Primjena računalnih pristupa različitih stupnjeva složenosti u svrhu razumijevanja strukture, dinamike i aktivnosti ljudske dipeptidil-peptidaze III

Tomić, Antonija

Doctoral thesis / Disertacija

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:602523

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-14**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Antonija Tomić

Primjena računalnih pristupa različitih stupnjeva složenosti u svrhu razumijevanja strukture, dinamike i aktivnosti ljudske dipeptidil-peptidaze III

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2015.

University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Antonija Tomić

Multi scale computational approaches to understand a structure, dynamics and activity of the human dipeptidyl-peptidase III

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2015.

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Antonija Tomić

Primjena računalnih pristupa različitih stupnjeva složenosti u svrhu razumijevanja strukture, dinamike i aktivnosti ljudske dipeptidil-peptidaze III

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Dr. sc. Sanja Tomić

Zagreb, 2015.

University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Antonija Tomić

Multi scale computational approaches to understand a structure, dynamics and activity of the human dipeptidyl-peptidase III

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Dr. sc. Sanja Tomić

Zagreb, 2015.

Ova disertacija izrađena je u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju Zavoda za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom prof. dr. sc. Sanje Tomić u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija kemije pri Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Računi su izvedeni na računalnim stanicama u sklopu Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju Zavoda za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković, računalnom serveru Isabella i Hrvatskoj nacionalnoj mreži računala (CRO-NGI) u sklopu Sveučilišnog računskog centra (SRCE) Sveučilišta u Zagrebu, te na računalnim klasterima u Španjolskoj („Barcelona SuperComputing Center“ u Barceloni i „Magerit“ u Madridu) i Njemačkoj (klaster pri „Heidelberg Institute for Theoretical Studies“ u Heidelbergu).

Za Tomu…

ZAHVALE

Na početku, najljepša hvala mojoj mentorici dr. sc. Sanji Tomić. Hvala joj na velikom znanju kojeg mi je uvijek rado prenosila, konstruktivnim diskusijama, predanom radu i slobodi koju mi je omogućila u mom istraživačkom radu. Hvala joj što je uvijek imala vremena za mene. Također, zahvaljujem joj na dobroti i prijateljstvu kojeg mi je pružila kao mentorica i cimerica.

Zahvaljujem dr. sc. Abramić na ugodnoj suradnji koju smo imali tijekom godina izrade ove disertacije, kao i na kritičkom i detaljnom čitanju disertacije, a i radova koji su iz nje proizašli. Hvala Vam što ste nam uvijek bili spremni pomoći.

Na ugodnoj radnoj atmosferi zahvaljujem svim članovima Laboratorija za kemijsku i biološku kristalografiju Zavoda za fizičku kemiju. Posebno zahvaljujem članovima grupe za modeliranje.

Hvala prof. dr. Rebecci Wade i prof. dr. sc. Miguelu Gonzalesu što su me ugostili i na taj način mi omogućili da steknem neka nova saznanja.

Velika hvala svim mojim prijateljima i cijeloj mojoj obitelji, a nadasve mojim roditeljima na njihovoj bezuvjetnoj ljubavi i pomoći.

I na kraju, najveća hvala mužu Gordanu i sinu Tomi na vašoj ljubavi i svemu što iz nje proizlazi!

Sadržaj

SAŽETAK X
ABSTRACT XI
§ 1. UVOD 1
1.1. Cilj i opseg rada 2
§ 2. LITERATURNI PREGLED 4
2.1. Peptidaze 4
2.2. Metalopeptidaze 6
2.3. Dipeptidil-peptidaza III 9
2.4. Računalna kemija 18
2.5. Kvantno-mehaničke (QM) metode 19
2.6. Metode molekulske mehanike (MM) 27
2.7. Molekulsko-dinamičke (MD) simulacije 30
2.8. Kvantno-mehaničke – molekulsko-mehaničke (QM/MM) metode 49
2.9. Račun slobodne energije 52
§ 3. RAČUNALNE METODE 55
3.1. MD simulacije slobodnog enzima 55
3.2. MD simulacije kompleksa DPP III 61
3.3. MD simulacije krupnog zrna (CGMD) DPP III 67
3.4. Računanje slobodne energije 69
3.5. QM račun mehanizma reakcije na modelnom sustavu 71
3.6. QM/MM račun koordinacije Zn^{2+} iona 74
3.7. Analize rezultata 78
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA 82
4.1. Struktura i dinamika DPP III i njenih kompleksa 82
4.2. Supstratna specifičnost 130
4.3. Ulazak/izlazak liganda u/iz aktivnog mjesta enzima 138
4.4. Konformacijska dinamika DPP III i vezanje liganda 141
4.5. Koordinacija cinkova iona u aktivnom mjestu enzima 165
4.6. Mehanizam reakcije hidrolize na modelnom sustavu 172
§ 5. ZAKLJUČAK 186

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA 191
§ 7. DODATAK 193
§ 8. LITERATURNI IZVORI 214
§ 9. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA 222

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

Primjena računalnih pristupa različitih stupnjeva složenosti u svrhu razumijevanja strukture, dinamike i aktivnosti ljudske dipeptidil-peptidaze III

Antonija Tomić
Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Dipeptidil-peptidaza III (DPP III) je o cinku ovisna egzopeptidaza koja katalizira reakciju hidrolize peptidne veze odcjepljujući dipeptid s N-kraja svojih supstrata. U okviru ove doktorske disertacije detaljno je istražena struktura i dinamika ljudske DPP III i njenih kompleksa primjenom računalnih pristupa različitih stupnjeva složenosti. Modeliranje je bilo temeljeno na trodimenzionalnim strukturama enzima određenim rentgenskom strukturnom analizom. Molekulsko-dinamičke (MD) simulacije slobodnog (bez vezanog liganda) enzima otkrile su veliku fleksibilnost proteina, a simulacije kompleksa DPP III sa sintetskim i peptidnim supstratima pridonijele su razumijevanju široke supstratne specifičnosti ovoga enzima, te u kombinaciji s računom slobodne energije omogućile određivanje najvjerojatnijeg i kemijski aktivnog načina vezanja supstrata. Aktivna konformacija enzima dodatno je potvrđena primjenom različitih MD metoda i hibridnim kvantno-mehaničkim – molekulsko-mehaničkim (QM/MM) računima različitih načina koordinacije cinka. Mehanizam reakcije hidrolize određen je na modelnom sustavu sastavljenom od supstrata, aminokiselinskih ostataka koji neposredno sudjeluju u procesu katalize i ostataka koji koordiniraju ion cinka.

(224 stranica, 94 slika, 27 tablica, 116 literaturnih navoda, izvornik na hrvatskom jeziku)

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

Ključne riječi: kvantna mehanika/ ljudska dipeptidil-peptidaza III/ metalopeptidaze/ molekulska dinamika/ molekulska mehanika/ račun slobodne energije/ supstratna specifičnost

Mentor: Dr. sc. Sanja Tomić, nasl. prof., znanstvena savjetica, Institut Ruđer Bošković

Ocjenitelji: Dr. sc. Zlatko Mihalić, red. prof., Prirodoslovno-matematički fakultet
Dr. sc. Sanja Tomić, nasl. prof., znanstvena savjetnica, Institut Ruđer Bošković
Dr. sc. Marija Abramić, znanstvena savjetnica, Institut Ruđer Bošković

Rad prihvaćen: travanj 2015.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

Multi scale computational approaches to understand a structure, dynamics and activity of the human dipeptidyl-peptidase III

Antonija Tomić
Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb, Hrvatska

The dipeptidyl-peptidase III (DPP III) is a zinc-exopeptidase that hydrolyzes dipeptide from the N-terminus of its substrates. In this thesis a structure and dynamics of ligand-free enzyme and its complexes is investigated in detail by multi scale computational approaches. Modeling study was based on the three-dimensional enzymes structures obtained by X-ray diffraction analysis. Molecular dynamics (MD) simulations of the ligand-free enzyme revealed large flexibility of the protein, while the simulations of DPP III in the complexes with synthetic and peptide substrates enabled understanding of its broad substrate specificity, and, in combination with the free energy calculations, helped in determination of the most probable and chemically active ligand binding mode. The active enzyme conformation was confirmed by different MD approaches as well as by the hybrid quantum mechanics-molecular mechanics (QM/MM) calculation of the different zinc ion coordinations. The reaction mechanism was determined using the model system consisting of substrate, amino acids participating in catalysis and the residues that coordinate the zinc ion.

(224 pages, 94 figures, 27 tables, 116 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: free energy calculations/ human dipeptidyle peptidase III/ metaloenzymes/ molecular dynamics/ molecular mechanics/ quantum mechanics/ substrate specificity

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

Reviewers: Dr. Zlatko Mihalić, Prof., Faculty of Science
Dr. Sanja Tomić, Prof., Scientific Advisor, Ruđer Bošković Institute
Dr. Marija Abramić, Scientific Advisor, Ruđer Bošković Institute

Thesis accepted: April 2015

§ 1. UVOD

Dipeptidil-peptidaza III (DPP III) je o cinku ovisna egzopeptidaza citosola stanica mnogih organizama koja katalizira reakciju hidrolize peptidne veze odcjepljujući dipeptid s N-kraja supstrata koji se sastoji od tri ili više aminokiselinskih ostataka.[1] Jedini je član obitelj dipeptidil-peptidaza III, prema klasifikaciji baze MEROPS (http://www.merops.sanger.ac.uk) nazvane još i obitelj metalopeptidaza M49, koja je karakterizirana dvama jedinstvenim strukturnim motivima HEXXGH i EEXR(K)AE(D) odgovornima za vezanje metalnog iona u aktivno mjesto enzima.[2] Bioinformatičkim analizama utvrđeno je postojanje sveukupno 5 evolucijski očuvanih regija unutar obitelji M49.[3] To su: 1. regija od 313. do 332. aminokiseline, 2. regija od 389. do 412. aminokiseline, 3. regija od 450. do 460. aminokiseline, 4. regija od 507. do 512. aminokiseline i 5. regija od 566. do 575. aminokiseline u primarnoj strukturi ljudske DPP III.

Rezultati rentgenske difrakcijske analize pokazali su da je DPP III monomerni protein koji se sastoji od dvije domene između koji se nalazi velika pukotina.[4] Ion cinka potreban za aktivnost i aminokiseline koje ga koordiniraju nalaze se s unutarnje strane pukotine, na dnu tzv. „gornje“ (katalitičke) domene. Prisustvo velike pukotine između dviju domena (približno širine 40 Å i visine 25 Å) i činjenica da se sačuvane regije unutar obitelji DPP III protežu kroz obje domene, ukazuju da bi ovaj enzim mogao biti podložan velikim konformacijskim promjenama.

In vitro istraživanja pokazala su relativno široku specifičnost DPP III prema oligopeptidima veličine od četiri do osam aminokiselinskih ostataka, uključujući biološki aktivne (neuro)peptide, što upućuje na ulogu tog enzima u njihovoj razgradnji.[1,5–7] Međutim, fiziološki supstrati DPP III, a time i uloga ovoga enzima *in vivo* nisu dovoljno razjašnjeni.[8–10] Relativno široka specifičnost prema peptidima i prisustvo u citosolu gotovo svih do danas ispitanih stanica, upućuje na ulogu u završnim stupnjevima unutarstaničnog katabolizma proteina. Nadalje, pretpostavlja se da bi ova metalopeptidaza mogla imati i ulogu kod regulacije boli u sisavaca budući da je pronađena visoka koncentracija tog enzima u površinskim slojevima neurona leđnog roga leđne moždine štakora.[11] Dodatna potvrda tome je i veliki afinitet ljudskog enzima prema važnim neuropeptidima (npr. enkefalinu,

endomorfinu) u *in vitro* uvjetima.[10] Pretpostavlja se da bi široka supstratna specifičnost DPP III mogla biti posljedica izražene fleksibilnosti enzima.

Mutacijska analiza i kinetička mjerenja ukazali su na važnost pojedinih aminokiselinskih ostataka u aktivnosti ljudske DPP III. Neke od njih nalaze se u „gornjoj“ (Glu451 i His568), a neke u „donjoj“ (Tyr318, Trp300 i Asn406) domeni proteina.[2,12–14]

1.1. Cilj i opseg rada

Cilj ovog rada bio je detaljno istražiti strukturu i dinamiku ljudske DPP III, te način vezanja liganda (supstrata i inhibitora) u vezno mjesto enzima primjenom računalnih metoda različitih stupnjeva složenosti.

Molekulsko-dinamičke (MD) simulacije u kojima se svaki atom tretira eksplicitno (eng. *all atom* MD), omogućile su detaljan uvid u strukturu, strukturne promjene i fleksibilnost ljudske DPP III. Budući da su takve MD simulacije računalno vrlo zahtjevne, te kao takve nisu praktične za proučavanje niskoenergetskih, dalekodosežnih, strukturalnih promjena velikih sustava, za proučavanje navedenih efekata koristila se i analiza normalnih modova (eng. *normal mode analysis*), MD simulacije krupnog zrna (eng. *coarse grained* MD), kao i ubrzane MD (eng. *accelerated* MD) simulacije. Analiza glavnih komponenti (eng. *principal component analysis*) omogućila nam je lakše razumijevanje sakupljenih podataka.

Metodama uklapanja (eng. *docking*) i primjenom usmjerenih (eng. *steered*) MD simulacija na sustave enzim-supstrat (sintetički, Arg-Arg-2-naftilamid, i prirodni, endomorfini i enkefalin) i enzim-inhibitor (Tyr-Phe-hidroksamat) ispitani su razni načini vezanja liganada u aktivno mjesto enzima. Najvjerojatniji, te kemijski produktivan, način vezanja supstrata za ljudsku DPP III određen je kombiniranjem metoda MD simulacija enzima bez i sa vezanim supstratom, s računom slobodne energije (MM-PBSA račun, skraćeno od eng. *Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area*). Ti rezultati omogućili su razumijevanje široke supstratne specifičnosti proučavanog enzima.

MD simulacijama s primjenom nasumične sile (eng. *Random Accelerated* MD, RAMD) pratili su se putevi (tuneli) izlaska, za koje smo pretpostavili da su ekvivalentni putevima ulaska, liganada (supstrata i molekula vode) u aktivno mjesto enzima.

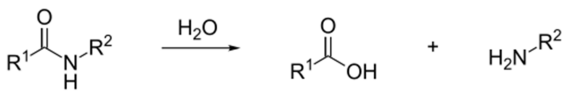
Mehanizam enzimske reakcije određen je za modelni sustav sastavljen od supstrata, aminokiselinskih ostataka koji neposredno sudjeluju u procesu katalize i ostataka koji koordiniraju ion cinka.

Također, ispitan je i utjecaj pojedinih točkastih mutacija (MD simulacijama mutanata H568N, N406Q, N406S, D372A, K405A i W300L) na konformacijsku promjenu enzima i/ili vezanje liganda u vezno mjesto enzima.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Peptidaze

Prema Međunarodnoj uniji za biokemiju i molekularnu biologiju (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, IUBMB), enzimi se dijele prema vrsti reakcije koju kataliziraju u 6 osnovnih skupina (oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze),[15] tzv. klasa, koje se dalje dijele na podskupine, tzv. podklase. Tako se unutar klase hidrolaza, enzima koji kataliziraju reakciju hidrolize, nalazi podklasa peptidaza (u starijoj literaturi koriste se još nazivi proteaze i proteinaze). Peptidaze su enzimi koji hidroliziraju peptidne veze (slika 1).[16] Prisutne su u svim živim organizmima gdje sudjeluju u izvanstaničnoj i unutarstaničnoj razgradnji proteina i peptida. Peptidazama je pridružena oznaka EC 3.4.; EC je skraćenica od *Enzyme Commision*, a prvi i drugi broj predstavljaju klasu hidrolaza (3) i podklasu peptidaza (4). Pored ta dva broja, enzimi se označavaju sa sveukupno četiri broja, gdje treći i četvrti broj označavaju pod-podklasu i serijski broj enzima u pod-podklasi.



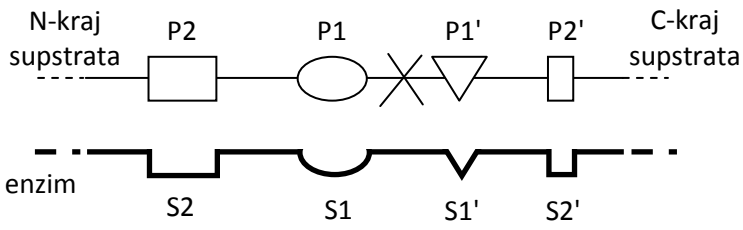
Slika 1. Shematski prikaz reakcije hidrolize peptidne veze.

Peptidaze mogu cijepati peptidnu vezu pri kraju ili unutar peptidnog lanca, te se tada govori o egzopeptidazama, odnosno endopeptidazama. Egzopeptidaze se dalje klasificiraju prema specifičnosti koju pokazuju prema N- ili C-kraju (poli)peptidnog lanca i prema broju aminokiselina koje odcjepljuju. Stoga se egzopeptidaze koje odcjepljuju jednu, dvije ili tri aminokiselne s N-kraja (poli)peptidnog lanca zovu aminopeptidaze, odnosno dipeptidil-peptidaze, odnosno tripeptidil-peptidaze. Karboksipeptidaze i peptidil-dipeptidaze su egzopeptidaze koje odcjepljuju jednu, odnosno dvije, aminokiseline sa slobodnog C-kraja peptidnog lanca.

U MEROPS bazi podataka (http://merops.sanger.ac.uk) peptidaze su klasificirane prema sličnosti njihovih primarnih struktura. Takav hijerarhijski sustav klasifikacije peptidaza

predložili su Rawlings i Barrett 1993. Godine.[17] Svaka peptidaza dodijeljena je nekoj obitelji na temelju statistički značajne sličnosti aminokiselinskog slijeda (bilo domene proteina ili dijela sekvence odgovorne za enzimsku aktivnost) prema nekom od članova te obitelji, a obitelji za koje se smatra da su homolozi (pokazuju sličnost u trodimenzionalnoj strukturi i redoslijedu katalitičkih aminokiselina u polipeptidnom lancu) grupiraju se u klanove. Navedena baza podataka peptidaze također dijeli prema funkcionalnoj grupi u aktivnom mjestu odgovornoj za katalizu, te razlikuje devet katalitičkih tipova: aspartatne (oznaka A), cisteinske (C), glutamatne (G), serinske (S), metalopeptidaze (M), treoninske (T), asparaginske (N), te peptidaze miješanog tipa (P) i peptidaze kojima je tip još nepoznat (U) (MEROPS, v 9.10, ožujak 2014.).

Priroda aminokiselinskih ostataka koji čine vezno mjesto peptidaze određuje koji će se aminokiselinski ostaci supstrata moći vezati na specifična vezna mjesta enzima. Drugim riječima, supstratna specifičnost peptidaza uvjetovana je građom podmjesta enzima u koja se smještaju bočni lanci aminokiselina (poli)peptidnog supstrata. Iako su neke peptidaza specifične u svom hidrolitičkom djelovanju, kao npr. tripsin koji hidrolizira peptidnu vezu isključivo iza lizina i arginina, specifičnost većine peptidaza je puno složenija i teže ju je definirati. Dan-danas, za opisivanje supstratne specifičnosti peptidaza koristi se model i terminologija koju su 1967. godine predložili Schechter i Berger.[18] Aminokiselinski ostaci peptidnog supstrata koji se nalaze prema N-, odnosno C-kraju supstrata od peptidne veze koja se cijepa u reakciji hidrolize označavaju se sa P1 do Pn, odnosno P1' do Pn'. Odgovarajuća podmjesta u veznom mjestu enzima u koja se smještaju navedeni aminokiselinski ostaci supstrata označavaju se sa S1-Sn, odnosno S1'-Sn' (slika 2). Prema navedenoj terminologiji, tripsin će hidrolizirati peptidnu vezu ako se u P1 podmjestu supstrata nalazi lizin ili arginin.



Slika 2. Shematski prikaz vezanja supstrata (peptida) na enzim (peptidazu) koji katalizira hidrolizu peptidne veze označene znakom x. Sa P1 do Pn i P1' do Pn' označeni su aminokiselinski ostaci peptidnog susptrata, od katalitičkog mjesta prema N-kraju, odnosno prema C-kraju supstrata, koji se smještaju u odgovarajuća podmjesta na enzimu označna sa S1 do Sn i S1' do Sn'.

2.2. Metalopeptidaze

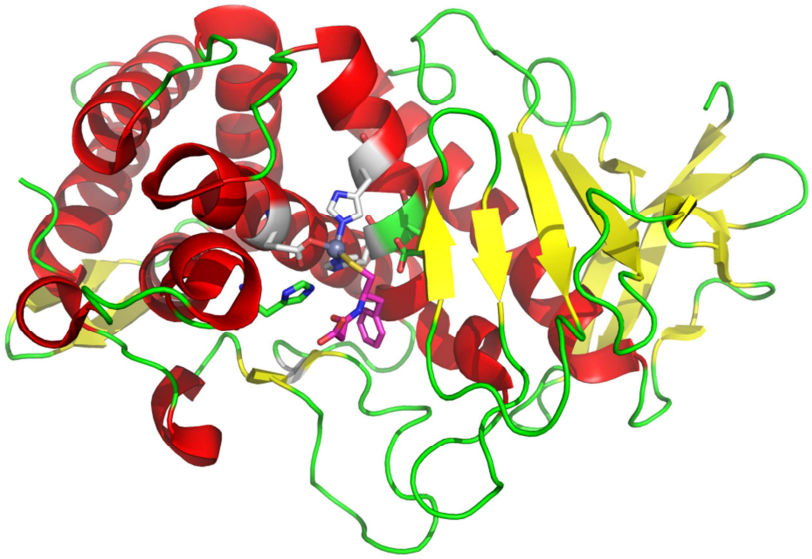
Metaloproteini su proteini koji vežu ione metala potrebne ili za katalitičku aktivnost ili za stabilizaciju strukture. Kod katalize metaloenzimima, ioni metali mogu vezati molekulu supstrata orijentirajući je pogodno za reakciju, mogu sudjelovati u oksido-redukcijskim reakcijama, ili mogu elektrostatski stabilizirati ili zaklanjati negativan naboj.[19]

Metalopeptidaze su hidrolaze u kojima dvovalentni metalni kation aktivira molekulu vode koja izvodi nukleofilni napad na peptidnu vezu.[20] Zn^{2+} je jedan od najzastupljenijih iona metala u enzimski kataliziranim reakcijama hidrolize peptidne veze zbog: a) fleksibilne koordinacijske geometrije i koordinacijskog broja (četiri do šest), b) dostupnosti, c) mogućnosti polarizacije intermedijera, d) brze izmjene liganada, e) čvrstog vezanja za enzim, f) nedostatka redoks aktivnosti i g) nemogućnosti stvaranja reaktivnih radikala. Pored njega se još pojavljuju i Co^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+} ili Cu^{2+}. U takvim enzimima ion metala najčešće je koordiniran s tri aminokiseline, od kojih su, u većini slučajeva, to His, Glu, Asp ili Lys. Osim liganada koji vežu metal, za katalizu je potreban barem još jedan aminokiselinski ostatak. Kod većine metalopeptidaza to je Glu, a može biti i Arg ili Lys.[21,22]

Iako metalopeptidaze odlikuje najveća raznolikost primarnih struktura od svih peptidaza (u MEROPS bazi podataka postoji 70 obitelji metalopeptidaza raspodijeljenih unutar 15 klanova), uočena je velika sličnost njihovih aktivnih mjesta, te sačuvanost aminokiselinskih ostataka odgovornih za vezanje metalnog kationa i katalizu.

Jedna od najviše proučavanih metalopeptidaza je termolizin. Riječ je o termostabilnoj endopeptidazi koja još djeluje i kao peptid- i ester-sintetaza. Još 1972. godine rentgenskom difrakcijskom analizom riješena je kristalna struktura termolizina.[23,24] Uočeno je da se radi o proteinu koji se sastoji od dviju domena, pri čemu je N-terminalna domena građena pretežno od β-vrpci, a C-terminalna od α-zavojnica, dok se aktivno mjesto nalazi duboko u procijepu između domena (slika 3). Ion cinka u aktivnom mjestu tetraedarski je koordiniran s dva histidina (His^{142} i His^{146}) koja su sastavni dio motiva His-Glu-Xaa-Xaa-His (HEXXH), s Glu^{166} iz susjedne α-zavojnice i s molekulom vode. U međuvremenu eksperimentalno je određen niz trodimenzionalnih struktura termolizina[25] i njegovih kompleksa,[26–28] koje u kombinaciji s rezultatima kvantno-mehaničkih računa na koordinaciji cinka,[29] upućuju na fleksibilnu koordinacijsku geometriju kationa cinka (tetraedarska i pentaedarska), pri čemu ga Glu166 može koordinirati monodentatno ili bidentatno.[30] Budući da oko polovine poznatih o

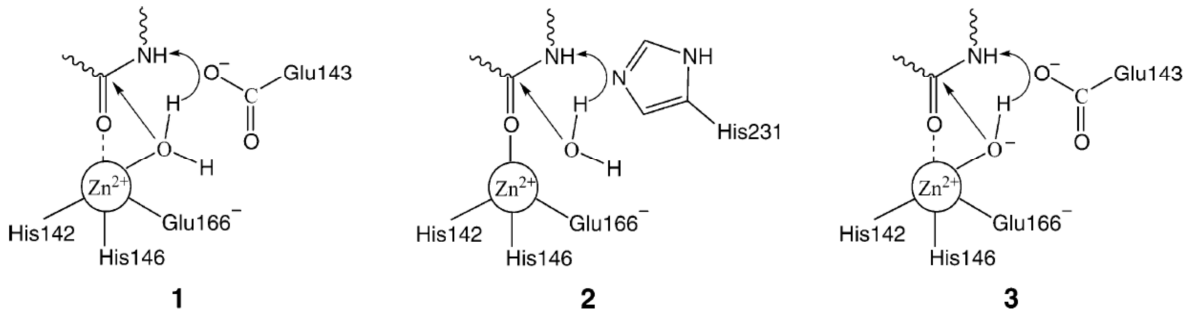
cinku ovisnih metalopeptidaza sadrži karakteristični strukturni motiv, pentapeptid HEXXH, koji sadrži dva od ukupno tri aminokiselinska liganda metala aktivnog mjesta (dva histidina), termolizin se koristi kao reprezentativni prototip za razumijevanje mehanizma katalize i dizajn inhibitora metalopeptidaza koje u aktivnom mjestu imaju jedan ion cinka.



Slika 3. Kristalografski određena struktura kompleksa termolizina s inhibitorom (S)-tiorfanom (PDB kod: 1Z9G). Pogled na strukturu u cjelini; β-vrpce obojene su žuto, a α-zavojnice crveno. U aktivnom mjestu termolizina naznačeni su: cinkov ion (prikazan sivom kuglicom), aminokiselinski ostaci koji koordiniraju metalni ion (prikazani štapićima s bijelo obojenim ugljikovim atomima), aminokiselinski ostaci Glu143 i His231 (prikazani štapićima s zeleno obojenim ugljikovim atomima) i inhibitor (prikazan štapićima s ružičasto obojenim ugljikovim atomima). Slika je generirana s programom PyMol.[31]

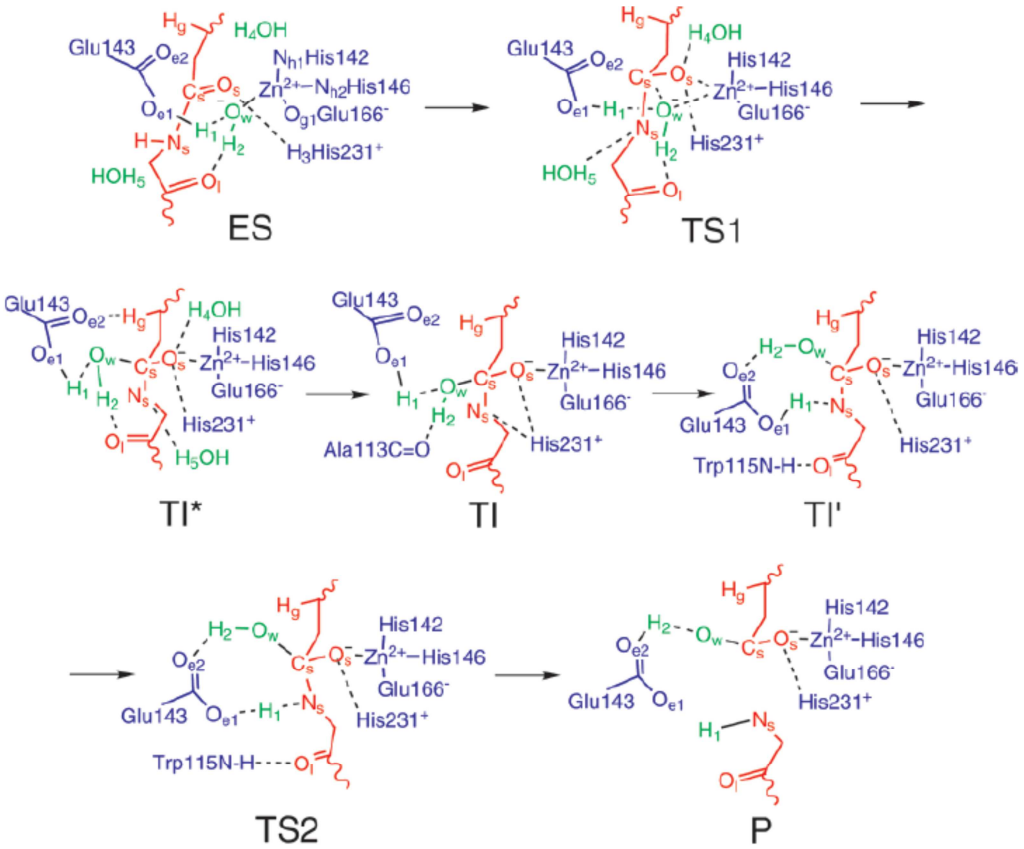
Katalitički mehanizam termolizina je do danas jedan od najbolje proučenih mehanizama metalopeptidaza. Predložena su tri mehanizma djelovanja (slika 4). Prema prvom, tzv. „hidroksidnom mehanizmu“, reaktivni nukleofil se generira deprotonacijom molekule vode koja koordinira cink i to na način da Glu143 iz motiva $H^{142}EXXH^{146}$ djeluje kao baza te odcjepljuje proton s molekule vode. Nakon toga slijedi nukleofilni napad hidroksidnog iona na karbonilni ugljikov atom iz peptidne veze koja sudjeluje u reakciji hidrolize, te prijenos protona s Glu143 na izlazeću amino skupinu (slika 4, mehanizam 1). Naknadno određene strukture kompleksa termolizin-inhibitor[32] i nekih drugih o cinku ovisnih endopeptidaza, kao i provedena kinetička mjerenja, potvrdila su vjerodostojnost navedenog mehanizma.[33,34] Mock i

suradnici su predložili mehanizam u kojem neutralni His231 djeluje kao baza koja deprotonira molekulu vode koja ne koordinira ion cinka (slika 4, mehanizam 2).[35] Međutim ovaj mehanizam ne može objasniti značajan gubitak enzimske aktivnosti uslijed mutacije Glu143. Prema trećem predloženom mehanizmu, ion cinka ne koordinira molekula vode već hidroksidni ion, a Glu143 samo prenosi proton na izlazeću amino skupinu.[36] Navedeni mehanizam temelji se na interpretaciji eksperimentalno dobivenih rezultata ovisnosti pK_m o pH, pri čemu je molekuli vode pripisana vrijednost pK_a=8,26.



Slika 4. Predloženi mehanizmi djelovanja termolizina. Preuzeto iz rada Blumbergera i suradnika.[29]

Složenim kvantno-mehaničkim – molekulsko-mehaničkim računima, 2007. godine Blumberger i suradnici,[29] izračunali su profil slobodne energije za prvi predloženi mehanizam. Prema provedenim računima hidroliza se odvija u tri koraka: 1) simultana deprotonacija molekule vode od strane Glu143 i nukleofilni napad OH^- na karbonilni ugljikov atom supstrata, 2) prijenos vodika, uz pomoć Glu143, na dušikov atom iz peptidne veze koja sudjeluje u reakciji hidrolize, i 3) simultano protoniranje dušikovog atoma i ireverzibilno pucanje peptidne veze (slika 5). Energijske barijere određene za prvi i treći korak (62,16 i 61,74 kJ mol^{-1}) u dobrom su slaganju s eksperimentalnima vrijednostima dobivenim za slične supstrate (50,82 – 57,12 kJ mol^{-1}). Prijelazno stanje TS1 stabilizirano je nastajanjem slabe koordinacijske veze između karbonilnog kisika iz peptidne veze koja sudjeluje u reakciji hidrolize i Zn^{2+}, kao i niza vodikovih veza između molekule supstrata i His231, te molekula vode u aktivnom mjestu. Velika fleksibilnost i mobilnost Glu143, koji je na početku reakcije nepovoljno orijentiran, omogućuju prijenos vodika na izlazeću amino skupinu.



Slika 5. Mehanizam reakcije hidrolize peptidne veze katalizirane termolizinom prema Blumbergeru i suradnicima.[29] Supstrat Ace-Gly-Leu-Ala-Mam je označen crvenom, katalitičke aminokiseline i ion metala plavom, a molekule vode zelenom bojom. Kovalentne i vodikove veze koje pucaju ili nastaju za vrijeme hidrolize prikazane su punim, odnosno iscrtkanim, crnim linijama. ES označava kompleks enzim-supstrat, TS1 prijelazno stanje za nukleofilni napad, TI*, TI i TI' tri različite konformacije međuprodukta, TS2 prijelazno stanje za protonaciju izlazeće skupine, a P produkt. Preuzeto iz rada Blumbergera i suradnika.[29]

2.3. Dipeptidil-peptidaza III

Dipeptidil-peptidaze (skraćeno DPP) su grupa peptidaza, koje odcjepljuju dipeptidne s N-kraja (poli)peptidnog supstrata. Kod sisavaca su najprije pronađena i okarakterizirana četiri glavna tipa tog enzima (DPP I-IV) koji se razlikuju prema razmještaju unutar stanice, supstratnoj specifičnosti i osjetljivosti na inhibitore.[37] Dipeptidil-peptidaza III (DPP III, EC 3.4.14.4) je otkrivena u ekstraktu dobivenom iz prednjeg režnja goveđe hipofize, na temelju detekcije hidrolitičkog cijepanja karakterističnog sintetskog supstrata Arg-Arg-2-naftilamida (RRNA).[38]

Danas se zna da dipeptidil-peptidaze tipa III iz različitih organizama sačinjavaju zasebnu porodicu proteina. Obitelj dipeptidil-peptidaza III prepoznata je i klasificirana na temelju statistički značajne sličnosti aminokiselinskih sljedova svojih članova i jedinstvenog strukturnog motiva, heksapeptida HEXXXH, odgovornog za vezanje cinka i katalitičku aktivnost enzima. U bazi MEROPS za obitelj DPP III navodi se još i naziv obitelj metalopeptidaza M49. Prvobitni naziv DPP III bio je dipeptidil-arilamidaza III jer je otkrivena kao treća u seriji dipeptidil-arilamidaza.[38] U ranijoj literaturi za DPP III se još pojavljuju nazivi dipeptidil-aminopeptidaza III, „angiotenzinaza" i „enkefalinaza B" izvedeni na temelju supstratne specifičnosti. Danas se većinom koristi naziv dipeptidil-peptidaza III, i kratica DPP III, sukladno preporuci Komisija za nomenklaturu Internacionalne unije za biokemiju i molekularnu biologiju (IUBMB) iz 1992. godine.

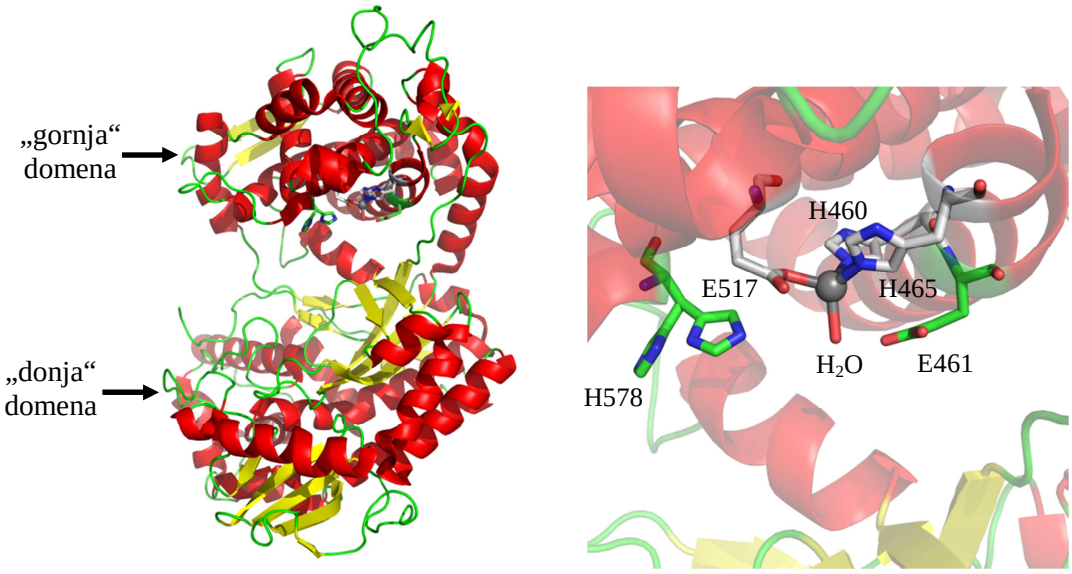
Osim u hipofizi DPP III je prisutna i u mnogim drugim tkivima sisavaca uključujući mozak (u ljudskoj placenti i leći,[39–41] eritrocitima,[5,8] mozgu i jetri štakora,[6,9,42] svinjskim mišićima)[43], kao i kod nižih eukariota (sluzave plijesni *Dyctiostelium discoideum* i kvasca *Saccharomyces cerevisiae*).[44,45] Pročišćena je i biokemijski okarakterizirana kao citosolni monomerni protein (Mr ~ 80 000, pI kod pH ~ 4,5). Opće značajke DPP III su također i ovisnost njezine enzimske aktivnosti o dvovalentnom metalnom kationu (inhibicija kelirajućim agensima) i inhibicija sulfhidrilnim reagensima.[5,6,38,40,44]

Istraživanja provedena *in vitro* pokazala su relativno široku specifičnost DPP III prema oligopeptidima veličine od četiri do osam aminokiselina, uključujući i neke biološki aktivne (neuro)peptide, što upućuje na ulogu tog enzima u njihovoj razgradnji.[1,5–7] Također je uočeno da DPP III sisavaca preferira hidrofobni aminokiselinski ostatak na trećem položaju od N-kraja supstrata (P1' položaj). Međutim, fiziološki supstrati DPP III, a time i uloga ovoga enzima *in vivo* nisu dovoljno razjašnjeni.[8–10] Njezina relativno široka specifičnost prema peptidima i prisustvo u citosolu gotovo svih do danas ispitanih stanica, upućuje na ulogu u završnim stupnjevima unutarstaničnog katabolizma proteina. Nadalje, pretpostavlja se da bi ova metalopeptidaza mogla imati i ulogu kod regulacije boli u sisavaca budući da je pronađena visoka koncentracija tog enzima u površinskim slojevima neurona leđnog roga leđne moždine štakora.[11] Dodatna potvrda tome je i veliki afinitet ljudskog enzima prema nekim opioidnim peptidima (npr. enkefalinu, endomorfinu) pokazan u *in vitro* uvjetima.[10] Zhang i suradnici su u svom istraživanju, ukazali na važnost DPP III u stvaranju očne mrene (kataraktogenezi).[46] Budući da je uočen povišeni stupanj ekspresije ljudske DPP III u

malignim tkivima endometrija i ovarija, prepoznata je i kao potencijalni biomarker maligniteta.[47,48] Najnovija genomska istraživanja otkrivaju povezanost DPP III s aktivacijom antioksidacijskog elementa (eng. *the Antioxidant Response Element*, ARE) važnog za ekspresiju brojnih citoprotektivnih enzima koji doprinose obrani od oksidativnog stresa u ljudi.[49] Hast i suradnici su 2013. godine ukazali na ulogu DPP III u aktivaciji transkripcijskog faktora Nrf2 koji je sastavni dio signalizacijskog puta Nrf2- Keap 1, glavnog mehanizma obrane stranice od toksičnih agensa i kancerogena.[50] Iako se fiziološki relevantne interakcije DPP III još istražuju i njene fiziološke uloge još otkrivaju, sva dosadašnja saznanja upućuju na to da bi ljudska DPP III mogla biti važna terapeutska meta.

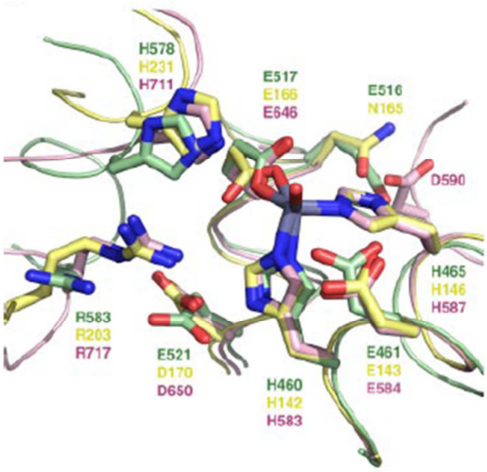
Proučavanje strukture DPP III započelo je 1998. godine kada je kloniran i sekvencioniran gen za DPP III iz štakorske jetre.[9,39] Nedugo nakon toga, određena je i primarna struktura ljudske DPP III (737 aminokiselina).[1] Na temelju određenih primarnih struktura, te rezultata ciljane mutageneze i bioinformatičkih analiza, ustanovljeno je pet evolucijski očuvanih aminokiselinskih regija unutar DPP III obitelji,[3] među kojima su dva karakteristična heksapeptidna motiva, HEXXGH i EEXR(K)AE(D).

Značajan novi pomak u znanju o metalopeptidazama iz obitelji M49 nastupio je određivanjem prve kristalne strukture DPP III (kod rezolucije 1,95 Å) i to ortologa iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (PBD kod: 3CSK)[4], čime je dobiven strukturni prototip ove obitelji. Trodimenzionalna struktura kvaščeve DPP III ukazuje na novi način smatanja proteina, koji ne pokazuje strukturne sličnosti s ostalim o cinku-ovisnim peptidazama. Sastoji se od dviju domena (tzv. „gornje“ i „donje“) koje su odvojene širokim rascjepom. Vezno mjesto katalitičkog iona Zn^{2+} nalazi se pri unutarnjem kraju rascjepa u „gornjoj“, helikalnoj, domeni i sastoji se od His460, His465, Glu517 i jedne molekule vode (slika 6).



Slika 6. Kristalna struktura kvaščeve DPP III (PDB kod: 3CSK). Lijevo, pogled na strukturu u cjelini; β-vrpce obojene su žuto, a α-zavojnice crveno. Desno, uvećani prikaz aktivnog mjesta kvaščeve DPP III. U aktivnom mjestu naznačeni su: cinkov ion (prikazan sivom kuglicom), aminokiselinski ostaci koji koordiniraju metalni ion (His 460, His465 i Glu517, prikazani štapićima s bijelo obojenim ugljikovim atomima), aminokiselinski ostaci Glu461 i His578 (prikazani štapićima s zeleno obojenim ugljikovim atomima) i molekula vode koja koordinira cink (prikazana crvenim štapićem). Slika je generirana s programom PyMol.[31]

Iako je tercijarna struktura DPP III u cjelini nova po načinu smatanja, način koordinacije cinkovog iona i razmještaj nekoliko katalitički važnih aminokiselinskih ostataka odgovaraju onima u strukturno nesrodnim cink-peptidazama termolizinu i neprilizinu, članovima obitelji metalopeptidaza M4, odnosno M13. Preklapanjem aktivnih mjesta uočeno je da su ostaci koji koordiniraju cink, te Glu143 i His231 kod termolizina ekvivalentni ostacima kvaščeve DPP III koji koordiniraju metalni ion, te Glu461 i His578 (slika 7). To najvjerojatnije upućuje na sličnost njihovih uloga u pretpostavljenom mehanizmu enzimski katalizirane hidrolize peptidne veze.



Slika 7. Aktivno mjesto kvaščeve DPP III (štapići sa zeleno obojenim ugljikovim atomima, PDB kod: 3CSK) preklopljeno s aktivnim mjestima termolizina (štapići sa žuto obojenim ugljikovim atomima, PDB kod: 4TMN) i neprilizina (štapići s ružičasto obojenim ugljikovim atomima, PDB kod: 1DMT). Preuzeto iz rada Barala i suradnika.[4]

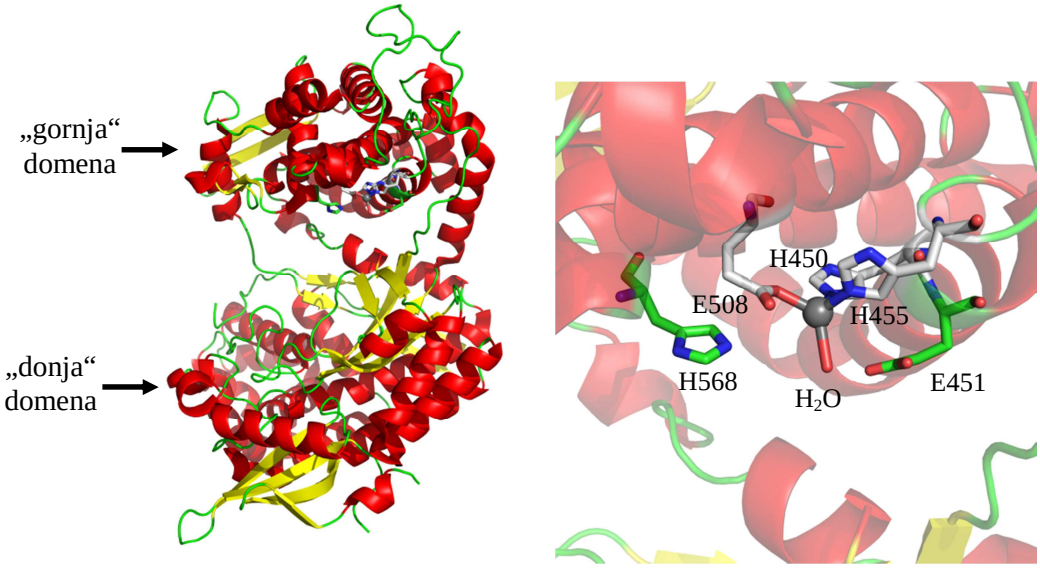
2.3.1. Ljudska dipeptidil-peptidaza III

Ljudska DPP III je monomerni protein koji sadrži 737 aminokiselinskih ostataka (molekularne mase oko 82,5 kDa), s izoelektričnom točkom pri pH 4,55. Pokazano je da ovaj enzim *in vitro* hidrolizira biološki aktivne peptide angiotenzin II, angiotenzin III, proktolin,[5] enekfaline[6] i neke hemorfine i egzorfine.[10] Također dokazano je i da cijepa peptide s prolinom u poziciji P1, kao što su endomorfin-1 i endomorfin-2,[10] te da to svojstvo ovisi o sastavu peptida. Od poznatih sintetskih supstrata najbolji je Arg-Arg-2-naftilamid pri čemu je pH oko 8,6 optimalan za njegovu hidrolizu pri 37 °C, a pri fiziološkom pH DPP III zadržava 45 % hidrolitičke aktivnosti prema ovom supstratu.[8] Specifičnost ljudske DPP III, kao ni ostalih DPP III, prema peptidnim supstratima nije precizno određena, no uočeno je da su joj najbolji supstrati oligopeptidi s četiri do osam aminokiselina (hidrolitičko djelovanje na tripeptide je slabo), pri čemu preferira one s hidrofobnim aminokiselinskim ostatkom na položaju P1'.[5]

Ciljnom mutagenezom na ljudskoj DPP III ustanovljeno je da supstitucija His568 s Asn rezultira drastičnim smanjenjem enzimske aktivnosti (uz sintetski supstrat Arg-Arg-2-naftilamid određeni su kinetički parametri za divlji tip (eng. *wild type*, WT) enzima: K_m=9,39 ± 1,11 μM i k_{cat}=16,20 ± 2,69 s^{-1}, i za mutant H568N: K_m=11,81 ± 0,18 μM i k_{cat}=0,0125 ± 5×10^{-4} s^{-1}),[14] te da zamjena Tyr318 sa Phe također značajno smanjuje katalitičku efikasnost enzima uz isti supstrat (kinetički parametri mutanta Y318F: K_m=10,4 ± 1,7 μM i k_{cat}=0,31 ± 0,03 s^{-1}).[12]

Nadalje, pokazano je da Trp300, evolucijski očuvan u obitelji M49, sudjeluje u vezanju kompetitivnih inhibitora i pretpostavljeno je da ovaj aminokiselinski ostatak sudjeluje u održavanju funkcionalnog integriteta podmjesta S2 u enzimu.[13]

2009. godine riješena je kristalna struktura ljudske DPP III (PBD kod: 3FVY, slika 8) i pokazano je da je slična strukturi kvaščevog ortologa, iako je identičnost njihovih aminokiselinskih sljedova svega ~36%.

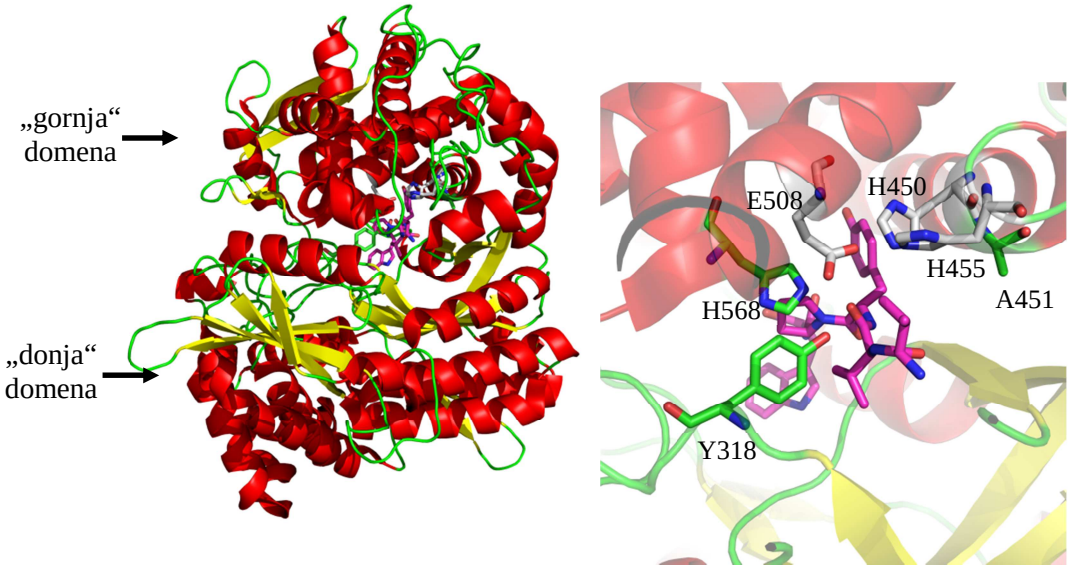


Slika 8. Kristalna struktura ljudske DPP III (PDB kod: 3FVY). Lijevo, pogled na struktura u cjelini; β-vrpce obojene su žuto, a α-zavojnice crveno. Desno, uvećani prikaz aktivnog mjesta ljudske DPP III. U aktivnom mjestu naznačeni su: cinkov ion (prikazan sivom kuglicom), aminokiselinski ostaci koji koordiniraju metalni ion (His 450, His455 i Glu508, prikazani štapićima s bijelo obojenim ugljikovim atomima), aminokiselinski ostaci Glu451 i His568 (prikazani štapićima sa zeleno obojenim ugljikovim atomima) i molekula vode koja koordinira cink (prikazana crvenim štapićem). Slika je generirana s programom PyMol.[31]

Rezultati mutacijske analize i kvantitativnog određivanja cinka štakorske DPP III pokazali su da dva histidina iz prvog karakterističnog heksapeptidnog motiva $H^{450}ELLGH^{455}$ i drugi glutamat iz drugog heksapeptidnog motiva $E^{507}E^{508}CRAE^{512}$, koordiniraju ion cinka u aktivnom mjestu, dok je za glutaminsku kiselinu (Glu451) koja se nalazi u prvom heksapeptidnom motivu DPP III pretpostavljeno da je odgovorna za baznu katalizu hidrolize

peptidne veze.[1,2,39] Tako je dokazano da udio cinkovih iona uslijed mutacije Glu508 u Ala, His450 u Tyr i His455 u Tyr pada s ~1 mol/mol proteina na ~0 mol/mol proteina.

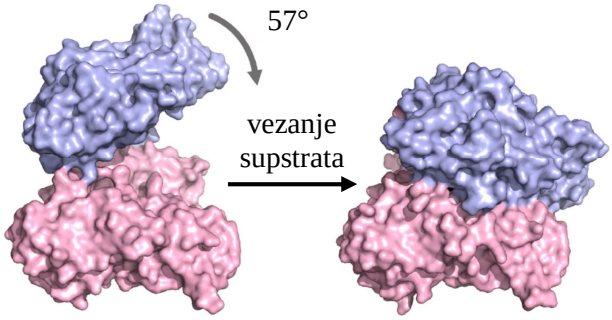
2012. godine riješena je i struktura mutanta Glu451Ala ljudske DPP III u kompleksu sa supstratom -pentapeptidom tinorfinom (PBD kodovi: 3T6B i 3T6J, slika 9).[51] Uočeno je da navedena struktura predstavlja kompaktniji (globularniji) oblik proteina, u kojoj je drastično smanjena udaljenost između „gornje“ i „donje“ domene. Navedena struktura pružila je uvid u način vezanja supstrata u vezno mjesto enzima. Pri tome, važno je naglasiti da u strukturi mutanta nedostaje elektronska gustoća cinkovog iona (slika 9).



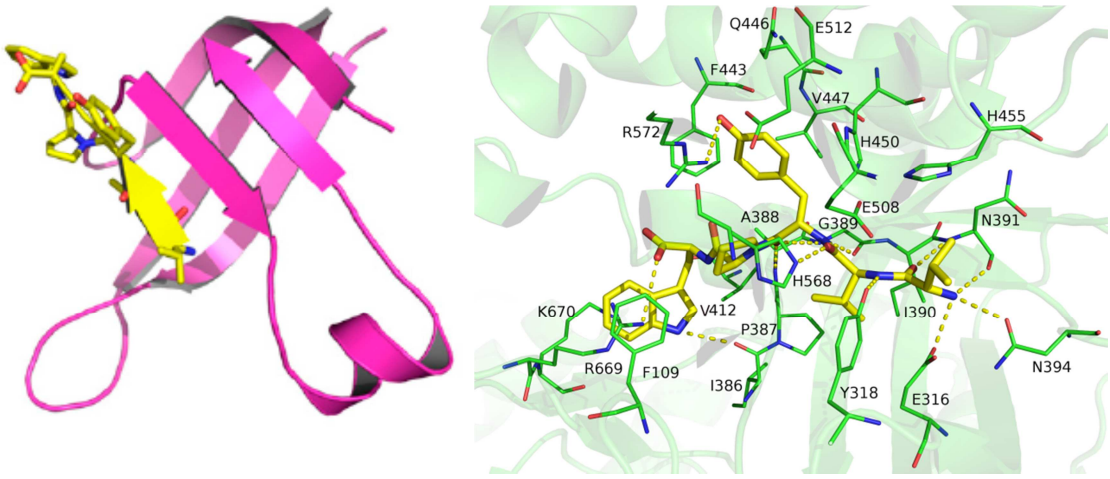
Slika 9. Kristalna struktura mutanta E451A ljudske DPP III u kompleksu s tinorfinom (PDB kod: 3T6B). Lijevo, pogled na strukturu kompleksa u cjelini; β-vrpce obojene su žuto, a α-zavojnice crveno. Desno, uvećani prikaz aktivnog mjesta ljudske DPP III. U aktivnom mjestu naznačeni su: aminokiselinski ostaci koji koordiniraju metalni ion (His 450, His455 i Glu508, prikazani štapićima s bijelo obojenim ugljikovim atomima), aminokiselinski ostaci Tyr318, Glu451 i His568 (prikazani štapićima sa zeleno obojenim ugljikovim atomima) i tinorfin, Val-Val-Tyr-Pro-Trp (prikazan štapićima s ružičasto obojenim ugljikovim atomima). Slika je generirana s programom PyMol.[31]

Nadalje, Bezerra i suradnici[51] su pokazali da se uslijed konformacijske promjene proteina ljudske DPP III, koja se može opisati kao „zatvaranje“, kut između dviju domena smanji za približno 60° (slika 10). Pri tome sekundarne strukture pojedinih domena ostaju očuvane. Aminokiselinski ostaci 409-420 predstavljaju tzv. mehanički zglob („šarku“) oko kojeg dolazi do pomicanja domena, a sama konformacijska promjena rezultat je vezanja supstrata,

tinorfina, u vezno mjesto enzima. U slobodnom (bez vezanog supstrata) enzimu, Lys670 iz „donje“ domene proteina ostvaruje vodikove veze s aminokiselinama s C-kraja spomenutog mehaničkog zgloba. Vezanjem supstrata, pri čemu tinorfin u ispruženoj (eng. *extended*) konformaciji formira β-vrpcu koja se na antiparalelan način veže za β-ploču iz „donje“ domene proteina sastavljenu od pet β-vrpci (slika 11), Lys670 se pomiče, te stupa u interakciju s karboksilnom skupinom na C-kraju supstrata. U isto vrijeme Arg669 ostvaruje vodikovu vezu s karboksilnom skupinom tinorfina.

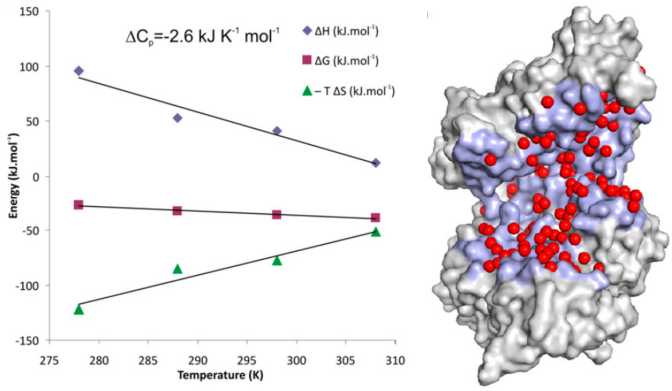


Slika 10. Pomicanje domena (površina „gornje“ domene obojana je plavo, a „donje“ ružičasto) uslijed vezanja tinorfina u ljudsku DPP III. Preuzeto iz rada Bezerre i suradnika.[51]



Slika 11. Vezno mjesto ljudske DPP III u kompleksu s opioidnim peptidom tinorfinom (PDB kod: 3T6B). Lijevo, supstrat (tinorfin, Val-Val-Tyr-Pro-Trp) se veže u obliku β-vrpce (naznačen štapićima i strelicom obojenom žutom bojom) na način da predstavlja nastavak već postojećih pet β-vrpci iz „donje“ domene proteina (strelice obojene ružičasto). Preuzeto iz rada Bezerre i suradnika.[51] Desno, aminokiseline koje se nalaze unutar 4 Å od molekule supstrata naznačene su štapićima sa zeleno obojenim ugljikovim atomima. Vodikovi atomi nisu prikazani zbog jasnoće. Elektrostatske interakcije naznačene su žutom isprekidanom linijom. Slika je generirana s programom PyMol.[31]

Također, autori navode da je vezanje tinorfina za enzim entropijski potpomognut proces. Rezultati izotermne kalorimetrijske titracije pokazali su da je vezanje tog supstrata izrazito endoterman proces. Da bi proces bio spontan, promjena Gibbsove energije (ΔG) pri konstantnom tlaku i temperaturi, mora biti negativna, što u slučaju endotermnih procesa znači da apsolutna vrijednost entropijskog člana mora biti veća od entalpijskog (tj. $T\Delta S > \Delta H$). U proučavanom temperaturnom području, protutežu pozitivnoj vrijednosti ΔH predstavlja veliki pozitivni entropijski doprinos, što rezultira egzergonim procesom vezanja supstrata (slika 12). Temperaturna ovisnost entalpije (toplinski kapacitet, ΔC_p), ima negativan nagib, što upućuje na činjenicu da je proces vezanja potaknut „zakopavanjem“ hidrofobnih dijelova površine proteina. Bezerra i suradnici su izračunali da se uslijed vezanja supstrata, površina proteina dostupna otapalu smanji za oko 3500 $Å^2$. Dakle, vezanje supstrata je entropijski potpomognut proces, pri čemu povećanju entropije najviše doprinosi oslobađanje strukturiranih molekula vode iz pukotine između domena enzima (slika 12). Analiza kristalizacijskih procesa,[52] pokazala je da se entropijski doprinos oslobađanja strukturiranih molekula vode s površine proteina kreće u rasponu od 100 do 700 J mol^{-1} K^{-1}, što približno dogovara oslobađanju 5-30 molekula vode tijekom kristalizacije proteina. U „otvorenoj“ formi DPP III (slika 8), u veznom mjestu, točnije u rascjepu među domenama, nalazi se otprilike 60 molekula vode (slika 12). Autori su pretpostavili da istiskivanje svih (ili većeg dijela) tih molekula vode može objasniti povoljni entropijski doprinos vezanja molekule tinorfina za DPP III (od 170 do 450 J mol^{-1} K^{-1} u mjerenom temperaturnom području). Strukturne molekule vode vezane u procjepu između domena predstavljaju svojevrsni entropijski rezervoar koji se koristi kao pogon za vezanje supstrata. DPP III je jedna od rijetkih peptidaza za koje se zna da pokazuju entropijski potpomognut proces vezanja i/ili veliki pomak domena uslijed vezanja supstrata. Bezerra i suradnici sugeriraju da bi se široka supstratna specifičnost enzima iz DPP III obitelji mogla objasniti upravo tom konformacijskom plastičnošću. Prilagodljivost širine pukotine među domenama rezultira mijenjanjem veličine veznog mjesta enzima što omogućuje smještanje različiti supstrata, tj. supstrata različitih aminokiselinskih sljedova.



Slika 12. Temperaturna ovisnost ΔG, ΔH i $-T\Delta S$ dobivena izotermnom kalorimetrijskom titracijom, lijevo. Desno su prikazane molekule vode na površini veznog mjesta „otvorene“ strukture DPP III (PDB kod: 3FVY), koje se oslobađaju iz unutrašnjosti enzima vezanjem supstrata. Površina obojena plavo ukazuje na površinu enzima koja prestaje biti izložena otapalu uslijed zatvaranja enzima. Preuzeto iz rada Bezerre i suradnika[51].

2.4. Računalna kemija

Računalna kemija ili molekulsko modeliranje je područje kemije za koje se može reći da je ujedno i mlado i staro. Staro u smislu da su njezini temelji postavljeni s razvojem kvantne kemije početkom dvadesetog stoljeća, no budući je njezina važnost usko povezana s razvojem računala, značajnije se primjenjuje tek posljednjih 35 godina. Računalni kemičari koriste modele teorijske kemije i fizike ugrađene u učinkovite računalne programe za izračun statičkih (struktura molekula, elektronska gustoća, redovi veza) i dinamičkih (konformacijske promjene, kemijske reakcije, vezanje nekih malih molekula u aktivno mjesto enzima) svojstava molekula. U tu svrhu koriste se metode modeliranja različitog stupnja složenosti: empirijske (tj. metode molekulske mehanike, MM, i molekulske dinamike, MD), semiempirijske, kvantno-mehaničke (QM) i kombinirane kvantno-mehaničke – molekulsko-mehaničke (QM/MM). Neke od tih metoda su izuzetno točne (primjenjive samo na male molekule), dok druge koriste značajne aproksimacije. *Ab initio* metode se upotpunost temelje na kvantno-mehaničkoj teoriji, pa se još nazivaju „metode prvih/osnovnih principa“. Empirijske i semiempirijske metode, u svrhu pojednostavljenja teorijske pozadine, imaju ugrađene neke eksperimentalne rezultate (parametre) i obično su manje precizne, no zbog mogućnosti da se njima opisuju znatno veći sustavi ne i manje točne.

2.5. Kvantno-mehaničke (QM) metode

Osnovni postulat kvantne mehanike kaže da je sustav u prostoru i vremenu u potpunosti opisan valnom funkcijom $\Psi(\mathbf{r},t)$, gdje je **r** matrica prostornih koordinata ($\mathbf{r}_1,\mathbf{r}_2,\mathbf{r}_3,\ldots,\mathbf{r}_{3n}$), sastavljena od po tri koordinate (npr. *x*, *y* i *z*) za svaku od *n* čestica, a *t* je vrijeme. Prostorni integral umnoška valne funkcije sa njenim kompleksnim konjugatom ($|\Psi^*\Psi|$, ili $|\Psi^2|$ ako se radi o realnim funkcijama) ima jedinicu gustoće vjerojatnosti. Dakle, vjerojatnost da će se sustav naći u određenom dijelu faznog prostora jednak je integralu od $|\Psi^2|$ preko toga dijela prostora. Valna funkcija često se zove i funkcijom stanja jer jednom kada se ona odredi moguće je djelovanjem određenog operatora na nju odrediti sva mjerljiva svojstva sustava. Npr. djelovanjem operatora **H** (Hamiltonov operator ili hamiltonijan) koji je operator ukupne energije, a dan je zbrojem operatora kinetičke i potencijalne energije (**H**=**T**+**U**), na valnu funkciju:

$$\mathbf{H}\Psi(\mathbf{r},t) = i\hbar\frac{\partial\Psi(\mathbf{r},t)}{\partial t} \tag{2.1}$$

dobije se ta ista valna funkcija pomnožena konstantom, koja u ovom slučaju odgovara ukupnoj energiji sustava:

$$\mathbf{H}\Psi(\mathbf{r},t) = E\Psi(\mathbf{r},t). \tag{2.2}$$

Znači, $\Psi(\mathbf{r},t)$ je vlastita funkcija sustava, a *E* vlastita vrijednost navedene valne jednadžbe (vlastitih vrijednosti).

Ako je valnu funkciju moguće prikazati kao produkt dviju neovisnih valnih funkcija, prostorne i vremenske, $\Psi(\mathbf{r},t) = \psi(\mathbf{r})\varphi(t)$, te uz pretpostavku da potencijalna energija ne ovisi o vremenu, tj. da **H** djeluje samo na valnu funkciju ovisnu o prostornim koordinatama, iz jednadžbe 2.2 dobiju se dvije neovisne jednadžbe:

$$\mathbf{H}\psi(\mathbf{r}) = E\psi(\mathbf{r}), \tag{2.3}$$

$$\frac{\mathrm{d}\varphi(t)}{\mathrm{d}t} = -i\frac{E}{\hbar}\varphi(t) \tag{2.4}$$

gdje je E energija stacionarnog stanja sustava. Jednadžba 2.3 je tzv. vremenski neovisna Schrödingerova jednadžba. Prostorna valna funkcija $\psi(\mathbf{r})$ ovisi o 3n koordinata, gdje je n ukupan broj čestica (elektrona i jezgara). Tipični oblik operatora hamiltonijana uključuje pet doprinosa ukupnoj energiji sustava:[53]

$$\mathbf{H} = -\sum_i \frac{\hbar^2}{2m_e}\nabla_i^2 - \sum_k \frac{\hbar^2}{2m_k}\nabla_k^2 - \sum_i \sum_k \frac{e^2 Z_k}{r_{ik}} + \sum_{i<j} \frac{e^2}{r_{ij}} + \sum_{k<l} \frac{e^2 Z_k Z_l}{r_{kl}} \tag{2.5}$$

gdje indeksi i i j odgovaraju elektronima, k i l jezgrama, $\hbar$ je reducirana Planckova konstanta ($\hbar = h/2\pi$), m_e i m_k su mase elektrona, odnosno jezgara, ∇^2 ($\nabla_i^2 = \frac{\partial^2}{\partial x_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial y_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial z_i^2}$) je operator, Laplacian, e je naboj elektrona, Z je atomski broj, a r_{ab} je udaljenost između čestica a i b. Izrazi s desne strane jednadžbe 2.5, gledajući s lijeva na desno, predstavljaju kinetičke energije, elektrona i jezgara, energiju međusobnog privlačenja elektrona i jezgara, i energije međusobnog odbijanja elektrona i jezgra.

Parcijalna diferencijalna jednadžba vlastitih vrijednosti dana izrazom 2.3 predstavlja osnovnu jednadžbu za određivanje energijskih stanja atoma i molekula. Međutim, veliki broj koordinata u slučaju molekula uvelike otežava njezino rješavanje, te se uvode određene aproksimacije. Born-Oppenheimerova aproksimacija omogućuje separaciju elektronskog i nuklearnog gibanja, tj. računanje elektronske energije za određeni položaj jezgara. To se opravdava činjenicom da su mase elektrona puno manje od masa jezgara (elektroni su ~1800 puta lakši od jezgara) pa se oni gibaju znatno brže od jezgara tj. „osjećaju“ samo položaje, a ne i količine gibanja jezgara. Sa stanovišta elektrona jezgre kao da miruju, tj. zanemaruje se utjecaj gibanja jezgara na gibanje elektrona, a energijski doprinos međusobnog odbijanja jezgara je konstantan za određeni raspored atoma. U tom slučaju, tzv. elektronska Schrödingerova jednadžba ima oblik:

$$\left(\mathbf{H}_{\mathrm{el}} + \mathbf{U}_{\mathrm{N}}\right)\psi_{\mathrm{el}}\left(\mathbf{r}_i;\mathbf{r}_k\right) = E_{\mathrm{el}}\psi_{\mathrm{el}}\left(\mathbf{r}_i;\mathbf{r}_k\right) \tag{2.6}$$

gdje indeks „el“ upućuje na to da se koristi Born-Oppenheimerova aproksimacija, $\mathbf{H}_{\mathrm{el}}$ uključuje samo prvi, treći i četvrti član s desne strane jednadžbe 2.5, $\mathbf{U}_{\mathrm{N}}$ je energije međusobnog odbijanja jezgara. Elektronske koordinate $\mathbf{r}_i$ su neovisne varijable, a nuklearne koordinate $\mathbf{r}_k$ su parametri te se navode iza točke-zareza u izrazu za elektronsku valnu funkciju, $\psi_{\mathrm{el}}\left(\mathbf{r}_i;\mathbf{r}_k\right)$. Vlastita vrijednost elektronske Schrödingerove jednadžbe je tzv.

unutrašnja energija, E_{el}. Važno je primijetiti da je član $\mathbf{U}_N$ konstantan za određeni set fiksiranih nuklearnih koordinata. Važno je naglasiti da bez Born-Oppenheimerove aproksimacije ne bi postojao koncept plohe potencijalne energije (eng. *Potential Energy Surface*, PES), a samim time i koncept strukture ravnotežnog i prijelaznog stanja budući da oni predstavljaju kritične točke na PES. PES je površina definirana s E_{el} za sve moguće položaje jezgara (pri standardnim uvjetima u kojima neki sustav postoji).

Jednadžba 2.6 jednostavnija je od jednadžbe 2.3 jer ne uključuje član koji opisuje korelaciju između jezgara i elektrona. Postoji mnogo ortonormiranih vlastitih funkcija ψ_i s pripadajućim vlastitim vrijednostima E_i koje predstavljaju rješenja jednadžbe 2.6. Varijacijski princip kaže da se kvaliteta odabrane valne funkcije kojom se opisuje (definira) osnovno stanje sustava, može procijeniti izračunom odgovarajuće energije, po pravilu „što niže to bolje“, tj. što je bolje odabrana valna funkcija, energija će biti niža. To znači da će se proizvoljno odabrana funkcija Φ, koja nije nužno linearna kombinacija (nepoznatog) ortonormiranog skupa valnih funkcija ψ_i ($\Phi = \sum_i c_i \psi_i$), moći koristiti za izračun drugih, vlastitih, veličina sustava primjenom odgovarajućih operatora, ako joj odgovara najniža energija.

Postavlja se pitanje koje matematičke funkcije koristiti u izrazu $\Phi = \sum_i c_i \psi_i$. Matematičke funkcije čijom se linearnom kombinacijom može izraziti neka proizvoljna valna funkcija Φ, zovu se osnovni skup. Npr. za sustav koji se sastoji od samo jednog elektrona i jedne jezgre, ne bi bilo potrebno pogađati valnu funkciju Φ, već bi se jednadžba 2.6 mogla riješiti egzaktno. Vlastite funkcije su tada već poznate atomske orbitale za atom vodika: 1s, 2s, 2p, 3s, 3p, …, te bi najjednostavniji princip izgradnje neke proizvoljne molekulske valne funkcije bio korištenjem atomskih orbitala vodika, tj.:

$$\phi = \sum_{i=1}^{N} a_i \varphi_i \tag{2.7}$$

gdje osnovni skup čini niz od N funkcija φ_i, a svaka funkcija ima odgovarajući koeficijent a_i. Ovakav pristup nazivamo linearnom kombinacijom atomskih orbitala (eng. *linear combination of atomic orbitals*, LCAO).

Molekulska valna funkcija višeelektronskog sustava (gdje je N ukupan broj elektrona), Ψ_{HP}, može se u Hartreejevom formalizmu izraziti kao produkt jednoelektronskih valnih funkcija (atomskih orbitala), ψ_i, te se govori o tzv. Hartreejevom produktu valnih funkcija:

$$\Psi_{\mathrm{HP}} = \psi_1\psi_1 \cdots \psi_N, \tag{2.8}$$

pri čemu vrijedi da svaka jednoelektronska valna funkcija zadovoljava jednadžbu vlastitih vrijednosti:

$$h_i\psi_i = \varepsilon_i\psi_i \tag{2.9}$$

gdje je h_i jednoelektronski hamiltonijan definiran s:[53]

$$h_i = -\frac{1}{2}\nabla_i^2 - \sum_{k=1}^{M}\frac{Z_k}{r_{ik}} + U_i\{j\}. \tag{2.10}$$

Prvi član u jednadžbi 2.10 odgovara kinetičkoj energiji elektrona i, drugi potencijalnoj energiji privlačenja elektrona i jezgre, a zadnji član predstavlja međudjelovanje elektrona i sa svim ostalim elektronima, ($U_i\{j\} = \sum_{i\neq j}\int\frac{\rho_j}{r_{ij}}d\mathbf{r}$, pri čemu je ρ_j gustoća elektrona u orbitali $\{j\}$).

Suma individualnih operatora h_i jednaka je operatoru $H = \sum_{i=1}^{N} h_i$ kojem odgovara vlastita funkcija Ψ_{HP}, prema izrazu $H\Psi_{\mathrm{HP}} = \left(\sum_{i=1}^{N}\varepsilon_i\right)\Psi_{\mathrm{HP}}$.

Međutim, svaka jednoelektronska valna funkcija je produkt prostorne i spinske (α ili β) funkcije. Iz uvjeta da elektronska valna funkcija mora promijeniti predznak uslijed zamjene elektrona, tj. da ukupna elektronska valna funkcija, koja uključuje i spin, mora biti antisimetrična na izmjenu bilo kojeg para elektrona, ukupna elektronska valna funkcija sustava zapisuje se u obliku Slaterove determinente. Npr. ukupna valna funkcije osnovnog stanja sustava koji se sastoji od dva elektrona istog spina α može se napisati kao:

$$\Psi_{\mathrm{SD}} = \frac{1}{\sqrt{2}}\begin{vmatrix}\psi_a(1)\alpha(1) & \psi_b(1)\alpha(1)\\ \psi_a(2)\alpha(2) & \psi_b(2)\alpha(2)\end{vmatrix} = \frac{1}{\sqrt{2}}\begin{vmatrix}\chi_1(1) & \chi_2(1)\\ \chi_1(2) & \chi_2(2)\end{vmatrix} \tag{2.11}$$

gdje je χ spin-orbitala tj. produkt prostorne i spinske vlastite (valne) funkcije. Ponekad se koristi i još kompaktniji zapis $\Psi_{\mathrm{SD}} = |\chi_1\chi_2\rangle$.

Tada se konačan skup valnih funkcija i energija za višelektronski sustav dobije rješavanjem sekularne determinante metodom samousklađenog polja (eng. *self-consistent field method*):

$$\begin{vmatrix} F_{11}-ES_{11} & F_{12}-ES_{12} & \cdots & F_{1N}-ES_{1N} \\ F_{21}-ES_{21} & F_{22}-ES_{22} & \cdots & F_{2N}-ES_{2N} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ F_{N1}-ES_{N1} & F_{N2}-ES_{N2} & \cdots & F_{NN}-ES_{NN} \end{vmatrix} = 0. \tag{2.12}$$

Element matrice S predstavlja integral preklapanja, dok se poopćeni oblik elementa matrice $F_{\mu\nu}$ može zapisati kao:

$$F_{\mu\nu} = \left\langle \mu \left| -\frac{1}{2}\nabla_i^2 \right| \nu \right\rangle - \sum_k^{\text{jezgre}} Z_k \left\langle \mu \left| \frac{1}{r_k} \right| \nu \right\rangle + \sum_{\lambda\sigma} P_{\lambda\sigma} \left[(\mu\nu|\lambda\sigma) - \frac{1}{2}(\mu\lambda|\nu\sigma) \right] \tag{2.13}$$

gdje je $(\mu\nu|\lambda\sigma) = \int\int \phi_\mu(1)\phi_\nu(1)\frac{1}{r_{12}}\phi_\lambda(2)\phi_\sigma(2)\,d\mathbf{r}(1)\,d\mathbf{r}(2)$, a ϕ_μ i ϕ_ν su osnovne funkcije koje predstavljaju gustoću vjerojatnosti jednog elektrona, a ϕ_λ i ϕ_σ drugog. **P** je matrica gustoće koja opisuje doprinos svake pojedine osnovne funkcije višeelektronskoj valnoj funkciji.

U praksi, jednoelektronske valne funkcije opisuju se Slaterovim tipom orbitala (eng. *Slater-type orbitals*, STO), čija je prednost što nalikuju vodikovim atomskim orbitalama. Međutim, zbog numeričke jednostavnosti, Slaterove orbitale sve se više zamjenjuju Gaussovim tipom orbitala (eng. *Gaussian-type orbital*, GTO) i to na način da se STO orbitala aproksimira s linearnom kombinacijom više GTO orbitala, tj. STO-*M*G gdje *M* označava broj Gaussiana koji se koriste za aproksimaciju jedne STO orbitale. Kada je valna funkcija definirana kao linearna kombinacija Gaussiana, radi se o tzv. kontrahiranoj (eng. *contracted*), tj. sažetoj osnovnoj funkciji, a individualni Gaussiani od kojih je ona sastavljena zovu se primitivni Gaussiani. Optimalan omjer točnosti i brzine dobiven je za STO-3G, tj. za slučaj kada je jedna Slaterova orbitala opisana s tri primitivna Gaussina. STO-3G osnovni skup se još zovn i „*single-ζ*“, ili minimalnim osnovnim skupom jer se koristi jedna i samo jedna osnovna funkcija za opis unutarnjih i vanjskih (valentnih) elektrona. Npr. za H i He postoji samo 1s funkcija, za Li do Ne pet funkcija 1s, 2s, $1p_x$, $1p_y$ i $2p_z$. Fleksibilnost osnovnog skupa može se povećati na način da se jedna atomska orbitala aproksimira s više osnovnih funkcija,

od kojih svaka može biti dana kao linearna kombinacija primitivnih gaussiana. Osnovni skup s dvije osnovne funkcije za svaku atomsku orbitalu zove se „*double-ζ*“, dok osnovni skup s tri osnovne funkcije za svaku atomsku orbitalu „*triple-ζ*“. Budući da nastanka ili pucanje kemijske veze puno više utječe na valentne nego unutarnje elektrone, razvili su se i tzv. „*split-valence*“ osnovni skupovi (ili „*valence-multiple-ζ*“) u kojima se unutarnje orbitale i dalje opisuju jednom kontrahiranom osnovnom funkcijom, a valentne orbitale se cijepaju u proizvoljan broj funkcija. Najviše se koriste „*split-valence*“ osnovni skupovi Poplea i suradnika, kao što su 3-21G, 6-21G, 4-31G i 6-311G. Prvi broj označava broj primitivnih Gaussina koji se koriste za opis unutarnjih orbitala, dok brojevi iza crtice ukazuju na broj primitivnih Gaussiana koji se koristi za opis valentnih orbitala. Ukoliko su iza crtice dva broja radi se o „*valence-double-ζ*“ osnovnom skupu, ako su tri o „*valence-triple-ζ*“. U slučaju kada je to potrebno, Popleovom osnovnom skupu pridodaju se polarizacijske i difuzne funkcije. Atomi s nepodijeljenim elektronskim parom i anioni bolje se opisuju osnovnim skupovima u kojima se teškim atomima dodatno pridružuju s i p difuzne funkcije (naznačene sa znakom +, npr. 6-31+G), a atomima vodika difuzna s-funkcija (naznačeno s drugim znakom + npr. 6-31++G, gdje se prvi znak + odnosi na difuzne funkcije, s i p, na teškim atomima, a drugi na difuzne funkcije, s, na vodicima). Dodavanjem osnovnih funkcija većeg angularnog kvantnog broja (npr. d i f kod teških atoma i p kod vodika), što se označava znakom * ili oznakom tipa dodane funkcije, elektronska gustoća pomiče se dalje od jezgre atoma. Npr. u slučaju 6-31G** ili 6-31G(d,p) osnovnog skupa svakom teškom atomu dodaje se 6 (5) funkcija d-tipa, a atomu vodika 3 funkcije p-tipa.

Kao što je već rečeno, jednom kada se zna (odredi) valna funkcije sustava, djelovanjem određenih operatora na nju, moguće je iz nje odrediti sva mjerljiva svojstva sustava. Budući da elektronska valna funkcija ovisi o jednoj spinskoj i tri prostorne koordinate za svaki elektron, postavlja se pitanje ne bi li bilo zgodnije raditi s nečim što zavisi o manje varijabli i što je intuitivnije od same valne funkcije. Kako hamiltonijan ovisi samo o položajima i atomskim brojevima jezgara i o ukupnom broju elektrona, umjesto valne funkcije mogla bi se koristiti elektronska gustoća, ρ, čiji integral preko cijelog prostora odgovara ukupnom broju (naboju) elektrona u sustavu. S obzirom da jezgre efektivno odgovaraju točkastim nabojima, njihov položaj će odgovarati lokalnim maksimumima u elektronskoj gustoći. Još je samo potrebno znati atomske brojeve kako bi se mogao u potpunosti definirati hamiltonija. Dakle,

ako se zna elektronska gustoća, može se izgraditi hamiltonijan, riješiti jednadžba vlastitih vrijednosti, te potom odrediti valne funkcije.

Teorija funkcionala gustoće (eng. *density functional theory*, DFT) temelji se na ideji da se energija molekule može izračunati bez korištenja valne funkcije, kao i na dva teorema koja su 1964. god. dokazali Hohenberg i Kohn. Prvi teorem kaže da elektronska gustoća u osnovnom energijskom stanju jedinstveno određuje potencijal, a time i sva ostala svojstva sustava, a drugi da se gustoća pokorava varijacijskom principu, tj. da su elektronske gustoće kojima odgovaraju niže energije, bliže točnoj.[54] U DFT teoriji energija molekule računa se korištenjem samo elektronske gustoće kao varijable, tj. energija postaje funkcija elektronske gustoće, dok je sama gustoća funkcija prostornih koordinata:

$$E\left[\rho(\mathbf{r})\right]=T_{\mathrm{ni}}\left[\rho(\mathbf{r})\right]+U_{\mathrm{ne}}\left[\rho(\mathbf{r})\right]+U_{\mathrm{ee}}\left[\rho(\mathbf{r})\right]+\Delta T\left[\rho(\mathbf{r})\right]+\Delta U_{\mathrm{ee}}\left[\rho(\mathbf{r})\right]. \tag{2.14}$$

Funkcija čiji je argument također funkcija zove se funkcional, te su stoga članovi T i U funkcionali gustoće. Članovi s desne strane jednadžbe 2.14 odgovaraju redom kinetičkoj energiji neinteragirajućih elektrona, interakciji jezgara i elektrona, klasičnom međusobnom odbijanju elektrona, korekciji kinetičke energije zbog interakcije elektrona, te neklasičnim korekcijama energije zbog međusobnog odbijanja elektrona. Dakle, prema Kohn i Shamu (1965.god.) polazišna točka za takve račune je nestvarni sustav koji se sastoji od neinteragirajućih elektrona čija ukupna elektronska gustoća u osnovnom stanju odgovara gustoći realnog sustava s elektronima koji interagiraju (budući da elektronska gustoća određuje položaje i atomske brojeve jezgara, te su veličine jednake u sustavu neiteragirajućih elektrona i stvarnom). Za sustav neinteragirajućih elektrona, kinetička energija jednaka je sumi individualnih kinetičkih energija elektrona. Ako se gustoća zapiše korištenjem Slaterove determinante (koja je točna valna funkcija za sustav od N neinteragirajućih elektrona) kao $\rho=\sum_{i=1}^{N}\langle\chi_i|\chi_i\rangle$, jednadžba 2.14 može se zapisati kao:

$$\begin{aligned}E\left[\rho(\mathbf{r})\right]=&\sum_{i}^{N}\left(\left\langle\chi_i\left|-\frac{1}{2}\nabla_i^2\right|\chi_i\right\rangle-\left\langle\chi_i\left|\sum_{k}^{\text{jezgre}}\frac{Z_k}{|\mathbf{r}_i-\mathbf{r}_k|}\right|\chi_i\right\rangle\right)\\&+\sum_{i}^{N}\left\langle\chi_i\left|\frac{1}{2}\int\frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r}_i-\mathbf{r}'|}d\mathbf{r}'\right|\chi_i\right\rangle+E_{\mathrm{xe}}\left[\rho(\mathbf{r})\right].\end{aligned} \tag{2.15}$$

Članovi ΔT i ΔU_{ee} spojeni su u jedan član E_{xc}, koji predstavlja energiju izmjene-korelacije (eng. *exchange-correlation energy*). Kao što mu i samo ime kaže, taj član uključuje kvantno mehaničke efekte izmjene i korelacije, tj. korekciju za klasičnu samointerakcijsku energiju i razliku kinetičkih energija nestvarnog i realnog sustava. Orbitale χ koje minimiziraju E u jednadžbi 2.15 zadovoljavaju jednadžbu vlastitih vrijednosti:

$$h_i^{KS}\chi_i = \varepsilon_i \chi_i \tag{2.16}$$

gdje je Kohn-Shamov jednoelektronski operator definiran s:

$$h_i^{KS} = -\frac{1}{2}\nabla_i^2 - \sum_k^{\text{jezgre}} \frac{Z_k}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_k|} + \int \frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' + U_{xc}. \tag{2.17}$$

Derivacija funkcionala U_{xc}, $U_{xc} = \frac{\delta E_{xc}}{\delta \rho}$, jednaka je jednoelektronskom operatoru čija je očekivana vrijednost E_{xc}. Hamiltonijan sustava može se tada napisati kao suma Kohn-Shamovih jednoelektronskih operatora za sustav N neinteragirajući elektrona[55]:

$$\sum_{i=1}^{N} h_i^{KS} \left| \chi_1 \chi_2 \cdots \chi_N \right\rangle = \sum_{i=1}^{N} \varepsilon_i \left| \chi_1 \chi_2 \cdots \chi_N \right\rangle. \tag{2.18}$$

Vlastite funkcije tog hamiltonijana su Slaterove determinante individualnih jednoelektronskih vlastitih funkcija, a vlastite vrijednosti su suma jednoelektronskih vlastitih vrijednosti.

U praksi, Kohn-Shamove orbitale se izražavaju korištenjem osnovnog skupa funkcija ϕ, a individualni koeficijenti određuju se rješavanjem sekularne jednadžbe, gdje su elementi $F_{\mu\nu}$ iz HF teorije, zamijenjeni s elementima $K_{\mu\nu}$:

$$K_{\mu\nu} = \left\langle \phi_\mu \left| -\frac{1}{2}\nabla_i^2 - \sum_k^{\text{jezgre}} \frac{Z_k}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_k|} + \int \frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' + U_{xc} \right| \phi_\nu \right\rangle. \tag{2.19}$$

DFT metode razlikuju se po tome koji se funkcional koristi za izračun energije izmjene, a koji (ako uopće koji) za energiju korelacije.

U izradi ove doktorske disertacije korištena su tri različita funkcionala: B3LYP, M06 i B97D. B3YLP funkcional predstavlja kombinaciju Becketovog funkcionala iz 1988. god. (označeno slovom B) koji uključuje Slaterovu izmjenu i korekciju koja uključuje gradijent gustoće,[56] i Lee, Yang i Parr-ov korelacijski funkcional (označeno slovima LYP).[57,58] B97D i

M06 su samostalni funkcionali, pri čemu prvi, Grimmov funkcional, (B97)[59] uključuje disperzne interakcije, a drugi je Truhlara-Zhaoa-ov[60] hibridni funkcional.

Kvantno mehanički računi mogu se izvoditi za sustav koji se nalazi u plinskoj fazi (tj. 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 koristili ili D-PCM (eng. Dielectric PCM) koji otapalo opisuje kao polarizabilni dielektrik ili CPCM (eng. Conductor-like PCM) koji otapalo opisuje kao sredstvo konstantne permitivnosti ε.

2.6. Metode molekulske mehanike (MM)

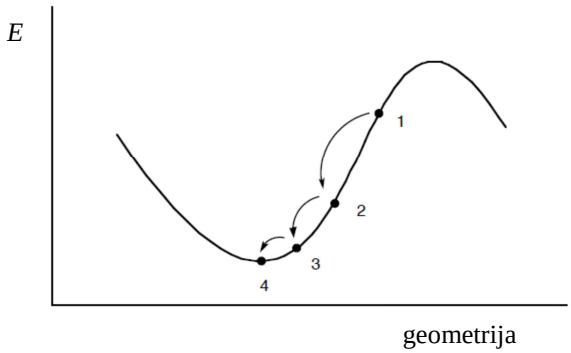
Računalne metode u kojima se zanemaruju elektronska struktura atoma, a ukupna energija molekule (sustava) postaje funkcija samo položaja jezgara (tj. atomi se opisuju kao tvrde kuglice), pripadaju tzv. empirijskim metodama. Tu spadaju metode molekulske mehanike (eng. *molecular mechanics*, MM) i molekulske dinamike (eng. *molecular dynamics*, MD). MM metode koriste se u slučaj kada se želi odrediti optimalna geometrija neke biomakromolekule (struktura koja odgovara energijskom minimumu molekule sastavljene od velikog broja atoma), a MD kada želimo proučavati dinamiku nekog sustava na dužoj vremenskoj skali.

Matematičke funkcije i parametri koji definiraju ukupnu potencijalnu energiju (tj. energijsku plohu) sustava nazivaju se poljem sila. Stoga, se navedene metode nazivaju još i metodama polja sila. U tzv. atomističkim poljima sila (eng. *all atom force fields*) svaki se atom opisuje eksplicitno, tj. svakom su atomu dodijeljeni njegovi pripadajući parametri (naboj, masa, radijus, konstante sile) koji ulaze u definiciju polja sila. Oblik funkcije i njezini parametri dobiveni su eksperimentalno i/ili iz kvantno mehaničkih računa. Osnovni oblik funkcije potencijalne energije sastoji se od „veznog“ i „neveznog“ člana. Vezni član opisuje interakcije između atoma povezanih kovalentnom vezom (energija istezanja veze, promjene valentnog kuta i torzijska energija), dok nevezni član (ponekad se zove i nekovalentni član) opisuje elektrostatske i van der Waalsove interakcije među atomima. Točna dekompozicija pojedinih članova ovisi o polju sila, međutim ako se radi o aditivnom polju sila tada bi opći oblik bio:

$$U_{\text{ukupna}} = U_{\text{vezna}} + U_{\text{nevezna}},$$
$$U_{\text{ukupna}} = \left[U_{\text{veza}} + U_{\text{kut}} + U_{\text{torzija}}\right] + \left[U_{\text{v.d.W}} + U_{\text{elektrostatska}}\right],$$
$$U_{\text{ukupna}} = \sum_{\text{veze}} k_{\text{b}}\left(r - r_{\text{eq}}\right)^2 + \sum_{\text{kutevi}} k_{\text{a}}\left(\theta - \theta_{\text{eq}}\right)^2 + \sum_{\text{torzije}} \frac{1}{2} V_n \left[1 + \cos\left(n\omega - \gamma\right)\right]$$
$$+ \sum_{i=1}^{N} \sum_{j=1+1}^{N} \left(4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^{6} \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}} \right). \tag{2.20}$$

U poljima sila energija istezanja veze (U_{veza}) i promjene kuta (U_{kut}) atoma povezanih kovalentnom vezom ima oblik harmoničkog potencijala koji opisuje povećanje energije uslijed odstupanja duljine veze (r) i valentnog kuta (θ) od ravnotežnih vrijednosti (r_{eq} i θ_{eq}). Za realističniji opis prilikom velikog istezanja, koristi se Morseov potencijal čime se smanjuje vjerojatnost neželjenog pucanja veze. Oblik funkcije ostalih veznih članova uvelike ovisi o polju sila koje se koristi. Promjena energije uslijed rotacije oko središnje veze četiri uzastopno kovalentno povezana atoma, U_{torzija}, obično se opisuje periodičkim funkcijama, dok se energija tzv. „neprave torzije“, kojima se osigurava planarnost aromatskih i ostalih konjugiranih sustava, opisuje funkcijom harmoničkog oscilatora. Postoje još i tzv. miješani članovi (eng. *cross-terms*) koji uključuju sprezanje različitih internih varijabli, kao npr. kutova i veza. Nevezni član potencijalne energije je računalno najzahtjevniji jer uključuje mnogo više interakcija po atomu. Definiran je za atome iz iste i/ili različitih molekula, tj. uključuje interakciju jednog atoma sa svim ostalim atomima u sustavu, uz uvjet da ih dijele najmanje tri kovalentne veze. Za opis van der Waalsovog doprinosa neveznoj energiji koristi se Lennard-Jonesov potencijal (rjeđe Buckinghemov potencijal), a elektrostatska energija računa se kao energija međudjelovanja točkastih naboja prema Coulombovom zakonu.

Jedan od ključnih motiva u ranoj fazi razvoja polja sila bio je razvoj izraza za energiju koji će omogućiti relativno laganu i brzu optimizaciju molekulske geometrije $3N$-6 dimenzionalnog sustava za N čestica u kojem zanemarujemo translacije i rotacije centra mase sustava (slika 13).

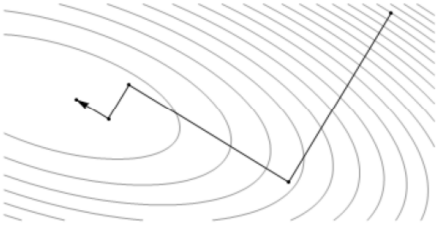


Slika 13. Proces optimizacije strukture molekule, tj. minimizacije energije molekule, od početne geometrije (1), do konačne geometrije (4).

Najjednostavniji postupak optimizacije geometrije bi bio pojedinačnim mijenjanjem pojedinih internih koordinata molekule (produljenje/smanjenje veza, kuteva, …) dok se ne pronađe odgovarajući minimum energije. Međutim takav postupak sporo konvergira, pa se u multidimenzionalnom prostoru koordinata promjene vrše u smjeru gdje je promjena energije najveća (metoda najstrmijeg spusta, eng. *steepest descent*, slika 14). U tom slučaju vektor ima smjer obrnut smjeru vektora gradijenta **g**, koji je definiran s:

$$\mathbf{g}(\mathbf{q}) = \begin{pmatrix} \frac{\partial \mathbf{U}}{\partial \mathbf{q}_1} \\ \frac{\partial \mathbf{U}}{\partial \mathbf{q}_2} \\ \frac{\partial \mathbf{U}}{\partial \mathbf{q}_3} \\ \vdots \\ \frac{\partial \mathbf{U}}{\partial \mathbf{q}_n} \end{pmatrix} \tag{2.21}$$

gdje je **q** n-dimenzionalni vektor internih (n=3N-6(5)) ili kartezijevih koordinata (n=3N) za sustav od N atoma. Kada se izračuna vektor **g**, napravi se korak u smjeru vektora –**g** do slijedećeg minimuma. U dobivenoj točki ponovno se izračuna vektor –**g**. Takav postupak ponavlja se dok se ne nađe minimum.



Slika 14. Shematski prikaz metode najstrmijeg spusta za sustav koji ima dvije geometrijske koordinate.

Metoda konjugiranih gradijenata (eng. *conjugated gradient*) bazira se na sličnom principu kao i metoda najstrmijeg spusta, tj. radi se pomak u smjeru obrnutom od najvećeg gradijenta, međutim, kako bi se izbjegle oscilacije u smjeru naprijed-nazad, što se zna dešavati kod metode najstrmijeg spusta, metoda konjugiranih gradijenta prilikom računanja novog pomaka koristi i podatke o prethodnim pomacima.

2.7. Molekulsko-dinamičke (MD) simulacije

Pronalaženje strukture najniže energije nije od posebnog značaja u slučaju bioloških makromolekularnih sustava budući se u realnim sustavima i u laboratoriju obično susrećemo s ravnotežnom smjesom velikog broja molekula manje-više različitih struktura. U tom slučaju, izmjerene veličine odgovaraju statističkom prosjeku na određenoj temperaturi, koji najvjerojatnije odgovara višestrukom broju diskretnih stereoizomera, tautomera i konformacijskih izomera koji se strukturno prilično razlikuju od idealiziranog modela sustava.

Prvi korak boljoj usklađenosti teorije i eksperimenta je uzimanje u obzir više struktura koja odgovaraju određenoj kemijskoj formuli. Dakle, potrebno je što potpunije okarakterizirati plohu potencijalne energije kako bi generirali reprezentativni ansambl struktura pri nekoj temperaturi, T. Uz pretpostavku da je prosjek stanja sustava generiranih računalnim metodama jednak statističkom prosjeku ansambla mogu se na temelju prvog izračunati makroskopske veličine koje će odgovarati onima dobivenim eksperimentom. Za generiranje reprezentativnih ravnotežnih ansambla obično se primjenjuju *Monte Carlo* simulacije ili klasične molekulsko-dinamičke (MD) simulacije.

MD simulacijama rješavaju se jednadžbe gibanja (za sustav od N atoma koji međusobno djeluju jedan na drugog na način određen molekulsko-mehaničkim poljem sila), od kojih je najjednostavnija Newtonova jednadžba:

$$m_i \frac{\partial^2 \mathbf{q}_i}{\partial t^2} = m_i \mathbf{a}_i = \mathbf{F}_i \tag{2.22}$$

gdje je $\mathbf{q}_i \equiv (x_i, y_i, z_i)$ vektor položaja, a m_i masa, i-tog atoma, a i=1,…N. Sila je negativna derivacija potencijalne energije definirane poljem sila:

$$\mathbf{F}_i = -\frac{\partial \mathbf{U}(\mathbf{q}_1, \mathbf{q}_2, ..., \mathbf{q}_N)}{\partial \mathbf{q}_i}. \tag{2.23}$$

Kombiniranjem prethodnih dviju jednadžbi, dobije se diferencijalna jednadžba:

$$m_i \frac{\partial^2 \mathbf{q}_i}{\partial t^2} = m_i \frac{\partial \mathbf{v}_i}{\partial t} = -\frac{\partial \mathbf{U}(\mathbf{q}_1, \mathbf{q}_2, ..., \mathbf{q}_N)}{\partial \mathbf{q}_i}, \tag{2.24}$$

čije rješenje predstavlja vremensku evoluciju koordinata (i brzina) čestica u 3N-6 (3N) dimenzionalnom faznom prostoru definiranom položajima (i linearnim momentima) N čestica, a naziva se trajektorija. Iako, na prvi pogled, sam postupak dobivanja trajektorije, integriranjem jednadžbe 2.24 za svaki vremenski korak, izgleda jednostavan, važno je napomenuti da za malo kompleksnije sustave ne postoje egzaktna analitička rješenja. Tada se rješenja Newtonovih jednadžbi gibanja određuju numeričkim integriranjem, tj. numeričkim rješavanjem diferencijalnih jednadžbi za konačne, male, promjene vremena (npr. korištenjem *Verletovog*, *velocity-Verletovog* ili *leap-frog* algoritma).

Većina tih numeričkih metoda zasniva se na razvoju funkcija **q** i **p** u Taylorov red. Verletov algoritam za brzine (eng. *velocity-Verlet*) računa vektore položaja i brzina za iste vremenske korake ($t + \Delta t$). Položaji čestica računaju se iz jednadžbe dobivene razvojem funkcije položaja u Taylorov red zaustavljen na drugoj derivaciji:

$$\mathbf{q}(t + \Delta t) = \mathbf{q}(t) + \mathbf{v}(t)\Delta t + \frac{1}{2}\mathbf{a}(t)\Delta t^2 \tag{2.25}$$

gdje je Δt integracijski korak, $\mathbf{q}(t)$ vektor položaja čestica, a **v** (brzina) i **a** (ubrzanje) su prva i druga derivacija položaja **q** po vremenu. Dakle, za određivanje novih položaja čestica, dovoljno je znati njihov trenutačni položaj (u trenutku t). Vektor brzina određuje se kao:

$$\mathbf{v}(t+\Delta t)=\mathbf{v}(t)+\frac{1}{2}\left[\mathbf{a}(t)+\mathbf{a}(t+\Delta t)\right]\Delta t \tag{2.26}$$

gdje je:

$$\mathbf{a}(t+\Delta t)=-(1/m)\nabla\mathbf{U}\left[\mathbf{q}(t+\Delta t)\right]. \tag{2.27}$$

Nove brzine (u vremenu $t+\Delta t$) mogu se izračunati tek nakon što se izračunaju sile u novom položaju (u vremenu $t+\Delta t$), tj. u račun novih brzina ulaze podatci o novim i starim silama. Prednost ovog algoritma je sinkronizirani izračun položaja i brzina.

U *leap-frog* algoritmu vektor brzina računa se u točki koja odgovara polovici vremenskog koraka, tj. $t+(1/2)\Delta t$, te se potom te brzine koriste za račun novog vektora položaja:

$$\mathbf{q}(t+\Delta t)=\mathbf{q}(t)+\mathbf{v}(t+\frac{1}{2}\Delta t)\Delta t, \tag{2.28}$$

$$\mathbf{v}\left(t+\frac{1}{2}\Delta t\right)=\mathbf{v}\left(t-\frac{1}{2}\Delta t\right)+\mathbf{a}(t)\Delta t. \tag{2.29}$$

Iz navedenog se vidi da ime metode potječe od načina na koji *leap-frog* algoritam funkcionira; vremenski, vektori položaja i brzine „preskaču“ jedan drugog (*leap* eng. skok, *frog* eng. žaba). Tj. položaji se određuju za vremena $t,\ t+\Delta t,\ t+2\Delta t,\ \ldots$, dok se brzine računaju za poluvremena tj. $t-\frac{1}{2}\Delta t,\ t+\frac{1}{2}\Delta t,\ t+\frac{3}{2}\Delta t,\ \ldots$. Važno je napomenuti da će *leap-frog* i *velocity Verlet* algoritam proizvesti iste trajektorije ako se uzmu odgovarajuće polazne točke.

U tipičnom (klasičnom) molekulskom sustavu, najbrže gibanje je vibracijsko gibanje, koje za vezu teški atom-vodik ima period od otprilike 10^{-14} s. Stoga, za sustave koji imaju vezan vodik na neki teški atom, integracijski korak (Δt) ne bi smio biti veći od 1 fs što znači da je za MD simulaciju koja je duga 10 ns potrebno izvršiti 10^6 izračuna energije, sile, itd. Mnogi zanimljivi fenomeni koji se dešavaju na mikrosekundnoj ili dužoj vremenskoj skali (npr. smatanje proteina), predstavljaju ograničenja za standardne MD simulacije.

Početni položaji atoma u molekuli obično se odrede na način da se izabere poznata struktura molekule (npr. dobivena rentgenskom difrakcijom), dok se početne brzine dodjeljuju nasumično svakoj pojedinoj čestici, ali tako da slijede Maxwell-Boltzmannovu raspodjelu na

zadanoj temperaturi:

$$P(v_i) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi k_B T}} \exp\left(-\frac{m_i v_i^2}{2k_B T}\right), \tag{2.30}$$

a trenutačna temperatura se računa prema ekviparticijskom teoremu:

$$T(t) = \frac{1}{(3N-n)k_B} \sum_{i=1}^{N} \frac{|p_i(t)|^2}{m_i} \tag{2.31}$$

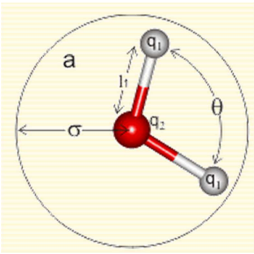
gdje je N ukupan broj atoma, a n broj ograničenih stupnjeva slobode.

Kako bi molekule proučavali u uvjetima što bližim realnim, simulacije se provode u implicitnom ili eksplicitnom otapalu. U izradi ove doktorske disertacije, korišteno je eksplicitno otapalo, tj. molekule vode definirane kao TIP3P[61] vode (tablica 1 i slika 15). Postupak otapanja molekula, odnosno kompleksa, provodi se smještanjem u kutiju, obično oblika krnjeg oktaedra, ispunjenu molekulama vode. Po potrebi, sustav se još može i neutralizirati dodavanjem protuiona (obično iona Na^+ ili Cl^-).

Tablica 1. Parametri za TIP3P model vode. Preuzeto iz rada Mahoneya i suradnika.[62]

model	σ* / Å	ε* / kJ mol^{-1}	l_1 / Å	q_1 / e	q_2 / e	Θ / °
TIP3P	3,15061	0,6364	0,9572	0,4170	−0,8340	104,52

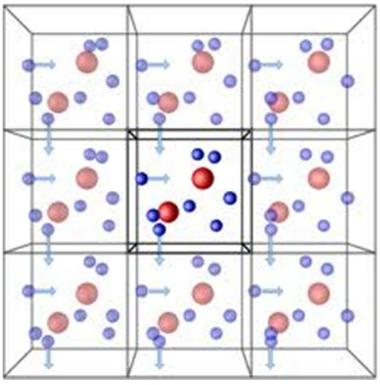
* σ i ε su Lennard-Jones parametri, tj. razmak i dubina minimuma potencijalne energije između dvije molekule vode.



Slika 15. TIP3P model molekule vode korišten u simulacijama s eksplicitnim otapalom (preuzeto s http://www1.lsbu.ac.uk/water/models.html).

Nadalje, kako bi se tijekom simulacija izbjegli neželjeni efekti na rubovima simulacijske kutije i omogućila nesmetana difuzija molekula upotrebljavaju se periodični rubni uvjeti (eng. *periodic boundary condition*, PBC), pri čemu se simulirani sustav smatra jediničnom ćelijom

trodimenzionalne rešetke (slika 16).



Slika 16. Osam od ukupno 26 najbližih periodičnih slika osnovne kubične simulacijske ćelije (središnji kvadrat s jasno, oštro prikazanim kuglicama i stjenkama) generiranih korištenjem periodičnih rubnih uvjeta (eng. *periodic boundary condition*). Ako tijekom simulacije čestica (atom) izađe iz osnovne simulacijske kutije, njezina periodička slika (tzv. „imaginarna“ čestica), će je zamijeniti (naznačeno strelicom).

Ako tijekom simulacija atom (ili više njih) izađe iz osnovne simulacijske ćelije u neku drugu njegova slika će simultano ući u tu istu osnovnu simulacijsku ćeliju u točki koja se nalazi zrcalno simetrično s obzirom na točku izlaska (slika 16). Čestice (atomi molekula) u osnovnoj simulacijskoj kutiji „vide“ one iz okolnih kutija, no čestice u tim kutijama su po svojoj naravi virtualne, tj. slike onih u osnovnoj. Korištenjem periodičnih rubnih uvjeta, u simulacijskoj kutiji očuvana je masa, broj čestica, ukupna energija i linearni moment. Značajka metode periodičnih rubnih uvjeta je da nijedna molekula unutar simulacijske kutije „ne vidi“ vakuum unutar tzv. granične (engl. *cut-off*) udaljenosti, tj. udaljenosti do koje se računaju nevezne interakcije, te su na taj način izbjegnuti efekti površine koji inače mogu bitno utjecati na sustav.

U standardnim MD simulacijama, proučava se evolucija klasičnog sustava od N (realnih) čestica u nekom volumenu V. U takvim simulacijama, ukupna energija (E) i ukupni linearni moment (p) su konstante gibanja. Ako se pretpostavi da je prosjek u vremenu jednak prosjeku ansambla (tj. ako je zadovoljena ergodička hipoteza), tada je (vremenski) prosjek neke veličine dobiven standardnim MD simulacijama jednak prosjeku ansambla, točnije rečeno, mikrokanonskog ansambla gdje su broj čestica N, volumen V i ukupna energija E konstantni (tzv. *NVE* ansambl). Međutim, u većini eksperimenata konstantni su tlak i temperatura.

Korištenjem termostata i barostata, MD simulacijama generirati će se, bilo ansambl s konstantnom temperaturom (tzv. *NVT* ili kanonski ansambl) ili ansambl s konstantnim i temperaturom i tlakom (tzv. *NPT* ili izobarno-izotermni ansambl).

Trenutačna (kinetička) temperatura sustava od *N* atoma u simulacijama obično se računa iz kinetičke energije sustava (korištenjem jednadžbe 2.31). Budući da je temperatura povezana s kinetičkom energijom sustava, najjednostavniji način kontrole temperature bio bi skaliranje brzina čestica pri svakom vremenskom koraku. No kako bi se osigurale prirodne fluktuacije temperature, to se skaliranje ne provodi direktno, naglo ($v' = v\sqrt{T_0/T}$, pri čemu su v i T trenutačna brzina i temperatura, a T_0 željena temperatura), već postepeno. Na tom principu temelji se Berendsenov termostat.[63] Radi se o metodi slabog sprezanja, gdje se željena temperatura održava „uranjanjem“ sustava u vanjsku kupelj fiksne temperature T_0. Postepeno skaliranja brzina ostvaruje se dodavanjem još jednog člana, tzv. konstante sprege, τ_T, u jednadžbu gibanja:

$$m_i \frac{d\mathbf{v}_i}{dt} = \mathbf{F}_i + \frac{\mathbf{p}_i(t)}{\tau_T}\left[\frac{T_0}{T(t)} - 1\right]. \tag{2.32}$$

Brzine se skaliraju na svakom koraku, i to tako da je brzina promjene temperature proporcionalna razlici temperatura:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T(t)}{\tau_T}, \tag{2.33}$$

pri čemu τ_T, parametar sprezanja, određuje koliko čvrsto su sustav i kupelj međusobno povezani. Što je τ_T veći to je sprezanje slabije, drugim riječima što je τ_T veći, to je više vremena potrebno da se postigne T_0. Promjena u temperaturi između dva uzastopna koraka s razlikom u vremenu Δt tada je:

$$\Delta T = \frac{\Delta t}{\tau_T}\left(T_0 - T(t)\right). \tag{2.34}$$

U praksi, tok topline u ili iz sustava, rezultat je skaliranja brzina svake čestice u svakom vremenskom koraku vremenski ovisnim faktorom λ (skalirajući faktor za brzine):

$$\lambda^2 = 1 + \frac{\Delta t}{\tau_T}\left[\frac{T_0}{T} - 1\right]. \tag{2.35}$$

Kada $\tau_T \to \infty$ Berendsonov termostat nije aktivan te se radi o simulaciji običnog mikrokanonskog ansambla.

Upotrebom Langevinove jednadžbe gibanja omogućuje se regulacija temperature tzv. Langevinovim termostatom.[64] Prema Langevinovoj jednadžbi gibanja, na brzine svih čestica, osim sile koja proizlazi iz polja sila, utječu još dvije dodatne sile:

$$\frac{d\mathbf{p}_i}{dt} = -\frac{\partial \mathbf{U}(\mathbf{q})}{\partial \mathbf{q}_i} - \Gamma \mathbf{p}_i + \mathbf{W}_i \tag{2.36}$$

sila trenja, $\Gamma \mathbf{p}_i$ (gdje je Γ masom skalirani koeficijent trenja), koja je proporcionalna brzini čestica momenta $\mathbf{p}_i$, i nasumična sila koja je rezultat slučajnih sudara, $\mathbf{W}_i$, i realizira se dodavanjem kinetičke energije česticama. Nasumična sila je nekorelirana u vremenu i preko svih čestica, sa srednjom vrijednošću $\left\langle \mathbf{W}_i(t), \mathbf{W}_j(\Delta t) \right\rangle = 6k_{\mathrm{B}} m T \Gamma \delta_{ij} \delta(t - \Delta t)$.[65] S obzirom da je Γ pozitivan broj, sila trenja utječe na smanjenje temperature sustava. Nasumični sudari u kombinaciji sa silom trenja održavaju temperaturu sustava na nekoj zadanoj vrijednosti, T_0. Langevinov termostat mijenja jednadžbu gibanja u vremenskim intervalima Δt, na način da se momenti čestica promijene za iznos:

$$\Delta \mathbf{p}_i = \left(\frac{\partial \mathbf{U}(\mathbf{q})}{\partial \mathbf{q}_i} - \Gamma \mathbf{p}_i + \mathbf{W}_i \right) \Delta t. \tag{2.37}$$

Nedostatak Langevinovog termostata je, kao i u slučaju ostalih stohastičkih termostata, što moment čestica više nije očuvan, te se ne preporuča njihovo korištenje kada se žele računati dinamičke veličine kao npr. koeficijent difuzije.

Druga vrsta algoritma koja također dopušta simulaciju kanonskog ansambla je algoritam koju je razvio Nosé,[66] a poslije modificirao Hoover.[67] Nosé-Hooverova metoda regulacije temperature, pripada tzv. metodama proširenog ansambla, jer se osnovnom hamiltonijanu sustava umjetno dodaje još jedan član. Osnovna ideja je da vanjska kupelj postaje sastavni dio simuliranog sustava, a predstavljena je dodatnim stupnjem slobode u osnovnoj jednadžbi gibanja, $\ddot{\mathbf{q}}_i = \frac{\mathbf{F}_i}{m_i}$ (gdje je $i = 1, \ldots, N$ za sustava od N simuliranih atoma), koja tada glasi:

$$\frac{d^2\mathbf{q}_i}{dt^2} = \frac{\mathbf{F}_i}{m_i} - \dot{\xi}\frac{d\mathbf{q}_i}{dt}, \tag{2.38}$$

pri čemu je $\mathbf{q}_i$ vektor položaja atoma *i*. Dodatni član u jednadžbi 2.38 predstavlja skaliranu brzinu, v_ξ, dodatnog stupnja slobode, ξ, zvanog parametar trenja, koji se koristi za kontrolu brzina čestica u sustavu, odnosno temperature sustava. Parametar trenja (ili varijabla kupelji), koji opisuje sprezanje simuliranih čestica s vanjskom kupelji, u potpunosti je dinamička veličina s vlastitim momentom p_ξ ($\dot{\xi} = \frac{p_\xi}{Q}$) i jednadžbom gibanja koja je funkcija kinetičke energije sustava i referentne (nametnute) temperature, T_0:

$$\ddot{\xi} = \frac{1}{Q}\left[\sum_{i=1}^{N} m_i \mathbf{v}_i^2 - N_{df} k_B T_0\right] \tag{2.39}$$

gdje je N_{df} broj stupnjeva slobode atoma, a *Q* je parametar „mase“ kupelji ($Q = N_{df} k_B T_0 \tau^2$, gdje τ odgovara tzv. relaksacijskom vremenu atoma). Iz jednadžbe 2.39 jasno se vidi mehanizam kontrole temperature Nosé-Hooverovom termostatom. Vremenska promjena parametra trenja računa se iz razlike trenutačne ($T(t)$) i referentne (T_0) temperature, točnije iz normirane razlike trenutačne kinetičke energije sustava i kinetičke energije pri željenoj temperaturi. Ako je trenutačna temperatura veća od željene, faktor trenja će se povećati, i obrnuto. Jačina sprezanja kupelji i realnog sustava određena je konstantom *Q*, tj. velika vrijednosti *Q* odgovara slabom sprezanju. MD simulacije u kojima $Q \to \infty$ rezultirati će mikrokanonskim ansamblom. S druge strane, premale vrijednosti (čvrsto sprezanje) mogu rezultirati s neželjenim, visoko frekventnim, oscilacijama temperature.

Jednadžba 2.38 generira mikrokanonski ansambl za prošireni sustav, a kanonski za realni sustav. Hamiltonijan takvog proširenog sustava od *N* čestica i jedna dodatne varijable trenja, ξ, glasi:

$$\mathbf{H} = \sum_{i=1}^{N} \frac{\mathbf{p}_i^2}{2m_i} + \mathbf{U}(\mathbf{q}_1, \mathbf{q}_2, ..., \mathbf{q}_N) + \frac{p_\xi^2}{2Q} + N_{df} k_B T \xi, \tag{2.40}$$

iz čega se vidi da je očuvana veličina u Nosé-Hooverovoj jednadžbi gibanja ukupna energija sustava i kupelji, dok energija simuliranog sustava fluktuira. Fluktuacije u ξ popraćene su prijenosom topline između sustava i kupelji, čime se regulira temperatura sustava. Važno je

naglasiti da su Nosé-Hooverove jednadžbe gibanja glatke, determinističke i vremenski reverzibilne. U slučajevima kada upotreba Nosé-Hooverovog termostata ne generira kanonsku distribuciju, koristi se tzv. metoda lanaca Nosé-Hooverovih termostata (eng. *Nosé-Hoover chain method*, NHC). Unutar NHC metode, Nosé-Hooverov termostat povezan je s još jednim termostatom, ili ako je potrebno s cijelim lancem termostata.

Većina eksperimenata provodi se pri konstantnom tlaku. Izvođenje MD simulacija u uvjetima konstantnog tlaka od posebne je važnosti kada se proučava utjecaj otapala na svojstva sustava, a postiže se upotrebom raznih barostata.

Jedan od osnovnih barostata koji funkcionira na (izotropnom ili anizotropnom) principu skaliranja koordinata čestica i vektora koji definiraju veličinu kutije na svakom koraku (odnosno svakih *n* koraka) je tzv. Berendsenov barostat (princip jako sličan Berendsenovom termostatu). Skaliranje se postiže sprezanjem s vanjskom tlačnom kupelji prema sljedećoj jednadžbi:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{P_0 - P}{\tau_P}, \tag{2.41}$$

(gdje je τ_P vremenska konstanta sprege tj. vremenska konstanta relaksacije barostata, baš kao i τ_T u slučaju kontrole temperature, a P i P_0 su trenutačni i referentni tlak) te dodavanjem još jednog člana Newtonovoj jednadžbi gibanja ($dq/dt = v$):

$$\frac{d\mathbf{q}}{dt} = \mathbf{v} + \alpha\mathbf{q}. \tag{2.42}$$

Volumen se pri tome mijenja prema $dV/dt = 3\alpha V$, a promjena tlaka povezana je s izotermnom kompresibilnosti, β_T ($\beta_T = -\frac{1}{V}\left(\frac{\partial V}{\partial P}\right)_T$), prema:

$$\frac{dP}{dt} = -\frac{1}{\beta_T V}\frac{dV}{dt} = -\frac{3\alpha}{\beta_T}. \tag{2.43}$$

Kada se jednadžba 2.43 uvrsti u jednadžbu 2.41, dobije se:

$$\alpha = -\frac{\beta_T (P_0 - P)}{3\tau_P}. \tag{2.44}$$

Modificirana jednadžba gibanja tada glasi:

$$\frac{d\mathbf{q}}{dt} = \mathbf{v} - \frac{\beta_T (P_0 - P)}{3\tau_P}\mathbf{q}. \tag{2.45}$$

Jednadžba 2.43 opisuje varijaciju volumena jedinične ćelije. U praksi, promjena volumena jedinične ćelije rezultat je skaliranja volumena kutije s faktorom μ za svaki vremenski korak (ili za svakih n_{PC} korak), a samim time i koordinata položaja čestica (x) i vektora koji definiraju duljinu ćelije (l) s $\mu^{1/3}$ na način da x prelazi u μx, a l u μl:

$$\mu = 1 - \frac{n_{PC}\Delta t}{3\tau_P}\beta_T\left(P_0 - P(t)\right). \tag{2.46}$$

U slučaju izotropnog skaliranja koristi se isti μ u svim smjerovima, tj. za sve (x, y i z) koordinate, dok se u slučaju anizotropnog barostata koriste različiti skalirajući faktori. Za kompresibilnost, β_T, obično se koristi eksperimentalno određena vrijednost za fizikalni sustav koji se aproksimira simulacijama (npr. izotermna kompresibilnost tekuće vode). Što se tiče jačine sprezanja između sustava i tlačne kupelji, vrijedi isto što i za Berendsenov termostat: što je veći τ_P, slabije je sprezanje.

Potpune jednadžbe koje kombiniraju sprezanje temperature i sprezanje tlaka, zovu se Martyna-Tuckerman-Tobias-Kleinove (MTTK) jednadžbe.[68,69] Kako bi dinamički sustav od N čestica generirao izobarno-izotermno distribuirane položaje $\mathbf{q}_i$ i momente $\mathbf{p}_i$, za kontrolu temperature i tlaka koriste se Nosé-Hooverovi lanci termostata i barostata. Općenito, atomi mogu biti povezani s odvojenim lancima termostata i barostata, ali je zbog jednostavnosti prikazan slučaj samo s jedan termostatom i barostatom. U takvom slučaju, očuvana veličina je:

$$\mathbf{H} = \sum_{i=1}^{N}\frac{\mathbf{p}_i^2}{2m_i} + \frac{p_\varepsilon^2}{2Q} + \frac{p_\xi^2}{2Q} + \mathbf{U}(\mathbf{q}_i, V) + \left(N_{df} + 1\right)k_B T_0 \xi + P_{\text{ext}} V \tag{2.47}$$

gdje je ξ dodatni stupnja slobode termostata (tj. sila trenja) „mase“ Q i momenata p_ξ. N_{df} je broj stupnjeva slobodne, a T_0 je referentna temperatura (temperatura vanjske kupelji). Kako bi se osigurao konstantan tlak, volumen V simulacijske kutije se mijenja, pri čemu je P_{ext} vanjski (nametnuti) tlak, a ε dodatni stupanj slobode barostata.

Vremenski (integracijski) korak od 1fs, koji predstavlja osnovni ograničavajući faktor za dulje MD simulacije sustava u kojima je vodik vezan na neki teži atom, može se povećati na način da se uklone stupnjevi slobode s najvećom frekvencijom (s pretpostavkom da proučavano svojstvo sustava ne ovisi o tom stupnju slobode). Ako se kovalentna veza između teškog atoma i vodika „zakoči“ na način da se udaljenost između tih atoma drži konstantnom, gibanje najveće frekvencije postaje 2-3 puta sporije vibriranje kovalentne veze između dva teška atoma. Ovaj pristup najčešće se koristi u simulacijama sustava koji se sastoje od makromolekule okružene s velikim brojem molekula otapala. Zamrzavanje nekih ili svih stupnjeva slobode molekula otapala, omogućuje korištenje većeg vremenskog koraka. SHAKE[70] algoritam je jedan od najčešće korištenih pristupa za zamrzavanje određenih stupnjeva slobode, i to na način da se skup koordinata dobivenih rješavanjem Newtonovih jednadžbi gibanja ($\mathbf{q}_{ij}$ „neograničene“ koordinate), zamijeni sa skupom koordinata koje zadovoljavaju nametnuta ograničenja. Osim SHAKE algoritma, često se koristi i tzv. LINCS[71] algoritam.

Porast broja interakcija koje treba izračunati uslijed povećanja veličine simuliranog sustava predstavlja ograničavajući faktor za izvođenje MD simulacija. Računanje veznih članova u polju sila ima vrlo povoljno skaliranje, $3N-6$, gdje je N broja atoma, dok se nevezne interakcije računaju za parove atoma te se stoga skaliraju kao N^2, tj. jedan atom ima vezu samo s malim brojem atoma, međutim interagira sa svim ostalim atomima u molekuli.

Jedan od načina uštede računalnog vremena potrebnog za račun neveznih interakcija je primjenom trećeg Newtonovog zakona, tj. $\mathbf{F}_{ij} = -\mathbf{F}_{ji}$. Na takav način račun neveznih interakcija smanjuje se za faktor dva računanjem samo članova gdje je $i < j$.

Uštede u računanju neveznih interakcija mogu se ostvariti i korištenjem tzv. „isključivača“ (eng. *cut-off*). Van der Waalsov doprinos neveznoj energiji, izražen obično Lennard-Jonesovim potencijalom, opada brzo s udaljenošću; privlačne sile opadaju s r^{-6}, a odbojne s r^{-12}, gdje r predstavlja udaljenost između dva atoma. Pri tome broj interakcija po atomu u sustavu raste s r^2, tj. proporcionalno s površinom sfere, za ε proporcionalno $1/r$. Budući da energijski doprinosi van der Waalsovih interakcija brzo konvergiraju (postaju zanemarivi na relativnom kratkim udaljenostima, pogotovo njihovi gradijenti), često se koristi granična

udaljenost, tzv. *cut-off* vrijednost ($r_{\text{cut-off}}$, obično oko 10 Å), koja odgovara maksimalnoj udaljenosti 2 atoma za koju će se te interakcije računati. Ako je udaljenost između dva atoma *i* i *j*, r_{ij}, veća od unaprijed zadane *cut-off* vrijednosti, energetski doprinos interakcije ta dva atoma se zanemaruje.

Korištenje *cut-off* udaljenosti može rezultirati malim greškama u izračunu energije, što ponekad predstavlja problem prilikom optimiziranja strukture. Bolji rezultati postižu se korištenjem funkcija trnjenja (eng. *switching function*) kojima se iznos energija neveznih interakcija skalira, pri čemu intenzitet skaliranja ovisi o udaljenosti, tako da na nekoj *cut-off* udaljenosti energija postaje jednaka nuli. Na malim udaljenostima vrijednost funkcije najčešće je 1.

Doprinos elektrostatskih interakcija opada mnogo sporije s povećanjem udaljenosti, što ih čini znatno složenijim za računanje. Za točkaste naboje, interakcijska energija opada s r^{-1}. Budući da ukupan broj interakcija po atomu raste s r^2, za očekivati je da će ukupna energija beskonačnog sustava divergirati. Ta formalna divergencija je u realnim slučajevima izbjegnuta, budući da u električki neutralnim sustavima postoji jednak broj pozitivnih i negativnih naboja, te dolazi do efekta poništavanja interakcija. U sustavu koji se u potpunosti sastoji od neutralnih grupa, interakcije dalekog dosega između grupa su dipol-dipol interakcije, koje opadaju s r^{-3}, a ukupni doprinos energiji bi trebao opadati s r^{-1}. U ovom slučaju *cut-off* udaljenosti (implementirane pomoć *switching* funkcija) moraju biti mnogo veće kako bi se izbjegli strukturni artefakti. U beskonačno periodičnim sustavima, alternativa korištenju *cut-off* udaljenosti je Ewaldova tehnika sumiranja odnosno njezine modifikacije kao što je npr. PME metoda (eng .*particle-mesh Ewald* metoda, PME).[72,73] Korištenjem tehnike sumiranja u recipročnom prostoru za procjenu interakcija dalekog dosega, ukupna elektrostatska energija može biti izračunata do na unaprijed određenu točnost, a broj interakcija koje treba izračunati proporcionalan je s $N \times \log N$.

Preduvjet za korištenje PME je upotreba periodičnih rubnih uvjeta. Budući da u MD simulacijama broj procjena neveznih interakcija nekog sustava raste s kvadratom njegova radijusa, računalni resursi neizbježno ograničuju veličinu sustava da bude što manja. Jedan od uvjeta da se to izbjegne je upotreba periodičnih rubnih uvjeta (slika 16).

Za sustave koji se dugo simuliraju kažemo da je zadovoljena ergodička hipoteza, tj. da će se sva dostupna mikrostanja sustava tijekom simulacije vjerojatno realizirati. No, za složene

sustave s velikim brojem sudionika, to je najčešće vrlo teško postići, pa se u svrhu boljeg uzorkovanja sustava, odnosno nekih njegovih stanja koriste prilagođene metode MD simulacija, kao što su npr. usmjerene i ubrzane MD simulacije.

2.7.1. Usmjerene MD simulacije (eng. steered MD, SMD)

Usmjerene molekulsko-dinamičke simulacije su MD simulacije u kojima se primjenjuje dodatna vanjska sila na atom ili skupinu atoma (tj. njihov centar mase), koja rezultira promjenom koordinata odabranih atoma u vremenu. Na takav način ograničava se gibanje odabrane skupina atoma u smjeru određenog stupnja slobode. Postoje dvije vrste SMD simulacija, kod jednih je konstantna sila koja se primjenjuje na centre masa koji se privlače, a kod drugih brzina privlačenja. U programu AMBER primjenjuje se potonja. U takvim simulacijama potrebno je definirati atome ili skupinu atoma (njihove centre masa) koje se privlače s neke početne udaljenosti (x_0) na neku željenu udaljenost (x) i konstantu sile (k) s kojom će se oni međusobno privlačiti:

$$U_{\mathrm{SMD}} = \left(\frac{1}{2}\right) k \left[x - x_0\left(t\right)\right]^2 . \tag{2.48}$$

Usmjerene MD simulacije često se koriste za proučavanje odmatanja i smatanja proteina, ulazak liganda i/ili molekula vode u aktivno mjesto enzima, itd.

2.7.2. MD simulacije s nasumično odabranom silom (eng. random acceleration MD, RAMD)

Vremenski interval od nekoliko desetaka nanosekundi koji se obično koristi za izvođenje (standardnih) MD simulacija, u većini slučajeva nije dovoljan da bi se mogao promatrati spontani izlazak molekule liganda iz veznog mjesta enzima koje se nalazi uvučeno duboko u proteinu. Uvođenjem dodatne sile na molekulu liganda može se povećati vjerojatnost takvog događaja. Kao što i samo ime kaže, u MD simulacijama u kojima se primjenjuje nasumično odabrana sila,[74] na molekulu liganda, tj. na njezin centar mase, djeluje dodatna sila u nasumičnom smjeru:

$$\vec{F} = k\vec{r}_0 \tag{2.49}$$

gdje je k konstanta sile, a $\vec{r}_0$ jedinični vektor u nasumičnom smjeru. Tri su podesiva parametra u RAMD simulacijama: 1) k, konstanta sile, koja je konstantna za vrijeme

simulacije i koja određuje veličinu sile (samo se mijenja smjer $\vec{r}_0$ sile na nasumičan način), 2) N, broj MD koraka za vrijeme kojih se ne mijenja smjer sile, i 3) $r_{\min}$, udaljenost koju treba proći centar mase liganda za vrijeme tih N koraka. Ako nakon N koraka, centar mase liganda pređe put manji od $r_{\min}$, odabire se novi nasumični vektor $\vec{r}_0$. Simulacije se prekidaju kada ligand napusti protein, odnosno kada udaljenost između centara masa proteina i liganda postane veća od neke unaprijed zadane udaljenosti, ili kada se dosegne maksimalni zadani broj koraka.

2.7.3. Ubrzane MD simulacije (eng. accelerated MD, AMD)

Aktivnost enzima u nekim je slučajevima uvjetovana njihovom konformacijskom promjenom. Međutim, takve strukturne promjene biomakromolekula obično se dešavaju na dužim vremenskim skalama (nekoliko milisekundi ili sekundi) i uključuju prelaženje visokoenergetskih barijera. Stoga se za proučavanje takvih fenomena koriste tzv. ubrzane molekulsko-dinamičke simulacije (AMD).[75–78] AMD simulacije temelje se na dodavanju potencijalne energije (tzv. potencijal poticaja, eng. *bias* ili *boost*), $\Delta U(r)$, sustavu kada se nalazi u stanjima vrlo niske potencijalne energije. Na taj se način potiče njegovo „izlaženje“ iz dubokih „potencijalnih jama“ i time olakšava, pretraživanje konformacijskog prostora (slika 17). Potencijalna energija sustava tada je dana izrazom:

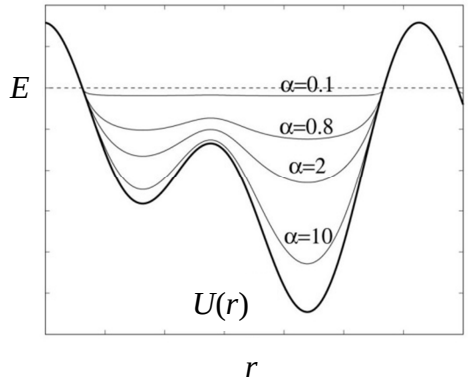
$$U^*(r) = U(r) + \Delta U(r). \tag{2.50}$$

Veličina potencijalne energije koja se dodaje $\Delta U(r)$ definirana je izrazom 2.51. Kada je iznos originalne potencijalne energije sustava, $U(r)$, ispod unaprijed definirane granične vrijednosti energije E (tzv. energijski prag), simulacije se provode korištenjem modificiranog potencijala $U^*(r)=U(r)+\Delta U(r)$, a kada $U(r)$ poprima vrijednosti veće od E, simulacije se provode korištenjem originalnog potencijala, $U^*(r)=U(r)$. Tj.:

$$\Delta U(r) = \begin{cases} 0, & U(r) \geq E \\ \dfrac{(E - U(r))^2}{\alpha + (E - U(r))}, & U(r) < E. \end{cases} \tag{2.51}$$

U tom slučaju sila $F^* = -\nabla U^*(r)$ na modificirani potencijal je:

$$F^* = -\nabla U(r)\left(\frac{\alpha}{\alpha + E - U(r)}\right)^2 . \tag{2.52}$$



Slika 17. Oblik jednodimenzionalne potencijalne energije $U(r)$ (podebljana linija) i oblik modificiranih energija $U^*(r)$ (tanje linije) za isti energijski prag E (naznačen isprekidanom linijom), ali različite parametre α. Što je α veći, oblik plohe promijenjene potencijalne energije sličniji je originalnoj. Preuzeto sa stranice http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/2.9/ug/node63.html.

Prosječne (očekivane) vrijednosti za kanonski ansambl mogu se dobiti ponovnim vaganjem (eng. *reweighting*) svake točke konfiguracijskog prostora s Boltzmannovim faktorom koji uključuje potencijal poticaja u toj određenoj točki, tj. $\exp\left[\beta \Delta U(r)\right]$. Kada se sustav propagira s nepromijenjenom, originalnom, potencijalnom energijom, potencijal poticaja je nula. Recipročna vrijednost parametra α određuje jačinu (intenzitet) promjene. Kako se α smanjuje, modificirana potencijalna energija sustava postaje sve jednoličnija (sustav slobodno prelazi iz jednog stanja u drugo), a kako se α povećava, vrijednosti modificirane energije asimptotski se približavaju originalnoj. Potencijal poticaja se u početku razvoja metode najviše primjenjivao na torzijski član funkcije potencijalne energije. Međutim, s vremenom se pokazalo da se pomaci velikih amplituda otopljene tvari u eksplicitnom otapalu usporavaju zbog viskoznosti otapala koje se nalazi oko biomakromolekule. Dakle, postavilo se pitanje kako poboljšati uzorkovanje difuzijskog gibanja u eksplicitnom otapalu.

Problem je riješen uvođenjem ubrzanih MD simulacije s dvostrukim poticajem (eng. *dual boost*)[76] koji omogućuje istovremeno poboljšano uzorkovanje internih i difuzijskih stupnjeva slobode. U tom slučaju zasebno se definiraju i primjenjuju, poticaji na torzijski član i na ukupnu preostalu potencijalnu energiju:

$$U(r)=U_0(r)+U_t(r), \tag{2.53}$$

$$U^*(r)=\left\{U_0(r)+\left[U_t(r)+\Delta U_t(r)\right]+\Delta U_T(r)\right\} \tag{2.54}$$

gdje je $U_t(r)$ originalna torzijska energija sustava, a $\Delta U_t(r)$ i $\Delta U_T(r)$ su promjene torzijske, odnosno ukupne, modificirane potencijalne energije, koji su definirani na jednak način kao u jednadžbi 2.51. Pri tome vrijedi da je $U_T(r)=U_0(r)+U_t(r)+\Delta U_t(r)$. Sila na modificirani potencijal tada je:

$$F^*=-\left\{\nabla U_0(r)+\nabla U_t(r)\left(\frac{\alpha_t}{\alpha_t+E_t-U_t(r)}\right)^2\right\}\times\left(\frac{\alpha_T}{\alpha_T+E_T-U_T(r)}\right)^2. \tag{2.55}$$

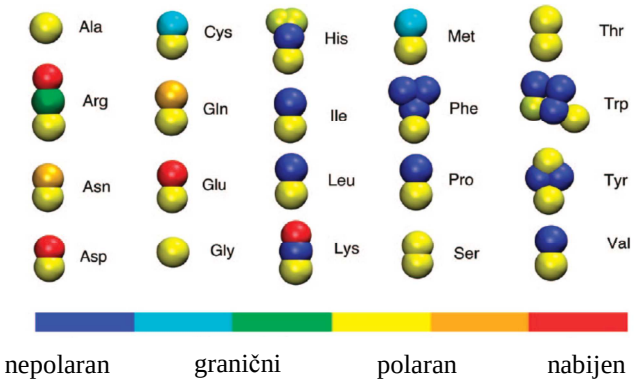
Energijski prag za torzijski član E_t i parametar α_t, te energijski prag za ukupni potencijal E_T i α_T posebno se definiraju. Također, recipročne vrijednosti parametara α_t i α_T određuju intenzitet promjena. Za velike vrijednosti α, energija sustava približno je jednaka originalnoj, dok za male vrijednosti α ($\alpha\approx 0$), energija sustava postaje konstantna, a uzorkovanje odgovara nasumičnom hodu. Iznos poticaja na ukupnu energiju treba biti u rasponu koji će omogućiti povećanje difuzije uz očuvanje prirodne strukture vode. U slučaju kada se primjenjuje dvostruki potencijal poticaja, ispravni prosjek kanonskog ansambla sustava dobiva se ponovnim vaganjem svake točke u konfiguracijskom prostoru s $\exp\left\{\beta\left[\Delta U_t(r)+\Delta U_T(r)\right]\right\}$.

Prednost AMD je što ne zahtijeva unaprijed poznavanje oblika potencijalne energije, odnosno reakcijske koordinate koja opisuje konformacijske promjene. Dovoljno je samo poznavati jednu strukturu sustava.

2.7.4. MD simulacije krupnog zrna (eng. coarse grained,CGMD)

MD simulacije krupnog zrna također se koriste za proučavanje fenomena koji se dešavaju na vremenskim skalama koje su predugačke da bi se mogle pratiti standardnim *all atom* MD simulacijama, kao npr. konformacijske promjene proteina, smatanje proteina i samoorganiziranje bioloških makromolekula. U takvim simulacijama koriste se pojednostavljeni modeli molekula, te se svaki atom više ne opisuje eksplicitno s pripadajućim parametrima, kao što je to slučaj kod standardnih MD simulacija (tzv. atomistički model). Na taj način moguće je simulirati veće sustave (koji mogu uključivati i stotine različitih molekula koje međusobno interagiraju) na dužim vremenskim skalama.

Unutar programskog paketa GROMACS dostupno je MARTINI polje sila koje omogućuje izvođenje MD simulacija krupnog zrna. U MARTINI modelu četiri teška atoma zamjenjuju se jednim interakcijskim centrom (tzv. zrnom), te se radi o tzv. mapiranju četiri naspram jedan. Izuzetak su prstenaste molekule kod kojih je zbog geometrijske specifičnosti bilo potrebno koristit veću rezoluciju, te se u tom slučaju koristi mapiranje dva naspram jedan, tj. dva teška atoma zamjenjuju se jednim interakcijskim centrom. MARTINI model uzima u obzir četiri glavna tipa interakcijskih mjesta, tj. ta novodefinirana čestica (zrno) može biti nabijena (Q), polarna (P), granična (N) i nepolarna (C). Podtipovi interakcijskih mjesta uzimaju još u obzir sposobnost stvaranja vodikovih veza (naznačeno s malim slovima d=donor, a=akceptor, da=oboje, 0=ništa) i stupanj polarizacija (naznačeno brojem od 1=niski stupanj polarizabilnosti do 5=visok stupanj polarizabilnosti).[79,80] Na slici 18 dan je CG prikaz svih 20 prirodnih aminokiselina unutar MARTINI polja sila.



Slika 18. CG model svih 20 prirodnih aminokiselina unutar MARTINI polja sila. Različiti tipovi atoma prikazani su različitom bojom. Preuzeto iz rada Monticellija i suradnika.[80]

Nevezne interakcije između zrna (osim najbližih susjeda) opisuju se Lennard-Jonesovim potencijalom:

$$U_{\text{Lennard-Jones}}\left(r_{ij}\right) = 4\varepsilon_{ij}\left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^{6}\right]. \tag{2.56}$$

Elektrostatske interakcije između nabijenih (Q) zrna opisuju se još i izrazom za kulonsku potencijalnu energiju:

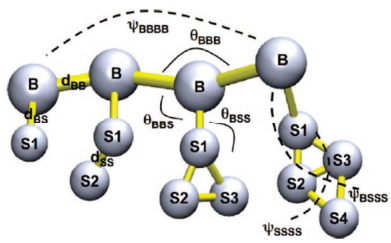
$$U_{\mathrm{el}} = \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 \varepsilon_{rel} r_{ij}} \tag{2.57}$$

gdje je vrijednost dielektrične konstante $\varepsilon_{\mathrm{rel}}$=15. Nevezne interakcije i sile prestaju se računati na udaljenosti većoj od $r_{\text{cut-off}}$=1,2 nm, pri čemu se Lennard-Jones interakcije pomalo isključuju unutar raspona od 0,9 - 1,2 nm, a elektrostatske postepeno trnu čitavim rasponom 0,00 - 1,2 nm.

Vezne interakcije opisuju se slijedećim skupom funkcija potencijalne energije, koje energiju međudjelovanja veznih mjesta *i*, *j*, *k* i *l* računaju s obzirom na odstupanje od ravnotežnih vrijednosti udaljenosti d_{b}, kuteva θ_{a} i torzijskih kuteva ψ_{d} ψ_{id}:

$$\begin{aligned} U_{\mathrm{b}} &= \frac{1}{2} K_{\mathrm{b}} \left(d_{ij} - d_{\mathrm{b}} \right)^2, \\ U_{\mathrm{a}} &= \frac{1}{2} K_{\mathrm{a}} \left[\cos\left(\theta_{ijk}\right) - \cos\left(\theta_{\mathrm{a}}\right) \right]^2, \\ U_{\mathrm{d}} &= K_{\mathrm{d}} \left[1 + \cos\left(n\psi_{ijkl} - \psi_{\mathrm{d}} \right) \right], \\ U_{\mathrm{id}} &= K_{\mathrm{id}} \left(\psi_{ijkl} - \psi_{\mathrm{id}} \right)^2, \end{aligned} \tag{2.58}$$

pri čemu su *K* pripadajuće konstante sila. Vezni potencijal U_{b} koristi se za zrna koja su povezana kemijskom vezom, a U_{a} za opisivanje krutosti lanca. Neprava torzija u izrazu U_{id} se koristi kako bi se spriječile distorzije van ravnine planarnih skupina, dok se prave torzije U_{d} u izrazu koriste za očuvanje sekundarne strukture okosnice proteina (slika 19).



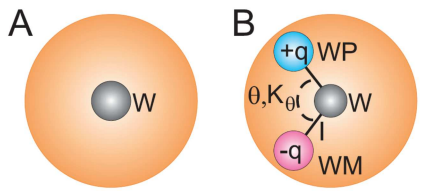
Slika 19. Shematski prikaz četiri različite vrste aminokiselina, koje sadrže, redom s ljeva na desno, jedno, dva, tri i četiri zrna u bočnom lancu (plus jedno zrno za glavni lanac). Naznačeni su intra i inter-vezne interakcije. Zrna glavnog lanca označena su s „B“, a bočnog lanca sa „S“.

Tip zrna iz okosnice proteina ovisiti će o sekundarnoj strukturi proteina: okosnica aminokiselina koje su slobodne u otopini ili su dio zavoja (eng. *bend* i *coil*) imati će jaki polarni karakter (P tip), a one koje su dio α-zavojnice ili β-ploče, gdje vodikove veze između

okosnica umanjuju polarni karakter, biti će nepolarne (N tip). Prolin je manje polaran zbog nedostatka sposobnosti doniranja vodikove veze.[80]

Kako bi se sačuvala sekundarna struktura proteina u CG simulacijama, osim samog odabira tipova zrna iz glavnog lanca proteina (i samim time odgovarajućih parametara veza/kuteva/torzija), za MARTINI model može se još definirati i tzv. elastična mreža.[81] Najjednostavniji slučaj je uvođenje dodatnog harmoničkog potencijala između zrna glavnog lanca koja nisu povezana veznim potencijalom, a nalaze se unutar neke unaprijed definirane udaljenosti (tzv. granična udaljenost). U tom slučaju potrebno je definirati konstantu sile takve elastične (harmoničke) veze (obično se koristi vrijednost od 500 kJ mol^{-1} nm^{-2}), te gornju i donju vrijednost granične udaljenosti (obično 0,5-0,9 nm).[82]

MARTINI polje sila omogućava i korištenje eksplicitnih molekula vode, na način da se četiri *all atom* molekule vode zamjene jednim novim zrnom (slika 20A). U novije vrijeme, razvijen je model polarizabilne vode, kako bi se što bolje opisale interakcije koje ovise o lokalnom okruženju. U tom slučaju četiri molekule vode zamijenjene su s tri interakcijska centra, tj. zrna (slika 20B).[83]



Slika 20. Modeli molekule vode u MARTINI polju sila. A) standardni model, i B) polarizabilni model. Krug osjenčan narančasto odgovara van der Waalsovom radijusu centralne čestice (zrna) W.

Središnje zrno W je neutralno i kao takvo ostvaruje Lennard-Jones interakcije s drugim zrnima u sustavu, kao što je i slučaj kod standardnog modela molekule vode (tj. kada su četiri eksplicitne molekule vode zamijenjene jednim zrnom). Dodatna zrna WP i WM su vezana za središnje zrno W te nose pozitivan (+0,46 *e*), odnosno negativan (−0,46 *e*) naboj. One ostvaruju samo kulonske interakcije s drugim česticama. Veze W-WP i W-WM su ograničene na udaljenost *l*. Interakcije između WP i WM unutar istog zrna vode su isključene. Kao rezultat toga, centri naboja rotiraju oko središnjeg zrna. Stoga će dipolni moment takve molekule vode ovisiti o položaju nabijenih zrna unutar iste CG molekule vode. Kako bi se

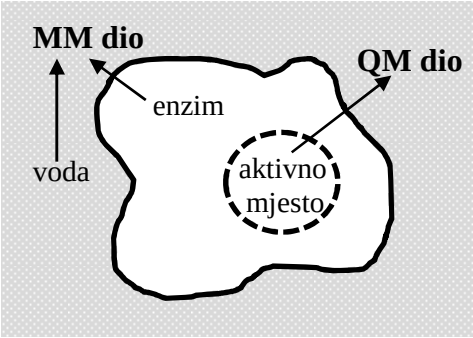
osigurala pravilna distribucija dipolnog momenta, tj. kako bi se kontrolirala rotacija WP i WM zrna, definiran je harmonički potencijal za ravnotežni kut θ s konstantom sile K_θ.

Zbog svega navedenog, u MD simulacijama krupnog zrna značajno je smanjen broj stupnjeva slobode, što omogućuje praćenje pojava u biološkim sustavima koji se dešavaju na puno dužim vremenskim skalama. Samim time interpretacija vremenske skale u CG simulacijama nije tako jednostavna. U usporedbi s atomističkim modelom, za iste dinamičke promjene u CG modelu potreban je znatno manji broj koraka. Glavni razlog je to što je kao posljedica veće veličine čestica ploha potencijalne energije puno glađa nego u slučaju plohe potencijalne energije u atomističkim sustavima iste veličine. Na temelju usporedbe difuzijskih konstanti CG i atomističkog modela, utvrđeno je da je efektivno vrijeme u CG modelima 2-10 puta duže od onog u atomističkim modelima.[79]

2.8. Kvantno-mehaničke – molekulsko-mehaničke (QM/MM) metode

Odabir kvantno-mehaničke metode i osnovnog skupa koji će se koristiti u računima najčešće je rezultat kompromisa između željene točnosti računa (što veća točnost to bolje) i dostupnih računalnih resursa. Pri tom se metode visoke točnosti nepovoljno skaliraju s veličinom molekule, što postavlja ograničenje na veličinu sustava koju možemo proučavati određenom metodom. Zbog toga, većina kemijski i biološki zanimljivih sustava postaje neprikladna za proučavanje uobičajenim kvantno-mehaničkim računima.

Kako bi se prevladala navedena ograničenja, razvijene su tzv. kvantno-mehaničke − molekulsko-mehaničke (eng. *quantum-mechanics – molecular-mechanics*, QM/MM) metode. Kao što se vidi i iz samog imena, QM/MM metode baziraju se na istovremenoj primjeni metoda visoke točnosti (upotrebom kvantno-mehaničke teorije) za opisivanje jednog manjeg dijela sustava kojem je potrebno poznavati elektronsku strukturu (npr. aktivno mjesto enzima gdje uslijed nastanka molekule produkta iz molekula rektanata dolazi do preraspodjele elektrona) i empirijskih metoda (baziranih na klasičnoj mehanici, kao što je npr. molekulska mehanika) za opisivanje ostatka sustava (ostatak enzima i molekule otapala, slika 21).



Slika 21. Shematski prikaz principa QM/MM metode. Kvantno-mehaničke metode (tj. metode visoke točnosti) koriste se za opisivanje dijela sustava u kojem dolazi do preraspodjele elektronske gustoće (QM dio), kao što je npr. aktivno mjesto enzima gdje iz molekula reaktanata nastaju molekule produkata, dok se empirijske metode (bazirane na klasičnoj mehanici) koriste za opisivanje ostatka sustava (ostatak enzima i otapalo).

ONIOM (eng. *Our own N-layered Integrated molecular Orbital and Molecular Mechanics*) je QM/MM metoda dostupna unutar računalnog programa Gaussian09. Navedena računalna metoda bazira se na definiranju dva (ili više, *N*) sloja unutar proučavanog sustava koji se tretiraju metodama različitih stupnjeva točnosti. Dvoslojna ONIOM metodologija podrazumijeva korištenje dva sloja, tzv. unutarnjeg i vanjskog, za opisivanje sustava. Unutarnjem sloju odgovara regija proteina u kojoj dolazi do nastajanja i pucanja kemijskih veza, i kao takva opisuje se kvantnom mehanikom. Taj sloj se ujedno zove i modelnim sustavom (M). Vanjskom sloju odgovara cijeli sustav (protein i molekule otapala), koji se stoga opisuje nekom manje zahtjevnom računalnom metodom (npr. molekulskom mehanikom, semiempirijskim metodama, ili puno jednostavnijim *ab initio* metodama sa skromnijim osnovnim skupom). Na taj način računa se utjecaj okoliša na dio proteina od interesa tj. na aktivno mjesto.

U ONIOM aproksimaciji, energija realnog sustava (R) definira se kao:[84,85]

$$E^{\text{ONIOM-ME}}(\text{R}) = E^{\text{MM}}(\text{R}) + E^{\text{QM}}(\text{M}) - E^{\text{MM}}(\text{M}) \tag{2.59}$$

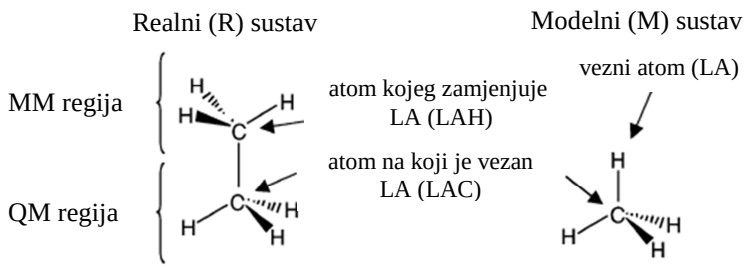
gdje je $E^{\text{MM}}(\text{R})$ energija realnog sustava izračunata korištenjem klasične teorije (tj. molekulske mehanike), a $E^{\text{QM}}(\text{M})$ i $E^{\text{MM}}(\text{M})$ energije modelnog sustava izračunate korištenjem kvantno-mehaničkog, odnosno klasičnog pristupa. U ovakvom ONIOM računu elektrostatske interakcije između QM i MM atoma opisane su samo na molekulsko-mehaničkom nivou, tj. radi se samo o interakciji parcijalnih naboja atoma iz MM dijela s

parcijalnim nabojima atoma iz QM dijela. Taj pristup zove se još i klasično ili mehaničko uklapanje (eng. *mechanical embedding*). U drugom (točnijem) pristupu raspodjela naboja u MM dijelu interagira sa stvarnom raspodjelom naboja u QM dijelu. U tom slučaju parcijalni naboji MM dijela eksplicitno su uključeni u QM hamiltonijan:

$$\begin{aligned} E^{\text{ONIOM-EE}}(\text{R}) &= E^{\text{MM}}(\text{R}) + E_V^{\text{QM}}(\text{M}) - E_V^{\text{MM}}(\text{M}), \\ E_V^{\text{QM}}(\text{M}) &= E^{\text{QM}}(\text{M}) - \sum_i \sum_N \frac{s_N q_N}{r_{i,N}} + \sum_J \sum_N \frac{Z_J s_N q_N}{r_{J,N}}, \\ E_V^{\text{MM}}(\text{M}) &= E^{\text{MM}}(\text{M}) + \sum_J \sum_N \frac{q_J s_N q_N}{r_{J,N}}, \end{aligned} \tag{2.60}$$

pri čemu se N, J i i redom odnose na atome u MM dijelu, atome u QM dijelu i elektrone. Ovakav ONIOM pristup s elektrostatskim uklapanjem (eng. *charge embedding*)[85,86] omogućava točniji opis elektrostatskih interakcija i polarizaciju valne funkcije pod utjecajem raspodjele naboja u MM dijelu. Skaliraući faktor s_N koristi se kako bi se izbjegla prevelika polarizacija valne funkcije pod utjecajem velikih naboja blizu QM dijela; s_N je obično nula za naboje koji se nalaze na manje od tri veze udaljenosti, a jedan za preostale naboje. Isti skalirajući faktor s_N koristi se za QM i MM račun.

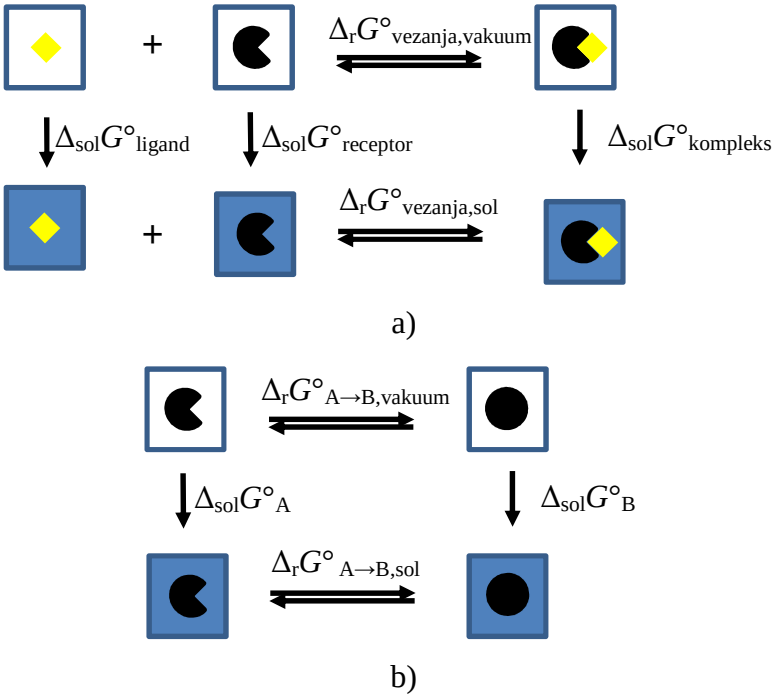
Ako granica između QM i MM dijela sustava (slika 22) prolazi kovalentnom vezom, modelnom sustavu se dodaje vezni atom (eng. *link atom*) kako bi se zasitila njegova valencija. Vezni atom, obično vodikov atom, nalazi se na liniji koja povezuje atom iz modelnog sustava (eng. *Link Atom Connection*, LAC) s onim iz okoline koga zamjenjuje (eng. *Link Atom Host*, LAH).



Slika 22. Pojašnjenje QM/MM terminologije na primjeru etana. Budući da postoji vezna interakcija između QM i MM regije, u svrhu popunjavanja valencije ugljikovog atoma, modelnom sustavu dodaje se vezni atom vodika (LA). Vezni atom vodika nalazi se na liniji koja povezuje atom iz modelnog sustava (eng. *Link Atom Connection*, LAC) s atomom koga LA zamjenjuje (eng. *Link Atom Host*, LAH). Preuzeto iz rada Vrevena i suradnika.[86]

2.9. Račun slobodne energije

Metoda MM-PBSA[87] koristi se za određivanja slobodne energije „otapanja“ molekule (slika 23b), slobodne energije vezanja liganda za protein (slika 23a), odnosno razlike slobodnih energija vezanja različitih liganada. Metoda se temelji na naknadnoj obradi podataka dobivenih MD simulacijama. Radi pojednostavljenja računa često se u slučaju određivanja slobodne energije vezanja liganda u protein, umjesto da se sudionici reakcije zasebno simuliraju, njihovi energijski doprinosi određuju na način da se iz ansambla struktura generiranih MD simulacijama kompleksa enzim-ligand (generirani ansambl struktura), izdvoje koordinate svakog zasebno, liganda i receptora (tj. enzima). Ime metode, MM-PBSA, skraćenica je od engleskih riječi *Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area*, koje opisuju način na koji se računaju pojedine komponente slobodne energije.



Slika 23. Termodinamički ciklus za određivanje slobodne energije: a) vezanja molekule liganda (obojan žuto) u protein (obojan crno), u vakuumu ($\Delta_r G°_{vezanja,vakuum}$), odnosno u otapalu ($\Delta_r G°_{vezanja,sol}$), b) različitih konformacija proteina, u vakuumu ($\Delta_r G°_{A\rightarrow B,vakuum}$), odnosno u otapalu ($\Delta_r G°_{A\rightarrow B,sol}$). $\Delta_{sol}G°_X$ je Gibbsova energije otapanja (solvatacije) sustava X. Otapalo je naznačeno plavom pozadinom, a vakuum bijelom.

Račun Gibbsove energije vezanja liganda za protein, izvodi se korištenjem termodinamičkog ciklusa prikazanog na slika 23a, tj. ona se računa kao suma Gibbsove energija vezanja liganda za protein u vakuumu ($\Delta_r G°_{vezanja,vakuum}$) i razlike slobodnih energija solvatacije:

$$\begin{aligned}\Delta_r G°_{vezanja,sol} &= G°_{kompleks} - G°_{receptor} - G°_{ligand} \\ &= \Delta_r G°_{vezanja,vakuum} + \left(\Delta_{sol}G°_{kompleks} - \Delta_{sol}G°_{ligand} - \Delta_{sol}G°_{receptor}\right).\end{aligned} \tag{2.61}$$

U slučaju konstantnog tlaka i volumena entalpijski doprinos Gibbsovom potencijalu jednak je potencijalnoj energiji sustava, $\Delta H = \Delta U$. U se računa pomoću programa *sander* (dio programskog paketa AMBER) na temelju jednadžbi molekulsko-mehaničkog polja sila, tj. kao suma svih veznih (energije veza, kuteva, torzija) i neveznih (sve van der Waalsove i elektrostatske interakcije, pri čemu je $r_{cut\text{-}off} = \infty$) interakcija:

$$\begin{aligned}\Delta_r G^\circ_{\text{vezanja,vakuum}} &= \Delta_r H^\circ_{\text{vezanja,vakuum}} - T\Delta_r S^\circ_{\text{vezanja,vakuum}} \\ &= \Delta U_{\text{MM}} - T\Delta S^\circ_{\text{analiza normalnih modova}} \\ &= \left[\Delta U_{\text{vezne}} + \Delta U_{\text{ele}} + \Delta U_{\text{vdw}}\right] - T\Delta S^\circ_{\text{analiza normalnih modova}}.\end{aligned} \tag{2.62}$$

Konformacijska entropija računa se analizom normalnih modova uz pomoć programa *nmode*. Ako se traži samo relativna razlika energija sličnih stanja, taj se član obično zanemaruje.

Slobodne energije solvatacije svakog pojedinog sudionika reakcije ($\Delta_{\text{sol}}G^\circ_{\text{X}}$, gdje je X=ligand, receptor ili kompleks) uključuju polarni i nepolarni doprinos energiji solvatacije. Polarni (elektrostatski) doprinos energiji solvatacije računa se numeričkim rješavanjem linearne Poisson-Boltzmannove jednadžbe korištenjem programa *pbsa* (ili u slučaju MM-GBSA metode, skraćenica od eng. *Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area*, numeričkim rješavanjem poopćene Bornove jednadžbe korištenjem programa *sander*). Nepolarni doprinos energiji solvatacije određuje se računanjem površine dostupne otapalu (eng. *solvent accessible surface area*, SASA), $\Delta_{\text{sol}}H_{\text{nepolaran}}=\gamma SASA+\beta$, uz pomoć programa *molsurf*.[88]

$$\begin{aligned}\Delta_{\text{sol}}G^\circ_{\text{X}} &= G^\circ_{\text{X,polaran},\varepsilon=80} - G^\circ_{\text{X,polaran},\varepsilon=1} + G^\circ_{\text{X,nepolaran}} \\ &= \Delta_{\text{sol}}H^\circ_{\text{X}} - T\Delta_{\text{sol}}S^\circ_{\text{X}} \\ &= \left[\Delta_{\text{sol}}H^\circ_{\text{polaran}} + \Delta_{\text{sol}}H^\circ_{\text{nepolaran}}\right] - T\Delta_{\text{sol}}S^\circ_{\text{X}}.\end{aligned} \tag{2.63}$$

Dakle, entalpijski doprinos slobodnoj energiji računa se kao suma molekulsko mehaničke energije (dobivene iz polja sila) i energije solvatacije u kontinuiranom (implicitnom) otapalu.

§ 3. RAČUNALNE METODE

3.1. MD simulacije slobodnog enzima

3.1.1. Priprema sustava

Trodimenzionalne strukture ljudske DPP III, određene rentgenskom difrakcijom i pohranjene u proteinskoj bazi podataka (PDB, http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do) pod kodom 3FVY i 3T6B, uzete su kao polazna točka za MD simulacije.

Struktura ljudske DPP III pohranjena pod oznakom 3FVY, odgovara nativnom enzimu u čijem se aktivnom mjestu nalazi atom cinka. Položaji aminokiselinskih ostataka koji su nedostajali u strukturi (Pro224-Asp227) određeni su korištenjem programa Modeller9v12.[89] Početno protonacijsko stanje proteina određeno je pomoću servera WHATIF (pri pH=7, http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html/index.html), dok je protonacijsko stanje histidina određeno prema njihovoj mogućnosti da tvore vodikove veze s aminokiselinama u susjedstvu. Kao što je i za očekivati pri fiziološkim uvjetima, svi arginini i lizini su pozitivno (+1), a glutamati i aspartati negativno (−1) nabijeni. Na taj način pripremljena je struktura tzv. „otvorene“ DPP III, ili skraćeno **oWT**.

Trodimenzionalna struktura ljudske DPP III pohranjena pod kodom 3T6B, predstavlja mutant E451A enzima u kompleksu sa supstratom tinorfinom (Val-Val-Tyr-Pro-Trp), kojem u aktivnom mjestu nedostaje ion cinka. Također, atom cinka nedostaje i u strukturi kompleksa DPP III-tinorfin pohranjenoj pod oznakom 3T6J. Prije MD simulacija Ala451 mutiran je u Glu i dodan je ion cinka. Položaji iona cinka i glutamata 451 određeni su tako što je aktivno mjesto iz strukture 3T6B sravnjeno s aktivnim mjestom iz strukture 3FVY, korištenjem položaja H450, H455 i E508 kao kriterija sravnjivanja. Protonacijska stanja aminokiselinskih ostataka određena su na isti način kao i za „otvorenu“ DPP III. Kako bi pripremili strukturu slobodnog (bez vezanog supstrata) enzima, molekula tinorfina uklonjena je iz veznog mjesta enzima. Dobivena struktura znatno je kompaktnija od „otvorene“ DPP III, te predstavlja „zatvorenu“ DPP III, ili skraćeno **cWT** formu.

MD simulacije provedene su pomoću programskih paketa AMBER (verzije 10-12) i/ili GROMACS 4.5.3. U svim simulacijama korišteno je ff03[90] polje sila i već unaprijed razvijeni

nevezni parametri za atom Zn^{2+} (naboj +2,0 *e*, van der Waalsov, vdW, radijus 1,22 Å i energija minimuma vdW interakcije 0,250 kcal/mol).[91,92]

3.1.2. MD simulacije provedene pomoću programskog paketa AMBER (verzije 10-12)

„Otvorena“ DPP III smještena je u kutiju oblika krnjeg oktaedra ispunjenu TIP3P molekulama vode, na način da je najmanja udaljenost između bilo kojeg atoma proteina i ruba simulacijske ćelije iznosila 11 Å (sveukupno ~98 000 atoma, od čega ~29 000 molekula vode). Sustav je neutraliziran dodavanjem natrijevih iona (Na^+), koji su smješteni u blizinu negativno nabijenih iona na površini proteina. Za otapanje i neutralizaciju sustava unutar programskog paketa AMBER koristi se program *tleap*. Dobiveni sustav, simuliran je korištenjem periodičnih rubnih uvjeta (PBC). Elektrostatske interakcije računate su korištenjem PME (eng. particle-mesh Ewald) metode.

Prije samih MD simulacija, geometrija proteina optimizirana je u tri kruga uz različita ograničenja (za minimizaciju i MD simulacije korišten je program *sander*). U prvom krugu (1500 koraka), dopušteno je pomicanje samo molekulama vode, dok su položaji proteina i cinka ograničeni korištenjem harmoničkog potencijala konstante sile 133,89 J mol^{-1} $Å^{-2}$. U drugom (2500 koraka) i trećem (1500 koraka) krugu, korištena je ista konstanta sile na cinkov atom, dok je pomicanje glavne okosnice proteina ograničeno korištenjem konstante sile od 133,89 kJ mol^{-1} $Å^{-2}$, odnosno 41,84 kJ mol^{-1} $Å^{-2}$. Prvih 100 ps uravnoteživanja sustava, uslijed čega je sustav zagrijan s 0 na 300 K, korišten je *NVT* ansambl, dok su preostale simulacije (faza podešavanja gustoće vode i produkcijska faza) izvođene pri konstantnom tlaku i temperaturi (1 atm i 300 K, korištenjem *NpT* ansambla). Temperatura je održavana konstantnom korištenjem Langevinove dinamike, s frekvencijom sudara 1 ps^{-1}, a konstantnost tlaka regulirana je Berendsenovim barostatom. Vibracije veze u kojima sudjeluju atomi vodika ograničene su primjenom SHAKE algoritma. Nakon 50., 71. i 176. ns MD simulacije, kako bi se postiglo što bolje pretraživanje faznog prostora, sustav je dodatno zagrijan na 400 K, te potom opet ohlađen na 300 K, u intervalima od 500 ps (uz vremenski korak od 1 fs). Između navedenih intervala zagrijavanja-hlađenja sustav je simuliran pri sobnoj temperaturi (1 atm i 300 K, korištenjem *NpT* ansambla i vremenskog koraka od 2 fs). Zadnjih 10 (uz vremenski korak od 1 fs) i 20 (uz vremenski korak od 2 fs) ns MD simulacije, provedeno je također korištenjem *NpT* ansambla. Sveukupno, MD simulacije „otvorene“ DPP III uz primjenu ff03 polja sila, rezultirale su trajektorijom dugom 207 ns. Za strukturu enzima

dobivenu nakon dugih (101 ili 207 ns) MD simulacija „otvorene“ DPP III u daljnjem tekstu koristiti će se naziv „zatvorena MD“ DPP III, ili skraćeno **cWT_{MD}**.

Pored toga, uravnotežena struktura „otvorene“ DPP III podvrgnuta je još dvjema nezavisnim MD simulacijama (korištenjem različitih nasumičnih brojeva za generiranje početnih brzina sustava, definirano s varijablom ig=−1) u trajanju od po 100 ns, uz vremenski korak od 2 fs (uz korištenje SHAKE algoritma) i *NpT* simulacijske uvjete.

Jednaki uvjeti otapanja, neutralizacije, optimizacije i uravnoteživanja kao i kod „otvorene“ DPP III, korišteni su i u MD simulacijama „zatvorene“ DPP III u trajanju od 100 ns, pri konstantnom tlaku i temperaturi (1 atm i 300 K, *NpT* ansambl). Vremenski korak tijekom prvih 50 ns bio je 1 fs, a zadnjih 50 ns, 2 fs. Uravnotežena struktura „zatvorene“ DPP III podvrgnuta je još trima nezavisnim MD simulacijama u trajanju od po 100 ns, uz vremenski korak od 2 fs (uz korištenje SHAKE algoritma) i *NpT* simulacijske uvjete. Sve do sada navedene simulacije provedene su korištenjem ff03 polja sila.

Točkasti mutanti K405A i W300L ljudske DPP III pripremljeni su pomoću programa *tleap* (koji je dio programskog paketa AMBER) iz oWT i/ili cWT struktura. Točnije, mutanti K405A „otvorene“ i „zatvorene“ DPP III pripremljen je iz struktura dobivenih nakon 10 (**oK405A**), odnosno 101 (**$cK405A_{MD}$**) ns MD simulacija oWT forme enzima, mutant K405A „zatvorene“ DPP III (**cK405A**) iz cWT forme, dok mutant W300L „otvorene“ DPP III (**oW300L**) iz oWT strukture. Takve strukture podvrgnute su jednakim uvjetima otapanja i neutralizacije, a potom i optimizaciji, zagrijavanju, uravnoteženju i MD simulacijama kao i nativni enzim. Nešto drugačija procedura korištena je za mutant W300L koji je nakon uobičajenog postupka uravnoteženja, tijekom narednih 20 ps zagrijan na 500K, nakon čega je ohlađen na 300 K unutar 20 ps. Tijekom grijanja i hlađenja korišten je vremenski korak od 1 fs. Mutanti oK405A, cK405A, $cK405A_{MD}$, i oW300L simulirani su redom 21,6, 20, 20 i 18 ns u uvjetima konstantnog tlaka i temperature (1 atm i 300 K, *NpT* ansambl), korištenjem vremenskog koraka od 1 fs i ff03 polja sila.

3.1.3. MD simulacije provedene pomoću programskog paketa GROMACS 4.5.3.

Nativna „otvorena“ DPP III i njezin mutant D372A smješteni su u dodekaedarsku kutiju ispunjenu TIP3P molekulama vode. Ioni Na^+ dodani su za neutralizaciju sustava. Korištenjem periodičnih rubnih uvjeta simulirani su sustavi koji se sastoje od sveukupno ~98 000 atoma

(~29 000 molekula vode). Za otapanje i neutralizaciju sustava unutar programskog paketa GROMACS koriste se programi *editconf* i *genbox*. Elektrostatske interakcije računate su korištenjem PME (eng. particle-mesh Ewald) metode. Na taj način pripremljene su strukture **oWT$_{gromacs}$** i **oD372A$_{gromacs}$**.

Prije produkcijske faze MD simulacija, optimizirana je geometrija sustava korištenjem metode najstrmijeg spusta. MD simulacije provedene su pri konstantnoj temperaturi i tlaku (300 K i 1 atm, *NpT* ansambl) korištenjem *velocity-Verlet* algoritma i vremenskog koraka od 1 fs. Temperatura je održavana konstantnom primjenom Nosé-Hooverovog termostata s konstantom sprege od 1 ps. Za izotropnu regulaciju tlaka korištena je Martyna-Tuckerman-Tobias-Klein (MTTK) procedura, s konstantom sprege od 1 ps. Nakon 50 ns *NpT* simulacije (prilikom čega su podatci o strukturi i energiji sačuvani svakih 1 ps), mutant D372A je zagrijan na 400 K (unutar 500 ps), nakon čega je uslijedilo postepeno hlađenje na 300 K (unutar 500 ps). Posljednjih 20ns MD simulacije provedeni su korištenjem *NpT* ansambla i vremenskog koraka od 1 fs. Sveukupno, generirane su trajektorije duge 50 i 71 ns za divlji tip, odnosno mutant D372A, DPP III.

3.1.4. MD simulacije u kojima se primjenjuje nasumična sila (RAMD) na molekulu vode

Sustav enzim-otapalo dobiven nakon 101 ns MD simulacija „otvorene“ DPP III, predstavljao je polaznu točku za RAMD simulacije. Pojedinačne RAMD simulacije izvodile su se 250 ps ili dokle udaljenost između centra enzima i centra molekule vode nije postala veća od 30 Å. Akceleracija sile primijenjene na centar mase molekule vode iznosila je 2,52 kJ g^{-1} $Å^{-1}$. Korišten je vremenski korak od 1 fs, a smjer sile održavan je konstantnim tijekom 40 vremenskih koraka MD simulacije. Ako se za vrijeme toga perioda molekula vode nije pomakla više od 0,01 Å, nasumično je izabran novi smjer sile; u suprotnom, isti smjer sile primijenjen je i kroz slijedećih 40 koraka.

Programom CAVER 2.0 v 0.003[93–95] (unutar programa PyMol) također su ispitani tuneli koje molekule vode koriste za ulazak u aktivno mjesto enzima. U tom slučaju pretraživanje je počelo od atoma cinka u strukturi enzima dobivenoj nakon 101 ns MD simulacija „otvorene“ DPP III i u strukturi „zatvorene“ DPP III, prema otopini.

3.1.5. Ubrzane MD simulacije (AMD) slobodnog enzima

Hidratizirani sustavi dobiveni nakon 5 i 207 ns MD simulacije „otvorene“ DPP III, te nakon 5 ns MD simulacije „zatvorene“ DPP III, korišteni su kao polazne strukture za AMD simulacije s dvostrukim poticajem. AMD simulacije provedene su pomoću programskog paketa AMBER12 instaliranom na grafičkim karticama (eng. *graphics processing unit*, GPU).

Prosječna ukupna potencijalna energija, $U_T(r)$, i prosječna torzijska potencijalna energija, $U_t(r)$, simuliranih sustava, izračunate su iz podataka generiranih tijekom prvih 5 ns standardnih MD simulacije „otvorene“ i „zatvorene“ DPP III, i tijekom zadnjih 5 (od sveukupno 207) ns MD simulacije „otvorene“ DPP III. Vrijednosti energijskih pragova (E_t i E_T) i parametara α (α_t *i* α_T) izračunati su prema preporuci Pierce-a i sur. (vidi tablicu 2).[77] Tada je granična vrijednost torzijskog potencijala dobivena kao suma izračunate prosječne torzijske energije, $U_t(r)$, i iznosa $n_{RES} \times E_{RES}$, pri čemu je n_{RES} broj aminokiselina od kojih se sastoji makromolekula, a E_{RES} jedinična energija dodana za svaku aminokiselinu u sustavu, dok je za α_t korištena vrijednost od (1/5) × $E_{RES} \times n_{RES}$. Granična vrijednost potencijalne energije sustava, E_T, izračunata je kao suma prosječne potencijalne energije, $U_T(r)$ i umnoška $n_{AT} \times E_{AT}$, pri čemu je n_{AT} ukupan broja atoma u sustavu, a E_{AT} jedinična energija dodana za svaki atom u sustavu, dok je za α_T korišten umnožak $n_{AT} \times E_{AT}$. U simulacijama korištene su različite vrijednosti parametara E_{RES} i E_{AT} što je rezultiralo trima različitim AMD simulacijama, tzv. AMD_1, AMD_2 i AMD_3 simulacije, pri čemu potencijal poticaja opada s lijeva na desno (detalji su dani u tablici 2). Programski paket AMBER12 (GPU verzija)[96] i ff03 polje sila korišteni su za izvođenje AMD simulacija uz konstantni tlak i temperaturu (1 atm i 300 K, *NpT* ansambl). Temperatura i tlak održavani su konstantnim korištenjem Langevinovog termostata i Berendsenovog barostata. Uz primjenu SHAKE algoritma korišten je vremenski korak od 2 fs. Provedeno je pet AMD_1 simulacija oWT, cWT i cWT_{MD} sustava, i pet i dvije AMD_2, odnosno AMD_3 simulacija, oWT sustava. Simulacijska vremena dana su u tablici 3.

Tablica 2. Parametri korišteni u ubrzanim MD simulacijama (AMD) s dvostrukim poticajem sustava enzima i njegovog kompleksa sa supstratom Arg-Arg-2-naftilamidom (RRNA). $U_T(r)$ i $U_t(r)$ su prosječna ukupna potencijalna energija, odnosno prosječna torzijska energija (± standardna devijacija, SD), $E_T(r)$ i $E_t(r)$ su energijski pragovi koji se definiraju posebno za ukupnu potencijalnu energiju, odnosno za torzijsku energiju, a α_T i α_t su parametri koji određuju intenzitet promjene. U računima ukupan broj aminokiselina (n_{RES}) iznosio je 723.

sustav	oznaka simulacije	$[E_{AT}, E_{RES}]^a$ / kJ mol^{-1}	$n_{AT}{}^c$	$(U_T(r) \pm SD)$ / kJ mol^{-1}	$E_T(r)$ / kJ mol^{-1}	α_T / kJ mol^{-1}	$(U_t(r) \pm SD)$ / kJ mol^{-1}	$E_t(r)$ / kJ mol^{-1}	α_t / kJ mol^{-1}
oWT	aMD_1	[0,67, 16,74]^b	97537	−1236272 ± 3021	-1170980	65296	32393 ± 159	44493	2418
	aMD_2	[0,67, 10,46]			-1170980	65296		39957	1506
	aMD_3	[0,42, 4,18]			-1195465	40811		35418	607
cWT	aMD_1	[0,67, 16,74]^b	66037	−816583 ± 1142	-772375	44208	32359 ± 155	44459	2418
cWT_{MD}	aMD_1	[0,67, 16,74]^b	97537	−1234155 ± 1163	-1168859	65296	32317 ± 138	44417	2418
oWT-RRNA	aMD_1	[0,67, 16,74]^b	104287	−1324943 ± 1289	-1255133	69814	32493 ± 142	44593	2418
	aMD_2	[0,67, 10,46]			-1255133	69814		40083	1506
	aMD_3	[0.42, 4.18]			-1281308	43635		35518	607
$oWT\text{-}RRNA_{MD}$	aMD_1	[0,67, 16,74]^b	79300	−992989 ± 1163	-939906	53087	32426 ± 142	44526	2418
cWT-RRNA	aMD_1	[0,67, 16,74]^b	62008	−761220 ± 1155	-719711	41514	32564 ± 151	44664	2418
cWT_{MD}-RRNA	aMD_1	[0,67, 16,74]^b	98392	−1246489 ± 1285	-1180624	65869	32426 ± 151	44526	2418

[a] E_{RES} je jedinična energija dodana za svaku aminokiselinu u sustavu prilikom izračuna $E_t(r)$ i α_t, a E_{AT} je jedinična energija dodana za svaki atom u sustavu prilikom izračuna $E_T(r)$ i α_T
[b] parametri prema preporuci Piercea i sur.[77]
[c] n_{AT} odgovara broju atoma u sustavu

3.2. MD simulacije kompleksa DPP III

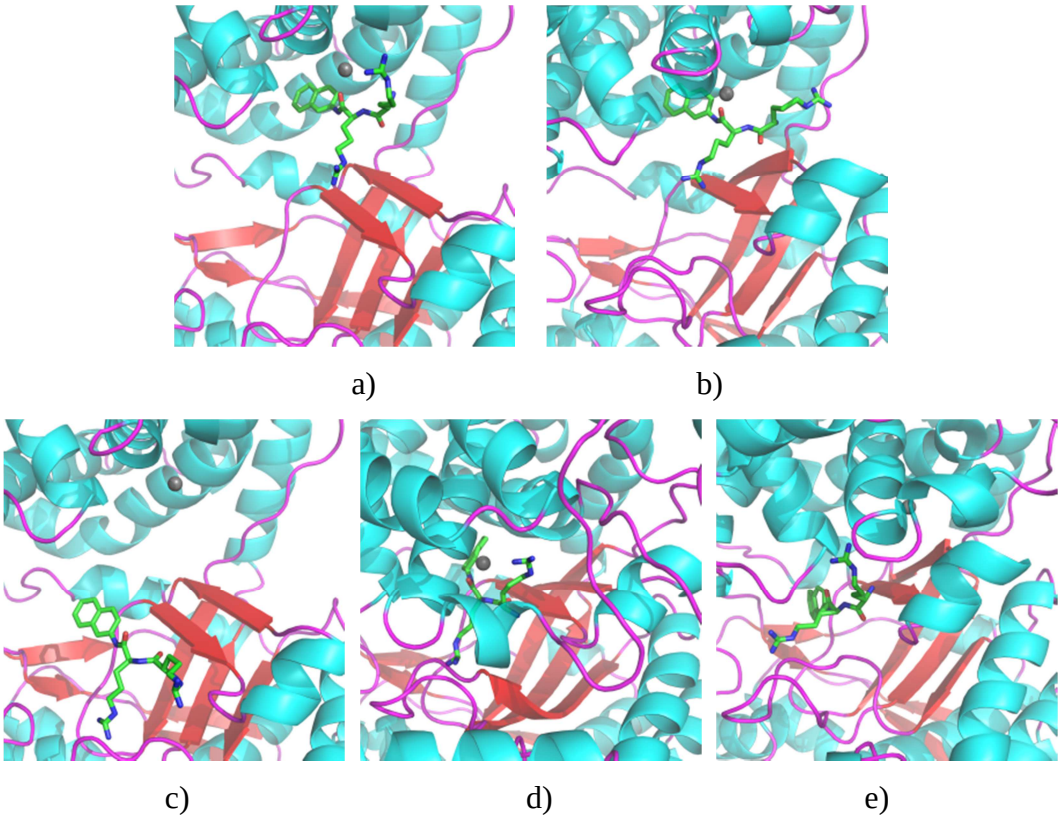
3.2.1. Određivanje načina vezanja liganda pomoću molekulskog uklapanja i usmjerenih MD simulacija

Kompleksi između „otvorene“ DPP III i liganada, sintetičkog supstrata Arg-Arg-2-naftilamida (RRNA) i inhibitora Tyr-Phe-hidroksamata (INH), sagrađeni su na način da je vezanje liganda u vezno mjesto enzima prvo ispitano programom AutoDock 4[97] (vidi tablicu 7). Najzastupljeniji načini vezanja liganda podvrgnuti su dalje usmjerenim MD simulacijama korištenjem programa AMBER10, i to na način da je karbonilni kisik druge peptidne veze s N-kraja liganda povlačen u smjeru cinka s konstantom sile od 418,40 kJ mol^{-1} $Å^{-2}$ do optimalne udaljenosti od 2,5 Å. Načini vezanja određeni usmjerenim MD simulacijama naknadno su optimizirani (2500 koraka) u implicitnom otapalu (korištenjem poopćenog Bornovog modela), a strukture s najnižom energijom odabrane su kao polazne točke za daljnje MD simulacije. Za vrijeme slijedeće faze, koja se sastojala od uravnoteženja sustava, simulacije pri povišenoj temperaturi (do 500 K), hlađenja i 3-4 ns MD simulacije pri sobnoj temperaturi, došlo je do kontrolirane reorijentacije liganda u energetski povoljniji položaj. Tijekom daljnjih MD simulacija ligandi su ostali koordinirani na atom cinka, te nisu značajno promijenili svoj položaj u veznom mjestu enzima. Uočene su samo fluktuacije oko relativno dobro definiranog veznog moda, gdje molekula liganda koordinira ion cinka (s karbonilnim kisikom iz druge peptidne veze s N-kraja liganda) i nalazi se iznad β-ploče iz „donje“ domene proteina (slika 24a). Navedeni način vezanja liganda, koji će se dalje u tekstu zvati „MD mod (način) vezanja“ (ili će se označavati indeksom MD uz skraćenicu za molekulu liganda), odabran je za daljnje MD simulacije u kojima je korišteno AMBER ff03 polje sila.[90] Parametri za ligande (Arg-Arg-2-naftilamid i Tyr-Phe-hidroksamat) određeni su korištenjem programa *Antechamber*, koji je dio programskog paketa AMBER. Za atom cinka korišteni su već navedeni nevezni parametri.[91,92]

3.2.2. MD simulacije kompleksa DPP III-Arg-Arg-2-naftilamid

Sagrađeni kompleks DPP III-RRNA, gdje je molekula RRNA smještena iznad β-ploče iz „donje“ domene proteina i koordinira atom cinka u „otvorenoj“ strukturi DPP III, tzv. **oWT-RRNA$_{MD}$** kompleks (slika 24a), smješten je u kutiju oblika krnjeg oktaedra koja je ispunjena

TIP3P molekulama vode na način da je najmanja udaljenost između bilo kojeg atoma proteina i ruba simulacijske ćelije iznosila 11 Å. Za neutralizaciju sustava dodani su Na^+ ioni u blizini negativno nabijenih aminokiselina na površini proteina. Konačni sustav simuliran je korištenjem periodičnih rubnih uvjeta. Elektrostatske interakcije računate su korištenjem PME (eng. *particle-mesh Ewald*) metode.



Slika 24. Pet različitih kompleksa DPP III-RRNA koji predstavljaju polazne strukture za MD simulacije: a) oWT-$RRNA_{MD}$, b) cWT_{MD}-$RRNA_{MD}$, c) oWT-RRNA, d) cWT-RRNA i e) cWT_{MD}-RRNA. Atom cinka prikazan je sivom kuglicom, a molekula supstrata štapićima obojanim prema tipu atoma. Vodici nisu prikazani zbog jednostavnosti prikaza. Dijelovi strukture koji odgovaraju β-vrpcama predstavljene su crvenim strelicama. Slike su generirane programom VMD.[98]

Optimizacija, zagrijavanje, uravnoteženje (50 ps, *NVT* ansambl) i produktivna MD faza (30 ns, *NpT* ansambl) sustava provedeni su na sličan način kao što je to učinjeno za strukture nativnog enzima (vidi poglavlje 3.1.2).

Za gradnju tzv. **cWT_{MD}-$RRNA_{MD}$** kompleksa (slika 24b) korištena je struktura enzima dobivena nakon 72 ns MD simulacije „otvorene“ DPP III (struktura u kojoj nije došlo do potpunog „zatvaranja“ enzima kako bi se ligand mogao smjestiti u vezno mjesto) i RRNA

vezan na način određen molekulskim uklapanjem i usmjerenim MD simulacijama (tj. RRNA koordinira atom cinka i nalazi se iznad β-ploče iz „donje“ domene proteina). Primjenjen je isti postupak pripreme sustava (otapanje kompleksa, neutralizacija, optimizacija geometrije, uravnoteženje sustava), te isti uvijeti tijekom produktivnih MD simulacija kao i u slučaju kompleksa oWT-RRNA.

Rentgenskom strukturnom analizom pokazan je novi način vezanja liganda (tj. molekule tinorfina) u vezno mjesto enzima (strukture kojima odgovaraju PDB kodovi 3T6B i 3T6J). U kompleksu DPP III-tinorfin, supstrat je vezan na način da formira β-vrpcu koja se na antiparalelan način veže za β-ploču sastavljenu od pet β-vrpci iz „donje“ domene proteina (slika 11). Po uzoru na tu strukturu sagrađeni su kompleksi s tri različita konformera DPP III (oWT, cWT i cWT_{MD}) u kojima je RRNA vezan na isti način kao molekula tinorfina. cWT_{MD} predstavlja strukturu DPP III dobivenu nakon 101 ns MD simulacija „otvorene“ DPP III. Kompleksi **oWT-RRNA**, **cWT-RRNA** i **cWT_{MD}-RRNA** (slika 24c-e) na isti su način pripremljeni i simulirani. Jedina je razlika što je sustav cWT_{MD}-RRNA za vrijeme faze uravnoteživanja kratko zagrijan na 400 K, te potom ohlađen na 300 K, sve unutar 40 ps, kako bi omogućili molekuli supstrata da nađe povoljan položaj u veznom mjestu enzima. Kompleksi oWT-RRNA, cWT-RRNA i cWT_{MD}-RRNA simulirani su 50, 80 i 30 ns pri 300 K korištenjem vremenskog koraka od 1 fs. Energije i strukture sačuvane su svakih 1 ps.

Stabilnost molekule supstrata u veznom mjestu enzima u kompleksima dobivenim nakon 30 (ili 50 i 80) ns MD simulacije pri sobnoj temperaturi, ispitana je na način da su sustavi simulirani dodatnih 10 ns pri 350 K uz vremenski koraka od 1 fs. Simulacije pri povišenoj temperaturi korištene su kako bi se ubrzali konformacijski prijelazi sustava u stabilno(ije) stanje.

Kompleksi RRNA s točkastim mutantima ljudske DPP III: H568N, N406Q, N406S i W300L priređeni su uz pomoć programa *tleap* (koji je dio programskog paketa AMBER) korištenjem oWT-$RRNA_{MD}$ kao predloška. U navedenim kompleksima molekula RRNA smještena je iznad β-ploče iz „donje“ domene proteina i koordinira atom cinka, pa u skladu s tim nose oznake: **oH568N-$RRNA_{MD}$**, **oN406Q-$RRNA_{MD}$**, **oN406S-$RRNA_{MD}$** i **oW300L-$RRNA_{MD}$**. Pripreme navedenih kompleksa za MD simulacije, kao i same simulacije, provedene su na isti način kao što je to učinjeno za komplekse s nativnim enzimom.

Kompleksi mutanata oH568N-RRNA$_{MD}$, oN406Q-RRNA$_{MD}$, oN406S-RRNA$_{MD}$ i oW300L-RRNA$_{MD}$ simulirani su redom: 30 ns, 20 ns, 5 ns i 18 ns.

3.2.3. MD simulacije kompleksa DPP III-peptid

Budući je dokazano da DPP III cijepa neke važne opioidne peptide,[10] priređeni su kompleksi nativnog enzima s Leu-enkefalinom (Tyr-Gly-Gyl-Phe-Leu), endomorfinom-1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH_2) i endomorfinom-2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH_2). Navedeni peptidi vezani su u vezno mjesto „zavorene“ DPP III na način da oponašaju vezanje molekule tinorfina iz kristalografski određene strukture kompleksa, te u skladu s tim nose oznake: **cWT-L-EN**, **cWT-EN1** i **cWT-EN2**. Postupak korišten tijekom pripreme (otapanje sustava, neutralizacija, optimizacija geometrije), uravnoteženje sustava, te produktivnih MD simulacija jednak je onom korištenom za DPP III-RRNA komplekse. Kompleksi su simulirani 30 ns korištenjem vremenskog koraka od 1 fs u *NpT* uvjetima, dok su energije i strukture pohranjivane u intervalima od 1 ps.

3.2.4. MD simulacije kompleksa DPP III-Tyr-Phe-hidroksamat

Pored kompleksa sa supstratima, sagrađeni su i kompleksi DPP III s kompetitivnim inhibitorom, Tyr-Phe-hidroksamatom. U tzv. **oWT-INH$_{MD}$** kompleksu inhibitor je smješten iznad β-ploče iz „donje“ domene proteina i koordinira atom cinka u „otvorenoj“ strukturi DPP III, a u **cWT-INH** kompleksu inhibitor je vezan po uzoru na molekulu tinorfina (u obliku β-vrpce koja se na antiparalelan način veže za β-ploču sastavljenu od pet β-vrpci iz „donje“ domene proteina) u „zatvorenu“ DPP III. Priprema sustava, uravnoteženje i MD simulacije provedene su na isti način kao u slučaju kompleksa sa supstratima. Svaki od navedenih kompleksa simuliran je 30 ns uz vremenski korak od 1 fs.

Kompleksi inhibitora s točkastim mutantima H568N i N406Q priređeni su uz pomoć programa *tleap* (koji je dio programskog paketa AMBER) korištenjem oWT-INH$_{MD}$ strukture ako predloška. U navedenim kompleksima molekula inhibitora smještena je iznad β-ploče iz „donje“ domene proteina i koordinira atom cinka, pa u skladu s tim nose oznake **oH568N-INH$_{MD}$** i **oN406Q-INH$_{MD}$**. Pripreme navedenih kompleksa za MD simulacije, kao i same simulacije, provedene su na isti način kao što je to učinjeno za komplekse s nativnim enzimom. Energije i strukture su pohranjivane svake ps tijekom 30 ns (uz Δt=1 fs) i 4,5 ns

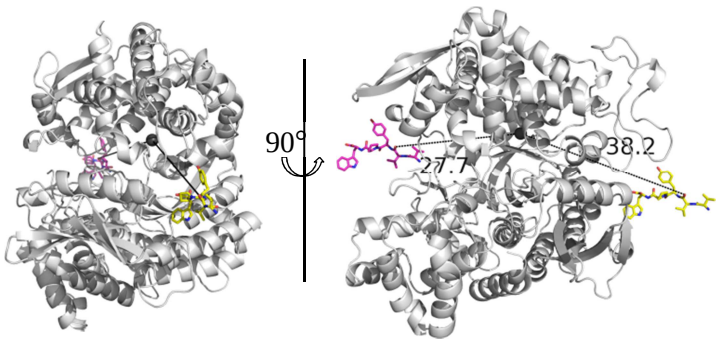
(prvih 0,5 ns uz Δt=1 fs, a preostalih 4 ns uz Δt=2 fs) MD simulacije, oH568N-INH_{MD}, odnosno oQ406N-INH_{MD} kompleksa.

3.2.5. MD simulacije u kojima se primjenjuje nasumična sila (RAMD) na supstrat

Putevi izlaska molekule supstrata (RRNA) iz veznog mjesta enzima proučavani su RAMD simulacijama. Sustav dobiven nakon 15 ns MD simulacija cWT_{MD}-RRNA kompleksa predstavljao je polaznu točku za te simulacije. RAMD simulacije provedene su na isti način kao što je to učinjeno u MD simulacijama u kojima se primjenjivala nasumična sila na molekulu vode (poglavlje 3.1.4.), s jedinom razlikom da je akceleracija sile primijenjene na centar mase molekule supstrata iznosila 0,42 kJ g^{-1} $Å^{-1}$.

3.2.6. Usmjerene MD simulacije (SMD) kompleksa DPP III-tinorfin

Usmjerenim MD simulacijama (SMD) ispitana je mogućnost ulaska molekule supstrata (tinorfina) u vezno mjesto „zatvorene“ DPP III, kao i utjecaj vezanja liganda na konformaciju proteina. Molekula tinorfina „ručno“ je smještena s prednje (slika 25, molekula tinorfina označena štapićima sa žuto obojenim ugljikovim atomima), odnosno sa stražnje (slika 25, molekula tinorfina označena štapićima s ružičasto obojenim ugljikovim atomima) strane pukotine koja se nalazi između dviju domena u „zatvorenoj“ strukturi DPP III (strukture **cWT-vvypw-1**, odnosno **cWT-vvypw-2**). Početni položaji suspstrata odabrani su na temelju položaja ulaza dva najvjerojatnija tunela za izlazak molekule vode iz aktivnog mjesta enzima identificirana programom CAVER.



Slika 25. Dva početna položaja molekule tinorfina, s prednje (žuto) i sa stražnje strane (ružičasto), pukotine koja se nalazi između dviju domena u „zatvorenoj” strukturi DPP III. Prikazane su dvije orijenta□ije enzima. Udaljenosti između drugog karbonilnog kisika s N-kraja supstrata i Zn^{2+} iona (siva kugli□a) prikazana je u jedini□ama Å. Slika je generirana s programom PyMol.[31]

Pripremljeni kompleksi smješteni su u kutiju oblika krnjeg oktaedra ispunjenu TIP3P molekulama vode, na način da najmanja udaljenost između bilo kojeg atoma proteina i ruba simulacijske ćelije iznosi 11 Å. Sustav je neutraliziran dodavanjem Na^+ iona, koji su smješteni u blizinu negativno nabijenih iona na površini proteina. Sustavi su simulirani korištenjem periodičnih rubnih uvjeta, pri čemu su elektrostatske interakcije računate korištenjem PME metode.

Prije samih MD simulacija, geometrija proteina optimizirana je u tri kruga, primjenom različitih ograničenja. U prvom krugu (2500 koraka), dopušteno je pomicanje samo molekulama vode i tinorfinu, dok su položaji protein i cinka bili ograničeni korištenjem harmoničkog potencijala konstante sile 133,89 kJ/(mol $Å^2$). U drugom (5000 koraka) i trećem (5000 koraka) krugu, korištena je ista sila na cinkov atom, dok je glavna okosnica proteina ograničena prvo korištenjem konstante sile 418,40 kJ/(mol $Å^2$), a potom 41,84 kJ/(mol $Å^2$). Prvih 50 ps uravnoteživanja sustava, prilikom čega je sustav zagrijan s 0 na 300 K, korišten je *NVT* ansambl, dok su preostale simulacije (faza podešavanja gustoće vode i produkcijska faza) izvođene pri konstantnom tlaku i temperaturi (1 atm i 300 K, korištenjem *NpT* ansambla). Temperatura je održavana konstantnom korištenjem Langevinovog termostata s frekvencijom sudara od 1 ps^{-1}, a tlak Berendsenovim barostatom. Vibracije veze u kojima sudjeluju atomi vodika ograničene su primjenom SHAKE algoritma. Tijekom produkcijske faze drugi karbonilni kisik s N-kraja supstrata privlačen je atomu cinka s konstantom sile od 418,40 kJ mol^{-1} $Å^{-2}$ na optimalnu udaljenost od 2,5 Å. Za vrijeme usmjerenih MD simulacija pomicanje atoma cinka ograničeno je primjenom dodatnog potencijala konstante sile od 133,89 kJ mol^{-1} $Å^{-2}$.

3.2.7. Ubrzane MD simulacije (AMD) kompleksa DPP III-RRNA

Hidratizirani kompleksi DPP III-RRNA u kojima je molekula supstrata vezana ili u obliku β-vrpce za β-ploču iz „donje“ domene proteina (oWT-RRNA, cWT-RRNA and cWT_{MD}-RRNA kompleksi) ili na „MD način“ ($oWT\text{-}RRNA_{MD}$), dobiveni nakon 5 ns (konvencionalnih) MD simulacija predstavljali su polazne točke za ubrzane MD simulacije. Prosječna ukupna potencijalna energija ($U_T(r)$) i prosječna torzijska potencijalna energija ($U_t(r)$) simuliranih sustava, izračunate su iz podataka generiranih tijekom početnih 5 ns (konvencionalnih) MD simulacija. Potencijali poticaja i parametri α izračunati su prema preporuci Pierce-a i sur.[77] korištenjem različitih vrijednosti parametara E_{AT} i E_{RES} (vidi tablicu 2). Korišteni su jednaki

simulacijski uvjeti kao i u slučaju slobodnog enzima (vidi poglavlje 3.1.5), a ukupna simulacijska vremena dana su u tablici 3.

3.3. MD simulacije krupnog zrna (CGMD) DPP III

Početni modeli za CGMD simulacije sagrađeni su u programu GROMACS 4.5.3 korištenjem Martini2P polja sila i tri različite strukture DPP III: „otvorene“ DPP III (oWT), „zatvorene“ DPP III (cWT) i strukture dobivene nakon 101 ns MD simulacija u kojima se svaki atom tretira eksplicitno (cWT_{MD}), kao predloška.

Korištenjem elastične mreže omogućena je sačuvanost sekundarnih struktura CG modela proteina tijekom CGMD simulacija. Izbor odgovarajućih parametara za postavljanje elastične mreže testiran je na primjeru „otvorene“ DPP III. Ispitane su različite vrijednosti konstanti sile elastične mreže (300, 500 i 700 kJ mol^{-1} nm^{-2}), te graničnih udaljenosti između „zrna“ iz okosnice proteina koje se koriste u definiranju elastične mreže (0,5-0,9 nm i 0,5-0,7 nm). Na temelju usporedbe s rezultatima MD simulacija u kojima se svaki atom tretira eksplicitno, u daljnjim CGMD simulacijama korišten je uži raspon graničnih udaljenosti, tj. 0,5-0,7 nm, i konstanta sile od 500 kJ mol^{-1} nm^{-2}. Navedeni parametri omogućili su očuvanje sekundarne strukture proteina za vrijeme CGMD simulacija, ali su i dopustili „zatvaranje“ proteina tj. promjenu tercijalne strukture enzima.

Sagrađene CG strukture minimizirane su u vakuumu (minimizacija je konvergirala kada je maksimalna sila bila manja od 1000 kJ mol^{-1} nm^{-1} korištenjem metode najstrmijeg spusta), te su potom smještene u kutiju (dodekaedar) ispunjenu polarizabilnim molekulama vode (korištenjem kutije vode uravnotežene pri T=300 K i p= 1 bar, preuzete s http://md.chem.rug.nl/cgmartini/index.php/downloads/example-applications/63-pure-water-solvent). Minimizirane otopljene CG strukture (minimizacija je konvergirala kada je maksimalna sila bila manja od 1000 kJ mol^{-1} nm^{-1} korištenjem metode najstrmijeg spusta), simulirane su pri konstantnoj temperaturi i tlaku (300 K i 1 bar, *NpT* ansambl) korištenjem *leap-frog* algoritma i vremenskog koraka od 20 fs. Temperatura i tlak su održavani konstantnim primjenom Berendsenovog termostata (uz vremensku konstantu sprege od 3 ps) i barostata (uz vremensku konstantu sprege od 3 ps i kompresibilnost od 4.5×10^{-5} bar^{-1}). Sve CGMD simulacije započete su korištenjem različitih nasumičnih brojeva za generiranje početnih brzina sustava (vrijednost gen_seed varijable je bila −1). Sustavi su simulirani u

prosjeku 50 000 000 koraka, a strukture i energije su uzorkovane svakih 10 000 koraka (svakih 200 ps).

Tablica 3. MD, SMD, AMD i CGMD[a] simulacije provedene u okviru ove doktorske disertacije.

Metoda[a]	Polje sila	Programski paket	Simulirani sustavi[a]	Br. simulacija×simulacijsko vrijeme/ns
MD	ff03	AMBER10	oWT	1×207, 2×100
		GROMACS 4.5.3.	oWT	1×50
		AMBER10	cWT	4×100
		AMBER10	oK405A	1×21,6
		AMBER10	cK405A$_{MD}$	1×20
		AMBER10	cK405A	1×20
		AMBER10	oW300L	1×18
	ff03	AMBER12	oWT-RRNA	1×60
		AMBER12	cWT-RRNA	1×90
		AMBER12	cWT$_{MD}$-RRNA	1×40
		AMBER10	oWT-RRNA$_{MD}$	1×40
		AMBER10	cWT$_{MD}$-RRNA$_{MD}$	1×40
		AMBER12	cWT-EN1	1×30
		AMBER12	cWT-EN2	1×30
		AMBER12	cWT-L-EN	1×30
		AMBER10	oH568N-RRNA$_{MD}$	1×30
		AMBER10	oW300L-RRNA$_{MD}$	1×18
		AMBER10	oN406S-RRNA$_{MD}$	1×5
		AMBER10	oN406Q-RRNA$_{MD}$	1×20
	ff03	AMBER10	oWT-INH$_{MD}$	1×30
			cWT-INH	1×30
			oH568N-INH$_{MD}$	1×30
			oN406Q-INH$_{MD}$	1×4,5
AMD$_1$	ff03	AMBER12	oWT	4×100, 1×50
			cWT	4×100, 1×50
			cWT$_{MD}$	4×100, 1×50
			oWT-RRNA	4×100, 1×50
			oWT-RRNA$_{MD}$	3×100
			cWT-RRNA	4×100, 1×50
			cWT$_{MD}$-RRNA	4×100, 1×50
AMD$_2$	ff03	AMBER12	oWT	3×100, 2×150
			oWT-RRNA	5×100
AMD$_3$	ff03	AMBER12	oWT	1×300, 1×285
			oWT-RRNA	2×297
CGMD	martini2P	GROMACS 4.5.3.	oWT	20×50 000 000[b]
			cWT	20×50 000 000[b]
			cWT$_{MD}$	20×50 000 000[b]
SMD	ff03	AMBER12	cWT-vvypw-1	1×29
			cWT-vvypw-2	1×32,65

[a] Kratice: MD, (standardne molekulsko-dinamičke simulacije) MD; AMD, ubrzane MD simulacije; CGMD, MD simulacije krupnog zrna; SMD, usmjerene MD simulacije; EN1, endomorfin-1; EN2, endomorfin-2; L-EN, Leu-enkefalin; RRNA, Arg-Arg-2-naftilamid.
[b] Za CGMD simulacije, umjesto simulacijskog vremena, naveden je ukupan broj koraka po CGMD simulaciji.

3.4. Računanje slobodne energije

3.4.1. MM-PBSA pristup računanju Gibbsove energije vezanja liganda

Korištenjem MM-PBSA pristupa (unutar programa AMBER) izračunate su aproksimativne (slobodne) Gibbsove energije vezanja liganada (supstrata, Arg-Arg-2-naftilamida, Leu-enkefalina, endomorfina-1 i endomorfina-2, i inhibitora, Tyr-Phe-hidroksamata). Za sintetički supstrat RRNA računi su provedeni za dva različita načina vezanja molekule liganda u vezno mjesto DPP III, jedan određen molekulskim uklapanjem i usmjerenim MD simulacijama i drugi preuzet iz trodimenzionalne strukture kompleksa „zatvorene“ DPP III i tinorfina. U MM-PBSA računu korišteni su ansambli struktura generirani tijekom intervala od po 5 (ili 2) ns MD simulacija pri čemu su strukture uzorkovane svakih 10 ps (ukupno 500 ili 200 struktura po intervalu). Slobodna energija vezanja računata je prema izrazu 2.61, tj. $\Delta G_{\text{vezanja}}=G_{\text{kompleks}}-[G_{\text{protein}}+G_{\text{ligand}}]$. Gibbsova energija aproksimirana je kao suma unutarnje energije sustava (izračunate u aproksimaciji polja sila) i slobodne energije solvatacije svakog pojedinog sudionika termodinamičkog ciklusa prikazanog na slici 23a. Polarni doprinos entalpiji solvatacije izračunat je rješavanjem linearne Poisson-Boltzmannove (PB) jednadžbe, dok je nepolarni doprinos određen računanjem površine dostupne otapalu (*SASA*) kao $\Delta_{\text{sol}}H_{\text{nepolaran}}=\gamma SASA+\beta$, pri čemu su korištene standardne vrijednosti konstanti (površinska napetost γ = 0,022764 kJ mol^{-1} Å^{-2}, β = 3,864 kJ mol^{-1}). Koncentracija (jednostruko nabijenih) iona u otopini korištena u PB računu iznosila je 0,95 M. Entropijski doprinos (translacijski, rotacijski i vibracijski) (slobodnoj) Gibbsovoj energiji vezanja izračunat je uz pomoć programa *Nmode* za period od 25-30 ns u slučaju vezanja inhibitora, ili za period od 15-30 ns u slučaju vezanja supstrata, uzimajući u obzir strukture generirane svakih 200 ps. Budući da je analiza normalnih modova računalno vrlo zahtjevna, entropijski doprinos izračunat je za skraćeni oblik proteina pri čemu su u obzir uzeti samo aminokiselinski ostaci koji čine vezno mjesto enzima (tj. Val308-Cys519), a predstavljaju dio enzima u kojem dolazi do najveće promjene uslijed vezanja liganda. Na temelju napravljene analize, u MM-PBSA računima, za otopljenu tvar (enzim i kompleks) korištena je dielektrična konstanta 2, a za otapalo 80, dok je naboj cinka bio + 1,5 *e*.

3.4.2. MM-PBSA pristup računanju relativne stabilnosti pojedinih formi proteina

Promjena Gibbsove energije uslijed konformacijske promjene enzima (prijelaz iz „otvorene“ u „zatvorenu“ formu proteina) određena je MM-PBSA računom na ansamblu struktura generiranih svakih 20 ps tijekom osam različitih 2 ns dugih intervala preuzetih iz MD simulacije (ukupno 100 struktura po intervalu). Kao i kod određivanja slobodne energije vezanja, Gibbsova energija aproksimirana je sumom konformacijske energije i slobodne energije solvatacije, korištenjem istih parametara kao i u slučaju određivanja Gibbsove energije vezanja. I u ovom slučaju ispitan je utjecaj dielektrične konstante (1, 2, i 4) proteina na promjenu slobodne Gibbsove energije. Entropijski doprinos izračunat je uzimanjem u obzir doprinosa otapala i enzima. Promjena konformacijske entropije enzima izračunata je analizom normalnih modova korištenjem modula *Nmode* (unutar AMBER11), pri čemu su u obzir uzeti samo aminokiseline koje čine vezno mjesto enzima, budući je taj dio enzima najosjetljiviji na konformacijske promjene. Tu je broj novonastalih kontakata uslijed „zatvaranja“ enzima najveći, a najveće su i promjene površine dostupne otapalu (*SASA*). *SASA* je izračunata uz pomoć programa Naccess V2.1.1.1 i PSAIA, korištenjem probe radijusa 1,4 Å (radijus molekule vode). Promjena entropijskog doprinosa energiji solvatacije procijenjena je na temelju promjene broja molekula vode u prvoj i drugoj solvatacijskoj sferi proteina uslijed promjene oblika proteina.

3.4.3. MM-GBSA pristup računanju relativnih slobodnih energija s obzirom na pojedine aminokiseline

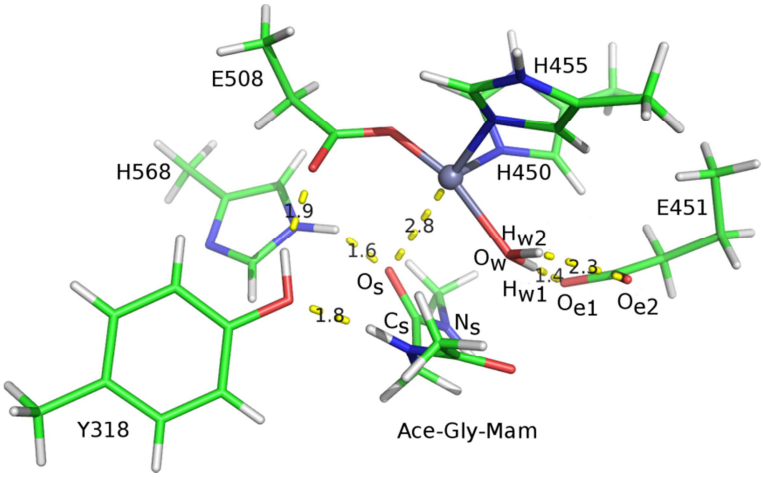
Za različite forme proteina, korištenjem MM-GBSA pristupa, izračunate su relativne slobodne energije s obzirom na pojedinih aminokiselina. Takvom dekompozicijskom analizom određene su aminokiseline koje značajno stabiliziraju „zatvorenu“ formu proteina. U tu svrhu u račun su uzete u obzir tri trajektorije od po 10 ns generiranih tijekom standardnih MD simulacija: dva intervala preuzeta iz MD simulacija oWT forme proteina (oWT-1 MD simulacija; interval od 7. do 17. ns i od 197. do 207. ns kako bi izračunali energije karakteristične za oWT, odnosno cWT_{MD} formu), te interval preuzet iz MD simulacije cWT forme proteina (cWT-1 MD simulacija; interval od 1. do 11. ns). U MM-GBSA računima dielektrična konstanta enzima bila je 2, a otapala 80. U obzir su uzete strukture generirane svakih 100 ps.

3.5. QM račun mehanizma reakcije na modelnom sustavu

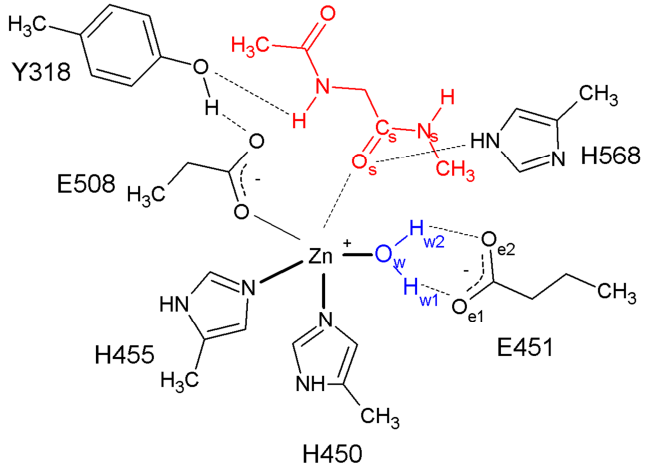
Eksperimentalno određena kristalna struktura kompleksa DPP III-tinorfin (PDB kod 3T6B), korištena je kao polazna točka za QM račune enzimske reakcije. Budući da u aktivnom mjestu navedenog enzima nedostaje ion cinka, te da se radi o mutantu E451A proteina, prije samih QM računa, Ala451 je mutiran natrag u Glu i dodan je ion cinka. Položaji iona cinka i glutamata 451 određeni su tako što je aktivno mjesto iz 3T6B strukture preklopljeno s aktivnim mjestom iz 3FVY strukture, korištenjem položaja H450, H455 i E508 kao kriterija sravnjivanja. QM računi provedeni su na minimalnom modelu aktivnog mjesta enzima koji se sastojao od iona cinka, molekule vode koja ga koordinira, te dva 4-metil-imidazola i jednog propanoata koji redom zamijenjuju aminokiseline H450, H455 i E508. Sačuvani aminokiselinski ostaci Y318, E451 i H568 modelirani su, redom, kao 1-metil-4-hidroksifenil, butirat i 4-metil-imidazol (slika 26). Molekula supstrata modelirana je kao CH_3CO-Gly-$NHCH_3$ (N-metil-Gly-acetamid), tj. glicinu je na N-kraju dodana acetilna skupina (Ace), a na C-kraju, metilamidna (Mam).

Početni položaj molekule vode odabran je na temelju QM/MM računa provedenih pri proučavanju koordinacije iona cinka. Budući da je teorijsko proučavanje hidrolize peptidne veze u termolizinu pokazalo da je energetski najpovoljniji mehanizam onaj koji uključuje adiciju molekule vode potpomognutu s Glu143, u računima je korišten minimalni model aktivnog mjesta ljudske DPP III u kome je molekula vode koja koordinira ion cinka i ima vodikovu vezu s Glu451. U modelu, položaj druge molekule vode u solvatacijskoj sferi cinka kod nativnog enzima zauzeo je karbonilni kisik molekule supstrata.

U kristalnoj strukturi kompleksa DPP III-tinorfin, amidna skupina druge aminokiseline (Val) s N-kraja supstrata ima vodikovu vezu s Y318, a karbonilna s H568. Stoga je i u minimalnom modelu zadržana navedena mreža vodikovih veza.



a)



b)

Slika 26. Minimalni model aktivnog mjesta ljudske DPP III sagrađen iz strukture kompleksa DPP III-tinorfin (PDB kod 3T6B): a) trodimenzionalna struktura (udaljenosti su dane u Å) i b) shematski prikaz (molekule supstrata i vode obojeni su crveno, odnosno plavo). Molekula supstrata aproksimirana je s Ace-Gly-Mam, pri čemu je Ace acetilna, a Mam metilamidna skupina. Istaknuta su imena atoma korištena dalje u tekstu. Elektrostatske interakcije prikazane su iscrtkanim linijama, a koordinativne i kovalentne veze debljim, odnosno tanjim punim linijama.

QM optimizacija geometrije stacionarnih točki provedena je u programu GAUSSIAN09 korištenjem B97D funkcionala koji uključuje disperzne interakcije. Stacionarne točke prvo su određene korištenjem 6-31G osnovnog skupa za H, N, C i O atome i LanL2DZ ECP za atom Zn^{2+}. Prilikom optimizacije struktura kompleksa enzim-supstrata (ES), međuprodukata (INT) i produkta (P), fiksiran je položaji ugljikovog atom iz CH_3 skupine modela aminokiselina Y318, H450, E451, H455, E508 i H568 čime je sterički simuliran okoliš proteina koji

osigurava sačuvanost oblika aktivnog mjesta enzima. Početne strukture INT i P dobivene su iz ES, odnosno INT kompleksa, skeniranjem plohe potencijalne energije. Točnije, kako bi se odredila struktura INT, udaljenost između kisikovog atoma iz molekule vode (O_w) i karbonilnog ugljikovog atoma (C_s) supstrata smanjivana je za 0,1 Å u 16 koraka, dok je prilikom izgradnje P, udaljenost između karbonilnog ugljikovog atoma (C_s) i amidnog dušikovog atoma (N_s) supstrata povećavana za 0,05 Å u 30 koraka. U oba slučaja, svaka promjena udaljenosti, tj. svaka nova geometrija, optimizirana je u 7 koraka. Skenirane su udaljenosti O_w-C_s i C_s-N_s budući da njihova promjena najviše opisuje imaginarnu frekvenciju prvog i drugog prijelaznog stanja određenih za termolizin. Molekula supstrata (Ace-Gly-Mam) nije bila podvrgnuta nikakvim ograničenjima tijekom minimizacije. Strukture prijelaznih stanja (eng. *transition state*, TS) 1 (TS1) i 2 (TS2) određene su iz stacionarnih točki ES, INT i P primjenom *Synchronous Transit-Guided Quasi-Newton* (STQN) metode unutar programa GAUSSIAN09 koju su razvili H. B. Schlegel i suradnici.[99] Najjednostavniji način određivanja strukture prijelaznog stanja je da se pretpostavi da se svaki atom nalazi točno između položaja u kojem počinje (reaktant) i u kojem završava (produkt). *Linear Synchronous Transit* (LST) algoritam traži maksimum (tj. strukturu TS) duž lineranog puta koji povezuje reaktante i produkte. Međutim, točnijom se pokazala *Quadratic Synchronous Transit* (QST) metoda koja pretpostavlja da se koordinate atoma u prijelaznom stanju nalaze na paraboli koja povezuje geometrije reaktanata i produkata. Nakon što se približimo dovoljno blizu strukture TS-a korištenjem LST ili QST metode, za konačnu optimizaciju geometrije primijenjuje se *quasi-Newton*ova metoda. U ovoj disertaciji prijelazna stanja određena su QST metodom, točnije prvo prijelazno stanje određeno je korištenjem QST2 metode za koju je potrebno znati početnu (u ovom slučaju reaktant) i konačnu (u ovom slučaju međuprodukt) strukturu, a drugo prijelazno stanje QST3, korištenjem metode za koju je osim početne (u ovim slučaju međuprodukt) i konačne (u osvom slučaju produkt) strukture potrebno definirati pretpostavljenu strukturu prijelaznog stanja.

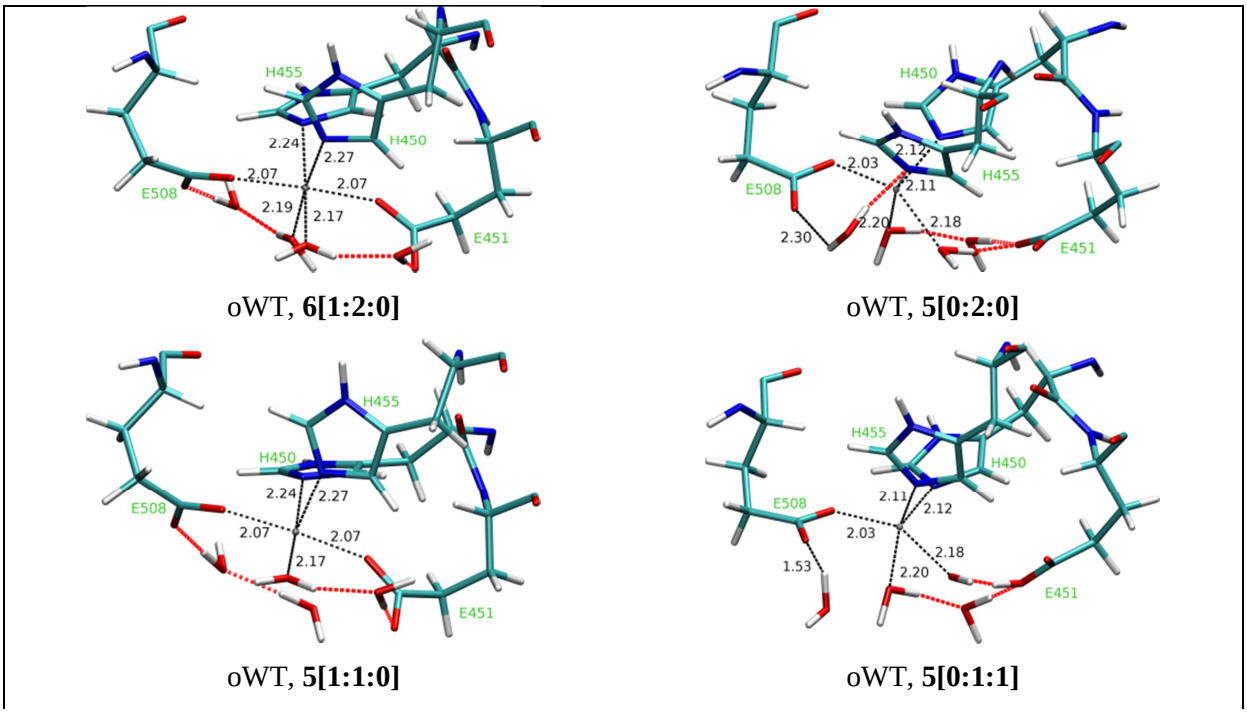
Nakon toga, dodavanjem polarizacijskih funkcija atomima H, N, C i O upotrebom 6-31G(d) osnovog skupa, određene su nove stacionarne točke korištenjem STQN metode ili metodom optimizacije prijelaznog stanja iz stacionarnih točki određenih s manjim osnovnim skupom. Prijelazno stanje potvrđeno je postojanjem jedne negativne vlastite vrijednosti (jedne imaginarne frekvencije) u Hessian matrici (matrica drugih derivacija energije), s vibracijskim vektorom koji vodi do susjednih minimuma. Također, strukture prijelaznih stanja povezane su

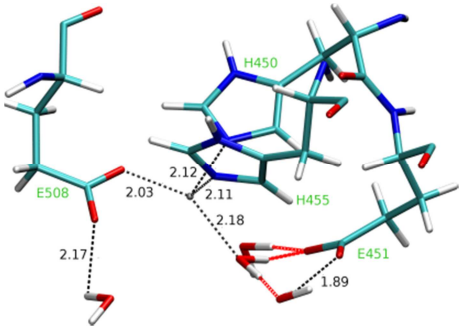
sa strukturama osnovnih stanja računanjem intrinsične reakcijske koordinate (eng. *intrinsic reaction coordinate*, IRC). U IRC računu, slijedi se put „nizbrdo“ iz prijelaznog stanja u oba smijera, naprijed i nazad. Svi računi provedeni su u prisustvu otapala (dielektrične konstante 4) korištenjem modela polarizabilnog kontinuuma (CPCM). Energije konačnih optimiziranih stacionarnih točki duž reakcijske koordinate, određene su *single point* računom uz korištenje proširenog osnovnog skupa 6-31++G(d,p), tj.u opisu atoma H, N, C i O korištene su pored osnovnih, difuzne i polarizacijske funkcije.

3.6. QM/MM račun koordinacije Zn^{2+} iona

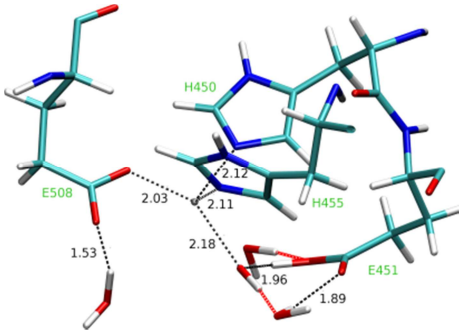
U QM/MM računima u obzir su uzete tri različite strukture proteina, „otvorena“, „zatvorena“ i struktura dobivena nakon 101 ns MD simulacije „otvorene“ DPP III („zatvorena MD“ DPP III), koje predstavljaju tri različita okoliša cinkova iona. U svakoj od tih struktura razmotrena su tri različita tipa koordinacije cinkovog iona: tetraedarski, deformirani trigonsko-bipiramidalni i oktaedarski.

Početne strukture za QM/MM račune (slika 27) sagrađene su iz struktura dobivenih nakon molekulske dinamike i/ili minimizacije „otvorene“ i „zatvorene“ DPP III.

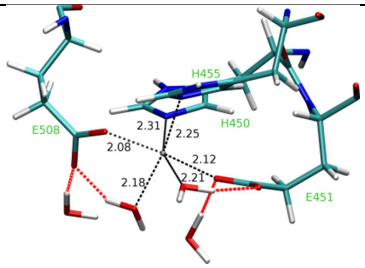




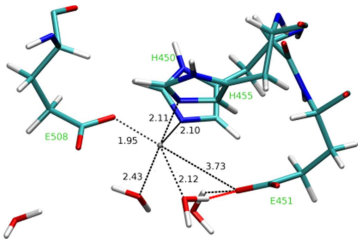
oWT, **4[0:1:0]**



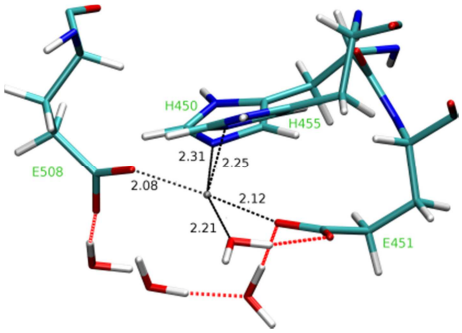
oWT, **4[0:0:1]**



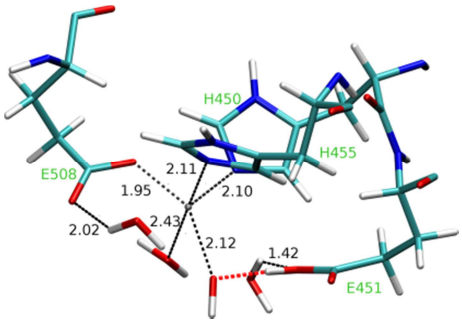
cWT, **6[1:2:0]**



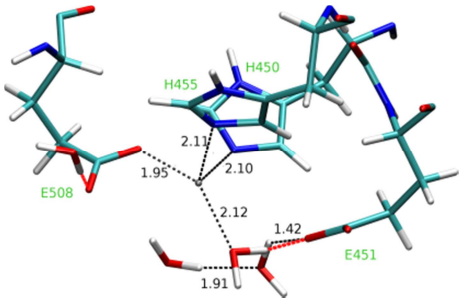
cWT, **5[0:2:0]**



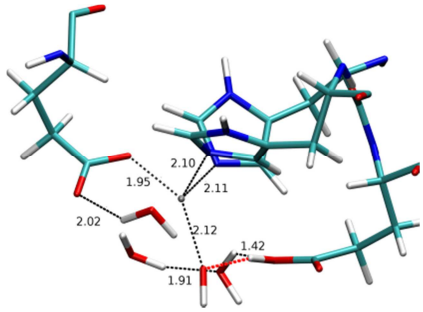
cWT, **5[1:1:0]**



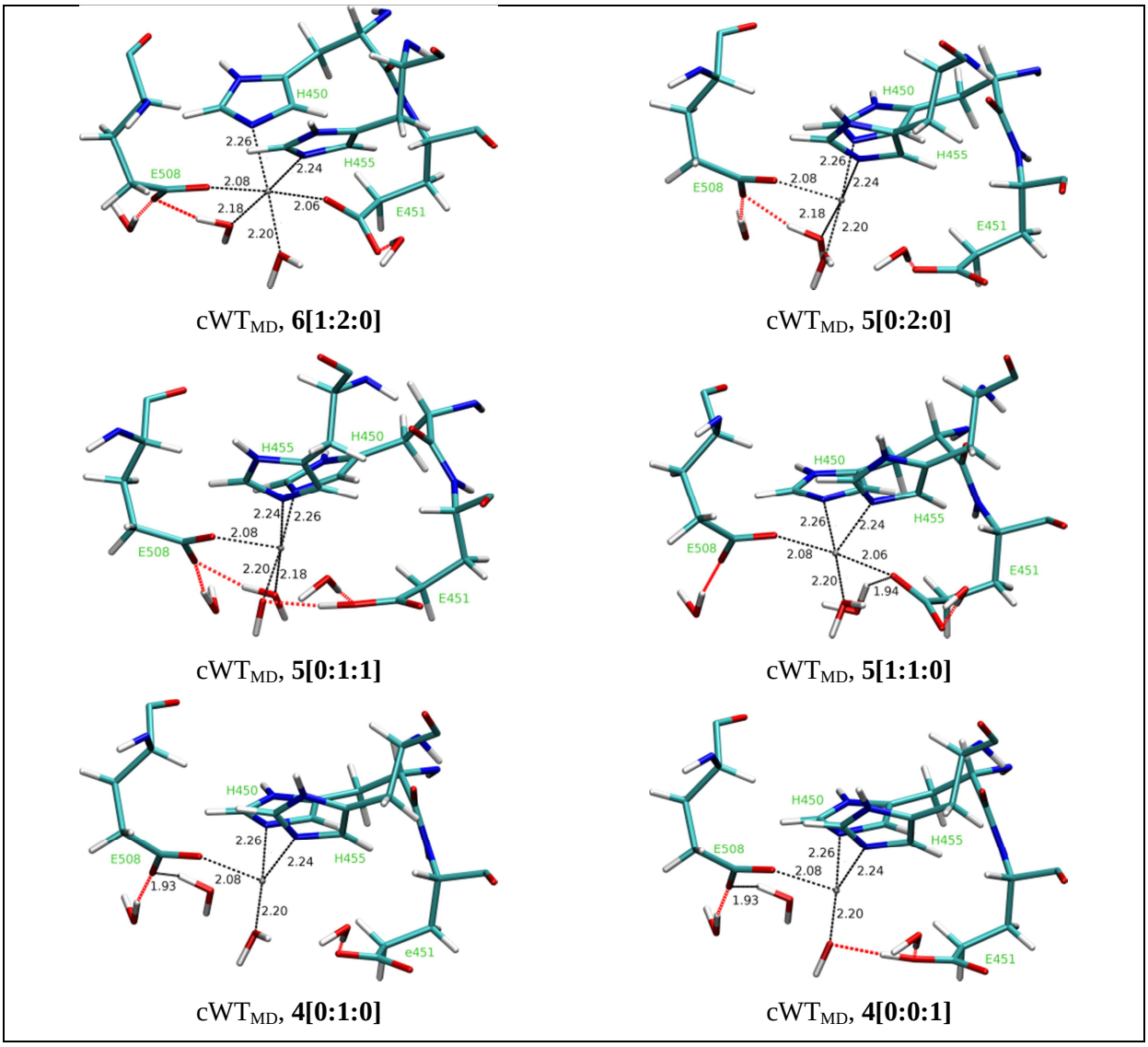
cWT, **5[0:1:1]**



cWT, **4[0:1:0]**



cWT, **4[0:0:1]**

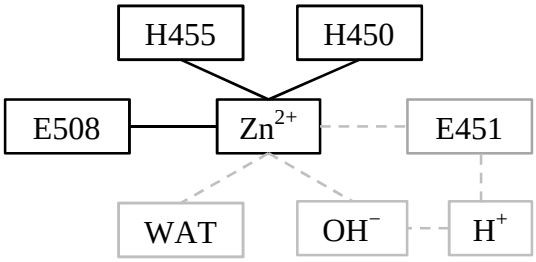


Slika 27. Koordinacija cinkova iona u početnim strukturama (enzim + 52 molekule vode) korištenim u ONIOM QM/MM računima. Identifikacijski kod sustava sastoji se od oznake forme proteina (oWT, cWT i cWT$_{MD}$), koordinacijskog broja metala (prvi podebljani broj) i tri broja u uglatoj zagradi koji pobliže označuju ligande cinka, E451, molekula(e) vode i OH^- ion (0 znači da ga ne koordiniraju, dok broj ≥ 1 ukazuje na broj odgovarajućih atoma kisika koji koordiniraju cink). Udaljenosti su navedene u Å. Vodikove veze, prikazane crtkanim crvenim linijama, određene su uz uvjet da je kut između atoma koji sudjeluju u vodikovoj vezi 180 ± 30˚, a udaljenost ≤3,0 Å.

Priprema i uravnoteženje sustava koji će se koristiti u MD simulacijama provedeno je na već opisan način (vidi poglavlje 3.1.2.).

Početne strukture u kojima je cink oktaedarski koordiniran dobivene su kao rezultat slobodnih (bez ograničenja na gibanje atoma) MD simulacija: 100 ns „otvorene“ i 0,1 ns

„otvorene“ i „zatvorene“ DPP III. Naime, nakon samo 100 ps MD simulacija „otvorene“ i „zatvorene“ DPP III cink je oktaedarski koordiniran s H450, E451, H455, E508 i dvije molekule vode. QM/MM računi provedeni su na djelomično otopljenom proteinu, tj. iz hidratiziranih struktura dobivenih MM ili MD računima zadržane su samo 52 molekule vode najbliže cinku (tj. molekule vode koje se nalaze unutar sfere radijusa 10 Å oko cinka u „otvorenoj“ strukturi DPP III). Iz tih struktura, sagrađene su strukture u kojima je koordinacijski broj cinka 4 ili 5 i to na način da je mijenjano ionizacijsko stanje molekule vode koja koordinira ion cinka i susjedne glutaminske kiseline E451 (slika 28).



Slika 28. Različite koordinacije cinkova iona razmatrane u QM/MM računima. Ligandi (aminokiseline) prikazani u crnim kvadratima koordiniraju cink u svim početnim strukturama, dok se ligandi u sivim kvadratima izmjenjuju u koordinaciji.

Sagrađeno je ukupno 18 struktura (slika 27), kojima odgovara 6 različitih koordinacijskih tipova metalnog iona u tri različite konformacije proteina, od kojih svaka sadrži 52 molekule vode. Strukture su nazvane prema konformaciji proteina (oWT, cWT i cWT_{MD}), koordinacijskom broju cinka i prisutnosti liganada E451, vode(a) ili OH^- iona.

QM/MM optimizacija geometrije navedenih DPP III struktura provedena je programom GAUSSIAN09[100] korištenjem dvoslojne ONIOM metodologije. U tu svrhu, slojevi sustava opisani su korištenjem pristupa različite složenosti. QM sloj, sastavljen od bočnih lanaca H450, E451, H455 i E508, cinkova iona i 4 molekule vode, opisan je DFT metodom (M06 i B3LYP funkcionalom) s dva osnovna skupa (6-31+g(d,p) za atome H, N, C i O i LanL2DZ ECP za atom cinka).[101] Dio tog sloja su i *link* atomi smješteni na mjestima gdje granica između QM i MM dijela siječe kovalentne veze (između Cα-Cβ atoma aminokiselina). MM dio (ostatak proteina i preostalih 48 molekula vode) opisan je parm96 AMBER poljem sila.[102] Za vrijeme MM optimizacije dopušteno je pomicanje samo 16 molekula vode najbližih

cinkovu ionu (koje odgovaraju molekulama vode koje su od Zn^{2+} iona smještenog u „otvorenoj“ DPP III udaljene manje od 7 Å). Ukupni naboj sustava bio je −24 *e*, dok je naboj QM dijela bio nula. Početna optimizacija geometrije provedena je korištenjem mehaničkog uklapanja (ME), pri čemu su interakcije između dva sloja opisna samo na MM nivou. Međutim, konačna optimizacija geometrije napravljena je korištenjem elektrostatskog uklapanja (EE).

3.7. Analize rezultata

3.7.1. RMSD, RMSF i R_g

Korijen iz srednjeg kvadrata odstupanja (eng. *root mean square deviation*, *RMSD*) je pokazatelj stabilnosti strukture proteina tijekom MD simulacije. *RMSD* vrijednost pokazuje koliko strukture (proteina ili nekog njegovog dijela) dobivene tijekom MD simulacija odstupaju od referentne (najčešće je to početna) strukture, a računa se prema formuli:

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i}^{N}(r_{A,i} - r_{B,i})^2}{N}} \tag{3.1}$$

gdje je N broj atoma, $r_{A,i}$ označava položaj i-tog atoma u strukturi A, a $r_{B,i}$ označava položaj i-tog atoma u strukturi B.

Korijen srednjeg kvadrata fluktuacija (eng. *root mean square fluctuation*, *RMSF*) je mjera devijacije položaja između i-te čestice i referentnog položaja $\tilde{x}_i$ u vremenu (T):

$$RMSF = \sqrt{\frac{\sum_{t_j}^{T}\left(x_i(t_j) - \tilde{x}_i\right)}{T}}. \tag{3.2}$$

Razlika između *RMSD* i *RMSF* je ta što se kod *RMSD* prosjek računa preko svih čestica, dajući vremenski ovisne vrijednosti, dok se kod *RMSF* računa vremenski prosjek za i-tu česticu. Temperaturni faktor tj. *B-faktor* koji opisuje pomake atoma od njihovog prosječnog položaja, računa se kao $(RMSF)^2 \times (8/3)\pi^2$. Što je atom fleksibilniji imati će veći pomak od srednjeg položaja.

Najčešće korištena mjera promjene globularnosti proteina je radijus giracije (R_g). Računa se kao korijen iz srednjeg kvadrata udaljenosti atoma od centra mase molekule prema formuli:

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum (R_i - R_{CM})^2}{N}} \tag{3.3}$$

gdje je R_i označava položaj i-tog atoma, R_{CM} označava položaj centra mase, a N je broj atoma. U MD simulacijama ta se veličina koristi za opis kompaktnosti molekule.

3.7.2. Analiza glavnih komponenata (eng. principal component analysis, PCA)

Trajektorije dobivene MD simulacijama koje odgovaraju vremenima od par do nekoliko desetaka nanosekundi sadrže ogromnu količinu podataka, budući da predstavljaju vremensku evoluciju koordinata (uz vremenski korak obično od 1 fs) svih atoma od kojih se sastoji proučavani sustava. Navedena gibanja u velikoj su mjeri korelirana gibanja. Kako bi reducirali složenost prikupljenih podataka i izdvojili međusobno nekorelirana, nisko frekventna, gibanja proteina (npr. gibanje proteinskih domena), korištena je analiza glavnih komponenata. To je tehnika kojoj je cilj reducirati veliki skup podataka na način da se skup koreliranih varijabli svede na manji broj nekoleriranih koje uspješno opisuju glavne karakteristike sustava. Nekorelirane varijable nazivamo glavnim komponentama (eng. *principal components*).

Za sustav od N-atoma, ulazni skup podataka za PCA analizu predstavljati će matrica kartezijevih koordinata sagrađena iz trajektorije. Stupci se odnose na atome, a retci na vremenski korak, dakle svaki redak predstavlja jednu reprezentaciju sustava, a svaki stupac sadrži kartezijeve koordinate za određeni atom u različitim vremenima $\mathbf{x}(t)$. Koordinate $\mathbf{x}$ su obilježene kao funkcije vremena zbog jasnoće, ali mogu biti elementi bilo kojeg skupa koordinata, npr. trajektorija dobivena MD simulacijom ili skup eksperimentalnih, rentgenskom difrakcijom određenih struktura. Iz dobivene matrice, $\mathbf{X}$, sagradi se matrica kovarijance, $\mathbf{C}$, čiji su elementi:[103]

$$\mathbf{C} = \left\langle \left(\mathbf{x}(t) - \langle \mathbf{x} \rangle\right)\left(\mathbf{x}(t) - \langle \mathbf{x} \rangle\right)^{\mathrm{T}} \right\rangle \tag{3.4}$$

gdje $\langle \cdots \rangle$ označava prosjek preko svih vremenskih koraka trajektorije (tj. preko svih konfiguracija M). Slijedeći korak je diagonalizacija simetrične $3N \times 3N$ matrice kovarijance (N je broj atoma u sustavu), a postiže se ortogonalnom transformacijom koordinata:

$$\mathbf{C} = \mathbf{T}\mathbf{\Lambda}\mathbf{T}^{\mathrm{T}} \tag{3.5}$$

gdje je **T** stupčana matrica vlastitih vektora, a **Λ** dijagonalna matrica koja sadrži odgovarajuće vlastite vrijednosti. Ovaj postupak transformira originalnu matricu dobivenu iz trajektorije u novi ortonormirani osnovni skup sastavljen od vlastitih vektora (tzv. glavnih komponenata). Vlastite vrijednosti ukazuju na srednji kvadrat pomaka (fluktuacije) atoma duž odgovarajućeg vlastitog vektora, tj. sadrže udio svake glavne komponente u ukupnoj fluktuaciji sustava. Vlastiti vektori su obično sortirani na način da su pripadne vlastite vrijednosti poredane u padajućem nizu, tj. $\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \ldots \geq \lambda_{3N}$. Ako je matrica **C** sagrađena korištenjem najmanje $3N$ konfiguracija ($M > 3N$), tada će se njenom dijagonalizacijom dobiti $3N-6$ vlastitih vektora kojima će vlastite vrijednosti biti različite od nule. Šest vlastitih vrijednosti koje su jednake nuli odgovarati će vlastitim vektorima koji opisuju translaciju i rotaciju centra mase molekule (to se obično uklanja superponiranjem trajektorije na neku referentnu strukturu). Ako je broj dostupih konfiguracija $M < 3N$, tada će se dobiti najviše $M-1$ vlastitih vektora s vlastitim vrijednostima različitima od nule.

Ako je μ_{i} *i*-ti vlastiti vektor od **C** (tj. *i*-ti stupac od **T**), tada njegov skalarni produkt sa skupom položaja pojedinog atoma (npr. elementima trajektorije) određuje udio „gibanja“ (prostorne raspodjele) tog atoma u vektoru, p_{i}:

$$p_{\mathrm{i}}(t) = \mu_{\mathrm{i}} \cdot \left(\mathbf{x}(t) - \langle \mathbf{x} \rangle\right), \tag{3.6}$$

pri čemu je varijanca $\left\langle p_{\mathrm{i}}^2 \right\rangle$ jednaka vlastitoj vrijednosti λ_{i}.

PCA analiza korištena je za redukciju podataka dobivenih MD simulacijama slobodne DPP III i njezinih kompleksa sa supstratima. Diagonalizirana je matrica kovarijance $3N \times 3N$ (gdje je N broj C, Cα, N i O atoma iz glavne okosnice proteina) generirana iz: a) trajektorije dobivene MD simulacijom oWT forme proteina (točnije rečeno prvih 100 ns oWT-1 MD simulacije) i b) struktura ljudske DPP III određenih difrakcijom X-zraka („otvorena“, 3FVY, i „zatvorena“, 3T6B) i zatvorene strukture dobivene dugim (207 ns) MD simulacijama ($\mathrm{cWT_{MD}}$). Diagonalizacija je provedena korištenjem modula *ptraj* iz AMBER programskog paketa, odnosno*g_covar* i *g_anaeig* iz programskog paketa GROMACS. Na taj su način određeni vlastiti vektori i vlastite vrijednosti konformacijskog prostora DPP III. Prije same diagonalizacije, sve struktute su sravnjene s prvom strukturom kako bi se uklonila translacija i rotacija geometrijskog centra. Doprinos svake pojedine vibracije određenom modu (vlastitom

vektoru) gibanja određen je projeciranjem MD trajektorije na određeni vektor, i uzimanjem prosjeka u vremenu.

3.7.3. Klasterska analiza

Klasterska analiza je multivarijantna tehnika čiji je primarni cilj klasificiranje ili klasteriranje objekata (opažanja) u skupine, grupe ili klastere na način da je: a) svaka grupa (ili klaster) homogna (kompaktna) obzirom na određene varijable (svojstva), tj. da su svi objekti u jednoj grupi slični jedni drugima, i b) svaka grupa je različita od druge s obzirom na varijable (svojstva) prema kojima se provodi klasteriranje.

U kontekstu ove doktorske disertacija klasterska analiza korištena je kao dodatni kriterij za praćenje konformacijske promjene enzima (tj. „zatvaranje“ enzima). Na taj način identificirane su najvažnije forme enzima uzorkovane za vrijeme simulacija. Klasteriranje je provedeno pomoću programa *ptraj* (koji je dio programskog paketa AMBER) korištenjem hijerarhijske metode prosječne vezanosti (eng. *averagelinkage* algoritam) koja se bazira na prosječnoj udaljenost između svih mogućih parova objekata u dva klastera. Mjerilo sličnosti tj. kriterij po kojem je vršeno klasteriranje je bio korijen iz srednjeg kvadrata odstupanja (*RMSD*) Cα atoma konformacija uzorkovanih za vrijeme MD simulacija u kojima se svaki atom tretira eksplicitno. Klasterska analiza je završena kada je dosegnut unaprijed definiran broj klastera. Prosječna vrijednost (struktura) unutar klastera zove se centroid i korištena je kao reprezentativna konformacija klastera.

3.7.4. Vizualizacija rezultata

Za vizualizaciju struktura dobivenih MD simulacijama, QM i QM/MM računima, kao i trajektorija generiranih MD simulacijama, korišteni su programi *Visual Molecular Dynamics* (VMD)[98] i PyMol.[31]

Program VMD korišten je i za analizu udaljenosti, kuteva, torzijskih kuteva, vodikovih veza (*Hydrogen Bonds* program), *RMSD* superponiranje struktura i trajektorija (moduli *RMSD Calculator* i *RMSD Trajectory Tool*), kao i za izgradnju početnih struktura liganada (modul *Molefacture*).

APBS modul koji se nalazi unutar programa PyMol omogućio je izračun mape elektrostatskog potencijala na površini enzima koje su zatim vizalizirane unutar navedenog programa.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Struktura i dinamika DPP III i njenih kompleksa

4.1.1. Struktura i dinamika slobodnog enzima

Na početka izrade ove doktorske disertacije uvid u trodimenzionalnu strukturu enzima iz obitelji M49 pružale su difrakcijom X-zraka određene strukture ljudske i kvaščeve DPP III pohranjene u proteinskoj bazi podataka pod ulaznim oznakama (kodovima) 3FVY i 3CSK. Iako je sličnost aminokiselinskih sekvencija tih dvaju proteina svega oko 35 %, trodimenzionalne strukture su im vrlo slične (*RMSD* = 2,17 Å, izračunato za 676 aminokiselina). Usprkos velikoj sličnosti njihovih tercijarnih struktura (dvije domene između kojih se nalazi velika pukotina) i očuvanosti aktivnog mjesta (koje je smješteno između dviju domena, te sadrži Zn^{2+} koji koordiniraju isti ligandi), kvaščeva DPP III je katalitički manje efikasna od ljudskog ortologa.[104]

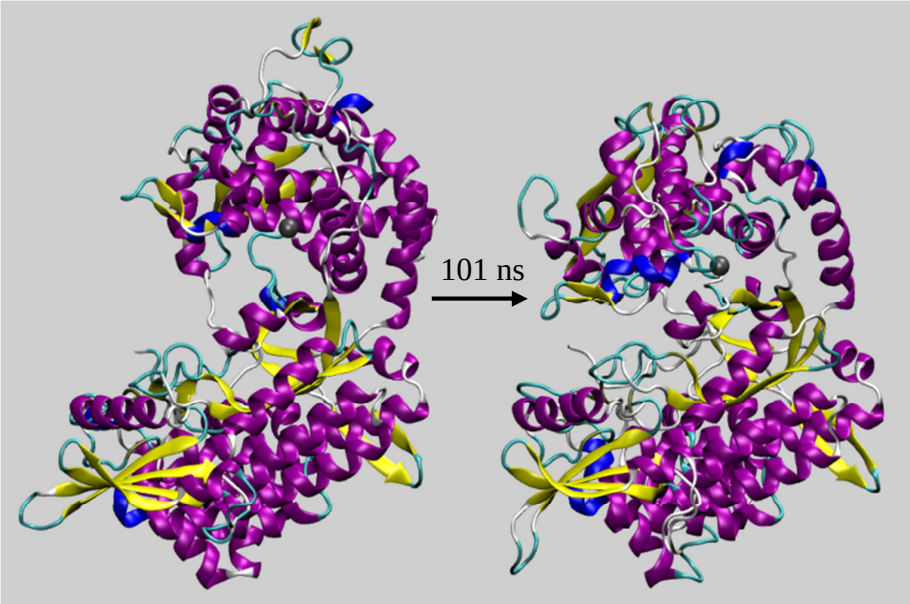
Jedan od preduvjeta za razumijevanje široke supstratne specifičnost i katalitičke efikasnosti ljudske DPP III, je detaljno poznavanje njezine strukture i dinamike.

Prisustvo široke pukotine između dviju domena (otprilike širine 40 Å i visine 25 Å), kao i rezultati bioinformatičke analize koji su pokazali da se očuvane regije unutar obitelji DPP III nalaze u obje domene, ukazuju da bi ovaj enzim mogao biti podložan značajnim dinamičkim promjenama i unutarnjim gibanjima.

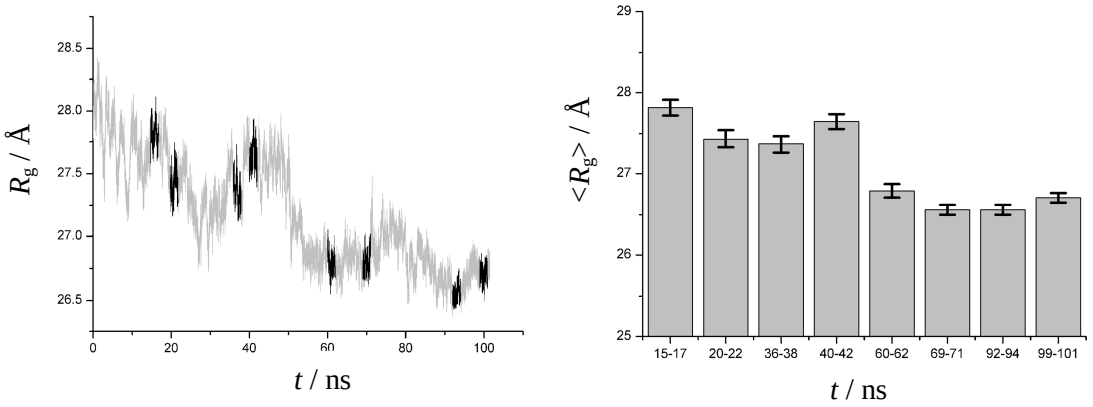
Postoje mnogobrojni primjeri koji upućuju na direktnu korelaciju između unutarnjeg gibanja proteina i njegove aktivnosti, kao što je povezanost katalitičke aktivnosti enzima s gibanjem petlji koje „otvaraju“ i „zatvaraju“ aktivno mjesto i po mogućnosti pozicioniraju ključne aminokiseline kako bi ostvarile kontakt s vezanim ligandom.[105–107] Od nedavno postoje mnogi primjeri koji ukazuju na postojanje konformacijskih izmjena u enzimima za koje nisu vezani ligandi. Tzv. model ravnotežne raspodjele konformera (eng. *pre-existing equilibrium*) pretpostavlja ansambl konformacija nekog proteina s mogućnošću relativno lakog prelaska iz jedne u drugu. Selektivno vezanje liganda za jednu od njih dovodi do pomicanja ravnotežne raspodjele prema novoj u kojoj ta (aktivna) konformacija prevladava. Ovaj koncept se razlikuje od modela inducirane prilagodbe (eng. *induced fit*), gdje supstrat inducira specifičnu promjenu tercijarne strukture proteina (tj. aktivnog mjesta) na način da

aminokiseline koje sudjeluju u reakciju, a nalaze se u veznom mjestu enzima, ostvaruju odgovarajuće interakcije sa supstratom.

U svrhu razumijevanja široke supstratne specifičnosti i katalitičke efikasnosti ljudske DPP III najprije su provedene duge MD simulacije slobodnog enzima otopljenog u eksplicitnom otapalu. Tijekom 101 ns produktivne MD faze, provedene pomoću programa AMBER10, došlo je do značajne promjene tercijarne strukture proteina kao rezultat približavanja proteinskih domena (slika 29). Navedena konformacijska promjene enzima popraćena je povećanjem globularnosti proteina (tj. smanjenjem radijusa giracije, slika 30).

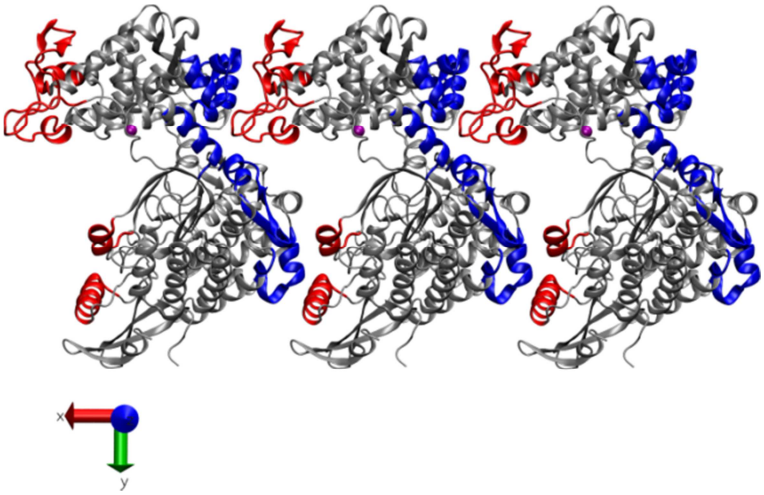


Slika 29. Početna (difrakcijom X-zraka određena) struktura ljudske DPP III (lijevo) i konformacija dobivena nakon 101 ns MD simulacije u eksplicitnom otapalu (desno). Fiksiran je položaj „donje“ domene. Siva kuglica predstavlja ion cinka.

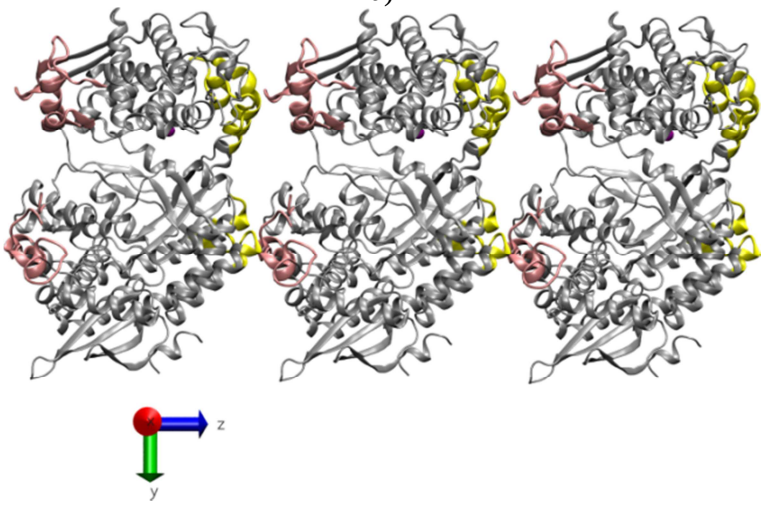


Slika 30. Promjene radijusa giracije DPP III tijekom MD simulacije. Lijevo, osam različitih klastera struktura proteina (naznačeni crnom bojom) preuzetih iz MD simulacije DPP III. Odabir je napravljen na temelju vrijednosti radijusa giracije (R_g). Desno, prosječne vrijednosti i standardne devijacije radijusa giracije za svaki klaster struktura.

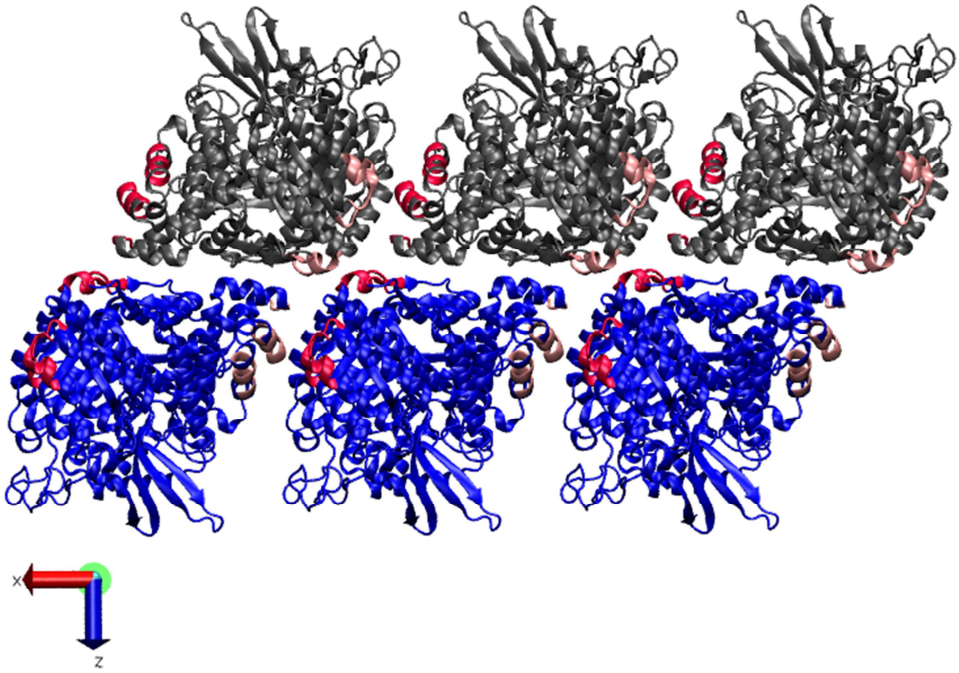
Do slične promjene tercijarne strukture proteina došlo je i tijekom 50 ns duge MD simulacije enzima provedene pomoću programa GROMACS (vidi sliku D1a). Dakle, pretpostavlja se da je „otvorena“ forma proteina prisutna u slučaju DPP III za koju nije vezan ligand rezultat kristalnog pakiranja molekule proteina (slika 31a i b) budući takva, izdužena, struktura omogućuje veću dodirnu površinu molekula u kristalu, te time i jače međudjelovanje. Važno je uočiti da u kristalu „otvorene“ forme DPP III (pdb kod 3FVY) u interakcijama između proteina sudjeluju obje proteinske domene, dok u kristalu „zatvorene“ forme DPP III (pdb kod 3T6B) samo aminokiselinske regije iz „donje“ domene enzima.



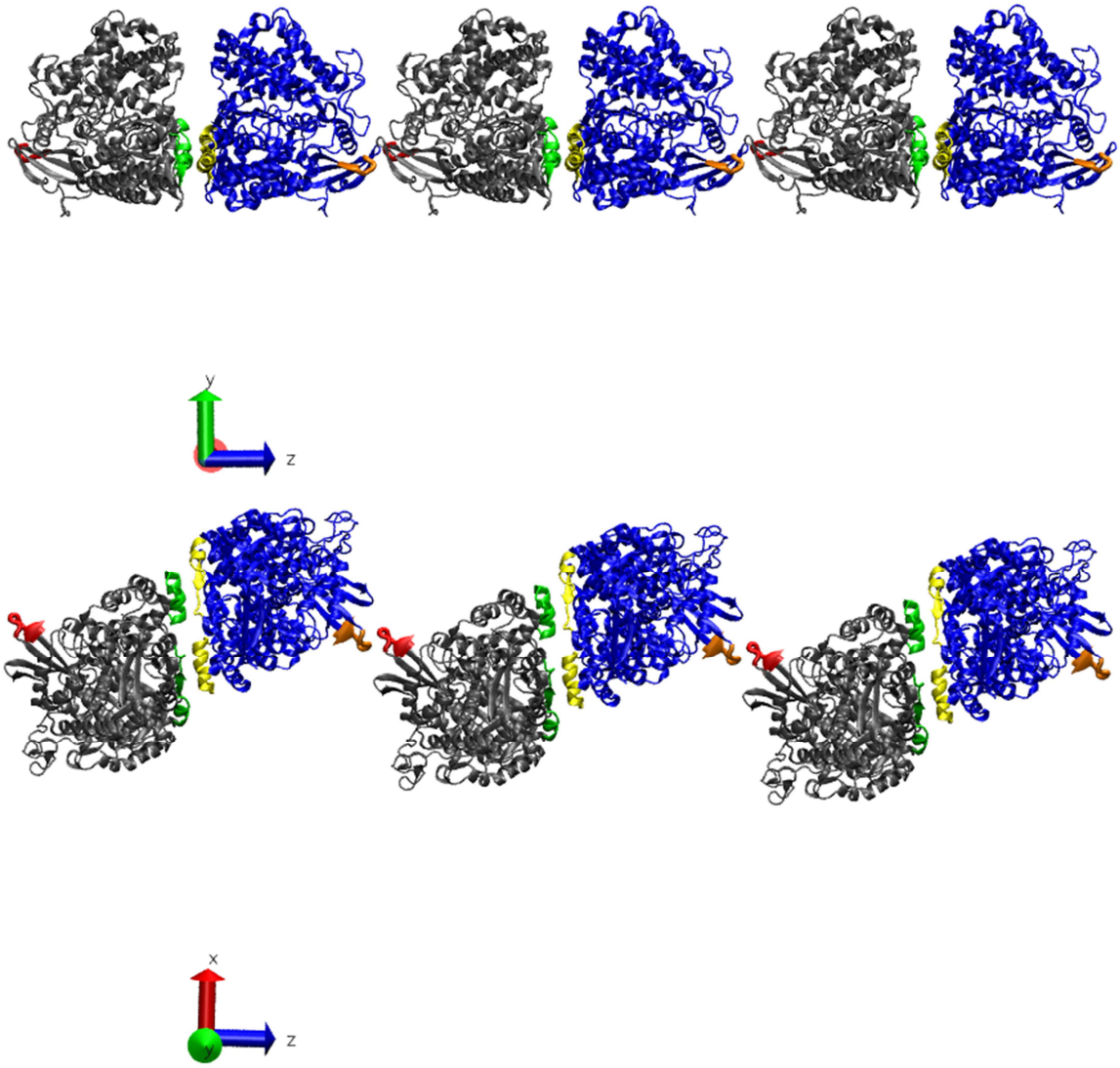
a)



b)



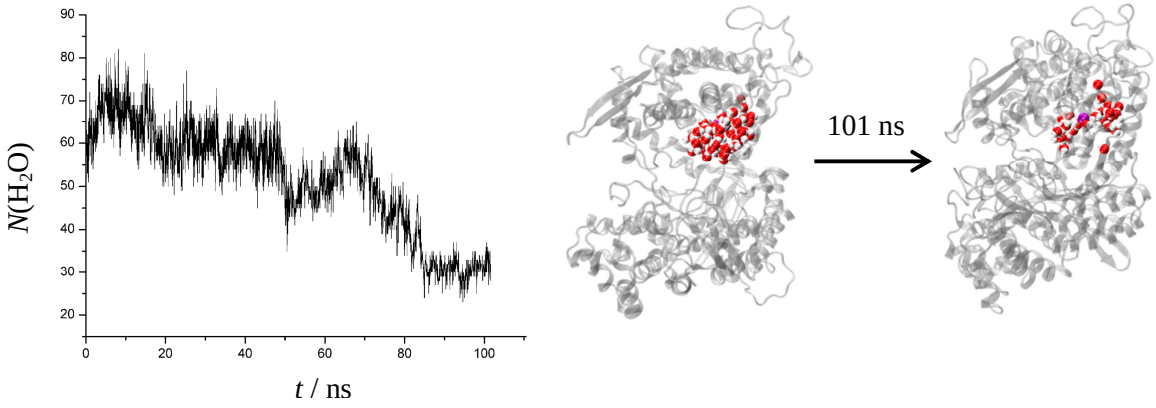
c)



d)

Slika 31. Slaganje proteina ljudske DPP III u kristalu. Periodičnost DPP III pohranjene pod kodom 3FVY u: a) x (aminokiselinski ostaci 177-191, 394-403, 460-501 i 633-643 su obojeni crveno, a aminokiselinski ostaci 18-26, 68-70, 130-141, 336-347, 428-443, 522-539, 676-691 i 706-709 plavo) i b) z (aminokiselinski ostaci 27-30, 267-273, 341-353, 365-370, 521-531 i 679-684 su obojeni žuto, a aminokiselinski ostaci 5-7, 117-123, 149-167, 558-564, 591-601 i 646-665 ružičasto) smjeru. Periodičnost DPP III pohranjene pod kodom 3T6B (u jediničnoj ćeliji nalaze se dvije molekule proteina naznačene plavom i sivom bojom) u: c) x (aminokiselinski ostaci 86-88, 123-131, 143-149 su obojeni svijetlo ružičasto, a aminokiselinski ostaci 23-31, 273-280, 305-311 i 686-688 tamno ružičasto) i d) z (aminokiselinski ostaci 21-29, 74-90 i 688-695 obojeni su zeleno i žuto, a 207-212 narančasto i crveno; prikazane su dvije različite orijentacije molekula) smjeru.

Približavanjem domena aktivno mjesto postaje sve „zatvorenije“ (uvučenije), pa se tijekom 101 ns MD simulacije broj molekula vode koje se nalaze u sferi radijusa 10 Å od cinka smanji na polovicu (slika 32).

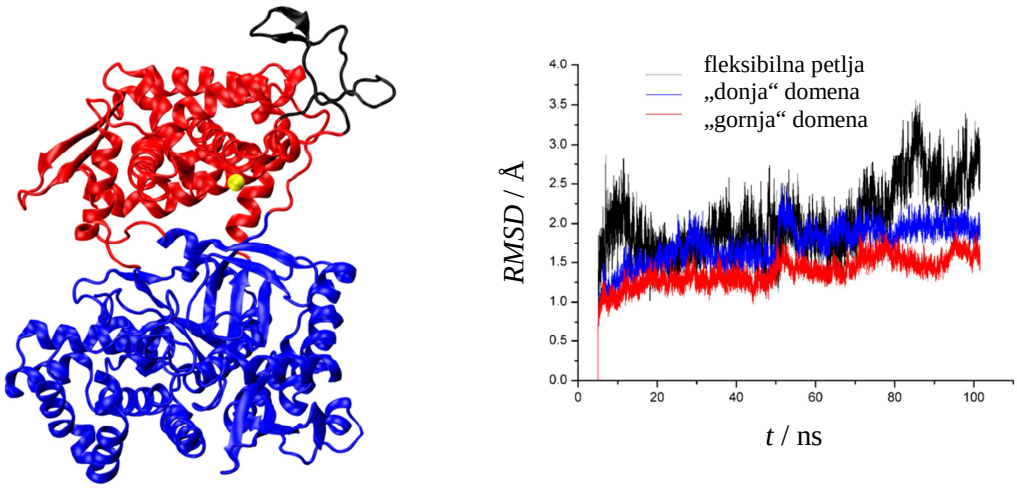


Slika 32. Broj (lijevo) i položaj (desno) molekula vode, $N(H_2O)$, unutar sfere radijusa 10 Å od cinka tijekom 101 ns MD simulacije, odnosno na početku i nakon 101 ns MD simulacije DPP III. Atom cinka (obojan ružičasto) i molekule vode (obojane crveno i bijelo) prikazani su kuglicama.

Sekundarna struktura proteina (tablica 4), kao i trodimenzionalna struktura pojedinih domena („gornje“ i „donje“, slika 33), ostaju očuvani uslijed konformacijske promjene enzima. *RMSD* profil izračunat za atome koji čine okosnicu proteina (slika 33) upućuje na stabilizaciju pojedinih domena već na početku simulacije. Regija sastavljena od 34 aminokiselinska ostatka iz „gornje“ domene proteina (obojana crno na slici 33, a crveno na slici 31a) podložna je najvećim promjenama tijekom simulacija.

Tablica 4. Elementi sekundarne strukture izračunati pomoću programa DSSP i STRIDE korištenjem servera „2Struc: the secondary structure server" (http://2struc.cryst.bbk.ac.uk/).[108]

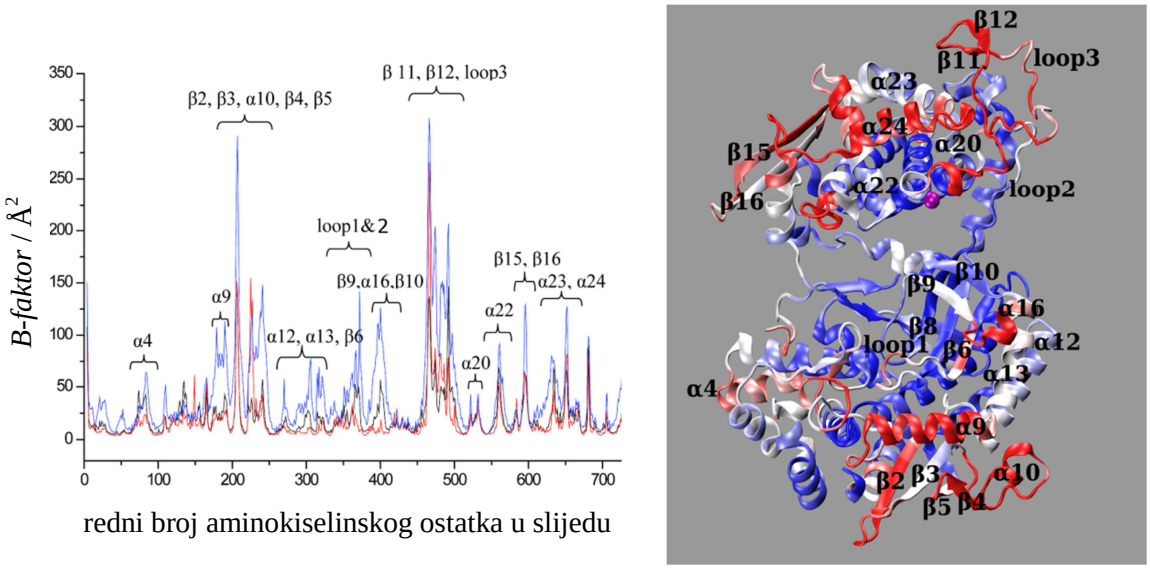
struktura	DSSP			STRIDE		
	zavojnice / %	ploče / %	ostalo / %	zavojnice / %	ploče / %	ostalo / %
3FVY	49,6	13,2	37,2	51,9	14,4	33,7
nakon 101 ns MD simula□ije „otvorene“ DPP III	45,2	12,6	42,2	48,3	13,1	38,6



Slika 33. Dijelovi DPP III (prikazani na eksperimentalno određenoj strukturi enzima, 3FVY), lijevo, i sukladno tome obojani pripadajući *RMSD* profili, desno. „Donja“ domena (aminokiseline 4-335, 374-416 i 670-726) je obojana plavo, većina „gornje“ domene (aminokiseline 336-373, 417-458 i 493-669) crveno, i „fleksibilna“ petlja iz „gornje“ domene (aminokiseline 459-492) crno. Struktura DPP III dobivena nakon 5 ns MD simulacije korištena je kao referentna struktura tijekom *RMSD* analize. Cink je prikazan žutom kuglicom.

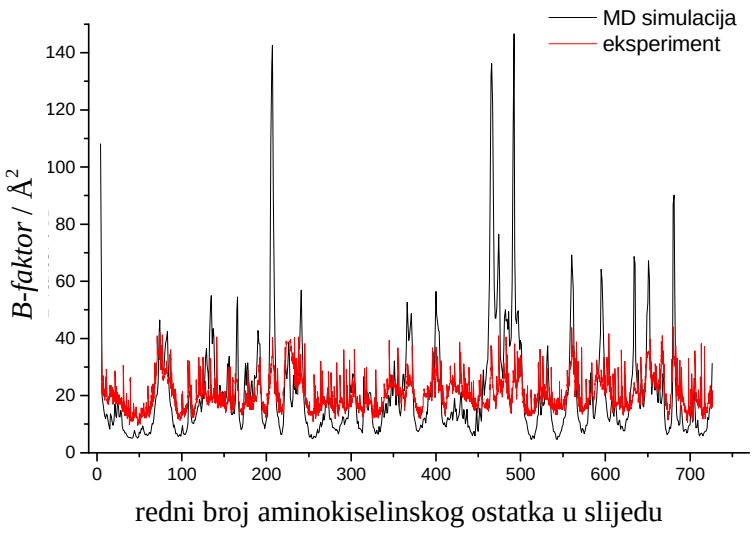
Izračunati *B-faktori* za pojedine aminokiseline (slika 34 lijevo) ukazuju na povećanu pokretljivost aminokiselinskih ostataka koji se nalaze na rubovima pukotine između domena (dijelovi enzima obojeni crveno na slici 34 desno), za razliku od onih koji oblažu pukotinu. U samoj pukotini opažena je povećana fleksibilnost regija: Phe368-Asp372, Ala414-Thr419 i Glu667-Leu671. Pri tome treba primijetiti da niz aminokiselinskih ostataka Ala414-Thr419 nedostaje u kristalografski određenoj strukturi kompleksa DPP III-tinorfin (PDB kod 3T6J). Važno je uočiti i pomak Tyr318 (koji je dio petlje 1, tj. *loop*1, slika 34). Mutacija Tyr318 u Phe rezultira značajnim (za dva reda veličine) smanjenjem katalitičke efikasnosti hidrolize Arg-Arg-2-naftilamida.[12] Tijekom MD simulacije, udaljenost između Cα atoma Tyr318 i cinka smanjila se s 26 Å na 16 Å. Pomicanjem prema „gornjoj“ domeni proteina Tyr318 uspostavlja direktne interakcije s aminokiselina iz te domene: vodikove veze s Arg565, a potom CH-π interakciju (nekovalentna interakcija između CH skupine i sustava π elektrona) s Phe556. Uslijed „zatvaranje“ enzima nastaje niz vodikovih veza između aminokiselina iz „gornje“ i „donje“ domene, kao što su Ser504-Asp396, Ser500-Gln400, Gln566-Glu316 i Arg565-Pro321 veze (prva aminokiselina u paru pripada „gornjoj“, a druga „donjoj“ domeni).

Kako bi se ispitao utjecaj konformacijske promjene enzima na lokalnu fleksibilnost proteina, izračunati su *B-faktori* i za tri odvojena, po 2 ns duga, intervala iz 101 ns duge MD trajektorije. Prijelaz iz „otvorene“ u „zatvorenu“ konformaciju proteina, popraćen je značajnim smanjenjem pokretljivost najfleksibilnijih dijelova proteina (slika 34 lijevo).



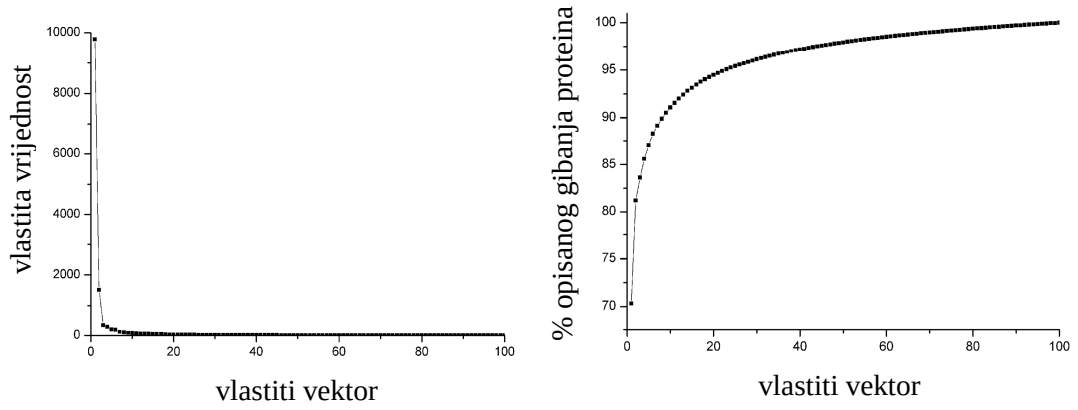
Slika 34. Lijevo, *B-faktori* pojedinih aminokiselina (u obzir su uzeti atomi iz okosnice proteina) izračunati za tri različita perioda iz 101 ns duge MD simulacije: od 1. do 3. ns (plavo), od 15. do 17. ns (crno) i od 92. do 94. ns (crveno). Desno, struktura DPP III obojana prema *B-faktorima* izračunatim tijekom cijele MD trajektorije. Aminokiseline (X) čiji se *B-faktor* razlikuju za jednu standardnu devijaciju (SD) od srednje vrijednosti *B-faktora* svih aminokiselina (<*B-faktor*>) obojeni su crveno ($<B\text{-}faktor> + \mathrm{SD}$) i plavo ($<B\text{-}faktor> - \mathrm{SD}$), dok su one unutar ±SD ($(<B\text{-}faktor> - \mathrm{SD}) \leq (B\text{-}faktor)_X \leq (<B\text{-}faktor> + \mathrm{SD})$) obojene bijelo. Oznake sekundarnih struktura određene su programom DSSP (dio WHATIF servera, http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html/index.html), osim oznaka za petlje (eng. *loop*). Cink je prikazan ružičastom kuglicom.

Važno je naglasiti da su izračunati *B-faktori* u dobrom slaganju s eksperimentalno određenima (za strukturu 3FVY, slika 35). Najveća razlika je za nestrukturirane dijelove (petlje) koji su i najpokretljiviji. Za očekivati je da će te regije (npr. od 204. do 209. aminokiseline) biti puno fleksibilnije u otopini nego u kristalu. Uistinu, neki od tih dijelova, kao npr. regija od 207 do 212 i od 460. do 501. aminokiseline, u kristalu se nalaze u bliskom kontaktu sa simetrijski povezanom molekulom (slika 31a i d).

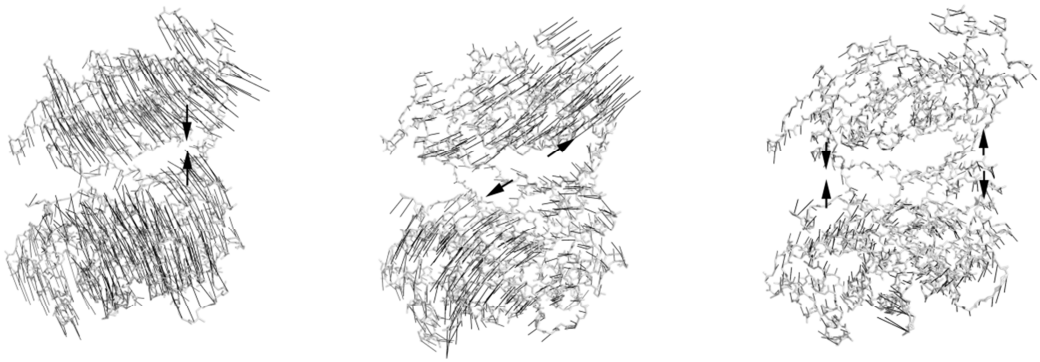


Slika 35. Usporedba *B-faktora* određenih eksperimentom (PDB kod 3FVY, crvena krivulja) i MD simulacijama (za period od 15. do 17. ns simulacije, crna krivulja) ljudske DPP III.

Analiza glavnih komponenti MD trajektorije pokazala je da dvije glavne komponente (slika 36a), kojima pripada najveća varijanca, opisuju 81 % ukupnog gibanja proteina tijekom 101 ns, dok tri glavne komponente opisuju 85 % gibanja. Gibanje s najvećom amplitudom, opisano s prva tri glavna vektora, odgovara pomicanju domena (slika 36b). Prvi vlastiti vektor (slika 36b, lijevo), opisuje „zatvaranje“ proteina, drugi (slika 36b, sredina) smicanje (paralelno pomicanje u suprotnom smjeru) „gornje“ domene u odnosu na „donju“, a treći (slika 36b, desno) simultano približavanje i udaljavanje suprotnih krajeva domena koji omeđuju pukotinu. Glavne interakcije koje upravljaju ovim gibanjima domena su interakcije koje prerastaju u vodikove veze između Asp372-Lys405 i Tyr318-Arg565, te CH-π interakcija između Tyr318 i Phe556. Zanimljivo je da su Tyr318 i Lys405 100 % očuvani unutar obitelji M49.



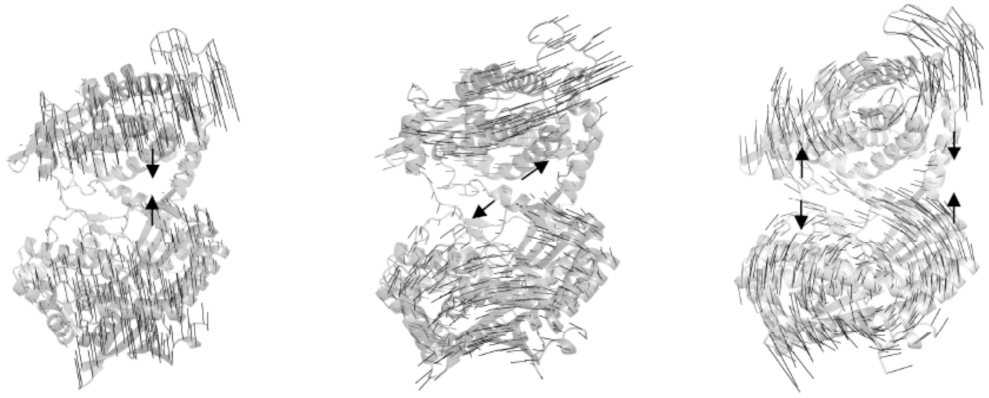
a)



b)

Slika 36. Analiza glavnih komponenata (PCA) 101 ns duge MD trajektorije DPP III: a) vlastite vrijednosti (lijevo) i postotak opisanog ukupnog gibanja proteina (desno) u ovisnosti o broju vlastitih vektora. Usklađenom gibanju opisanom s dva glavna vektora odgovara 81 % ukupnog gibanja proteina, a tri glavne komponente (vlastite vrijednosti opadaju s lijeva na desno) dobivene PCA analizom opisuju 85% (b). Smjer i duljina crne linije dodijeljene svakom Cα atomu ukazuju na smjer vlastitog vektora, odnosno veličinu vlastite vrijednosti, dok crne strelice upućuju na smjer usklađenog gibanja proteina.

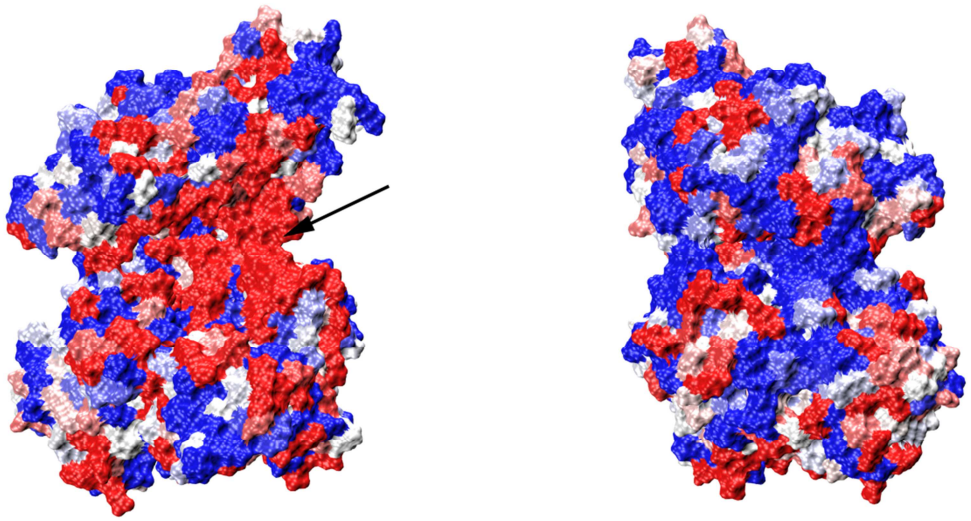
Pomoću servera Delarue grupe (http://lorentz.dynstr.pasteur.fr/) napravljena je i analiza normalnih modova na strukturi „otvorene“ forme enzima. Uočeno je da su prva tri načina gibanja proteina (s najnižom frekvencijom, odnosno najvećom amplitudom gibanja) određena PCA analizom MD trajektorije jednaka onima dobivenim analizom normalih modova (slike 37 i 36b).



Slika 37. Tri načina gibanja proteinskih domena određena analizom normalih modova pomoću servera Delarue grupe (http://lorentz.dynstr.pasteur.fr/). Normalni modovi 7, 8, i 9 (kojima odgovara najniža frekvencija) prikazani su s lijeva na desno. Prvih šest normalnih modova opisuje translaciju i rotaciju centra mase enzima. Crne strelice opisuju smjer usklađenog gibanja dijelova proteina.

Nastanak vodikovih veza između Asn406 i Asp372 i Glu451, na samom početku MD simulacije (odmah poslije faze uravnoteženja sustava), potpomaže konformacijsku promjenu enzima. Te vodikove veze omogućile su pomicanje Asp372 u smjeru „donje“ domene proteina, te nastajanje vodikove veze između Asp372 i Lys405, a povremeno i između Asp372 i Lys304. U isto vrijeme nastaju i vodikove veze između Lys405 i Thr374, te Glu508 i Asn391, kao i vodikove veze i CH-π interakcije između aminokiselina koje se nalaze malo dalje od aktivnog mjesta enzima, kao npr. između Tyr318 i Arg565 i Phe556, što rezultira „zatvaranjem“ proteina. Uslijed toga, zavojnice α13 (kojoj pripada 100% očuvani Trp300) i α16 iz „donje“ domene proteina približavaju se „gornjoj“ domeni, dok se β-ploča iz „donje“ domene proteina, koja se sastoji od 5 β-vrpci (β6, β7, β8, β9 i β10), pomiče prema unutrašnjosti pukotine.

Zbog „zatvaranja“ proteina vezno mjesto enzima i pukotina između domena sve su manje izložene okolnom otapalu, dok se u isto vrijeme površina dostupna otapalu na stražnjoj, konveksnoj strani proteina, povećava (slika 38).



Slika 38. Struktura „otvorene“ forme DPP III obojana prema promjeni površine dostupne otapalu (*SASA*) izračunate za pojedine aminokiseline (x), $\Delta SASA_x = SASA_x(0ns) - SASA_x(101ns)$, u strukturi s početka (0 ns) i s kraja (101 ns) MD simulacije. Prikazane su prednja (lijevo) i stražnja (desno, dobivene rotacijom za 180°) strana proteina. Aminokiseline koje su na kraju MD simulacije izloženije otapalu obojene su plavo ($\Delta SASA_x \leq 0$ Å^2), a one koje su manje izložene crveno ($\Delta SASA_x \geq 0$ Å^2). Položaj pukotine između domena naznačen je crnom strelicom.

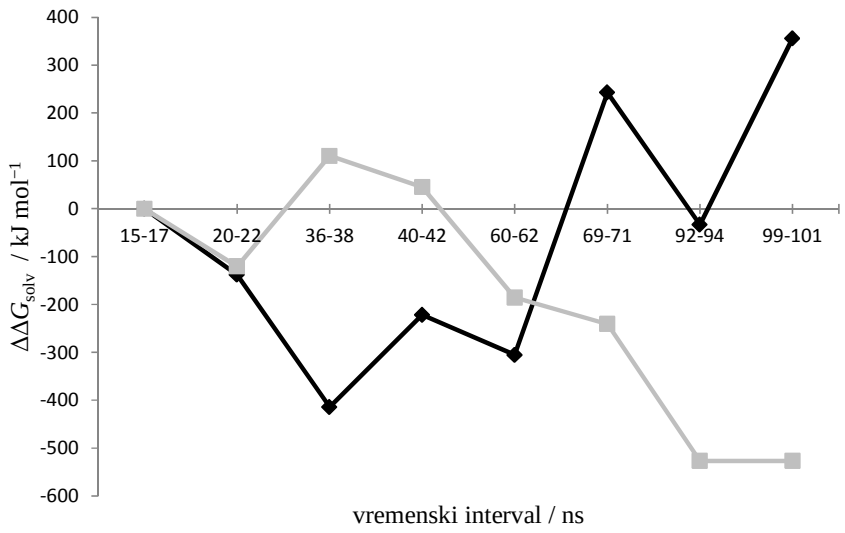
Tijekom simulacije, ion cinka bio je koordiniran s His450, Glu451, His455, Glu508 i dvije molekule vode.

MM-PBSA računom određena je promjene slobodne energije DPP III uslijed konformacijske promjene enzima. U tu svrhu, iz MD trajektorije, odabrano je osam klastera struktura proteina sa sličnim radijusom giracije (slika 30). Računi su pokazali da tijekom MD simulacije ne dolazi do značajne promjene energije intramolekulskih interakcija (elektrostatskih i van der Waalsovih) i nepolarnog doprinosa slobodnoj energiji solvatacije, pri čemu elektrostatski doprinos slobodnoj energiji solvatacije blago raste uslijed „zatvaranja“ proteina (tablica 5). To bi moglo sugerirati da će u otopini biti preferirana „otvorena“ konformacija proteina. Međutim, entropijski efekt zbog oslobađanja molekula vode s površine proteina u otapalo kompenzira porast entalpije. Naime, broj molekula vode koje se nalaze u prvoj i drugoj solvatacijskoj sferi proteina smanji se za više od 100 (tablica 5) tijekom „zatvaranja“. To je većinom posljedica izbacivanja molekula vode iz pukotine između domena (slika 32). Molekule vode koje se nalaze daleko od površine proteina (tj. koje ne pripadaju prvoj i drugoj solvatacijskoj sferi proteina) imaju veću entropiju, nego strukturirane

molekule vode koje se nalaze uz površinu proteina. Prema literaturnim podatcima promjena energije uslijed oslobađanja strukturirane molekule vode u okolno otapalo (eng. *bulk*), iznosi od −5,02 do −9,62 kJ/mol[109,110]. To znači da energija koja se oslobodi otpuštanjem molekula vode iz prve i duge solvatacijske sfere proteina uslijed prelaska DPP III iz „otvorene“ u „zatvorenu“ formu, poprima vrijednosti u rasponu od 631,78 do 1213,36 kJ/mol. Dakle, ako se u obzir uzmu entalpijski i navedeni entropijski doprinosi slobodnoj energiji sustava, može se pretpostaviti da će u otopini biti prisutne obje forme enzima, „otvorena“ i „zatvorena“ (slika 39).

Tablica 5. Elektrostatski doprinos slobodnoj energiji solvatacije proteina ($\Delta_{sol}G^{elec.}$) i broj molekula vode u 1. i 2. solvatacijskoj sferi proteina ($N(H_20)$). Izračunate su prosječne vrijednosti za osam intervala od po 2 ns iz MD trajektorije, prikazanih na slici 30. Dielektrična konstanta otopljene tvari je 2 ili 4, a otapala 80.

t / ns	($\Delta_{sol}G^{elec.}$ ± SD) / kJ mol^{-1}		$N(H_20)$ ± SD
	ε_r=2	ε_r =4	
15-17	−19970 ± 197	−9606 ± 92	3436 ± 33
20-22	−20108 ± 180	−9669 ± 88	3412 ± 29
36-38	−20384 ± 276	−9803 ± 134	3458 ± 29
40-42	−20192 ± 209	−9711 ± 100	3445 ± 25
60-62	−20276 ± 197	−9745 ± 96	3399 ± 28
69-71	−19728 ± 167	−9485 ± 79	3388 ± 27
92-94	−20004 ± 184	−9619 ± 92	3331 ± 31
99-101	−19615 ± 218	−9431 ± 105	3331 ± 37



Slika 39. Elektrostatski (crna linija i rombovi) i entropijski (siva linija i kvadratići) doprinosi slobodnoj energiji solvatacije izračunati za 8, po 2 ns dugih intervala tijekom 101 ns duge MD simulacije (slika 30). Prikazane su promjene s obzirom na vrijednosti izračunate za prvi interval (od 15. do 17. ns). Vrijednosti su izračunate korištenjem dielektrične konstante otopljene tvari ε_r=2 (tablica 5) i energije od 5,02 kJ/mol koje se oslobodi otpuštanjem molekule vode u *bulk*.

Konformacijski (vibracijski, translacijski i rotacijski) doprinos entropiji izračunat analizom normalnih modova (u računu je uzet u obzir samo dio enzima koji je podložan najvećim promjenama uslijed „zatvaranja“ enzima tj. dio proteina koji se nalazi u okolici pukotine između domena) ne mijenja se značajno kako protein prelazi iz „otvorene“ u „zatvorenu“ formu (tablica 6).

Tablica 6. Konformacijski doprinos slobodnoj energiji (entropiji) izračunat analizom normalnih modova (MM-PBSA račun). Tijekom minimizacije dielektrična konstanta otapala iznosila je 80.

t / ns	$(TS_{TRA} \pm SD)$ / kJ mol^{-1}	$(TS_{ROT} \pm SD)$ / kJ mol^{-1}	$(TS_{VIB} \pm SD)$ / kJ mol^{-1}	$(TS_{TOT} \pm SD)$ / kJ mol^{-1}
1-3	71,59 ± 0,00	75,02 ± 0,08	14024,18 ± 54,94	14170,79 ± 54,94
99-101	71,59 ± 0,00	74,68 ± 0,00	13984,77 ± 60,42	14131,04 ± 60,46

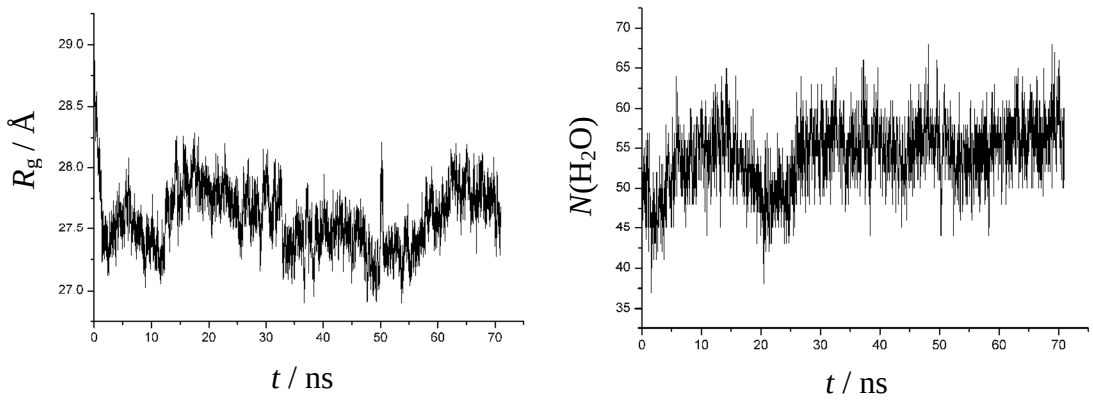
Simulacijsko vrijeme od 100 ns nije dovoljno dugo da bi se moglo govoriti o vjerojatnostima postojanja „otvorene“ i „zatvorene“ forme u ravnotežnom sustavu, međutim može se pretpostaviti da će oba stanja biti relevantna, kao što i sam eksperiment kaže. Tu hipotezu potvrđuju i rezultati analize normalnih modova provedeni pomoću servera Delarue

grupe, te činjenica da je protein tijekom prvih 50 ns MD simulacije zadržao „otvorenu“ formu.

Bezerra i suradnici[51] pokazali su da je vezanje tinorfina entropijski potpomognut proces, te da je vezanje liganda popraćeno velikim gibanjem domena sličnom onom opaženom tijekom ovih MD simulacija. Razumno je pretpostaviti da će vezanje liganda potaknuti „zatvaranje“ proteina, te pomaknuti populaciju proteinskih konformacija u smjeru „zatvorene“ forme. Izotermna titracijska kalorimetrija pokazala je da je vezanje tinorfina (kao i endomorfina-1 i enkefalina) endoterman proces, entropijski potpomognut. U eksperimentalno određenoj strukturi samog protein u pukotini između domena nalazi se 60 molekula vode, dok u strukturi kompleksa većina njih nedostaje. Tijekom MD simulacije samog enzima, otprilike 40 molekula vode je izbačeno iz veznog mjesta enzima uslijed „zatvaranje“ enzima. Dakle, i eksperiment i račun pokazuju da je „zatvaranje“ proteina entropijski potpomognut proces.

4.1.1.1. Točkasti mutanti DPP III

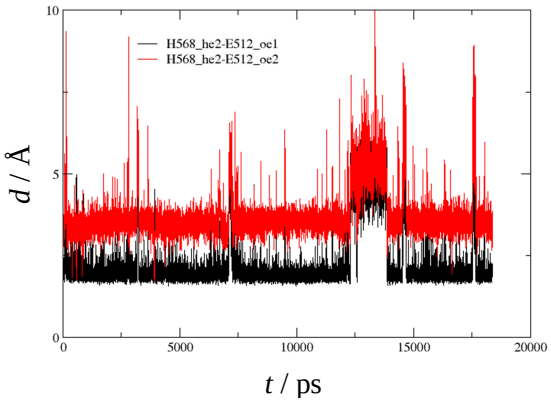
MD simulacije u kojima je Asp372 mutiran u Ala u „otvorenoj“ formi enzima provedene su kako bi se ispitala uloga navedenog aspartata u konformacijskoj promjeni enzima. Puno slabije „zatvaranje“ proteina primijećeno je tijekom 71 ns MD simulacije mutanta oD372A (slika 40, lijevo). Radijus giracije izračunat nakon 71 ns MD simulacije divljeg tipa i mutanta D372A DPP III iznosio je 27,0, odnosno 27,7 Å. Time je potvrđena pretpostavka da će se zbog nemogućnosti nastanka vodikove veze između Asp372 i Asn406 i Lys405 smanjiti stupanj „zatvaranja“ enzima. Početno djelomično „zatvaranje“ proteina rezultat je nastanka vodikove veze između Asn406 i Glu451. Iako je ta vodikova veza stabilna tijekom cijele MD simulacije mutanta oD372A, ona nije dovoljna za izraženije „zatvaranje“ enzima prisutno u divljem tipu enzima. Također, tijekom produktivne MD faze nije došlo do značajnije promjene u broju molekula vode koje se nalaze u sferi radijusa 10 Å oko cinka (slika 40, desno).



Slika 40. Radijus giracije (R_g) i broj molekula vode ($N(H_20)$) koje se nalaze u sferi radijusa 10 Å oko cinka tijekom 71 ns MD simulacije mutanta oD372A DPP III.

Točkasti mutanti slobodnog enzima u kojima je Trp300 mutiran u Leu i Lys405 u Ala također su podvrgnuti MD simulacijama. Cilj je bio ispitati utjecaj, navedenih evolucijski unutar obitelji M49 100% očuvanih, aminokiselinskih ostataka na strukturu i dinamiku (fleksibilnost) samog enzima.

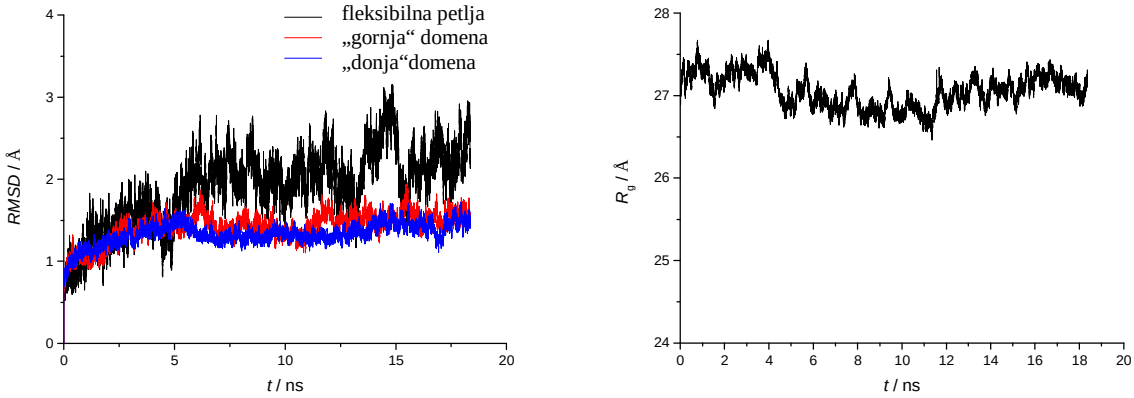
Tijekom prve nanosekunde, 20 ns duge MD simulacije mutanta oW300L DPP III, koordinacijski broj cinka je osam (His450, His455 i dvije molekule vode monodentatno koordiniraju metal, a Glu451 i Glu505 bidentatno), dok je tijekom preostalog vremena očuvana oktaedarska koordinacija cinka (Glu451 i Glu508 monodentatno koordiniraju metal). Bočni lanci His568 i Glu512, tijekom gotovo cijele MD simulacije, tvore vodikovu vezu (slika 41).



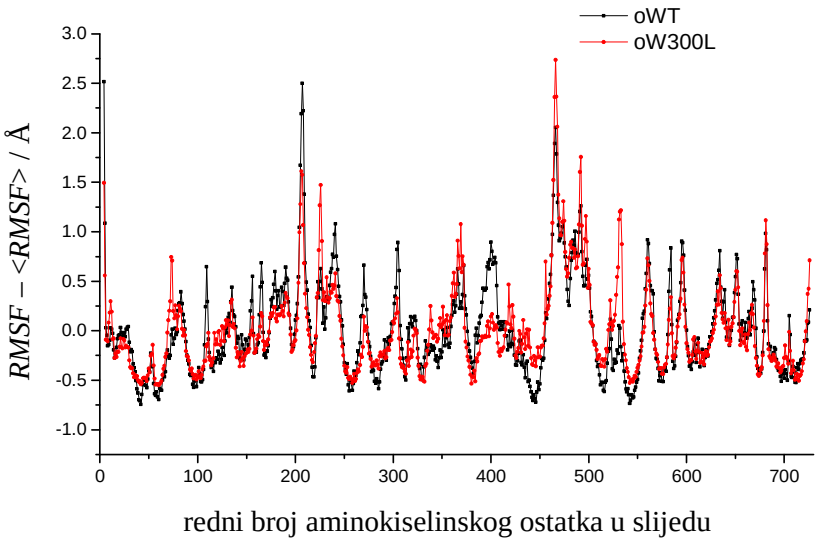
Slika 41. Udaljenost između Nε vodika His568 (He2) i karboksilnih kisika Glu512 (Oe1 i Oe2) tijekom 18 ns MD simulacije oW300L DPP III.

Mutacija Trp300 u Leu ne utječe značajno na promjenu ukupne pokretljivosti enzima (delta *RMSF* profil na slici 42c), kao ni na promjenu mobilnosti pojedinih domena enzima (ako se usporede *RMSD* profili prikazani na slikama 33 i 42a). MD simulacije ukazuju samo na djelomično smanjenje fleksibilnosti regije od 391. do 407. aminokiseline, kao i povećanje fleksibilnosti regije od 522. do 534. aminokiseline uslijed mutacije (slika 42c). Regija kojoj pripada mutirana aminokiselina podjednako je stabilna u obje forme enzima, s tim da je bočni lanac Trp300 (indolni prsten) u divljem tipu enzima najjače stabiliziran vodikovom vezom koju tvori s bočnim lancem Glu309, kao i CH-π, kation-π i van der Waalsovim interakcijama koje tvori s evolucijski 100% očuvanim Lys405, dok je Leu300 u mutantu W300L najjače stabiliziran van der Waalsovim interakcijama koje tvori s hidrofobnim bočnim lancem aminokiselina u svom okruženju (Ile301, His273, Met277, Tyr281 i Tyr311) i sa Ser297.

Tijekom MD simulacije vrijednost radijusa giracije fluktuira oko srednje vrijednosti od 27,1 ± 0,2 Å (slika 42b).



a) b)



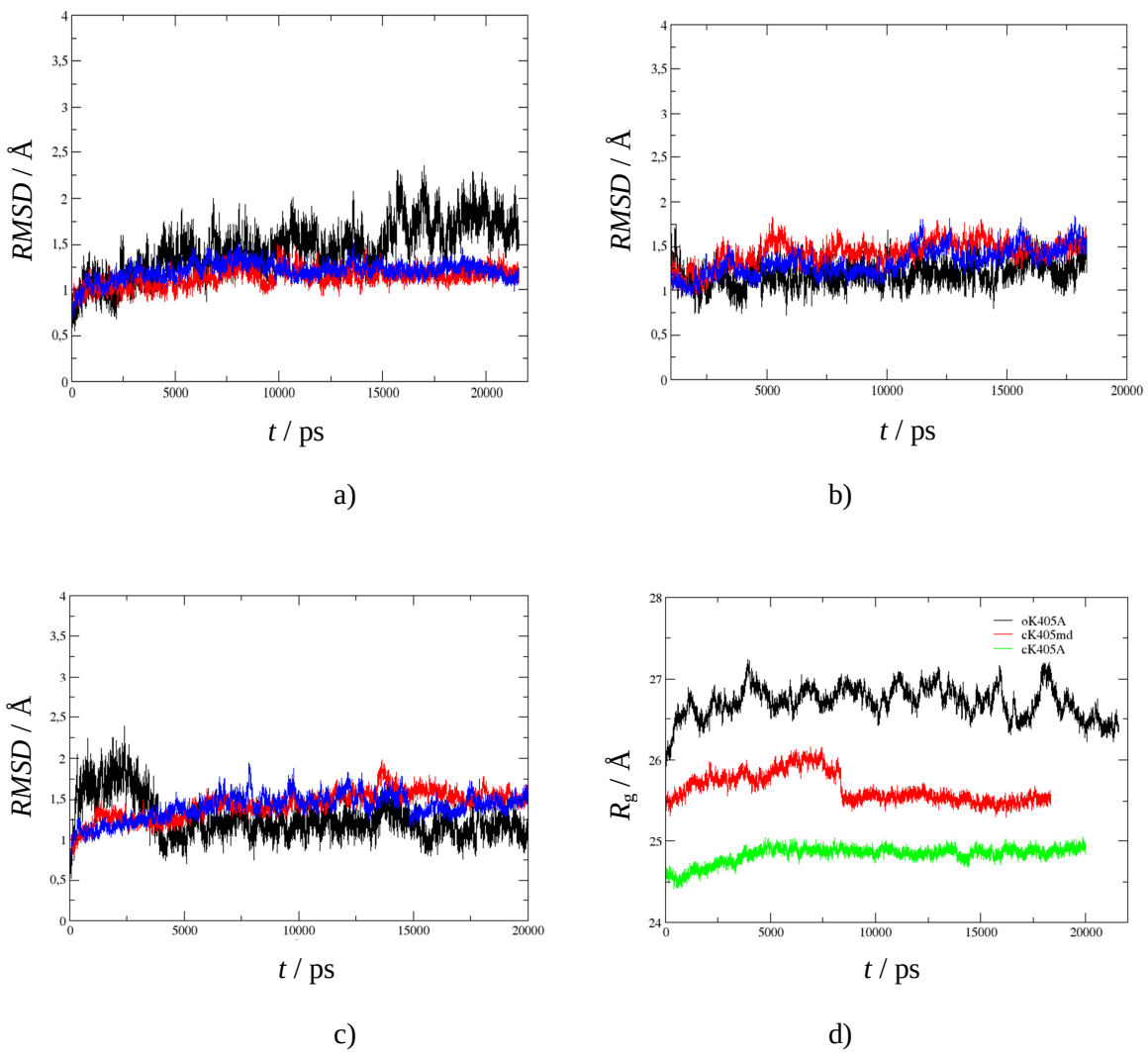
c)

Slika 42. a) *RMSD* profili pojedinih domena mutanta W300L „otvorene“ DPP III („donja“ domena: aminokiselinski ostaci 4-335, 374-416 i 670-726 je obojana plavo, „gornja“ domena: aminokiselinski ostaci 336-373, 417-458 i 493-669 crveno, i „fleksibilna“ petlja: aminokiselinski ostaci 459-492 crno), b) promjena radijusa giracije tijekom MD simulacije i c) delta *RMSF* vrijednosti (*RMSF* − <*RMSF*>) pojedinih aminokiselinskih ostataka izračunate tijekom početnih 18.5 ns MD simulacije „otvorene“ forme divljeg tipa enzima (oWT, crna linija) i mutanta W300L DPP III (oW300L, crvena linija) uzimajući u obzir samo atome koji čine okosnicu proteina.

Metodama molekulske dinamike ispitan je i utjecaj mutacije lizina 405 u alanin na stabilnost sve tri različite forme proteina, tj. „otvorene“ i „zatvorene“ forme enzima dobivene difrakcijom X-zraka (oK405A, odnosno mutant cK405A) i „zatvorene“ forme dobivene nakon 101 ns MD simulacije „otvorene“ forme (mutant $cK405A_{MD}$). Osim činjenice da se

radi o evolucijski 100% očuvanoj aminokiselini unutar obitelji M49, motivaciju za MD simulacije navedenog mutanta predstavljali su i rezultati dugih MD simulacija divljeg tipa enzima koji su pokazali da nastajanje vodikove veze između Lys405 i Asp372 potpomaže prijelaz iz „otvorene“ u „zatvorenu“ formu. Zbog toga je polazna pretpostavka bila da će navedena točkasta mutacija onemogućiti „zatvaranje“ enzima, dok bi u slučaju „zatvorenih“ formi ova mutacija mogla utjecati na stabilnost strukture proteina.

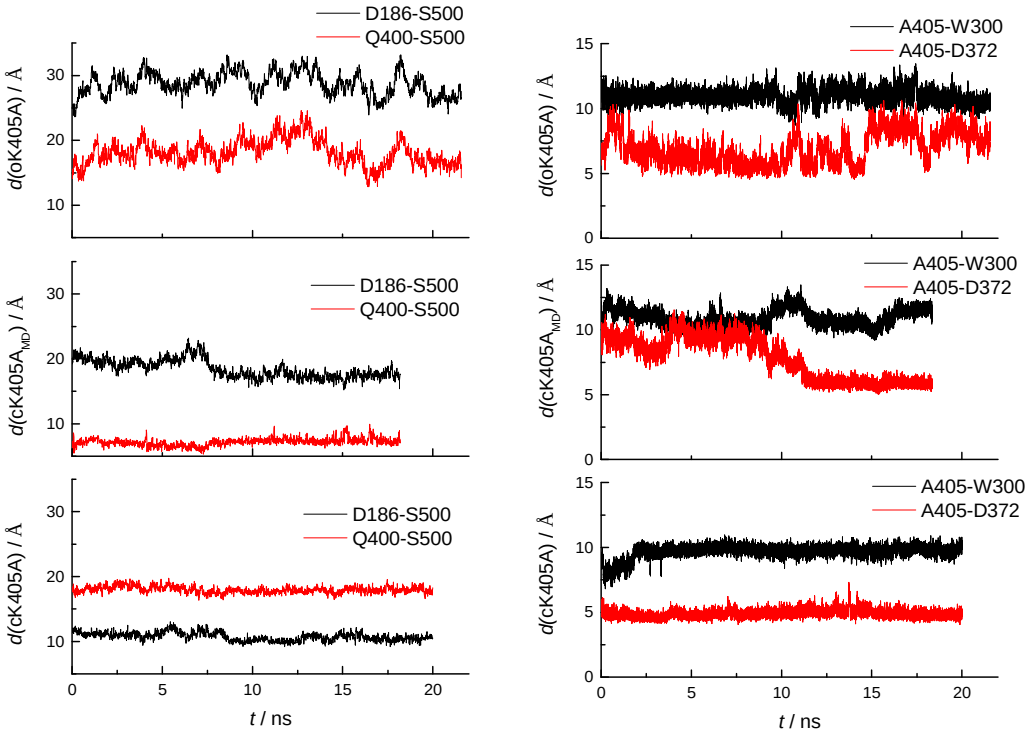
Rezultati *RMSD* analize (slika 43a-c), kao i u slučaju MD simulacija divljeg tipa enzima, upućuju na očuvanost (stabilnost) sekundarnih i tercijarnih struktura sve tri forme proteina K405A tijekom otprilike 20 ns MD simulacija.



Slika 43. *RMSD* profili pojedinih domena („donja“ domena: aminokiselinski ostaci 4-335, 374-416 i 670-726 obojana plavo, „gornja“ domena: aminokiselinski ostaci 336-373, 417-458 i 493-669 obojana crveno, i fleksibilna petlja: aminokiselinski ostaci 459-492 obojana crno) mutanta K405A DPP III: a) oK405A, b) cK405A$_{MD}$ i c) cK405A. d) promjena radijusa giracije (R_g) tijekom MD simulacije.

Blago „otvaranje“ sve tri mutirane forme proteina može se pratiti kroz postepeno povećanje radijusa giracije tijekom MD simulacije (slika 43d). U slučaju mutanta cK405A$_{MD}$, nakon 8 ns MD simulacije globularnost proteina raste, te R_g poprima vrijednost sličnu početnoj, tj. srednja vrijednost R_g nakon 10 ns MD simulacije iznosi 25,5 ± 0,1 Å (vrijednost na početku produktivne MD faze iznosi 25,6 Å). Tijekom MD simulacije oK405A, R_g se povećao s početnih 26,1 Å (vrijednost nakon faze uravnoteženja) na 26,7 ± 0,2 Å (nakon prvih 10 ns MD simulacije), dok je u slučaju mutanta cK405A došlo tek do neznatnog

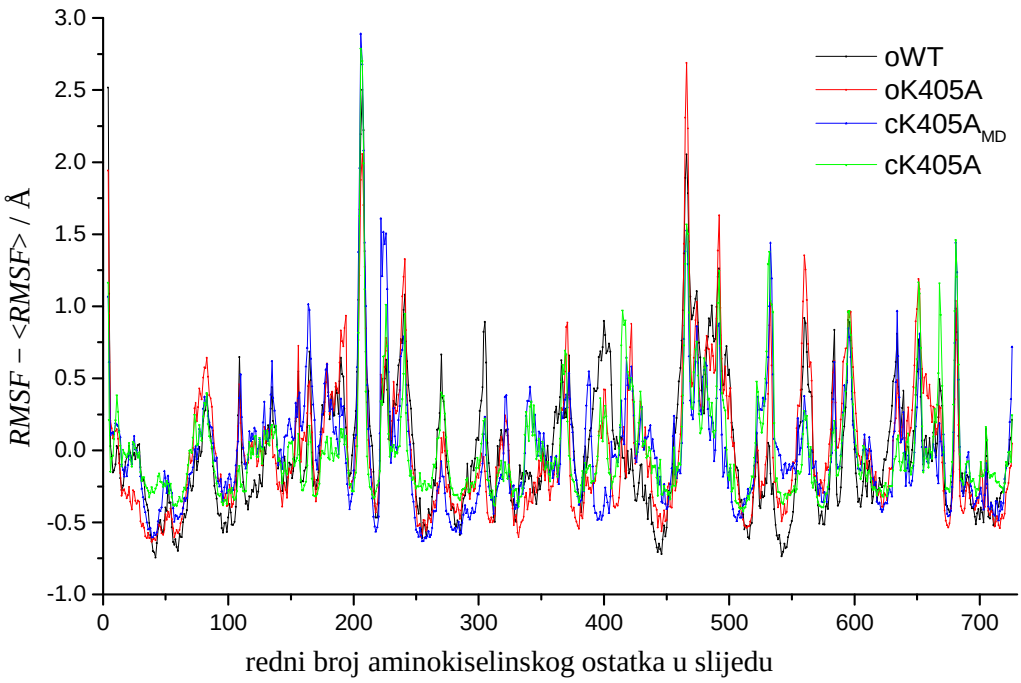
povećanja radijusa giracije s 24,7 Å (vrijednost na početku produktivne MD faze) na 24,9 ± 0,1 Å tijekom zadnjih 10 ns MD simulacije. „Otvaranje“ mutanta oK405A može se pratiti i kroz blago povećanje udaljenosti između Cα atoma aminokiselinskih parova Asp186-Ser500 (d_1) i Gln400-Ser500 (d_2, slika 44). Tijekom MD simulacije mutanta cK405A parametri d_1 i d_2 fluktuiraju oko srednje vrijednosti od 10,7 ± 0,6 Å, odnosno 18,0 ± 0,5 Å. Smanjenje R_g nakon otprilike 8 ns MD simulacije mutanta cK405A$_{MD}$ rezultat je blagog smanjenja udaljenosti između Cα atoma Asp186 i Ser500; nakon 10 ns MD simulacije vrijednost parametra d_1 smanji se s početne vrijednosti od 19,9 Å na 17,4 ± 0,7 Å. U isto vrijeme smanji se i udaljenosti između Cα atoma Ala405 i Asp372, uslijed čega nastaju van der Waalsove interakcija između njihovih bočnih lanaca.



Slika 44. Promjena udaljenosti između Cα atoma aminokiselinskih parova D186-S500, Q400-S500, A405-W300 i A405-D372 tijekom MD simulacija mutanata K405A DPP III.

Vodikove veze koje Lys405 u divljem tipu enzima tvori s Asp372 i povremeno s Glu309, te van der Waalsove, CH-π i kation-π interakcije s Trp300, mutacijom u alanin zamijenjene su puno slabijim van der Waalsovim interakcijama s Asp372 i Trp300. U isto vrijeme u mutiranim enzimima nastaje vodikova veza između Asp372 (u oK405A i cK405A$_{MD}$ strukturama) ili Glu309 (u cK405A strukturi) i Lys304.

Utjecaj mutacije lizina 405 u alanin na fleksibilnost pojedinih regija proteina dan je na slici 45 (velike *RMSF* vrijednosti odgovaraju aminokiselinama čiji se položaj najviše mijenja tijekom MD simulacije). Uočava se da okosnica mutirane aminokiseline, kao i okosnica aminokiselinskih ostataka koji se nalaze u njezinoj okolici (aminokiselinski ostaci od 298. do 307. i od 388. do 407.) tj. s kojima ona interagira, pokazuju manju fleksibilnost u mutantima u odnosu na divlji tip proteina. S druge strane, mutacije lizina u alanin rezultira povećanjem fleksibilnosti regije od 522. do 536. aminokiseline (dio α-zavojnica sa stražnje strane protein) u sve tri mutirane forme enzima (kao i u slučaju mutanta oW300L), te blagim povećanjem fleksibilnosti regije od 337. do 348. aminokiseline (α-zavojnica koja povezuje „gornju“ i „donju“ domenu) u obje „zatvorene“ forme mutanta K405A .



Slika 45. Delta *RMSF* vrijednost (*RMSF* − <*RMSF*>) pojedinog aminokiselinskog ostatka izračunate tijekom početnih 18.5 ns MD simulacije „otvorene“ forme divljeg tipa enzima (crna linija, oWT) i 20 ns mutanata K405A DPP III (oK405A, cK405A $_{MD}$ i cK405A, redom crvena, plava i zelena linija) uzimajući u obzir samo atome koji čine okosnicu proteina.

Rezultati *RMSD* i *RMSF* analize pokazuju da mutacija lizina u alanin ne utječe značajno na stabilnost „zatvorenih“ formi proteina, što se ne slaže s polaznom pretpostavkom. Također, iako MD simulacije mutanta oK405A DPP III pokazuju blago povećanje radijusa giracije

tijekom simulacije, utjecaj navedene mutacije na konformacijsku promjenu (tj. „zatvaranje“) proteina trebalo bi ispitati dužim MD simulacijama.

Oktaedarska koordinacija cinka, koju čine His450, Glu451, His455, Glu508 i dvije molekule vode, narušena je samo tijekom MD simulacije mutanta cK405A. Već tijekom početne faze uravnoteženja cK405A sustava dolazi do reorijentacije His450 rotacijom oko Cβ-Cγ veze, te nastajanja vodikove veze s Glu512. U isto vrijeme Glu451 bidentatno koordinira Zn^{2+} (Glu508 bidenatatno koordinira metal od početka simulacije).

4.1.2. Struktura i dinamika kompleksa DPP III sa sintetičkim ligandima

Budući na početku izrade ove doktorske disertacije nije bila poznata trodimenzionalna struktura kompleksa DPP III-ligand, trebalo je odrediti najvjerojatniji način vezanja molekule liganda u vezno mjesto ljudske DPP III. Kombiniranjem metoda molekulskog uklapanja s usmjerenim MD simulacijama, ispitano je vezanje molekule liganda (sintetičkog supstrata, Arg-Arg-2-naftilamida, i inhibitora, Tyr-Phe-hidroksamata) u vezno mjesto (tada poznate) „otvorene“ forme DPP III. Određeno je da je energetski najpovoljniji položaj onaj u kojem ligand koordinira ion cinka s karbonilnim kisikom iz druge peptidne veze s N-kraja liganda i nalazi se iznad β-ploče iz „donje“ domene proteina (slika 24a i tablica 7). Navedeni način vezanja liganda predstavlja tzv. „MD mod (način) vezanja“, te će se u daljem tekstu označavati indeksom MD uz ime liganda.

Tablica 7. Relativne potencijalne energije izračunate korištenjem GB (eng. *generalized Born*) modela za odabrane komplekse: oWT-INH i oWT-RRNA (INH je skraćenica od Tyr-Phe-hidroksamat, a RRNA od Arg-Arg-2-naftilamid). Prva četiri kompleksa sagrađena su korištenjem orijentacija liganda određenih programom AutoDock, dok zadnja dva kompleksa odgovaraju strukturama odabranima za daljnje MD simulacije, odnosno strukturi dobivenoj nakon 10 ns MD simulacije kompleksa. Osim za navedene komplekse, dane su i energije kompleksa dobivenih usmjerenim (eng. *steered*) MD simulacijama inhibitora i energije kompleksa sa supstratom orijentiranim u suprotnom (op) smjeru u veznom mjestu enzima, kao i kompleksi s kristalografski određenom „otvorenom“ strukturom proteina (pri čemu je RRNA smješten na način određen nakon 10 ns MD simulacije kompleksa ili je orijentirana u suprotnom smjeru).

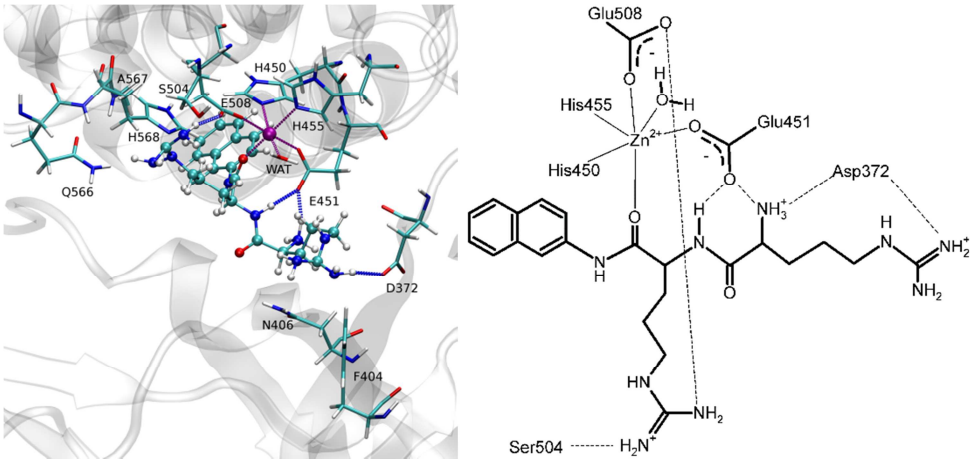
Kompleksi s inhibitorom	$\frac{\Delta E_{pot}}{kJ\ mol^{-1}}$	Kompleksi s RRNA	$\frac{\Delta E_{pot}}{kJ\ mol^{-1}}$
AutoDock_1_1	0	AutoDock_6_1	0
AutoDock_3_1	343	AutoDock_9_1	113
AutoDock_14_1	−25	AutoDock_13_1	281
AutoDock_26_1	−134	AutoDock_41_1	335
steered_1	−1657	DPP III[b] + $RRNA_{iz\ konačnog\ kompleksa}$	176
steered_2	−1209	DPP III[b] + $RRNA_{op}$[a]	423
		$DPP\ III_{iz\ konačnog\ kompleksa}$ + $RRNA_{op}$[a]	−1179
$oWT\text{-}INH_{MD}$ (početna struktura za daljnje MD simulacije)	−1757	$oWT\text{-}RRNA_{MD}$ (početna struktura za daljnje MD simulacije)	−1573
$oWT\text{-}INH_{MD}$ (konačan kompleks)	−2138	$oWT\text{-}RRNA_{MD}$ (konačan kompleks)	−1364

[a] $RRNA_{op}$ odgovara orijentaciji supstrata gdje naftilamidna skupina nije smještena u hidrofobnom džepu, već u suprotnom smjeru tj. prema vanjskom dijelu aktivnog mjesta enzima.

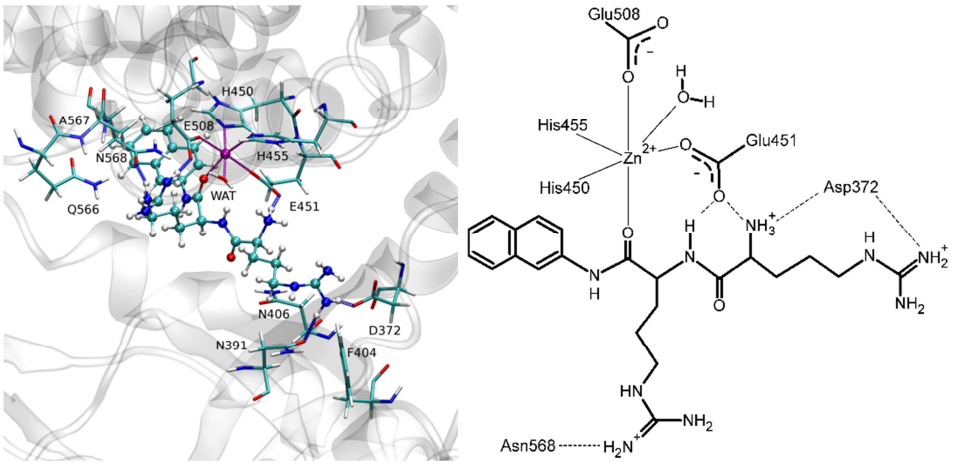
[b] početna struktura slobodnog enzima (kristalografski određena struktura, PDB kod 3FVY) korištena u daljnjim MD simulacijama

Provođenjem MD simulacije kompleksa DPP III sa supstratom, nakon početne faze uravnoteženja sustava (3,5 ns), ligand se stabilizirao u veznom mjestu kompleksa $oWT\text{-}RRNA_{MD}$. Tijekom 30 ns produktivne MD faze cink je oktaedarski koordiniran s molekulom vode, četiri aminokiseline iz aktivnog mjesta enzima (His450, Glu451, His455 i Glu508) i karbonilnim kisikom iz druge peptidne veze s N-kraja molekule supstrata (slika 46a). Histidini koordiniraju atom cinka s imidazolnim Nε atomom, a glutamati s karboksilnim kisikom. Molekula vode koja koordinira cink tvori, direktno ili posredstvom drugih molekula

vode, vodikovu vezu s karboksilnim kisikom Glu451 ili Glu508 koji ne sudjeluje u koordinaciji cinka.



a)

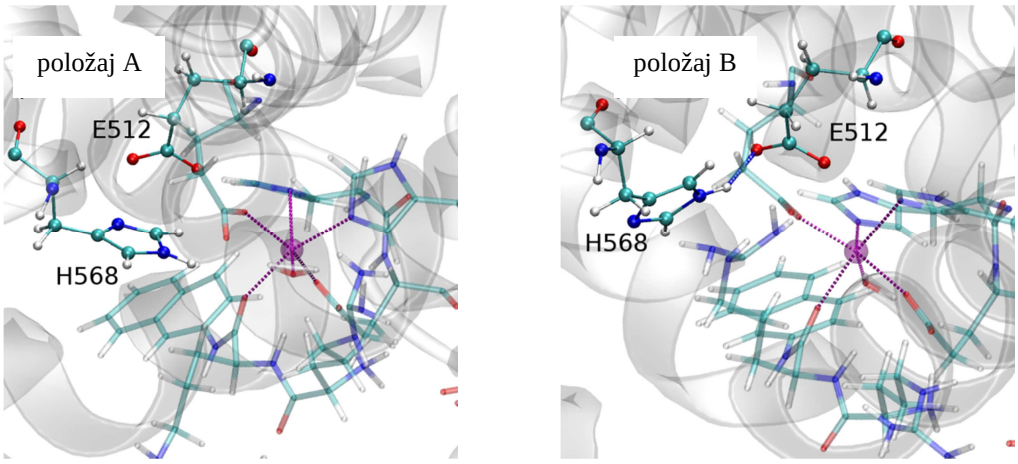


b)

Slika 46. Vezanje supstrata Arg-Arg-2-naftilamida (RRNA) u veznom mjestu: a) nativne i b) mutanta H568N „otvorene“ ljudske DPP III nakon 30 ns MD simulacije kompleksa (lijevo). Atom cinka prikazan je ružičastom kuglicom, a molekula supstrata kuglicama i štapićima. Aminokiselinski ostaci i molekule vode (WAT) iz veznog mjesta enzima prikazani su štapićima. Ružičaste iscrtkane linije predstavljaju koordinativnu vezu, a iscrtkane plave linije vodikove veze. Za ovakav način vezanja liganda koristiti će se naziv „MD mod (način) vezanja“. Desno je dan shematski prikaz aktivnog mjesta DPP III s vezanim ligandom.

Molekula supstrata RRNA vezana u položaj prikazan na slici 46a dodatno je stabilizirana vodikovim vezama i hidrofobnim interakcijama koje ostvaruje s proteinom. N-kraj i amidna skupina iz prve peptidne veze tvore vodikove veze s Glu451, pri čemu N-kraj supstrata

povremeno tvori i vodikovu vezu s Asp372, te van der Waalsove i elektrostatske interakcije s Asn406 i Phe404. Gvanidino skupina drugog arginina s N-kraja supstrata ostvaruje vodikove veze s Glu508 i Ser504. Naftilna skupina molekule RRNA nalazi se u tzv. hidrofobnom džepu kojeg čine nepolarne aminokiseline Leu413, Phe443, Val447, te polarne Gln446, His450 i Glu451. Osim hidrofobnih interakcija s navedenim aminokiselinama, naftilna skupina dodatno je stabilizirana NH-π interakcijama (nekovalentne interakcije između NH skupine i sustava π elektrona) s Arg572 i CH-π interakcijama s His568. Tijekom MD simulacije bočni lanac His568 rotira oko Cβ-Cγ veze zauzimajući uglavnom dvije različite orijentacije u veznom mjestu (slika 47); jednu u kojoj tvori vodikovu vezu s Glu512 (položaj B na slici 47) i drugu u kojoj imidazolni prsten ostvaruje različite interakcije (elektrostatske: NH-π, CH-π, CH-O, i van der Waalsove) s naftilamidnom skupinom RRNA (položaj A na slici 47).



Slika 47. Dva najzastupljenija položaja His568 određena MD simulacijama kompleksa oWT-$RRNA_{MD}$. His568 i Glu512 prikazani su štapićima i kuglicama. Atom cinka prikazan je prozirnom ružičastom kuglicom, a molekula supstrata, aminokiselinski ostaci i voda koji koordiniraju cink prozirnim štapićima. Ružičaste iscrtkane linije predstavljaju koordinativnu vezu.

Budući da su kinetička mjerenja mutanta H568N uz supstrat RRNA pokazala da je His568 ključan za aktivnost enzima, uloga ove aminokiseline, očuvane unutar obitelji metalopeptidaza M49, ispitana je MD simulacijama kompleksa oH568N-$RRNA_{MD}$.

Tijekom 30 ns MD simulacije navedenog kompleksa mutanta sa supstratom, ion cinka bio je oktaedarski koordiniran s istim ligandima kao i divlji tip enzima. Iako na samom početku produktivne MD faze Glu508 bidentatno koordinira cink, uslijed pucanja vodikove veze između Glu508 i Asn568 dolazi do reorijentacije glutamata koji nakon toga monodentatno

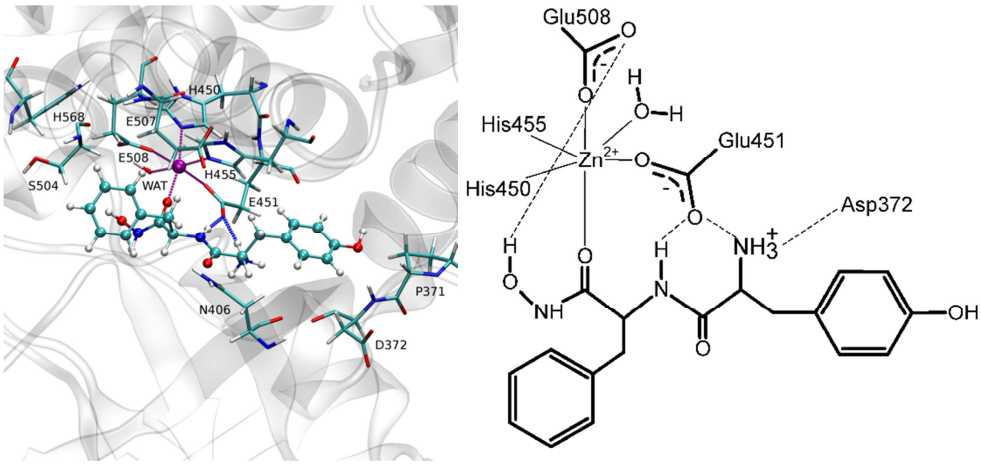
koordinira atom cinka. Također, položaj supstrata, s izuzetkom drugog bočnog lanca arginina, je vrlo sličan položaju koji ima u divljem tipu enzima (slika 46b). Vodikove veze između molekule RRNA i aminokiselina u blizini cinka, karakteristične za kompleks s divljim tipom, također su očuvane u kompleksu oH568N-RRNA. Naime N-kraj i amidna grupa iz prve peptide veze supstrata tvore vodikovu vezu s Glu451. N-kraj i gvanidino skupina prvog arginina tvore vodikovu vezu s Asp372, pri čemu gvanidino skupina dodatno ostvaruje i van der Waalsove interakcije s Asn406 i Phe404. Tijekom zadnjih 10 ns MD simulacije, gvanidino skupina prvog arginina tvori vodikovu vezu s bočnim lancem Asn391. Hidrofobne i NH-π interakcija s naftilamidnom skupinom su također većinom sačuvane u mutiranom kompleksu. Nedostaju jedino CH-π interakcije s His568 kao posljedica mutacije. U mutiranom kompleksu drugi arginin molekule supstrata ostvaruje vodikovu vezu s Asn568, dok u kompleksu s divljim tipom ima snažne interakcije sa Ser504. Elektrostatske i van der Waalsove interakcije tog dijela supstrata s Glu508 i Gln566, povremeno prelaze u vodikove veze. Dakle, glavna razlika u stabilizaciji molekule supstrata u kompleksu s divljim tipom ili mutiranim enzimom proizlazi iz razlike u stabilizaciji drugog arginina (tablica D1).

U kompleksu oH568N-RRNA$_{MD}$ Asn568 tvori vodikovu vezu s Gln512 samo tijekom prvih 5 ns MD simulacije, dok je u kompleksu s nativnim enzimom ta vodikova veza prisutna tijekom 50% ukupnog simulacijskog vremena.

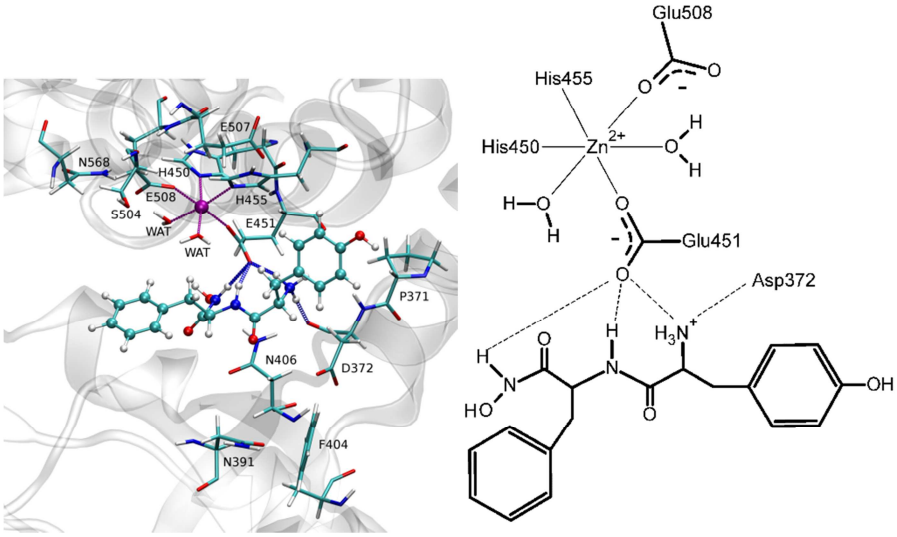
Tijekom MD simulacije kompleksa s inhibitorom (oWT-INH$_{MD}$, inhibitor vezan na tzv. „MD način“ u „otvorenu“ formu DPP III), molekula inhibitora (Tyr-Phe-hidroksamat) u veznom mjestu enzima stabilizirana je na sličan način kao i molekula supstrata (slika 48a). Također, atom cinka oktaedarski je koordiniran s molekulom vode, četiri aminokiseline (His450, Glu451, His455 i Glu508) i drugom karbonilnom skupinom s N-kraja inhibitora. U oWT-INH$_{MD}$ kompleksu molekula vode koordinira atom cinka sa „stražnje“ strane, ako se usporedi s položajem koji ima u kompleksu sa supstratom i samo povremeno ostvaruje vodikovu vezu, direktno ili posredstvom drugih molekula vode, s Glu508. Hidroksilna skupina, za koju se prije mislilo da koordinira atom cinka, tvori vodikovu vezu s Glu508, a Glu451 tvori vodikove veze s amidnom grupom iz prve peptidne veze inhibitora i N-krajem inhibitora. N-kraj inhibitora tvori i vodikovu vezu s Asp372. Van der Waalsove i CH-π interakcije između tirozina iz molekule inhibitora i aminokiselinskih ostataka Pro371, Asp372, Asn406 i His455 dodatno stabiliziraju taj ligand u veznom mjestu enzima.

Fenilalanin iz molekule inhibitora interagira sa Ser504, Glu507 i Glu508. Takva orijentacija inhibitora u aktivnom mjestu enzima stabilna je od početka MD simulacije.

Ispitan je i alternativni način vezanja liganda, gdje molekula inhibitora bidentatno koordinira cink. Međutim, MD simulacije su pokazale da zbog steričkih uvjeta i odbojnih interakcija između hidroksilne skupine inhibitora i atoma cinka, takva topologija nije moguća.



a)



b)

Slika 48. Vezanje inhibitora Tyr-Phe-hidroksamata u aktivno mjesto DPP III. Lijevo; optimizirane strukture dobivene nakon 30 ns MD simulacija u kojima je inhibitor bio vezan na „MD način“ u veznom mjestu: a) nativne i b) mutanta H568N „otvorene“ ljudske DPP III. Atom cinka prikazan je ružičastom kuglicom, a molekula liganda kuglicama i štapićima. Aminokiselinski ostaci i molekule vode (WAT) iz veznog mjesta enzima prikazani su štapićima. Ružičaste iscrtkane linije predstavljaju koordinativnu vezu, a iscrtkane plave linije vodikove veze. Desno, shematski prikaz aktivnog mjesta DPP III s vezanim ligandom.

Kao i u oWT-RRNA$_{MD}$ kompleksu, His568 u kompleksu s inhibitorom fluktuira između dvije stabilne konformacije kao posljedica rotacije oko Cα-Cβ veze. Jedna od tih konformacija uključuje vodikovu vezu s Glu512.

MD simulacije (30 ns) s Tyr-Phe-hidroksamatom vezanim na „MD način“ u vezno mjesto mutanta H568N „otvorene“ DPP III (kompleks oH568N-INH$_{MD}$) ukazuju na značajnu promjenu u načinu vezanja molekule inhibitora u veznom mjestu enzima uslijed mutacije. Tijekom simulacije, inhibitor se pomalo odmiče od cinka, te se nakon 8 ns MD simulacije veže bliže „donjoj“ domeni proteina (slika 48b). U tom položaju inhibitor više ne koordinira atom cinka, pa šesto koordinacijsko mjesto metala zauzima dodatna molekula vode, tj. dvije molekule vode i četiri aminokiseline (His450, Glu451, His455 i Glu508) monodentantno koordinaraju Zn^{2+}. Glavni razlog početnoj destabilizaciji inhibitora u aktivnom mjestu enzima je mreža vodikovih veza nastala između Glu508, Asn568 i Glu512. Kao i u kompleksu sa supstratom oH568N-RRNA$_{MD}$, Glu508 tvori vodikovu vezu s Asn568. Nadalje, u oH568N-INH$_{MD}$ kompleksu Asn568 tvori vodikovu vezu s Glu512 tijekom cijele produktivne MD faze, te zbog toga odvlači karboksilnu skupinu Glu508 dalje od inhibitora što rezultira pucanjem vodikove veze između Glu508 i hidroksilne skupine molekule inhibitora. Položaj u kojem se inhibitor nalazi vezan bliže „donjoj“ domeni proteina, stabiliziran je trima snažnim NH-O vodikovim vezama između inhibitora i Glu451 (slika 48b i tablica D1). Fenilalanin iz molekule inhibitora ostvaruju van der Waalsove interakcije s Asn391, Asn406 i Phe404, a tirozin, vodikove veze s Asp372 i elektrostatske i van der Waalsove interakcije s Asn406, His455 i Pro371.

MM-PBSA metodom izračunat je entalpijski doprinos slobodnoj energiji vezanja molekula supstrata i inhibitora za divlji i mutirani (H568N) tip enzima. Entropijski doprinos slobodnoj energiji vezanja ($T\times S$) izračunat je samo za komplekse s inhibitorom i iznosi −75,90 kJ/mol (za kompleks s mutantom H568N) i −67,66 kJ/mol (za kompleks s divljim tipom enzima), a standardna devijacija (SD) je reda veličine 83,68 kJ/mol. Budući je SD konformacijske entropije znatno veća od njihove razlike u navedenim kompleksima doprinos konformacijske entropije slobodnoj energiji vezanja je zanemaren.

Prije samog računa entalpijskog doprinosa slobodnoj energiji vezanja ispitan je utjecaj dielektrične konstante (ε = 1, 2, 4) otopljene tvari (enzima i kompleksa), te naboja cinka na vrijednost slobodne energije vezanja, na način da je određena ovisnost razlike Gibbsove energije vezanja, $\Delta\Delta G$, molekule inhibitora (Tyr-Phe-hidroksamat) za „otvorenu“ formu divljeg tipa i mutanta H568N DPP III ($\Delta\Delta G = \Delta G_{\text{oWT-INH}_{\text{MD}}} - \Delta G_{\text{oH568N-INH}_{\text{MD}}}$) o navedenim parametrima. Kao što se vidi iz lijevog stupca u tablici 8, povećanjem dielektrične konstante, razlika slobodnih energija se smanjuje.

Tablica 8. Ovisnost razlike promjene Gibbsove energije vezanja, $\Delta\Delta G$ ($\Delta\Delta G = \Delta G_{\text{oWT-INH}_{\text{MD}}} - \Delta G_{\text{oH568N-INH}_{\text{MD}}}$), molekule inhibitora (Tyr-Phe-hidroksamat) za divlji tip i mutant H568N „otvorene“ forme DPP III o vrijednosti dielektrične konstante i naboju cinka. Dielektrična konstanta otapala iznosila je 80. MM-PBSA račun napravljen je na ansamblu struktura preuzetih svakih 10 ps iz 5 nanosekundnog intervala MD simulacije (od 25. do 30. ns) navedenih kompleksa.

	($\Delta\Delta G$ ± SD) / kJ mol^{-1}	
ε	$q(Zn^{2+})$ = + 2,0 *e*	$q(Zn^{2+})$ = + 1,5 *e*
1	−29,66 ± 50,96	−8,83 ± 42,38
2	−18,07 ± 27,78	−7,95 ± 24,85
4	−11,21 ± 21,21	−4,69 ± 20,33

U svim provedenim MD simulacijama korišten je naboj cinka + 2 *e*. Naboj cinka, određen na temelju elektrostatskog potencijala dobivenog B3LYP/cc-pVTZ računom na modelnom sustavu (sastavljenom od iona cinka i bočnih lance dva histidina i dva glutamata), iznosio je + 1,63 *e*. Međutim, korištenje cjelobrojne vrijednosti naboja cinka (+ 2 *e*) omogućilo je upotrebu standardnih parametara za okolne aminokiseline. Bitno je naglasiti da su se navedeni nevezni parametri iona cinka do sada pokazali dovoljno dobri za proučavanje strukture enzima i njegovih kompleksa. Međutim, za puno osjetljivije MM-PBSA račune, korištenjem niže vrijednosti naboja cinka (+ 1,5 *e*) dobiveni su bolji rezultati, kao što se vidi iz desnog stupca u tablici 8.

Na temelju provedene analize, u MM-PBSA računima korištena je dielektrična konstanta 2 za otopljenu tvar (enzim i kompleks), dok je naboj cinka bio +1,5 *e*.

Prema rezultatima MM-PBSA analize (tablica 9), slobodna energija vezanja molekule RRNA za divlji i mutirani tip enzima (ako se u obzir uzme statistička nesigurnost tj.

standardna devijacija) je jednaka. Ti rezultati slažu se s eksperimentalnim rezultatima prema kojima zamjena evolucijski očuvanog His568 ne utječe na vrijednost Michaelisove konstante (K_m=9,39 ± 1,11 μM za divlji tip enzima i K_m=11,81 ± 0.18 μM za mutant H568N) iako dolazi do značajnog (1296-ostrukog) smanjenja vrijednosti katalitičke konstante (k_{cat} divljeg tipa iznosi 16,20 ± 2,69 s^{-1}, a mutanta H568N 0,00125 ± 5×10^{-4} s^{-1}).[14] Računi također pokazuju da se inhibitor slabije veže za mutirani enzim, nego za divlji tip (WT). Razlika i odnos izračunatih slobodnih energija vezanja inhibitora za WT enzima i H568N, sličan je razlici vrijednosti konstanti inhibicije izračunatih iz eksperimentalih rezultata (K_i=0,15 μM za kompleks s divljim tipom enzima i K_i= 1,36 μM za kompleks s mutantom H568N).

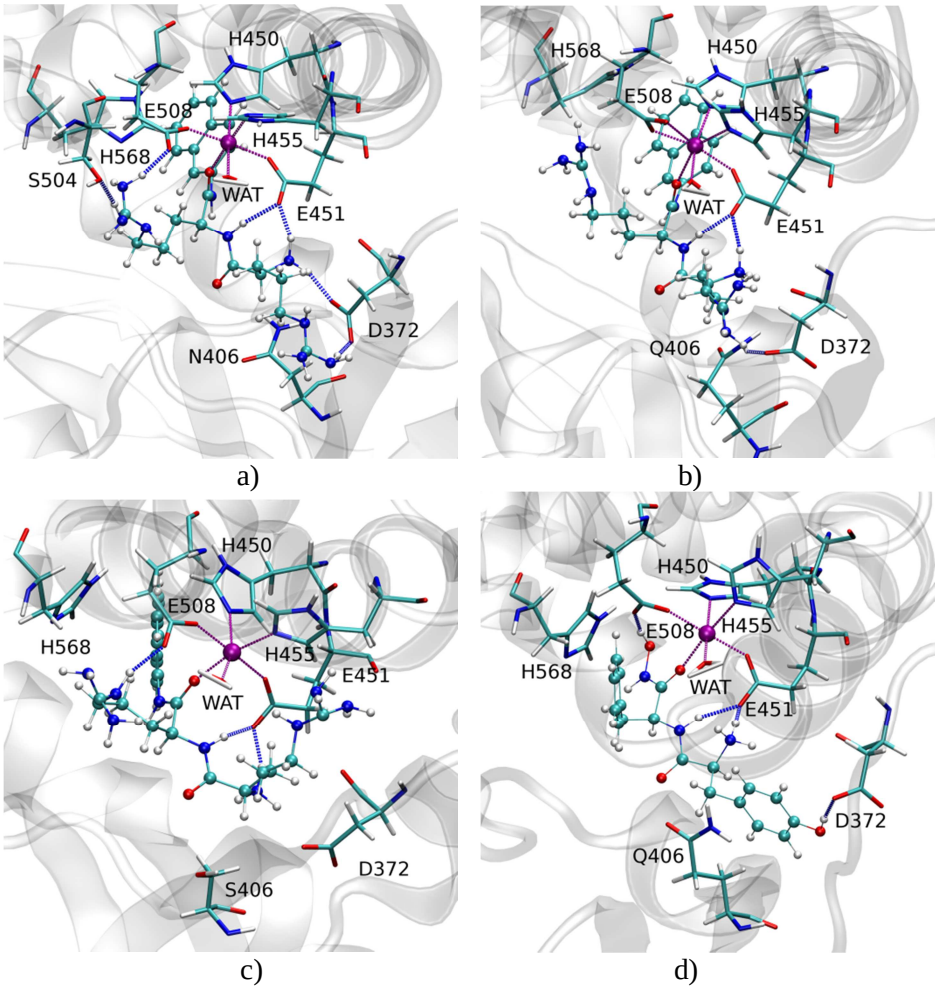
Kod usporedbe s eksperimentalnim podacima važno je naglasiti da se K_m i K_i vrijednosti zbog načina na koje su određene, ne mogu direktno uspoređivati s K_d vrijednostima. Iako su razlike u ekperimentalno određenim vrijednostim K_m i K_i djelomično rezultat različitog vezanja molekule lignada, one sadrže i druge doprinose kao što su stabilizacija prijelaznog stanja i brzina otpuštanja produkata (u slučaju K_m). Stoga se izračunate slobodne eneregije vezanja mogu samo kvalitativno uspoređivati s vrijednostima K_m i K_i.

Tablica 9. Entalpijski doprinos slobodnoj energiji vezanja liganda (Arg-Arg-2-naftilamida, RRNA, i Tyr-Phe-hidroksamata, INH) za divlji tip („otvorene“ i „zatvorene“) i mutant H568N, N406Q i N406S („otvorene“) DPP III. Energije su izračunate MM-PBSA metodom za period od 26. do 30. ns MD simulacije (osim u slučaju asparaginskih mutanta gdje su u obzir uzete zadnje 2 ns tj. od 9. do 10. ns za N406Q i od 4. do 5. ns za N406S kompleks), pored toga energija vezanja inhibitora izračunata je i za period od 45. do 50. ns. Dielektrične konstante otapala i otopljene tvari iznosile su 80 i 2. U računu je korišten naboj cinka +1,5 *e*, te strukture generirane svakih 10 ps.

	(ΔH ± SD) / kJ mol^{-1}
oWT-INH_{MD}	−118,66 ± 21,59
oH568N-INH_{MD}	−110,71 ±12,34
cWT-INH	−259,28 ± 16,23
cWT-INH*	−165,90 ± 15,27
oWT-$RRNA_{MD}$	−183,89 ± 23,43
oH568N-$RRNA_{MD}$	−186,86 ± 18,54
oN406Q-$RRNA_{MD}$	−186,15 ± 16,99
oN406S-$RRNA_{MD}$	−170,71 ± 20,08

* MM-PBSA račun za period od 45. do 50. ns MD simulacije

Bioinformatička analiza pokazala je da je Asn406 100% očuvan u DPP III kod eukariota, dok se kod prokariota na tom mjestu nalazi serin (također 100% očuvan).[111] Prema kinetičkim mjerenjima, supstitucija Asn406 sa Ser u ljudskoj DPP III ne utječe na vrijednost Michaelisove konstante (K_m = 3,37 ± 1,1 μmol dm^{-3} kod divljeg tipa i K_m = 3,99 ± 0,99 μmol dm^{-3} kod mutanta N406S) i na katalitičku efikasnost hidrolize RRNA (k_{cat} = 14,13 ± 1,67 s^{-1} kod divljeg tipa i k_{cat} = 10,70 ± 0,92 s^{-1} kod mutanat N406S), kao ni na konstantu inhibicije u slučaju Tyr-Phe-hidroksamata (K_i za divlji tip iznosi 0,23 ± 0,03 μmol dm^{-3}, a za mutanta N406S 0,28 ± 0,02 μmol dm^{-3}).[111] Međutim mutacija Asn406 u glutamin rezultirala je velikim smanjenjem katalitičke efikasnosti (100 puta manji omjer k_{cat}/K_m, uglavnom zbog značajnog smanjenja k_{cat} kod mutanta N406Q: k_{cat} = 0,21 ± 0,02 s^{-1} i K_m = 5,03 ± 1,23 μmol dm^{-3}) i stupnja inhibicije (156 puta veća K_i mutanta; K_i = 35,89 ± 5,86 μmol dm^{-3}).[111] Utjecaj navedenih mutacija na vezanje liganda i strukturu DPP III ispitan je MD simulacijama kompleksa oN406S-RRNA$_{MD}$ i oN406Q-RRNA$_{MD}$. Također, provedene su i kratke MD simulacije s kompetitivnim inhibitorom (Tyr-Phe-hidroksamatom) vezanim u vezno mjesto mutanta N406Q „otvorene“ forme DPP III. Simulacije su ukazale na očuvanost oktaedarske koordinacije cinka tijekom cijele produktivne MD faze kompleksa oN406S-RRNA$_{MD}$, dok je u slučaju kompleksa oN406Q-RRNA$_{MD}$ cink većinom koordiniran sa sedam liganada (slika 49).

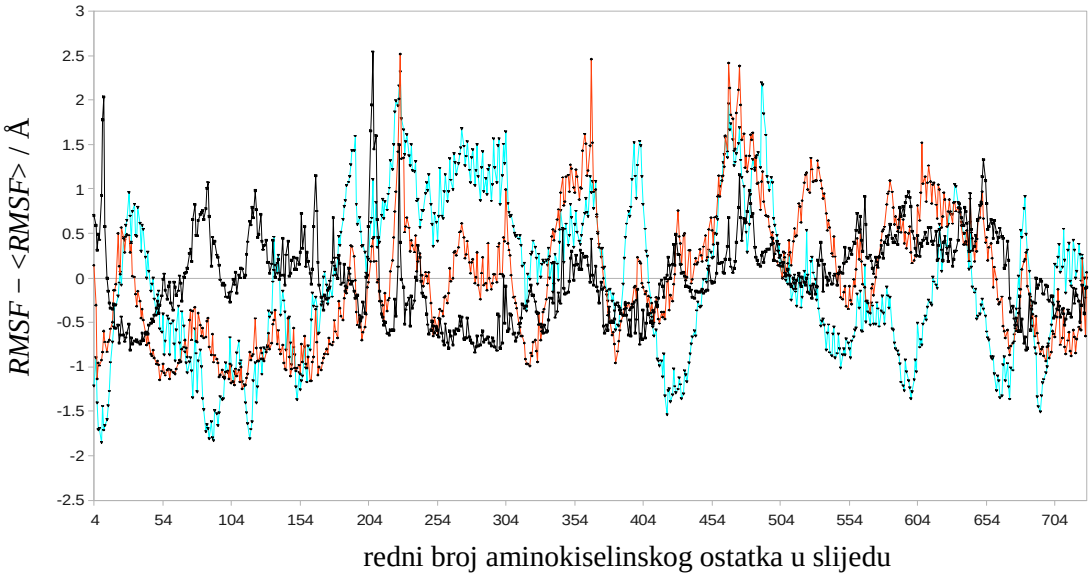


Slika 49. Koordinacija cinka u kompleksu: a) oWT-RRNA$_{MD}$ nakon 10 ns MD simulacije, b) oN406Q-RRNA$_{MD}$ nakon 10 ns MD simulacije, c) oN406S-RRNA$_{MD}$ nakon 5 ns MD simulacije, i d) oN406Q-INH$_{MD}$ nakon 2,5 ns MD simulacije. Ružičasta kuglica predstavlja cink, a aminokiselinski ostaci i molekule vode (WAT) koji ga koordiniraju prikazani su štapićima i kuglicama. Ružičaste iscrtkane linije predstavljaju koordinativnu vezu, a iscrtkane plave linije vodikove veze.

U kompleksu oN406Q-RRNA$_{MD}$ (slika 49b) nedostaju vodikove veze, prisutne u divljem tipu enzima, između molekule supstrata i Glu508 i Ser504 (slika 49a). Inhibitor u kompleksu sa mutantom N406Q tvori slabe van der Waalsove interakcije sa Ser504 tijekom zadnjih 0,5 ns MD simulacije (slika 49d).

Kako bi se podrobnije istražio utjecaj mutacija na fleksibilnost pojedinih regija proteina, ali i na ukupnu fleksibilnost proteina, izračunati su *RMSF* profili za divlji tip i obje mutirane forme enzima (slika 50). Najveća razlika u izračunatim *RMSF* vrijednostima odgovara aminokiselinama koje čine „donju“ domenu proteina. U mutiranim kompleksima dolazi do povećanja fleksibilnosti regije iz „donje“ domene proteina koja se nalazi odmah ispod

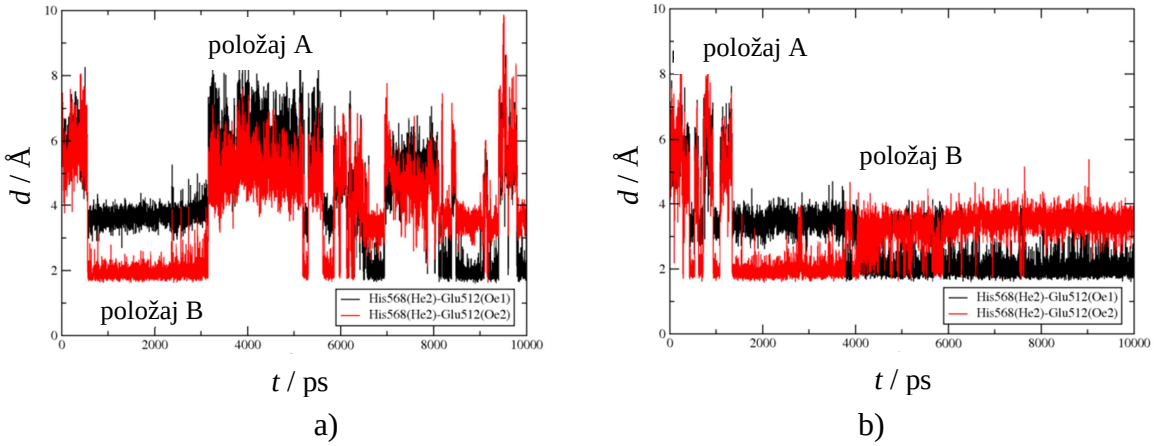
aktivnog mjesta enzima (kojoj pripada i „mutirani“ Asn406), dok ostatak „donje“ domene pokazuje manju fleksibilnost. U kompleksu oN406Q-RRNA$_{MD}$ dolazi do blagog pomaka β-ploče iz „donje“ domene (aminokiselinski ostaci 388-408) smještene odmah ispod aktivnog mjesta prema „gornjoj“ domeni. Nadalje, razlike *RMSF* vrijednosti ukazuju na povećanu relativnu pokretljivost α-zavojnice koja povezuje „donju“ i „gornju“ domenu u mutiranim proteinima, kao i povećanu krutost „gornje“ domene u mutantu N406Q.



Slika 50. Razlike *RMSF* vrijednosti (*RMSF* − <*RMSF*>) pojedinih aminokiselina izračunate tijekom zadnjih 5 i 2 ns MD simulacija kompleksa divljeg tipa enzima (crna linija, oWT-RRNA$_{MD}$ od 25. do 30. ns MD simulacije) i mutiranih oblika (crvena linija: oN406S-RRNA$_{MD}$ od 3. do 5. ns MD simulacije; tirkizna linija: oN406Q-RRNA$_{MD}$, od 8. do 10 ns MD simulacije) enzima sa sintetičkim supstratom uzimajući u obzir samo atome koji čine okosnicu proteina. Aminokiselinski sljedovi 4-335, 374-416 i 670-726 čine „donju“ domenu, a 336-373, 417-458 i 493-669 „gornju“ domenu, dok aminokiseline u slijedu od 459. do 492. čine „fleksibilnu“ petlju „gornje“ domene. Aminokiseline u nizu od 337. do 374. dio su α-zavojnice koja povezuje „donju“ i „gornju“ domenu.

Tijekom MD simulacije kompleksa oN406Q-RRNA$_{MD}$, katalitički važna aminokiselina His568 stabilizirana je vodikovom vezom s Glu512 (slika 51). U tom položaju His568 ne ostvaruje interakcije sa supstratom, te je time smanjen njegov doprinos u samoj reakciji. To se slaže s eksperimentalnim rezultatima koji upućuju na značajno smanjenje katalitičke efikasnosti mutanta N406Q. S druge strane, prema MM-PBSA računima, afiniteti vezanja

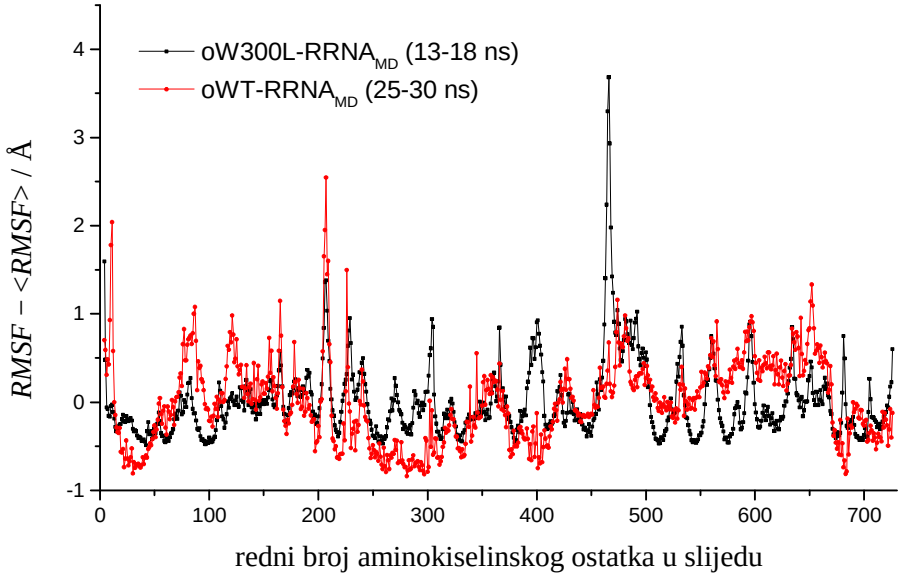
molekule RRNA za divlji i mutirani tip enzima je praktički jednak (tablica 9), tj. razlike energija su reda veličine standardne devijacije.



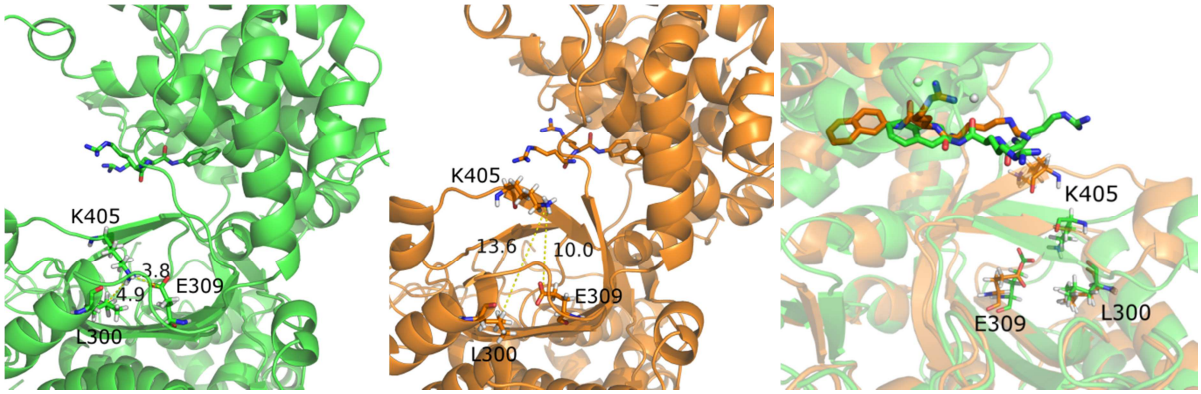
a) b)

Slika 51. Dva položaja His568 tijekom 10 ns MD simulacije kompleksa: a) oWT-RRNA$_{MD}$ i b) oN406Q-RRNA$_{MD}$. Promjena udaljenosti između Nε vodika His568 (He2) i karboksilnih kisika, Oe1 i Oe2, Glu512 prikazana je crnom i crvenom linijom. Položaji A i B ilustrirani su na slici 47.

Rezultati MD simulacija provedene s molekulom supstrata (RRNA) vezanom na način da koordinira atom cinka i nalazi se iznad β-ploče iz „donje“ domene proteina u veznom mjestu „otvorene“ forme mutanta W300L DPP III (tzv. kompleks oW300L-RRNA$_{MD}$) potvrđuju pretpostavku da evolucijski očuvani Trp300 sudjeluje u vezanju liganda i to na način da pomaže u održavanju funkcionalnog integriteta podmjesta S2 u enzimu.[13] U divljem tipu enzima trodimenzionalna strukture β-ploče sastavljene od 5 β-vrpci iz „donje“ domene proteina stabilizirana je vodikovim vezama između indolnog prstena Trp300 i Glu309, kao i CH-π, kation-π i van der Waalsovim interakcijama između indolnog prstena Trp300 i također evolucijski potpuno očuvanog Lys405. Gubitak navedenih interakcija uslijed mutacije triptofana 300 u leucin, za posljedicu ima povećanje fleksibilnosti navedenih β-vrpci iz „donje“ domene proteina (porast u delta *RMSF* vrijednostima za aminokiseline koje se nalaze u okolici Trp300 i Lys405, slika 52) i narušavanje tercijarne strukture β-ploče (slika 53) sastavljene od 5 β-vrpci iz „donje“ domene i njezinog pomicanja prema „gornjoj“ domeni. Budući da prvi arginin s N-kraja molekule supstrata (P2 aminokiselinski ostatak) interagira s aminokiselinama iz te β-ploče (aminokiselinski ostaci 389. do 409.), narušavanjem tercijarne stukture β-ploče narušavaju se i te interakcije. Pri tom je važno naglasiti da aminokiseline 389. do 412. pripadaju jednoj od pet očuvanih regija primarne strukture unutar obitelji M49.



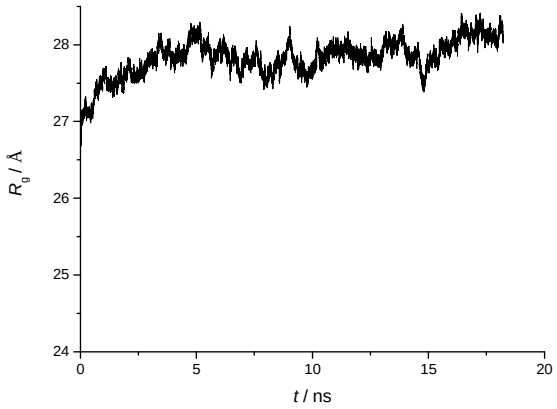
Slika 52. Razlike *RMSF* vrijednosti (*RMSF* − <*RMSF*>) pojedinih aminokiselina izračunate tijekom zadnjih 5 ns MD simulacije kompleksa divljeg tipa enzima (crvena linija: oWT-RRNA$_{MD}$ od 25. do 30. ns MD simulacije) i mutanta W300L DPP III (crna linija: oW300L-RRNA$_{MD}$ od 13. do 18. ns MD simulacije) sa supstratom RRNA uzimajući u obzir samo atome koji čine okosnicu proteina.



a) b) c)

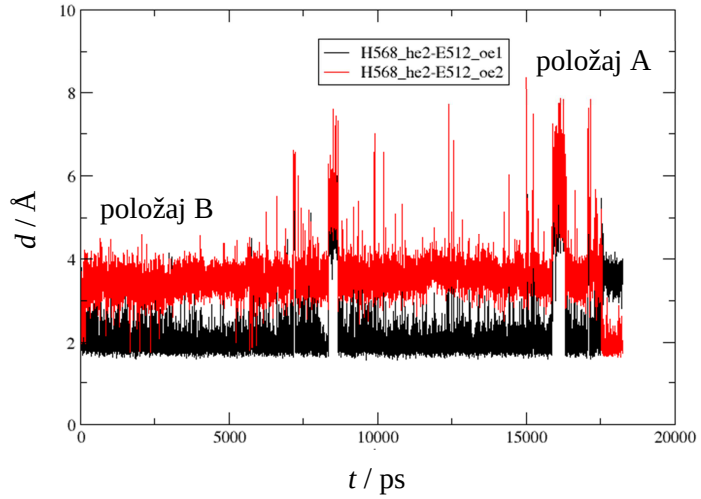
Slika 53. Vezno mjesto kompleksa oW300L-RRNA$_{MD}$: a) nakon faze uravnoteženja sustava i b) nakon 18 ns MD simulacije. Molekula supstrata RRNA (vodikovi atomi nisu prikazani zbog jasnoće) i aminokiseline Leu300, Glu309 i Lys405 prikazane su štapićima, a atom cinka bijelom kuglicom. Udaljenosti (između Cα atoma) su navedene u Å; c) preklopljeno (s obzirom na „donju“ domenu) vezno mjesto kompleksa iz a) i b).

Blago „otvaranje“ proteina tijekom 18 ns MD simulacije popraćeno je povećanjem radijusa giracije (slika 54).



Slika 54. Radius giracije (R_g) proteina tijekom 18 ns MD simulacije kompleksa oW300L-RRNA$_{MD}$.

Tijekom produktivne MD faze koordinacijski broj cinka je uglavnom šest (monodentatno je koordiniran s His450, Glu451, His455, Glu508, supstratom i molekulom vode), izuzev prvih 5 ns kada Glu508 bidentatno koordinira metal što rezultira koordinacijskim brojem cinka sedam. Tijekom simulacija molekula supstrata u veznom mjestu enzima stabilizirana je vodikovim vezama: a) gvanidino i amino skupine prvog Arg s N-kraja supstrata s Asp372, odnosno Glu451 i b) gvanidino skupine drugog Arg s Glu508. Bočni lanci His568 i Glu512 tvore vodikovu vezu tijekom cijele MD simulacije (slika 55).



Slika 55. Udaljenost (*d*) između Nε vodika His568 (he2) i karboksilnih kisika Glu512 (oe1 i oe2) tijekom 18 ns MD simulacije kompleksa oW300L-RRNA$_{MD}$. Položaji A i B ilustrirani su na slici 47.

4.1.2.1. Određivanje kemijski aktivnog načina vezanja supstrata

Rentgenskom strukturnom analizom određena trodimenzionalna struktura mutanta E451A ljudske DPP III u kompleksu sa pentapeptidom tinorfinom pružila je eksperimentalan uvid u vezanje supstrata, kao i dokaz o postojanju globularnijeg oblika proteina od onog određenog prethodno istom metodom (PDB kod 3FVY). Budući da se tako određen način vezanja molekule supstrata, kao i sama „zatvorena“ konformacija proteina, razlikuju od onih dobivenih MD simulacijama,[112] proveli smo dodatne MD simulacije kako bi se odredio (kemijski) aktivan način vezanja liganda u veznom mjestu enzima, kao i aktivna forma proteina. U tu svrhu priređena su još četiri kompleksa DPP III-RRNA u kojima je molekula supstrata RRNA vezana u dva različita položaja (u položaj određen za molekulu tinorfina, RRNA, ili u položaj određen MD simulacijama, RRNA$_{MD}$) u tri različite forme proteina (u „otvorenu“, oWT, i „zatvorenu“, cWT, formu proteina određenu difrakcijskom analizom, i „zatvorenu“ formu dobivenu dugim MD simulacijama, cWT$_{MD}$); tzv. kompleksi cWT$_{MD}$-RRNA$_{MD}$, oWT-RRNA, cWT$_{MD}$-RRNA i cWT-RRNA.

MM-PBSA metodom određene su slobodne energije vezanja molekule RRNA za različite forme enzima. Entalpijski doprinos izračunat je za tri različita perioda od po 5 ns tijekom 15 ns MD simulacija, a entropijski (korištenjem analize normalnih modova) na 15 ns dugoj trajektoriji koja obuhvaća navedene intervale (tablica 10).

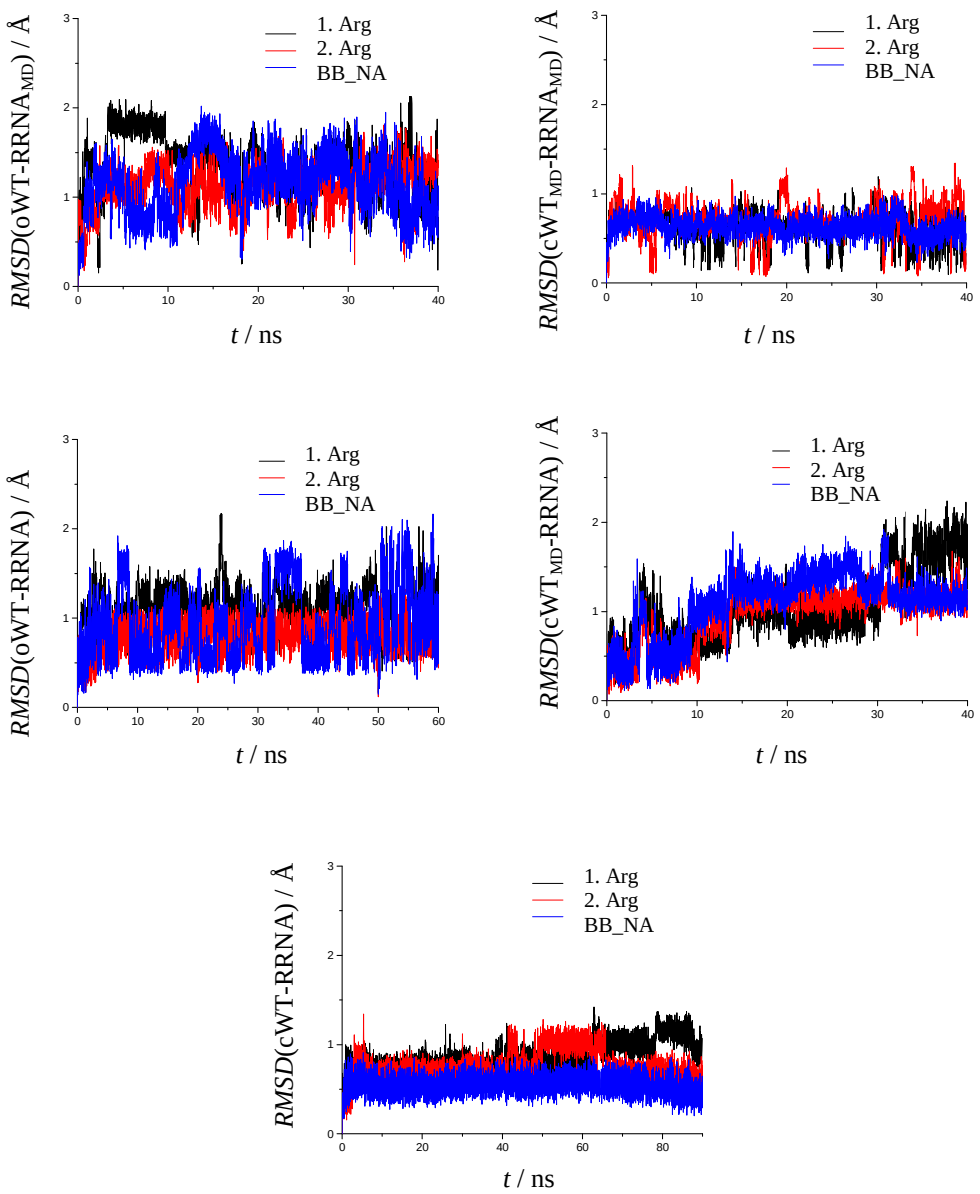
Tablica 10. Entalpijski i entropijski doprinos slobodnoj energiji vezanja molekule Arg-Arg-2-naftilamida (RRNA) u različite forme proteina izračunat MM-PBSA pristupom (dielektrična konstanta vode iznosi 80, a otopljene tvari 2). Korišten je naboj cinka +1,5 *e*.

t / ns		oWT-RRNA$_{MD}$	cWT$_{MD}$-RRNA$_{MD}$	oWT-RRNA	cWT$_{MD}$-RRNA	cWT-RRNA
15-20	$\frac{(\Delta H \pm \mathrm{SD})}{\mathrm{kJ\ mol^{-1}}}$	−155,64 ± 27,20	−234,47 ± 22,22	−291,00 ± 15,61	−272,50 ± 20,17	−500,78 ± 21,80
20-25	$\frac{(\Delta H \pm \mathrm{SD})}{\mathrm{kJ\ mol^{-1}}}$	−183,01 ± 22,26	−232,38 ± 21,21	−293,34 ± 17,24	−283,55 ± 21,05	−484,72 ± 20,71
25-30	$\frac{(\Delta H \pm \mathrm{SD})}{\mathrm{kJ\ mol^{-1}}}$	−183,89 ± 23,43	−245,18 ± 18,91	−288,99 ± 14,48	−271,21 ± 25,27	−487,35 ± 21,09
15-30	$\frac{(T\Delta S_{\mathrm{TRA}} \pm \mathrm{SD})}{\mathrm{kJ\ mol^{-1}}}$	−55,44 ± 0,00	−55,44 ± 0,00	−55,44 ± 0,00	−55,44 ± 0,00	−55,44 ± 0,00
	$\frac{(T\Delta S_{\mathrm{ROT}} \pm \mathrm{SD})}{\mathrm{kJ\ mol^{-1}}}$	−48,20 ± 0.21	−48,49 ± 0,08	−48,33 ± 0,21	−47,95 ± 0,21	−48,62 ± 0,04
	$\frac{(T\Delta S_{\mathrm{VIB}} \pm \mathrm{SD})}{\mathrm{kJ\ mol^{-1}}}$	4,98 ± 41.76	−7,41 ± 31,97	12,09 ± 30,08	−31,92 ± 31,55	−47,03 ± 25,52
	$\frac{(T\Delta S_{\mathrm{TOT}} \pm \mathrm{SD})}{\mathrm{kJ\ mol^{-1}}}$	−98,66 ± 41.80	−111,34 ± 31,97	−91,71 ± 30,04	−135,31 ± 31,59	−151,13 ± 25, 52

Slobodne energije vezanja određene za komplekse gdje je RRNA vezana na „MD način“ u „otvorenu“ i „zatvorenu MD“ formu protein, ukazuju na povećanje stabilnosti kompleksa s povećanjem globularnosti proteina. Iako molekula RRNA interagira s istim aminokiselinama u oba kompleksa, te interakcije su jače i dugotrajnije u kompleksu sa „zatvorenom MD“ formom proteina (tablica 11). Također, stabilnost molekule RRNA je veća u „zatvorenoj“ formi proteina (slika 56). Važno je naglasiti da tijekom cijele MD simulacije cWT$_{MD}$-RRNA$_{MD}$ kompleksa His568 tvori vodikovu vezu s Glu512.

Tablica 11. Dekompozicija entalpijskog doprinosa slobodnoj energiji vezanja po pojedinim aminokiselinskim ostacima (a.o.) enzima za komplekse DPP III sa sintetičkim supstratom RRNA (Arg-Arg-2-naftilamid). Energije su izračunate MM-GBSA pristupom za period od 15. do 30. ns MD simulacija za strukture uzorkovane svakih 100 ps. Navedene su energije a.o. koji doprinose sa više od ±4,18 kJ mol^{-1}. Podebljani su a.o. koji stabiliziraju RRNA i peptidne supstrate (tablica 14) u „zatvorenoj“ formi proteina (cWT).

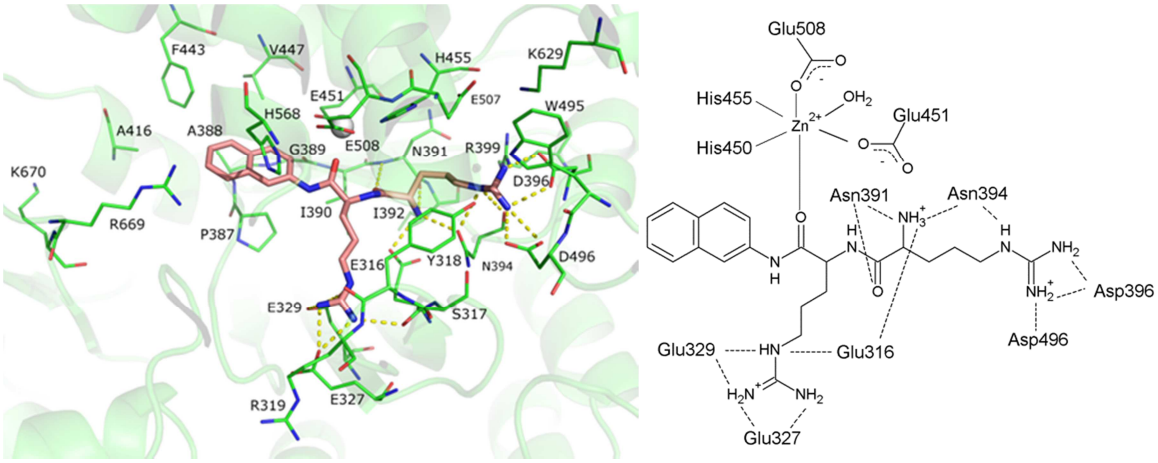
oWT-RRNA$_{MD}$		cWT$_{MD}$-RRNA$_{MD}$		oWT-RRNA		cWT$_{MD}$-RRNA		cWT-RRNA	
a.o.	ΔH / kJ mol^{-1}	a.o.	ΔH / kJ mol^{-1}	a.o.	ΔH / kJ mol^{-1}	a.o.	ΔH / kJ mol^{-1}	a.o.	ΔH / kJ mol^{-1}
E451	−14,10	E451	−23,05	E329	−19,87	E316	−22,64	**E316**	−35,86
H568	−9,71	D372	−21,17	E316	−19,33	E329	−17,49	D396	−25,52
D372	−7,03	F404	−15,56	E327	−13,10	E508	−8,79	**N394**	−17,82
V447	−6,02	H568	−6,69	N391	−12,47	A388	−8,12	E329	−17,61
N406	−4,94	E316	−6,23	P387	−7,91	G389	−7,91	E327	−17,41
E508	−4,48	N406	−5,98	I390	−6,49	P387	−7,78	D496	−17,20
Zn	14,69	V447	−5,48	G389	−6,07	H568	−7,24	**Zn**	−15,31
		H455	−5,44	Y318	−5,82	Q566	−4,60	**Y318**	−15,23
		N391	−5,02	G385	−5,36	F443	−4,27	**N391**	−10,96
		H450	−5,02			Zn	7,74	**H568**	−9,08
		Zn	17,82					**H455**	−8,58
								E507	−8,28
								P387	−7,95
								I390	−5,65
								A388	−4,94
								S317	−4,39
								R399	9,87
								K629	7,66



Slika 56. *RMSD* profili izračunati iz MD trajektorije za glavnu okosnicu i naftilnu skupinu supstrata (plava linija), prvi (crna linija) i drugi (crvena linija) arginin s N-kraja molekule RRNA u svih pet kompleksa DPP III-RRNA.

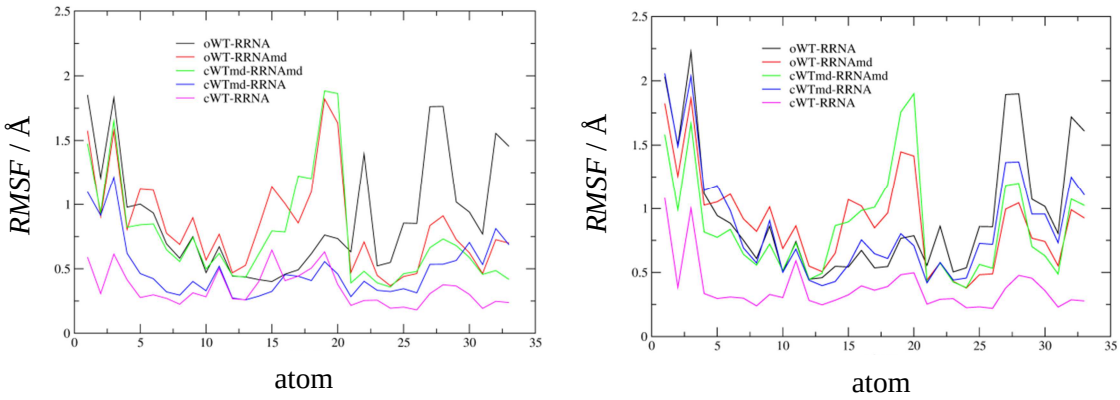
Dodatne simulacije s molekulom RRNA vezanom po uzoru na molekulu tinorfina pokazale su da je vezanje supstrata u izduženoj konformaciji energetski povoljnije od „MD“ načina vezanja (tablica 10). Pri takvom vezanju arginini supstrata tvore β-vrpcu koja se na antiparalelan način veže za β-ploču iz „donje“ domene proteina sastavljenu od pet β-vrpci. Treba naglasiti da nas je primarno zanimala razlika slobodnih energija vezanja tj. zanimao nas je smjer promjene slobodne energije vezanja.

Dekompozicijska analiza (korištenjem MM-GBSA metode, tablica 11) omogućila je određivanje najznačajnijih interakcija između proteina i supstrata RRNA vezanog po uzoru na molekulu tinorfina. U kompleksu cWT-RRNA, vodikove veze koje prva karbonilna skupine s N-kraja supstrata tvori s proteinom (Asn391), kao i one između N-kraja supstrata i proteina (Glu316, Asn391 i Asn394) bile su prisutne tijekom cijele MD simulacije (slika 57). Također, cijelo vrijeme prisutne su i vodikove veze između prvog i drugog bočnog lanca arginina iz molekule RRNA i Asp396/Asp496, odnosno Glu316/Glu327/Glu329. Većina tih vodikovih veza prisutna je i tijekom MD simulacije kompleksa oWT-RRNA i cWT_{MD}-RRNA; kao što su vodikove veze između N-kraja supstrata i Glu316, i bočnog lanca drugog arginina i Glu327, te Glu329. U kompleksu cWT-RRNA, atom cinka značajno doprinosi stabilizaciji molekule supstrata RRNA (cink se nalazi na 2,1 Å od peptidne veze koja sudjeluje u reakciji hidrolize). U kompleksu cWT_{MD}-RRNA udaljenost između cinka i peptidne veze je otprilike 10 Å. Također, u kompleksu cWT_{MD}-RRNA ne postoji mreža vodikovih veza između okosnice supstrata i okosnice susjedne mu β-vrpce koja je dio β-ploče iz „donje“ domene proteina. Važno je naglasiti da bočni lanac prvog arginina iz molekule supstrata u cWT_{MD}-RRNA tvori vodikovu vezu s Glu508, što nije slučaj s kompleksom cWT-RRNA.

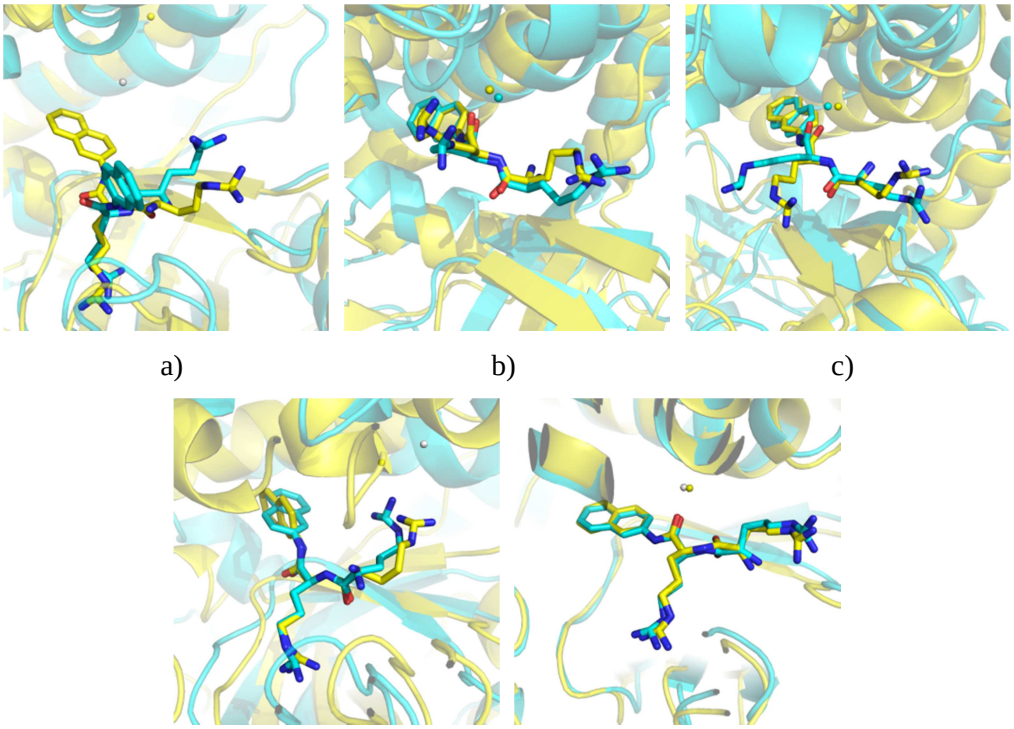


Slika 57. Lijevo: optimizirana struktura kompleksa „zatvorene“ DPP III s Arg-Arg-2-naftilamidom (prikazan štapićima sa ružičasto obojenim ugljikovim atomima) dobivene nakon 30 ns MD simulacija. Štapićima sa zeleno obojenim ugljikovim atomima prikazane su aminokiseline koje se nalaze unutar 4 Å od supstrata. Polarne interakcije naznačene su žutom iscrtkanom linijom. Bijela kuglica predstavlja ion cinka. Vodikovi atomi nisu prikazani zbog jasnoće. Desno: shematski prikaz aktivnog mjesta DPP III s vezanim ligandom.

RMSF analiza napravljena za svaki pojedini atom molekule RRNA (slika 58) ukazuje na smanjenu fleksibilnost supstrata kada je vezan u izduženoj konformaciji u bilo kojoj od „zatvorenih“ formi proteina. S druge strane, povećana fleksibilnost bočnog lanca prvog arginina (atomi 1-7) i naftilamidne skupine (atomi 21-33) uočena je u slučaju kada je RRNA vezana u izduženoj konformaciji u „otvorenoj“ DPP III. Tijekom MD simulacija kompleksa bočni lanac prvog arginina uglavnom je fleksibilniji od bočnog lanca drugog arginina, osim u slučaju cWT-RRNA. Izraženija fleksibilnost bočnog lanca drugog arginina (atomi 14-20) primijećena je u kompleksima gdje je RRNA vezan na „MD način“, tj. cWT_{MD}-$RRNA_{MD}$ i oWT-$RRNA_{MD}$. Kao što je i za očekivati, globularnost proteina negativno je korelirana s fleksibilnošću liganda. Tijekom dodatnih 10 ns simulacija pri povišenoj temperaturi (350 K, slike 56 i 58) nije došlo do značajne promjene fleksibilnosti i mobilnosti molekule RRNA. Samo u slučaju cWT-RRNA i cWT_{MD}-RRNA kompleksa primijećeno je blago povećanje fleksibilnosti bočnog lanca prvog arginina, a u slučaju cWT_{MD}-RRNA i cWT_{MD}-$RRNA_{MD}$ naftilamidne grupe. Ti rezultati predstavljaju dodatnu potvrdu pouzdanosti veznih modova dobivenih MD simulacijama (vezanje molekule RRNA nakon MD simulacija pri 300 i 350 K prikazani su na slici 59).



Slika 58. *RMSF* profili izračunati za svaki pojedini atom molekule supstrata RRNA u svih pet kompleksa DPP III-RRNA: a) za period od 15. do 30. ns (ili 50 i 80 ns) MD simulacije i b) tijekom zadnjih 10 ns pri povišenoj temperaturi (350 K). Vodici nisu uzeti u obzir. Atomi 1-7 i 14-20 čine bočne lance 1., odnosno 2., arginina, atomi 8-13 i 21-23 glavnu okosnicu supstrata, a atomi 24-33 naftilnu skupinu.



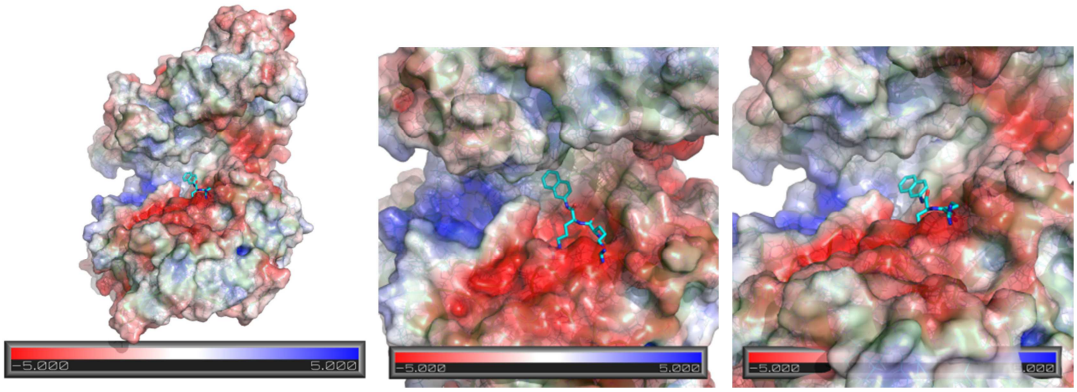
Slika 59. Vezanja supstrata RRNA određeno nakon 30 ns (odnosno nakon 50 i 80 ns) MD simulacija pri 300 K (atom cinka, kuglica, te ugljikovi atomi molekule supstrata, štapići, obojeni su žuto) i nakon 10 ns pri 350 K (atom cinka, kuglica, te ugljikovi atomi molekule supstrata, štapići, obojeni su tirkizno) u kompleksu: a) oWT-RRNA, b) oWT-$RRNA_{MD}$, c) cWT_{MD}-$RRNA_{MD}$, d) cWT_{MD}-RRNA i e) cWT-RRNA.

Kada je RRNA vezan u obliku β-vrpce na antiparalelan način za β-ploču iz „donje“ domene, prvi arginin s N-kraja supstrata i naftilamidna skupina ostvaruju mnogostruke interakcije s aminokiselinama iz obje domene proteina, dok drugi arginin s aminokiselinama većinom iz „donje“ domene (slika 57). To je i za očekivati za aminokiseline koje formiraju β-ploču.

U eksperimentalno određenoj strukturi kompleksa DPP III-tinorfin, atomi iz okosnice prve i treće aminokiseline s N-kraja supstrata tvore vodikove veze s atomima iz okosnice Asn391, odnosno Gly389 (slika 11, žute isprekidane linije), dok u cWT-RRNA kompleksu postoje vodikove veze samo između okosnice prvog Arg i Asn391 (slika 57, žute iscrtkane linije).

Vizualizacija mape elektrostatskog potencijala (eng. *electrostatic surface potential*, izračunate pomoću APBS programa unutar programa PyMol) na površini „otvorene” forme enzima ukazuje na snažnu elektrostatsku stabilizaciju pozitivno nabijenih gvanidino skupina i

N-kraja supstrata s negativno nabijenim aminokiselinama većinom iz „donje“ domene proteina (Glu316, Glu327, Glu329 i Asp396, slike 57 i 60, te tablica 11). Vezanje molekule RRNA na način da su njezini arginini orijentirani prema negativno nabijenom dijelu proteina koje se nalazi uz β-ploču sastavljenu od pet β-vrpci, energetski je izrazito povoljno. U isto vrijeme, naftilamidna skupina je smještena u tzv. hidrofobnom džepu gdje je stabilizirana van der Waalsovim interakcijama s Pro387, Ala388, Gly389, Ile390, Ala416, Phe443 i Val447 i CH-π interakcijama s His568 i Arg669 (slike 57 i 60, te tablica 11). Budući da je dno „gornje“ domene proteina sastavljeno većinom od hidrofobnih aminokiselina (dio obojen bijelo na slici 60), „zatvaranje“ proteina dodatno pomaže povećanju hidrofobnosti S1' podmjesta enzima. S1 i S2 podmjesto enzima sastavljeno je od negativno nabijenih aminokiselina iz „gornje“ domene proteina; Glu451, Glu507, Glu508 i Asp496 (tablica 12).



Slika 60. Mapa elektrostatskog potencijala na površini „otvorene“ forme enzima u kompleksu s RRNA (optimizirana struktura dobivena nakon 30 ns MD simulacije) izračunata APBS programom unutar programa PyMol (prikazane su različite orijentacije proteina). Koncentracija pozitivno (radijusa 2,0 Å) i negativno (radijusa 1,8 Å) nabijenih iona iznosila je 0,05 M, a dielektrične konstante proteina i otapala (radijusa 1,4 Å) iznosile su 2, odnosno 78. Plava i crvena površina odgovaraju potencijalu > 5 $k_B T$, odnosno < −5 $k_B T$ (T = 300 K). Supstrat RRNA prikazan je štapićima.

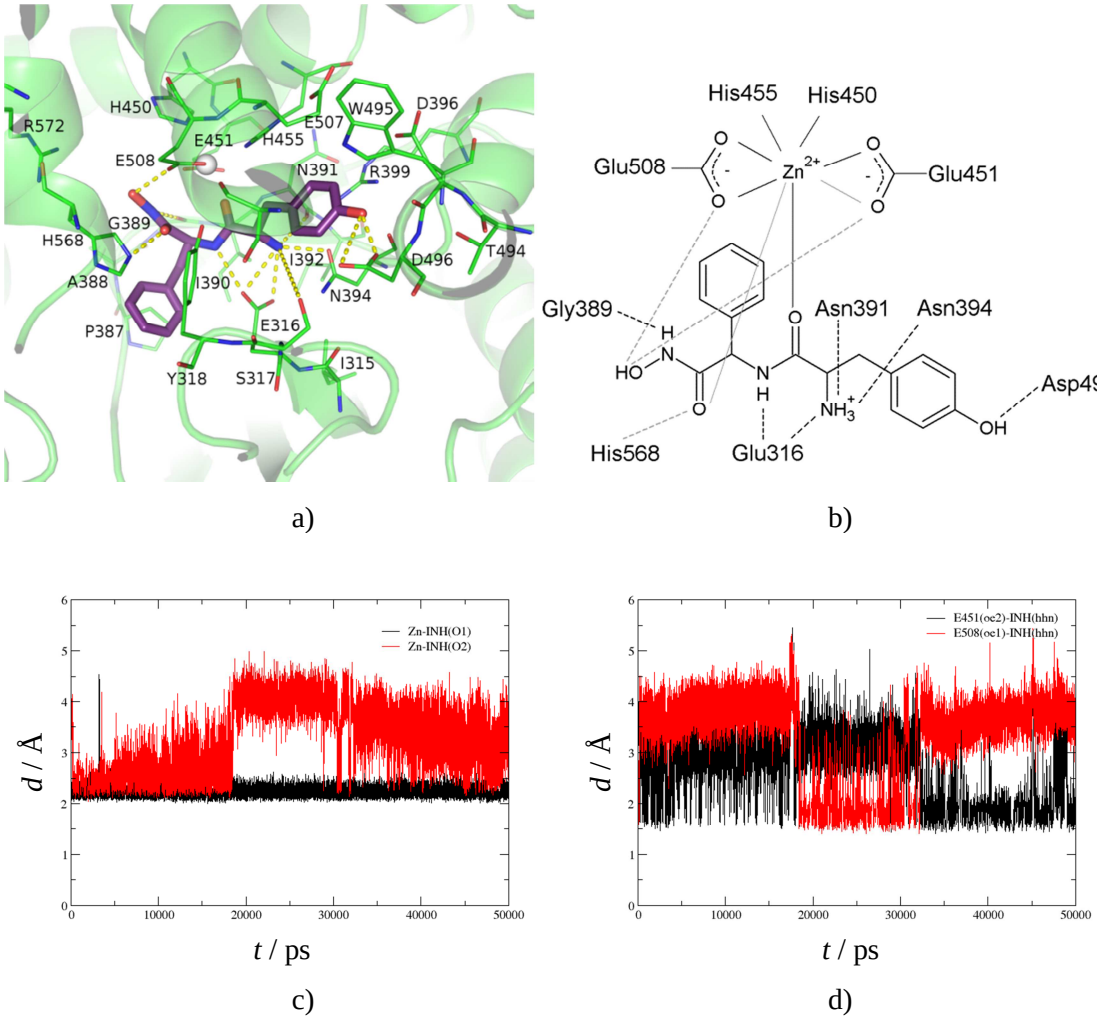
Tablica 12. Aminokiseline koje se nalaze unutar 4 Å od Arg-Arg-2-naftilamida (NA je skraćenica od 2-naftilamid) u strukturi kompleksa dobivenoj nakon 30 ns MD simulacije i 5000 koraka optimizacije geometrije. P1, P2, P1', P2' i P3' su aminokiselinski ostaci supstrata koji interagiraju s odgovarajućim podmjestima enzim (S1, S2, S1', S2' i S3'). Aminokiselinski ostaci koji prema MM-GBSA računu doprinose (±4,18 kJ mol^{-1}) stabilizaciji supstrata (vidi tablicu 11) dani su u kurzivu. Podcrtane aminokiseline destabiliziraju kompleks DPP III-RRNA prema MM-GBSA računu.

	P2	**P1**	**P1'**
cWT-RRNA	**Arg**	**Arg**	**NA**
	S2	**S1**	**S1'**
	E316	R319	*P387*
	S317	*Y318*	*A388*
	Y318	*E327*	*G389*
	N391	*E329*	A416
	I392	*I390*	F443
	N394	E451	V447
	D396	E508	*H568*
	R399		R669
	H455		
	W495		
	D496		
	E507		
	K629		

Simulacije u kojima je RRNA vezana u izduženoj konformaciji pokazale su da očuvani, pozitivno nabijeni, Arg669 tvori CH-π interakcije s naftilamidnom skupinom supstrata. Bezerra i suradnici u svom radu[51] govore o ulozi Arg669 i Lys670 u stabilizaciji C-kraja tinorfina. Također, oni pretpostavljaju da je konformacijska promjena enzima, koja odgovara „zatvaranju“ proteina, posljedica pucanja vodikovih veza između Lys670 i aminokiselinskih ostataka iz C-terminalnog dijela pomične „šarke“ proteina (aminokiseline 409. do 420.) inducirane vezanjem supstrata. Međutim, MD simulacije u kojima je tinorfin zamijenjen s RRNA (u kompleksu cWT-RRNA) pokazale su da ta pretpostavka ne vrijedi za kompleks sa ovim supstratom (RRNA). Iako naftilamidna skupina RRNA tvori CH-π interakcije s Arg669, Lys670 se nalazi predaleko od supstrata da bi mogao ostvarivati interakcije s njim.

MM-PBSA analiza provedena za MD simulacije u kojima je molekula Tyr-Phe-hidroksamata vezana po uzoru na molekulu tinorfina u „zatvorenoj“ formi proteina (slika 61) ukazuju na bolju stabilizaciju (tj. nižu energiju vezanja) inhibitora u veznom mjestu „zatvorene“, nego „otvorene“, forme proteina (tablica 9). Međutim, iako se inhibitor tijekom

cijele (50 ns) MD simulacije nalazi u izduženoj konformaciji, na samom početku produktivne MD faze narušena je struktura vodikovih veza između okosnica inhibitora i susjedne mu β-vrpce koja pripada β-ploči iz „donje“ domene proteina. Razlog tome je rotacija prve peptidne veze uslijed čega karbonilni kisik iz prve peptidne veze inhibitora koordinira atom cinka (slika 61), a Glu316 ostvaruje vodikovu vezu s amidnom grupom iz iste peptidne veze. Očuvane su vodikove veze između amino skupina, tj. N-kraja inhibitora i Glu316, Asn391 i Asn394. Karbonilni kisik fenilalanina (drugi karbonilni kisik s N-kraja inhibitora) koordinira cink prvih 18 ns, nakon čega ostvaruje čvrstu vodikovu vezu s His568. Hidroksamatna skupina stabilizirana je dvjema vodikovim vezama, jednom koja nastaje između N-H grupe i Gly389 i drugom između hidroksilne skupine i Glu508 ili Glu451 (slika 61). Vodikova veza s Glu451 mogla bi objasniti mehanizam inhibicije DPP III s Tyr-Phe-NHOH. Hidroksilna skupina tirozina stabilizirana je vodikovom vezom s Asp496. Osim navedenih vodikovih veza, fenilalanin i tirozin stabilizira niz van der Waalsovih i elektrostatskih interakcija s aminokiselinama iz veznog mjesta enzima; tirozin inhibitora ostvaruje interakcije s Tyr318, Asp396, Arg399, His455, Trp495, Ser504 i Glu507, a fenilalanin s Phe109, Glu316, Tyr318, Pro387, Ile390 i His568.

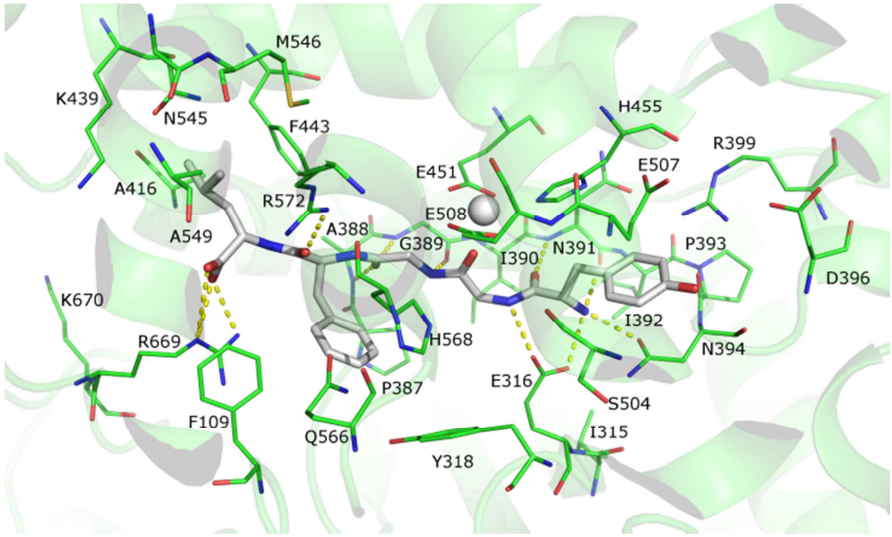


Slika 61. a) vezanje Tyr-Phe-hidroksiamata u veznom mjestu „zatvorene“ forme proteina nakon 30 ns MD simulacije. Štapićima sa zeleno obojenim ugljikovim atomima prikazane su aminokiseline koje se nalaze unutar 4 Å od inhibitora. Polarne interakcije naznačene su žutom isprekidanom linijom. Bijela kuglica predstavlja ion cinka. Vodikovi atomi nisu prikazani zbog jasnoće. b) shematski prikaz aktivnog mjesta DPP III s vezanim inhibitorom (sivom bojom naznačene su vodikove ili koordinativne veze koje nisu prisutne cijelo vrijeme tijekom simulacije). Udaljenosti između: c) cinka i prvog ili drugog karbonilnog kisika s N-kraja inhibitora i d) vodika hidroksidne skupine inhibitora i karboksilnog kisika Glu451 ili Glu508, tijekom 50 ns MD simulacije.

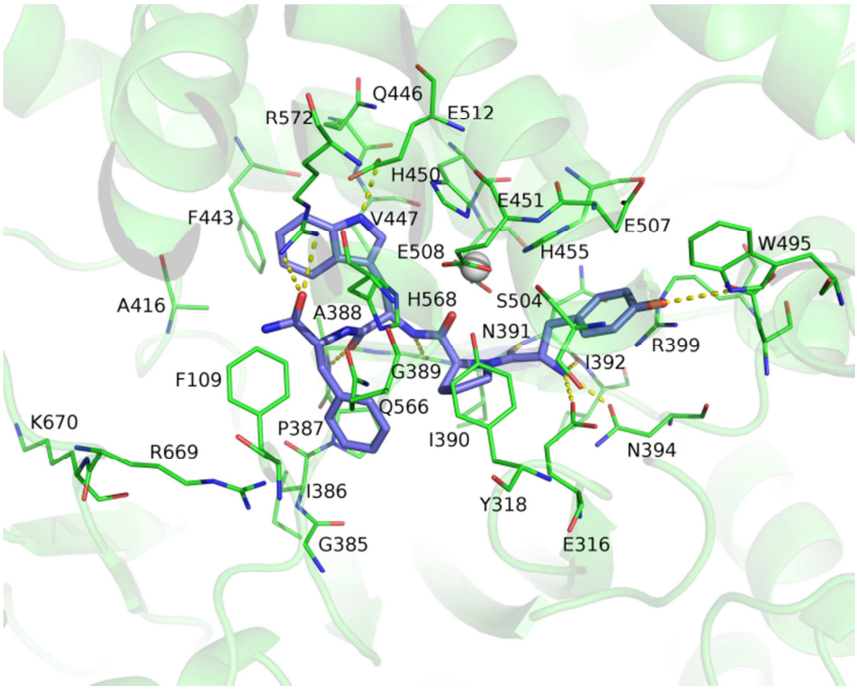
Važno je naglasiti da je tijekom 50 ns duge MD simulacije kompleksa cWT-INH, atom cinka koordiniran sa 7 liganada. Tijekom prvih 18 ns His450, Glu451 i His455 monodentatno koordiniraju cink, a inhibitor i Glu508 bidentatno, dok tijekom preostalih 32 ns MD simulacije inhibitor većinom monodentatno koordinira Zn^{2+}, a Glu451 bidentatno. Tijekom simulacija nije došlo do ulaska vode u koordinacijsku sferu cinka.

4.2. Supstratna specifičnost

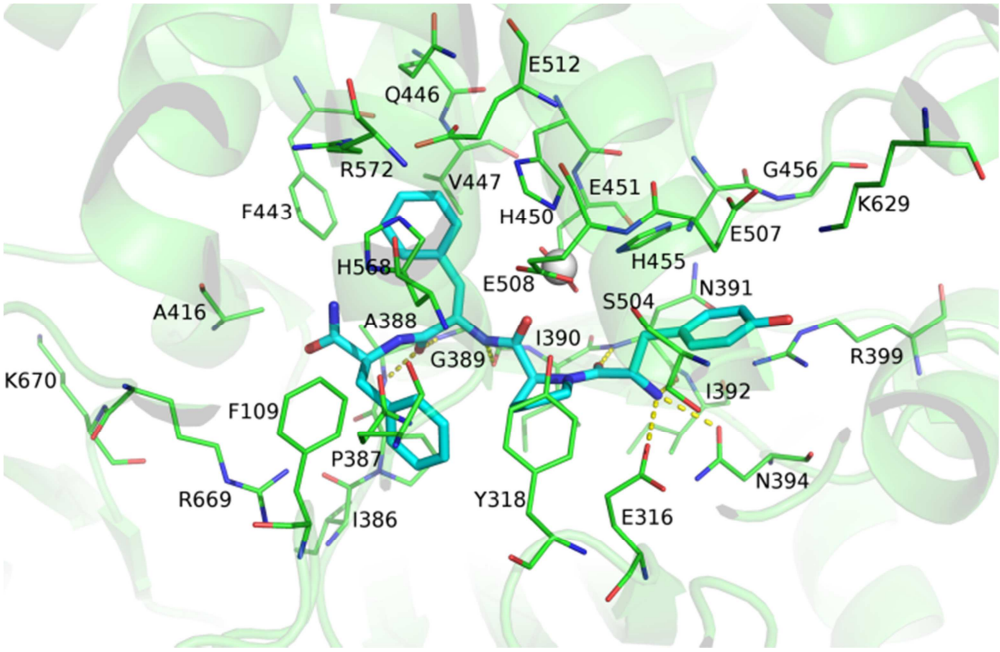
Dokazano je da ljudska DPP III osim Arg-Arg-2-naftilamida hidrolizira i druge supstrate, sintetičke kao što su Phe-Arg-2-naftilamid i Ala-Arg-2-naftilamid,[104] te prirodne peptide kao što su endomorfin-1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH_2), endomorfin-2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH_2), Leu-enkefalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) i tinorfin (Val-Val-Typ-Pro-Trp).[10] U svrhu razumijevanja široke supstratne specifičnost ljudske DPP III provedene su MD simulacije kompleksa DPP III, u „zatvorenom“ obliku, s peptidnim supstratima. Optimizirane strukture kompleksa dobivene nakon 30 ns duge MD simulacije prikazane su na slici 62.



a)



b)



c)

Slika 62. Optimizirane strukture kompleksa „zatvorene“ DPP III i: a) Leu-enkefalina (prikazan štapićima sa sivo obojenim atomima ugljika), b) endomorfina-1 (prikazan štapićima s plavo obojenim atomima ugljika) i c) endomorfina-2 (prikazan štapićima s tirkizno obojenim atomima ugljika) dobivene nakon 30 ns MD simulacija. Aminokiseline koje se nalaze unutar 4 Å od supstrata prikazane su štapićima sa zeleno obojenim atomima ugljikaa. Polarne interakcije naznačene su žutom iscrtkanom linijom. Bijela kuglica predstavlja ion cinka. Vodici nisu prikazani zbog jasnoće.

Entalpijski i entropijski doprinosi slobodnoj energiji vezanja molekule supstrata u aktivno mjesto enzima dani su u tablici 13, a rezultati dekompozicijske analize, izračunati MM-GBSA metodom, u tablici 14. Uočava se da je vezanje peptidnih supstrata manje egzergono od vezanja RRNA (tablica 10).

Tablica 13. Entalpijski i entropijski doprinosi slobodnoj energiji vezanja molekula supstrata, Leu-enkefalina (L-EN), endomorfina-1 (EN1) i endomorfina-2 (EN2), u „zatvorenu“ formu proteina (cWT) izračunati MM-PBSA pristupom pri čemu su dielektrične konstante otapala i otopljene tvari 80, odnosno 2, a naboj cinka +1,5 *e*.

t / ns		cWT-L-EN	cWT-EN1	cWT-EN2
15-20	(ΔH ± SD) / kJ mol^{-1}	−284,76 ± 17,87	−304,76 ± 17,74	−253,93 ± 17,82
20-25	(ΔH ± SD) / kJ mol^{-1}	−273,68 ± 17,95	−305,64 ± 16,82	−259,78 ± 17,70
25-30	(ΔH ± SD) / kJ mol^{-1}	−264,35 ± 15,86	−305,64 ± 19,08	−260,16 ± 15,10
15-30	($T\Delta S_{TRA}$ ± SD) / kJ mol^{-1}	−56,15 ± 0,00	−56,48 ± 0,00	−56,27 ± 0,00
	($T\Delta S_{ROT}$ ± SD) / kJ mol^{-1}	−49,79 ± 0,08	−49,41 ± 0,04	−48,99 ± 0,04
	($T\Delta S_{VIB}$ ± SD) / kJ mol^{-1}	2,05 ± 37,61	7,66 ± 25,98	−9,04 ± 42,72
	($T\Delta S_{TOT}$ ± SD) / kJ mol^{-1}	−103,85 ± 37,57	−98,24 ± 25,98	−114,27 ± 42,76

Tablica 14. Dekompozicija entalpijskog doprinosa slobodnoj energiji vezanja po pojedinim aminokiselinskim ostacima (a.o) enzima za komplekse DPP III s peptidnim supstratima: Leu-enkefalin (L-EN), endomorfin-1 (EN1) i endomorfin-2 (EN2). Energije su izračunate MM-GBSA pristupom za period od 15. do 30. ns MD simulacije za strukture uzorkovane svakih 100 ps. Naznačeni su a.o. za koje je energijski doprinos veći od −4,18 kJ/mol. Također, podebljani su oni a.o. koji stabiliziraju i peptidne supstrate i RRNA (tablica 11) u „zatvorenoj“ formi enzima (cWT).

cWT-L-EN		cWT-EN1		cWT-EN2	
a.o	ΔH / kJ mol^{-1}	a.o.	ΔH / kJ mol^{-1}	a.o.	ΔH / kJ mol^{-1}
R669	−16,78	**E316**	−18,37	**E316**	−12,93
E316	−15,23	**H568**	−14,64	**N391**	−11,55
N394	−11,46	**N391**	−11,09	**H455**	−10,17
F443	−10,38	**P387**	−10,71	**P387**	−9,96
H455	−9,96	**Y318**	−9,67	**Y318**	−9,08
N391	−9,62	**Zn**	−9,12	**Zn**	−7,95
H568	−8,95	**H455**	−9,04	**N394**	−7,82
P387	−8,41	**N394**	−9,00	**H568**	−7,49
R572	−6,82	R572	−7,03	V447	−7,15
Zn	−5,73	V447	−6,99	G389	−6,69
A388	−5,31	**I390**	−6,28	**I390**	−6,65
E507	−5,19	**A388**	−6,23	**A388**	−6,40
Y318	−5,10	E512	−6,19	F443	−6,32
I390	−4,90	G389	−5,61	H450	−6,15
G389	−4,81	F109	−5,36	F109	−4,90
F109	−4,14	H450	−4,90	**E507**	−4,60
		E507	−4,64		
		F443	−4,06		

Rezultati dekompozicijske analize (tablica 14) pokazali su da se peptidni supstrati vežu u isto vezno mjesto enzima kao i Arg-Arg-2-naftilamid, tj. stabilizirani su s istim aminokiselinama (tablica 15). Međutim, za razliku od elektrostatski stabilizirane molekule RRNA, Leu-enkefalin i endomorfini su većinom stabilizirani van der Waalsovim i CH-π interakcijama, kao i intramolekulskim paralelnim slaganjem aromatskih jedinica (eng. *stacking*).

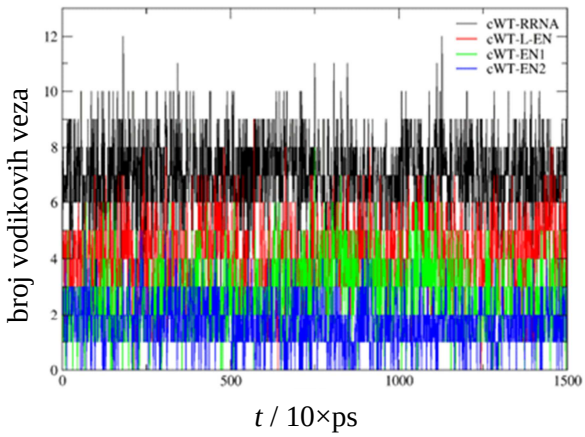
Tablica 15. Aminokiseline koje se nalaze na udaljenostima do 4 Å od molekule supstrata (L-EN, EN1 i EN2, redom Leu-enkefalin, endomorfin-1 i endomorfin-2) u optimiziranom kompleksu cWT-supstrat dobivenom nakon 30 ns MD simulacija. P1 i P2 su aminokiselinski ostaci peptidnog supstrata, od katalitičkog mjesta prema N-kraju, odnosno P1', P2' i P3' prema C-kraju supstrata, koji se smještaju u odgovarajuća podmjesta enzima označna sa S1, S2, S1', S2' i S3'. Aminokiselinski ostaci koji prema MM-GBSA računu značajno doprinose stabilizaciji supstrata (<−4,18 kJ/mol, tablica 14) napisani su u kurzivu.

	P2	**P1**	**P1'**	**P2'**	**P3'**
cWT-L-EN	**Tyr**	**Gly**	**Gly**	**Phe**	**Leu**
	S2	**S1**	**S1'**	**S2'**	**S3'**
	E316	*Y318*	*G389*	*F109*	A416
	N391	*I390*		*Y318*	K439
	N394	*E451*		*P387*	*F443*
	I392	E508		*A388*	N545
	P393	*H568*		Q566	M546
	D396			*H568*	A549
	R399			*R572*	*R669*
	H455			*R669*	
	E507				
	S504				
	P2	**P1**	**P1'**	**P2'**	
cWT-EN1	**Tyr**	**Pro**	**Trp**	**Phe-NH_2**	
	S2	**S1**	**S1'**	**S2'**	
	E316	Y318	A388	F109	
	N391	I390	G389	G385	
	N394	E451	A416	I386	
	R399	E508	F443	P387	
	H455	H568	V447	Q566	
	W495		H450	H568	
	S504		E512	R572	
	E507		R572	R669	
	P2	**P1**	**P1'**	**P2'**	
cWT-EN2	**Tyr**	**Pro**	**Phe**	**Phe-NH_2**	
	S2	**S1**	**S1'**	**S2'**	
	E316	Y318	A388	F109	
	N391	I390	G389	I386	
	N394	E451	A416	P387	
	R399	E508	F443	Q566	
	H455		V447	R572	
	S504		H450	R669	
	E507		E512		
			H568		
			R572		

Najznačajnija je razlika u stabilizaciji aminokiseline u P1 položaju molekule supstrata. Arginin iz molekule RRNA tvori veliki broja vodikovih veza s aminokiselinama iz „donje“

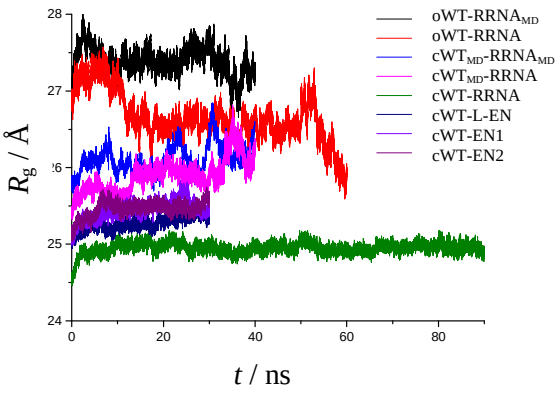
domene proteina (tablica 12), dok je glicin/prolin u slučaju peptidnih supstrata gotovo isključivo stabiliziran van der Waalsovim interakcijama s β-pločom (tablica 15). Iako bočni lanci arginina i tirozina, aminokiseline u P2 položaju RRNA i peptidnih supstrata (tablice 12 i 15), interagiraju s istim aminokiselinama enzima, značajno veća energija stabilizacije molekule RRNA posljedica je većeg broja vodikovih veza. Aromatske aminokiseline u P1' položaju tvore veliki broj van der Waalsovih i CH-π interakcija s aminokiselinama u hidrofobnom džepu proteina, dok glicin iz Leu-enkefalina, ostvaruje samo van der Waalsove interakcije s Gly389 iz „donje“ domene proteina (tablica 15). Sva tri peptidna supstrata imaju vezan fenilalanin u S2' podmjestu koji je stabiliziran van der Waalsovim, CH-π i *stacking* interakcijama s Phe109, Pro387, His568, Arg572 i Arg669, te povremeno s Tyr318 (tablica 15). Leucin iz Leu-enkefalina u podmjestu S3' stabiliziran je vodikovim vezama između njegove C-terminalne karboksilne skupine i bočnog lanca Arg669 (tablica 15 i slika 62), kao i van der Waalsovim i CH-π interakcijama s aminokiselinama iz hidrofobnog džepa proteina. Slične interakcije tvori i molekula tinorfina u kristalografski određenoj strukturi kompleksa DPP III (slika 11). C-terminalna karbonilna skupina tetrapeptida endomorfina-1 tvori vodikovu vezu s Arg572 iz „gornje“ domene proteina.

Slično kao i u slučaju kompleksa cWT-RRNA, Leu-enkefalin i endomorfini podjednako su stabilizirani s aminokiselinama iz obje domene proteina i sa središnjim metalnim ionom (tablica 15). Većina vodikovih veza prisutnih u kompleksima s peptidnim supstratima posljedica je vezanja liganda na antiparalelan način za β-ploču iz „donje“ domene proteina. Međutim, u kompleksu cWT-RRNA, molekula RRNA stabilizirana je s 4-5 dodatnih vodikovih veza koje njezini bočni lance tvore s negativno nabijenim aminokiselinama iz „donje“ domene proteina (slika 63).



Slika 63. Broj vodikovih veza koje supstrati, Arg-Arg-2-naftilamid (RRNA, crna linija), Leu-enkefalin (L-EN, crvena linija), endomorfin-1 (EN1, zelena linija) i endomorfin-2 (EN2, plava linija), tvore s aminokiselinama iz veznog mjesta „zatvorene“ forme (cWT) proteina DPP III. Analiziran je period od 15. do 30. ns MD simulacija. U prosjeku (± standardna devijacija) molekule RRNA, L-EN, EN1 i EN2 redom ostvaruju 7,0 (± 1,5), 4,1 (± 1,4), 2,7 (± 1,3) i 1,7 (± 1,0) vodikovih veza.

Tijekom MD simulacija kompleksa, DPP III je ostala u svojoj početnoj konformaciji (npr. radijus giracije se promijenio najviše za 5 %, slika 64). Samo je u slučaju kompleksa oWT-RRNA došlo do postepenog „zatvaranja“ proteina, prvo blagog (nakon ~10 ns MD simulacija pri 300 K), a potom izraženijeg (tijekom zadnjih 10 ns MD simulacija pri povišenoj temperaturi). Račun slobodne energije vezanja (tablica 13) napravljen je na dijelu trajektorije gdje se radijus giracije proteina promijenio najviše za 5 % od svoje početne vrijednosti (početni dio MD simulacije).



Slika 64. Promjena radijusa giracije tijekom MD simulacija kompleksa DPP III-supstrat. RRNA, L-EN, EN1 i EN2 su redom Arg-Arg-2-naftilamid, Leu-enkefalin, endomorfin-1 i endomorfin-2. Aminokiselinski ostaci 462. do 490. koji čine „fleksibilnu petlju“ proteina izostavljeni su iz računa.

Iz svega navedenog može se zaključiti da je supstratna specifičnost ljudske DP III definirana s dva faktora: a) sposobnošću supstrata da se veže u obliku β-vrpce, i b) pozitivno nabijenim N-krajem molekule supstrata. Važno je primijetiti da su β-ploča, za koju se na antiparalelan način veže molekula supstrata, i aminokiseline koje sudjeluju u stabilizaciji N-kraja supstrata dio prve i druge visoko očuvane regije iz obitelji DPP III,[3] što upućuje na njihovu važnost u enzimskoj aktivnosti. Također, pokazano je da različite aminokiseline imaju različite „sklonosti“ (eng. *propensity*) tvorenju β-nabranih ploča, pri čemu su Val, Ile, Leu, Cys, Phe, Tyr, Trp, Thr i Met najbolji kandidati.[113] Uistinu, prirodni supstrati DPP III, kao što su endomorfin-1(Tyr-Pro-Trp-Phe-NH_2), endomorfin-2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH_2) i Leu-enkefalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu), većinom su sastavljeni od tih aminokiselina. Može se zaključiti da je za vezanje molekule supstrata na način koji će biti kemijski aktivan, nužno da na prva tri položaja (P1, P2 i P1') od N-kraja ima aminokiseline koje pokazuju veću „sklonost“ formiranju β-vrpce. Nadalje, uočena je sklonost P2, P1' i P2' položaja prema aromatskim aminokiselinama (Tyr, Phe i Trp) koje također rado tvore β-vrpce, a u navedenim položajima tvore van der Waalsove, CH-π i *stacking* interakcije s aminokiselinama iz S2, S1' i S2' podmjesta enzima.

Zanimljivo je da su endomorfini i Leu-enkefalin supstrati DPP III iako u P1 položaju imaju prolin/glicin, aminokiseline za koje se smatra da narušavanju formiranje sekundarne strukture β-ploče. To se može objasniti činjenicom da druga aminokiselina s N-kraja supstrata ne sudjeluje u mreži vodikovih veza između okosnice supstrata i β-ploče iz „donje“ domene

proteina. Budući da je sekundarna struktura neke regije posljedica konsenzusa slijeda aminokiselina nije nužno da sve aminokiseline u nizu preferiraju navedenu strukturu. Tako su npr. za formiranje α-zavojnice potrebne minimalno 4 aminokiseline, od 6 u nizu, koje pokazuju sklonost prema toj strukturi, dok je pri formiranju β-vrpce potrebno imati 3 od 5 aminokiselina u nizu s većom sklonošću prema toj strukturi. Pojedinačne „pogreške“ poprimaju sekundarnu strukturu svojih susjeda.

Već su 1967. Ellis i Nuenke[38] pokazali da je RRNA od svih dipeptidil-2-naftilamida najbolji supstrat DPP III, dok su Ala-Ala-2-naftilamid, Lys-Lys-2-naftilamid, Gly-Arg-2-naftilamid, Ser-Tyr-2-naftilamid, Leu-Ala-2-naftilamid i Lys-Ala-2-naftilamid vrlo loši supstrati. Iako Arg, kao i ostale aminokiseline (Lys, Ala, Ser) dipeptidil-2-naftilamidnih supstrata, pokazuje nisku „sklonost“ formiranju β-vrpce, arginini, u kompleksu cWT-RRNA, kompenziraju to stvaranjem velikog broja vodikovih veza s aminokiselinama u veznom mjestu enzima što potvrđuju i MD simulacije (80 ns) tijekom kojih RRNA ostaje vezana na antiparalelan način za β-ploču iz „donje“ domene proteina (slika 56). To međutim nije slučaj s ostalim dipeptidil-2-naftilamidnim supstratima.

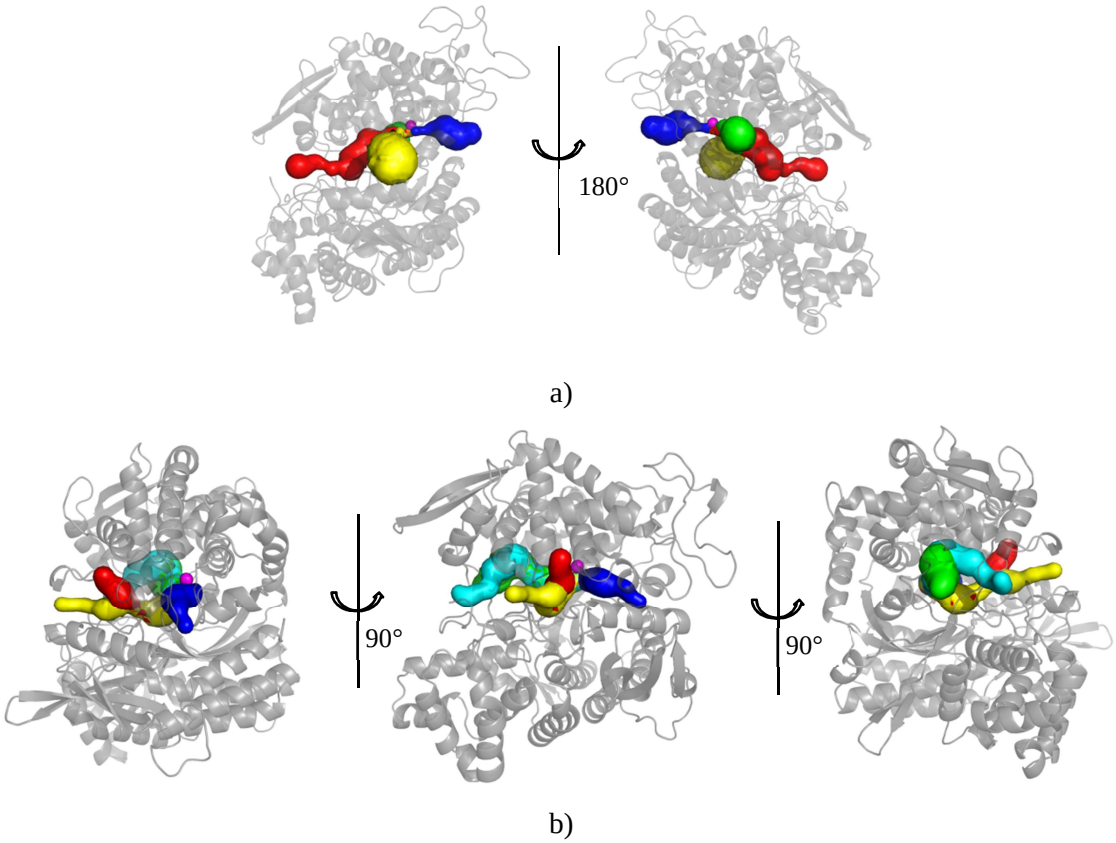
Model supstratne specifičnosti koji se bazira na sklonosti aminokiselina formiranju sekundarne strukture β-vrpce sužava supstratnu specifičnost DPP III, ali i objašnjava otpuštanje molekule produkta iz veznog mjesta enzima. Naime, pucanjem peptidne veze narušava se stabilizacija β-vrpce što olakšava otpuštanja produkata.

4.3. Ulazak/izlazak liganda u/iz aktivnog mjesta enzima

Pristup molekula otapala aktivnom mjestu „zatvorene“, eksperimentalne i teorijske, forme enzima ispitan je programom CAVER (pri čemu je najuži dio tunela definiran radijusom molekule vode od 1,4 Å) i/ili RAMD simulacijama. Na taj način određeni su mogući pristupni putevi (tzv. tuneli) koji povezuju atom cinka i vanjsko otapalo.

U slučaju „zatvorene MD“ forme proteina, programom CAVER, identificirana su četiri moguća tunela za ulazak/izlazak molekule vode (slika 65a). Ulaz najkraćeg tunela (dužine otprilike 21 Å, plavi tunel) kojeg čine aminokiseline Ile301, Lys304, Leu369, Thr370 i Asp372, promjera je 3,4 Å, dok promjer ulaza najdužeg tunela (dužine otprilike 43 Å, crveni tunel) iznosi svega 1,1 Å (slika 65a). Iako je crveni tunel (definiran s aminokiselinama Phe109, Thr112, Tyr318, Glu555, Leu663 i Lys666) prilično uzak, izračunati *B-faktori* (slika

34) ukazuju na značajnu fleksibilnost tog dijela enzim, što upućuje na njihovu prilagodljivost ulasku molekule vode ili supstrata.

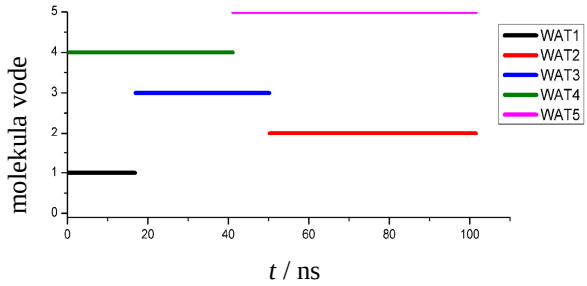


Slika 65. Glavni tuneli (prikazani različitim bojama) određeni programom CAVER za: a) „zatvorenu“ strukturu dobivenu nakon 101 ns MD simulacije „otvorene“ forme enzima i b) rentgenskom strukturnom analizom određenu strukturu „zatvorene“ forme enzima. Prikazane su različite orijentacije. Ružičasta kuglica odgovara atomu cinka.

Tri od ova četiri tunela, tj. plavi, crveni i žuti, potvrđeni su RAMD simulacijama provedenima unutar programskog paketa AMBER8. Za izlazak iz aktivnog mjesta enzima molekula vode najčešće je koristila plavi tunel (72 %), dok su crveni i žuti tuneli korišteni podjednako često.

Tijekom 101 ns (od ukupno 207 ns) MD simulacije „otvorene“ forme enzima (oWT-1 strukture) ion cinka, osim s His450, Glu451, His455 i Glu508, monodentatno je koordiniran i s dvije molekule vode. Unutar tog vremenskog intervala (101 ns) sveukupno pet molekula vode izmjenjuju se u koordinaciji cinka. Međutim, nikada više od dvije molekule vode ne koordiniraju istovremeno cink i nikada se ne izmjenjuju obje odjednom (slika 66). Izmjena s

molekulama u okolnom otapalu (*bulk*-u) odvijala se podjednako koristeći plavi i žuti tunel. Proces izmjene je puno brži na početku simulacije nego tijekom zadnjih 50 ns. Razlog tome je najvjerojatnije sužavanje ulaza u aktivno mjesto enzima uslijed konformacijske promjene enzima. Dodatna potvrda tome su preostalih 100 ns MD simulacije (ukupno 207 ns) tijekom kojih nije došlo do izmjene molekula vode WAT2 (označena crvenom bojom na slici 66) i WAT5 (označena ružičastom bojom na slici 66), tj. te dvije molekule vode koordiniraju cink sve do kraja MD simulacije.



Slika 66. Vrijeme unutar kojega određena molekula vode koordinira atom cinka tijekom 101 ns MD simulacije „otvorene“ forme proteina.

Najuži dio žutog tunela (s ulazom promjera 5 Å) okružen je s Asn391, His568 i Glu508, tj. aminokiselinama koje čine vezno mjesto enzima.

RAMD simulacije kojima su proučavani putevi izlaska molekule supstrata (RRNA) iz veznog mjesta „zatvorene MD“ forme proteina slažu se s onima dobivenim programom CAVER. Iako molekula RRNA za izlazak iz aktivnog mjesta koristi sva četiri tunela prikazana na slici 65a, plavi i žuti tunel korišteni su u 90% slučajeva i to s podjednakom vjerojatnošću.

Programom CAVER identificirano je pet glavnih tunela (označeni različitim bojama na slici 65b) koje molekula vode koristi za izlazak iz aktivnog mjesta difrakcijom X-zraka određene „zatvorene“ forme enzima (PDB kod 3T6B). Razlika između tirkiznog i zelenog, kao i crvenog i žutog tunela, je u dijelu tunela koji je najizloženiji otapalu (ulaz u protein), dok je dio tunela koji prolazi kroz unutrašnjost proteina isti. Plavi tunel je najkraći (dužine 17,5 Å), dok su zeleni i crveni tuneli skoro dvostruko duži, 30.3 Å, odnosno 31,6 Å. Budući da su tirkizni i žuti tunel za otprilike 7 Å dulji od zelenog, odnosno crvenog, može se govoriti o postojanju samo tri tunela tj. plavog, zelenog i crvenog.

Na samom ulazu u plavi tunel nalaze se aminokiseline Ser194, Tyr196 i Lys294, dok unutrašnjost oblažu aminokiseline za koje je dokazano da definiraju vezno mjesto enzima (Ile315-Tyr318, Gly389-Arg399, His450, Glu451, His455, Thr494-Ser497, Ala503-Glu508, His568 i Arg629). Ovaj tunel sličan je žutom tunelu identificiranom u „zatvorenoj MD“ strukturi enzima. Ulazni dio zelenog tunela definiran je s Gly13-Ser15, Val415-Gln420 i Glu667-Lys670, aminokiselinama koje čine ili se nalaze u okolici tzv. pomične „šarke“, nakon čega slijede Asn545, Arg548, Ala549, Gln566, His568, Met569 i Arg572, te ostale aminokiseline iz veznog mjesta enzima. Važno je primijetiti da su zeleni tuneli identificirani u obje „zatvorene“ forme enzima slični, s tim da se ulaz u zeleni tunel u eksperimentalno određenoj strukturi nalazi ispod „šarke“, a u MD strukturi iznad „šarke“. Ulazni dio crvenog tunela definiran je s Glu316-Gly323, Thr501-Glu508 i Phe562-Gln570, nakon čega slijede Lys107-Asp111, Glu327, Glu329, Ser384-Asn394, Arg399, Tyr557, Arg638, Tyr641 i Glu642, što ukazuje na sličnost crvenih tunela u obje „zatvorene“ forme.

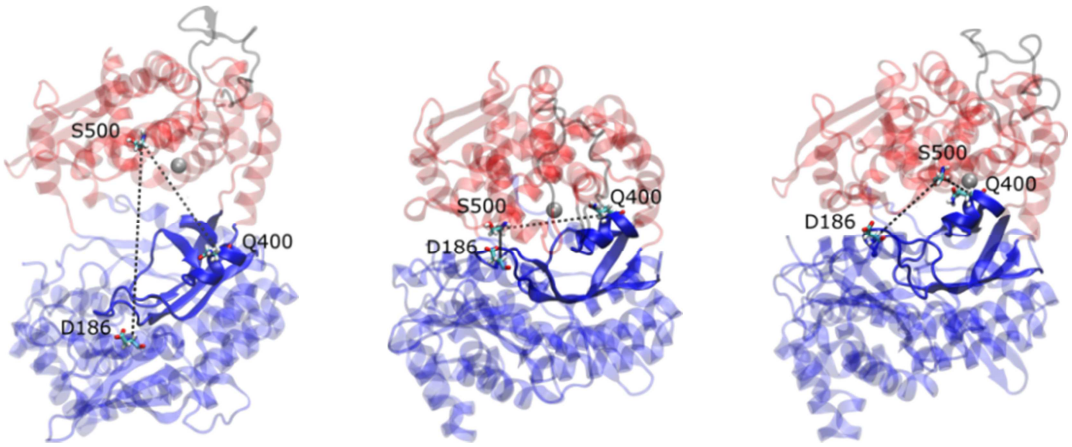
4.4. Konformacijska dinamika DPP III i vezanje liganda

Prema G. G. Hammesu[106] jedan od razloga zašto su enzimi, makromolekule velike molekulske mase, tako efikasni biološki katalizatori je njihova sposobnosti da u otopini poprime različite konformacije. Stoga, potpunije razumijevanje uloge enzima kao katalizatora zahtjeva detaljno poznavanje njihovih konformacijskih promjena.

Prvi korak u reakcijskom mehanizmu enzima je vezanje supstrata. Supstrat može ili inducirati (potaknuti) konformacijsku promjenu enzima (model inducirane prilagodbe) ili se selektivno vezati za jednu od niza postojećih, ravnotežnih konformacija enzima (model pomaka u populaciji, eng. *population-shift model*, ili model konformacijskog odabira, eng. *conformational selection model*, ili model ravnotežne raspodjele konformera eng. *pre-existing equilibrium*). Okazaki i Takada[114] pokazali su da su jake i dalekodosežne interakcije (kao npr. elektrostatske interakcije) između proteina i supstrata uobičajenije za model inducirane prilagodbe, a kratkodosežne interakcije za model pomaka u populaciji. Konformacijska promjena enzima može značajno promijeniti i entropiju sustava, kao i reakcijski okoliš uslijed istiskivanja molekula vode iz unutrašnjosti proteina. To će rezultirati smanjenjem polarizabilnost i promjenom pK_a vrijednosti ionizabilnih skupina iz aktivnog mjesta enzima.

Računalne simulacije i eksperiment ukazali su na konformacijsku promjenu DPP III iz izdužene, tzv. „otvorene“, u kompaktnu, tzv. „zatvorenu“, pri čemu tercijarna struktura pojedinih domena ostaje očuvana (*RMSD* vrijednosti između odgovarajućih domena oWT i cWT, te oWT i cWT_{MD}, struktura su otprilike 0,6 / 1,5 Å („gornje“) i 0,4/ 2,0 Å („donje“)). Iako autori eksperimentalno određene „zatvorene“ strukture DPP III tvrde da vezanje liganda inducira „zatvaranje“ enzima (sukladno modelu inducirane prilagodbe), duge MD simulacije pokazale su da u otopini dolazi do „zatvaranja“ enzima i bez prisustva supstrata (sukladno modelu konformacijskog odabira). U prilog modelu konformacijskog odabira, govori i činjenica da je energetski najpovoljniji način vezanja liganda u obliku β-vrpce za β-ploču iz „donje“ domene proteina uglavnom posljedica kratkodosežnih interakcija između proteina i liganda; vodikove veze između okosnica supstrata i proteina i aromatske interakcije bočnih lanaca aminokiselina na 1.,3. i 4. položaju s N-kraja supstrata.

Nadalje, važno je naglasiti da postoji razlika u međusobnom relativnom položaju domena kod „zatvorene“ forme enzima određene difrakcijom X-zraka i one dobivene MD simulacijama. U „zatvorenoj“ strukturi dobivenoj MD simulacijama, cWT_{MD} (slika 67c), koordinacijska sfera cinka nalazi se iznad β-ploče iz „donje“ domene proteina, dok je u eksperimentalno određenoj, cWT (slika 67b), pomaknuta u smjeru pukotine.



Slika 67. Tri različite konformacije DPP III: „otvorena“ (lijevo) i „zatvorena“ (sredina) struktura enzima određene rentgenskom difrakcijom i „zatvorena“ struktura dobivena MD simulacijama (desno). „Gornja“ domena (aminokiseline 337-374 i 422-668) obojana je crveno, a „donja“ (aminokiseline 1-336, 375-421 i 669-726) plavo. Plavom bojom istaknut je položaj β-ploče sastavljene od pet β-vrpci iz „donje“ domene. Aminokiseline D186, Q400 i S500 prikazane su štapićima, cink sivom kuglicom, a udaljenosti d_1 (D186-S500) i d_2 (Q400-S500) Cα atoma iscrtkanim crnim linijama. Fleksibilna petlja (aminokiseline 463-489) obojana je sivo.

Iako se standardne MD simulacije mogu koristiti za proučavanje konformacijskih promjene enzima, veliki prostorni pomak („zatvaranjem“ enzima kut između dviju domena smanji se za otprilike 60°)[51] i vrijeme potrebno za takav pomak od nekoliko desetaka do stotina ns,[75,112] zahtijevali su upotrebu nekih prilagođenih metoda MD simulacija u takvim istraživanjima. Dakle, kako bi poboljšali uzorkovanje i postigli bolju statistiku, dodatno je provedena serija ubrzanih MD simulacija (AMD), kao i MD simulacija krupnog zrna (CGMD), enzima s vezanim i bez vezanog liganda. Navedenim simulacijama ostvaren je detaljan uvid u konformacijsku promjenu ljudske DPP III, kao i u utjecaj vezanja liganda na konformaciju DPP III. Određena je i forma enzima najpodesnija za vezanje supstrata

Prilikom analize rezultata MD, AMD i CGMD simulacija, razlika između tri poznate forme DPP III (oWT, cWT i cWT_{MD}) opisana je sljedećim geometrijskim parametrima.

Stupanj „zatvorenosti“ proteina, te samim time konformacijska promjena DPP III, opisan je radijusom giracije (R_g). Povećanje globularnosti proteina tijekom simulacije popraćeno je smanjenjem R_g vrijednosti. R_g vrijednosti izračunate za početne oWT, cWT i cWT_{MD} („zatvorena“ struktura dobivena nakon 207 ns MD simulacije) strukture (za atomistički i CG model) dani su u tablici 16. Najveća R_g vrijednost pripada „otvorenoj“ strukturi DPP III, oWT, a najmanja „zatvorenoj“ strukturi dobivenoj difrakcijom X-zraka, cWT.

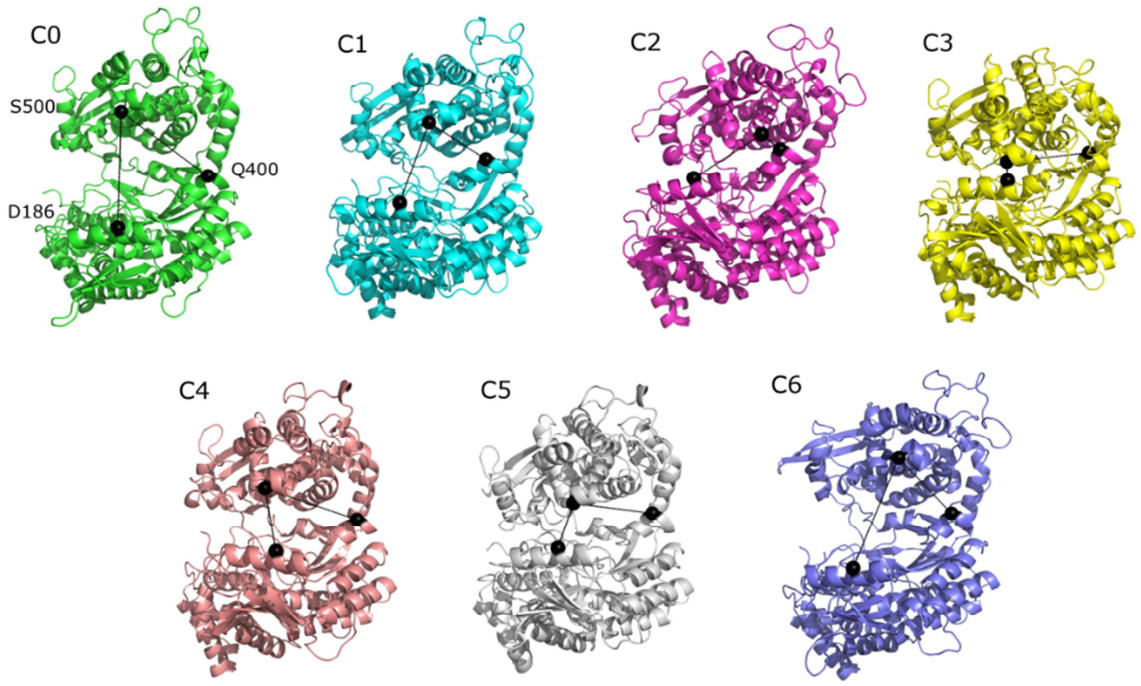
Udaljenostima između Cα atoma aminokiselinskih parova D186-S500 (tzv. d_1 udaljenost) i Q400-S500 (tzv. d_2 udaljenost) definirana je međusobna orijentacija dviju proteinskih domena. Stoga, parametri d_1 i d_2 predstavljaju kriterij za međusobno razlikovanje cWT i cWT_{MD} struktura (vidi sliku 67 i tablicu 16). Aminokiseline D186 i Q400 pripadaju α-zavojnicama iz „donje“ domene, a S500 α-zavojnici iz „gornje“ domene proteina (slika 67). U „zatvorenoj“ strukturi dobivenoj MD simulacijama, udaljenost d_2 (Q400-S500) je znatno manja nego u početnoj, oWT, strukturi (tablica 16).

Tablica 16. Geometrijski parametri korišteni za definiranje stupnja „zatvorenosti“ enzima i tipa „zatvorene“ strukture DPP III. Izračunate su vrijednosti za karakteristične strukture DPP III (za CG i atomistički model). Radijus giracije (R_g) izračunat je za atome iz okosnice proteina (ili zrna iz okosnice proteina) pri čemu su zanemarene aminokiseline koje pripadaju fleksibilnoj petlji iz „gornje“ domene (aminokiseline 463-489).

geometrijski parametri	oWT		cWT		cWT_{MD}	
	CG model	atomistički model	CG model	atomistički model	CG model	atomistički model
R_g / Å	27,1	27,2	24,8	24,7	25,6	25,6
d_1(D186-S500) / Å	38,5	38,5	13,0	11,6	16,9	17,0
d_2(Q400-S500) / Å	25,6	25,2	21,3	20,9	8,8	8,2

4.4.1. Konformacijski klasteri DPP III

Strukture generirane MD i AMD simulacijama mogu se klasificirati u 7 klastera (C0-C6, slika 68).

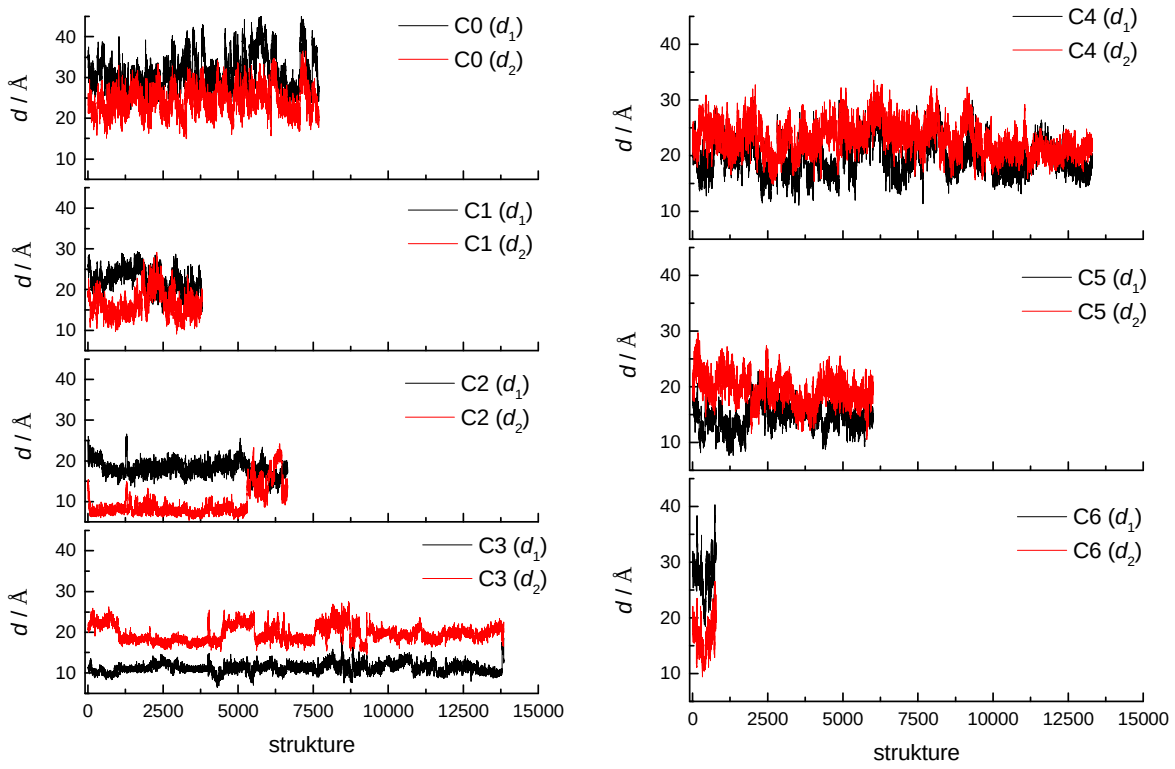


Slika 68. Centroidi klastera C0-C6 dobiveni klasterskom analizom struktura generiranih MD i AMD simulacijama. Cα atomi S500, Q400 i D186 (njihovi položaji naznačeni su na centroidu klastera C0) prikazani su crnim kuglicama.

Iz prosječnih vrijednosti geometrijskih parametara klastera C0 danih u tablici 17, može se zaključiti da ovom klasteru pripadaju „otvorene“ strukture DPP III čije su prosječne R_g, d_1 i d_2 vrijednosti slične onima izračunatim za oWT strukturu (vidi tablicu 16). Po istom principu klasterima C3 i C2 pripadaju „zatvorene“ cWT, odnosno cWT_{MD}, strukture DPP III (vidi tablice 16 i 17). Prosječne R_g vrijednosti klastera C1, C4, C5 i C6 nalaze se između onih određenih za klastere C0 i C3. S obzirom na pripadajuće d_1 i d_2 vrijednosti, strukture iz klastera C1 i C6 predstavljaju prijelazni oblik iz oWT u cWT_{MD} strukturu, a strukture iz klastera C4 i C5, prijelazni oblik iz oWT u cWT strukturu. Svi navedeni prijelazni oblici u daljnjem tekstu zvati će se „**polu(semi)zatvorena“** ili **semiWT** DPP III. Važno je uočiti da klasteri kojima pripadaju semiWT i oWT forme enzima uglavnom imaju veće standardne devijacije parametara d_1 i d_2 (vidi tablicu 17), nego klasteri kojima pripadaju „zatvoreni“ oblici, cWT i cWT_{MD}. To ukazuje na veću varijaciju struktura unutar klastera s „otvorenijim“ strukturama.

Tablica 17. Geometrijski parametri (vidi sliku 67) izračunati za pojedine klastere (C0-C6).

klaster	zastupljenost /%	$\langle R_g \rangle$ / Å	$\langle d_1 \rangle$ / Å	$\langle d_2 \rangle$ / Å
C0	13,3	26,7 ± 0,4	31,1 ± 4,4	24,4 ± 3,3
C1	13,9	26,0 ± 0,3	22,4 ± 2,6	16,5 ± 3,2
C2	11,5	25,4 ± 0,2	18,2 ± 1,8	9,5 ± 3,6
C3	24,0	24,8 ± 0,2	11,2 ± 1,2	19,7 ± 2,0
C4	25,5	25,5 ± 0,3	19,8 ± 3,2	23,0 ± 2,8
C5	10,4	25,2 ± 0,2	14,6 ± 2,4	19,4 ± 2,6
C6	1,3	26,6 ± 0,4	27,7 ± 3,6	16,6 ± 3,0



Slika 69. Udaljenosti između Cα atoma D186-S500 (d_1) i Q400-S500 (d_2) struktura koje pripadaju različitim klasterima (C0-C6). Klasteri su određeni klasterskom analizom trajektorija generiranih MD i AMD simulacijama slobodne DPP III i njenog kompleksa sa supstratom (Arg-Arg-2-naftilamidom).

4.4.2. Mapiranje različitih konformacija dobivenih MD simulacijama

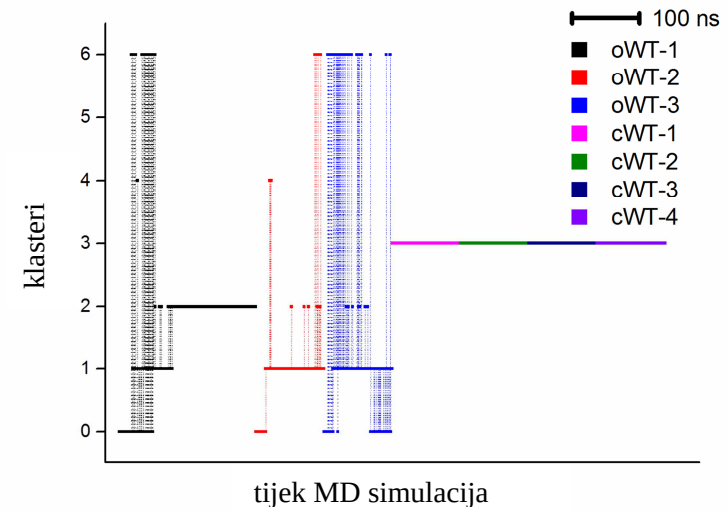
4.4.2.1. MD simulacije slobodnog enzima.

Prijelazi između klastera (C0↔C1/4/6↔C2, slika 70), kao i smanjenje radijusa giracije, R_g (slika D1) i udaljenosti d_1 i d_2 (slika D2), zapaženi su tijekom 207 ns MD simulacije „otvorene“, oWT, DPP III (oWT-1 simulacija). Minimalna R_g vrijednost (25,3 Å, tablica D3) postignuta je nakon 132 ns MD simulacije i nije se značajno promijenila tijekom sljedećih 70 ns. Strukture generirane nakon 74-te ns MD simulacije pripadaju klasteru C2 (samim time obje cWT_{MD} strukture, dobivene nakon 101 ns i 207 ns, pripadaju klasteru C2).

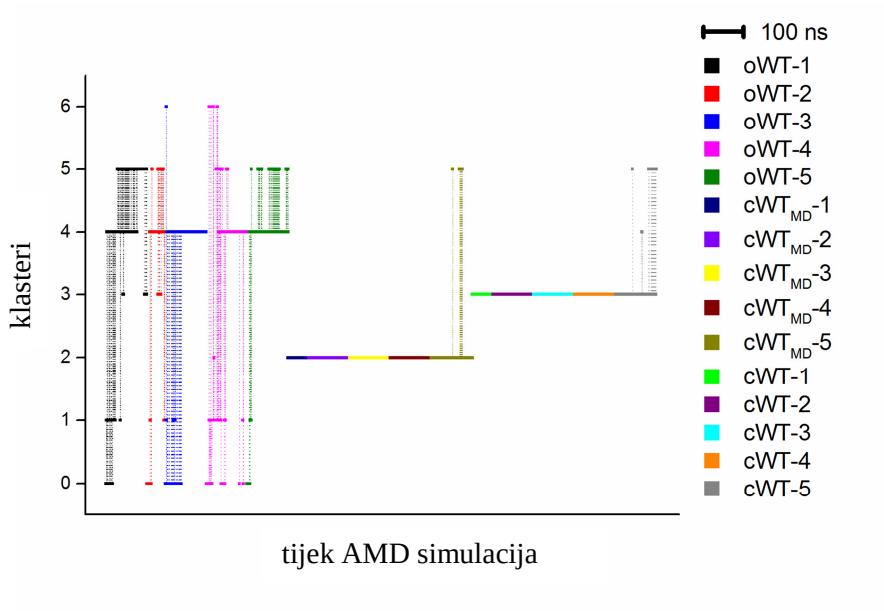
Reverzibilni prijelazi oWT↔semiWT↔cWT_{MD}, ekvivalentni prijelazima između klastera C0↔C1/4/6↔C2 (slike 70, D1 i D2), zapaženi su i tijekom ostalih kraćih (100 ns) MD simulacija s oWT formom proteina kao početnom (oWT-2,3 simulacije).

Tijekom MD simulacija cWT forme proteina (cWT-1-4 simulacije) nisu zapaženi prijelazi između klastera, te sve uzorkovane strukture pripadaju klasteru C3 (slika 70).

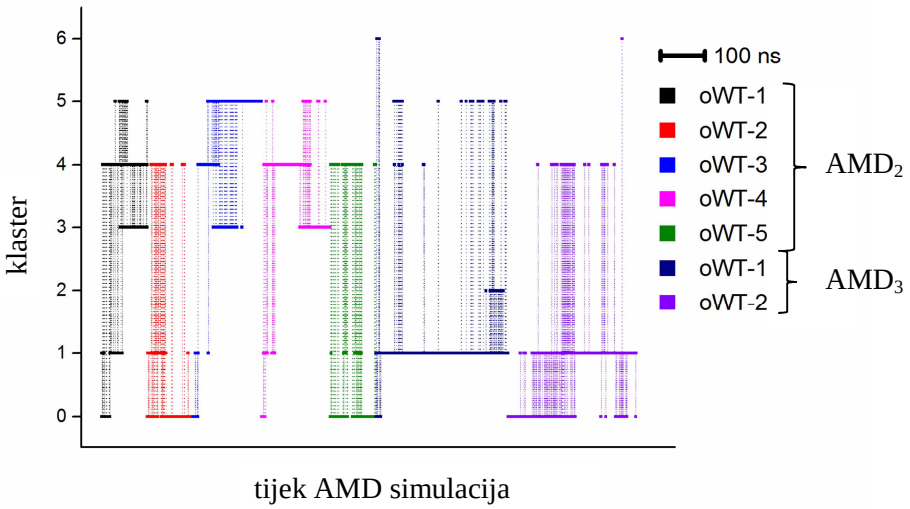
Razlozi zašto tijekom MD simulacija nisu uočeni prijelazi cWT↔oWT i cWT↔cWT_{MD} mogu biti: a) neefikasnost MD simulacija, b) priroda samih prijelaza (prijelazi s visokom energijskom barijerom) i c) utjecaj okoliša („otvorena“ struktura slobodnog enzima mogla bi biti posljedica gustog kristalnog pakiranja i kristalizacijskih uvjeta, vidi sliku 31).



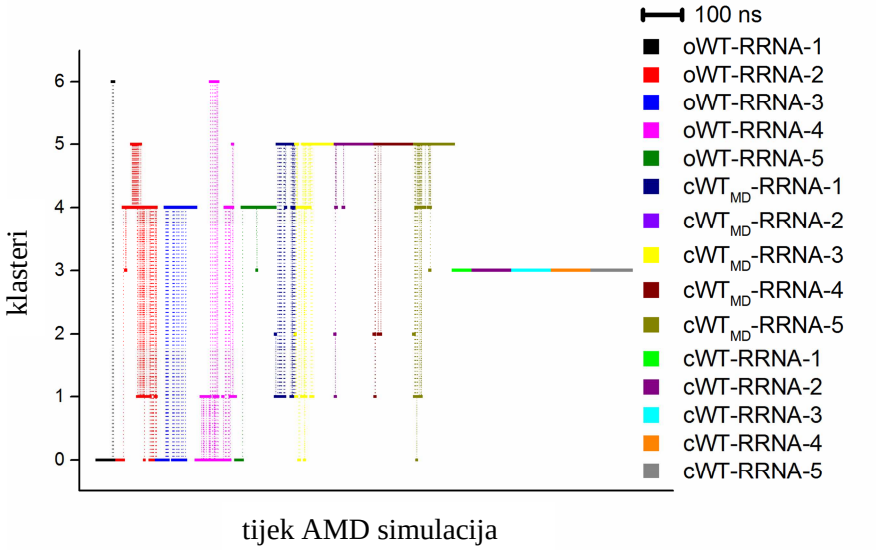
a)



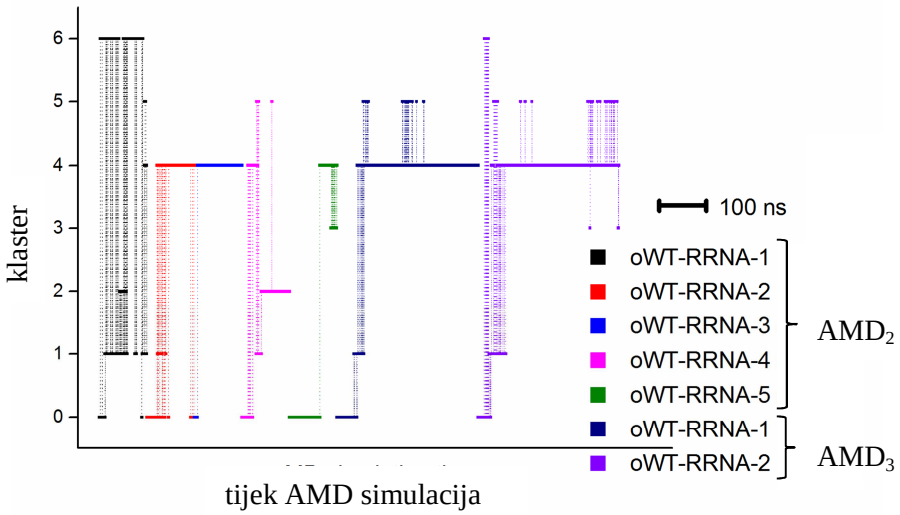
b)


klaster
0
1
2
3
4
5
6
100 ns
oWT-1
oWT-2
oWT-3
oWT-4
oWT-5
oWT-1
oWT-2
AMD2
AMD3
tijek AMD simulacija

c)


klasteri
0
1
2
3
4
5
6
100 ns
oWT-RRNA-1
oWT-RRNA-2
oWT-RRNA-3
oWT-RRNA-4
oWT-RRNA-5
cWTMD-RRNA-1
cWTMD-RRNA-2
cWTMD-RRNA-3
cWTMD-RRNA-4
cWTMD-RRNA-5
cWT-RRNA-1
cWT-RRNA-2
cWT-RRNA-3
cWT-RRNA-4
cWT-RRNA-5
tijek AMD simulacija

d)



e)

Slika 70. Pripadnost struktura generiranih tijekom individualnih MD simulacija (individualne simulacije označene su različitim bojama) određenom klasteru. X-os predstavlja vremensku koordinatu (naznačen je period od 100 ns, pri čemu vrijeme raste s lijeva na desno), a y-os pripadnost klasteru (od 0 do 6). U obzir su uzete strukture generirane svakih 100 ps. Dani su rezultati: a) MD, b) AMD_1, c) AMD_2 i AMD_3 simulacije slobodnog enzima, i d) AMD_1 i e) AMD_2 i AMD_3 simulacija kompleksa DPP III-RRNA.

4.4.2.2. AMD simulacije slobodnog enzima.

Tijekom oWT-1,2 AMD_1 i oWT-1,3,4 AMD_2 simulacija uočeni su prijelazi oWT↔semiWT↔cWT, tj. došlo je do „zatvaranja“ enzima u oblik određen difrakcijskim eksperimentom, dok se tijekom oWT-3,4,5 AMD_1 i oWT-2,5 AMD_2 simulacija protein ili djelomično „zatvorio“ (u semiWT oblik), ili je ostao u „otvorenoj“ konformaciji, oWT (prijelazi oWT↔semiWT, vidi slike 70, D1 i D2). Za razliku od navedenih, AMD simulacije s najmanjim potencijalom poticaja (AMD_3 simulacije), pokazuju „zatvaranje“ oWT strukture u semiWT ili cWT_{MD} oblik (što odgovara prijelazima između klastera C0↔C1/4/6↔C6, vidi sliku 70), kao što je primijećeno i tijekom standardnih MD simulacija, dok prijelazi opaženi tijekom AMD simulacija s većim potencijalom poticaja (AMD_1 i AMD_2 simulacije) nisu opaženi tijekom standardnih simulacija. Dakle, AMD simulacijama učinkovitije je pretražen konformacijski prostor DPP III, nego MD simulacijama.

Kao i u slučaju MD simulacija, ni tijekom AMD_1 simulacija nije došlo do značajnije promijene radijusa giracije „zatvorenih“ (cWT i cWT_{MD}) formi enzima. Najveća promjena (tj. povećanje) geometrijskih parametara R_g, d_1 i d_2 opažena je tijekom cWT-5 i cWT_{MD}-5 simulacija (tablica D3), što odgovara prijelazima između klastera C3↔C4/5, odnosno C2↔C5. U oba slučaja radi se o cWT/cWT_{MD}↔semiWT prijelazima. Konformacije uzorkovane za vrijeme preostalih cWT ili cWT_{MD} simulacija, pripadaju klasterima C3, odnosno C2.

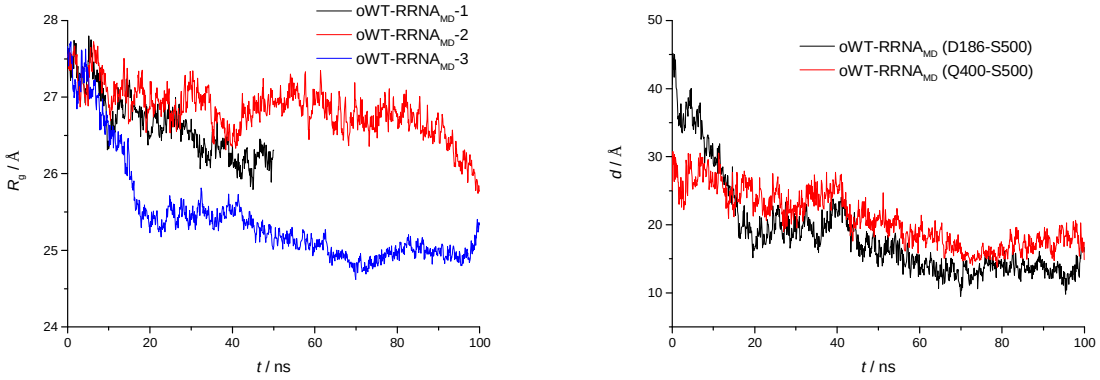
4.4.2.3. AMD simulacije kompleksa DPP III-RRNA.

a) RRNA vezan u obliku β-vrpce za β-ploču iz „donje“ domene (eksperimentalno određen način vezanja). Serija AMD simulacija kompleksa DPP III-RRNA provedena je kako bi se ostvario uvid u utjecaj liganda na konformacijsku promjenu enzima. Već je pokazano[115] da najpovoljniji način vezanje RRNA odgovara onom eksperimentalno određenom za tinorfin u mutantu E451A DPP III. Bezerra i sur.[51] pretpostavili su da je „zatvaranje“ enzima potaknuto pucanjem vodikove veze između Lys670 i aminokiselina iz „šarke” (aminokiseline 409-420) proteina uslijed vezanja liganda (tinorfina). Međutim, MD simulacije pokazale su da se u kompleksu DPP III-RRNA naftilamidna skupina molekule RRNA nalazi predaleko od Lys670 da bi s njim interagirala,[115] kao i da do „zatvaranja“ enzima dolazi i bez prisustva liganda. Također, uočeno je da se u „poluzatvorenim“ i „zatvorenim“ strukturama DPP III, Lys670 nalazi sa stražnje, konveksne, strane proteina izložen molekulama otapala (slika 76).

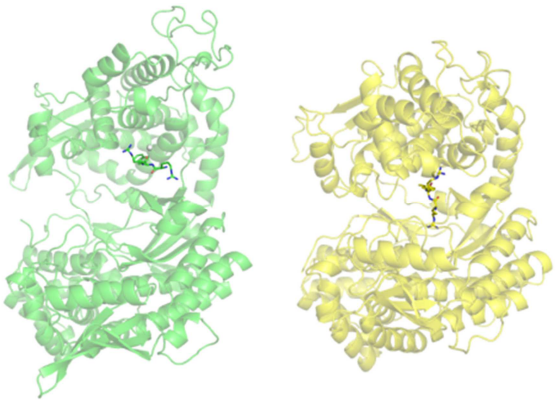
Tijekom AMD simulacija kompleksa oWT-RRNA došlo je do značajne konformacijske promjene enzima, koja odgovara „zatvaranju“ enzima. Može se uočiti da je na kraju AMD_1 i AMD_2 simulacija kompaktnost enzima ($\langle R_g \rangle$ u rasponu od 25,4 do 26,3 Å) nešto manja nego u slučaju simulacija slobodnog enzima ($\langle R_g \rangle$ u rasponu od 24,8 do 25,1 Å), dok je obrnuti slučaj na kraju AMD_3 simulacija ($\langle R_g \rangle$ u rasponu od 25,8 do 26,1 Å i od 25,2 do 25,6 Å tijekom simulacija slobodnog enzima, odnosno kompleksa). Kao i u slučaju simulacija započetih s oWT strukturom, tijekom AMD simulacije kompleksa oWT-RRNA najzastupljenije su semiWT strukture koje pripadaju C1, C4, C5 i C6 klasterima (slika 70). Važno je uočiti da velika većina tih semiWT strukture pripada klasterima C4 i C5, tj. strukturama koje predstavljaju prijelazni oblik od klastera C0 (strukture slične oWT) ka C3 (strukture slične cWT). Na temelju AMD simulacija može se pretpostaviti da vezanje liganda potiče „zatvaranje“ DPP III u cWT oblik.

Tijekom AMD simulacija kompleksa cWT-RRNA nije došlo do značajnije konformacijske promjene enzima (generirane strukture pripadaju C3 klasteru). Za razliku od AMD simulacija započetih s cWT_{MD} strukturom gdje većina generiranih struktura pripada C2 klasteru, strukture generirane tijekom AMD simulacija kompleksa cWT_{MD}-RRNA uglavnom pripadaju C5 klasteru, tj. došlo je do prijelaza cWT_{MD}→semiWT (C2↔C1/3/4→C5 prijelaz, slika 70). Dakle, rezultati AMD simulacija kompleksa s RRNA ukazuju da vezanje supstrata inducira transformaciju proteina u oblik sličniji cWT formi.

b) RRNA vezan za „gornju“ domenu (način vezanja određen simulacijama). Tijekom jedne (oWT-$RRNA_{MD}$-3) od sveukupno tri AMD_1 simulacije kompleksa oWT-$RRNA_{MD}$ (u kojem je supstrat vezan na način određen računalnim simulacijama) došlo je do značajnijeg smanjenja radijusa giracije i udaljenosti d_1 i d_2 (slika 71a i b), pri čemu se protein „zatvorio“ u oblik sličan cWT formi. Uslijed „zatvaranja“ enzima došlo je do pomicanja molekule supstrata prema „donjoj“ domeni, da bi nakon 100 ns AMD simulacije RRNA bio vezan u veznom mjestu enzima na način sličan onom određenom eksperimentalno za tinorfin (slika 71c) .



a) b)



c)

Slika 71. Promjena: a) radijusa giracije, R_g (aminokiseline iz fleksibilne petlje, 462-490, nisu uzete u obzir) i b) udaljenosti između D186-S500 i Q400-S500 Cα atoma tijekom AMD simulacija kompleksa oWT-RRNA$_{MD}$. c) lijevo (zeleno obojana) početna struktura oWT-RRNA$_{MD}$ kompleksa i desno (žuto obojana) struktura dobivena nakon 100 ns AMD simulacije kompleksa oWT-RRNA$_{MD}$-3. Molekula RRNA prikazana je štapićima.

4.4.2.4. CGMD simulacije slobodnog enzima.

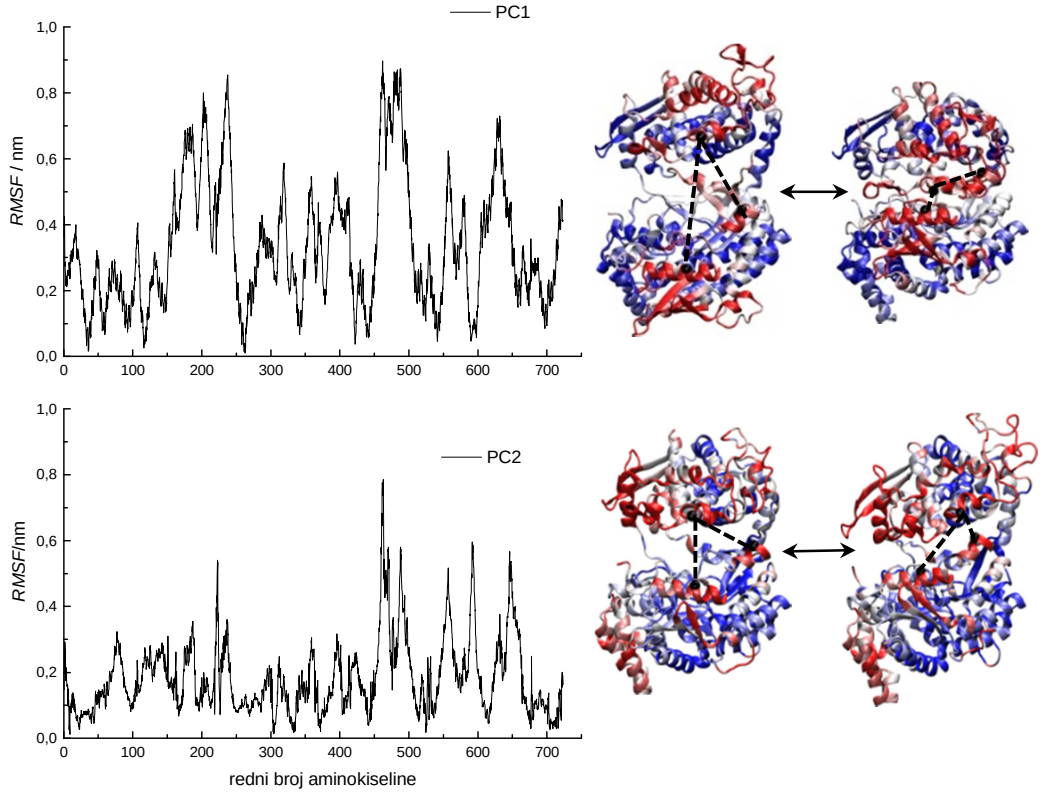
Konformacijski prostor uzorkovan tijekom CGMD simulacija DPP III obuhvaća konformacijske prostore generirane tijekom MD i AMD simulacija slobodnog enzima. Tijekom 3 od 20 CGMD simulacija došlo je do potpunog „zatvaranje“ enzima, jednom u cWT$_{MD}$ oblik (oWT-1 simulacija) i dva puta u cWT oblik (oWT-8 i oWT-13 simulacije) (tablica D4, te slike D1 i D2). Do djelomičnog „zatvaranja“ enzima (oWT↔semiWT prijelaz) došlo je tijekom 8 CGMD simulacije (oWT-2,3,4,5,6,12,15,18; pripadajuće minimalne vrijednosti parametara R_g, d_1 i d_2 u tablici 4D nalaze se unutar srednje vrijednosti navedenih

parametara + SD klastera C1, C4, C5 i C6, tj. klastera kojem pripadaju semiWT strukture, tablica 17). Minimalna vrijednost radijusa giracije postignuta u navedenim simulacijama Tijekom preostalih CGMD simulacija nije došlo do značajne promjene u strukturi početne oWT forme proteina.

Kao i u slučaju MD simulacija u kojima se svaki atom tretira eksplicitno, tijekom CGMD simulacija najstabilniji je cWT oblik proteina (slike D1 i D2). 5 od 20 CGMD simulacija započetih iz cWT_{MD} strukture (cWT_{MD}-7,11,12,19,20) pokazuju „otvaranje“ proteina u „poluzatvoreni“ (semiWT) oblik, pri čemu dolazi do povećanja parametara R_g i d_1 (tablica D4, te slike D1 i D2). Povećanje d_2 udaljenosti zapaženo je tijekom 5 CGMD simulacija (cWT_{MD}-5,7,10,13,16, slika D2), što upućuje na cWT_{MD}→cWT prijelaz.

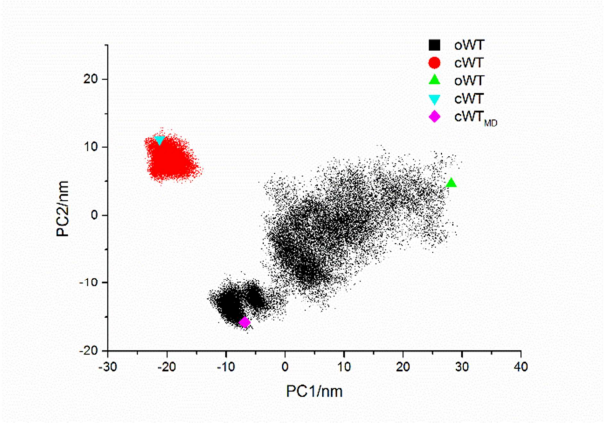
4.4.3. Raspodjela uzorkovanih struktura u prostoru definiranom dvijema glavnim komponentama

Konformacijska promjena enzima oWT↔cWT_{MD}↔cWT u potpunosti (100 %) je opisana s prve dvije glavne komponente prikazane na slici 72 (naznačen je doprinos pojedinih aminokiselina određenoj glavnoj komponenti). Prva glavna komponenta (PC1) opisuje usklađen pomak aminokiselina koje se nalaze na rubu pukotine između domena, tj. gibanje koje odgovara „zatvaranju“ proteina, dok druga glavna komponenta (PC2) predstavlja paralelni pomak proteinskih domena u suprotnom smjeru, što odgovara cWT_{MD}↔semiWT prijelazu.

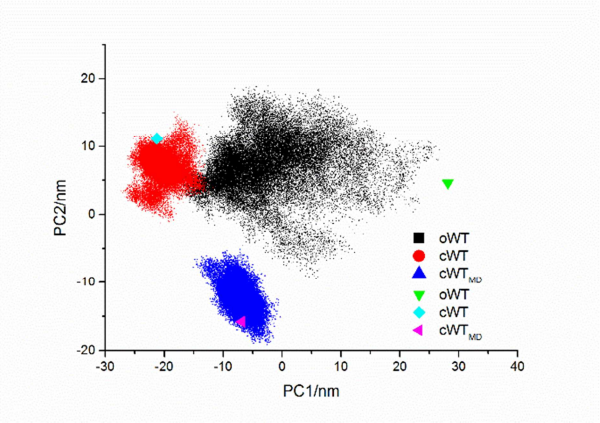


Slika 72. Doprinos fluktuacije pojedine aminokiseline dvjema glavnim komponentama (PC1 i PC2). Glavne komponente opisuju oWT↔cWT$_{MD}$↔cWT prijelaze DPP III. Vrijednosti koje se za više od jedne standardne devijacije (SD) razliku od prosječne *RMSF* vrijednosti obojane su crveno (<*RMSF*> + SD) i plavo (<*RMSF*> − SD), dok su vrijednosti između obojane bijelo. Cα atomi aminokiselina D186, Q400 i S500 (crne kuglice) povezani su crnim iscrtkanim linijama i prikazani na strukturama DPP III koje odgovaraju najvećim pomacima duž glavnih vektora.

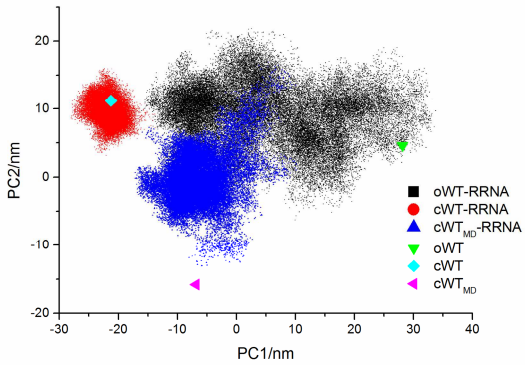
Na slici 73, u koordinatnom sustavu definiranom s prve dvije glavne komponente (PC1 i PC2), naznačen je položaj oWT, cWT i cWT$_{MD}$ struktura, kao i struktura generiranih tijekom MD, AMD i CGMD simulacija.


oWT
cWT
oWT
cWT
cWT$_{MD}$
PC2/nm
PC1/nm

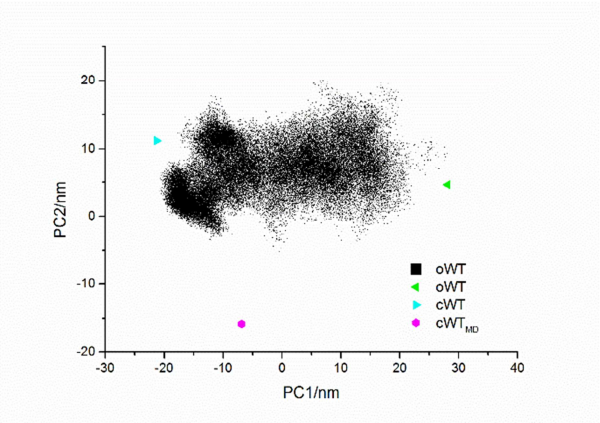
a)


oWT
cWT
cWT$_{MD}$
oWT
cWT
cWT$_{MD}$
PC2/nm
PC1/nm

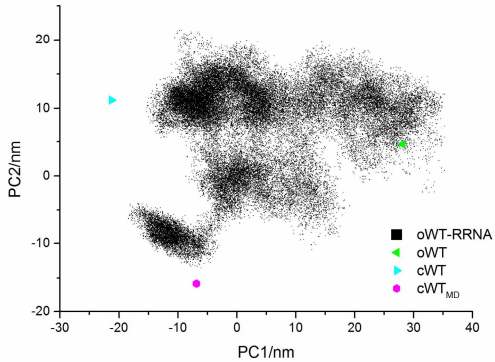
b)


oWT-RRNA
cWT-RRNA
cWT$_{MD}$-RRNA
oWT
cWT
cWT$_{MD}$
PC2/nm
PC1/nm

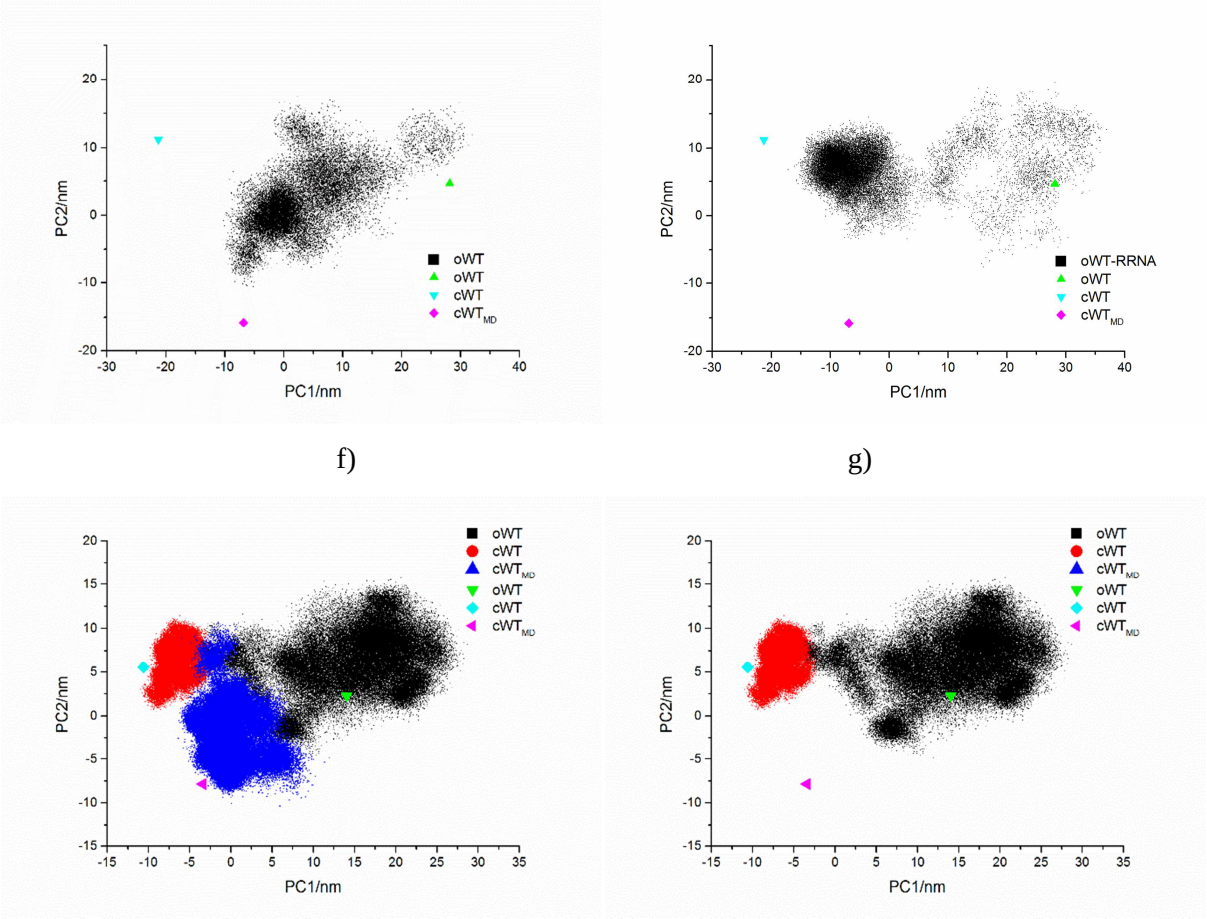
c)


oWT
oWT
cWT
cWT$_{MD}$
PC2/nm
PC1/nm

d)


oWT-RRNA
oWT
cWT
cWT$_{MD}$
PC2/nm
PC1/nm

e)



Slika 73. Raspodjela struktura u koordinatnom sustavu definiranom s prve dvije glavne komponente (PC1 i PC2). Strukture su generirane tijekom: a) MD simulacija DPP III, b) i c) AMD_1 simulacija DPP III, odnosno kompleksa s RRNA, d) i e) AMD_2 simulacija DPP III, odnosno kompleksa s RRNA, f) i g) AMD_3 simulacija DPP III, odnosno kompleksa s RRNA, te h) CGMD simulacija DPP III. Uzorkovane strukture (svakih 100 ps u slučaju atomističkih simulacija i svakih 10 000 koraka u slučaju simulacija krupnog zrna) obojane su ovisno o strukturi iz koje su započete simulacije, tj. simulacije koje su započete iz oWT strukture obojene su crno, iz cWT crveno, a one iz cWT_{MD} plavo. Položaji početnih oWT, cWT i cWT_{MD} struktura naznačeni su redom zelenim, tirkiznim i ružičastim simbolom.

Iz raspodjele struktura generiranih tijekom MD simulacija (slika 73a), uočava se da su regije uzorkovane oko „zatvorenih“, cWT i cWT_{MD}, struktura puno uže od regije uzorkovane oko „otvorene“, oWT, strukture (simboli obojeni zeleno, tirkozno i ružičasto na slici 73a). Međutim, najviše struktura uzorkovanih tijekom MD simulacija je iz regije koja se nalazi između oWT i cWT_{MD} formi DPP III. Važno je uočiti da MD simulacijama nije bilo moguće

simulirati prijelaz između cWT i ostale dvije forme enzima, na što upućuje izolirani položaj regije u okolici cWT strukture.

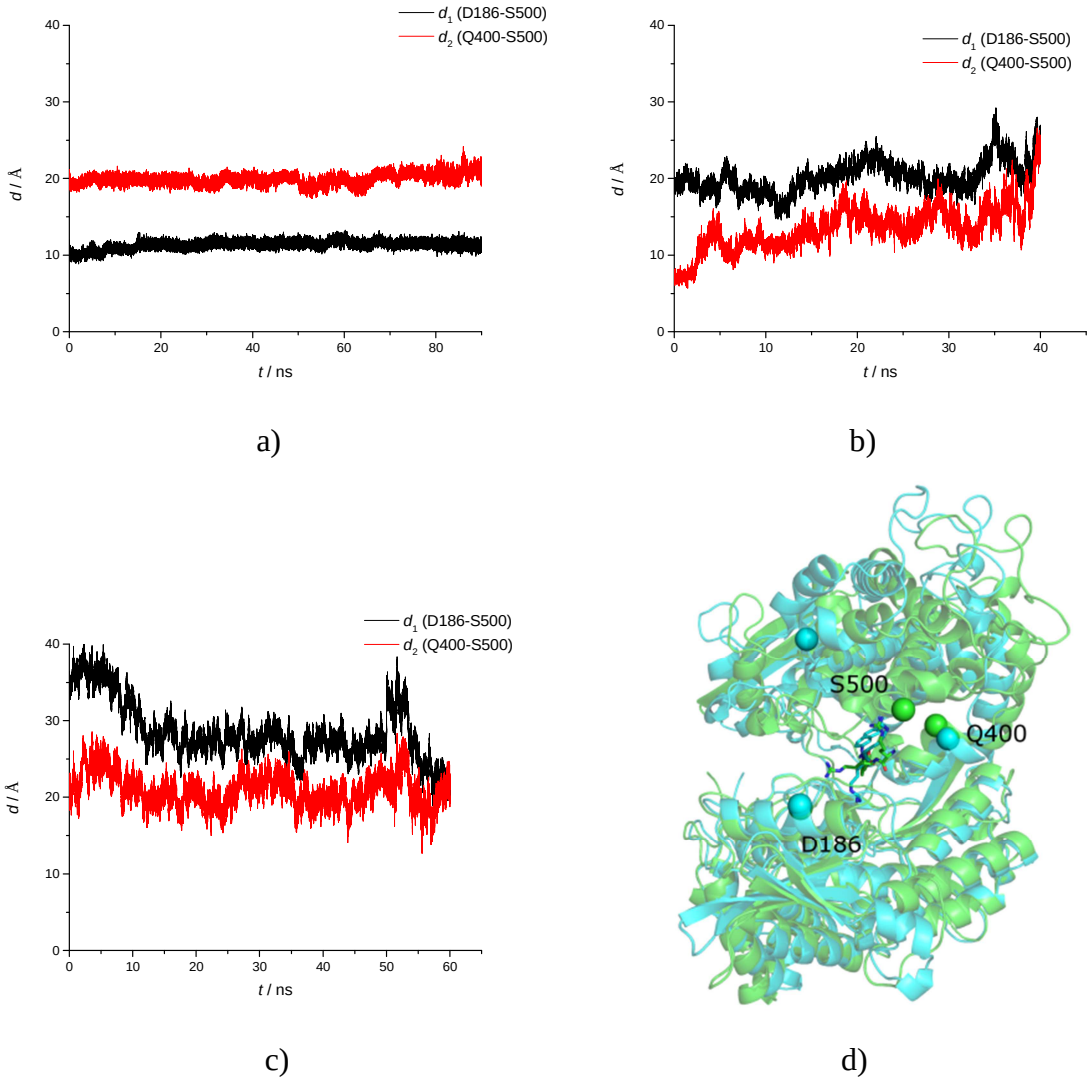
Usporedba konformacijskih prostora obuhvaćenih tijekom MD i AMD simulacija započetih s oWT kao početnom konformacijom (regija obojena crno na slici 73a, b, d i f) ukazuje da se tijekom AMD_1 i AMD_2 simulacija protein uglavnom razvijao u smjeru cWT forme, a tijekom MD i AMD_3 simulacija isključivo u smjeru cWT_{MD} forme. Iako je tijekom AMD_2 simulacije došlo do oWT↔semiWT↔cWT prijelaza, AMD_1 simulacijama uglavnom je uzorkovan konformacijski prostor koji se nalazi između oWT i cWT formi. Slično kao i kod MD simulacija, AMD simulacijama uzorkovana je prilično uska regija kada su kao početne korištene kompaktne, cWT i cWT_{MD}, strukture, tj. uzorkovane su samo strukture susjedne početnoj.

CGMD simulacijama cWT_{MD} forme proteina uzorkovan je puno veći konformacijski prostor (regija obojana plavo na slici 73h) nego u slučaju simulacija započetih iz cWT forme proteina (regija obojana crveno na slici 73h). To upućuje na činjenicu da je cWT_{MD} oblik manje zakočen od cWT oblika. Važno je uočiti da se konformacijski prostori uzorkovani tijekom CGMD simulacija različitih formi proteina (oWT, cWT i cWT_{MD}) međusobno preklapaju, što ukazuje na mogućnost prijelaza između pojedinih struktura.

Dakle, sve MD simulacije (MD, AMD i CGMD) upućuju na veću stabilnost „zatvorenih“ nego „otvorenih“ formi DPP III, pri čemu je tijekom simulacija cWT forma manje podložna promjeni od cWT_{MD} forme.

Rezultati AMD simulacija slobodnog cWT enzima (regija obojana crveno na slici 73b) i njegovog kompleksa s RRNA (regija obojana crveno na slici 73c) u skladu su s rezultatima standardnih (90 ns dugim) MD simulacija kompleksa cWT-RRNA koje pokazuju da vezanje liganda ne utječe značajno na dinamiku najkompaktnije, cWT, forme proteina (vidi d_1 i d_2 udaljenosti na slici 74a). Značajniji utjecaj vezanja liganda na dinamiku „zatvorene“ forme određene dugim MD simulacijama (cWT_{MD}) i „otvorene“ (oWT) forme enzima opažen tijekom AMD simulacija, u slaganju je s rezultatima MD simulacija kompleksa oWT-RRNA i cWT_{MD}-RRNA (vidi d_1 i d_2 udaljenosti na slici 74b i c, kao i strukturu kompleksa cWT_{MD}-RRNA dobivenu nakon 40 ns MD simulacije na slici 74d). Naime, tijekom AMD simulacija kompleksa cWT_{MD}-RRNA uzorkovan je veći konformacijski prostor nego tijekom simulacija slobodnog cWT_{MD} enzima (vidi regije obojane plavo na slici 73c i b), dok je tijekom

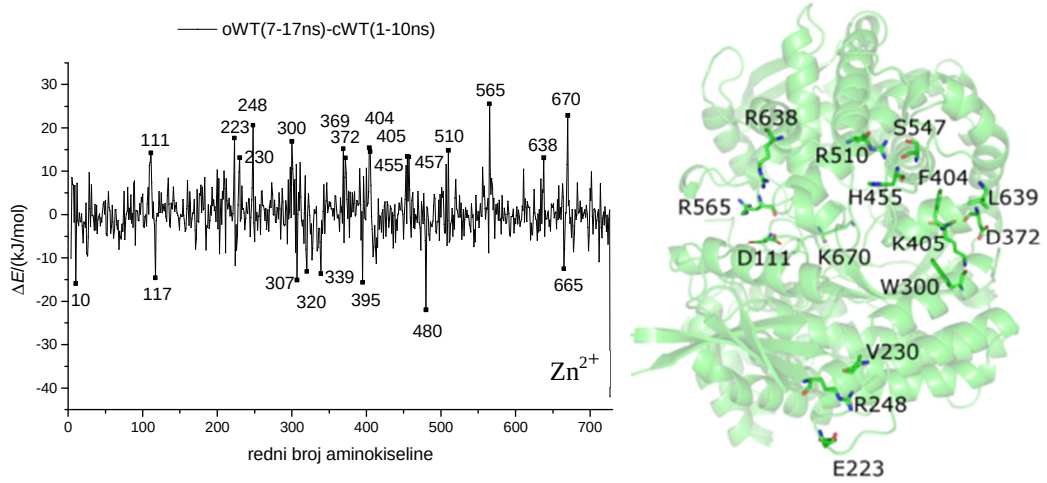
simulacija „otvorene“ forme enzima uočen pomak u smjeru cWT forme enzima (vidi regije obojane crno na slici 73b-h).



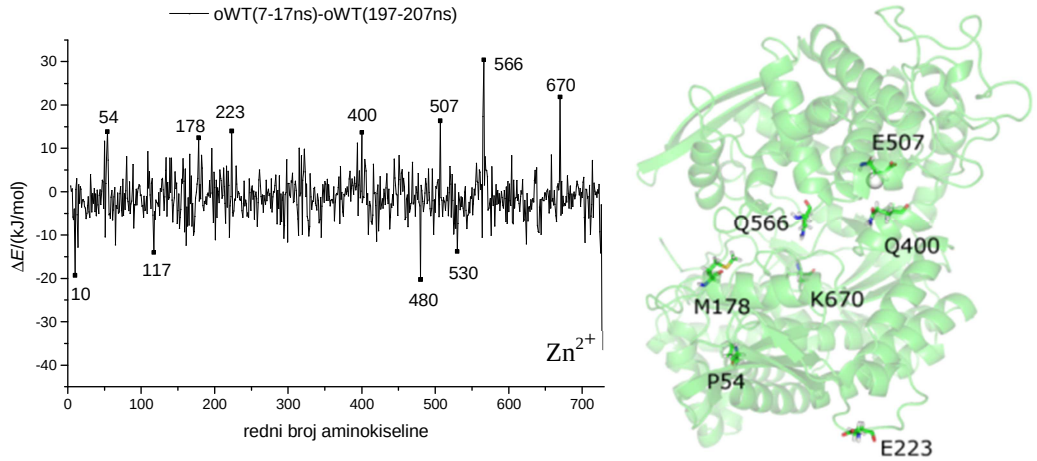
Slika 74. Udaljenosti između Cα atoma D186-S500 (d_1) i Q400-S500 (d_2) tijekom MD simulacija: a) „zatvorene“ (cWT) strukture, b) „zatvorene“ strukture dobivene dugim MD simulacijama (cWT_{MD}) i c) „otvorene“ (oWT) strukture u kompleksu s Arg-Arg-2-naftilamidom (RRNA) vezanim po uzoru na tinorfin u mutantu E451A DPP III (pdb code 3T6B). d) preklopljene početna (zeleno) i konačna (tirkizno, nakon 40 ns) struktura kompleksa cWT_{MD}-RRNA; ligand je prikazan štapićima, a Cα atomi D186, Q400 i S500 kuglicama.

4.4.4. Objašnjenje rezultata MD, AMD i CGMD simulacija

Rezultati MD simulacija ukazuju na postojanje različitih formi DPP III u otopini, pri čemu su kompaktnije (u potpunosti ili djelomično „zatvorene“) strukture zastupljenije. Iako je „zatvaranje“ proteina entropijski potpomognut proces, interakcije između aminokiselina iz „gornje“ i „donje“ domene značajno stabiliziraju „zatvorene“ (cWT i cWT_{MD}) forme proteina. MM-PBSA dekompozicijska analiza slobodne energije po pojedinim aminokiselinama (slika 75), kao i uvid u strukture „zatvorenih“ formi, pokazali su da interakcije između parova aminokiselina Asp111-Arg565, Trp300/Asp372-Lys405 i Leu369-Phe404 stabiliziraju cWT oblik, dok je cWT_{MD} oblik stabiliziran interakcijama između Met178, Gln400, Glu507 i Gln 566 i aminokiselina iz susjedne domene.



a)

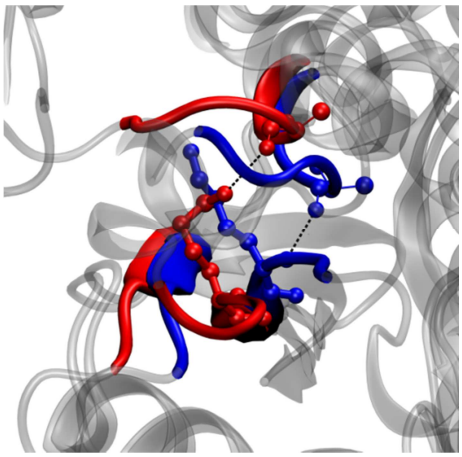


b)

Slika 75. Promjena (ΔE = E(„otvorena“) − E(„zatvorena“)) Gibbsove slobodne energije pojedinih aminokiselina uslijed „zavaranja“ enzima, izračunato MM-GBSA pristupom. „Zatvorena“ forma je ili a) cWT ili b) cWT_{MD}. U računu su uzeti 10 nanosekundni intervali (strukture uzorkovane svakih 100 ps) dobiveni MD simulacijama slobodnog enzima. Aminokiseline koje „preferiraju“ (tj. koje imaju nižu Gibbsovu energiju) „zatvoreni“, cWT ili cWT_{MD}, oblik naznačene su na strukturama: a) cWT ili b) cWT_{MD} forme. U cWT_{MD} strukturi atom cinka prikazan je bijelom kuglicom.

U „otvorenoj“, oWT, formi DPP III Lys670 zauzima orijentaciju u smjeru pukotine između domena, dok je u „zatvorenim“, cWT i cWT_{MD}, strukturama orijentiran prema otapalu sa stražnje, konveksne, strane enzima (slika 76). MM-GBSA računom je pokazano da je orijentacija Lys670 prema otapalu energetski povoljnija (slika 75). Također, MM-GBSA račun ukazuje na značajniju stabilizaciju cinka u „otvorenoj“, nego u „zatvorenoj“ formi

enzima (zadnji ostatak na slici 75). To je posljedica nepovoljnih interakcija između cinka i pozitivno nabijenih aminokiselina iz „donje“ domene proteina u kompaktnoj, „zatvorenoj“, formi enzima.



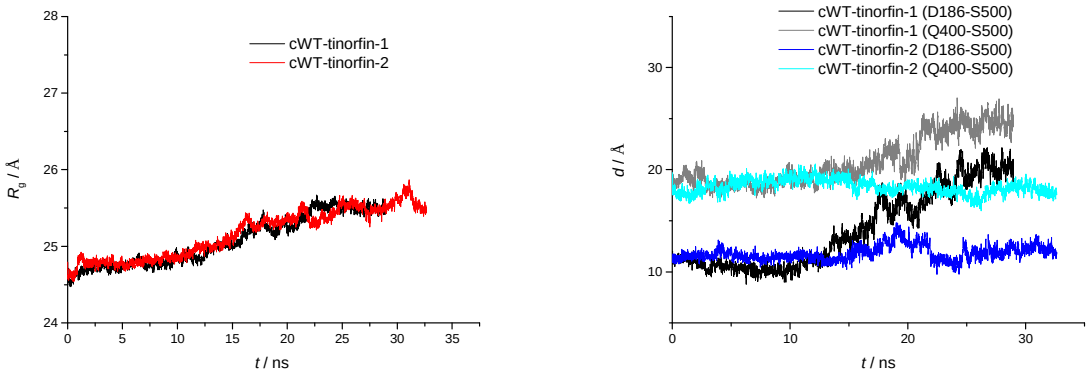
Slika 76. Položaj Lys670 i Ala416, prikazanih kuglicama i štapićima, na početku (pdb kod: 3FVY, obojeno crveno) i nakon 207 ns (obojani plavo) MD simulacije oWT forme DPP III. Dio proteinskog lanca koji se nalazi unutar 6 Å od Lys670 obojan je crveno ili plavo. Vodikove veze između kabonilnog kisika Ala416 i amidne ili ε-amino grupe Lys670 prikazane su iscrtkanom crnom linijom.

„Zatvaranjem“ enzima smanjuje se površina dostupna otapalu (*SASA*) i to otprilike tri puta više u cWT, nego u cWT_{MD} strukturi (tablica 18). U isto vrijeme, izbacivanjem molekula vode iz pukotine između domena (slika D3), smanjuje se polarizabilnost te regije. Prema Hammesu,[106] medij niže dielektrične konstante omogućuje lakšu deprotonaciju molekule vode, što je korisno za aktivnost DPP III, budući da je pretpostavljeno da je to prvi korak u reakciji.[29,116]

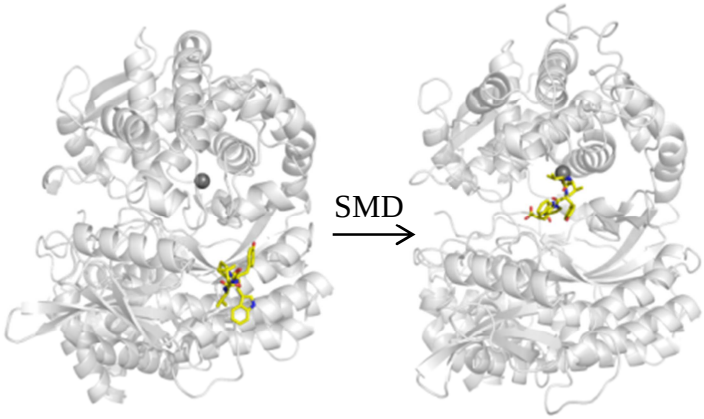
Tablica 18. Razlika u prosječnoj površini dostupnoj otapalu (<*SASA*> ± standardna devijacija) izračunatoj na intervalima od 2 nanosekunde preuzetima iz MD simulacija. Prvi redak odgovara razlici <*SASA*> struktura generiranih tijekom oWT-1 simulacije (intervali: 205.-207. ns i 1.-3. ns), a drugi redak razlici <*SASA*> struktura generiranih tijekom cWT-1 simulacije (interval 9.-10. ns) i oWT-1 simulacije (interval 1.-3. ns). Površine su izračunate programom NACCESS (gornje vrijednosti) i PSAIA (donje vrijednosti, u kurzivu).

sustav	simulacijsko vrijeme / ns	Δ<*SASA*> ± SD / Å^2	Δ<*SASA*>(nepolarni dio proteina) ± SD / Å^2	Δ<*SASA*> (polarni dio proteina) ± SD / Å^2
oWT	205-207	−760 ± 357 *−642 ± 387*	−388 ± 236 *−398 ± 222*	−372 ± 287 *−244 ± 312*
cWT	9-11	−1952 ± 334 *−1834 ± 402*	−1079 ± 201 *−1141 ± 195*	−873 ± 279 *−693 ± 326*

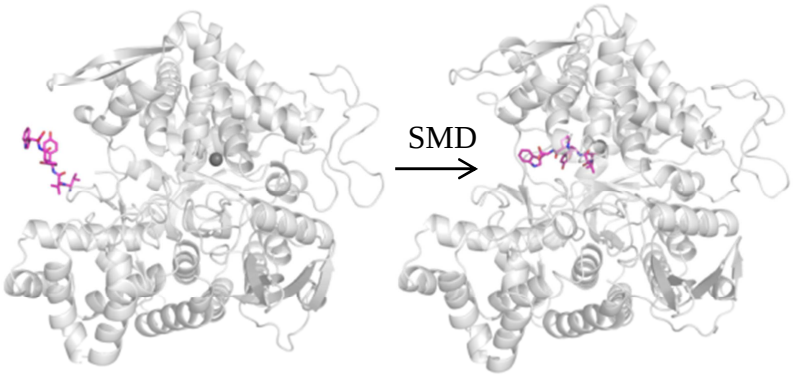
AMD simulacijama dodatno je potvrđena opravdanost korištenja modela konformacijskog odabira za opisivanje vezanja liganda za DPP III. One su u skladu s termodinamičkim mjerenjima koja su pokazala da se RRNA veže u obliku β-vrpce za β-ploču iz „donje“ domene. Međutim, postavlja se pitanje veže li se molekula supstrata u već „zatvorenu“ (cWT) formu proteina ili u „poluzatvoreni“ oblik nakon čega dolazi do pomaka konformacijske ravnoteže u smjeru kompaktnije forme proteina. Odgovor na to pitanje pružile su usmjerene MD simulacije (SMD) u kojima je na atom cinka privlačena molekula tinorfina. Na početku SMD simulacije tinorfin se nalazio izvan veznog mjesta cWT strukture DPP III, točnije blizu ulaza u jedan od tunela (određenih programom CAVER, vidi poglavlje 4.3. i sliku 65b) koji molekula vode koristi za ulazak u aktivno mjesto cWT strukture. Tinorfin smješten s prednje strani pukotine između domena (slike 77 i 65b) ušao je u vezno mjesto koristeći plavi tunel, a onaj smješten sa stražnje, konveksne strane, zeleni tunel (slike 77 i 65b).



a) b)



c)



d)

Slika 77. Promjena: a) radijusa giracije (R_g) i b) udaljenosti između Cα atoma D186-S500 (d_1) i Q400-S500 (d_2) tijekom SMD simulacije kompleksa DPP III-tinorfin. Početna (lijevo) i konačna (desno) struktura kompleksa preuzete iz SMD simulacija u kojima je na atom cinka privlačena molekula supstrata postavljena s: c) prednje (cWT-tinorfin-1) i d) stražnje (cWT-tinorfin-2) strane pukotine. Atom cinka prikazan je sivom kuglicom, a molekula tinorfina štapićima.

Važno je naglasiti da je u oba slučaja ulazak tinorfina u vezno mjesto enzima bio moguć tek nakon proširenja mjesta ulaska uslijed pomaka proteinskih domena u suprotnom smjeru (popraćeno povećanjem radijusa giracije proteina za otprilike 1 Å, slika 77a). Proširenje ulaza plavog tunela (slika 65b), koji prema rezultatima RAMD simulacija danima u poglavlju 4.3. ligand najčešće koristi za putovanje između okoline i aktivnog mjesta, uzrokuje povećanje udaljenosti između Cα atoma D186-S500 i Q400-S500 (slika 77b).

Važno je uočiti i veliku sličnost proteinskih struktura dobivenih SMD simulacijama kompleksa DPP III-tinorfin (prikazana na slici 77c desno s $<d_1>=20{,}0 \pm 0{,}9$ Å i $<d_2>=24{,}6 \pm 0{,}8$ Å tijekom zadnjih 5 ns SMD simulacije) i semiWT struktura koje pripadaju klasteru C4. Temeljem toga može se pretpostaviti da se ligand najvjerojatnije veže u „poluzatvoreni“ oblik DPP III koristeći pritom plavi tunel za ulazak u vezno mjesto enzima.

Dakle, iako je eksperiment pokazao da je ljudska DPP III podložna konformacijskoj promjeni (rentgenskom strukturnom analizom određene su strukture „otvorene“, oWT, i „zatvorene“, cWT, ljudske DPP III), računalne simulacije pokazale su da ta promjena nije jednoznačna, tj. da postoje dvije različite kompaktne strukture DPP III, cWT i cWT_{MD}, kao i cijeli niz međuoblika, tzv. „poluzatvorenih“ struktura. Svim tim strukturama zajednička je očuvanost tercijarne strukture pojedinih domena prilikom konformacijske promjene enzima. MD simulacije pokazale su da do „zatvaranja“ proteina dolazi puno češće nego do „otvaranja“. Tijekom MD i AMD simulacija s najmanjim potencijalom poticaja (AMD_3 simulacije) oWT strukture, došlo je ili do potpunog „zatvaranja“ proteina u cWT_{MD} oblik, ili do djelomičnog „zatvaranja“ u oblik koji odgovara međustanju između oWT i cWT_{MD} (u slučaju AMD_1 simulacije i cWT) strukture. „Zatvaranje“ enzima u oblik određen eksperimentom (cWT) dogodilo se samo tijekom AMD simulacija s većim potencijalom poticaja (AMD_1 i AMD_2 simulacije), što upućuje na zaključak da je za taj prijelaz potrebno savladati višu energijsku barijeru. Važno je naglasiti da tijekom simulacija nije uočeno potpuno „otvaranje“ niti jedne od već „zatvorenih“ struktura (cWT i cWT_{MD}), tj. prijelaz u oWT oblik. Povremeno je došlo do njihovog „otvaranja“ u „poluzatvoreni“ (semiWT) oblik, međutim samo tijekom AMD simulacija. Takva stabilnost kompaktnih strukture slaže se s termodinamičkim podacima.[51,112] „Zatvaranje“ DPP III je entropijski potpomognut proces pri čemu je glavni doprinos oslobađanje uređenih molekula vode iz pukotine između domena u

okolno otapalo (eng. *bulk*). Hidrofobni okoliš u kristalu u kombinaciji s gustim kristalnim pakiranjem i samim time jakim interakcijama između proteinskih jedinica, favorizira „otvorenu“ konformaciju slobodne DPP III određenu kristalografski.

Za razliku od AMD simulacija s većim potencijalom poticaja (AMD_1 i AMD_2 simualcije), AMD simulacije s manjim potencijalom poticaja (AMD_3 simulacije) ukazuju na značajan utjecaj vezanog liganda na fleksibilnost DPP III. Tijekom AMD_3 simulacija slobodnog enzima preferirano je „zatvaranje“ oWT strukture u cWT_{MD} oblik (što se slaže i s rezultatima MD simulacija), dok su simulacije kompleksa ukazale na preferirano „zatvaranje“ oWT forme u cWT oblik u prisustvu vezanog liganda. AMD simulacije slobodnog enzima i kompleksa s RRNA upućuju na „poluzatvorene“ strukture kao najzastupljenije. Kako je tijekom simulacije kompleksa DPP III-RRNA uzorkovana veća regija semiWT oblika (uzorkovan je mnogo veći broj različitih semiWT oblika) nego tijekom simulacije slobodnog enzima, može se pretpostaviti da se ligand veže za semiWT oblik enzima, a potom potpomaže „zatvaranje“ u aktivni, cWT, oblik, što su potvrdile i SMD simulacije.

Provedeni računi pokazali su da su u otopini prisutni različiti oblici DPP III, ali da su oni kompaktniji (u potpunosti ili djelomično „zatvoreni“) zastupljeniji, pri čemu je semiWT vjerojatno najreaktivniji za vezanje supstrata. Selektivno vezanje liganda za semiWT oblik pomiče ravnotežu prema globularnijem obliku enzima. Proizlazi da je vezanje supstrata entropijski potaknut proces što je u skladu s kinetičkim mjerenjima za vezanje tinorfina.[51]

Rezultati SMD simulacija također ukazuju na važnost semiWT oblika. „Zatvoreni“ oblik, iako energetski najpovoljniji za katalizu, je prekompaktan da bi omogućio ulazak i vezanje supstrata u vezno mjesto. Treba doći do djelomičnog „otvaranja“ enzima kako bi se ligand mogao vezati u aktivno mjesto.

Stoga, na temelju rezultata MD simulacija može se pretpostaviti da se vezanje supstrata dešava po principu mehanizma konformacijske selekcije što inducira konformacijski pomak.

4.5. Koordinacija cinkova iona u aktivnom mjestu enzima

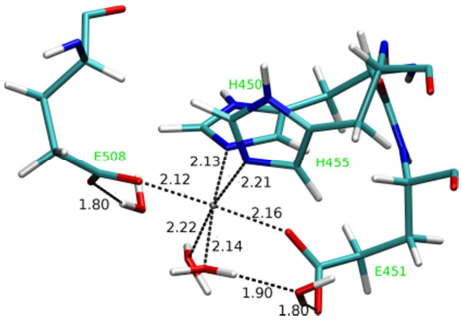
Preliminarni uvid u koordinaciju atoma cinka u ostalim o cinku ovisnim enzimima napravljen je korištenjem BioMe servera (http://metals.zesoi.fer.hr/metals/). Analiza struktura pohranjenih u proteinskoj bazi podataka (PDB) pokazala je da je koordinacijski broj cink u većini proteina (61,4%) 4, potom slijede koordinacijski brojevi 5 i 6 u 24%, odnosno 12,4%

slučajeva. Ako se tzv. „cinkovi prsti“ (eng. *zinc finger*) isključe iz analize, tetraedarski koordinirani cink je i dalje najzastupljeniji (52%), ali udio pentaedarski i oktaedarski koordiniranog cinka raste na 29,7%, odnosno na 15,7%.

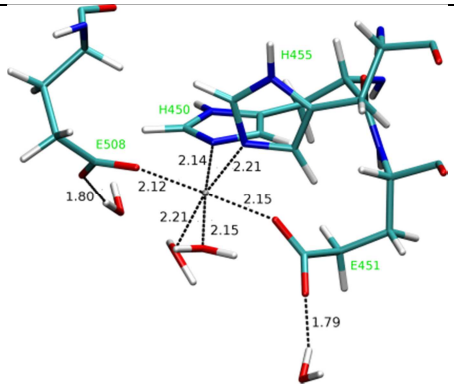
QM/MM računi na koordinaciji iona cinka u aktivnom mjestu ljudske DPP III omogućili su detaljnije razumijevanje koordinacije cinka u različitim konformacijama proteina. Do tada, jedino su strukture ljudske i kvaščeve DPP III, pohranjene u PDB bazi podataka (kodovi 3FVY i 3CSK) pružale informacije u koordinaciju Zn^{2+} u aktivnom mjestu navedenog enzima. QM/MM optimizacijom 18 djelomično otopljenih struktura DPP III (enzim + 52 molekule vode) ispitan je utjecaj okoliša (proteina i otapala) na koordinaciju iona cinka u aktivnom mjestu enzima. Geometrijski detalji prve koordinacijske sfere Zn^{2+}, protonacijska stanja liganada i njihove relativne energije dani su u tablici 19, i na slikama 78 i 79.

Tablica 19. Relativne energije (niže od 83,68 kJ mol^{-1}) djelomično otopljene DPP III (enzim + 52 molekule vode) dobivene dvoslojnom ONIOM optimizacijom s M06 ili B3LYP funkcionalom i dva različita osnovna skupa (6-31+g(d,p) za atome H, N, C i O i LANL2DZ-ECP za Zn^{2+}). MM dio opisan je AMBER poljem sila (parm96). Uspoređene su energije različitih koordinacija, izračunate primjenom elektrostatskog uklapanja, za istu konformaciju proteina. KB je koordinacijski broj cinka, a brojevi u uglatim zagradama kazuju koordiniraju li Glu451, molekula(e) vode ili OH^- ion, atom cinka.

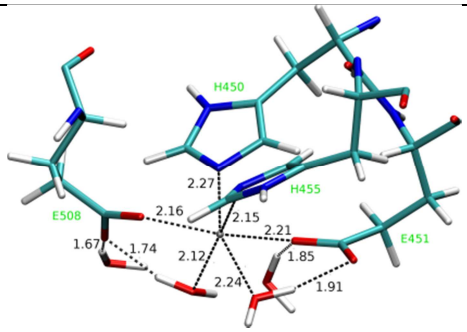
početne strukture		M06		B3LYP	
sustav	KB[E451:H_2O:OH^-]	KB[E451:H_2O:OH^-]	ΔE^{ONIOM} / kJ mol^{-1}	KB[E451:H_2O:OH^-]	ΔE^{ONIOM} / kJ mol^{-1}
cWT	6[1:2:0]	6[1:2:0]	0,00	6[1:2:0]	9,96
	5[0:2:0]	6[1:2:0]	29,71	5[0:2:0]	15,52
	5[1:1:0]	5[1:1:0]	19,25	5[1:1:0]	0,00
	4[0:1:0]	4[0:0:1]	51,42	4[0:0:1]	37,03
	4[0:0:1]	4[0:0:1]	36,99	4[0:0:1]	23,30
cWT_{MD}	6[1:2:0]	6[1:2:0]	0,00		
	5[0:2:0]	6[1:2:0]	0,00		
	5[0:1:1]	5[0:2:0]	72,43		
	5[1:1:0]	5[1:1:0]	58,41		
	4[0:1:0]	6[1:2:0]	0,00		
	4[0:0:1]	5[1:1:0]	49,58		
oWT	6[1:2:0]	6[1:2:0]	15,82		
	4[0:0:1]	6[1:2:0]	0,00		



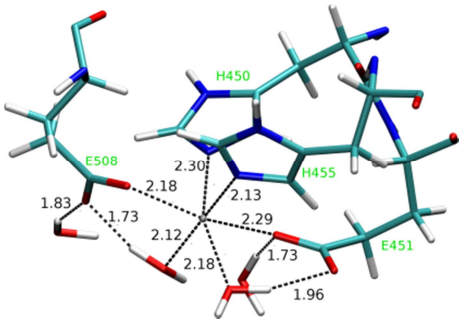
oWT, **6[1:2:0]**



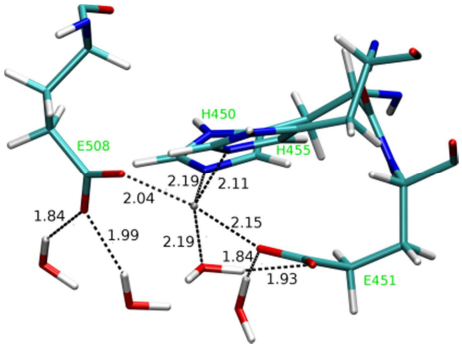
oWT, **6[1:2:0]**



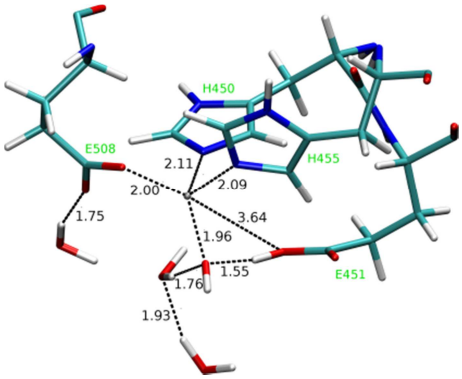
cWT, **6[1:2:0]**



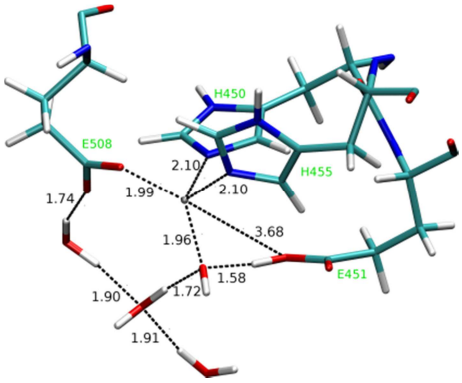
cWT, **6[1:2:0]**



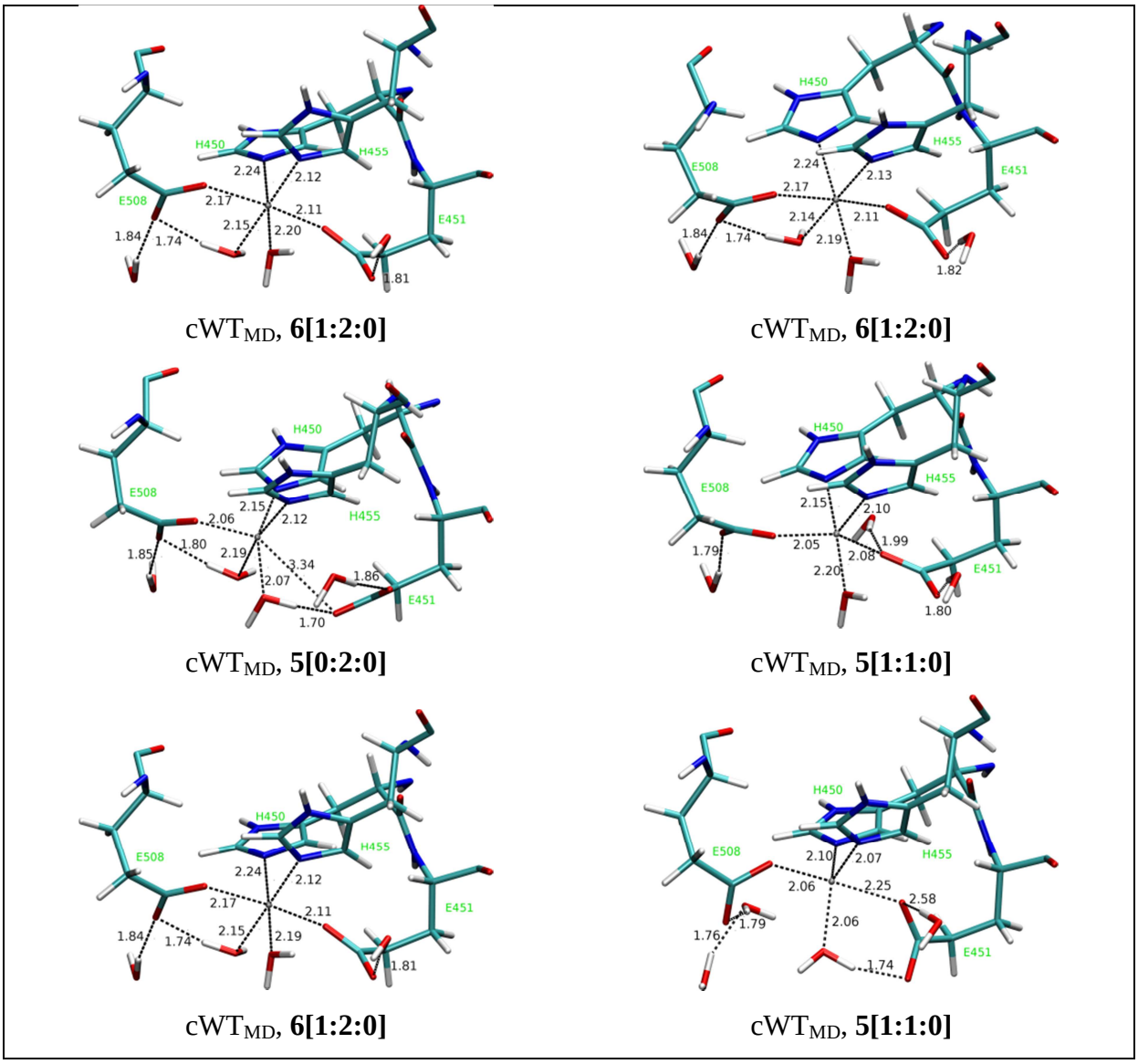
cWT, **5[1:1:0]**



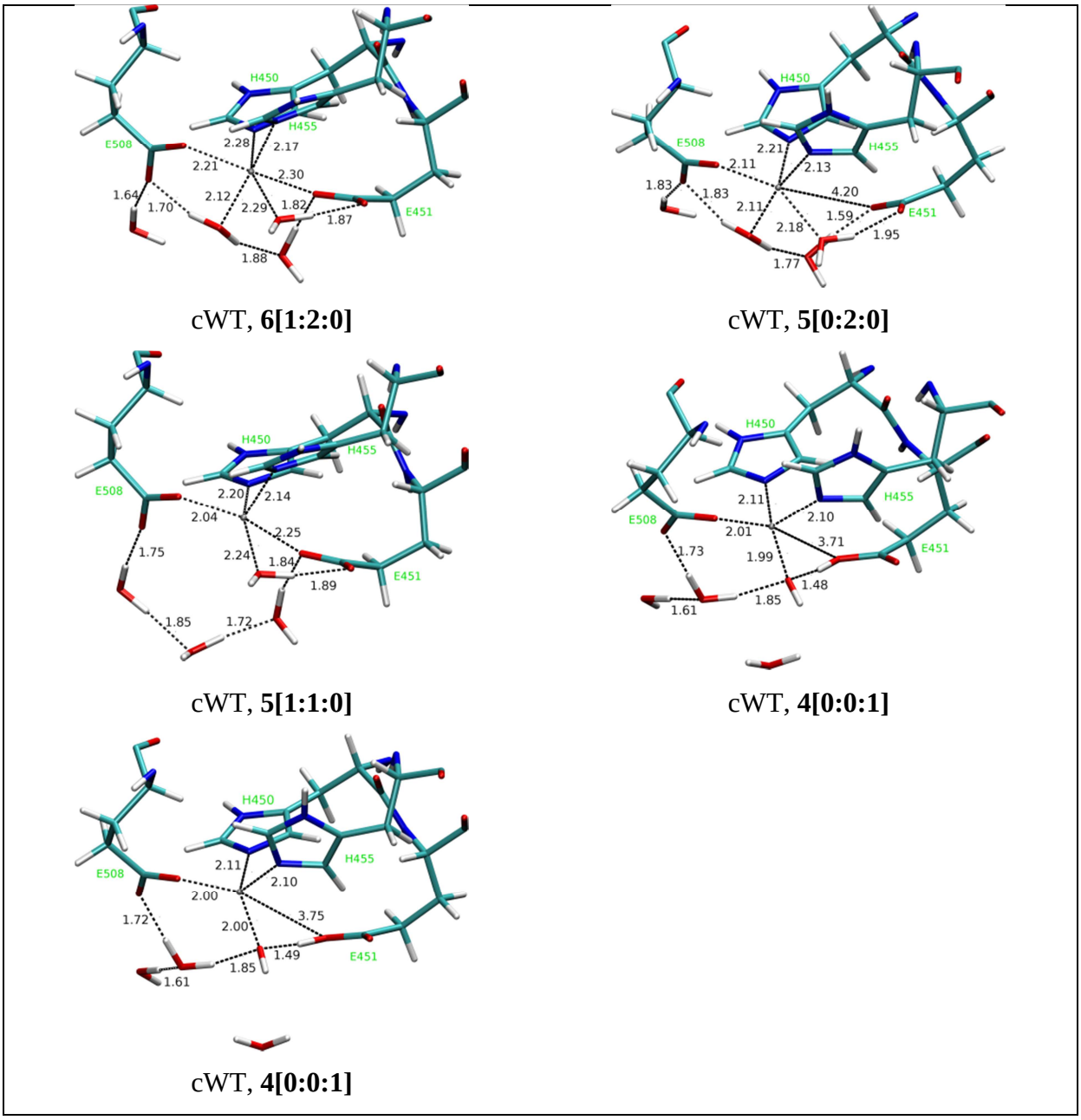
cWT, **4[0:0:1]**



cWT, **4[0:0:1]**



Slika 78. Koordinacijska sfera cinka dobivena QM/MM optimizacijom (uz M06 funkcional) sustava DPP III + 52 molekule vode. oWT, cWT i cWT$_{MD}$ odgovaraju različitim konformacijama enzima, redom „otvorenoj“, „zatvorenoj“ i „zatvorenoj MD“ DPP III. Prikazane su strukture s $\Delta E^{\mathrm{ONIOM}}$ energijom nižom od 83,68 kJ mol^{-1}. Udaljenosti su dane u Å.



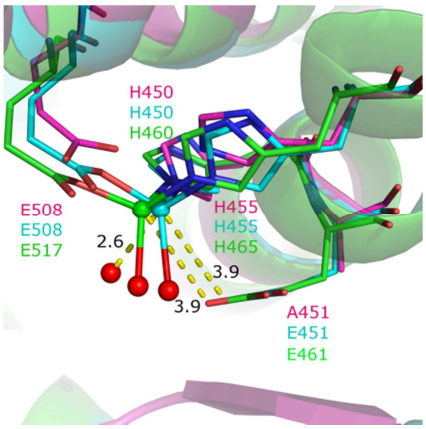
Slika 79. Koordinacijska sfera cinka dobivena QM/MM optimizacijom (uz B3LYP funkcional) sustava DPP III + 52 molekule vode. oWT, cWT i cWT_{MD} odgovaraju različitim konformacijama enzima, redom „otvorenoj“, „zatvorenoj“ i „zatvorenoj MD“ DPP III. Prikazane su strukture s ΔE^{ONIOM} energijom nižom od 83,68 kJ mol^{-1}. Udaljenosti su dane u Å.

QM/MM rezultati upućuju na značajnu fleksibilnost prve koordinacijske sfere cinka i kao takvi su konzistentni s već objavljenim rezultatima o koordinaciji atoma cinka,[92] kao i s rezultatima pretraživanja proteinske baze podataka. Prema ONIOM računu (s M06 funkcionalom), u sve tri različite forme proteina, energetski je najpovoljnija oktaedarska

koordinacija cinka, ostvarena s 4 aminokiseline (His450, Glu451, His455 i Glu508) i dvije molekule vode.

U „otvorenoj“, najvjerojatnije kemijski neaktivnoj, formi enzima, strukture u kojima je koordinacijski broj cinka 5 imaju za otprilike 117 i 180 kJ/mol veću energiju od onih u kojima je koordinacijski broj cinka 6. U prvom slučaju, osim His450, His455, Glu508 i molekule vode, peti lignad koji koordinira cink je Glu451, a u drugom dodatna molekula vode. Međutim, i prema B3LYP i M06 računu, povećanjem globularnosti proteina, razlika u energiji struktura u kojima je koordinacijski broj cinka 5 i 6 postaje sve manja. U slučaju „zatvorene MD“ forme proteina ta razlika iznosi 49,58 kJ/mol kada Glu451 koordinira cink, i 72,43 kJ/mol kada dodatna molekula vode koordinira metalni ion. Još manja razlika u energiji, 19,25 kJ/mol, između pentaedarski i oktaedarski koordiniranog cinka određena je u strukturi „zatvorene“ DPP III s M06 funkcionalom (tablica 19).

Iako trodimenzionalne strukture „otvorene“ forme ljudske i kvaščeve DPP III sugeriraju da je cink tetraedarski koordiniran s His450, His455, Glu508 i molekulom vode (slika 80, u ljudskom ortologu postoji dodatna molekula vode na 2,63 Å od cinka), ONIOM računi predviđaju mogućnost postojanja tetraedarski koordiniranog cinka samo u aktivnom mjestu „zatvorene“ forme DPP III. Struktura u kojoj je cink tetraedarski koordiniran ima za 37 kJ/mol veću energiju od onih u kojima je metalni ion oktaedarski koordiniran u istoj formi proteina. U toj strukturi četvrti ligand cinka je hidroksidni ion nastao deprotonacijom molekule vode od strane Glu451.



Slika 80. Aktivno mjesto tri različite, difrakcijom X-zraka određene, strukture DPP III: mutant C130S kvaščeve DPP III (PDB kod 3CSK, ugljikovi atomi i atom cinka obojeni su zeleno), divlji tip ljudske DPP III (PDB kod 3FVY, ugljikovi atomi i atom cinka obojeni su tirkizno), mutant E451A ljudske DPP III (PDB kod 3T6B, ugljikovi atomi i atom cinka obojeni su ružičasto).

Optimizacijom s B3LYP funkcionalom opažena je još veća fleksibilnost koordinacijske sfere cinka u cWT strukturama. Pentaedarski, 5[1:1:0], koordiniran cink, predstavlja energetski najpovoljniju geometriju, dok 6[1:2:0] i 4[0:0:1] strukture imaju za 9,96, odnosno 23,30 kJ/mol veću energiju. Nadalje, prema B3LYP rezultatima, moguća je i 5[0:2:0] struktura, budući da ona ima za samo 15,52 kJ/mol veću energiju od energetski najpovoljnije.

Koordinacija 6[1:2:0] ima oktaedarsku geometriju u „otvorenoj“ i „zatvorenoj MD“ DPP III, dok u cWT (dobiveno korištenjem oba, M06 i B3LYP, funkcionala) ima djelomično narušenu oktaedarsku geometriju. Nepravilnu trigonsku bipiramidalnu geometriju pokazuju strukture s 5[1:1:0] i 5[0:2:0] koordinacijom cinka u sve tri forme proteina, dok 4[0:0:1] strukture imaju tetraedarsku (B3LYP funkcional) i djelomično deformiranu tetraedarsku (M06 funkcional) geometriju.

QM i QM/MM računi hidrolize peptidne veze u termolizu pokazali su da tijekom reakcije cink ima ili koordinacijski broj 5,[116] ili mu se koordinacijski broj mijenja s 5 na 4 tijekom same reakcije.[29] Također računi su pokazali da glutaminska kiselina aktivira molekulu vode koja koordinira metal za nukleofilni napad na karbonilni ugljik peptidne veze koja sudjeluje u reakciji hidrolize. Ako se pretpostavi da je katalitički mehanizam DPP III sličan onom kod termolizina, tada bi i u DPP III trebao postojati jednaki raspored liganada oko središnjeg metalnog iona. ONIOM računi su pokazali da samo u „zatvorenim“ strukturama DPP III (cWT i cWT_{MD}) postoji vodikova veza između molekule vode (neutralne ili deprotonirane) koordinirane na atom cinka i Glu451. Izražena fleksibilnost koordinacijske sfere cinka, kao i postojanje H_2O-Glu451 vodikove veze, upućuju na zaključak da se reakcija najvjerojatnije odvija u „zatvorenoj“ formi DPP III. U toj strukturi proteina, prema M06 računima, 6[1:2:0], 5[1:1:0] i 4[0:0:1] koordinacijske geometrije cinka imaju redom relativne energije 0,0, 19,25 i 37 kJ/mol. B3LYP računi ukazuju na još manju razliku u energijama struktura 5[1:1:0], 6[1:2:0], 5[0:2:0] i 4[0:0:1], redom 0,0, 9,96, 15,52 i 23,30 kJ/mol. Na temelju pretpostavljene sličnosti katalitičkog mehanizma DPP III i termolizina, rezultata QM/MM računa različitih načina koordinacije cinka i izračunatih energija vezanja supstrata za različite forme proteina (vidi poglavlje 4.1.2), pretpostavljeno je da će DPP III biti aktivna kada se nalazi u najkompaktnijoj, tj. u „zatvorenoj“ (cWT) formi.

4.6. Mehanizam reakcije hidrolize na modelnom sustavu

Struktura kompleksa enzim-supstrat (ES) optimizirana je na B97D/[6-31G + LanL2DZ] razini teorije (6-31G osnovni skup za atome H, N, C, O i LanL2DZ ECP skup za kation Zn^{2+}). U optimiziranom kompleksu ES središnji metalni ion koordiniran je s pet liganada: supstrat (koordiniran s O_s atomom), molekula vode (koordinirana s O_w atomom), His450, His455 i Glu508 (tablica 20 i slika 81). To je u skladu s QM/MM rezultatima različitih načina koordinacije cinka koji su pokazali da je u „zatvorenoj“ (kemijski aktivnoj) strukturi enzima dobivenoj rentgenskom difrakcijskom analizom, energetski najpovoljnija geometrija ona u kojoj je koordinacijski broj cinka 5. U kompleksu ES udaljenost O_w-Zn je za 0,2 Å kraća od udaljenosti O_s-Zn (tablica 20). Također, molekula vode snažno je polarizirana djelovanjem negativno nabijenog Glu451 koji je jaka baza, te kationa cinka (vodikova, O_{e1}-H_{w1}-O_w, i koordinativna, O_w-Zn, veza, slike 81 i D4). Stoga je za pretpostaviti da će pK_a vrijednost vezane molekule vode u aktivnom mjestu enzima biti niža nego u vodi (pK_a vrijednosti u vodi iznosi 15,7). U veznom mjestu enzima molekula supstrata stabilizirana je vodikovim vezama koje tvori s evolucijski očuvanim aminokiselinama His568 i Tyr318, kao i koordinativnom vezom koju tvori s kationom cinka (slika D4).

Tablica 20. Udaljenosti (*d*) između određenih atoma tijekom hidrolize peptidne veze u modelnom sustavu (imena atoma označena su na slici 26). Optimizirane strukture stacionarnih točaka (ES, TS1, INT, TS2 i P) dobivene su na B97D/[6-31G + LanL2DZ] razini teorije.

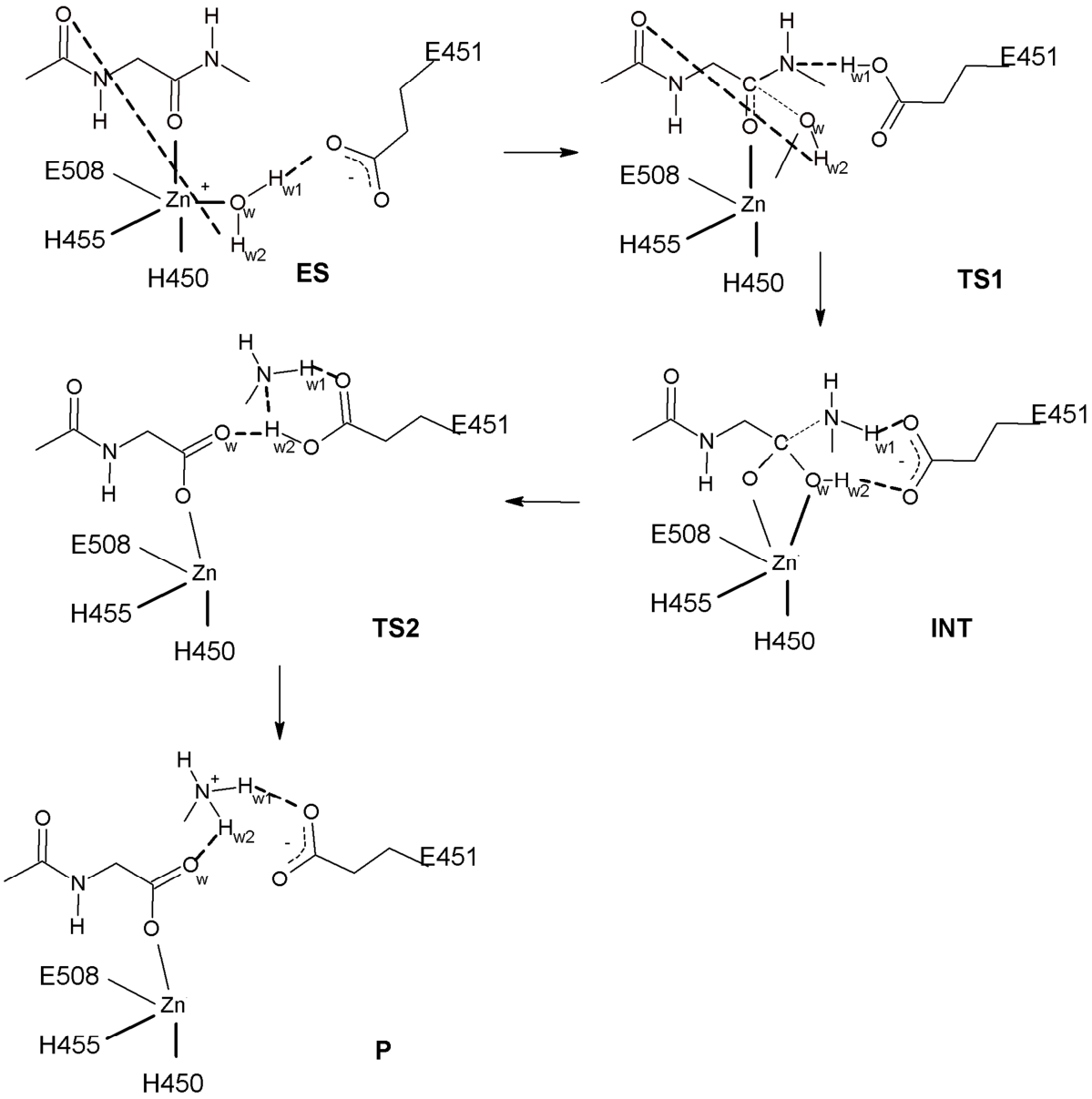
	ES	TS1	INT	TS2	P
$d(O_s\text{-}Zn)$ / Å	2,22	2,04	2,11	2,05	2,02
$d(O_w\text{-}Zn)$ / Å	2,06	2,22	2,18	2,94	4,25
$d(C_s\text{-}N_s)$ / Å	1,35	1,45	1,63	3,13	3,50
$d(O_w\text{-}C_s)$ / Å	3,18	1,58	1,43	1,27	1,27
$d(O_s\text{-}C_s)$ / Å	1,29	1,38	1,36	1,33	1,32
$d(O_w\text{-}H_{w2})$ / Å	0,99	1,00	1,08	2,02	1,69
$d(O_w\text{-}H_{w1})$ / Å	1,07	2,00	2,42	3,41	3,22
$d(H_{w2}\text{-}O_{e2})$ / Å	2,93	2,52	1,42	1,01	3,25
$d(H_{w1}\text{-}O_{e1})$ / Å	1,44	1,01	1,60	2,15	1,51
$d(N_s\text{-}H_{w1})$ / Å	4,87	2,06	1,09	1,02	1,06
$d(N_s\text{-}H_{w2})$ / Å	4,53	2,98	2,75	2,29	1,12
$d(H450^*\text{-}Zn)$ / Å	2,17	2,11	2,11	2,07	2,11
$d(H455^*\text{-}Zn)$ / Å	2,13	2,09	2,10	2,08	2,10
$d(E508^*\text{-}Zn)$ / Å	2,14	2,07	2,06	2,03	2,05

*udaljenost između cinka i dušikovog (Nδ), odnosno kisikovog (karboksilni kisici), atoma liganda (aminokiseline) koji ga koordinira.

Prvi korak u reakcijskom mehanizmu (određenom primjenom 6-31G osnovnog skupa za atome H, N, C i O) je deprotonacija molekule vode od strane Glu451, a nastajući hidroksidni ion vrši nukleofilni napad na karbonilni ugljik iz peptidne veze koja sudjeluje u reakciji hidrolize (C_s, slike 81 i D4). His568 stabilizira negativan naboj na karbonilnom kisiku peptidne veze, što olakšava nukleofilni napad aktiviranom (deprotoniranom) molekulom vode (slika D4). Negativni naboj prvog prijelaznog stanja (TS1, slika 81) stabiliziran je elektrostatskim interakcijama sa Zn^{2+}, no značajnoj stabilizaciji doprinosi i elektrostatska interakcija s His568 (slika D4). Dakle, već u prvom prijelaznom stanju (TS1) narušena je planarnost peptidne veze, a glutaminska kiselina 451 je protonirana. Slijedi prijenos protona H_{w1} na amidni dušik (N_s) iz peptidne veze koja sudjeluje u reakciji hidrolize, pri čemu nastaje oksianionski međuprodukt (INT, slika 81). Važno je uočiti da je prijenos protona H_{w1} popraćen kontinuiranim smanjenjem energije, baš kao što je pokazano i za reakciju hidrolize u modelnom sustavu termolizina (slika 82).[29,116] Također, u međuproduktu nije došlo do potpune disocijacije peptidne veze (veza C_s-N_s se produljila s 1,35 Å u kompleksu ES, na 1,63 Å u INT, tablica 20), a proton H_{w1} i hidroksidna skupina (O_w-H_{w2}) molekule vode vezani su kovalentnom vezom za aktivirani supstrat. Oksianionski međuprodukt također je stabiliziran

vodikovom vezom između karbonilnog kisika supstrata i His568 (slika D4), bidentatnom koordinacijom na atom cinka, ali i vodikovim vezama koje Glu451 tvori s aktiviranim supstratom (slike 81 i D4). Radi se o prilično jakoj vodikovoj vezi između H_{w2} i karboksilnog kisika Glu451 budući da je njihova udaljenost u međuproduktu svega 1,42 Å (tablica 20).

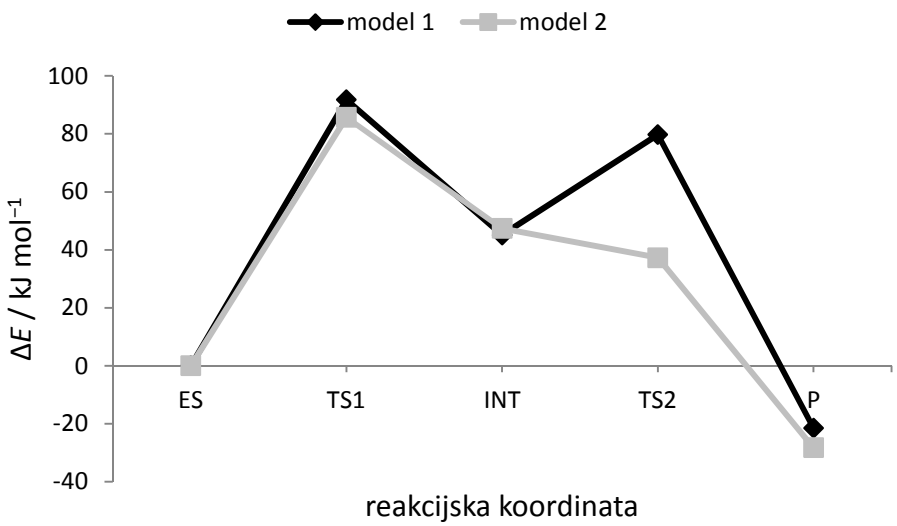
Nukleofilni napad hidroksidnog iona na karbonilni ugljik predstavlja korak koji određuje brzinu kemijske reakcije s energijskom barijerom od 92 kJ/mol (slika 82 i tablica 21). Udaljenost N_s-H_{w1} od 2,06 Å je velika za prijelazno stanje (TS1) koje uključuje prijenos protona. Međutim, prijenos protona H_{w1} na amidni dušik potpomognut je rotacijom bočnog lanca Glu451 (što opravdava korištenje dužeg bočnog lanca u modelu za opis glutamatnih iona). Vibracijskom analizom određena je mala vrijednost imaginarne frekvencije od 208i cm^{-1} za prvo prijelazno stanje, što upućuje na činjenicu da se većinom radi o gibanjima teških atoma i plitkoj plohi potencijalne energije za prijenos protona u polju hidroksilnog (O_w) i karboksilnog (Glu451) kisika.



Slika 81. Mehanizam reakcije hidrolize na modelnom sustavu ljudske DPP III (zbog jednostavnosti nisu prikazani Y318 i H568). Stacionarne točke optimizirane su na B97D/[6-31G + LanL2DZ] razini teorije uz vibracijsku analizu. ES odgovara kompleksu enzim-supstrat, TS1 i TS2 prvom, odnosno drugom, prijelaznom stanju, INT međuproduktu i P produktu. Vodikove veze prikazane su debljim iscrtkanim linijama, veze koje nastaju ili pucaju iscrtkanim linijama, a koordinativne i kovalentne veze debljim, odnosno tanjim punim linijama.

Duljina C_s-N_s veze u međuproduktu od 1,63 Å upućuje na njen prevladavajući ionski karakter, a konačno pucanje peptidne veze nastupa uz energetsku barijeru od 34,6 kJ/mol (tablica 21). U isto vrijeme dolazi do prijenosa drugog protona (H_{w2}) s O_w na karboksilni kisik

Glu451. Konačni produkt (koji je za −21,5 kJ/mol stabilniji od reaktanta, tablica 21) nastaje prijenosom protona (H_{w2}) s karboksilnog kisika Glu451 na izlazeću amino skupinu. Acetatni dio produkta monodentatno koordinira cink s O_s atomom, dok O_w tvori vodikovu vezu s nastalim protoniranim metilaminom. Na kraju reakcije hidrolize cink je tetraedarski koordiniran. Protonirani metilamin je u veznom mjestu stabiliziran vodikovom vezom s Glu451 i van der Waalsovim interakcijama s His450. Važno je uočiti da su i drugo prijelazno stanje i produkt stabilizirani vodikovom vezom s His568 (slika D4), što je u skladu s s eksperimentalnim rezultatima koji pokazuju značajno smanjenje enzimske aktivnosti uslijed mutacije navedenog histidina (vrijednost k_{cat} se smanji za 1296 puta).[14] Eksperimentalni rezultati također su ukazali na važnost Tyr318 u enzimskoj aktivnosti. Međutim, mutacija navednog Tyr u Phe rezultirala je manjim smanjenjem aktivnosti (vrijednost k_{cat} se smanji za 100 puta)[12], nego mutacija His568. Moguće pojašnjenje je neposredno sudjelovanje histidina u stabilizaciji prijelaznog stanja, dok je uloga tirozina pozicionirati supstrat u veznom mjestu enzima.



Slika 82. Energijski profil reakcije hidrolize peptidne veze izračunat na dvije razine teorije: B97D/[6-31G + LanL2DZ] + $ZPVE_{B97D/[6\text{-}31G\ +\ LanL2DZ]}$ (model 1; crna krivulja i rombovi) i B97D/[6-311++G(d,p) + LanL2DZ]//B97D/[6-31G + LanL2DZ] + $ZPVE_{B97D/[6\text{-}31G\ +\ LanL2DZ]}$ (model 2; siva krivulja i kvadratići). Svi računi uključivali su implicitni opis otapala, korištenjem modela polarizabilnog kontinuuma (CPCM) uz dielektričnu konstantu ε=4. Prikazane su relativne energije (ΔE).

Tablica 21. Promjena energije za reakciju hidrolize dobivena na dvije razine teorije: B97D/[6-31G + LanL2DZ] + $ZPVE_{B97D/[6\text{-}31G + LanL2DZ]}$ (model 1) i B97D/[6-311++G(d,p) + LanL2DZ]//B97D/[6-31G + LanL2DZ] + $ZPVE_{B97D/[6\text{-}31G + LanL2DZ]}$ (model 2). Svi računi uključivali su implicitni opis otapala, korištenjem modela polarizabilnog kontinuuma (CPCM) uz dielektričnu konstantu ε=4.

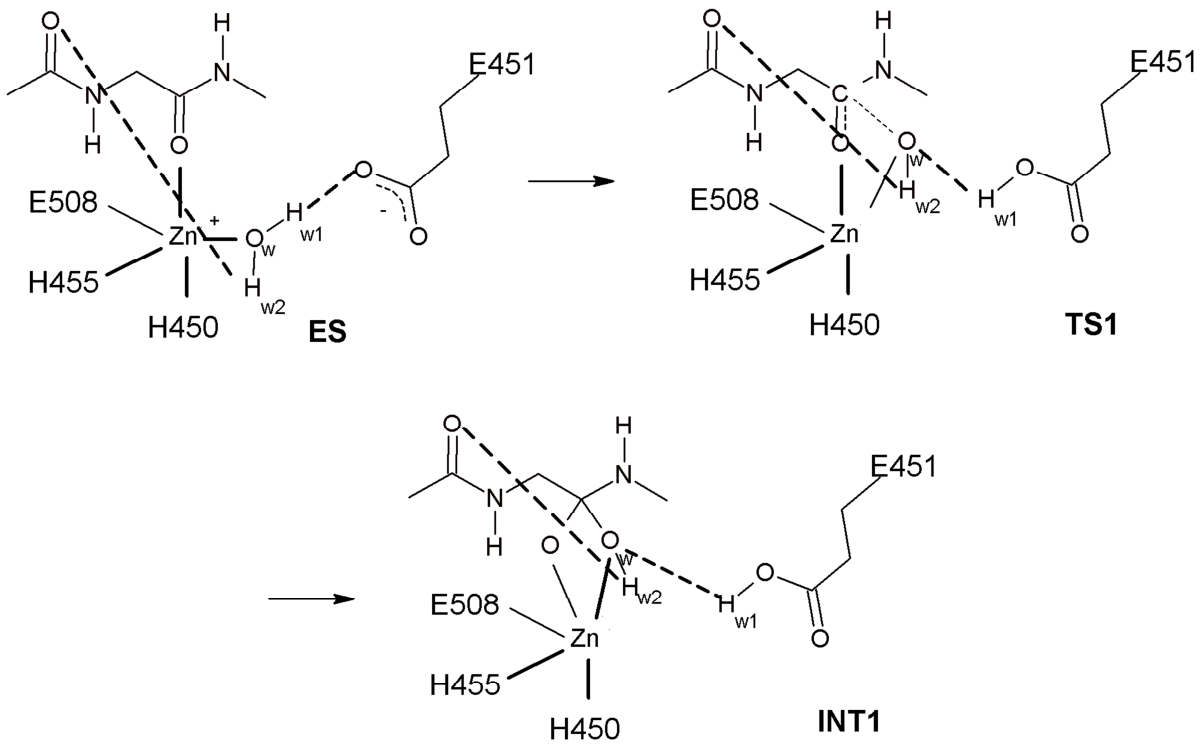
	ΔE / kJ mol^{-1}	
sustav	model 1	model 2
ES	0,0	0,0
TS1	91,8	85,7
INT	45,2	47,4
TS2	79,7	37,3
P	−21,5	−28,3

Neslaganje reakcijskih profila (najuočljivije za TS2 strukturu, slika 82) dobivenih optimizacijom uz 6-31G osnovni skup i *single-point* računom uz 6-311++G(d,p) osnovni skup, ukazuje da je u računu navedenog reakcijskog mehanizma Popleovom osnovnom skupu potrebno pridodati dodatne, polarizacijske i difuzne, osnovne funkcije.

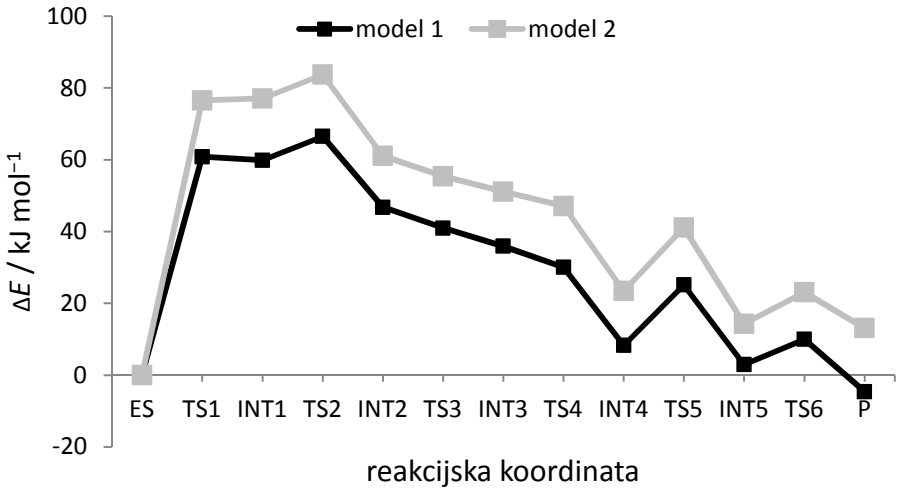
Stoga, kako bi što točnije opisali mehanizam reakcije hidrolize peptidne veze u modelnom sustavu DPP III, stacionarne točke određene su i nakon što je atomima C, N i O dodan po jedan set polarizacijskih funkcija, tzv. 6-31G(d) osnovni skup (za cink je i dalje korišten LanL2DZ ECP osnovni skup). Važno je uočiti očuvanost strukture kompleksa ES dobivene korištenjem oba osnovna skupa (slike D4 i D6). Međutim, za razliku od reakcije dobivene korištenjem manjeg osnovnog skupa (slika 81), uključivanje polarizacijskih funkcija rezultira reakcijom koja se odvija u šest koraka (slike 83, 85, 86, 87 i 88, te slika D6). Veći broj prijelaznih stanja i međuprodukata posljedica su energijskih barijera koje su povezane s reorijentacijom, odnosno rotacijom aminokiselina (prvenstveno Glu451) ili prijenosom protona, koraka koji su korištenjem manjeg osnovnog skupa bili dio drugih elementarnih pretvorbi.

Prvi reakcijski korak određen B97D/[6-31G(d) + LanL2DZ] razinom teorije također uključuje deprotonaciju molekule vode od strane Glu451, a potom nukleofilni napad nastajućeg hidroksidnog iona na karbonilni ugljik iz peptidne veze na kojoj se odvija reakcija hidrolize (slika 83). His568 polarizira karbonilni kisik peptidne veze, što olakšava nukleofilni napad aktiviranom molekulom vode (slika D6). U prvom prijelaznom stanju (TS1, slika 83) supstrat koordinira cink i ostvaruje vodikovu vezu s His568 (slika D6). I u ovom slučaju prvi korak, s energijskom barijerom od 60,8 kJ/mol, je korak koji određuje brzinu kemijske

reakcije (slika 84 i tablica 22). Nastajanjem kovalentne veze O_w-C_s sustav se relaksira u strukturu prvog međuprodukta (udaljenost O_w-C_s se smanji s 1,70 Å u TS1, na 1,51 Å u INT1, tablica 23). Nastali oksianionski tetraedarski međuprodukt (INT1) stabiliziran je vodikovom vezom s His568, bidentatnom koordinacijom na cink, te vodikovom vezom s protoniranim Glu451 (slike 83 i D6). Budući da u INT1 postoji vodikova veza O_w-H_{w1}-O_{e2} (slika 83), udaljenost O_w-Zn je veća, a O_s-Zn kraća, od istih udaljenosti u međuproduktu određenom s manjim osnovnim skupom gdje postoji vodikova veza O_w-H_{w2}-O_{e2} (slika 81). Također, u INT1 udaljenost između C_s-N_s atoma povećala se s početnih 1,34 Å (u kompleksu ES, a po duljini između jednostruke i dvostruke veze) na 1,46 Å, što odgovara jednostrukoj C-N vezi.



Slika 83. Prvi korak u mehanizmu reakcije hidrolize peptidne veze u modelnom sustavu ljudske DPP III (zbog jednostavnosti nisu prikazani Tyr318 i His568). Stacionarne točke optimizirane su na B97D/[6-31G(d) + LanL2DZ] razini teorije uz vibracijsku analizu. ES je kompleks enzim-supstrat, TS1 prvo prijelazno stanja, a INT1 prvi međuprodukt. Vodikove veze prikazane su debljim iscrtkanim linijama, veze koje nastaju ili pucaju iscrtkanim linijama, a koordinativne i kovalentne veze debljim, odnosno tanjim punim linijama.



Slika 84. Energijski profil reakcije hidrolize peptidne veze izračunat na dvije razine teorije: B97D/[6-31G(d) + LanL2DZ] + $ZPVE_{\text{B97D/[6-31G(d) + LanL2DZ]}}$ (model 1; crna krivulja i kvadratići) i B97D/[6-311++G(d,p) + LanL2DZ]//B97D/[6-31G(d) + LanL2DZ] + $ZPVE_{\text{B97D/[6-31G(d) + LanL2DZ]}}$ (model 2; siva krivulja i kvadratići).Svi računi uključivali su implicitni opis otapala, korištenjem modela polarizabilnog kontinuuma (CPCM) uz dielektričnu konstantu ε=4. Prikazane su relativne energije (ΔE).

Tablica 22. Promjena energije za reakciju hidrolize dobivena na dvije razine teorije: B97D/[6-31G(d) + LanL2DZ] + $ZPVE_{\text{B97D/[6-31G(d) + LanL2DZ]}}$ (model 1) i B97D/[6-311++G(d,p) + LanL2DZ]//B97D/[6-31G(d) + LanL2DZ] + $ZPVE_{\text{B97D/[6-31G(d) + LanL2DZ]}}$ (model 2). Svi računi uključivali su implicitni opis otapala, korištenjem modela polarizabilnog kontinuuma (CPCM) uz dielektričnu konstantu ε=4.

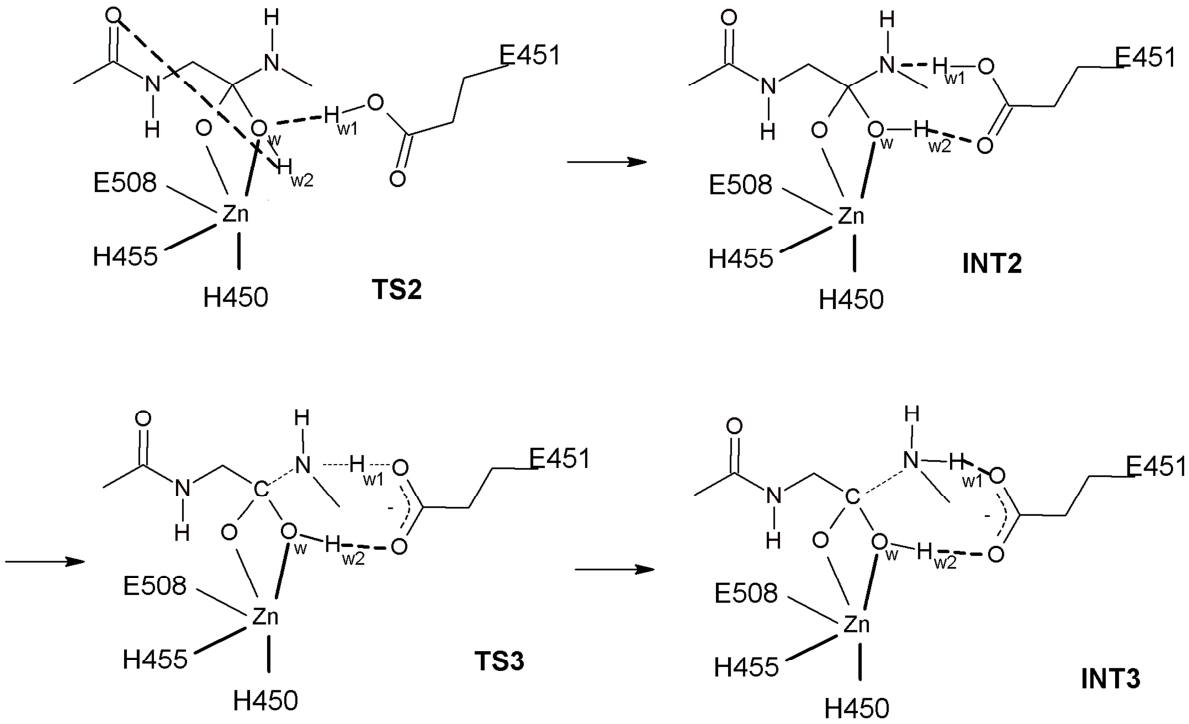
	ΔE / kJ mol^{-1}	
sustav	model 1	model 2
ES	0,0	0,0
TS1	60,8	76,5
INT1	59,9	77,1
TS2	66,5	83,7
INT2	46,8	61,0
TS3	40,9	55,4
INT3	35,9	51,1
TS4	30,0	47,1
INT4	8,3	23,5
TS5	25,2	41,1
INT5	2,9	14,3
TS6	10,0	23,1
P	−4,6	13,1
P’	−33,6	−30,2

Tablica 23. Udaljenosti (*d*) između određenih atoma tijekom hidrolize peptidne veze u modelnom sustavu (na slici 26 označena su imena atoma). Optimizirane strukture stacionarnih točki (ES, TS1-6, INT1-5, P i P') dobivene su korištenjem B97D funkcionala i 6-31G(d) osnovnog skupa za H, N, C i O atome i LanL2DZ ECP za atom Zn^{2+}.

	ES	TS1	INT1	TS2	INT2	TS3	INT3	TS4	INT4	TS5	INT5	TS6	P	P’
$d(O_s\text{-}Zn)$ / Å	2,29	2,03	1,99	2,02	2,03	2,04	2,08	2,09	2,11	2,09	2,09	2,14	2,14	2,02
$d(O_w\text{-}Zn)$ / Å	2,08	2,23	2,43	2,29	2,29	2,29	2,23	2,2	2,38	2,47	2,43	2,32	2,33	4,22
$d(C_s\text{-}N_s)$ / Å	1,34	1,41	1,46	1,47	1,52	1,54	1,67	1,74	2,82	3,05	4,27	3,99	3,52	3,48
$d(O_w\text{-}C_s)$ / Å	3,24	1,70	1,51	1,50	1,45	1,43	1,39	1,37	1,27	1,26	1,26	1,26	1,27	1,25
$d(O_s\text{-}C_s)$ / Å	1,26	1,33	1,36	1,36	1,35	1,35	1,33	1,32	1,29	1,30	1,30	1,29	1,29	1,30
$d(O_w\text{-}H_{w2})$ / Å	0,98	0,99	1,00	0,99	1,00	1,01	1,07	1,18	1,63	2,05	3,42	3,08	2,18	1,74
$d(O_w\text{-}H_{w1})$ / Å	1,07	1,59	1,67	2,07	2,57	2,51	2,41	2,42	2,7	3,46	4,45	4,39	3,98	3,30
$d(H_{w2}\text{-}O_{e2})$ / Å	2,86	2,81	2,83	2,53	1,72	1,66	1,43	1,25	1,02	1,00	1,06	1,37	2,57	3,14
$d(H_{w1}\text{-}O_{e1})$ / Å	1,45	1,03	1,01	1,00	1,09	1,18	1,67	1,76	2,23	2,15	3,12	2,15	1,08	1,49
$d(N_s\text{-}H_{w1})$ / Å	5,12	2,71	2,72	2,14	1,53	1,37	1,07	1,06	1,02	1,02	1,02	1,03	1,54	1,13
$d(N_s\text{-}H_{w2})$ / Å	4,68	3,11	3,02	2,93	2,58	2,57	2,66	2,77	3,61	2,36	1,58	1,19	1,03	1,05
$d(H450^{*}\text{-}Zn)$ / Å	2,22	2,17	2,15	2,15	2,16	2,15	2,14	2,14	2,12	2,11	2,12	2,12	2,12	2,15
$d(H455^{*}\text{-}Zn)$ / Å	2,16	2,11	2,11	2,12	2,12	2,12	2,12	2,12	2,13	2,13	2,12	2,13	2,14	2,13
$d(E508^{*}\text{-}Zn)$ / Å	2,11	2,08	2,06	2,06	2,04	2,04	2,03	2,04	2,04	2,04	2,05	2,05	2,05	2,05

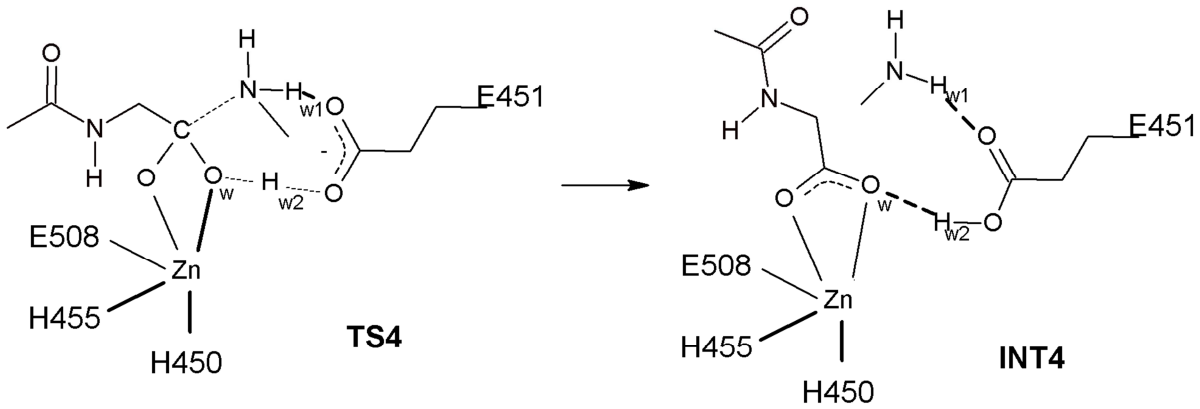
* udaljenost između cinka i dušikovog (Nδ), odnosno kisikovog (karboksilni kisici), atoma liganda (aminokiseline) koji ga koordinira.

Do prijenosa H_{w1} protona na amidni dušik (N_s) iz peptidne veze koja sudjeluje u reakciji hidrolize dešava se u sljedeća dva reakcijska koraka (slika 85). Prvi (s energijskom barijerom od 6,62 kJ/mol, tablica 22) uključuje rotaciju karboksilne skupine Glu451 i hidroksidnog iona (O_w-H_{w2}) na način da nastaju vodikove veze N_s-H_{w1}-O_{e2} i O_w-H_{w2}-O_{e1} (slike 85 i D6). Uslijed toga udaljenost N_s-H_{w1} se smanji s 2,72 Å u INT1, na 1,53 Å u INT2 (tablica 22) što olakšava prijenos protona na amidni dušik (N_s) u sljedećem reakcijskom koraku popraćenom smanjenjem energije (INT3, slika 84). U isto vrijeme dolazi do istezanja peptidne veze, tj. u INT3 udaljenost C_s-N_s iznosi 1,67 Å (tablica 23). Osim vodikovom vezom s His568 i bidentatnom koordinacijom na Zn^{2+} (slike 85 i D6), INT3 je dodatno stabiliziran jakom O_w-H_{w2}-O_{e2} (udaljenost H_{w2}-O_{e2} iznosi 1,43 Å, tablica 23) i nešto slabijom N_s-H_{w1}-O_{e1} (udaljenost H_{w1}-O_{e1} iznosi 1,67 Å, tablica 23), vodikovom vezom. Jaka vodikova veza O_w-H_{w2}-O_{e2} rezultira blagom polarizacijom veze O_w-H_{w2} (udaljenost se poveća s 1,00 Å u INT2 strukturi na 1,07 Å u INT3 strukturi, tablica 23). Uočava se i blago skraćivanje jednostruke C_s-O_w (s 1,45 Å u INT2 na 1,39 Å u INT3, tablica 23) i C_s-O_s (s 1,35 Å u INT2 na 1,33 Å u INT3, tablica 23) veze. Važno je uočiti sličnost struktura međuprodukta INT određenog korištenjem manjeg osnovnog skupa (slika 81) i INT3 dobivenog uz veći osnovni skup (slika 85).



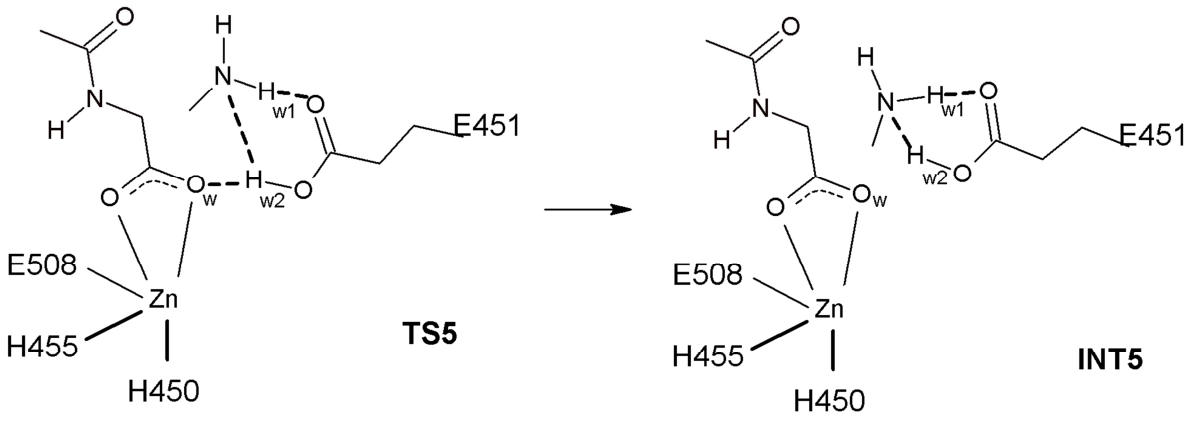
Slika 85. Drugi i treći korak u mehanizmu reakcije hidrolize peptidne veze u modelnom sustavu ljudske DPP III (zbog jednostavnosti nisu prikazani Tyr318 i His568). Stacionarne točke optimizirane su na B97D/[6-31G(d) + LanL2DZ] razini teorije uz vibracijsku analizu. TS2 i TS3 su drugo i treće prijelazno stanja, a INT2 i INT3 drugi i treći međuprodukt. Vodikove veze prikazane su debljim iscrtkanim linijama, veze koje nastaju ili pucaju iscrtkanim linijama, a koordinativne i kovalentne veze debljim, odnosno tanjim punim linijama.

Slijedeći (četvrti) korak uključuje prijenos protona H_{w2} s O_w na karboksilini kisik Glu451, uz istovremeno pucanje peptidne veze (udaljenost atoma C_s i N_s u INT4 iznosi 2,82 Å, slika 86 i tablica 23). Ovaj korak je također popraćen smanjenjem energije (slika 84). Nastali metilamin stabiliziran je van der Waalsovim interakcijama s His450 i slabom vodikovom vezom s Glu451 (udaljenost atoma H_1-O_{e1} iznosi 2,23 Å, tablica 23), a acetatni dio produkta vodikovim vezama s Glu451 i His568, te bidenetatnom koordinacijom na Zn^{2+} (slike 86 i D6). Dodatno skraćivanje veza O_w-C_s i O_s-C_s na 1,27 Å, odnosno 1,29 Å, ukazuje da je C-O veza u INT4 po duljini između jednostruke i dvostruke veze.



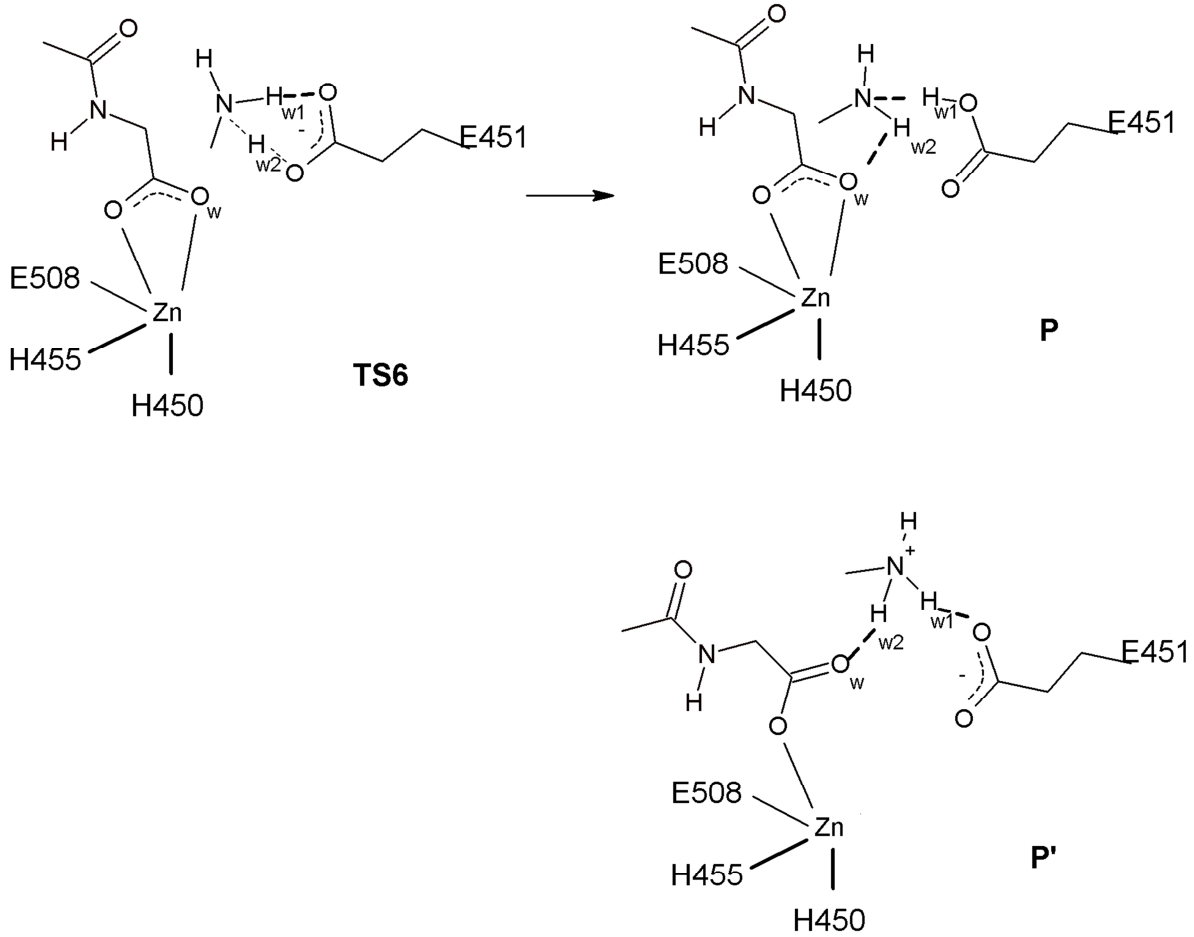
Slika 86. Četvrti korak u mehanizmu reakcije hidrolize peptidne veze u modelnom sustavu ljudske DPP III (zbog jednostavnosti nisu prikazani Tyr318 i His568). Stacionarne točke optimizirane su na B97D/[6-31G(d) + LanL2DZ] razini teorije uz vibracijsku analizu. TS4 je četvrto prijelazno stanja, a INT4 četvrti međuprodukt. Vodikove veze prikazane su debljim iscrtkanim linijama, veze koje nastaju ili pucaju iscrtkanim linjama, a koordinativne i kovalentne veze debljim, odnosno tanjim punim linijama.

Peti reakcijski korak (s energijskom barijerom od 16,9 kJ/mol, tablica 22) uključuje rotaciju karboksilne skupine Glu451 prema metilaminu i nastajanje jake vodikove veze N_s-H_{w2}-O_{e2} (udaljenost N_s-H_{w2} od 3,61 Å u INT4, smanji na 1,58 Å u INT5, tablica 23), te pucanje vodikove veze između Glu451 i acetatnog dijela produkta (slika 87). Iako je tijekom cijele reakcije koordinacijski broj cinka 5, udaljenost O_w-Zn u INT1 i INT5 strukturi iznosi 2,43 Å (tablica 23), što govori o smanjenom doprinosu O_w atoma koordinaciji cinka u tim dvjema strukturama. Važno je uočiti da je razlika u energiji kompleksa ES i INT5 svega 2,9 kJ/mol (tablica 22).



Slika 87. Peti korak u mehanizmu reakcije hidrolize peptidne veze u modelnom sustavu ljudske DPP III (zbog jednostavnosti nisu prikazani Tyr318 i His568). Stacionarne točke optimizirane su na B97D/[6-31G(d) + LanL2DZ] razini teorije uz vibracijsku analizu. TS5 je peto prijelazno stanja, a INT5 peti međuprodukt. Vodikove veze prikazane su debljim iscrtkanim linijama, veze koje nastaju ili pucaju iscrtkanim linjama, a koordinativne i kovalentne veze debljim, odnosno tanjim punim linijama.

Iako je B97D/6-31G(d) računom identificirano i prijelazno stanje koje opisuje prijenos protona H_{w2} s Glu451 na N_s atom (s energijskom barijerom od 7,06 kJ/mol, tablica 22), u konačnom produktu (P) dolazi do prijenosa atoma H_{w1} nazad na Glu451 (slike 88 i D6). Nastali produkt (P) je za −4,60 kJ/mol stabilniji od kompleksa ES (tablica 22). Za razliku od protoniranog amina dobivenog računom s manjim osnovnim skupom, račun s proširenim osnovnim skupom kao konačni produkt ima neprotonirani amin. Uzimajući u obzir energije struktura INT4, INT5 i P (tablica 22) i energijske barijere koje ih razdvajaju, može se pretpostaviti da bilo koja od te tri strukture može predstavljati konačni produkt kemijske reakcije hidrolize peptidne veze. Reoptimizacijom (uz 6-31G(d) osnovni skup) produkta dobivenog računom s manjim osnovnim skupom, geometrija protoniranog amina (produkt P', slike 88 i D6) je očuvana (ΔE=−33,6 kJ/mol u odnosu na kompleks ES, tablica 22). Razlog tome su dvije jake vodikove veze koje on tvori s acetatnim dijelom produkta i Glu451 (udaljenosti O_w-H_{w1} i H_{w2}-O_{e1} iznose 1,7, odnosno 1,5 Å, tablica 23).



Slika 88. Šesti korak u mehanizmu reakcije hidrolize peptidne veze u modelnom sustavu ljudske DPP III (zbog jednostavnosti nisu prikazani Tyr318 i His568). Stacionarne točke optimizirane su na B97D/[6-31G(d) + LanL2DZ] razini teorije uz vibracijsku analizu. TS6 je šesto prijelazno stanja, a P produkt. P' produkt dobiven je reoptimizacijom produkta dobivenog računom s manjim osnovnim skupom. Vodikove veze prikazane su debljim iscrtkanim linijama, veze koje nastaju ili pucaju iscrtkanim linjama, a koordinativne i kovalentne veze debljim, odnosno tanjim punim linijama.

Budući da su na ovoj razini teorije energije TS3 i TS4 niže od energija INT2, odnosno INT3, navedene strukture ne mogu se smatrati prijelaznim stanjima. Oblik krivulje dan na slici 84 upućuje da se sustav nakon prijelaza TS2, manje-više kontinuirano, bez energijske barijere, relaksira, tj. prelazi u INT4. Tijekom navedenog prijelaza proton H_{w1} s karboksilne skupine Glu451 prelazi na atom dušika peptidne veze (N_s) uz istovremeno pucanje C_s-N_s veze i reorganizaciju strukture.

§ 5. ZAKLJUČAK

Primjenom računalnih pristupa različitih stupnjeva složenosti ostvaren je detaljan, submolekulski, uvid u strukturu, dinamiku i aktivnost ljudske DPP III, kao i u proces vezanja liganada za navedeni enzim. Rezultati ovih istraživanja trebali bi olakšati sintezu boljih i specifičnijih inhibitora ljudske DPP III u svrhu ciljane terapije, što je eksperimentalno često vrlo skupo i vremenski izuzetno zahtjevno.

Struktura i fleksibilnost ljudske DPP III detaljno su proučeni primjenom različitih metoda molekulske dinamike (MD) na sustave enzim i enzim-supstrat. Duge MD simulacije slobodnog enzima pokazale su da se radi o izrazito fleksibilnom proteinu podložnom konformacijskoj promjeni koja se može opisati kao „zatvaranje“ proteina.[112] Taj rezultat u skladu je s prethodnim saznanjima: 1) trodimenzionalna struktura DPP III određena rentgenskom difrakcijskom analizom pokazala je da se radi o monomernom proteinu koji se sastoji od dvije domene između kojih se nalazi velika pukotina, 2) bioinformatička analiza pokazala je da se očuvane regije unutar DPP III obitelji nalaze u objema domenama. Nadalje, u ovom doktorskom radu ustanovljeno je da tijekom „zatvaranja“ proteina ljudske DPP III dolazi do povećanja entalpije sustava čemu najviše doprinosi povećanje elektrostatske energije sustava (tablica 5). Iako bi to moglo sugerirati da će u otopini biti preferirana „otvorena“ konformacija proteina, pozitivan entropijski efekt zbog oslobađanja strukturiranih molekula vode s površine proteina i iz pukotine između domena (slika 32) u otapalo uslijed njegove globularizacije kompenzira pozitivan entalpijski prirast. Na temelju tih rezultata predložili smo tzv. model ravnotežne raspodjele konformera (eng. *pre-existing equilibrium*) koji pretpostavlja postojanje ansambla različitih konformera enzima koje su međusobno u dinamičkoj ravnoteži. Vezanjem liganda za jednu, njemu najpovoljniju, konformaciju dolazi do pomicanja raspodjele prema toj, „reaktivnoj“, konformaciji proteina.

Opravdanost predloženog modela za vezanja liganda u vezno mjesto enzima dodatno je ispitana nizom standardnih i ubrzanih MD simulacijama sustava enzim i enzim-supstrat, kao i MD simulacijama krupnog zrna. „Zatvaranje“ enzima u tzv. „poluzatvorenu“ ili „zatvorenu“ formu opaženo je u većini tih simulacija, bilo da se radilo o simulacijama enzima ili kompleksa sa supstratom. Usmjerene MD simulacije ukazale su na važnost „poluzatvorene“

forme proteina u procesu vezanja molekule liganda u vezno mjesto enzima, kao i na najvjerojatniji put ulaska liganda u vezno mjesto.

MD simulacijama ispitan je i utjecaj pojedinih točkastih mutacija (MD simulacijama mutanata W300L, D372A i K405A) na konformacijsku promjenu enzima. Kao što je i pretpostavljeno na temelju dugih MD simulacija divljeg tipa enzima, mutacija aspartata 372 u alanin rezultirala je smanjenjem stupnja „zatvaranja“ proteina tijekom 70 ns duge MD simulacije mutanta oD372A. Razlog je nemogućnosti nastanka vodikove veze Asp372-Asn406/Lys405.[112] Tijekom MD simulacije mutanata triptofana 300 i lizina 405 (100% očuvanih aminokiselina unutar obitelji M49) nije uočena smanjena pokretljivost domena, već samo neznatno smanjenje fleksibilnosti aminokiselinskih regija kojim pripadaju mutirane aminokiseline, kao i regija u njihovoj okolici. Međutim za pouzdanije zaključke o utjecaju navedenih mutacija trebalo bi provesti duže simulacije.

QM/MM računima ispitan je utjecaj različitih konformacija proteina na koordinaciju centralnog metalnog (Zn^{2+}) iona.[115] Rezultati tih istraživanja pomogli su u određivanju kemijski aktivne forme enzima, kao i točnom definiranju koordinacijske sfere kationa cinka, metala potrebnog za aktivnost metalopeptidaza iz obitelji M49. QM/MM rezultati upućuju na značajnu fleksibilnost prve koordinacijske sfere cinka i kao takvi konzistentni su s već objavljenim rezultatima o koordinaciji atoma cinka,[92] kao i s rezultatima pretraživanja proteinske baze podataka. Prema ONIOM, M06 računima, u sve tri različite forme proteina, energetski je najpovoljnija oktaedarska koordinacija cinka (metal monodentatno koordiniran s His450, Glu451, His455, Glu508 i dvije molekule vode), pri čemu se povećanjem globularnosti proteina (tj. „zatvaranjem“), razlika između energija struktura u kojima je koordinacijski broj cinka 5 i 6 smanjuje (tablica 19, B3LYP i M06 računi). Prema ONIOM računima postojanja tetraedarski koordiniranog cinka (koordinacija prisutna u eksperimentalno određenim strukturama DPP III) moguće je samo u aktivnom mjestu „zatvorene“ forme DPP III. U toj strukturi pored His450, His455 i Glu508 cink koordinira i hidroksidni ion nastao deprotonacijom molekule vode od strane Glu451. Na temelju pretpostavke da je katalitički mehanizam DPP III sličan onom u termolizinu i ONIOM računa koji su pokazali da je postojanje pentaedarski i/ili tetraedarski koordiniranog Zn^{2+} i vodikove veze između glutaminske kiseline iz aktivnog mjesta enzima i molekule vode koja koordinira metal energetski najizvedljivije u „zatvorenoj“, cWT formi DPP III, može se zaključiti da je ta forma enzimski najaktivnija. Aktivna forma enzima dodatno je potvrđena MD

simulacijama kompleksa DPP III sa sintetičkim supstratom Arg-Arg-2-naftilamidom (RRNA). Simulacije su ukazale na znato povećanje stabilnosti DPP III-RRNA kompleksa s povećanjem globularnosti proteina[112] pri čemu je najstabilnija struktura (tablica 10) u kojoj arginini supstrata formiraju β-vrpcu koja se na antiparalelan način veže za β-ploču iz „donje“ domene proteina sastavljenu od pet β-vrpci. Mapa elektrostatskih potencijala na površini „otvorene” forme enzima ukazuje je na snažnu elektrostatsku stabilizaciju pozitivno nabijenih gvanidino skupina i N-kraja supstrata s negativno nabijenim aminokiselinama, većinom, iz „donje“ domene proteina (Glu316, Glu327, Glu329 i Asp396, slike 57 i 60, te tablica 11).

MD simulacije s peptidnim supstratima (Leu-enkefalin i endomorfin 1 i 2) pridonijele su boljem razumijevanju supstratne specifičnosti ljudske DPP III. Uočeno je da su peptidni supstrati stabilizirani istim aminokiselinama u veznom mjestu ljudske DPP III (tablica 15) kao i RRNA. Međutim, za razliku od elektrostatski stabilizirane molekule RRNA, Leu-enkefalin i endomorfini su većinom stabilizirani van der Waalsovim, CH-π i *stacking* interakcijama. Pri tome, većina vodikovih veza prisutnih u kompleksima DPP III s peptidnim supstratima posljedica je vezanja molekule supstrata na antiparalelan način za β-ploču iz „donje“ domene proteina. Prema tome supstratna specifičnost ljudske DPP III definirana je s dva faktora: a) sposobnošću supstrata da se veže u obliku β-vrpce i b) pozitivno nabijenim N-krajem molekule supstrata.[115] Budući različite aminokiseline imaju različite „sklonosti“ (eng. *propensity*) tvorenju sekundarne strukture β-vrpce, dobar supstrat DPP III bi na prva tri položaja od N-kraja (P1, P2 i P1') trebao imati aminokiseline koje pokazuju veću „sklonost“ formiranju β-ploče, kao što su Val, Ile, Leu, Cys, Phe, Tyr, Trp, Thr i Met.[113] Pri tome građa S2, S1' i S2' podmjesta enzima posebno preferira aromatske aminokiseline, kao što su Tyr, Phe i Trp, na P2, P1' i P2' položaju molekule supstrata zbog mogućnosti da s njima tvore van der Waalsove, CH-π i *stacking* interakcije.

Ispitan je i utjecaj pojedinih točkastih mutacije (His568 u Asn,[14] Asn406 u Gln,[111] Asn406 u Ser)[111] na vezanje liganda (supstrata, Arg-Arg-2-naftilamida, i inhibitora, Tyr-Phe-hidroksamata) u vezno mjesto enzima. Iako su koordinacija cinka i položaj RRNA u kompleksu oH568N-$RRNA_{MD}$ slični onima u kompleksu s divljim tipom enzima, razlika je u stabilizaciji drugog arginina i naftilamidne skupine molekule supstrata. Kao posljedica mutacije nedostaju CH-π interakcije između naftilamidne skupine RRNA i His568, dok su snažne interakcije drugog arginina sa Ser504 u kompleksu s mutiranim zamijenjene vodikovom vezom s Asn568. Mutacija His568 u Asn rezultirala je značajnom promjenom u

načinu vezanja inhibitora u vezno mjesto mutanta oH568N-INH$_{MD}$, tj. tijekom MD simulacije inhibitor je napustio koordinacijsku sferu cinka te se vezao bliže „donjoj“ domeni proteina. Razlog tome je što Asn568 odvlači karboksilnu skupinu Glu508 dalje od inhibitora, te dolazi do pucanja vodikove veze između Glu508 i hidroksilne skupine molekule inhibitora. Ti rezultati slažu se s kinetičkim mjerenjima koja su pokazala da zamjena evolucijski očuvanog His568 ne utječe na vrijednost Michaelisove konstante u slučaju vezanja molekule supstrata, dok je u slučaju inhibitora primijećeno slabije vezanje za mutirani enzim, nego za divlji tip (9 puta niža vrijednost K_i za divlji nego mutirani tip enzima).

Mutacija 100% očuvanog Asn406 (u serin i glutamin) i Trp300 (u leucin) za posljedicu ima povećanje pokretljivosti (fleksibilnosti) aminokiselinskih regija kojima pripadaju mutirane aminokiseline. U kompleksima oN406Q-RRNA$_{MD}$ i oW300L-RRNA$_{MD}$ dolazi do blagog pomaka β-ploče iz „donje“ domene (aminokiseline 388-408), smještene odmah ispod aktivnog mjesta, prema „gornjoj“ domeni proteina. Uočeno je da mutacija Trp300 značajnije utječe na narušavanje tercijarne strukture β-ploče (slika 53) sastavljene od 5 β-vrpci iz „donje“ domene proteina zbog gubitka CH-π, kation-π i van der Waalsovih interakcija između indolnog prstena Trp300 i evolucijski 100% očuvanog Lys405. Tijekom MD simulacija kompleksa oN406Q-RRNA$_{MD}$ i oW300L-RRNA$_{MD}$, katalitički važan His568 stabiliziran je vodikovom vezom s Glu512 (slika 51). U tom položaju His568 ne ostvaruje interakcije sa supstratom, te je time smanjen njegov doprinos u samoj reakciji. Svi ti rezultati u skladu su s eksperimentalnim mjerenjima koji upućuju na značajno smanjenje katalitičke efikasnosti mutanata N406Q i W300L.

Mehanizam reakcije hidrolize peptidne veze u aktivnom mjestu ljudske DPP III određen je na modelnom sustavu sastavljenom od supstrata, aminokiselinskih ostataka koji neposredno sudjeluju u procesu katalize i ostataka koji koordiniraju ion cinka. Prvi korak reakcije, u kome dolazi do deprotonacije molekule vode koja koordinira atom cinka od strane Glu451, te nukleofilnog napada nastajućeg hidroksidnog iona na karbonilni ugljik iz druge peptidne veze s N-kraja supstrata, je korak koji određuje brzinu reakcije s energijom aktivacije od 60,8 kJ/mol. Nastali oksianionski međuprodukt stabiliziran je elektrostatskim interakcijama s Zn^{2+} i s vodikovom vezom s His568, a u stabilizaciji sudjeluje i Tyr318 koji tijekom cijele reakcije, osim s Glu508 vodikovu vezu tvori i s prvom NH skupinom supstrata. Pucanjem peptidne veze nastaje ili protonirani ili neutralni amin uz acetatni dio produkta. Tijekom reakcije hidrolize koordinacijski broj cinka je 5, pri čemu u koordinaciji sudjeluju His450, His455,

Glu508, supstrat i voda. Samo u slučaju nastajanja protoniranog amina koordinacijski broj cinka se smanji na 4 zbog rotacije acetatnog dijela produkta i formiranja vodikove veze s nastalim protoniranim aminom (kompenzacija nastalog pozitivnog naboja).

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

Å	ångström je fizikalna jedinica za duljinu; 1 Å = 10^{-10} m
atm	standardna atmosfera je fizikalna jedinica za tlak; 1 atm = 101325 Pa
cWT	„zatvorena“ forma ljudske DPP III, PDB kod 3T6B
cWT_{MD}	„zatvorena“ forma ljudske DPP III dobivena nakon dugih (72, 101 ili 207 ns) MD simulacija „otvorene“ forme ljudske DPP III
DFT	kvantno mehanički funkcional (eng. *density functional theory*)
EE	elektrostatsko uklapanje (eng. *electrostatic embedding*)
EN1	endomorfin-1
EN2	endomorfin-2
L-EN	Leu-enkefalin
ME	mehaničko uklapanje (eng. *mechanical embedding*)
MD	molekulska dinamika (eng. *molecular dynamics*)
MM	molekulska mehanika (eng. *molecular mechanics*)
MM-GBSA	metoda za račun slobodne energije (eng. *molecular mechanics Generalized Born solvent accessible area*)
MM-PBSA	metoda za račun slobodne energije (eng. *molecular mechanics Poisson-Boltzmann solvent accessible area*)
NpT	izotermno-izobarni ansambl
NVE	mikrokanonski ansambl
NVT	kanonski ansambl
ONIOM	kvantno mehanička-molekulsko mehanička metoda (eng. *our own N-layered integrated molecular orbital and molecular mechanics*)
oWT	„otvorena“ forma ljudske DPP III, PDB kod 3FVY
PBC	periodični rubni uvjeti (eng. *periodic boundary conditions*)
PCM	metoda za simuliranje otapala (eng. *polarizable continuum model*)
PDB	proteinska baza podataka (eng. *protein data bank*)
PME	metoda za računanje elektrostatskih interakcija (eng. *particle mesh Ewald*)
QM	kvantna mehanika (eng. *quantum mechanics*)

QM/MM	kvantna mehanika−molekulska mehanika (eng. *quantum mechanics-molecular mechanics*)
R_g	radijus giracije (eng. *radius of gyration*)
RMSD	korjen iz srednjeg kvadrata odstupanja (eng. *root mean square deviation*)
RMSF	korijen iz srednjeg kvadrata fluktuacije (eng. *root mean square fluctuation*)
RRNA	Arg-Arg-2-naftilamid
SASA	površina dostupna otapalu (eng. *solvent accessible surface area*)
ZPVE	energija nulte točke (eng. *zero point vibrational energy*)

§ 7. DODATAK

Tablica D1. Interakcije između DPP III, divljeg tipa (WT) i mutanta (H568N), i liganda (supstrat, Arg-Arg-2-naftilamid, i inhibitor, Tyr-Phe-hidroksamat). P1, P2 i P1' su aminokiselinski ostaci koji interagiraju s odgovarajućim podmjestima na enzimu (S1, S2 i S1').

				P2		P1		P1'
	$^{+}H_3N$-			-Arg-		-Arg-		-2-naftilamid
				S2		S1		S1'
WT	Asp372	30%H	Asp372	H	Glu451[a]	H	Leu413	v.d.W./CH-π
	Glu451	H	Phe404	v.d.W	Ser504	5% H/elec./v.d.W.	Phe443	v.d.W./CH-π
			Asn406	20%H/elec./v.d.W.	Glu508	65% H	Val447	v.d.W./CH-π
					Gln566	17%H/elec./v.d.W.	Gln446	v.d.W./CH-π
					Ala567	v.d.W.	His450	v.d.W./CH-π
							Glu451	v.d.W./CH-π
							His568	v.d.W./CH-π
							Arg572	v.d.W./NH-π
H568N	Asp372	30%H	Asp372	H	Glu451[a]	65%H/elec.	Leu413	v.d.W./CH-π
	Glu451	H	Phe404	v.d.W.	Glu508	28%H	Phe443	v.d.W./CH-π
			Asn406	7%H/elec./v.d.W.	Gln566	3%H/v.d.W./elec.	Val447	v.d.W./CH-π
			Asn391	32%H	Ala567	v.d.W.	Gln446	v.d.W./CH-π
					Asn568	H	His450	v.d.W./CH-π
							Glu451	v.d.W./CH-π
							Arg572	v.d.W./NH-π
				P2		P1		P1'
	$^{+}H_3N$-			-Tyr-		-Phe-		-hidroksamat
				S2		S1		S1'
WT	Asp372	H	Pro371	CH-π/elec./v.d.W.	Glu451[a]	H	Glu508	60%H
	Glu451	H	Asp372	v.d.W.	His455	v.d.W.		
			Asn406	elec.	Ser504	v.d.W		
			His455	v.d.W.	Glu507	v.d.W./CH-π		
			Glu451	v.d.W.	Glu508	v.d.W.		
H568N	Asp372	50%H	Pro371	CH-π/elec./v.d.W.	Asn391[b]	v.d.W	Glu451	76%H/elec.
	Gln451	H	Asp372	v.d.W.	Phe404[b]	v.d.W	Asn406	22%H/elec.
			Asn391	50%H	Asn406[b]	v.d.W		
			Asn406	13%H/elec./v.d.W.	Glu451[a]	H		
			His455	v.d.W.				

[a] Vodikova veza s amidnom skupinom. Neke vodikove veze prisutne su tijekom cijele MD simulacije, a neke samo određeni period (naznačeno u postotcima simulacijskog vremena).

[b] Interakcije koje nastaju povremeno zbog rotacije fenilalanina.

Tablica D2. Relativne energije djelomično otopljene DPP III (enzim + 52 molekule vode) dobivene dvoslojnom ONIOM optimizacijom s M06 ili B3LYP funkcionalom (s mehaničkim, ME, ili elektrostatskim uklapanjem, EE) i dva različita osnovna skupa (6-31+g(d,p) za atome H, N, C i O i LANL2DZ-ECP za Zn^{2+}). MM dio opisan je AMBER poljem sila (parm96). Uspoređene su energije dobive za istu konformaciju proteina. KB je koordinacijski broj cinka, a brojevi u uglatim zagradama kazuju koordiniraju li Glu451, molekula(e) vode ili OH− ion, atom cinka (0 znači da ga ne koordinira, a brojevi ≥ 1 označavaju broj kisikovih atoma koji koordiniraju cink). Računi u kojima su MM molekule vode bile fiksirane tijekom minimizacije (kako bi postigli konvergenciju u „otvorenoj“ strukturi DPP III gdje postoji veliki broj molekula vode u neposrednoj blizini cinka koje se izmjenjuju u koordinaciji metal), naznačeni su kosim brojevima.

početne strukture		M06 s ME		M06 s EE		B3LYP s EE	
sustav	KB[E451: H_2O:OH^-]	KB[E451: H_2O:OH^-]	$\frac{\Delta E^{\mathrm{ONIOM}}}{\mathrm{kJ\ mol^{-1}}}$	KB[E451: H_2O:OH^-]	$\frac{E^{\mathrm{ONIOM}}}{\mathrm{kJ\ mol^{-1}}}$	KB[E451: H_2O:OH^-]	$\frac{E^{\mathrm{ONIOM}}}{\mathrm{kJ\ mol^{-1}}}$
cWT	6[1:2:0]	6[1:2:0]	0,00	6[1:2:0]	0,00	6[1:2:0]	9,96
	5[0:2:0]	5[0:2:0]	64,06	6[1:2:0]	29,71	5[0:2:0]	15,52
	5[1:1:0]	5[1:1:0]	39,46	5[1:1:0]	19,25	5[1:1:0]	0,00
	5[0:1:1]	6[0:3:0]	150,46	6[0:3:0]	131,34	5[0:2:0]	99,83
	4[0:1:0]	4[0:0:1]	36,90	4[0:0:1]	51,42	4[0:0:1]	37,03
	4[0:0:1]	4[0:0:1]	21,21	4[0:0:1]	36,99	4[0:0:1]	23,30
cWT_{MD}	6[1:2:0]	6[1:2:0]	0,00	6[1:2:0]	0,00		
	5[0:2:0]	6[1:2:0]	6,95	6[1:2:0]	0,00		
	5[0:1:1]	5[0:1:1]*	71,96	5[0:2:0]	72,43		
	5[1:1:0]	5[1:1:0]	62,43	5[1:1:0]	58,41		
	4[0:1:0]			6[1:2:0]	0,00		
	4[0:0:1]	5[0:1:1]	71,09	5[1:1:0]	49,58		
oWT	6[1:2:0]	6[1:2:0]	0,00	6[1:2:0]	15,82		
	5[0:2:0]	6[0:3:0]	118,24	*6[0:3:0]*	153,51		
	5[1:1:0]	*5[1:1:0]*	113,09	*5[1:1:0]*	117,65		
	5[0:1:1]	5[0:2:0]	129,75	*5[0:2:0]*	179,12		
	4[0:1:0]	6[0:3:0]	80,83	6[0:3:0]	102,17		
	4[0:0:1]	6[1:2:0]	31,97	6[1:2:0]	0,00		

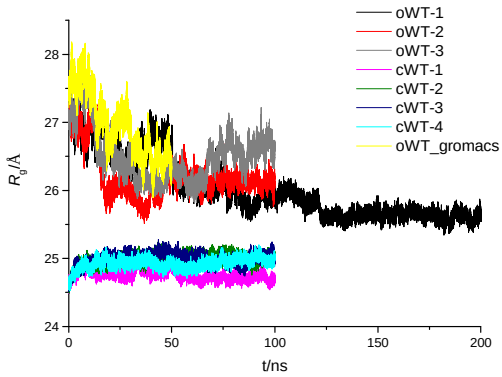
* struktura u kojoj se vodikov atom molekule vode koja koordinira cink i ima vodikovu vezu s Glu451 nalazi podjedanako udaljen od kisikovog atoma iz molekule vode i karboksilnog kisika Glu451.

Tablica D3. Minimalne i maksimalne vrijednosti parametara: R_g, d_1 (udaljenost između Cα atoma D186 i S500) i d_2 (udaljenost između Cα atoma Q400 i S500) izračunate tijekom MD i AMD simulacija.

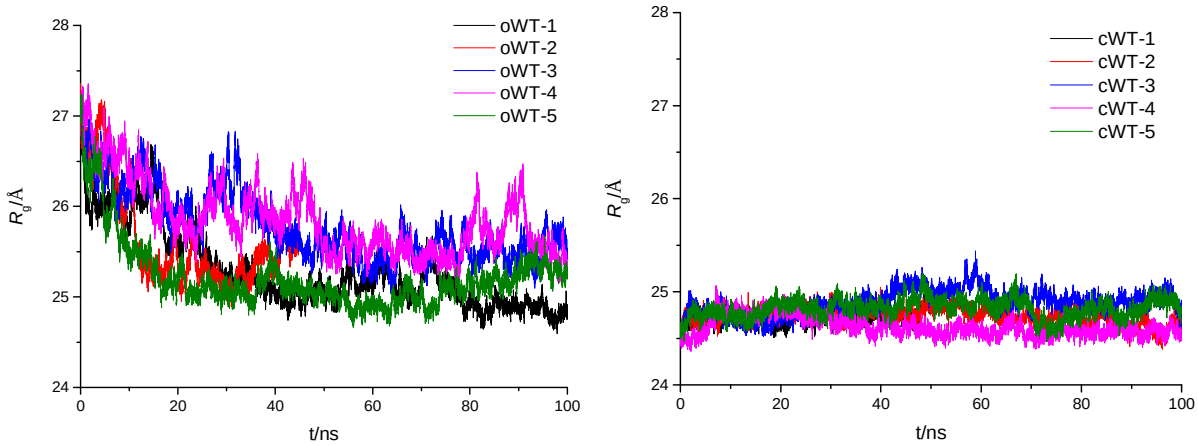
metoda	oznaka simul.	t/ns	$R_{g,min}$/Å	$R_{g,max}$/Å	$d_{1,min}$/Å	$d_{1,max}$/Å	$d_{2,min}$/Å	$d_{2,min}$/Å	oznaka simul.	t/ns	$R_{g,min}$/Å	$R_{g,max}$/Å	$d_{1,min}$/Å	$d_{1,max}$/Å	$d_{2,min}$/Å	$d_{2,min}$/Å
MD	oWT-1	207	25,3	27,5	13,2	38,2	5,6	31,0								
	oWT-2	100	25,5	27,5	17,3	39,8	8,7	30,2								
	oWT-3	100	25,8	27,8	19,6	40,1	10,3	29,8								
	oWT_gromacs	50	25,9	28,2	19,0	44,6	15,5	30,1								
	cWT-1	100	24,5	25,1	8,1	15,0	18,6	26,2								
	cWT-2	100	24,5	25,2	8,7	13,5	15,7	22,2								
	cWT-3	100	24,5	25,3	8,9	15,0	15,2	22,0								
	cWT-4	100	24,5	25,2	9,4	13,5	15,3	20,6								
AMD_1	oWT-1	100	24,6	27,2	7,8	34,0	16,7	32,9	oWT-RRNA-1	50	26,1	27,7	24,5	40,7	13,8	32,8
	oWT-2	50	24,9	27,4	10,5	35,9	14,5	30,9	oWT-RRNA-2	100	25,0	27,8	11,2	42,9	16,9	33,5
	oWT-3	100	25,0	27,2	15,1	36,6	16,3	30,4	oWT-RRNA-3	100	25,0	27,9	13,1	43,8	17,6	33,8
	oWT-4	100	25,2	27,4	13,7	40,0	11,6	34,1	oWT-RRNA-4	100	25,1	27,8	12,2	44,5	13,1	34,4
	oWT-5	100	24,7	27,2	10,7	36,7	14,2	31,7	oWT-RRNA-5	100	24,9	27,5	12,1	43,7	17,5	33,5
	cWT-1	50	24,4	25,0	6,4	14,0	14,9	25,6	cWT-RRNA-1	50	24,4	25,0	8,7	14,9	16,7	24,6
	cWT-2	100	24,4	25,1	6,4	14,6	17,8	25,6	cWT-RRNA-2	100	25,0	25,8	9,7	15,5	16,1	22,1
	cWT-3	100	24,5	25,4	8,4	14,9	15,5	25,8	cWT-RRNA-3	100	24,6	25,1	8,3	15,3	16,0	23,8
	cWT-4	100	24,4	25,1	8,9	14,5	14,9	22,4	cWT-RRNA-4	100	24,4	25,1	7,8	14,4	15,9	22,6
	cWT-5	100	24,5	25,2	8,6	16,0	15,0	27,8	cWT-RRNA-5	100	24,5	25,1	8,5	14,0	16,7	23,6
	cWT_{MD}-1	50	25,0	25,7	13,6	21,8	5,9	13,1	cWT_{MD}-RRNA-1	50	25,0	26,0	14,2	24,3	10,9	23,1
	cWT_{MD}-2	100	25,0	25,8	13,8	22,3	5,7	13,9	cWT_{MD}-RRNA-2	100	25,0	26,6	10,0	30,6	10,4	28,0
	cWT_{MD}-3	100	25,0	25,6	13,9	22,6	5,1	11,0	cWT_{MD}-RRNA-3	100	24,8	26,1	11,4	23,8	10,2	24,8
	cWT_{MD}-4	100	25,0	25,9	14,2	23,2	5,9	12,1	cWT_{MD}-RRNA-4	100	24,8	26,0	8,2	23,9	10,2	27,2
	cWT_{MD}-5	100	24,8	25,9	12,1	25,6	5,6	24,0	cWT_{MD}-RRNA-5	100	24,9	26,4	9,0	29,4	11,7	26,2
AMD_2	oWT-1	100	24,8	27,2	10,3	33,8	14,9	29,7	oWT-RRNA-1	100	25,3	27,4	13,9	40,0	8,7	28,9
	oWT-2	100	25,4	27,4	15,3	39,2	15,5	33,2	oWT-RRNA-2	100	25,4	27,7	17,2	41,4	15,8	34,7
	oWT-3	150	24,5	27,2	6,9	33,3	14,8	29,8	oWT-RRNA-3	100	25,0	27,7	13,0	42,7	16,1	32,3
	oWT-4	150	24,6	27,2	8,3	35,8	14,5	32,0	oWT-RRNA-4	100	25,1	27,7	11,1	44,2	7,5	35,1
	oWT-5	100	25,4	27,2	16,0	36,2	17,0	33,5	oWT-RRNA-5	100	25,0	28,1	14,5	46,8	15,4	34,7
AMD_3	oWT-1	300	25,2	27,3	13,6	33,4	8,7	30,3	oWT-RRNA-1	297	25,1	27,9	12,2	45,5	13,1	36,8
	oWT-2	285	25,4	27,6	17,1	42,3	10,6	36,2	oWT-RRNA-2	297	24,9	27,9	11,0	41,6	12,4	30,7

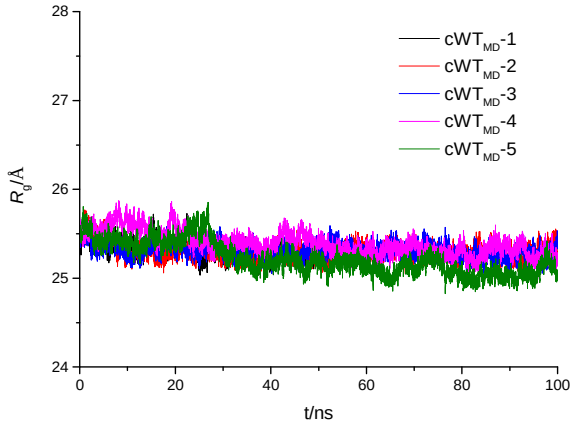
Tablica D4. Minimalne i maksimalne vrijednosti parametara: R_g, d_1 (udaljenost između D186 i S500 zrna iz okosnice) i d_2 (udaljenost između Q400 i S500 zrna iz okosnice) izračunate tijekom 60 CGMD simulacija.

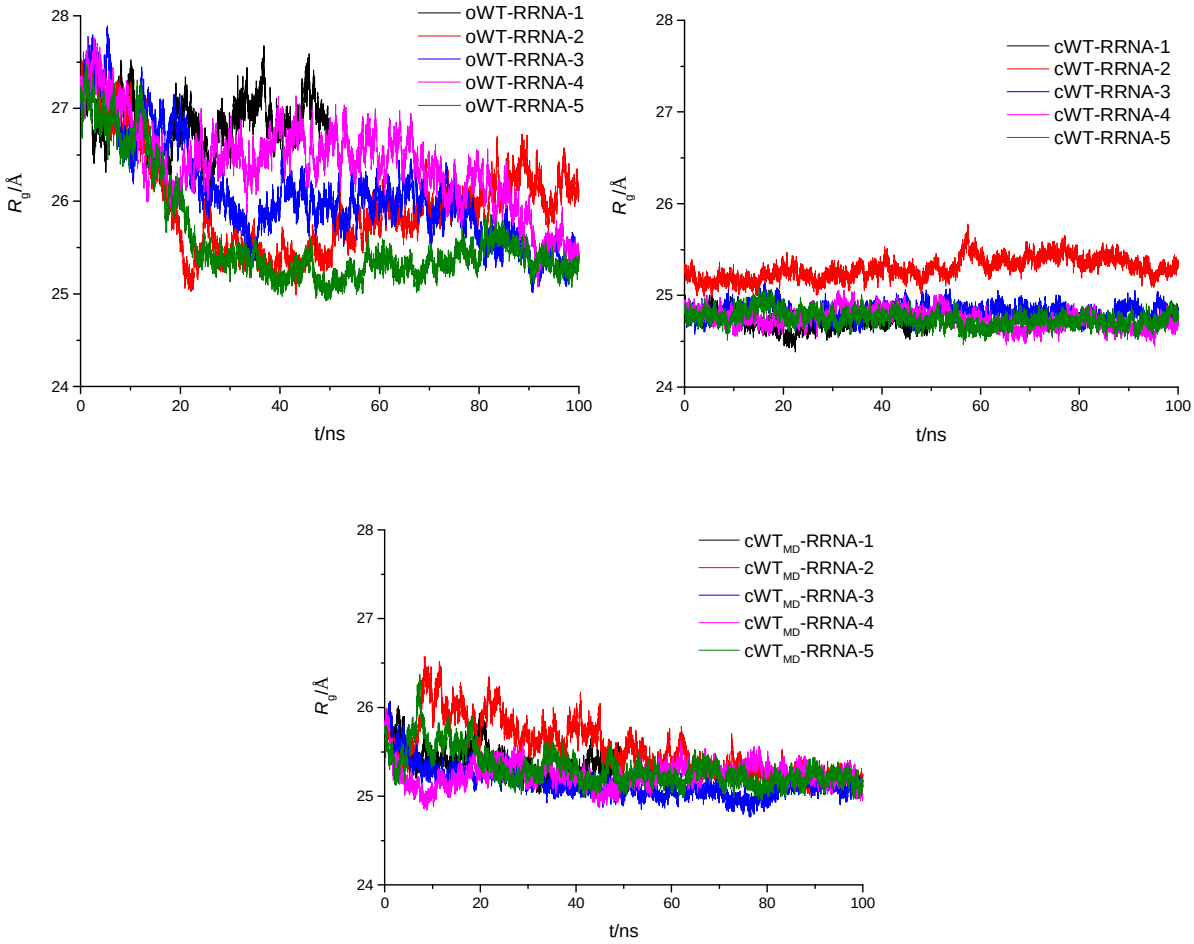
oznaka simul.	$R_{g,min}$/ Å	$R_{g,max}$ /Å	$d_{1,min}$ /Å	$d_{1,max}$ /Å	$d_{2,min}$ /Å	$d_{2,max}$ /Å	oznaka simul.	$R_{g,min}$/ Å	$R_{g,max}$ /Å	$d_{1,min}$ /Å	$d_{1,max}$ /Å	$d_{2,min}$ /Å	$d_{2,max}$ /Å	oznaka simul.	$R_{g,min}$/ Å	$R_{g,max}$/ Å	$d_{1,min}$/ Å	$d_{1,max}$/ Å	$d_{2,min}$/ Å	$d_{2,max}$/ Å
oWT-1	25,5	27,3	22,2	40,1	8,8	26,3	cWT-1	24,5	25,3	9,4	15,7	17,7	24,1	cWT_{MD}-1	25,2	26,0	13,6	22,0	4,9	14,8
oWT-2	26,2	28,6	24,8	46,5	15,6	33,2	cWT-2	24,5	25,3	9,6	15,4	15,5	21,2	cWT_{MD}-2	25,2	25,9	16,8	27,3	4,7	11,9
oWT-3	26,1	28,1	28,4	55,1	22,9	48,0	cWT-3	24,7	25,4	10,8	17,6	19,1	25,1	cWT_{MD}-3	25,3	26,2	17,0	26,7	5,5	13,8
oWT-4	25,9	27,8	23,8	50,7	19,8	43,0	cWT-4	24,5	25,2	10,4	15,4	15,5	21,2	cWT_{MD}-4	25,3	26,1	14,9	26,4	5,3	13,8
oWT-5	25,8	27,7	24,1	42,5	20,1	34,1	cWT-5	24,6	25,2	9,7	15,4	17,5	22,9	cWT_{MD}-5	25,2	26,1	15,9	25,1	6,1	18,1
oWT-6	26,3	28,5	28,0	52,5	24,4	46,5	cWT-6	24,6	25,5	7,9	15,9	15,2	24,2	cWT_{MD}-6	25,2	26,2	17,8	26,8	5,1	13,6
oWT-7	26,5	28,8	27,3	51,9	25,3	41,5	cWT-7	24,6	25,3	10,1	15,2	16,8	22,3	cWT_{MD}-7	25,5	27,3	17,0	34,3	5,1	16,0
oWT-8	24,8	27,4	15,7	40,1	16,5	33,6	cWT-8	24,6	25,4	8,4	13,5	15,6	21,2	cWT_{MD}-8	25,1	26,1	18,4	30,7	5,0	9,4
oWT-9	26,4	28,4	36,0	60,7	26,3	52,5	cWT-9	24,7	25,5	11,8	23,0	14,9	21,2	cWT_{MD}-9	25,1	26,3	15,6	24,7	4,6	10,6
oWT-10	26,4	28,8	33,6	54,1	22,6	38,1	cWT-10	24,6	25,1	8,4	14,5	14,9	21,2	cWT_{MD}-10	25,1	26,3	10,5	23,8	8,0	15,7
oWT-11	26,6	28,8	35,5	58,7	26,3	45,7	cWT-11	24,5	25,2	10,1	16,1	14,7	21,2	cWT_{MD}-11	25,5	27,1	19,9	38,5	4,8	13,9
oWT-12	26,2	28,4	30,1	52,3	20,2	40,9	cWT-12	24,5	25,3	8,1	15,9	15,4	22,6	cWT_{MD}-12	25,3	27,4	15,9	32,3	5,0	13,9
oWT-13	25,2	27,5	14,6	40,1	15,6	34,1	cWT-13	24,6	25,1	11,8	19,5	15,5	22,2	cWT_{MD}-13	25,2	26,5	15,4	29,3	5,0	22,2
oWT-14	26,2	27,7	32,0	49,7	19,0	33,2	cWT-14	24,5	25,4	11,8	22,6	19,3	23,2	cWT_{MD}-14	24,9	26,0	17,9	28,1	4,8	9,1
oWT-15	25,8	27,3	19,3	40,1	16,4	30,9	cWT-15	24,6	25,4	10,9	18,5	19,6	26,1	cWT_{MD}-15	25,2	26,1	14,7	24,9	4,8	12,8
oWT-16	26,7	28,5	33,2	50,7	26,3	43,8	cWT-16	24,6	25,2	8,0	16,9	18,6	24,6	cWT_{MD}-16	25,2	26,0	15,0	25,4	8,2	17,0
oWT-17	26,1	28,9	29,3	55,7	26,0	46,6	cWT-17	24,5	25,4	9,2	17,5	14,9	21,2	cWT_{MD}-17	25,1	26,3	16,7	25,9	6,3	14,5
oWT-18	26,0	27,8	23,5	43,8	19,8	36,1	cWT-18	24,7	25,8	11,8	22,5	17,5	22,6	cWT_{MD}-18	25,3	26,6	13,7	28,8	7,1	13,8
oWT-19	26,7	28,6	33,9	56,7	22,7	42,8	cWT-19	24,5	25,2	7,4	12,3	15,2	21,2	cWT_{MD}-19	25,4	26,4	19,1	29,8	4,6	10,1
oWT-20	26,6	28,3	34,9	52,2	24,6	42,8	cWT-20	24,7	25,5	10,8	18,1	15,2	21,2	cWT_{MD}-20	25,4	27,0	14,8	27,7	4,8	14,6


oWT-1
oWT-2
oWT-3
cWT-1
cWT-2
cWT-3
cWT-4
oWT_gromacs
R_g/Å
t/ns

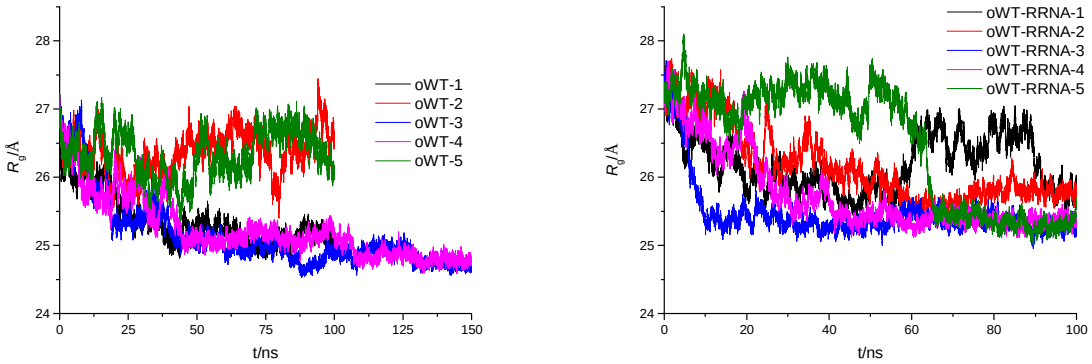
a)


oWT-1
oWT-2
oWT-3
oWT-4
oWT-5
cWT-1
cWT-2
cWT-3
cWT-4
cWT-5
R_g/Å
t/ns

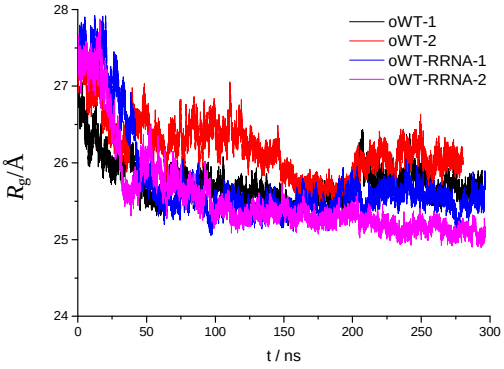

cWT_{MD}-1
cWT_{MD}-2
cWT_{MD}-3
cWT_{MD}-4
cWT_{MD}-5
R_g/Å
t/ns


oWT-RRNA-1
oWT-RRNA-2
oWT-RRNA-3
oWT-RRNA-4
oWT-RRNA-5
cWT-RRNA-1
cWT-RRNA-2
cWT-RRNA-3
cWT-RRNA-4
cWT-RRNA-5
cWT$_{MD}$-RRNA-1
cWT$_{MD}$-RRNA-2
cWT$_{MD}$-RRNA-3
cWT$_{MD}$-RRNA-4
cWT$_{MD}$-RRNA-5
R_g/Å
t/ns

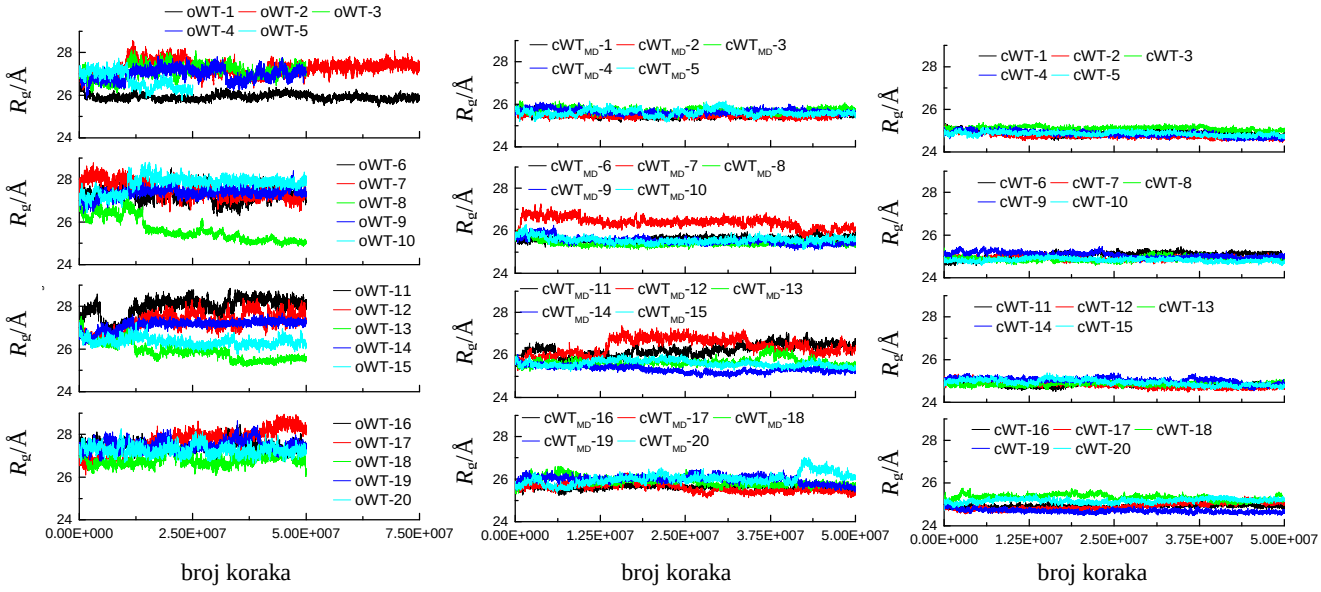
b)


oWT-1
oWT-2
oWT-3
oWT-4
oWT-5
oWT-RRNA-1
oWT-RRNA-2
oWT-RRNA-3
oWT-RRNA-4
oWT-RRNA-5
R_g/Å
t/ns

c)

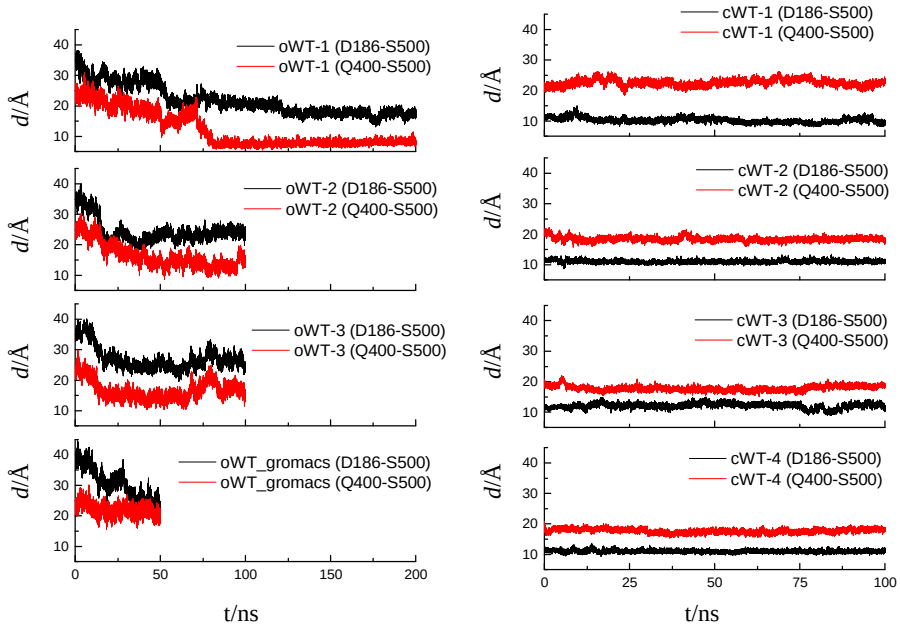


d)

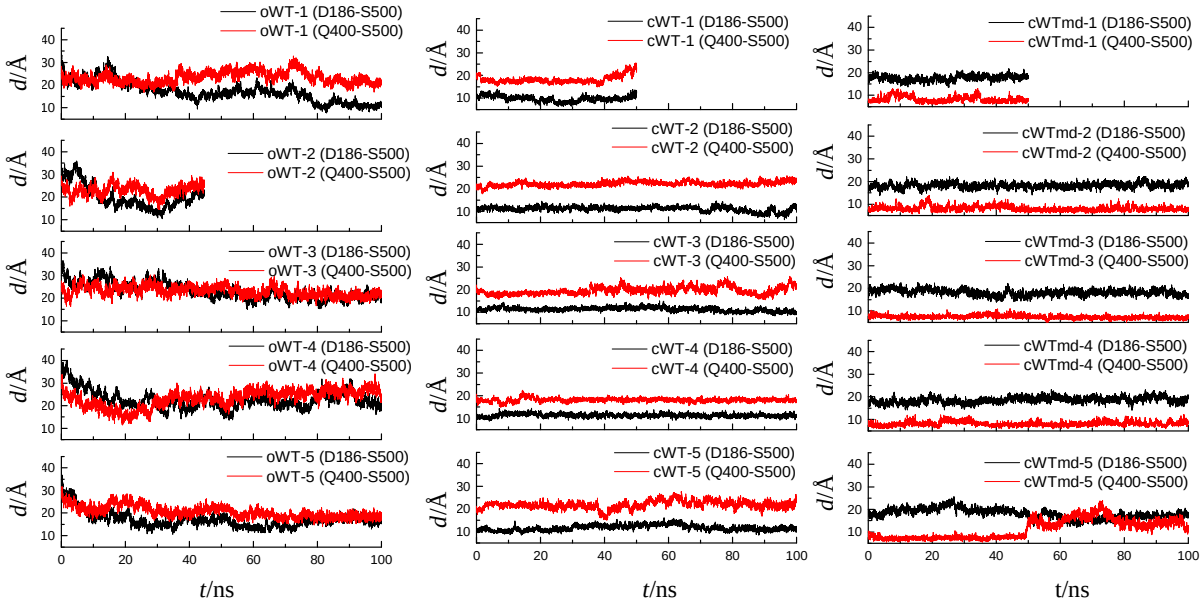


e)

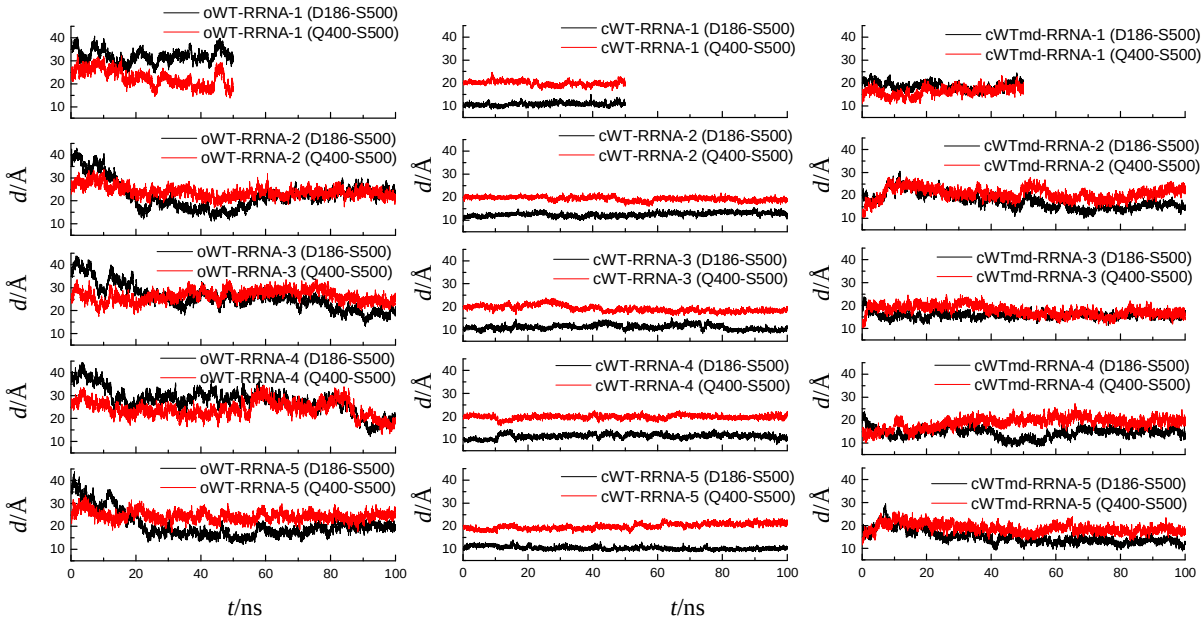
Slika D1. Radijus giracije (R_g) izračunat za atome (ili zrna) iz okosnice proteina (aminokiseline 463-489, koje čine fleksibilnu petlju, nisu uzeti u obzir) tijekom: a) MD, b) AMD_1, c) AMD_2, d) AMD_3 i e) CGMD simulacija.


oWT-1 (D186-S500)
oWT-1 (Q400-S500)
oWT-2 (D186-S500)
oWT-2 (Q400-S500)
oWT-3 (D186-S500)
oWT-3 (Q400-S500)
oWT_gromacs (D186-S500)
oWT_gromacs (Q400-S500)
cWT-1 (D186-S500)
cWT-1 (Q400-S500)
cWT-2 (D186-S500)
cWT-2 (Q400-S500)
cWT-3 (D186-S500)
cWT-3 (Q400-S500)
cWT-4 (D186-S500)
cWT-4 (Q400-S500)
d/Å
t/ns

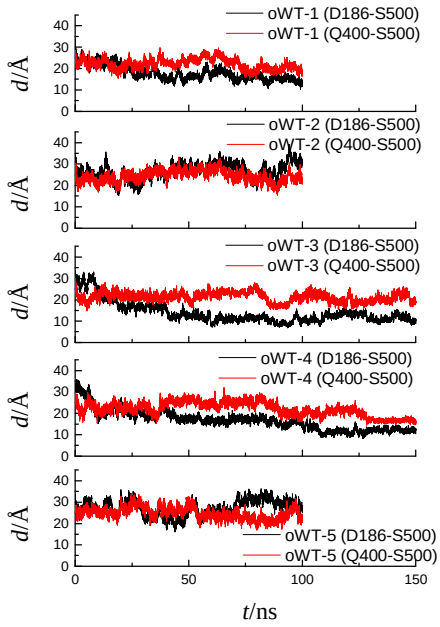
a)


oWT-1 (D186-S500)
oWT-1 (Q400-S500)
oWT-2 (D186-S500)
oWT-2 (Q400-S500)
oWT-3 (D186-S500)
oWT-3 (Q400-S500)
oWT-4 (D186-S500)
oWT-4 (Q400-S500)
oWT-5 (D186-S500)
oWT-5 (Q400-S500)
cWT-1 (D186-S500)
cWT-1 (Q400-S500)
cWT-2 (D186-S500)
cWT-2 (Q400-S500)
cWT-3 (D186-S500)
cWT-3 (Q400-S500)
cWT-4 (D186-S500)
cWT-4 (Q400-S500)
cWT-5 (D186-S500)
cWT-5 (Q400-S500)
cWTmd-1 (D186-S500)
cWTmd-1 (Q400-S500)
cWTmd-2 (D186-S500)
cWTmd-2 (Q400-S500)
cWTmd-3 (D186-S500)
cWTmd-3 (Q400-S500)
cWTmd-4 (D186-S500)
cWTmd-4 (Q400-S500)
cWTmd-5 (D186-S500)
cWTmd-5 (Q400-S500)
d/Å
t/ns

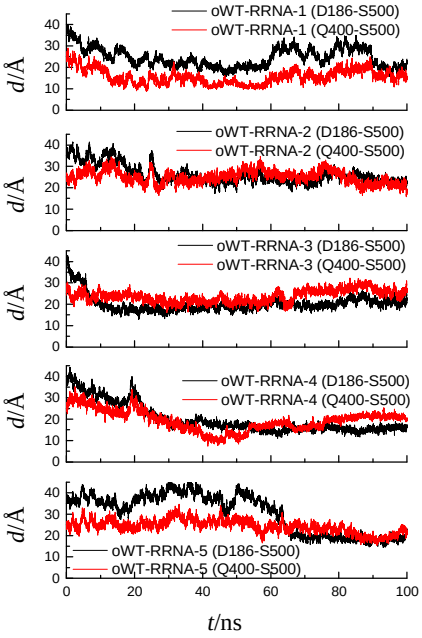
b)


oWT-RRNA-1 (D186-S500)
oWT-RRNA-1 (Q400-S500)
oWT-RRNA-2 (D186-S500)
oWT-RRNA-2 (Q400-S500)
oWT-RRNA-3 (D186-S500)
oWT-RRNA-3 (Q400-S500)
oWT-RRNA-4 (D186-S500)
oWT-RRNA-4 (Q400-S500)
oWT-RRNA-5 (D186-S500)
oWT-RRNA-5 (Q400-S500)
cWT-RRNA-1 (D186-S500)
cWT-RRNA-1 (Q400-S500)
cWT-RRNA-2 (D186-S500)
cWT-RRNA-2 (Q400-S500)
cWT-RRNA-3 (D186-S500)
cWT-RRNA-3 (Q400-S500)
cWT-RRNA-4 (D186-S500)
cWT-RRNA-4 (Q400-S500)
cWT-RRNA-5 (D186-S500)
cWT-RRNA-5 (Q400-S500)
cWTmd-RRNA-1 (D186-S500)
cWTmd-RRNA-1 (Q400-S500)
cWTmd-RRNA-2 (D186-S500)
cWTmd-RRNA-2 (Q400-S500)
cWTmd-RRNA-3 (D186-S500)
cWTmd-RRNA-3 (Q400-S500)
cWTmd-RRNA-4 (D186-S500)
cWTmd-RRNA-4 (Q400-S500)
cWTmd-RRNA-5 (D186-S500)
cWTmd-RRNA-5 (Q400-S500)
d/Å
t/ns

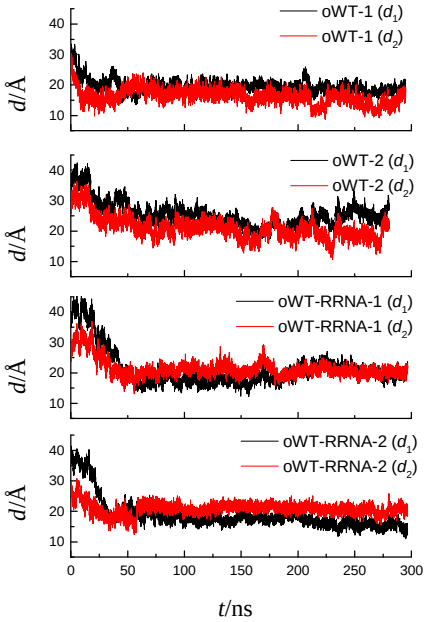
c)


oWT-1 (D186-S500)
oWT-1 (Q400-S500)
oWT-2 (D186-S500)
oWT-2 (Q400-S500)
oWT-3 (D186-S500)
oWT-3 (Q400-S500)
oWT-4 (D186-S500)
oWT-4 (Q400-S500)
oWT-5 (D186-S500)
oWT-5 (Q400-S500)
d/Å
t/ns

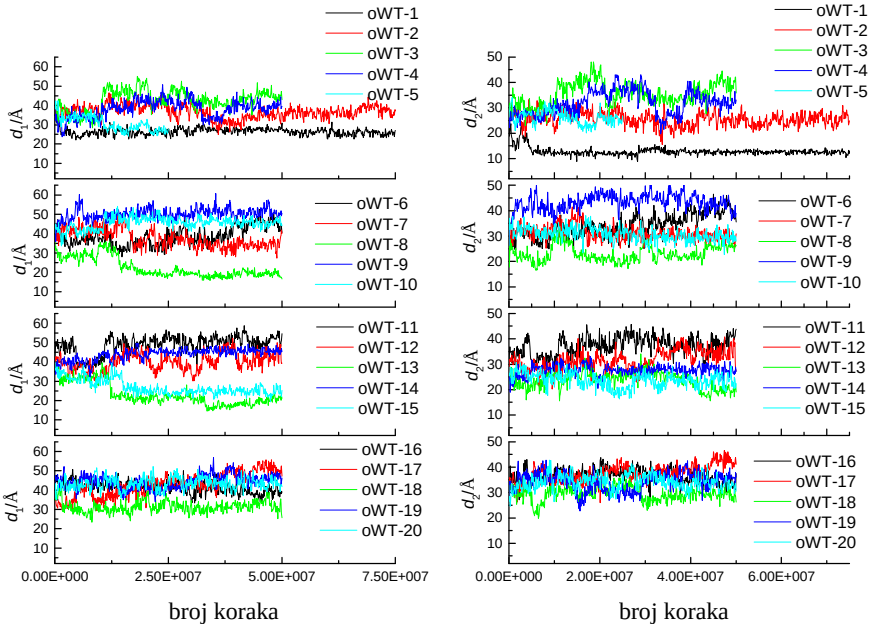
d)

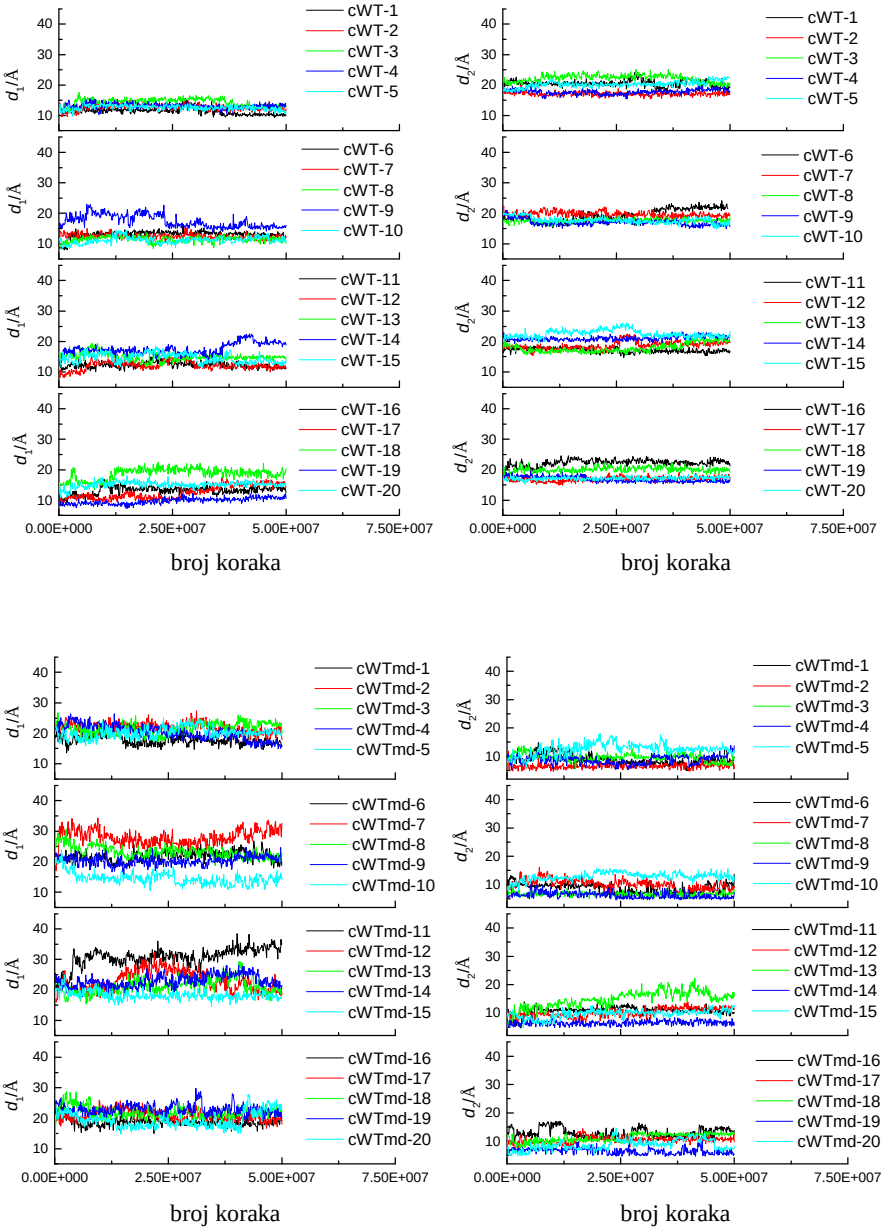

oWT-RRNA-1 (D186-S500)
oWT-RRNA-1 (Q400-S500)
oWT-RRNA-2 (D186-S500)
oWT-RRNA-2 (Q400-S500)
oWT-RRNA-3 (D186-S500)
oWT-RRNA-3 (Q400-S500)
oWT-RRNA-4 (D186-S500)
oWT-RRNA-4 (Q400-S500)
oWT-RRNA-5 (D186-S500)
oWT-RRNA-5 (Q400-S500)
d/Å
t/ns

e)


oWT-1 (d_1)
oWT-1 (d_2)
oWT-2 (d_1)
oWT-2 (d_2)
oWT-RRNA-1 (d_1)
oWT-RRNA-1 (d_2)
oWT-RRNA-2 (d_1)
oWT-RRNA-2 (d_2)
d/Å
t/ns

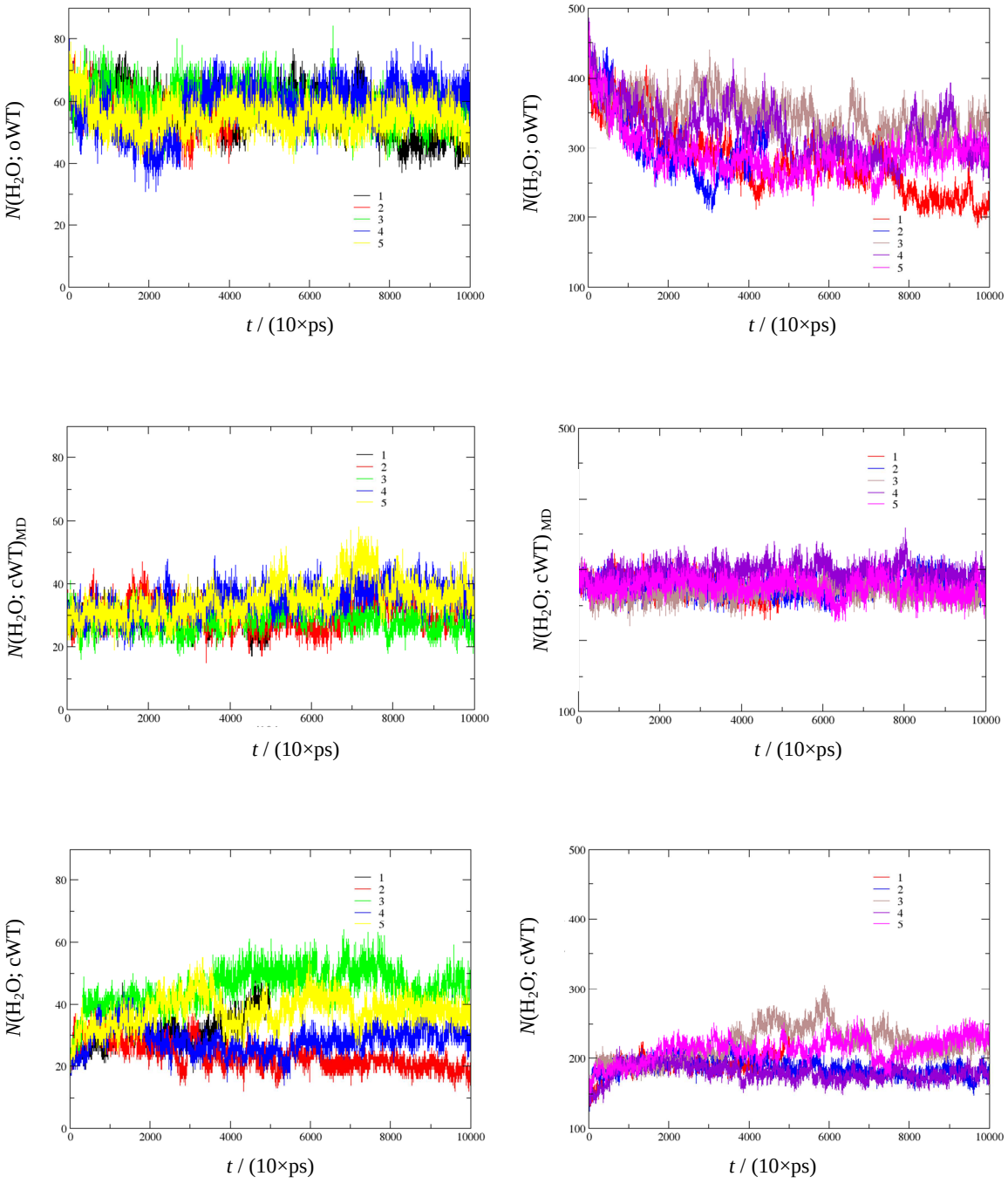
f)


oWT-1
oWT-2
oWT-3
oWT-4
oWT-5
oWT-6
oWT-7
oWT-8
oWT-9
oWT-10
oWT-11
oWT-12
oWT-13
oWT-14
oWT-15
oWT-16
oWT-17
oWT-18
oWT-19
oWT-20
d_1/Å
d_2/Å
broj koraka
broj koraka

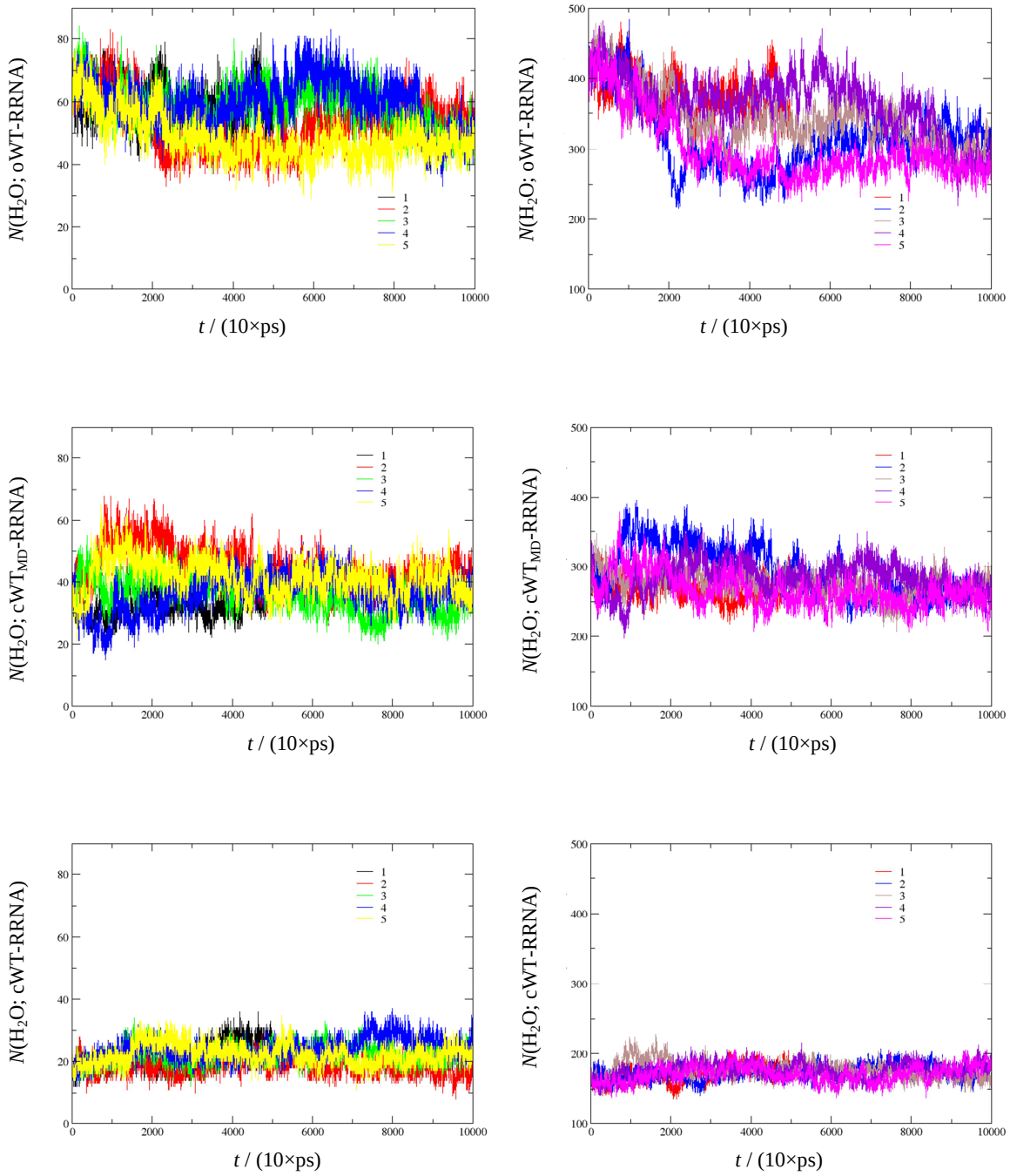


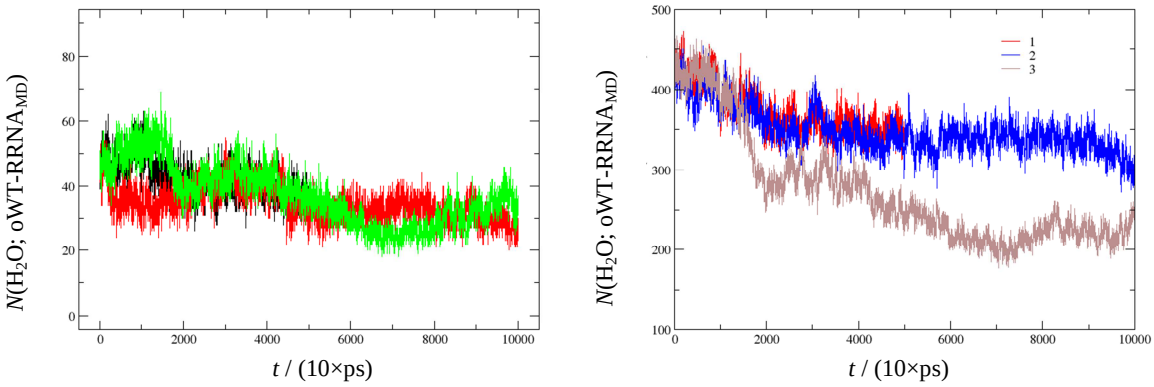
g)

Slika D2. Parametri d_1 (udaljenost između D186 i S500 Cα atoma ili zrna iz okosnice) i d_2 (udaljenost između Q400 i S500 Cα atoma ili zrna iz okosnice) izračunati tijekom: a) 7 MD simulacija, b) i c) 15 AMD_1 simulacija slobodnog enzima, odnosno u kompleksu s RRNA, d) i e) 5 AMD_2 simulacija slobodnog enzima, odnosno u kompleksu s RRNA, f) 2 AMD_3 simulacije slobodnog enzima i u kompleksu s RRNA, i g) 60 CGMD simulacija slobodnog enzima.



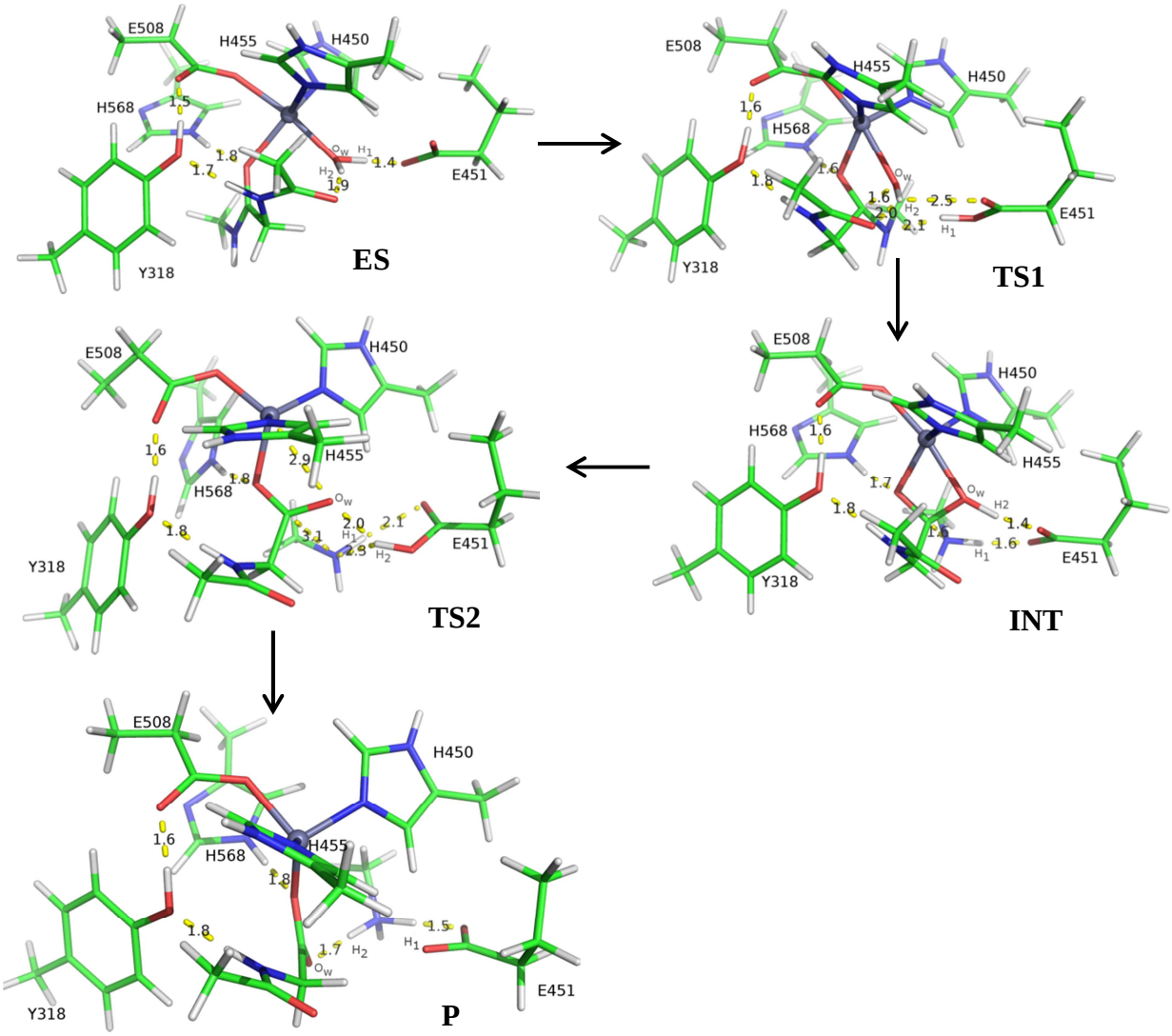
a)


N(H2O; oWT-RRNA)
N(H2O; oWT-RRNA)
N(H2O; cWTMD-RRNA)
N(H2O; cWTMD-RRNA)
N(H2O; cWT-RRNA)
N(H2O; cWT-RRNA)
t / (10×ps)
1
2
3
4
5

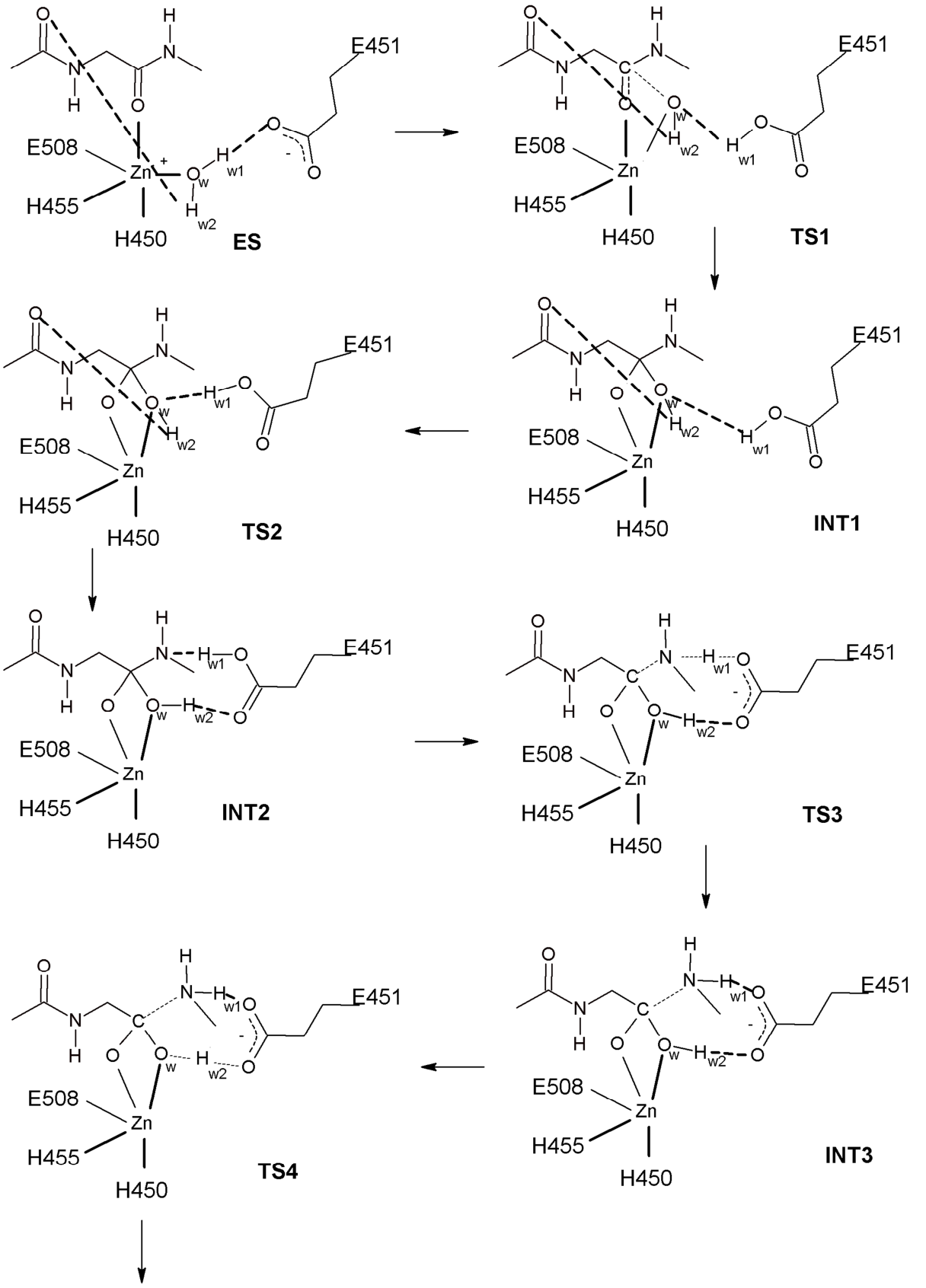


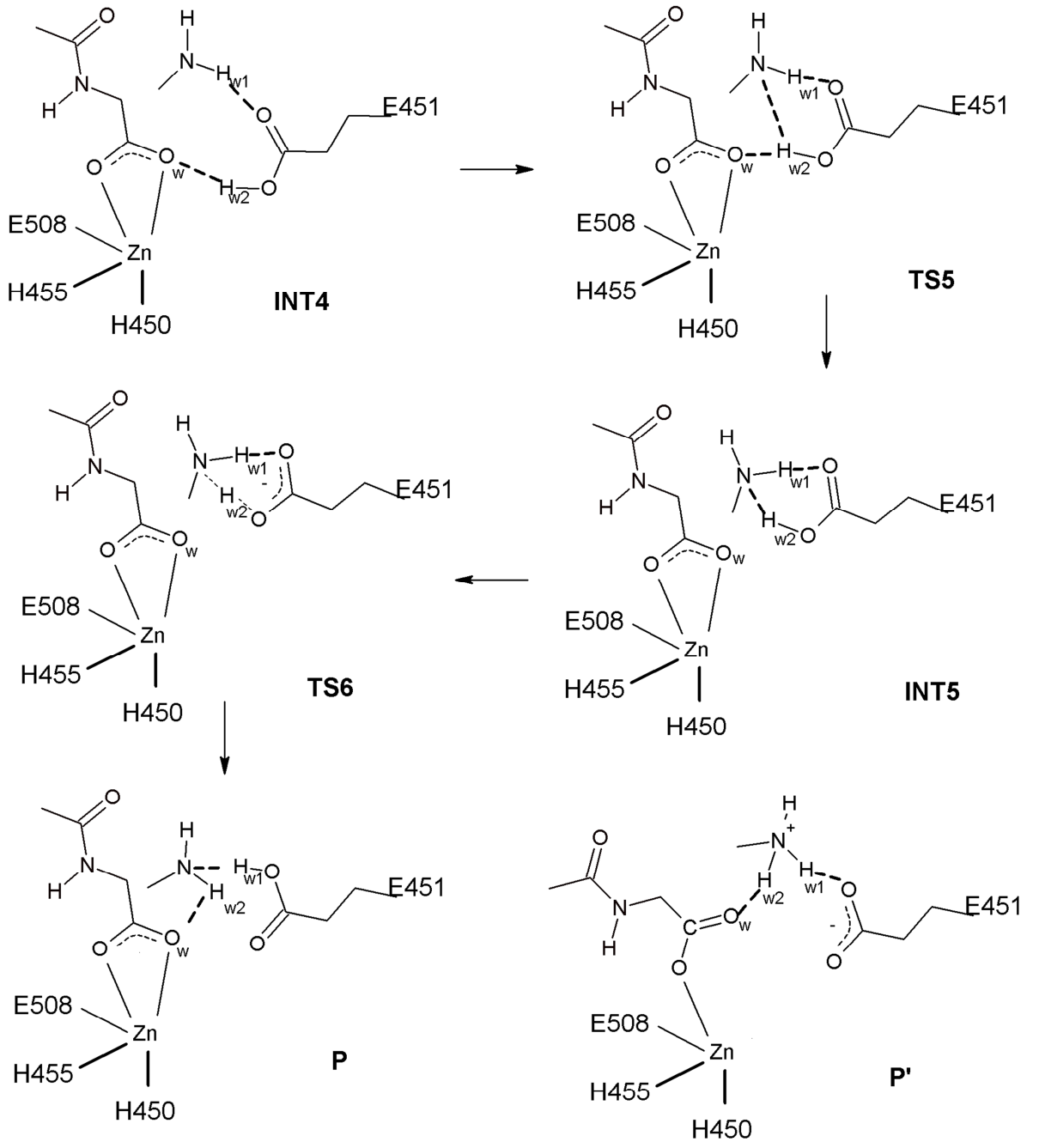
b)

Slika D3. Broj molekula vode u sferi radijusa 10 (lijevo) i 20 (desno) Å od cinka tijekom AMD_1 simualcije DPP III: a) bez vezanog i b) s vezanim ligandom (RRNA). Na slikama su naznačeni simulirani sustavi i redni brojevi simulacije.

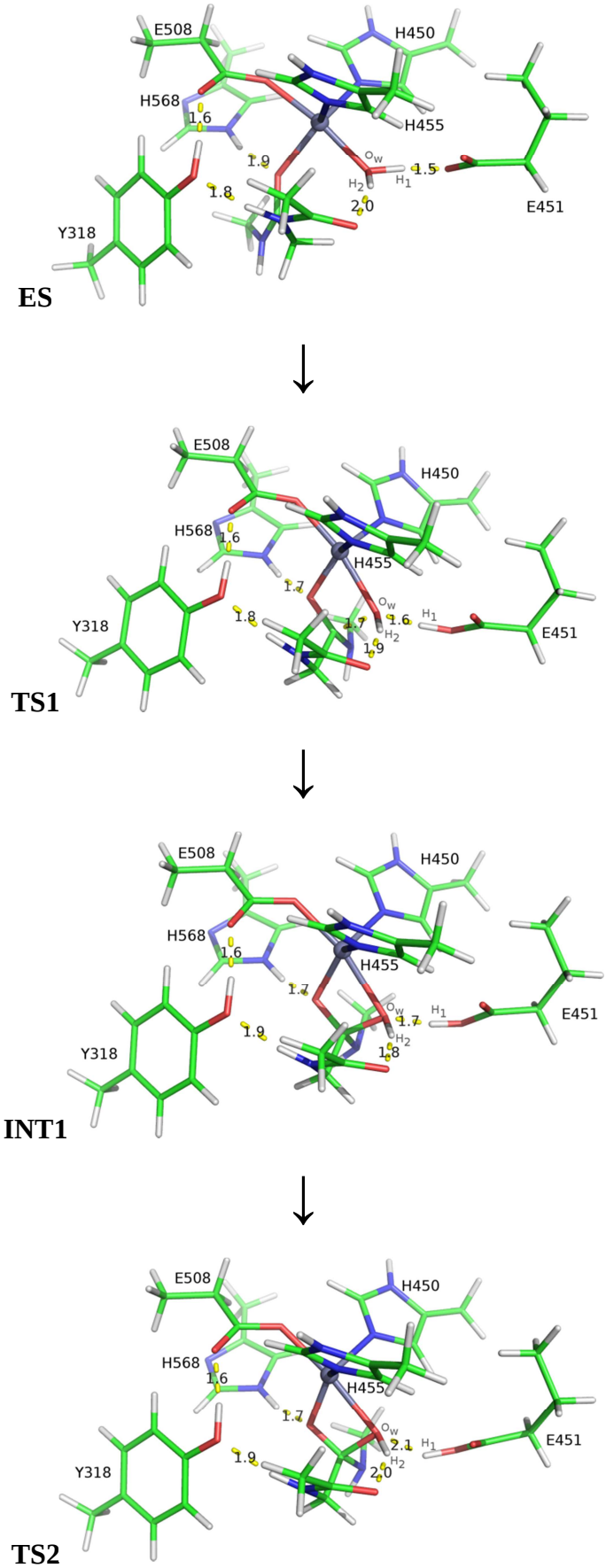


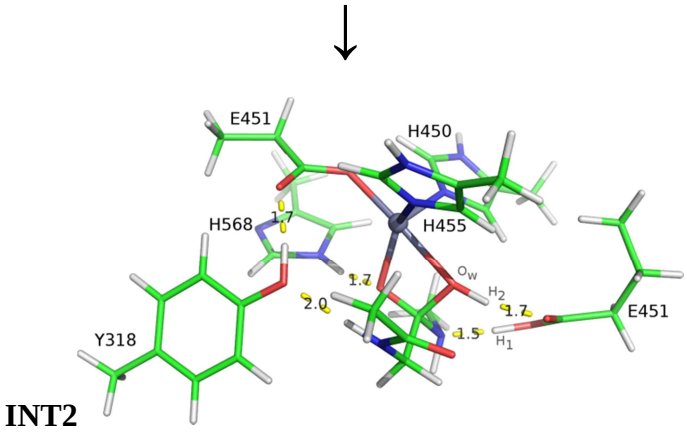
Slika D4. Optimizirane strukture kompleksa enzim-supstrat (ES), prvog (TS1) i drugog (TS2) prijelaznog stanja, međuprodukta (INT) i produkata (P i P') dobivene na B97D/[6-31G+LANL2DZ-ECP] razini teorije. Tijekom optimizacije ES, INT, P i P' struktura položaji ugljikovih atoma metilnih skupina Y318, H450, E451, H455, E508 I H568 bili su zamrznuti. Elektrostatske interakcije prikazane su žutim crtkanim linijama (udaljenosti između atoma prikazane su u jedinici Å), a koordinative veze sivim štapićima.


E451
E508
H455
H450
Zn
ES
TS1
INT1
TS2
INT2
TS3
INT3
TS4

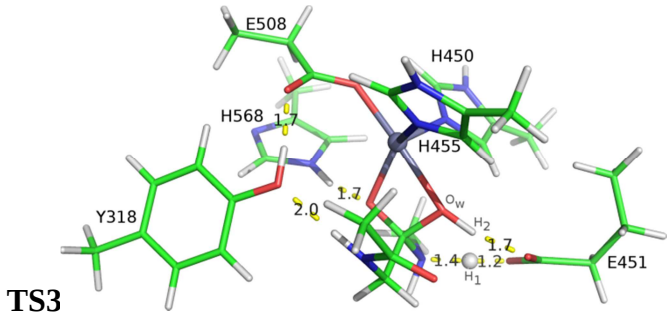


Slika D5. Mehanizam reakcije hidrolize na modelnom sustavu ljudske DPP III određen na B97D/[6-31G(d)+LANL2DZ-ECP] razini teorije uz vibracijsku analizu (zbog jednostavnosti nisu prikazani Y318 i H568). Optimizirane strukture: kompleksa enzim-supstrat (ES), prijelaznih stanja (TS1 - TS6), međuprodukata (INT1 - INT5) i produkata (P i P'). Vodikove veze prikazane su debljim iscrtkanim linijama, veze koje nastaju ili pucaju iscrtkanim linijama, a koordinativne i kovalentne veze debljim, odnosno tanjim punim linijama.

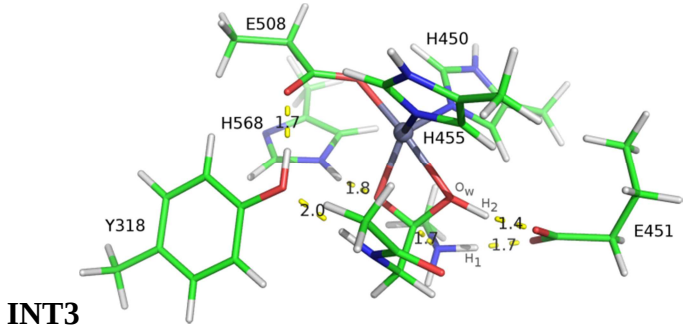

E508
H450
H568
1.6
H455
1.9
1.8
Ow
H2
H1
1.5
2.0
E451
Y318
ES
E508
H450
H568
1.6
H455
1.7
1.8
Ow
1.7
1.6
H1
H2
1.9
E451
Y318
TS1
E508
H450
H568
1.6
H455
1.7
Ow
1.7
H1
E451
1.9
H2
1.8
Y318
INT1
E508
H450
H568
1.6
H455
1.7
Ow
2.1
H1
E451
1.9
H2
2.0
Y318
TS2



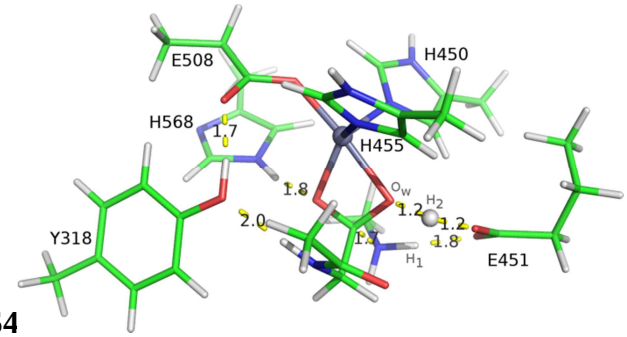
INT2



TS3

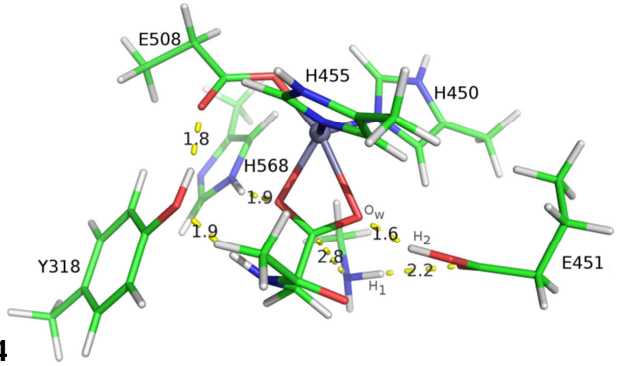


INT3


E508
H450
H568
1.7
H455
1.8
Ow
H2
1.2
1.2
2.0
1.8
Y318
H1
E451

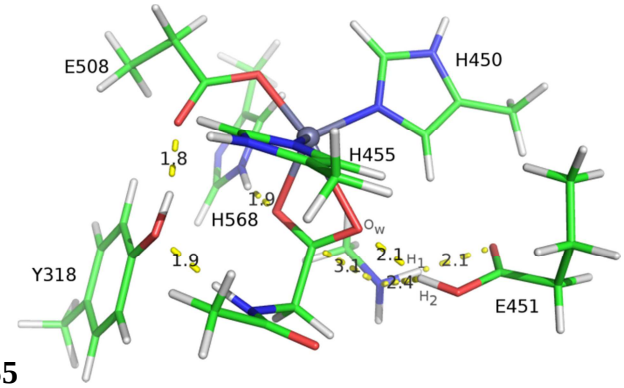
TS4

↓


E508
H455
H450
1.8
H568
1.9
Ow
1.9
1.6
H2
2.8
2.2
Y318
H1
E451

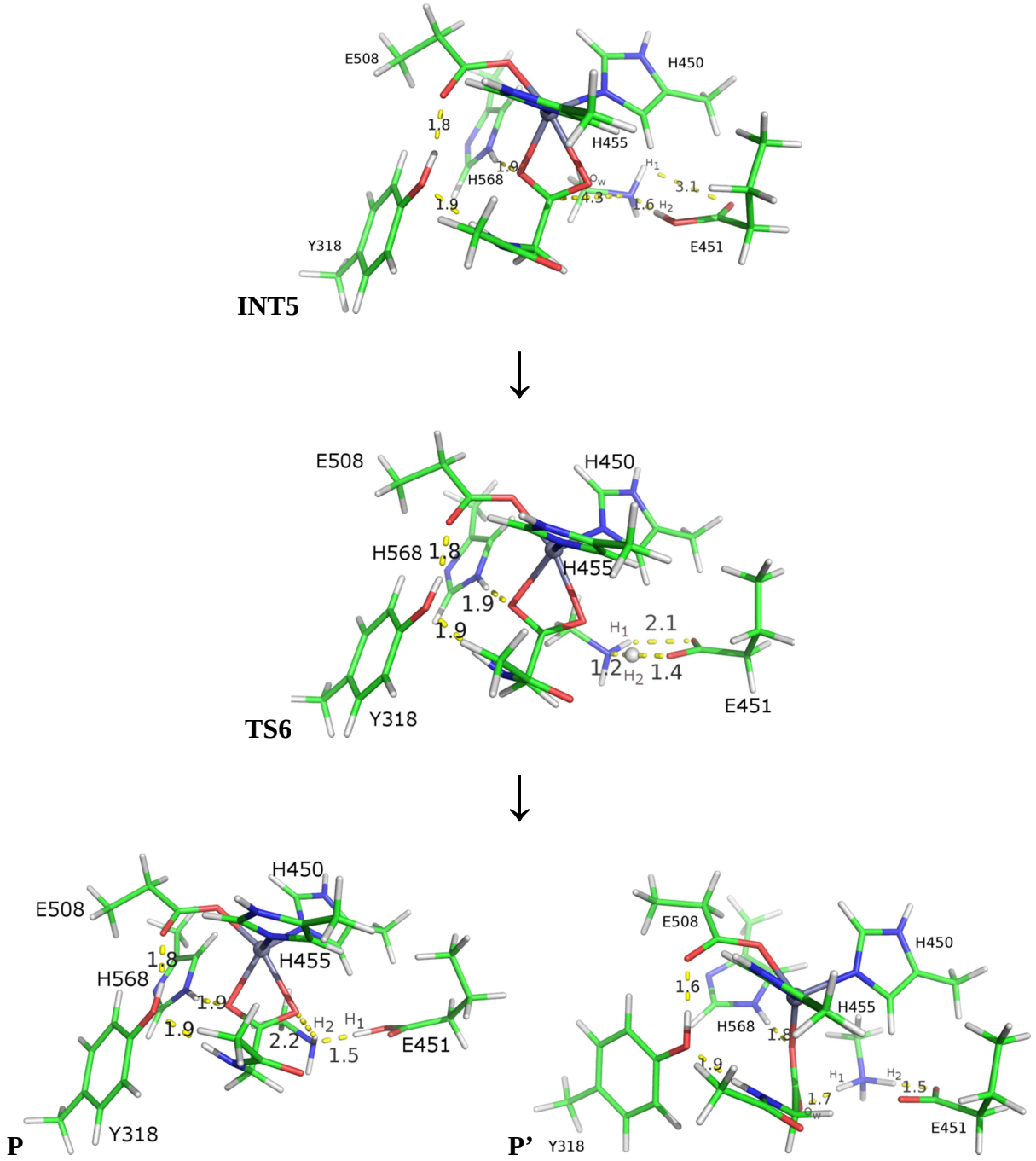
INT4

↓


E508
H450
1.8
H455
1.9
H568
Ow
2.1
H1
2.1
1.9
3.1
2.4
H2
Y318
E451

TS5

↓



Slika D6. Optimizirane strukture kompleksa enzim-supstrat (ES), prijelaznih stanja (TS1 - TS6), međuprodukata (INT1 - INT5) i produkata (P i P') dobivene na B97D/[6-31G(d)+LANL2DZ-ECP] razini teorije. Tijekom optimizacije kompleksa enzim-supstrat, međuprodukata i produkata položaji ugljikovih atoma metilnih skupina Y318, H450, E451, H455, E508 i H568 bili su zamrznuti. Elektrostatske interakcije prikazane su žutim crtkanim linijama (udaljenosti između atoma prikazane su u jedinici Å), a koordinative veze sivim štapićima.

§ 8. LITERATURNI IZVORI

1. A. J. Barrett, N. D. Rawlings i J. F. Woessner (ur.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Vol. 1, Elsevier, Academic Press, London, 2004, str. 809-812.

2. K. Fukasawa, K. M. Fukasawa, H. Iwamoto, J. Hirose, M. Harada, The HELLGH motif of rat liver dipeptidyl peptidase III is involved in zinc coordination and the catalytic activity of the enzyme., *Biochemistry* **38** (1999) 8299–8303.

3. M. Abramić, J. Špoljarić, Š. Šimaga, Prokaryotic homologs help to define consensus sequences in peptidase family M49., *Period. Biol.* **106** (2004) 161–168.

4. P.K. Baral, N. Jajcanin-Jozić, S. Deller, P. Macheroux, M. Abramić, K. Gruber, The first structure of dipeptidyl-peptidase III provides insight into the catalytic mechanism and mode of substrate binding., *J. Biol. Chem.* **283** (2008) 22316–22324.

5. M. Abramić, M. Zubanović, L. Vitale, Dipeptidyl peptidase III from human erythrocytes., *Bio. Chem. Hoppe-Seyler* **369** (1988) 29–38.

6. C. M. Lee, S. H. Snyder, Dipeptidyl-aminopeptidase III of rat brain. Selective affinity for enkephalin and angiotensin., *J. Biol. Chem.* **257** (1982) 12043–12050.

7. M. Smyth, G. O'Cuinn, Dipeptidyl aminopeptidase III of guinea-pig brain: specificity for short oligopeptide sequences., *J. Neurochem.* **63** (1994) 1439–1445.

8. M. Abramić, D. Schleuder, L. Dolovcak, W. Schröder, K. Strupat, D. Sagi, J. Peter-Katalini, L. Vitale, Human and rat dipeptidyl peptidase III: biochemical and mass spectrometric arguments for similarities and differences., *Biol. Chem.* **381** (2000) 1233–1243.

9. I. Ohkubo, Y. H. Li, T. Maeda, Y. Yamamoto, T. Yamane, P. G. Du, K. Nishi, Dipeptidyl peptidase III from rat liver cytosol: purification, molecular cloning and immunohistochemical localization., *Biol. Chem.* **380** (1999) 1421–1430.

10. M. Barsun, N. Jajcanin, B. Vukelić, J. Spoljarić, M. Abramić, Human dipeptidyl peptidase III acts as a post-proline-cleaving enzyme on endomorphins., *Biol. Chem.* **388** (2007) 343–348.

11. T. Chiba, Y.-H. Li, T. Yamane, O. Ogikubo, M. Fukuoka, R. Arai, S. Takahashi, T. Ohtsuka, I. Ohkubo, N. Matsui, Inhibition of recombinant dipeptidyl peptidase III by synthetic hemorphin-like peptides., *Peptides* **24** (2003) 773–778.

12. B. Salopek-Sondi, B. Vukelić, J. Spoljarić, S. Simaga, D. Vujaklija, J. Makarević, N. Jajcanin, M. Abramić, Functional tyrosine residue in the active center of human dipeptidyl peptidase III., *Biol. Chem.* **389** (2008) 163–167.

13. J. Špoljarić, B. Salopek-Sondi, J. Makarević, B. Vukelić, D. Agić, S. Simaga, N. Jajcanin-Jozić, M. Abramić, Absolutely conserved tryptophan in M49 family of peptidases contributes to catalysis and binding of competitive inhibitors., *Bioorg. Chem.* **37** (2009) 70–76.

14. A. Tomić, M. Abramić, J. Spoljarić, D. Agić, D. M. Smith, S. Tomić, Human dipeptidyl peptidase III: insights into ligand binding from a combined experimental and computational approach., *J. Mol. Recognit.* **24** (2011) 804–814.

15. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Enzyme Nomenclature. Recommendation of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes*, (Academic Press, Inc.: San Diego, California, USA, 1992).

16. A. J. Barrett, N. D. Rawlings i J. F. Woessner (ur.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Vol. 1, Academic Press, London, 2004, str. 33-35.

17. A. J. Barrett, N. D. Rowlings, Evolutionary families of peptidases., *Biochem. J.* **290** (1993) 205–218.

18. I. Schechter, A. Berger, On the size of the active site in proteases. I. Papain., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27** (1967) 157–62.

19. D. Voet i J. G. Voet, *Biochemistry*, John Wiley & Sons, Inc. New York, 1995, str. 336-337.

20. A. J. Barrett, N. D. Rawlings i J. F. Woessner (ur.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Vol. 1, Elsevier, Academic Press, London, 2004, str. 231-268.

21. N. D. Rawlings, A. J. Barrett, Evolutionary families of metallopeptidases., *Methods Enzymol.* **248** (1995) 183–228.

22. W. N. Lipscomb, N. Sträter, Recent Advances in Zinc Enzymology., *Chem. Rev.* **96** (1996) 2375–2434.

23. B. W. Matthews, J. N. Jansonius, P. M. Colman, B. P. Schoenborn, D. Dupourque, Three-dimensional Structure of Thermolysin., *Nat. New Biol.* **238** (1972) 37–41.

24. P. M. Colman, J. N. Jansonius, B. W. Matthews, The structure of thermolysin: an electron density map at 2-3 A resolution., *J. Mol. Biol.* **70** (1972) 701–724.

25. D. R. Holland, A. C. Hausrath, D. Juers, B. W. Matthews, Structural analysis of zinc substitutions in the active site of thermolysin., *Protein Sci.* **4** (1995) 1955–1965.

26. H. M. Holden, D. E. Tronrud, A. F. Monzingo, L. H. Weaver, B. W. Matthews, Slow- and fast-binding inhibitors of thermolysin display different modes of binding: crystallographic analysis of extended phosphonamidate transition-state analogues., *Biochemistry* **26** (1987) 8542–8553.

27. P. A. Bartlett, C. K. Marlowe, Possible role for water dissociation in the slow binding of phosphorus-containing transition-state-analog inhibitors of thermolysin., *Biochemistry* **26** (1987) 8553–8561.

28. B. W. Matthews, Structural basis of the action of thermolysis and related enzyme peptidase., *Acc. Chem. Res.* **21** (1988) 333–340.

29. J. Blumberger, G. Lamoureux, M. L. Klein, Peptide Hydrolysis in Thermolysin: Ab Initio QM/MM Investigation of the Glu143-Assisted Water Addition Mechanism., *J. Chem. Theory Comput.* **3** (2007) 1837–1850.

30. R. Wu, P. Hu, S. Wang, Z. Cao, Y. Zhang, Flexibility of Catalytic Zinc Coordination in Thermolysin and HDAC8: A Born-Oppenheimer ab initio QM/MM Molecular Dynamics Study., *J. Chem. Theory Comput.* **6** (2009) 337–343.

31. W. L. DeLano, The PyMOL Molecular Graphics System, (2010)

32. B. W. Matthews, Structural basis of the action of thermolysin and related zinc peptidases., *Acc. Chem. Res.* **21** (1988) 333–340.

33. A. Devault, C. Nault, M. Zollinger, M. C. Fournie-Zaluski, B. P. Roques, P. Crine, G. Boileau, Expression of neutral endopeptidase (enkephalinase) in heterologous COS-1 cells. Characterization of the recombinant enzyme and evidence for a glutamic acid residue at the active site., *J. Biol. Chem.* **263** (1988) 4033–4040.

34. D. Corbeil, P. E. Milhiet, V. Simon, J. Ingram, A. J. Kenny, G. Boileau, P. Crine, Rat endopeptidase-24.18 alpha subunit is secreted into the culture medium as a zymogen when expressed by COS-1 cells., *FEBS Lett.* **335** (1993) 361–366.

35. W. L. Mock, D. J. Stanford, Arazoformyl dipeptide substrates for thermolysin. Confirmation of a reverse protonation catalytic mechanism., *Biochemistry* **35** (1996) 7369–7377.

36. W. N. Lipscomb, N. Sträter, Recent Advances in Zinc Enzymology., *Chem. Rev.* **96** (1996) 2375–2434.

37. J. K. McDonald i A. J. Barrett, *Mammalian Proteases: A Glossary and Bibliography*, Vol. 2 Exopeptidases. Academic Press London, 1986, str. 1-6, 127-131.

38. S. Ellis, J. M. Nuenke, Dipeptidyl arylamidase III of the pituitary. Purification and characterization., *J. Biol. Chem.* **242** (1967) 4623–4629.

39. K. Fukasawa, K. M. Fukasawa, M. Kanai, S. Fujii, J. Hirose, M. Harada, Dipeptidyl peptidase III is a zinc metallo-exopeptidase. Molecular cloning and expression., *Biochem. J.* **329** (1998) 275–282.

40. Y. Shimamori, Y. Watanabe, Y. Fujimoto, Purification and characterization of dipeptidyl aminopeptidase III from human placenta., *Chem. Pharm. Bull.* **34** (1986) 3333–3340.

41. A. A. Swanson, B. Albers-Jackson, J. K. McDonald, Mammalian lens dipeptidyl aminopeptidase III., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **84** (1978) 1151–1159.

42. Y. Inaoka, H. Tamaoki, Purification and characterization of enkephalinase B from rat brain membrane., *Biochim. Biophys. Acta* **925** (1987) 27–35.

43. M. A. Sentandreu, F. Toldrá, Biochemical Properties of Dipeptidyl Peptidase III Purified from Porcine Skeletal Muscle., *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 3977–3984.

44. Y. Watanabe, Y. Kumagai, Y. Fujimoto, Presence of a dipeptidyl aminopeptidase III in Saccharomyces cerevisiae., *Chem. Pharm. Bull.* **38** (1990) 246–248.

45. J. Huang, J. Kim, P. Ramamurthy, T. H. D. Jones, The purification, specificity, and role of dipeptidyl peptidase III inDictyostelium discoideum., *Exp. Mycol.* **16** (1992) 102–109.

46. H. Zhan, Y. Yamamoto, S. Shumiya, M. Kunimatsu, K. Nishi, I. Ohkubo, K. Kani, Peptidases play an important role in cataractogenesis: an immunohistochemical study on lenses derived from Shumiya cataract rats., *Histochem. J.* **33** 511–521.

47. S. Simaga, D. Babić, M. Osmak, J. Ilić-Forko, L. Vitale, D. Milicić, M. Abramić, Dipeptidyl peptidase III in malignant and non-malignant gynaecological tissue., *Eur. J. cancer* **34** (1998) 399–405.

48. S. Simaga, D. Babić, M. Osmak, M. Sprem, M. Abramić, Tumor cytosol dipeptidyl peptidase III activity is increased with histological aggressiveness of ovarian primary carcinomas., *Gynecol. Oncol.* **91** (2003) 194–200.

49. Y. Liu, J. T. Kern, J. R. Walker, J. A. Johnson, P. G. Schultz, H. Luesch, A genomic screen for activators of the antioxidant response element., *PNAS* **104** (2007) 5205–5210.

50. B. E. Hast, D. Goldfarb, K. M. Mulvaney, M. A. Hast, P. F. Siesser, F. Yan, D.N. Hayes, M. B. Major, Proteomic analysis of ubiquitin ligase KEAP1 reveals associated proteins that inhibit NRF2 ubiquitination., *Cancer Res.* **73** (2013) 2199–2210.

51. G. A. Bezerra, E. Dobrovetsky, R. Viertlmayr, A. Dong, A. Binter, M. Abramic, P. Macheroux, S. Dhe-Paganon, K. Gruber, Entropy-driven binding of opioid peptides induces a large domain motion in human dipeptidyl peptidase III., *PNAS* **109** (2012) 6525–6530.

52. Z. S. Derewenda, P. G. Vekilov, Entropy and surface engineering in protein crystallization., *Acta Crystallogr. Sect. D, Biol. Crystallogr.* **62** (2006) 116–124.

53. C. J. Cramer, *Essentials of Computational Chemistry, Theories and Models*, John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, West Sussex, England, 2004, str. 1–618.

54. P. Hohenberg, W. Kohn, Inhomogeneous Electron Gas., *Phys. Rev.* **136** (1964) B864–B871.

55. W. Kohn, L. J. Sham, Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects., *Phys. Rev.* **140** (1965) A1133–A1138.

56. A. D. Becke, Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior., *Phys. Rev. A* **38** (1988) 3098–3100.

57. C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density., *Phys. Rev. B* **37** (1988) 785–789.

58. B. Miehlich, A. Savin, H. Stoll, H. Preuss, Results obtained with the correlation energy density functionals of becke and Lee, Yang and Parr., *Chem. Phys. Lett.* **157** (1989) 200–206.

59. S. Grimme, Semiempirical GGA-type density functional constructed with a long-range dispersion correction., *J. Comput. Chem.* **27** (2006) 1787–1799.

60. Y. Zhao, D. G. Truhlar, The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other function., *Theor. Chem. Acc.* **120** (2007) 215–241.

61. W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water., *J. Chem. Phys.* **79** (1983) 926–935.

62. M. W. Mahoney, W. L. Jorgensen, A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, nonpolarizable potential functions., *J. Chem. Phys.* **112** (2000) 8910–8922.

63. H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, J. R. Haak, Molecular dynamics with coupling to an external bath., *J. Chem. Phys.* **81** (1984) 3684–3690.

64. G. Grest, K. Kremer, Molecular dynamics simulation for polymers in the presence of a heat bath., *Phys. Rev. A* **33** (1986) 3628–3631.

65. http://www.pages.drexel.edu/~cfa22/msim/node34.html (preuzeto 13. rujan 2014. god.)

66. S. Nose, A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble., *Mol. Phys.* **52** (1984) 255–268.

67. W. Hoover, Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions., *Phys. Rev. A* **31** (1985) 1695–1697.

68. G. J. Martyna, D. J. Tobias, M. L. Klein, Constant pressure molecular dynamics algorithms., *J. Chem. Phys.* **101** (1994) 4177–4189.

69. G. J. Martyna, M. E. Tuckerman, D. J. Tobias, M. L. Klein, Explicit reversible integrators for extended systems dynamics., *Mol. Phys.* **87** (1996) 1117–1157.

70. J.-P. Ryckaert, G. Ciccotti, H. J. Berendsen, Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes., *J. Comput. Phys.* **23** (1977) 327–341.

71. B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen, J. G. E. M. Fraaije, LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations., *J. Comput. Chem.* **18** (1997) 1463–1472.

72. T. Darden, D. York, L. Pedersen, Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems., *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 10089–10092.

73. U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L. G. Pedersen, A smooth particle mesh Ewald method., *J. Chem. Phys.* **103** (1995) 8577–8593.

74. S. K. Lüdemann, V. Lounnas, R. C. Wade, How do substrates enter and products exit the buried active site of cytochrome P450cam? 1. Random expulsion molecular dynamics investigation of ligand access channels and mechanisms., *J. Mol. Biol.* **303** (2000) 797–811.

75. D. Bucher, B. J. Grant, J. A. McCammon, Induced fit or conformational selection? The role of the semi-closed state in the maltose binding protein., *Biochemistry* **50** (2011) 10530–10529.

76. D. Hamelberg, C. A. F. de Oliveira, J. A. McCammon, Sampling of slow diffusive conformational transitions with accelerated molecular dynamics., *J. Chem. Phys.* **127** (2007) 155102–155109.

77. L. C. T. Pierce, R. Salomon-Ferrer, C. Augusto F de Oliveira, J. A. McCammon, R. C. Walker, Routine Access to Millisecond Time Scale Events with Accelerated Molecular Dynamics., *J. Chem. Theory Comput.* **8** (2012) 2997–3002.

78. D. Hamelberg, J. Mongan, J. A. McCammon, Accelerated molecular dynamics: a promising and efficient simulation method for biomolecules., *J. Chem. Phys.* **120** (2004) 11919–29.

79. S. J. Marrink, H. J. Risselada, S. Yefimov, D. P. Tieleman, A. H. de Vries, The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations., *J. Phys. Chem. B* **111** (2007) 7812–7824.

80. L. Monticelli, S. K. Kandasamy, X. Periole, R. G. Larson, D. P. Tieleman, S.-J. Marrink, The MARTINI Coarse-Grained Force Field: Extension to Proteins., *J. Chem. Theory Comput.* **4** (2008) 819–834.

81. X. Periole, M. Cavalli, S.-J. Marrink, M. A. Ceruso, Combining an Elastic Network With a Coarse-Grained Molecular Force Field: Structure, Dynamics, and Intermolecular Recognition., *J. Chem. Theory Comput.* **5** (2009) 2531–2543.

82. http://md.chem.rug.nl/cgmartini/index.php/proteins (preuzeto 10. listopada 2014. god.)

83. S. O. Yesylevskyy, L. V Schäfer, D. Sengupta, S. J. Marrink, Polarizable water model for the coarse-grained MARTINI force field., *PLoS Comput. Biol.* **6** (2010) e1000810.

84. T. Vreven, M. J. Frisch, K. N. Kudin, H. B. Schlegel, K. Morokuma, Geometry optimization with QM/MM methods II: Explicit quadratic coupling., *Mol. Phys.* **104** (2006) 701–714.

85. T. Vreven, K. Morokuma, O. Farkas, H. B. Schlegel, M. J. Frisch, Geometry optimization with QM/MM, ONIOM, and other combined methods. I. Microiterations and constraints., *J. Comput. Chem.* **24** (2003) 760–769.

86. T. Vreven, K. S. Byun, I. Komáromi, S. Dapprich, J. A. Montgomery,, K. Morokuma, M. J. Frisch, Combining Quantum Mechanics Methods with Molecular Mechanics Methods in ONIOM., *J. Chem. Theory Comput.* **2** (2006) 815–826.

87. J. M. J. Swanson, R. H. Henchman, J. A. McCammon, Revisiting free energy calculations: a theoretical connection to MM/PBSA and direct calculation of the association free energy., *Biophys. J.* **86** (2004) 67–74.

88. M. L. Connolly, Analytical molecular surface calculation., *J. Appl. Crystallogr.* **16** (1983) 548–558.

89. A. Sali, T. L. Blundell, Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints., *J. Mol. Biol.* **234** (1993) 779–815.

90. Y. Duan, C. Wu, S. Chowdhury, M. C. Lee, G. Xiong, W. Zhang, R. Yang, P. Cieplak, R. Luo, T. Lee, J. Caldwell, J. Wang, P. Kollman, A point-charge force field for molecular mechanics

simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations., *J. Comput. Chem.* **24** (2003) 1999–2012.

91. B. Bertosa, B. Kojić-Prodić, R. C. Wade, S. Tomić, Mechanism of auxin interaction with Auxin Binding Protein (ABP1): a molecular dynamics simulation study., *Biophys. J.* **94** (2008) 27–37.

92. I. Dokmanić, M. Sikić, S. Tomić, Metals in proteins: correlation between the metal-ion type, coordination number and the amino-acid residues involved in the coordination., *Acta Crystallogr. Sect. D, Biol. Crystallogr.* **64** (2008) 257–263.

93. M. Petrek, M. Otyepka, P. Banás, P. Kosinová, J. Koca, J. Damborský, CAVER: a new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities., *BMC Bioinforma.* **7** (2006) 316–324.

94. B. Kozlikova, E. Sebestova, V. Sustr, J. Brezovsky, O. Strnad, L. Daniel, D. Bednar, A. Pavelka, M. Manak, M. Bezdeka, P. Benes, M. Kotry, A. Gora, J. Damborsky, J. Sochor, CAVER Analyst 1.0: Graphic tool for interactive visualization and analysis of tunnels and channels in protein structures., *Bioinformatics* (2014)

95. E. Chovancova, A. Pavelka, P. Benes, O. Strnad, J. Brezovsky, B. Kozlikova, A. Gora, V. Sustr, M. Klvana, P. Medek, L. Biedermannova, J. Sochor, J. Damborsky, CAVER 3.0: a tool for the analysis of transport pathways in dynamic protein structures., *PLoS Comput. Biol.* **8** (2012) e1002708.

96. R. Salomon-Ferrer, A. W. Götz, D. Poole, S. Le Grand, R. C. Walker, Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit Solvent Particle Mesh Ewald., *J. Chem. Theory Comput.* **9** (2013) 3878–3888.

97. G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew, A. J. Olson, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function., *J. Comput. Chem.* **19** (1998) 1639–1662.

98. W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: visual molecular dynamics., *J. Mol. Graph.* **14** (1996) 33–8, 27–28.

99. C. Peng, H. Bernhard Schlegel, Combining Synchronous Transit and Quasi-Newton Methods to Find Transition States., *Isr. J. Chem.* **33** (1993) 449–454.

100. D. J. F. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Had, Gaussian 09, Revision D.01, (2009)

101. P. J. Hay, W. R. Wadt, Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals., *J. Chem. Phys.* **82** (1985) 299–310.

102. W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules., *J. Am. Chem. Soc.* **117** (1995) 5179–5197.

103. S. Hayward, B. L. de Groot, Normal modes and essential dynamics., *Methods Mol. Biol.* **443** (2008) 89–106.

104. N. Jajčanin-Jozić, M. Abramić, Hydrolysis of dipeptide derivatives reveals the diversity in the M49 family., *Biol. Chem.* **394** (2013) 767–771.

105. O. Keskin, Binding induced conformational changes of proteins correlate with their intrinsic fluctuations: a case study of antibodies., *BMC Struct. Biol.* **7** (2007) 31–42.

106. G. G. Hammes, Multiple Conformational Changes in Enzyme Catalysis., *Biochemistry* **41** (2002) 8221–8228.

107. E. Z. Eisenmesser, D. a Bosco, M. Akke, D. Kern, Enzyme dynamics during catalysis., *Science* **295** (2002) 1520–1523.

108. D. P. Klose, B. A. Wallace, R. W. Janes, 2Struc: the secondary structure server., *Bioinformatics* **26** (2010) 2624–2625.

109. S.-Y. Sheu, D.-Y. Yang, Determination of protein surface hydration shell free energy of water motion: theoretical study and molecular dynamics simulation., *J. Phys. Chem. B* **114** (2010) 16558–16566.

110. S. K. Pal, J. Peon, B. Bagchi, A. H. Zewail, Biological Water: Femtosecond Dynamics of Macromolecular Hydration., *J. Phys. Chem. B* **106** (2002) 12376–12395.

111. J. Špoljarić, A. Tomić, B. Vukelić, B. Salopek-Sondi, D. Agić, S. Tomić, M. Abramić, Human Dipeptidyl Peptidase III: the Role of Asn406 in Ligand Binding and Hydrolysis., *Croat. Chem. Acta* **84** (2011) 259–268.

112. A. Tomić, M. González, S. Tomić, The large scale conformational change of the human DPP III-substrate prefers the “closed” form., *J. Chem. Inf. Model.* **52** (2012) 1583–1594.

113. K. Fujiwara, H. Toda, M. Ikeguchi, Dependence of α-helical and β-sheet amino acid propensities on the overall protein fold type., *BMC Struct. Biol.* **12** (2012) 18–33.

114. K.-I. Okazaki, S. Takada, Dynamic energy landscape view of coupled binding and protein conformational change: induced-fit versus population-shift mechanisms., *PNAS* **105** (2008) 11182–11187.

115. A. Tomić, S. Tomić, Hunting the human DPP III active conformation: combined thermodynamic and QM/MM calculations., *Dalton Trans.* **43** (2014) 15503–15514.

116. V. Pelmenschikov, M. R. A. Blomberg, P. E. M. Siegbahn, A theoretical study of the mechanism for peptide hydrolysis by thermolysin., *J. Biol. Inorg. Chem.* **7** (2002) 284–298.

§ 9. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

Životopis

Rođena sam 17. rujna 1984. godine u Splitu. Opću gimnaziju „Vladimir Nazor“ upisala sam 1999. godine u Splitu, te maturirala 2003. godine. Iste godine upisala sam Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, smjer dipl. ing. kemije. Diplomirala sam 2008. godine u Fizičko-kemijskom zavodu Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu s diplomskim radom: „Pravilo ispreplitanja vibracijskih nivoa kod tiofena i furana“ pod mentorstvom dr. sc. Tomislava Živkovića. Od 2009. god. zaposlena sam na Institutu Ruđer Bošković, prvo kao suradnik i asistent na projektu „ReCompSoLS“, a potom od 2010. pa sve do danas kao znanstveni novak u suradničkom zvanju i na suradničkom radnom mjestu asistenta na znanstvenom projektu „Proučavanje biomakromolekula računalnim metodama i razvoj novih algoritama“ u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju na Zavodu za fizičku kemiju. 2010. godine upisala sam doktorski studij. Od zaposlenja do danas tri puta sam boravila u inozemstvu, jednom kod prof. dr. sc. Miguela Gonzaleza na Sveučilištu u Barceloni, Španjolska, u sklopu “ HPC-Europe2” stipendije (u dužini od mjesec i pol dana), te dva puta kod prof. dr. sc. Rebecce Wade na "Institute for Theoretical Studies" u Heidelbergu, Njemačka, u sklopu Alexander von Humboldt projekta: “Study of plant enzymes from metallopeptidase families M20 and M49” (u ukupnoj dužini od mjesec i pol dana). Također tijekom doktorskog studija sudjelovala sam i u izvođenju nastave iz kolegija Osnove fizikalne kemije (smjer: preddiplomski studij molekularne biologije i preddiplomski studij znanosti o okolišu), Osnovni praktikum fizikalne kemije (smjer: cjeloviti studij kemije i fizike), Praktikum iz fizikalne kemije 1, te Višeg praktikuma iz fizikalne kemije.

Koautorica sam pet znanstvenih radova koje citira baza *Current Contents* (popis je priložen u Životopisu) i dvanaest priopćenja na međunarodnim znanstvenim skupovima. Članica sam Hrvatskoga kemijskog društva i Hrvatskog biofizikalnog društva.

Popis objavljenih radova

1. A. Tomić, S. Tomić, Hunting the human DPP III active conformation: combined thermodynamic and QM/MM calculations, *Dalton Trans.* **43** (2014) 15503-15514.

2. A. Tomić, M. Gonzalez, S. Tomić, The large scale conformational change of the human DPP III – substrate preferes the "closed" form, *J. Chem. Inf. Model.* **52** (2012) 1583-1594.

3. A. Tomić, M. Abramić, J. Špoljarić, D. Agić, D. M. Smith, S. Tomić, Human Dipeptidyl Peptidase III: Insights into Ligand Binding from a Combined Experimental and Computational Approach, *J. Mol. Recognit.* **24** (2011) 804-814.

4. J. Špoljarić, A. Tomić, B. Vukelić, B. Salopek-Sondi, D. Agić, S. Tomić, M. Abramić, Human dipeptidyl peptidase III: site-directed mutagenesis proves the importance of Asn406 for ligand binding and hydrolysis, *Croat. Chem. Acta* **84** (2011) 259-268.

5. A. Tomić, T. P. Živković, On the Vibrational Interlacing Rule in Deuterated Thiophene: I. Out-of-plane Vibrations, *Croat. Chem. Acta* **82** (2009) 561-566.

Sažeci u zbornicima skupova

1. A. Tomić,S. Tomić, Molecular Mechanics - Poisson Boltzmann Surface Area calculations using AMBER program package - application to the human dipeptidyl petidase III, *Computational Electrostatics for Biological Applications*, Genova, Italija, 01-03.07.2013.

2. A. Tomić, S. Tomić, Najnovija saznanja o koordinaciji cinka i o vezanju liganda u aktivno mjesto humane DPP III – implikacije na mehanizam kemijske reakcije, *XXIII. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera*, Osijek, Hrvatska, 21-24. 04. 2013.

3. S. Tomić, A. Tomić, M. Gonzalez, Molecular dynamics based studies on human DPP III revealed determinants for its broad substrate selectivity, *In Silico Enzyme Sesign and Screening*, Trst, Italija, 07-09.05.2012.

4. A. Tomić, S. Tomić, QM/MM study of the zinc coordination in the active site of the human DPP III, *IX. Susret mladih kemijskih inženjera*, Zagreb, Hrvatska, 16-17.02.2012.

5. A. Tomić, S. Tomić, Further study of the zinc coordination in the active site of the human DPP III - ONIOM calculations, *11th Greta Pifat-Mrzljak International School of Biophysics*, Biomolecular complexes and assemblies, Primošten, Hrvatska, 30.09.-09.10.2012.

6. A. Tomić, S. Tomić, MD simulations showed large conformational changes of the human free DPP III, *The Conference on Molecular Simulations in Biosystems and Material Science*, Konstanz, Njemačka, 28.09-01.10.2011.

7. A. Tomić, J. Špoljarić, M. Abramić, S.Tomić, Ligand binding to human DPP III and its mutant H568N - computational analyses, *6th International Workshop on New Approaches in Drug Design & Discovery*, Marburg, Njemačka, 22.-25.04.2010.

8. A. Tomić, S. Tomić, Natural vs. synthetic peptides binding to human dipeptidyl-peptidases (DPP III), computational insight, *Australia-Croatia Workshop on Antimicrobial Peptides and Summer School in Biophysics PhD Programme: AMP 2010*, Split, Hrvatska, 09.-13.08.2010.

9. A. Tomić, S. Tomić, Human dipeptidyl-peptidases (h.DPP III), sampling the substrate binding site - computational analysis, Fourth Humboldt Conference on Computational Chemistry, Varna, Bugarska, 12-15.07.2010.

10. A. Tomić, M. Abramić, D. Smith, S. Tomić, Molecular dynamics simulations of ligands binding into the active site of human dipeptidyl-peptidases (DPPIII), *EMBO Young Scientists Forum*, Zagreb, Hrvatska, 15.-17.06.2009.

11. A. Tomić, M. Abramić, D. Smith, S. Tomić, Computational and experimental approach to the study of ligands binding into the active site of the human dipeptidyl-peptidases (DPPIII), *The 3rd Adriatic Meeting On Computational Solutions in the Life Sciences*, Primošten, Hrvatska, 01.-05.09.2009.

12. G. Horvat, K. Magdić, A. Tomić, L. Pitarević Svedružić, S. Rončević, Analiza sedimenta i vode Moslavačkog područja, *Voda i mi. II.*, Zagreb - Lonjsko polje, Hrvatska, 14.-20.05.2007.