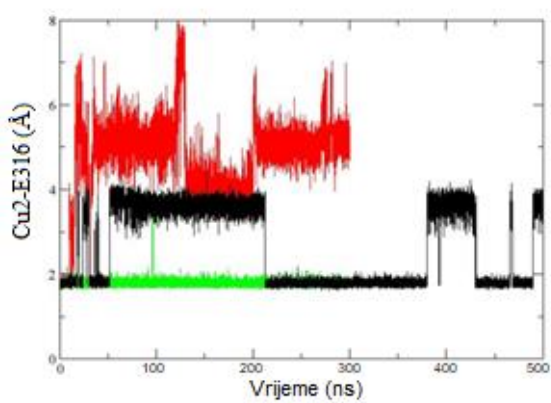
b



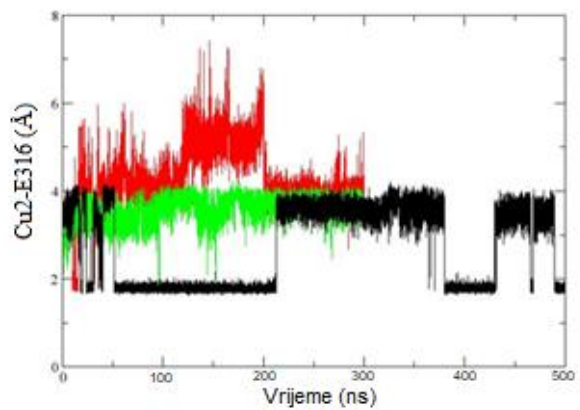
c



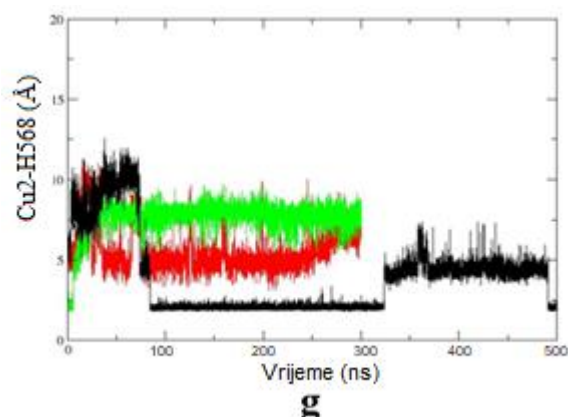
d



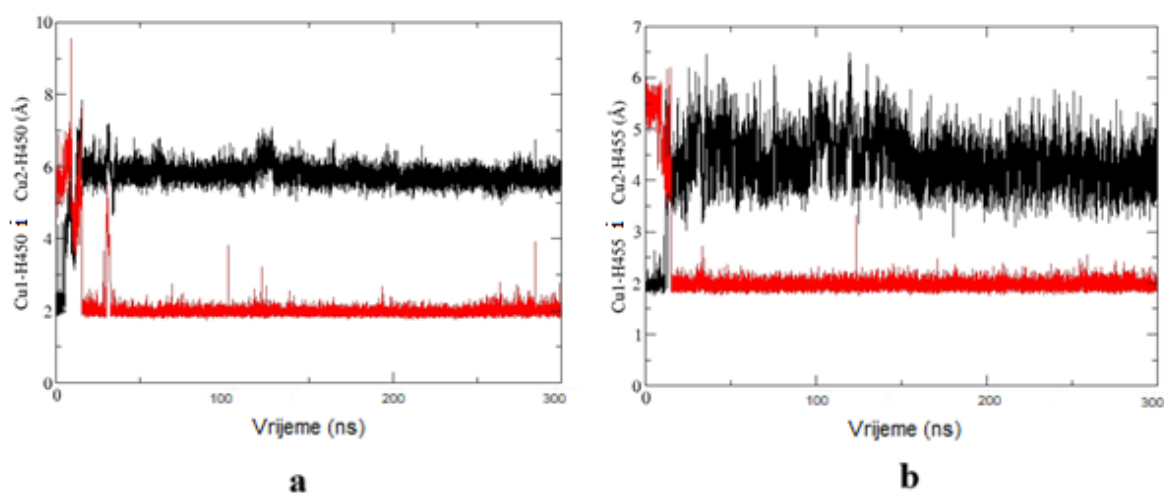
e



f



Slika 31. Koordinacija Cu1 (a-c) i Cu2 (d-g) tijekom MD simulacija replika SM1, SM1-1 (crveno), SM1-2 (crno) i SM1-3 (zeleno).

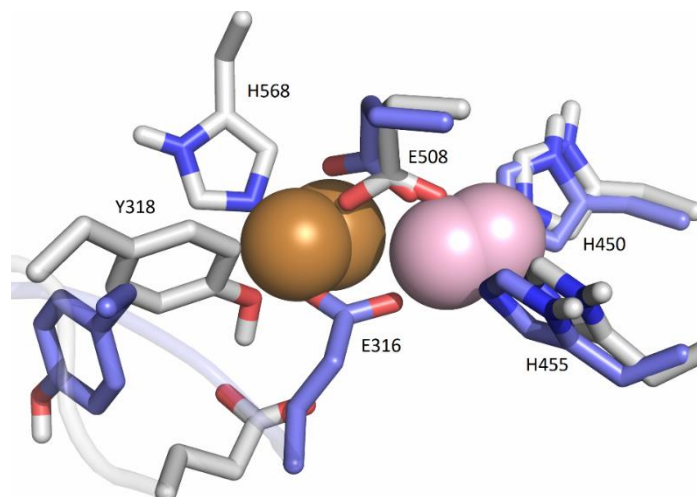


Slika 32. Izmjena položaja Cu1 (crveno) i Cu2 (crno) tijekom simulacije replike SM1-1, prikazano prema njihovoj udaljenosti od H450 (a) i H455 (b).

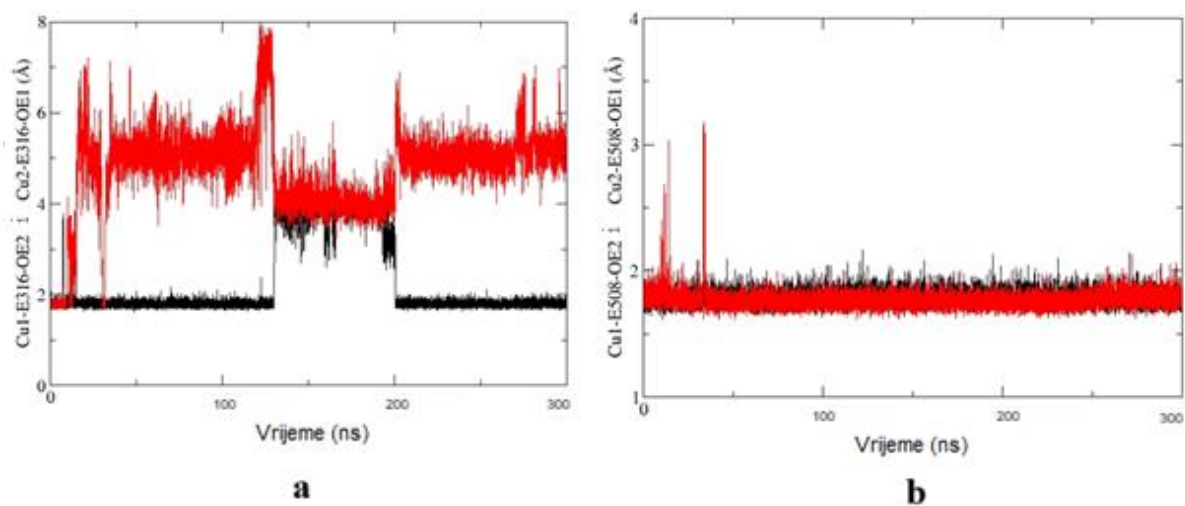
Izmjena Cu iona dogodila se tijekom prvih 15 ns MD simulacija (slika 32). Još tijekom ekvilibracije, aminokiseline Y318 i H568 izašle su iz koordinacijske sfere Cu2, a E316 je ušao u njegovu koordinacijsku sferu tako da premošćuje oba iona metala Cu1 i Cu2 (slika 33) i kao takav ostaje tijekom prvih 10 ns MD simulacija (slika 34). Tijekom sljedećih 5 ns, Cu2 se udaljio od E316, dok se E508, koji je koordinirao oba iona metala tijekom simulacije (slika 34), zarotirao za oko 160° oko C β -C γ veze (kut C α -C β -C γ -C δ se promijenio s 80° na -80° , slika 35) i Cu1 i Cu2 su zamijenili položaje (slika 36).

Tablica 19. Prosječne LIE energije (elektrostatička + vdw) u kcal/mol tijekom naznačenog vremena simulacije.

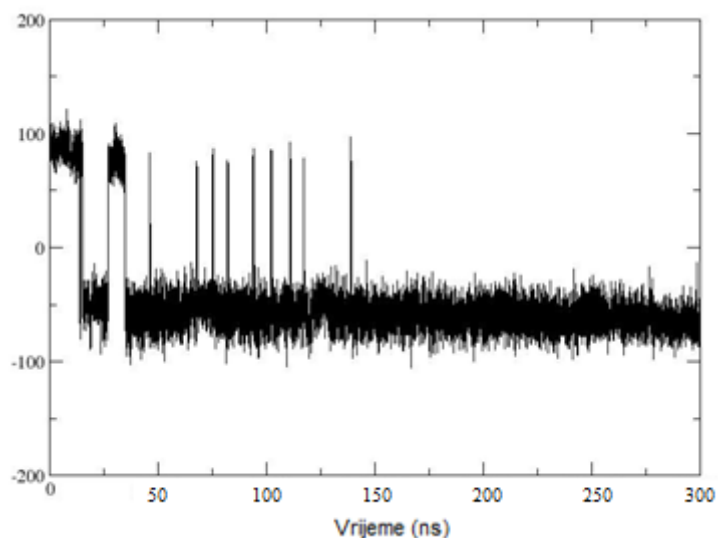
	Prosjek P - 2Cu	SD	Prosjek PCu1-Cu2	SD	Prosjek P - Cu1	SD
SM1-1 0,3 μ s	-121	6	-45	3	-60	4
SM1-2 0,5 μ s	-123	8	-46	5	-61	8
SM1-3 0,3 μ s	-94	14	-42	4	-40	12
SM1'-1 0,3 μ s	-95	8	-20	6	-53	3
SM1'-2 0,2 μ s	-112	7	-31	5	-55	3
SM2-1 1,2 μ s	-113	5	-58	6	-55	3
SM2-2 0,3 μ s	-115	15	-53	15	-61	3
SM2-3 1,0 μ s	-107	8	-52	13	-55	3



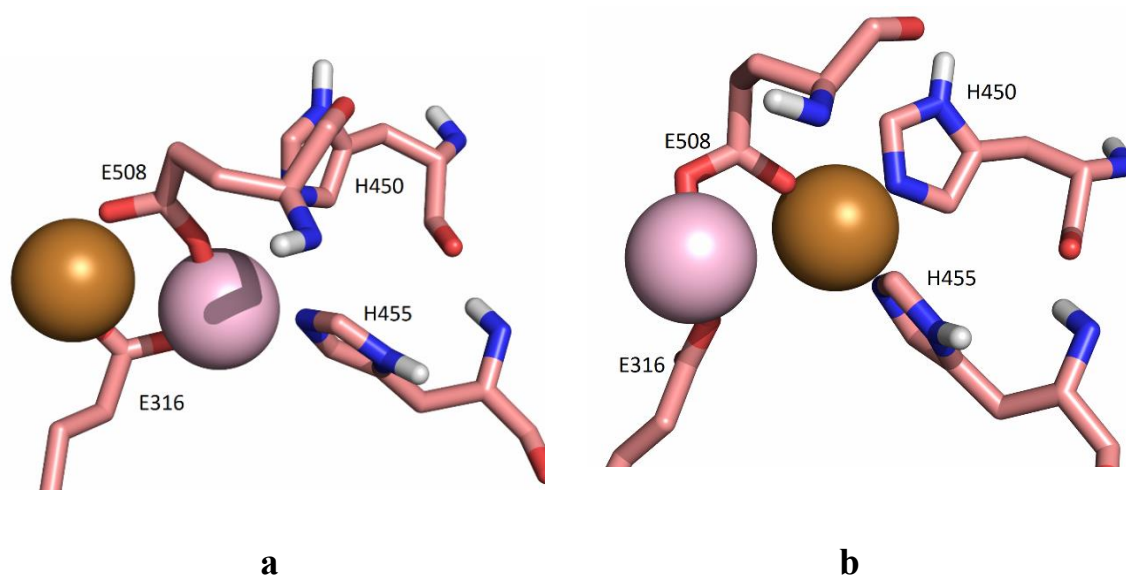
Slika 33. Koordinacija Cu1 (svijetlo rozo) s Cu2 (narančasta) u strukturi SM1: početna, predstavljena kao bijeli štapići, i nakon ekvilibracije (plavi štapići).



Slika 34. Koordinacija Cu1 (crveno) i Cu2 (crno) s (a) E316 i (b) E508 tijekom MD simulacija replike SM1-1.



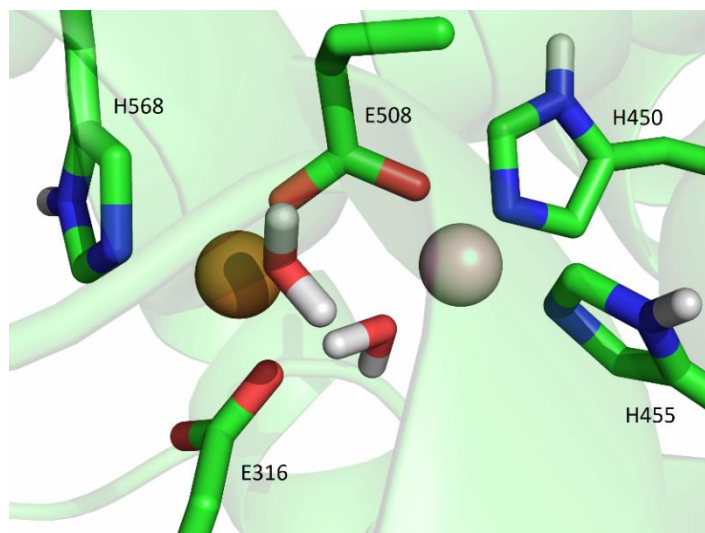
Slika 35. Vrijednosti kuta $C\alpha-C\beta-C\gamma-C\delta$ u E508 tijekom MD simulacija SM1 replike SM1-1.



Slika 36. Koordinacija Cu1 (svijetlo roza) i Cu2 (narančasta) s proteinskim ostacima u strukturama dobivenim nakon (a) 3 ns i (b) 20 ns, MD simulacija strukture SM1 na sobnoj temperaturi, replika SM1-1 (molekule vode nisu prikazane radi jasnoće).

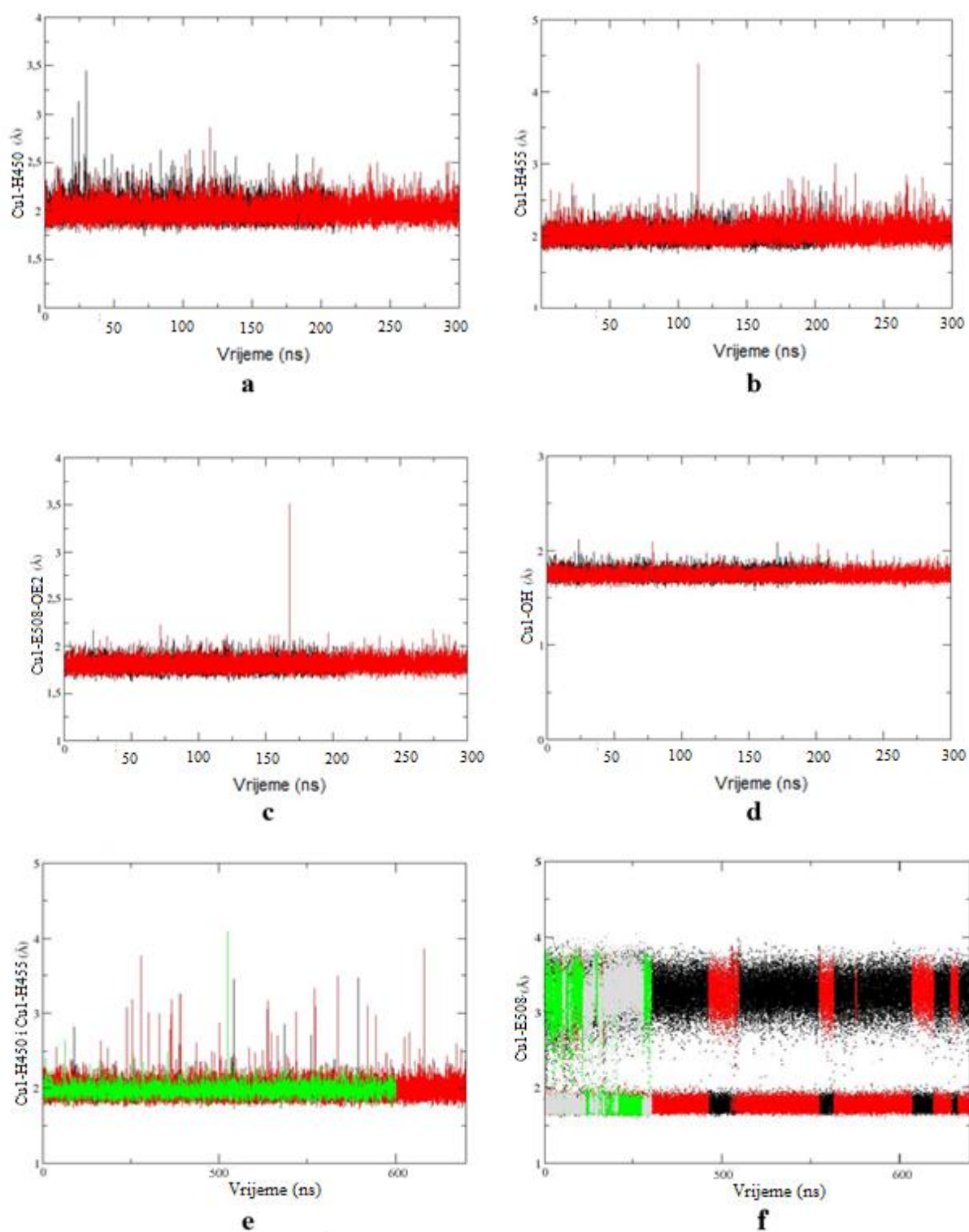
Tijekom simulacije druge replike SM1-2 Cu1 je stalno ostao blizu svog početnog položaja, aminokiseline H455 i E508 su ga koordinirale tijekom cijele simulacije, ali H450 se zarotirao približno 100° oko $C\beta-C\gamma$ veze nakon oko 70 ns (kut $C\alpha-C\beta-C\gamma-C\delta$ se promijenio s približno

-73° na 25°), i nije bio koordiniran s Cu1 tijekom sljedećih 250 ns. Međutim, nakon otprilike 330 ns MD simulacije, vratio se u svoj početni položaj i tamo ostao do kraja simulacije (slike 31 i 37).



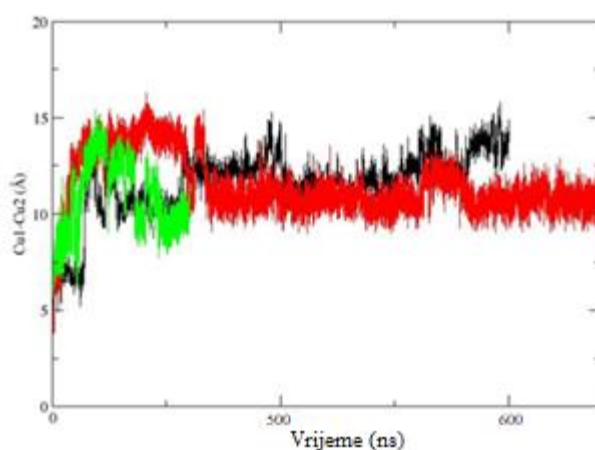
Slika 37. Koordinacija Cu1 (siva sfera) i Cu2 (narančasta sfera) u konačnoj strukturi dobivenoj nakon 500 ns MD simulacija na sobnoj temperaturi, replika SM1-2.

U simulacijama struktura SM1' i SM2, Cu1 je ostao blizu svog početnog položaja tijekom simulacija, koordiniran s aminokiselinskim ostacima H450, H455 i E508 (slika 38) te hidrosidnim ionom u replici strukture SM1', odnosno molekulom vode u replici strukture SM2.

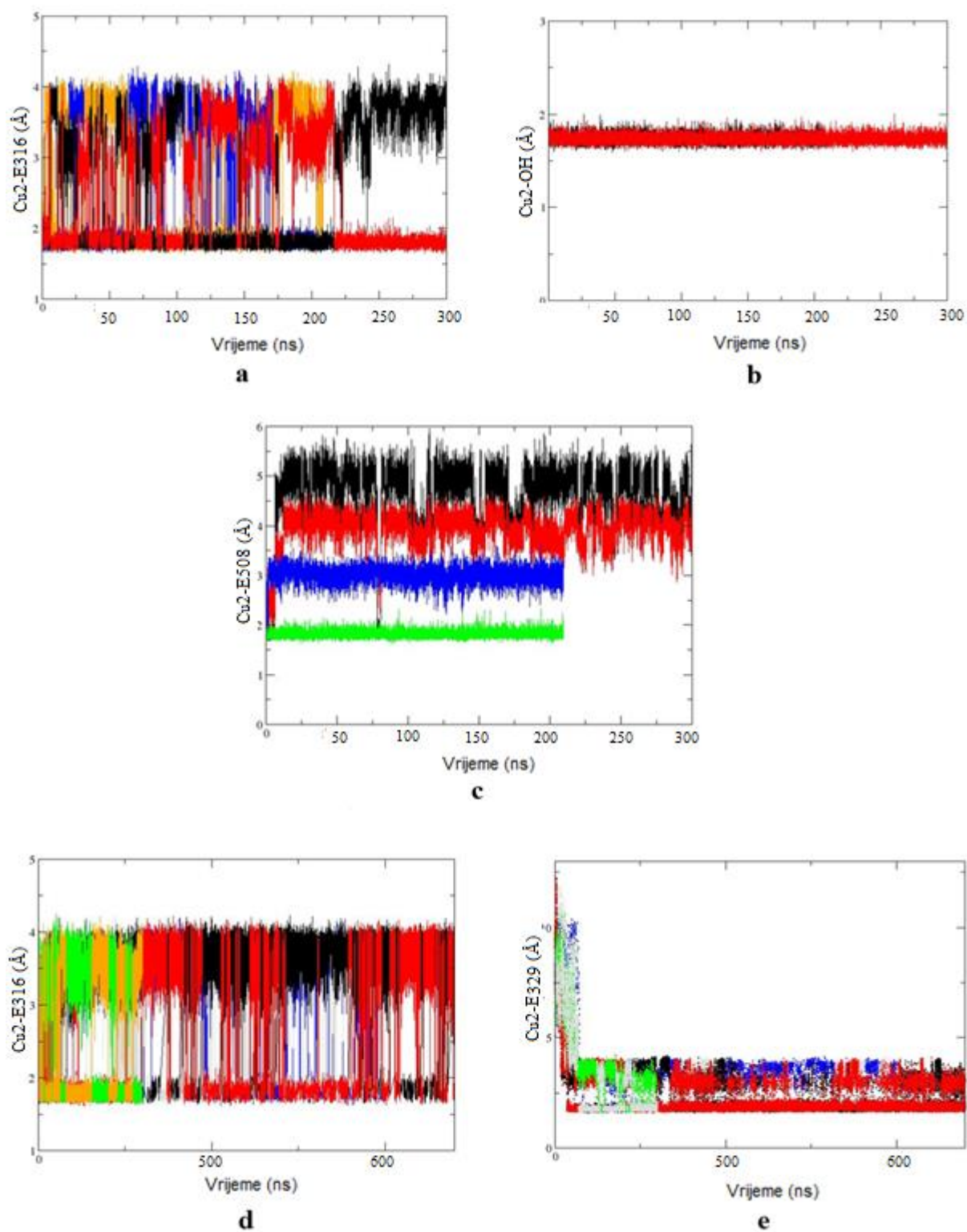


Slika 38. Koordinacija Cu1 tijekom MD simulacija SM1' replika (a-d; SM1'-1, crno obojeno i SM1'-2, crveno) i SM2 replika (SM2-1, SM2-2 i SM2-3) (e-f; SM2-1 crvena, SM2-2 zelena, SM2-3 crna).

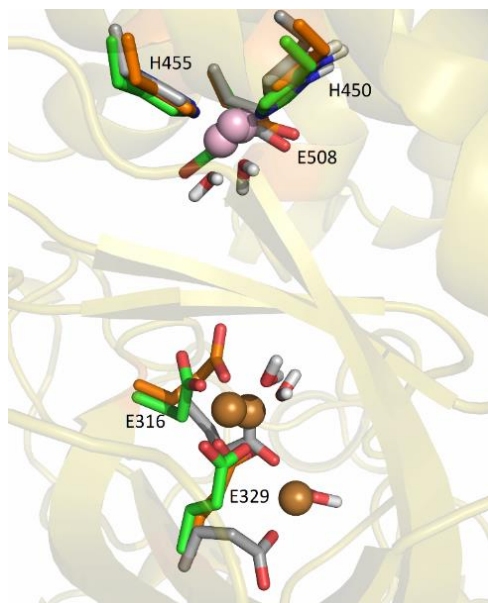
Fluktuacije u Cu2 bile su najveće u strukturi SM2. U sve tri replike ove strukture, Cu2 se pomaknuo prema donjoj domeni u smjeru ulaza u međudomensku pukotinu i smjestio se između E316 i E329 (slike 39, 40 i 41). Prema energijama interakcije PCu1-Cu2 izračunatim metodom LIE ovo je najpovoljniji način vezanja drugog iona bakra (tablica 19). U simulacijama replike SM2, ioni bakra uglavnom su bili tetra-koordinirani i, povremeno, penta-koordinirani (treba napomenuti da je interakcija iona metala s karboksilnom skupinom Glu ili monodentatna, m ili bidentatna, b). Cu1 je bio koordiniran s H450, H455, E508^m i jednom molekulom vode (povremeno, dvije molekule vode), a Cu2 je bio koordiniran s E316^m, E329^b i jednom molekulom vode u SM2-1 i SM2-2, a u replici SM2-3 s E316^m, E329^m i dvije molekule vode.



Slika 39. Udaljenost između Cu1 i Cu2 u simulacijama SM2 replika. Podaci koji se odnose na različite simulacije SM2 predstavljene su bojama SM2-1 crvena, SM2-2 zelena, SM2-3 crna.



Slika 40. Koordinacija Cu₂ tijekom MD simulacija replika SM1' (a-c; SM1'-1, crno i SM1'-2, crveno) i replika SM2 (SM2-1, SM2-2 i SM2-3) (d - e; SM2-1 crvena i crna, SM2-2 zelena i plava, SM2-3 žuta i siva).



Slika 41. Koordinacija Cu1 (svijetlo roza) i Cu2 (narančasta) u konačnim strukturama dobivenim MD simulacijama strukture SM2 na sobnoj temperaturi, replike SM2-1 (siva), SM2-2 (zelena) i SM2-3 (narančasta).

U simulacijama obje replike strukture SM1', ioni bakra ostali su blizu svojih početnih položaja, kao što je gore opisano. Cu1 u obje replike je koordiniran s H450, H455, E508^m i hidroksidom, dok je Cu2 u replici SM1'-1 koordiniran s E316^m, hidroksidom i dvije molekule vode, a u replici SM1'-2 Cu2 je koordiniran s E316^b, E508^m i hidroksidom (slika 40).

§ 5. ZAKLJUČAK

Eksperimentalna istraživanja spektroskopijom zaustavljenog protoka pokazala su da višak svih testiranih metala u odnosu na ekvimolarnu koncentraciju proteina dovodi do inhibicije enzima. Najveća aktivnost za sve metale izmjerena je neposredno prije ili u trenutku kada je omjer broja iona metala prema molekulama proteina dosegao vrijednost 1:1. Daljnje dodavanje iona metala rezultiralo je sličnim smanjenjem aktivnosti za sve ione metala. Primijećena je mala razlika između aktivacije proteina cinkom i drugim metalima: za Zn je aktivnost rasla sve dok omjer Zn i proteina nije dosegao 1:1, a zatim je opadala. Za druge ione metala, aktivnost je bila uglavnom konstantna (maksimalna) do omjera metala i proteina od 1:1, iznimka je Cu^{2+} u čijem slučaju je maksimum aktivnosti postignut pri omjeru Cu : protein od 1 : 10.

Rezultati K_d vrijednosti slažu se s prethodno objavljenim rezultatima, pri čemu je u našim istraživanjima hDPP III najveći afinitet, pikomolarni, pokazala prema Cu^{2+} , što je dva reda veličine veći afinitet nego prema Zn^{2+} , te tri reda veličine veći nego za Co^{2+} , koji je nanomolarni.

ICP-MS eksperimenti dali su jasne i ponovljive rezultate. Kada je hDPP III bila izložena koncentracijama iona metala od šest molarnih ekvivalenata, proteini su zadržali 1,1 iona cinka, 2,0 iona bakra i 0,3 iona kobalta dok je vezanje iona mangana bilo zanemarivo. Prisutnost dva iona bakra po molekuli proteina ukazuje na prisutnost drugog veznog mjesta metala u proteinu. Vezanje samo jednog iona cinka u odnosu na vezanje dva iona bakra, ukazuje na veći afinitet vezanja bakra te kinetički labilnije vezanje cinka u inhibicijsko mjesto. U ICP-MS mjerenjima nisu primijećene razlike između nativnih i apo proteina u određivanju iona metala - rezultati pokazuju da je u nativnom proteinu sadržaj iona metala vrlo nizak (do 10%), a eksperimentima spektroskopije zaustavljenog protoka maksimum aktivnosti enzima mjeren je pri ekvimolarnim koncentracijama iona metala. Ovo sugerira da proizvodnja rekombinantnog proteina u *E. coli*, barem prema protokolu koji je korišten, rezultira proteinom koji nije zasićen ionom metala.

ITC mjerenja otkrila su da se Co^{2+} veže samo u jedno vezno mjesto na hDPP III, vjerojatno u aktivno mjesto. Vrijednosti K_d dobivene na dva različita instrumenta, ITC mjerenjem i fluorimetrijski, vrlo dobro se slažu. Stehiometrijske vrijednosti za Zn^{2+} i Cu^{2+}

ukazale su na vezanje najmanje dva iona metala po molekuli proteina, što je dodatno potkrijepljeno slabim, ali mjerljivim vezanjem Mn^{2+} na dva vezna mjesta (necijelobrojna stehiometrijska vrijednost). Vezanje Zn^{2+} bilo je ponovljivo u izravnoj i reverznoj titraciji, s najvećom razlikom u stehiometriji, izmjerenoj kao $n = 1,5$ u izravnoj i $n = 2,5$ u reverznoj titraciji. Rezultati imunotestova sugeriraju da je rezidualni His-privjesak TEV proteaze vezanjem dva iona metala, mogao povećati izmjereni sadržaj iona metala u obrnutoj titraciji do 20% , što je vrlo blizu izmjerenoj vrijednosti u obrnutoj titraciji ukoliko pretpostavimo da su se na hDPP III vezala dva iona cinka. Za Cu^{2+} obrnuta titracija nije potvrdila izravnu titraciju, vjerojatno zbog interferirajućih reakcija s puferom ili His-privjeskom. Stoga te podatke nismo smatrali pouzdanima. Međutim, rezultati dobiveni za vezanje Cu^{2+} na mutant E508D i dvostruki mutant E316A i H568Y tj. izmjerene promjene K_d sugeriraju da se interakcija metala mjerena izravnom titracijom dogodila s proteinskom molekulom, u blizini katalitičkog mjesta vezivanja iona.

Fluorimetrijska mjerenja i kvantno mehanički izračuni pokazali su da se Cu veže s većim afinitetom za hDPP III nego Zn, a enzimska aktivnost Cu – hDPP III niža je od one za Zn – hDPP III.

Kalorimetrijska mjerenja otkrila su različite termodinamičke karakteristike za vezanje iona metala na hDPP III. Dok je vezanje iona bakra entalpijski kontrolirano, vezanje iona Zn i Co je entropijski kontrolirano. S druge strane, vezanje iona mangana u aktivnom mjestu je entalpijski kontrolirano, dok je vezanje na dodatno mjesto entropijski kontrolirano. Općenito, različiti doprinosi Gibbsovoj energiji u entalpiji i entropiji odgovaraju različitim načinima vezanja. Postoji nekoliko mogućih razloga za ove razlike, od kojih je jedan razlika u afinitetu iona metala za molekule pufera. Drugi potencijalni razlog za ovu razliku je visok afinitet Cu^{2+} za vezno mjesto u donjoj domeni hDPP III, što čini protein krućim nego vezanje drugog metala u blizini katalitičkog mjesta.

MD simulacije su također pokazale da ioni Cu i Zn vezani u katalitičko i inhibitorno vezno mjesto u neposrednoj blizini katalitičkog mogu zamijeniti svoje položaje. Nadalje MD simulacije su pokazale, a eksperimenti potvrdili da kada se dva iona cinka vežu, jedan od njih napušta protein lakše nego što je to slučaj kada se dva iona Cu vežu na hDPP III .

Dodatno (inhibitorno) vezno mjesto potvrđeno je eksperimentalnim i računalnim metodama. Na kraju možemo zaključiti da provedena istraživanja potvrđuju našu hipotezu da hDPP III ima dodatno mjesto za vezanje iona metala, čiji je afinitet za cink tri reda veličine

manji od onog u aktivnom mjestu. Položaj aktivnog mjesta sličan je onom identificiranom u drugim srodnim proteazama, što ukazuje na zajednički mehanizam regulacije enzimske aktivnosti viškom iona metala.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

Å	ångström, mjerna jedinica za duljinu; $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$
Arg ₂ -2NA	komercijalno dostupni supstrat; diarginil-2-naftilamid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DFT	teorija funkcionala gustoće (eng. <i>Density functional theory</i>)
SMD	solvatacija temeljena na gustoći (engl. <i>Solvation Model based on Density</i>)
E451A	inaktivni mutant hDPP III
ff14SB	oznaka za polje sila
HF	metoda Hartree-Fock
FPLC	eng. <i>Fast protein liquid chromatography</i>
hDPP III	humana dipeptitil petidaza III; protein
ICP – MS	eng. <i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
ITC	izotermalna titracijska kalorimetrija
M	mol dm^{-3} ; mjerna jedinica za množinsku koncentraciju
MD	molekulska dinamika
MM	molekulska mehanika
MM-PBSA	metoda za izračun slobodne energije (engl. <i>molecular mechanicsPoissonBoltzmann surface area</i>)
NPT	izotermno-izobarni ansambl
NVT	kanonski ansambl
QM	kvantna mehanika
PDB	proteinska baza podataka (engl. <i>Protein Data Bank</i>)
SDS	natrijev dodecilsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	poliakrilamidna gel-elektroforeza u prisutnosti natrijeva dodecil-sulfata
RMSD	korijen srednjeg kvadrata odstupanja (engl. <i>root mean square deviation</i>)
rpm	broj obrtaja; (engl. <i>revolutions per minute</i>)
SHAKE	algoritam ograničavanja gibanja vodikovih atoma tijekom MD simulacija
TIP3P	modeli molekula vode u kojima su duljine veza i kutevi fiksirani, a elektrostatske interakcije definirane preko 3 točkasta naboja (engl. <i>transferrable intermolecular potential 3 point</i>)

Tris-HCl	Tris(hidroksimetil)aminometan hidrokloridni pufer
VMD	program za vizualizaciju i analizu (engl. visual molecular dynamics)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. M. Baršun, N. Jajčanin, B. Vukelić, J. Spoljarić, M. Abramić. *Biol Chem.* **388** (2007) 343-8.
2. J. M. Chen, A. J. Barrett. *Academic Press*, (2004) 809-812.
3. X. Pang, A. Shimizu, S. Kurita, D. P. Zankov, K. Takeuchi, M. Yasuda-Yamahara, S. Kume, T. Ishida, H. Ogita. *Hypertension.* **68** (2016) 630-41.
4. S. Jha, U. Taschler, O. Domenig, M. Poglitsch, B. Bourgeois, M. Pollheimer, L. M. Pusch, G. Malovan, S. Frank, T. Madl, K. Gruber, R. Zimmermann, P. Macheroux. *J. Biol. Chem.* **295** (2020) 13711-13723.
5. Y. Liu, J.T. Kern, J.R. Walker, J.A. Johnson, P.G. Schultz, H. Luesch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104** (2007) 5205–5210.
6. E. H. Bridgid, D. Goldfarb, K. M. Mulvaney, M. A. Hast, P. F. Siesser, F. Yan, D. N. Hayes, M. B. Major. *Cancer Res.* **73** (2013) 2199–2210.
7. X. Ren, J. Yu, L. Guo, H. Ma. *Int Immunopharmacol.* **96** (2021) 107595.
8. C. Menale, L. J. Robinson, E. Palagano, R. Rigoni, M. Erreni, A. J. Almarza, Strina, D. Strina, S. Mantero, M. Lizier, A. Forlino, R. Besio, M. Monari, P. Vezzoni, B. Cassani, H. C. Blair, A. Villa, C. Sobacchi. *J. Bone Miner. Res.* **10**. (2019) 37(7):876-887.
9. K. M. Fukasawa, J. Hirose, T. Hata, Y. Ono. *Biochim Biophys Acta.* **1804** (2010) 2063-9.
10. C. J. Young, S. Siemann. *Chem Commun (Camb).* **52** (2016) 11748-51.
11. P. Kumar, V. Reithofer, M. Reisinger, S. Wallner, T. P. Keller, P. Macheroux, K. Gruber. *Sci Rep.* (2016) 6:23787.
12. T. Xu, C. Xie, D. Yao, C. Z. Zhou, J. Liu. *Biochem Biophys Res Commun.* **494** (2017) 621-25.
13. I. Sabljčić, N. Meštrović, B. Vukelić, P. Macheroux, K. Gruber, M. Luić, M. Abramić. *PLoS One.* (2017) 12(11) 0187295.
14. B. Bertoša, B. K. Prodić, R. C. Wade, S. Tomić. *Biophys J.* **94** (2008) 27-37.
15. I. Dokmanić, M. Šikić, S. Tomić. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **64** (2008) 257-63.
16. A. Tomić, B. Kovačević, S. Tomić. *Phys Chem Chem Phys.* **18** (2016) 27245-56.
17. A. J. Barrett. *Eur J Biochem.* **250** (1997) 1-6.
18. J. Mótyán, F. Tóth, J. Tőzsér. *Biomolecules* **3**, (2013) 923–942

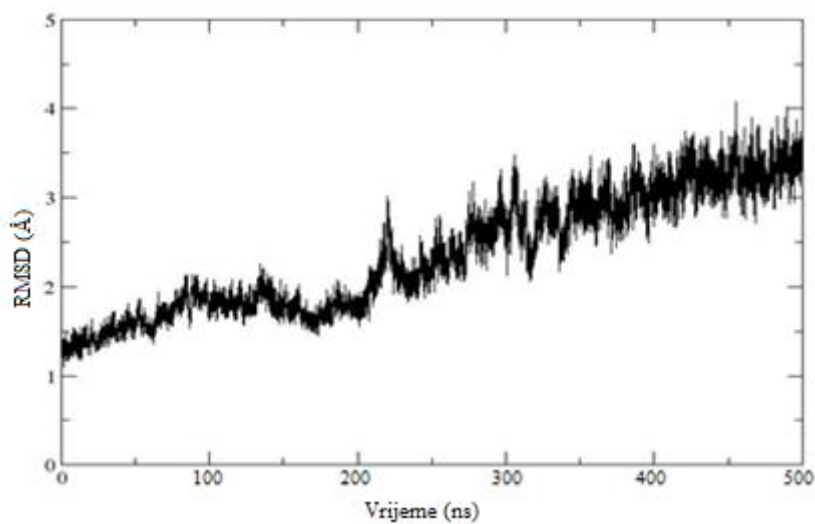
19. N. D. Rawlings, A. J. Barrett, P. D. Thomas, X. Huang, A. Bateman, R. D. Finn, (2018) The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res* **46**.
20. N. Cerda-Costa i F.X. Gomis-Ruth, *Protein Sci.* **23** (2014) 123-144.
21. G. A. Bezerra, E. Dobrovetsky, R. Viertlmayr, A. Dong, A. Binter, M. Abramić, P. Macheroux, S. Dhe-Paganon, K. Gruber. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109** (2012) 6525-6530.
22. C. López-Otín i J.S. Bond, *J. Biol. Chem.* **283** (2008) 30433-30437.
23. S. C. Prajapati, S. S. Chauhan. *FEBS Journal* **278** (2011) 3256-3276.
24. M. Abramić, J. Špoljarić, Š. Šimaga. *Period. biol.* 106 (2004) 161-168.
25. N.D. Rawlings i A.J. Barrett, u N. D. Rawlings, G. Salvesen, *Elsevier Ltd*, Vol. 1 (2013) 325-370.
26. M. He, D. P. Mangiameli, S. Kachala, K. Hunter, J. Gillespie, X. Bian, H. C. Shen, S. K. Libutti. *Clin Cancer Res.* **16** (2010) 249-59.
27. H. L. Chou, C. T. Yao, S. L. Su, C. Y. Lee, K. Y. Hu, H. J. Terng, Y. W. Shih, Y. T. Chang, Y. F. Lu, C. W. Chang, M. L. Wahlqvist, T. Wetter, C. M. Chu. *BMC Bioinformatics.* (2013) 14:100.
28. H. Lodish, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell. *Molecular Cell Biology.* **4** (2000).
29. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer. *Biochemistry* **5** (2002) 79-91.
30. L. Hagel, *Current Protocols in Molecular Biology*, **44** (2001) 10.9.1-10.0.20
31. N. Sattayasai. *Chemical Biology*, (2012).
32. C.R.Bagshaw. *Encyclopedia of Biophysics.* (2013) 2460–2466
33. R. Thomas. *Nature.* (2004) 145-148.
34. J. Calvete, D. Petras, C. Calderón, F. Celis, B. Lomonte, J. Encinar, A. Sanz-Medel. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases.* **23** (2017) 1-9.
35. A. Kashani, J. Mostaghimi. *Atomization Spray.* **20** (2010) 415- 433.
36. T. Wiseman, S. Williston, J. F. Brandts, L. N. Lin. *Anal Chem.* (1989) 1317.
37. L. Indvk, H. F. Fisher. *Methods Enzymol.* (1998) 64:295350.
38. A. Saponaro. *Bio Protoc.* **8** (2018) 2957.
39. <https://cmi.hms.harvard.edu/isothermal-titration-calorimetry> (22.9.2023.).
40. M. J. Blandamer, P.M. Cullis, P.T. Gleeson, *Chem. Soc. Rev.* **32** (2003) 264–267.

41. P. W. Atkins, R. Friedman. *Molecular Quantum Mechanics*. **4** (2005).
42. C. J. Cramer. *Essentials of Computational Chemistry*. **42** (2004).
43. K. I. Ramachandran, G. Deepa, K. Namboori. *Computational Chemistry and Molecular Modeling-Principles and Applications*. (2008).
44. K. Vanommeslaeghe, O. Guvench, A. D. MacKerell. *Curr. Pharm. Des.* **20** (2014) 3281–92.
45. R. Pissurlenkar, M. Shaikh, R. Iyer, E. Coutinho. *Antiinfect. Agents Med. Chem.* **8** (2009) 128–150.
46. W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein. *J. Chem. Phys.* **79** (1983) 926–935.
47. H. Bekker, *Molecular dynamics simulation methods revised*. (1996) 33–62.
48. web stranice <https://isaacs.sourceforge.io/phys/pbc.html> (3.2.2023.).
49. C. J. Cramer. *Essentials of Computational Chemistry* **42** (2004).
50. B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen. *J Comput Chem.* **18** (1997) 1463-1472.
51. F. Jensen, *Introduction to Computational Chemistry* (2017) 50-157, 469-502.
52. A. Szabo i N.S. Ostlund. *Courier Corporation*. (2012) 158.
53. A. D. Becke. *Phys. Rev. A.* **38** (1988) 3098–3100.
54. U.K. Laemmli. *Nature* **227** (1970) 680–685.
55. H. Towbin, T. Staehelint, J. Gordon. *Procedure and Some Applications*. **76** (1979) 4350–4354.
56. C.F. Quinn, M.C. Carpenter, M.L. Croteau, D.E. Wilcox, *Elsevier Inc.* (2016) Vol. 567.
57. J. Hirose, H. Iwamoto, I. Nagao, K. Enmyo, H. Sugao, N. Kanemitsu, K. Ikeda, M. Takeda, M. Inoue, T. Ikeda. *Biochemistry* **40** (2001) 11860–11865.
58. C. E. Säbel, S. St-Denis, J. M. Neureuther, R. Carbone, S. Siemann. *Biochem Biophys Res Commun.* **403** (2010) 209-213.
59. A. V. Marenich, C. J. Cramer, D.G. Truhlar. *J. Phys. Chem. B* **113** (2009) 6378–6396.
60. C. J. Cramer. *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models, 2nd Edition*; John Wiley and Sons, Ltd., (2004).
61. N. Kircheva, S. Dobrev, V. Nikolova, S. Angelova, T. Dudev. *Inorg. Chem.* **59** (2020) 17347–17355
62. S. Dobrev, N. Kircheva, V. Nikolova, S. Angelova, T. Dudev. *Comput. Biol. Chem.* **101** (2022) 107785.

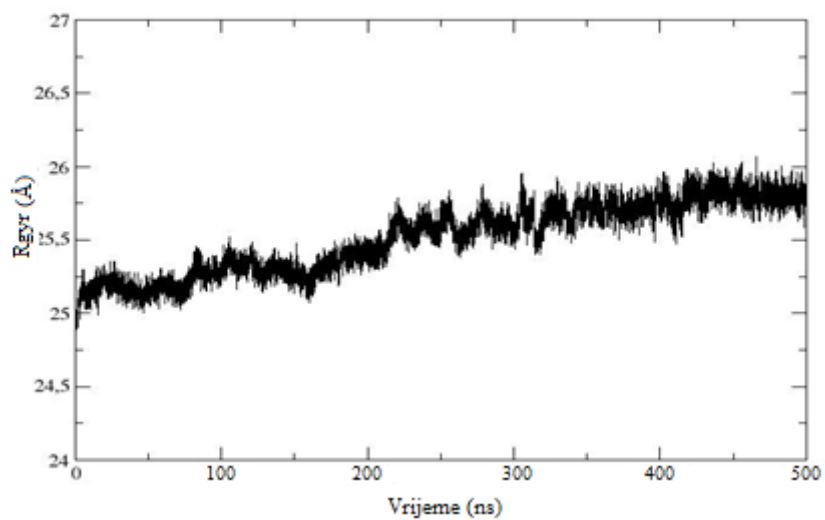
63. A. Tomić, H. Brkić, A. Matic, S. Tomić. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **23** (2021) 13267–13275.
64. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji. Gaussian 09, Revision D.01 (2009).
65. C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, *Phys. Rev. B* **37** (1988) 785–789.
66. A. D. Becke. *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 5648–5652.
67. E. N. Brothers, D. Suarez, D. W. Deerfield II, K. M. Merz Jr. *J. Comput. Chem.* **25** (2004) 1677–1692.
68. W. W. Rudolph, G. Irmer. *Dalt. Trans.* **42** (2013).
69. M. D. Daily, M. D. Baer, C. J. Mundy, *J. Phys. Chem. B.* **12** (2016) 2198–2208.
70. J. A. Maier, C. Martinez, K. Kasavajhala, L. Wickstrom, K. E. Hauser, C. Simmerling, *J. Chem. Theory Comput.* **11** (2015) 3696–3713.
71. C. Tian, K. Kasavajhala, K.A.A. Belfon, L. Raguette, H. Huang, A.N. Miguez, J. Bickel, Y. Wang, J. Pincay, Q. Wu. *J. Chem. Theory Comput.* **16** (2020) 528–552.
72. R. D. A. Case, T. A. Darden, T. E. Cheatham, III, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, G. S. Luo, R.C. Walker, W. Zhang, K. M. Merz, B. Roberts, S. Hayik, A. Roitberg, J. L. J. Swails, A.W. Götz, I. Kolossváry, K. F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, R. M. Wolf, G. X. Wu, S.R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M. J. Hsieh, T. Cui, D. R. Roe, D. H. Mathews, M. G. Seetin, R. Salomon-Ferrer, C. Sagui, V. Babin, Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, P. A. Kollman, “AMBER 12.” San Francisco-University of California (2012).
73. R. Salomon-Ferrer, D.A. Case, R.C. Walker. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **3** (2013) 198–210.
74. A. Tomić, G. Horvat, M. Ramek, D. Agić, H. Brkić and S. Tomić, *J. Chem. Inf. Model.* **59** (2019) 3437–3453.
75. W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein, *J. Chem. Phys.*, **79** (1983) 926–935.
76. H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, J. R. Haak, *J. Chem. Phys.* **81** (1984) 3684–3690.
77. R. J. Loncharich, B. R. Brooks and R. W. Pastor, *Biopolymers.* **32** (1992) 523–535.
78. S. Miyamoto, P.A. Kollman. *J. Comput. Chem.* **13** (1992) 952–962.

79. D.R. Roe, T.E. Cheatham. *J. Chem. Theory Comput.* **9** (2013) 3084–3095.
80. A. Onufriev, D. Bashford and D. A. Case, *Proteins*. **55** (2004) 383–94.
81. B. R. Miller, T. D. McGee, J. M. Swails, N. Homeyer, H. Gohlke and A. E. Roitberg, *J. Chem. Theory Comput.* **8** (2012) 3314–3321.
82. A. Smolko, F. Šupljika, J. Martinčić, N. Jajčanin-Jozić, M. Grabar-Branilović, S. Tomić, J. Ludwig-Müller, I. Piantanida, B. Salopek-Sondi. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18** (2016) 8890–8900.
83. A. Matić, F. Šupljika, H. Brkić, J. Jurasović, Z. Karačić, S. Tomić. *International journal of molecular sciences*. **16** (2023) 1-23.
84. A. Tomić, M. Berynskyy, R. C. Wade and S. Tomić, *Mol. Biosyst.* **11** (2015) 3068–3080)
85. F. Duarte, P. Bauer, A. Barrozo, B. A. Amrein, M. Purg, J. Åqvist and S. C. L. Kamerlin, *J. Phys. Chem. B.* **118** (2014) 4351–4362.

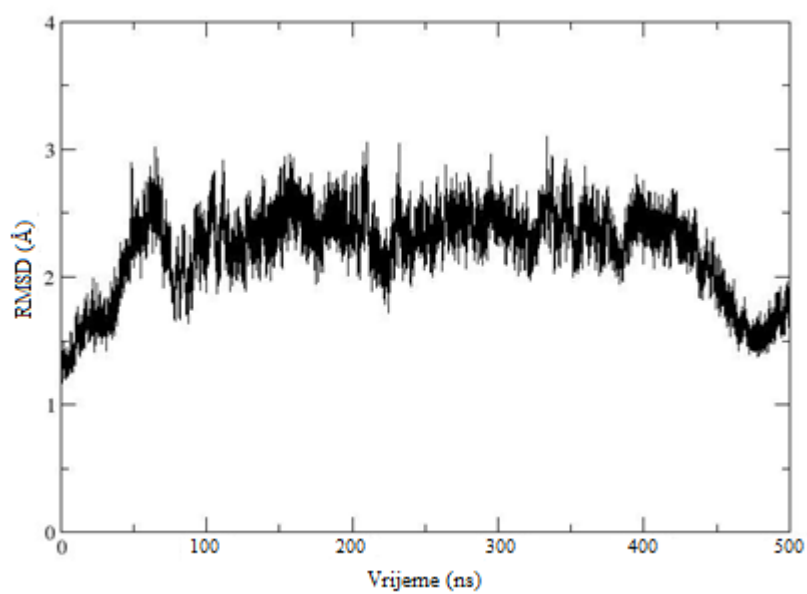
§ 8. DODATAK



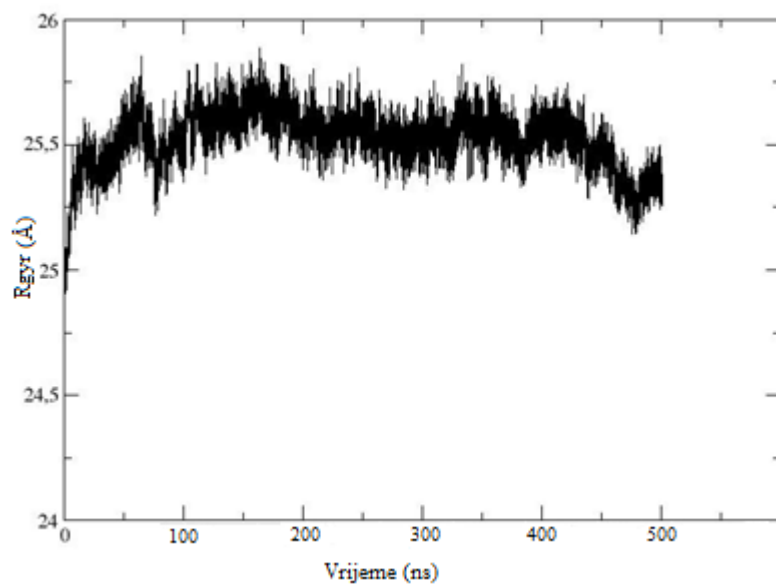
Slika 42. Prikaz RMSD za model CPLX1.



Slika 43. Prikaz radijusa gibanja (Rgyr) za model CPLX1.



Slika 44. Prikaz RMSD za model CPLX2.



Slika 45. Prikaz radijusa gibanja (Rgyr) za model CPLX2.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Vinkovcima 18. kolovoza 1991. godine. Maturirala sam u vinkovačkoj gimnaziji, te upisala preddiplomski studij kemije na Odjelu za kemiju u Osijeku. Završni rad radila sam u zavodu za Analitičku kemiju na upisanom fakultetu s temom „Sinteza novog senzorskog materijala za određivanje anionskih tenzida“. Potom sam upisala istraživački smjer analitičke kemije, organske kemije i biokemije na istom fakultetu. Radila sam kao demonstratorica u laboratoriju kao pomoć studentima pri izvođenju laboratorijskih vježbi. Diplomirala sam 2017. godine s temom „Određivanje kationskih tenzida u sredstvima za dezinfekciju elektrodom na bazi nanomaterijala“. Iste godine upisujem program Pedagoško-psihološko-didaktičko-metodičke izobrazbe na Filozofskom fakultetu u Osijeku, te sam iste godine završila i stekla pedagoške kompetencije za obrazovanje u osnovnoj i srednjoj školi. 2018. godine zapošljam se na stručno osposobljavanje u Laboratoriju za analitičku kemiju i rezidue, Veterinarski zavod Vinkovci, podružnica Hrvatskog veterinarskog instituta. Od 2019. zaposlena sam na Institutu Ruđer Bošković kao asistentica u Zavodu za organsku kemiju i biokemiju u Laboratoriju za biokemiju proteina i molekulsko modeliranje, na HRZZ projektu Biološka važnost dipeptidil – peptidaze III i njezin utjecaj na zdravlje čovjeka. Bila sam uključena u rad sa studentima pri izvođenju njihovih diplomskih radova i vodila stručnu praksu. Uključena sam u popularizaciju znanosti sudjelovanjem u organizaciji punkta na Otvorenom danu Instituta 2023.

Publikacije:

1. A. Tomić, H. Brkić, A. Matic, S. Tomić. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **23** (2021) 13267–13275.
2. A. Matic, F. Šupljika, H. Brkić, J. Jurasović, Z. Karačić, S. Tomić. *Int. J. Mol. Sci.* **16** (2023) 1-23.

Posterska priopćenja:

1. Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, 21.-22.4.2023., Sveučilište u Zagrebu, postersko priopćenje "Dipeptidyl peptidase III inhibition tests by metal dications."
2. Međunarodni znanstveni skup HDBMB, From Science to Knowledge, 28.9.-1.10.2022, Brela, Hrvatska, postersko priopćenje "Dipeptidyl peptidase III inhibition tests by metal dications"
3. Međunarodni znanstveni skup HSKIKI (Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera) 5.-8.10.2021., Veli Lošinj, postersko priopćenje „Dipeptidyl peptidase III inhibition tests by metal dications“
4. Međunarodni znanstveni skup Ružičkini dani, Danas znanost-sutra industrija, 16.-18.9.2020., Vukovar, postersko priopćenje "Ispitivanja inhibicije dipeptidil peptidaze III metalnim dikationima."
5. Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, 28.2.2020., Sveučilište u Zagrebu, postersko priopćenje "Identifikacija potencijalnog inhibitornog veznog mjesta za metal u ljudskoj dipeptidil-peptidazi III."

Usmena priopćenja:

1. A. Matic, Identifikacija veznog mjesta metalnog iona s inhibicijskim djelovanjem na aktivnost dipeptidil – peptidaze III, obrana teme doktorske disertacije, PMF, Zagreb, 2023.
2. A. Matic, Influence of Metal Di-cations on DPP III Structure and Function, Radni sastanak na BioRe projektu, IRB, Zagreb, veljača, 2022.

3. A. Matić, Study of binding of metal ions (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+}) to human DPP III, Radni sastanak na BioRe projektu, IRB, Zagreb, rujan, 2022.

RADIONICE

1. Korištenje računalnog klastera Isabella, 17.-18.9.2019. Zagreb.
2. Minisimpozij o Dipeptidil-peptidazi III, 3.2.2020., Zagreb, Institut Ruđer Bošković.
3. Osnove proteomike, 25.-26.2.2020. Zagreb, radionica BICRO BIOCentra (Inkubacijski centar za bioznanosti)
4. Uvod u molekularno modeliranje, 3.-7.12.2020., Hrvatsko društvo za istraživanje raka, Zagreb.
5. Simpozij apoptoza i novotvorine, online, Odbor za genomiku i proteomiku, 21.4.2021., Zagreb
6. Upravljanje znanjem, intelektualno vlasništvo, transfer tehnologije i inovacije, 26.-27.6.2021. PMF, Zagreb
7. Sustainability shaping the fragrance & cosmetic industries, 30.03.2021., PMF, Zagreb
8. Diseminacija znanstvenih istraživanja i znanstvena etika, 24-25.02.2023., PMF, Zagreb
9. Sudjelovanje u organizaciji otvorenih dana IRBa, FRIZBIJADA, Zagreb, 2023. (Popularizacija znanosti)

Članstva

Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju

Hrvatsko kemijsko društvo

Hrvatsko biofizičko društvo