

Računalne simulacije kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III s angiotenzinom-(1-7) i njegovim stabilnim analogom

Čavka, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:300560>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-17**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ivana Čavka

**Računalne simulacije kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III
s angiotenzinom-(1-7) i njegovim stabilnim analogom**

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biokemiju proteina i molekularno modeliranje Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom prof. dr. sc. Sanje Tomić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Računalne simulacije kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III s angiotenzinom-(1-7) i njegovim stabilnim analogom

Ivana Čavka

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Dipeptidil-peptidaza III (DPP III) je metalopeptidaza ovisna o cinku, koja ima široku supstratnu specifičnost. Uključena je u procese razgradnje kratkih peptida sastavljenih od tri do deset aminokiselina. Poznato je kako ljudska DPP III (hDPP III) posjeduje visok afinitet prema opioidnim peptidima i peptidima iz sustava renin-angiotenzin-aldosteron, pa se sukladno tome povezuje s različitim fiziološkim procesima kao što su regulacija krvnog tlaka, mehanizam modulacije boli i obrana od oksidacijskog stresa. Osim toga, aktivnost enzima DPP III se povezuje i s nekim patološkim stanjima kao što su pojava mreine i rast tumora. Ova otkrića razlog su tome što se DPP III razmatra kao potencijalna meta lijekova. Rad donosi rezultate molekulske-dinamičkih (MD) simulacija enzima hDPP III u kompleksima s dva različita peptida. Prvi peptid je eksperimentalno potvrđen supstrat – angiotenzin-(1-7), a drugi peptid je njegov stabilizirani analog ACCA3, u kojem je valin zamijenjen neprirodnom cikličkom δ aminokiselinom (ACCA). Supstitucija valina onemogućuje degradaciju angiotenzina-(1-7) enzimom hDPP III. Rezultati rada otkrivaju moguće uzroke stabilnosti peptida ACCA3, a upućuju i na veću stabilnost kompleksa hDPP III s ACCA3 u odnosu na kompleks s angiotenzinom-(1-7).

(54 stranice, 29 slike, 5 tablica, 50 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: metalopeptidaza, ljudska dipeptidil-peptidaza III, angiotenzin-(1-7), molekulske modeliranje, molekulska dinamika, račun slobodne energije, MM-PBSA

Voditelj: dr.sc. Sanja Tomić, nasl. prof.
Suvoditelj: dr.sc. Biljana Balen, izv. prof.

Ocjenitelji:

Dr.sc. Biljana Balen, izv. prof.
Dr.sc. Vesna Benković, izv. prof.
Dr.sc. Dijana Škorić, prof.

Zamjena:

Dr.sc. Inga Marijanović, doc.

Rad prihvaćen: 19. rujna 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Computational study of complexes of human dipeptidyl peptidase III with angiotensin-(1-7)
and its stabile analogue

Ivana Čavka

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Dipeptidyl peptidase III (DPP III) is a zinc-dependant metallopeptidase with a broad substrate specificity. It is involved in degradation of peptides with three to ten amino acid residues. It is known that human DPP III (hDPP III) exhibits high affinity to opioid peptides and peptides from renin-angiotensin-aldosterone system. In the view of this, hDPP III has been associated with different physiological processes, such as, pain-modulation, blood pressure regulation and, defence against oxidative stress. Furthermore, there have been some implications of hDPP III enzyme's involvement in pathophysiological states like cataractogenesis and malignant growth. These findings have characterized DPP III as a potential drug target. This thesis brings results of molecular dynamics (MD) simulations of complexes of hDPP III with two different peptides. First one is angiotensin-(1-7), which has been experimentally confirmed as a substrate, and the other one is its stabile analogue ACCA3, in which valin has been substituted with a non-natural cyclic δ amino acid (ACCA). Valin substitution prevents angiotensin-(1-7) degradation by hDPP III. The results hold possible causes of ACCA3's apparent stability and indicate the greater stability of the complex of hDPP III with ACCA3, than that of the complex of hDPP III with the angiotensin-(1-7).

(54 pages, 29 figures, 5 tables, 50 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: metallopeptidase, human dipeptidyl peptidase III, angiotensin-(1-7), molecular dynamics, molecular mechanics, free energy calculation, MM-PBSA

Supervisor: Dr. sc. Sanja Tomić, Prof.

Co-supervisor: Dr.sc. Biljana Balen, Assoc. Prof.

Reviewers:

Dr. Biljana Balen, Assoc. Prof.

Dr. Vesna Benković, Assoc. Prof.

Dr. Dijana Škorić, Prof.

Replacement:

Dr. Inga Marijanović, Asst. Prof.

Thesis accepted: 19 September 2018

Zahvale

Najprije želim od srca zahvaliti prof.dr.sc. Sanji Tomić, voditeljici ovog diplomskog rada. Hvala Vam na ukazanom povjerenju, prenesenom znanju i vremenu koje ste mi posvetili. Iskreno Vam zahvaljujem i na strpljenju koje ste mi ukazali, kao i na vrijednim savjetima koje ste mi davali tijekom izrade ovog rada.

Na strpljenju i neizostavnoj pomoć u izradi rada zahvaljujem i suvoditeljici rada, izv.prof.dr.sc. Biljani Balen. Hvala Vam na vremenu koje ste mi posvetili tijekom izrade rada, te strpljenju koje ste mi ukazali.

Na pomoći i savjetima o korištenju računalnih alata i programa, koji su bili od velike koristi prilikom izrade rada, posebno zahvaljujem i dr.sc. Marku Tominu.

Na posljetku, hvala mojoj obitelji i prijateljima. Roditeljima Maši i Marinku, te teti Dragici zahvaljujem što su mi omogućili da studiram ono što volim i što su mi uvijek bili velika potpora. Vrijeme brzo leti kada se zabavljaš. Na tome što je posljednjih pet godina studija tako brzo i olako prošlo zahvaljujem svojim prijateljicama Anamariji i Pauli, sestrama Anamariji i Marini, te bratu Augustinu.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Peptidaze	1
1.2. Metalopeptidaze	2
1.3. Dipeptidil-peptidaza III	3
1.4. Uloga DPP III u sustavu renin-angiotenzin-aldosteron.....	8
1.5. Stabilizacija Ang-(1-7) zamjenom valina s cikličkom aminokiselinom	9
1.6. Molekulsko modeliranje.....	10
1.6.1. Empirijske metode i polja sile.....	11
1.6.2. Optimizacija geometrije.....	12
1.6.3. Molekulska dinamika.....	12
1.6.4. Račun slobodne energije	14
1.7. Ciljevi rada.....	15
2. Materijali i metode	16
2.1. Priprema sustava	16
2.2. Simulacije molekulske dinamike	18
2.2.1. Optimizacija sustava	18
2.2.2. Molekulska dinamika.....	18
2.3. Račun slobodne energije	19
2.4. Analiza podataka	19
2.4.1. Korižen iz srednjeg kvadrata odstupanja.....	19
2.4.2. Korižen iz srednjeg kvadrata fluktuacija	20
2.4.3. Radijus giracije	20
2.4.4. Udaljenosti parova atoma	21
2.4.5. Interakcije proteina i liganada.....	21
3. Rezultati	22
3.1. Strukturne i dinamičke odrednice kompleksa	22

3.2. Karakterizacija aktivnog mjesta	22
3.2.1. Simulacije s neutralnim histidinom H568 (HIE568)	28
3.2.2. Simulacije s protoniranim histidinom H568 (HIP568)	30
3.3. Koordinacija kationa cinka.....	33
3.3.1. Simulacije s neutralnim histidinom H568 (HIE568)	33
3.3.2. Simulacije s protoniranim histidinom H568 (HIP568)	36
3.4. Slobodna energija vezanja liganda	39
3.5. Interakcije proteina i liganada	40
4. Rasprava.....	45
5. Zaključak.....	50
6. Literatura.....	51
7. Prilozi.....	I
8. Životopis	V

Popis kratica

Å	fizikalna jedinica duljine ångström (10^{-10} m)
ACCA	cis-3-(aminometil)ciklobutan karboksilna kiselina
ACCA3	stabilni analog angiotenzina-(1-7) kojem je valin zamijenjen s ACCA
ACE	angiotenzin konvertirajući enzim (engl. <i>angiotensin converting enzyme</i>)
ACE2	angiotenzin konvertirajući enzim 2 (engl. <i>angiotensin converting enzyme 2</i>)
AM1-BCC	model naboja korišten u parametrizaciji
AMBER	polje sila i paket računalnih programa za molekulsko-dinamičke simulacije biomakromolekula (engl. <i>assisted model building with energy refinement</i>)
Ang-(1-7)	angiotenzin-(1-7)
CG	metoda konjugiranih gradijenata (engl. <i>conjugate gradients</i>)
CHYM	enzim kimaza (engl. <i>chymase</i>)
Cs	atom ugljika iz peptidne veze koja se hidrolitički cijepa
\bar{d}	srednja udaljenost
DPP III	dipeptidil-peptidaza III
E508-Oε2	kisik bočnog lanca glutamata E508 koji u pripremi sustava nije vezan za cink
EC	sustav klasifikacije enzima <i>Enzyme Commission</i>
ff14SB	proteinsko polje sila računalnog paketa AMBER16
fs	fizikalna jedinica vremena – femtosekunda (10^{-15} s)
e	jedinični naboj ($1,602 \times 10^{-19}$ C)
GAFF	polje sila za male organske molekule (engl. <i>general amber force field</i>)
H568-Nε	ε dušik bočnog lanca histidina H568
hDPP III	ljudska dipeptidil-peptidaza III (engl. <i>human dipeptidyl peptidase III</i>)
hDPP III-ACCA3	kompleks hDPP III s ACCA3
hDPP III-Ang-(1-7)	kompleks hDPP III s Ang-(1-7)
HIE568	neutralni histidin H568 s vodikom na ε dušiku bočnog lanca
HIP568	protonirani histidin H568
HOH1	molekula vode koja sudjeluje u hidrolizi peptidne veze
HOH2	druga molekula vode u koordinacijskoj ljusci cinka
MD	molekulska dinamika (engl. <i>molecular dynamics</i>)
MM	molekulska mehanika (engl. <i>molecular mechanics</i>)
MM-GBSA	metoda za račun slobodne energije (engl. <i>molecular mechanics with generalized Born and surface area solvation</i>)
MM-PBSA	metoda za račun slobodne energije (engl. <i>molecular mechanics with Poisson-Boltzmann and surface area solvation</i>)
NEP	neprilizin

<i>NpT</i>	izotermno-izobarni ansambl
Ns	atom dušika iz peptidne veze koja se hidrolitički cijepa
ns	fizikalna jedinica vremena – nanosekunda (10^{-9} s)
<i>NVE</i>	mikrokanonski ansambl
<i>NVT</i>	kanonski ansambl
Os	kisik uz peptidnu vezu koja se hidrolitički cijepa
P1-N	dušik okosnice arginina na položaju P1
PDB	proteinska baza podataka <i>Protein Data Bank</i>
PME	metoda za tretman interakcija dugog doseg (engl. <i>particle mesh Ewald</i>)
ps	fizikalna jedinica vremena – pikosekunda (10^{-12} s)
QM	kvantna mehanika (engl. <i>quantum mechanics</i>)
QM/MM	kvantna mehanika/molekulska mehanika
RAA	renin-angiotenzin-aldosteron
Rg	radijus giracije
RMSD	korijen iz srednjeg kvadrata odstupanja (engl. <i>root mean square deviation</i>)
RMSF	korijen iz srednjeg kvadrata fluktuacija (engl. <i>root mean square fluctuation</i>)
SASA	otapalu dostupna površina (engl. <i>solvent accessible surface area</i>)
<i>sd</i>	standardna devijacija
SD	metoda najstrmijeg spusta (engl. <i>steepest descent</i>)
SHAKE	algoritam korišten za ukrućivanje kovalentnih veza s vodikom
TIP3P	model vode za simulacije u eksplicitnom otapalu
TOP	timet-oligopeptidaza
vdW	van der Waals
Y318-OH	kisik bočnog lanca tirozina Y318

1. Uvod

1.1. Peptidaze

Prema Međunarodnoj uniji za biokemiju i molekularnu biologiju (IUBMB, engl. *International Union for Biochemistry and Molecular Biology*), peptidaze se definiraju kao enzimi koji provode hidrolizu peptidne veze. U užem smislu, pod pojmom peptidaza podrazumijeva se manja skupina hidrolaza peptidne veze koje kao supstrate preferiraju peptide. Kako bi se izbjegla zabuna, preporuča se korištenje pojma peptidaza isključivo u njegovom širem smislu (Beynon i Bond, 2001).

Prema sustavu EC (od engl. *Enzyme Commission*) peptidaze čine podrazred EC.3.4., gdje broj tri označava razred hidrolaza kojemu pripadaju peptidaze. Prema klasičnoj nomenklaturi sustava EC, enzimi se klasificiraju isključivo na temelju osnovne reakcije koju kataliziraju. Takav način klasifikacije nije pogodan za klasifikaciju peptidaza za koje je osnovna reakcija ista – hidroliza peptidne veze. Kako bi se peptidaze učinkovito klasificirale, u klasičnu nomenklaturu prema sustavu EC uvedeno je nekoliko izmjena. Tako se podrazred peptidaza dijeli u 14 pod-podrazreda koji su podijeljeni u dvije veće skupine – endopeptidaze i egzopeptidaze (Beynon i Bond, 2001). Endopeptidaze cijepaju peptidnu vezu koja se nalazi unutar slijeda polipeptida, dok egzopeptidaze djeluju isključivo odcjepljujući aminokiseline s krajeva polipeptida. Ovisno o kraju kojeg preferiraju, egzopeptidaze se dijele na one koje preferiraju N-kraj polipeptida i one koje preferiraju C-kraj polipeptida. N-terminalne peptidaze uključuju tri pod-podrazreda, aminopeptidaze koje odcjepljuju jedan aminokiselinski ostatak, dipeptidil-peptidaze koje odcjepljuju dva, i tripeptidil-peptidaze koje odcjepljuju tri aminokiselinska ostatka. Slična je podjela i C-terminalnih peptidaza koje obuhvaćaju četiri pod-podrazreda. Jedan od tih pod-podrazreda su peptidil-dipeptidaze, koje odcjepljuju po dva aminokiselinska ostatka s C-kraja, dok ostala tri pod-podrazreda čine C-terminalne peptidaze koje odcjepljuju po jedan aminokiselinski ostatak – karboksipeptidaze. Karboksipeptidaze su na temelju katalitičke skupine razvrstane u tri pod-podrazreda: metalokarboksipeptidaze, karboksipeptidaze serinskog tipa, karboksipeptidaze cisteinskog tipa. Egzopeptidaze uključuju još dva od 14 pod-podrazreda i to dipeptidaze, koje cijepaju dipeptide, te omega peptidaze koje odcjepljuju supstituirane terminalne ostatke. Nadalje, endopeptidaze su na temelju mehanizma katalize razvrstane u ukupno 6 pod-podrazreda, koji uključuju serinske, cisteinske, aspartatske i treoninske endopeptidaze, metaloendopeptidaze te endopeptidaze čiji je mehanizam katalize nepoznat (<http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/>).

Važno je spomenuti i sustav nomenklature MEROPS koji je 1992. godine predložio Neil D. Rawlings (Beynon i Bond, 2001). Sustav MEROPS razvrstava peptidaze uzimajući u obzir njihove strukturne karakteristike i evolucijske odnose, a objavljen je u vidu mrežne baze podataka peptidaza i njihovih inhibitora (<https://www.ebi.ac.uk/merops/index.shtml>). U bazi podataka MEROPS svaka je peptidaza na temelju aminokiselinskog slijeda pridružena jednoj od obitelji koje su na temelju homologije grupirane u klanove. Svakoj obitelji dodijeljen je jedinstveni identifikator. Identifikator se sastoji od slova koje predstavlja katalitički mehanizam i jedinstvenog broja. Sustav MEROPS razlikuje osam tipova katalitičkih mehanizma, koji uključuju aspartatske (A), cisteinske (C), glutaminske (G), asparaginske (N), serinske (S) i treoninske (T) peptidaze, metalopeptidaze (M), peptidaze s miješanim mehanizmom katalize (P) te peptidaze čiji je mehanizam katalize nepoznat (U).

Peptidaze su sveprisutni enzimi uključeni u čitav niz različitih procesa na razini stanice i organizma. Njihove se uloge kreću od nespecifične razgradnje proteina važne za homeostazu stanice do sudjelovanja u specifičnim reakcijama cijepanja peptida preko kojih utječu na čitav niz procesa kao što su replikacija i transkripcija DNA, stanična proliferacija i diferencijacija, morfogeneza i remodeliranje tkiva, angiogeneza, neurogeneza, ovulacija, nekroza i mnogi drugi (López-Otín i Bond, 2008). Jasno je kako je uloga pojedine peptidaze određena njezinom supstratnom specifičnošću koja je pak određena karakteristikama veznog mjesta (Beynon i Bond, 2001), odnosno aminokiselinskim ostatcima enzima koji oblažu vezno mjesto. Supstratna specifičnost se opisuje modelom koji su 1967. godine predložili Berger i Schechter. Prema tom modelu, vezno mjesto je opisano nizom podmjesta od kojih svako može vezati po jedan bočni lanca supstrata. Predloženo je da se aminokiselinski ostatci supstrata označavaju s P1, P2, ... Pn, ukoliko se nalaze prema N-kraju supstrata u odnosu na peptidnu vezu koja se cijepa prilikom reakcije hidrolize, odnosno P1', P2', ... Pn' ukoliko se nalaze prema C-kraju. Shodno tomu se odgovarajuća podmjesta aktivnog mjesta peptidaze označavaju sa S1, S2, ... Sn, odnosno S1', S2', ... Sn' (Schechter i Berger, 1967).

1.2. Metalopeptidaze

Najveći broj peptidaza spada u metalopeptidaze koje u svojoj strukturi sadrže jedan ili dva metalna iona važna za odvijanje katalitičke reakcije. Smatra se kako divalentni metalni kation u aktivnom mjestu metalopeptidaze aktivira molekulu vode snižavajući njezinu pKa vrijednost. Aktivirana molekula vode kroz nukleofilnu reakciju s karbonilom peptida potiče cijepanje peptidne veze (Frey i Hegeman, 2007). Najzastupljeniji kofaktor metalopeptidaza je

dvovalentni cinkov ion, a uz njega se još pojavljuju i dvovalentni ioni magnezija, kobalta, bakra i nikla (Barrett i Rawlings, 2013). Analizom kristalnih struktura iz mrežne baze *Protein Data Bank* (PDB), uočeno je da je kation cinka najčešće koordiniran s tri aminokiselinska ostatka i molekulom vode (tetrakoordiniran). Prisutne su i strukture u kojima je koordinacijski broj kationa cinka pet ili šest (Tomić i Tomić, 2014).

O koordinacijskom broju kationa ovisi učinkovitost kationa u sniženju pKa vrijednosti vode, tj. kation s nižim koordinacijskim brojem bolja je Lewisova kiselina od kationa koji je koordiniran s više liganada. Razlog tome je manji ionski radijus kod kationa s nižim koordinacijskim brojem. Kation niti jednog biološki relevantnog metala s koordinacijskim brojem šest ne može, samostalno, spustiti pKa vode dovoljno da se omogući njezina deprotonacija i nastanak hidroksida (Frey i Hegeman, 2007). Osim o koordinacijskom broju, učinkovitost kationa ovisi o prirodi aminokiselinskih ostataka koji sudjeluju u koordinaciji. Kod metalopeptidaza u koordinaciji kationa najčešće sudjeluju histidin, aspartat, glutaminska kiselina i cistein (Auld, 2013). Važnu ulogu u reakciji hidrolize kod metalopeptidaza ima i glutaminska kiselina čija uloga nije u potpunosti razjašnjena, ali se uglavnom smatra da služi kao opća baza tijekom deprotonacije vode (Barrett i Rawlings, 2013; Blumberger i sur., 2007).

1.3. Dipeptidil-peptidaza III

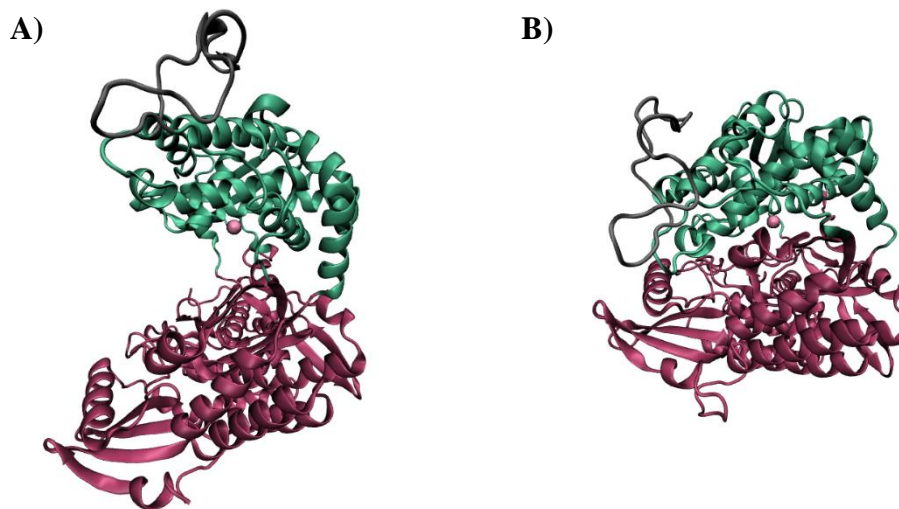
Dipeptidil-peptidaza III (DPP III, EC 3.4.14.4) je o cinku ovisna metalopeptidaza široke supstratne specifičnosti. Prema bazi MEROPS, peptidazna obitelj DPP III je kategorizirana kao obitelj M49 unutar klana MA. Osnovna karakteristika M49 peptidaza je katalitički motiv **HEXXXH** (Rawlings i sur., 2018). Histidini katalitičkog motiva sudjeluju u koordinaciji kationa cinka, dok glutaminska kiselina aktivira molekulu vode (Tomić i Tomić, 2014). Treći aminokiselinski ostatak koji sudjeluje u koordinaciji metalnog dikationa je glutaminska kiselina iz evolucijski očuvanog motiva M49 peptidaza – **EEXR(K)AE(D)** (Prajapati i Chauhan, 2011; Tomić i Tomić, 2014). Određivanje i poravnanje aminokiselinskih sljedova enzima iz obitelji M49 otkrilo je još nekoliko očuvanih aminokiselinskih ostataka. U slučaju ljudske DPP III (hDPP III) riječ je o aminokiselinskim ostatcima Q51, K53, K405, F404, N406, W300, E316, Y318, D372, E329, D372, N391, N394, H568, R399, R572, R659, R669 i R703 (Prajapati i Chauhan, 2011; Tomić i sur., 2012). Za dio očuvanih ostataka postoje dokazi o direktnoj ili indirektnoj ulozi u vezanju supstrata (K405, N372, N406, R399, F404, W300, Y318), odvijanju katalitičke reakcije (H568, Y318) i konformacijskoj promjeni enzima (D372, K405, N406, W300, Y318, N391, F404) (Tomić i sur., 2012).

Prva DPP III je izolirana 1967. godine iz hipofize goveda. Danas je poznato da su članovi obitelji M49 široko rasprostranjeni enzimi, pronađeni u pripadnika pet od šest kraljevstava živog svijeta – *Bacteria*, *Protista*, *Fungi*, *Animalia*, *Plantae* (Rawlings i sur., 2018). U većini istraživanja je potvrđeno da se radi o citosolnim peptidazama, no u nekoliko istraživanja uočena je i membranska aktivnost enzima DPP III, a hDPP III je prisutna i u izvanstaničnim tekućinama poput retroplacentarnog seruma te sjemene i cerebrospinalne tekućine. Točan mehanizam, kojim protein hDPP III ulazi u izvanstanični prostor, nije razjašnjen, ali pretpostavlja se da se radi o sekreciji ili o izlasku koji je posljedica smrti ili oštećenja stanica (Prajapati i Chauhan, 2011). Prisutnost proteina DPP III potvrđena je u mnogim tkivima i stanicama sisavaca kao što su mišići, eritrociti, limfociti, monociti, mozak, leđna moždina, koža, leća, bubreg, jetra i tanko crijevo (Kumar i sur., 2016; Prajapati i Chauhan, 2011). Prekomjerna ekspresija hDPP III povezuje se s različitim patološkim stanjima kao što su pojava očne mrežnice i rast tumora pa se sam enzim smatra mogućom metom lijekova (Tomić i sur., 2016). Iz tog razloga se ulažu značajni znanstveni napor i kako bi se rasvijetlio mehanizam katalize i razvili inhibitori enzima hDPP III kao potencijalni lijekovi.

Peptidaza DPP III je uključena u procese razgradnje kratkih peptida duljine tri do deset aminokiselina u završnim fazama katabolizma proteina (Prajapati i Chauhan, 2011). Studije u uvjetima *in vitro* pokazuju kako ova peptidaza posjeduje široku supstratnu specifičnost i može učinkovito cijepati različite biološki aktivne peptide (Kumar i sur., 2016). Peptidaza hDPP III posjeduje visok afinitet prema opioidnim peptidima i peptidima iz sustava renin-angiotenzin-aldosteron (RAA). Od opioidnih peptida koji su supstrati enzima DPP III, posebno se ističu endomorfini koji u svom aminokiselinskom slijedu imaju prolin na položaju P1, a uz njih hDPP III cijepa i enkefaline (Prajapati i Chauhan, 2011). Opioidni peptidi reguliraju mnoštvo fizioloških procesa kao što su osjet boli (nocicepcija), endokrine i imunostne funkcije, probava i kompleksna socijalna ponašanja (Kumar i sur., 2016). Pokazano je kako enzim hDPP III razgrađuje opioidne peptide i peptide sustava RAA na način koji bi u fiziološkim uvjetima vodio gubitku njihove aktivnosti (Prajapati i Chauhan, 2011). Kao najbolji supstrat, od biološki aktivnih peptida, spominje se angiotenzin II, kojeg hDPP III razgrađuje kroz dvije sukcesivne reakcije (Kumar i sur., 2016). Nedavno je uočeno kako je enzim DPP III, glavna peptidaza u razgradnji angiotenzina-(1-7) (Ang-(1-7)) u staničnoj kulturi epitelnih stanica bubrega čovjeka (stanice HK-2) te mozgu i proksimalnom tubulu bubrega ovce (Cruz-Diaz i sur., 2016, 2017; Wilson i sur., 2015). Upravo je kompleks hDPP III s Ang-(1-7) predmet istraživanja ovog rada pa je, shodno tome, detaljniji opis moguće uloge DPP III u sustavu RAA dan u narednom poglavlju. Neke studije upućuju i na ulogu enzima DPP III u obrani od oksidacijskog stresa

tako što sudjeluje u procesima koji vode prijenosu proteina NRF2 u jezgu (Liu i sur., 2007). Potvrda biološki aktivnih peptida kao dobrih supstrata upućuje na moguće uloge peptidaze hDPP III u širokom spektru fizioloških procesa čovjeka i time na važnost njezina proučavanja.

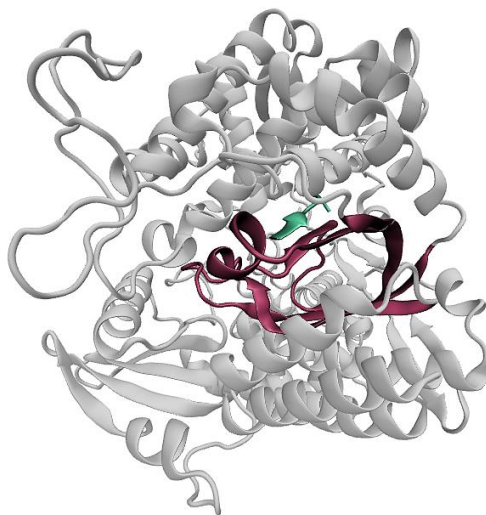
Velik doprinos razumijevanju peptidaze hDPP III bilo je određivanje njezine strukture. Do sada su kristalografski određene strukture DPP III iz šest vrsta (Baral i sur., 2008; Bezerra i sur., 2012; Kumar i sur., 2016; Xu i sur., 2017; Sabljic i sur., 2017, 2018). Struktura enzima hDPP III određena je u dvije konformacije (Slika 1.). Otvorena konformacija enzima (PDB ID: 3FVY) određena je bez prisustva liganda, dok je zatvorena konformacija određena bez (PDB ID: 5EGY) i uz (PDB ID: 3T6B, 3T6J, 5E33, 5E3A, 5E2Q, 5EHH, 5E3C) prisustvo liganda (Bezerra i sur., 2012; Kumar i sur., 2016). Sa slike 1. je vidljivo kako se struktura enzima može podijeliti u dvije domene. Donju domenu (ljubičasto na slici 1.) čine aminokiselinski ostatci između 1. i 336. pozicije, 375. i 421. pozicije te između 669. i 726. pozicije slijeda. Gornju domenu enzima (zeleno na slici 1.) sačinjavaju aminokiselinski ostatci između 337. i 374. te 422. i 668. pozicije slijeda. Unutar gornje domene primjetna je nestrukturirana, fleksibilna petlja (sivo na slici 1.) koja se proteže od 463. do 489. pozicije aminokiselinskog slijeda.



Slika 1. Kristalografski određene strukture ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) bez prisutnosti liganda. Različitim bojama su naznačene donja domena (ljubičasto), gornja domena (zeleno), fleksibilna petlja koja pripada gornjoj domeni (sivo) i kation cinka (roza sfera). **A)** Otvorena konformacija enzima (PDB ID: 3FVY). **B)** Zatvorena konformacija (PDB ID: 5EGY). Slika je izrađena korištenjem alata *VMD* (Humphrey i sur., 1996) prema predlošku iz rada Tomić i sur., 2012.

Dinamika između dvije konformacije enzima hDPP III proučavana je u nekoliko računalnih istraživanja (Tomić i sur., 2012, 2015). Autori računalnih istraživanja prezentirali su dokaze koji upućuju na postojanje ravnoteže između otvorene i zatvorene konformacije u otopini, uz postojanje niza prijelaznih oblika ili poluzatvorenih konformacija. Prema mišljenju autora, vezanje liganda utječe na dinamiku između otvorene i poluzatvorenih konformacija,

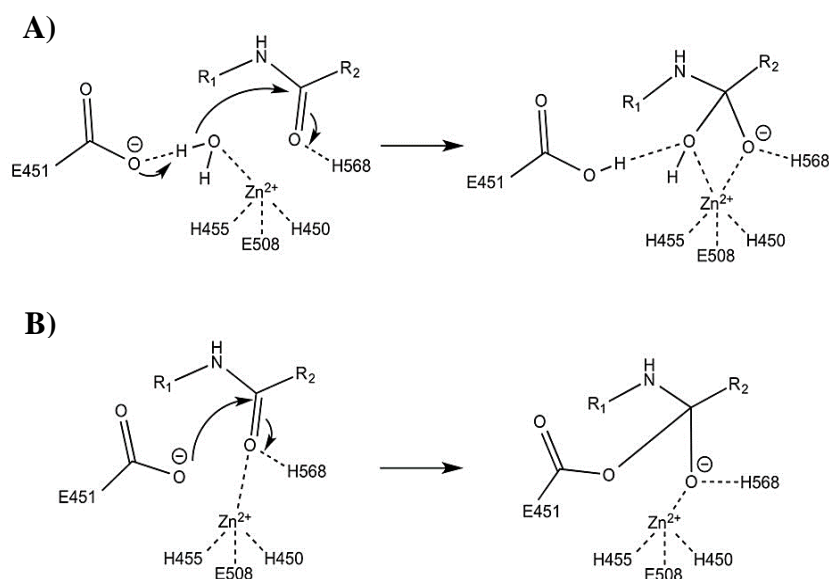
pomičući ravnotežu prema zatvorenoj konformaciji (Tomić i sur., 2015). Opisani model je u skladu s eksperimentalnim istraživanjima. Tako su u radu, koji donosi prve kristalografski određene strukture enzima hDPP III (Bezerra i sur., 2012), autori pokazali da je vezanje liganda proces vođen entropijom, gdje je nepovoljan entalpijski doprinos nadoknađen porastom entropije uslijed oslobađanja strukturiranih voda iz međudomenskog prostora u koji se ligand veže. Na slici 2. je prikazana struktura peptidaze hDPP III u kompleksu s angiotenzinom II (PDB ID: 5E2Q). Za enzim hDPP III je dokazano da veže različite peptidne ligande, a zajedničko u vezanju svih liganada je ostvarivanje polarnih interakcija s N-krajem peptidnog liganda i interakcija liganda s β -pločom unutar veznog mjesta enzima (ljubičasto na slici 2.). Smatra se kako su ove interakcije važne za povoljno pozicioniranje peptidne veze supstrata koja se hidrolizira u katalitičkoj reakciji enzima (Kumar i sur., 2016). Računalno istraživanje supstratne specifičnosti enzima (Tomić i Tomić, 2014), pokazalo je da enzim hDPP III preferira peptidne ligande čiji aminokiselinski ostatci na položajima P2-P2' imaju mogućnost stvaranja β -vrpce, a dodatno su preferirani oni koji na položajima P2 i P1'-P3' imaju nepolarne aminokiselinske ostatke. Ukoliko se u vezno mjesto povoljno smjesti peptidni supstrat, dolazi do katalitičke reakcije i odcjepljenja dvaju aminokiselinskih ostataka s N-kraja peptida. Na temelju dokaza prikupljenih dosadašnjim istraživanjima, pretpostavlja se da je kristalografski određena zatvorena konformacija enzima katalitički aktivna (Tomić i sur., 2015; Tomić i Tomić, 2014).



Slika 2. Kristalografski određena struktura mutanta ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III E451A) u kompleksu s angiotenzinom II (PDB ID: 5E2Q). Angiotenzin II (zeleno) se strukturira u β -vrpcu i antiparalelno se veže s β -pločom proteina sastavljenom od pet β -vrpci (ljubičasto). Slika je izrađena korištenjem alata *VMD* (Humphrey i sur., 1996) prema predlošku iz rada Kumar i sur., 2016.

Smatra se kako katalitički mehanizam enzima DPP III nalikuje katalitičkom mehanizmu drugih metalopeptidaza ovisnih o cinku, kao što su termolizin i neprilizin (Tomić i sur., 2016). Termolizin je najproučavanija metalopeptidaza, a na temelju eksperimentalnih podataka predložena su tri mehanizma. Najviše dokaza podupire mehanizam u kojem glutamat E134 sudjeluje kao opća baza koja pridonosi deprotonaciji vode, čija je pKa vrijednost snižena zbog njezina sudjelovanja u koordinaciji kationa cinka. Osim glutamata E134, koji je neophodan, za odvijanje katalitičke reakcije je važan i histidin H231 koji sudjeluje u stabilizaciji prijelaznog stanja, stvarajući snažnu vodikovu vezu s nastalim kisikovim anionom (Blumberger i sur., 2007). Adekvatni analozi pronađeni su i u slijedu proteina hDPP III. Radi se evolucijski očuvanim aminokiselinskim ostatcima H568 i E451. Nadalje, isto kao i kod termolizina, kation cinka u strukturi enzima hDPP III fiksiraju dva histidina, H450 i H455, te glutamat E508. Eksperimenti u kojima su mjerena kinetička istraživanja mutanata pokazali su kako je katalitička aktivnost potpuno narušena supstitucijom glutamata E451A, dok je aktivnost mutanta sa supstitucijom histidina H568N dosta snižena (Tomić i sur., 2011). Pokazano je i kako supstitucija evolucijski očuvanog tirozina Y138 fenilalaninom vodi snižavanju katalitičke aktivnosti enzima hDPP III (Salopek-Sondi i sur., 2008). Rezultati računalne analize potvrđuju ulogu histidina H568 u stabilizaciji prijelaznog stanja i upućuju na ulogu tirozina Y318 u pozicioniranju supstrata i glutamata E508 (Tomić i sur., 2016).

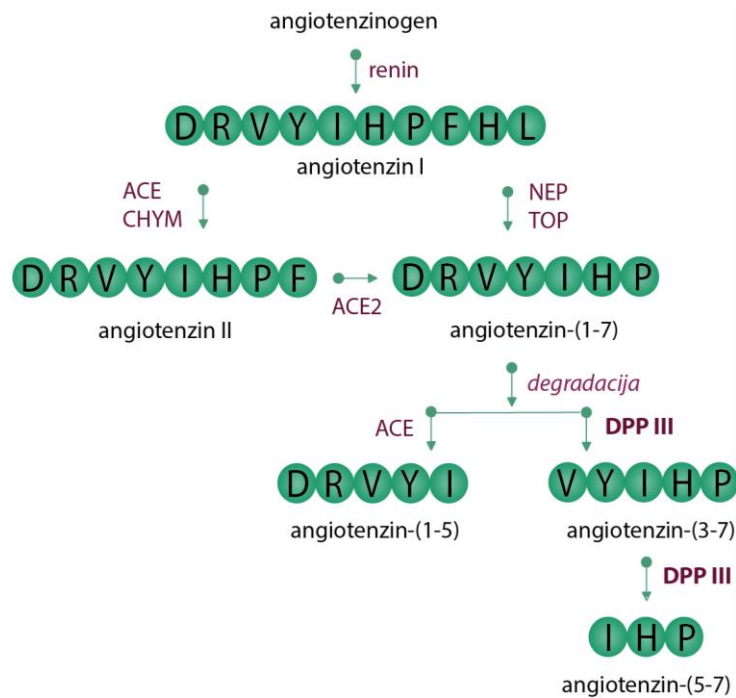
Dosad potvrđeni inhibitori enzima DPP III uključuju kelatore metalnih kationa, teške metale i peptide kao što su tinorfin (VVYPW), spinorfin (LVVYPWT) i sintetizirani hemorfini analozi (IVYPW i WVYPW). Kao i DPP III sisavaca, spinorfini i hemorfini su prisutni u cerebrospinalnoj tekućini pa se pretpostavlja da sudjeluju u regulaciji aktivnosti enzima DPP III (Prajapati i Chauhan, 2011). Kumar i sur. (2016) uočili su kako prilikom dulje inkubacije enzima hDPP III s peptidnim inhibitorima, ipak dolazi do cijepanja inhibitora, tj. da se zapravo radi o sporim supstratima. Na temelju određenih struktura autori su predložili da se cijepanje ovih kompetitivnih inhibitora odvija sporim anhidridnim mehanizmom (slika 3. B), dok se hidroliza „zlatnih“ supstrata, kao što su met-enkefalin, leu-enkefalin i angiotenzin II i dr., odvija putem prethodno opisanog mehanizma (slika 3. A).



Slika 3. Mogući mehanizmi katalize ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III). **A)** Mehanizam u kojem aktivirana voda nukleofilno napada karbonilni ugljik peptidne veze predložen je za razgradnju „zlatnih“ supstrata, **B)** Anhidridni mehanizam. Predloženi mehanizam razgradnje inhibitora (sporih supstrata). Slika je preuzeta iz rada Kumar i sur., 2016.

1.4. Uloga DPP III u sustavu renin-angiotenzin-aldosteron

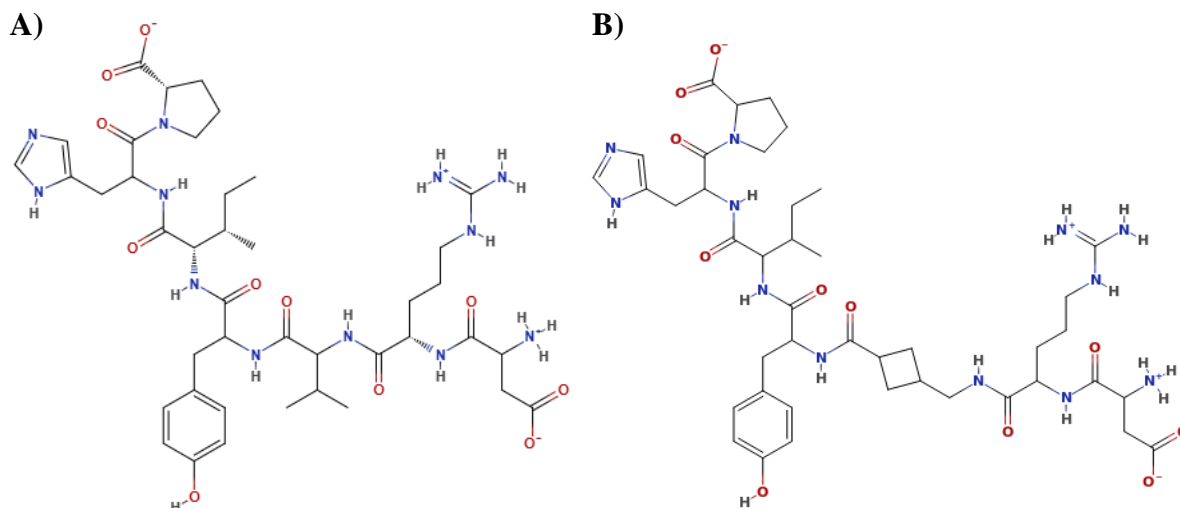
Sustav RAA čini okosnicu fiziološke regulacije krvnog tlaka. Glavni čimbenici sustava su angiotenzinski peptidi koji nastaju iz angiotenzinogena posredstvom različitih peptidaza. Klasični put sustava sačinjavaju angiotenzin II i njegov receptor AT₁R. U tom putu, aktivacija receptora AT₁R vezanjem angiotenzina II vodi k pojavi vazokonstrikcije, žeđi, zadržavanju natrija, oksidacijskog stresa, fibroze, staničnog rasta i upale. Alternativni put aktivacije AT₇R vezanjem Ang-(1-7) djeluje suprotno klasičnom putu i poništava njegove učinke (Cruz-Diaz i sur., 2017). Slika 4. prikazuje puteve nastanka i degradacije angiotenzina II i Ang-(1-7). U prvom koraku renin cijepa angiotenzinogen, prilikom čega nastaje biološki neaktivan angiotenzin I. Potom djelovanjem angiotenzin-konvertirajućeg enzima (ACE) ili kimaze (CHYM) nastaje angiotenzin II, dok cijepanje neprilizinom (NEP) ili timet-oligopeptidazom (TOP) vodi nastanku Ang-(1-7). Ang-(1-7) može nastati i cijepanjem angiotenzina II angiotenzin-konvertirajućim enzimom 2 (ACE2). Daljnju degradacija Ang-(1-7) provodi enzim ACE ili enzim DPP III (Cruz-Diaz i sur., 2017). Eksperimentom u uvjetima *in vitro* je pokazano da enzim DPP III pokazuje veći afinitet prema Ang-(1-7) nego prema angiotenzinu II (Cruz-Diaz i sur., 2017), a cijepanje i inaktivacija Ang-(1-7) enzimom hDPP III provode se u dva sukcesivna koraka do Ang-(5-7) (slika 4.).



Slika 4. Peptidaze sustava renin-angiotenzin-aldosteron (RAA). Renin cijepa angiotenzinogen, prilikom čega nastaje biološki neaktivan angiotenzin I. Potom djelovanjem angiotenzin-konvertirajućeg enzima (ACE) ili kimaze (CHYM) nastaje angiotenzin II, dok cijepanje neprilizinom (NEP) ili timet-oligopeptidazom (TOP) vodi nastanku Ang-(1-7). Ang-(1-7) može nastati i cijepanjem angiotenzina II angiotenzin-konvertirajućim enzimom 2 (ACE2). Daljnju degradaciju Ang-(1-7) provode enzim ACE ili dipeptidil-peptidaza III (DPP III). Slika je izrađena prema predlošku preuzetom iz rada Cruz-Diaz i sur., 2017.

1.5. Stabilizacija Ang-(1-7) zamjenom valina s cikličkom aminokiselinom

Inhibitorni učinak Ang-(1-7) na angiogenezu i proliferaciju čine ga potencijalnim kandidatom za liječenje karcinoma. Jedno od glavnih ograničenja terapijskog potencijala peptida je njihova nestabilnost tj. podložnost degradaciji od strane različitih peptidaza (Wester i sur., 2017). Kako bi se povećala otpornost peptida na peptidaznu aktivnost, oni se modificiraju na način da se njihov terapijski učinak pri tome ne smanji. Eksperimentom, koji je proveden u uvjetima *in vitro*, pokazano je da stabilizacija Ang-(1-7) supstitucijom određene aminokiseline peptida cikličkom δ aminokiselinom ne narušava njegov inhibitorni učinak na proliferaciju (Wester i sur., 2017). U radu, koji donosi rezultate spomenutog eksperimenta, ispitivane su različite supstitucije koje bi štatile Ang-(1-7) od različitih aktivnosti enzima hDPP III ili ACE. Za zaštitu od peptidazne aktivnosti enzima hDPP III, predložena je supstitucija treće aminokiseline Ang-(1-7) s *cis*-3-(aminometil)ciklobutan karboksilnom kiselinom (ACCA) (Wester i sur., 2017). Strukture tako stabiliziranog analoga (ACCA3) i Ang-(1-7) prikazane su na slici 5.



Slika 5. Struktura **A**) angiotenzina-(1-7) i **B**) njegovog stabiliziranog analoga u kojem je valin zamijenjen cikličkom δ aminokiselinom – cis-3-(aminometil)ciklobutan karboksilnom kiselinom (ACCA). Slika je izrađena korištenjem mrežnog alata *MolView* (<http://molview.org/>).

1.6. Molekulsko modeliranje

Molekulsko modeliranje je bilo koji pokušaj oponašanja kemijskih sustava (Leach, 2001). Metode molekulskog modeliranja koriste različite matematičke modele koji opisuju ovisnost energije sustava o njegovoj strukturi (Becker i sur., 2001), a dijele se prema razini teorije koju uključuje korišteni matematički model. Računi kvantno-mehaničkih (QM) metoda tretiraju elektrone eksplicitno. Računalna zahtjevnost njihovih računa onemogućuje korištenje metoda QM za modeliranja velikih sustava, kakvi su od interesa u biološkim istraživanjima. Za reprezentaciju takvih sustava pogodne su empirijske metode temeljene na polju sila, poznate i kao molekulska mehanika (MM). Ove metode energiju sustava računaju u ovisnosti o položajima jezgara bez eksplicitnog uključivanja elektrona u proračune. Nedostatak ovakvog pristupa je nemogućnost simuliranja kemijske reakcijske. Rješenje tog problema ponuđeno je u obliku hibridnih metoda QM/MM u kojima je sustav podijeljen u dva dijela koji se promatraju na različitoj razini teorije. Aktivno mjesto enzima simulira se koristeći metode QM, dok se ostatak sustava opisuje metodama MM uz iznimku granice dva sustava koja se opisuje različitim modelima (Leach, 2001).

1.6.1. Empirijske metode i polja sile

Empirijske metode opisuju molekule kao kuglice povezane oprugama. Potencijalna energija sustava (U) ovisi o međusobnom položaju jezgara i za sustav od N atom dana je izrazom:

$$U(\mathbf{r}^N) = \sum_{\substack{\text{kemijske} \\ \text{veze}}} \frac{k_i}{2} (l_i - l_{i,0})^2 + \sum_{\substack{\text{valentni} \\ \text{kutevi}}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\substack{\text{torzijski} \\ \text{kutevi}}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma)) \\ + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left(4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}} \right)$$

Prva tri člana izraza opisuju energiju veznih interakcija, tj. interakcija između atoma koji su povezani kovalentnim vezama. Četvrti član opisuje energiju neveznih interakcija atoma, koje uključuju van der Waalove i elektrostatske interakcije. Ponekad se koriste i dodatni članovi koji opisuju odstupanje atoma iz ravnine, a korisni su u opisu planarnih sustava (npr. benzenski prsten), te mješoviti članovi koji opisuju međuovisnost dva različita člana u izrazu za potencijalnu energiju.

Energija istezanja kemijske veze opisana je potencijalom harmoničkog oscilatora koji opisuje odstupanje duljine veze (l_i) od ravnotežne vrijednosti ($l_{i,0}$). Slično vrijedi i za energiju promjene kuta određenog s tri atoma povezana dvjema kovalentnim vezama, a koja je dana drugim članom. Energija promjene torzijskog kuta opisana je periodičnom funkcijom (treći član funkcije). Doprinos van der Waalovih interakcija energiji neveznih interakcija opisan je Lennard-Jonesovim potencijalom, a doprinos elektrostatskih Coulombovim potencijalom između dva točkasta naboja. Ravnotežne vrijednosti, naboji, radijusi atoma i ostali parametri u gornjoj formuli određeni su na temelju eksperimenta ili kvantno-mehaničkih računa. Od velike važnosti je primjenjivost parametara na širok spektar problema od interesa, iako su same vrijednosti parametara utvrđene na malom broju slučajeva. Parametri i gore dan izraz za potencijalnu energiju zajedno čine polje sila. Do danas je razvijeno više različitih polja sila. Neka od njih su specifična i primjenjiva samo na određene sustave, dok su druga polja sila općenita i primjenjuju se na širi spektar problema. Primjeri općenitih polja sila su COMPASS i MMFF, dok se polja sila AMBER, GROMOS, CHARMM i OPLS koriste u računalnim simulacijama biopolimera. Važno je naglasiti kako energija izračunata u polju sila nema nikakvo fizikalno značenje i služi isključivo za usporedbu dviju konformacija čije su energije određene u istom polju sila. Energije određene korištenjem različitih polja sila nisu usporedive.

U otopini su molekule iste vrste prisutne u različitim konformacijama, koje se mogu prikazati kao različite točke na plohi potencijalne energije (PPE) koja reprezentira sve moguće

konformacije neke molekule. Cilj empirijskih metoda je pronalazak minimuma na plohi potencijalne energije koji predstavljaju stabilnije konformacije. U empirijske metode spadaju metode molekulske mehanike (MM), molekulske dinamike (MD) i Monte Carlo (MC) metode.

1.6.2. Optimizacija geometrije

Metode MM se ne koriste za pretraživanje plohe potencijalne energije. Ove metode se koriste za optimizaciju energije, tj. „spuštanje“ u najbliži lokalni minimum. Geometrija početne strukture se kroz određen broj koraka optimizira nekom od metoda MM kako bi se dobila konformacija niže energije. Metode MM uglavnom se koriste za minimizaciju energije početne strukture (uglavnom eksperimentalno određene) prije izvođenja molekulske-dinamičkih (MD) simulacija, a dijele se na metode koje ne koriste derivacije funkcije i one koje koriste. Metode, koje koriste derivacije funkcije, dalje se dijele na metode minimizacije energije prvog i drugog stupnja. Metoda najstrmijeg stupnja (SD, od engl. *steepest descent*) i metoda konjugiranih gradijenata (CG, od engl. *conjugate gradients*) primjeri su metoda prvog stupnja, dok su Newton-Raphsonova metoda i njezine izvedenice primjeri metoda drugog stupnja.

1.6.3. Molekulska dinamika

Molekulska dinamika (MD) omogućuje učinkovito pretraživanje PPE bioloških makromolekula. U MD simulacijama promatrani sustav se propagira kroz vrijeme. U prvom koraku se svakoj čestici pripisuje početna brzina. Početne brzine se dodjeljuju u sva tri smjera na temelju Maxwell-Boltzmanove raspodjele. Ukupna kinetička energija, a time i brzine čestica, ovisi o temperaturi pri kojoj se sustav simulira. Sustav se potom propagira numeričkim rješavanjem diferencijalne jednadžbe drugog Newtonovog zakona:

$$m_i \frac{\partial^2 \mathbf{r}_i}{\partial t^2} = m_i \mathbf{a}_i = F_i$$

Kako bi se omogućilo rješavanje ove diferencijalne jednadžbe, nužno je uvesti pretpostavku da je sila (F_i), koja djeluje na česticu s koordinatama (\mathbf{r}_i) i mase (m_i), konstantna tijekom trajanja jednog vremenskog koraka (δt). Duljina jednog vremenskog koraka ne smije biti dulja od trajanja najbržeg kretanja u sustavu pa se najčešće uzima desetina vremena titraja C-H veze – 1 fs (10^{-15} s). Zamrzavanje, odnosno ukrućivanje određenih elemenata strukture omogućuje korištenje većih vremenskih koraka i time dulje simuliranje sustava u kraćem računalnom vremenu. Jedan od algoritama, osmišljenih u tu svrhu, je algoritam SHAKE koji se često koristi za ukrućivanje kovalentnih veza s vodikom. Za numeričku integraciju po vremenskim koracima postoje različiti algoritmi temeljeni na razvoju funkcije u Taylorov niz (Verletov

algoritam, Verletov algoritam za brzine, algoritam žabljeg skoka (engl. *leap-frog*). Algoritmi se razlikuju s obzirom na broj članova Taylorovog reda koje uključuju u proračune, a služe za računanje novih položaja, brzina i ubrzanja čestica sustava.

Eksperimenti, koji se provode u laboratorijima, namijenjeni su mjerenju makroskopskih svojstava sustava. Rezultati predstavljaju uprosječenu sliku mnoštva mikroskopskih stanja promatranog sustava koja su definirana položajima i količinom gibanja atoma. Skup točaka faznog prostora koji imaju različito mikroskopsko, ali isto makroskopsko stanje čini ansambl. Makroskopsko stanje definirano je termodinamičkom temperaturom (T), tlakom (p), brojem čestica (N) i energijom (E). Metoda MD se temelji na ergotskoj hipotezi prema kojoj će sva termodinamički relevantna stanja biti zastupljena u generiranom skupu konformacija ukoliko dovoljno dugo simuliramo sustav. Radi se o mikrostanjima sustava koja su u termodinamičkoj ravnoteži. Što je točno „dovoljno duga“ simulacija, ovisi o simuliranom sustavu i promjenama koje se žele uočiti. MD simulacijama se mogu generirati tri vrste ansambla: izotermo-izobarni (NpT), kanonski (NVT) i mikrokanonski (NVE). Kako bi se omogućile simulacije pri konstantnoj temperaturi ili tlaku, koriste se različiti termostati, odnosno barostati. U biokemijskim istraživanjima od interesa su simulacije proteina u otapalu. Postoje dva osnovna načina modeliranja otapala: implicitno i eksplicitno otapalo. U slučaju implicitnog otapala, otapalo se u sustav uvodi kao kontinuirani medij određene dielektrične konstante. Simulacije s eksplicitnim otapalom podrazumijevaju uključivanje molekula otapala u simulirani sustav. Molekule otapala opisane su različitim modelima. U slučaju vode, razvijeno je nekoliko modela – SPC, SPCE, TIP3P, TIP4P, TIP5P. Model TIP3P opisuje molekulu vode kao molekulu sastavljenu od dva atoma vodika i jednog atoma kisika kojima su pripisani odgovarajući naboji. Kako bi se smanjila zahtjevnost računa, kut i veze unutar molekule su fiksirani. Makromolekula od interesa se smješta u simulacijsku kutiju određenih dimenzija, koja je ispunjena molekulama otapala. Simulacijska kutija mora biti dovoljno velika kako bi makromolekula bila učinkovito otopljena u uvjetima koji su što sličniji onima koji vladaju u realnom sustavu. S druge strane računalni kapacitet ograničava veličinu kutije pa je potrebno pronaći svojevrsnu „zlatnu sredinu“ koja zadovoljava oba zahtjeva. Iz istih razloga se, u ovisnosti o obliku makromolekule, koriste različiti oblici simulacijskih kutija (kocka, heksagonalna prizma, krnji oktaedar i dr.). Simulacije s eksplicitnim otapalom zahtijevaju poseban tretman granica sustava. U modelu kapi vanjski potencijal koji djeluje na granicu kutije onemogućava gubitak otapala. U sustavu s periodičnim rubnim uvjetima, slike osnovne ćelije okružuju osnovnu simulacijsku ćeliju u sve tri dimenzije. Molekula otapala, koja iziđe iz simulacijske ćelije, nadoknađena slikom molekule koja iz susjedne ćelije prelazi u osnovnu.

Kod periodičnih rubnih uvjeta potreban je poseban tretman dalekosežnih, elektrostatskih interakcija za što se često koristi Ewaldova metoda ili neka od njezinih modifikacija (npr. PME, engl. *particle mesh Ewald*) (Becker i sur., 2001; Leach, 2001).

1.6.4. Račun slobodne energije

Rezultat MD simulacija je niz reprezentacija sustava – trajektorija. Izvođenje različitih proračuna na trajektoriji omogućuje računalno određivanje različitih termodinamičkih svojstava. Jedan od primjera je račun slobodne energije vezanja liganda, na temelju kojeg se mogu usporediti afiniteti kojima protein veže različite ligande i stabilnost kompleksa. Često se za račun slobodne energije koristi metoda MM-PBSA (engl. *molecular mechanics with Poisson-Boltzmann and surface area solvation*). Kod ove metode, energija vezanja liganda (ΔG) procjenjuje se prema formuli (Genheden i Ryde, 2015):

$$\Delta G = \langle G_{PL} - G_P - G_L \rangle_{PL}$$

Formula vrijedi za uobičajen pristup u kojem se izvode samo simulacije kompleksa, a prosjeci za sam protein i ligand se dobiju uklanjanjem odgovarajućih atoma. Svaka od tri slobodne energije (G_{PL} , G_P , G_L) računa se prema formuli:

$$G = E_{vezne} + E_{elektrostatske} + E_{vdW} + G_{pol} + G_{np} - TS$$

Prva tri člana računaju se iz izraza za potencijalnu energiju polja sila, na način koji je već opisan. G_{pol} i G_{np} označavaju polarni i nepolarni doprinos slobodnoj energiji otapanja. Polarni doprinos odnosi se na račun energije elektrostatskih interakcija otopljene tvari (protein, ligand ili kompleks) i implicitno modeliranog otapala, a dobije se numeričkim rješavanjem Poisson-Boltzmanove jednadžbe. Ponekad se zbog manje računalne zahtjevnosti koristi poopćena Bornova metoda (engl. *generalized Born*) pa govorimo o MM-GBSA metodi računanja slobodne energije vezanja. Nepolarni doprinos energiji otapanja obuhvaća energiju potrebnu za stvaranje šupljine i energije privlačnih i odbojnih van der Waalsovih interakcija otapala i otopljene tvari koje djelomično opisuju entropijske doprinose. U standardnim izračunima slobodnih energija metodama MM-PBSA ili MM-GBSA nepolarni se doprinos procjenjivao iz linearnog odnosa s površinom koja je dostupna otapalu (SASA, engl. *solvent accessible surface area*), ali predložene su i varijacije kod kojih se nepolarni doprinos računa kao dva odvojena člana – stvaranje šupljine u otapalu i disperzijski član (Genheden i Ryde, 2015; Miller i sur., 2012). Preostali doprinosi slobodnoj energiji uključuju promjene translacijske, rotacijske i vibracijske entropije. Prva dva se računaju se iz formula statističke mehanike, a vibracijski se procjenjuje iz računalno zahtjevne analize normalnih modova (Miller i sur., 2012).

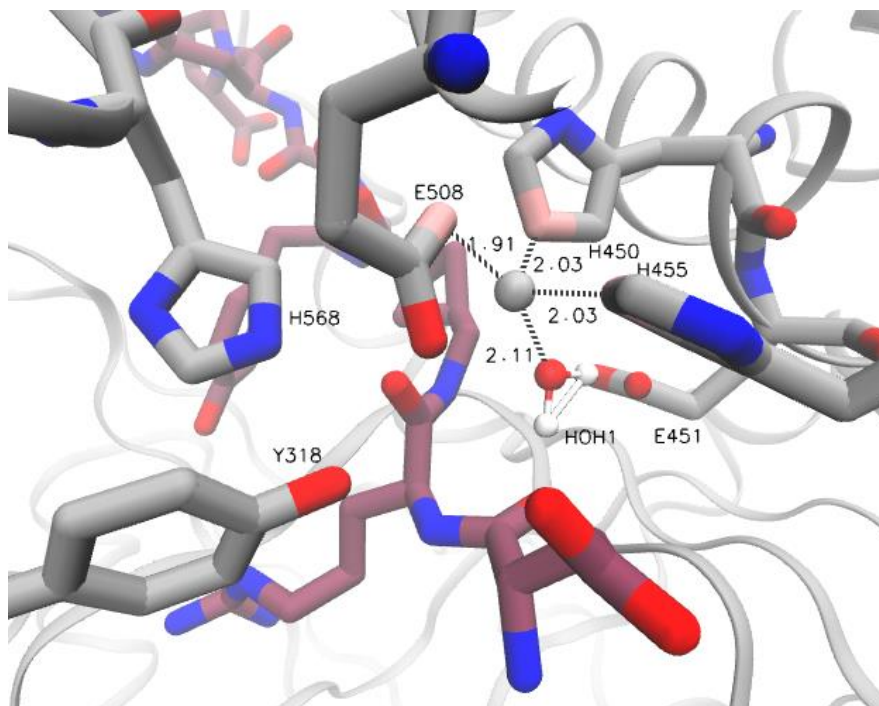
1.7. Ciljevi rada

Cilj diplomskog rada je, korištenjem računalnih metoda molekuskog modeliranja, pobliže ispitati pozadinu eksperimentalno dokazane (Wester i sur., 2017) otpornosti analoga Ang-(1-7) (ACCA3), u kojem je treća aminokiselina (valin) zamijenjena cikličkom δ aminokiselinom (ACCA), na degradaciju enzimom hDPP III. U svrhu toga uspoređivana su strukturna i dinamička svojstva te stabilnost kompleksa hDPP III s Ang-(1-7) i njegovim stabilnim analogom ACCA3. Određene su interakcije navedenih peptida s aminokiselinama u aktivnom mjestu enzima hDPP III, te razlike u položaju aminokiselina aktivnog mjesta i koordinaciji iona cinka tijekom MD simulacija pojedinog kompleksa u vodi. Ispitan je i inhibitorski kapacitet stabilnog analoga i odlike vezanja iz kojih bi on proizlazio. Svrha rada je doprinijeti boljem razumijevanju važnosti pojedinih interakcija enzima hDPP III i supstrata za odvijanje katalitičke reakcije. Dodatno rad donosi karakterizaciju nedavno razvijenih parametara za kation cinka. Naime, u prijašnjim računalnim istraživanjima primijećena je neusklađenost koordinacije iona cinka u aktivnom mjestu enzima DPP III s onom u eksperimentalno određenim strukturama (Tomić i Tomić, 2014).

2. Materijali i metode

2.1. Priprema sustava

Kao početna točka pripreme sustava, korištena je kristalografski određena struktura enzima hDPP III u kompleksu s angiotenzinom II (PDB ID: 5E2Q) (Kumar i sur., 2016). Iako u strukturi nedostaje elektronska gustoća metalnog dikationa, očuvani su položaji aminokiselinskih ostataka koji sudjeluju u njegovoj koordinaciji. Ion cinka dodan je u strukturu sravnjivanjem s drugom strukturom proteina hDPP III u kojoj je prisutan (PDB ID: 5P3F) (Kumar i sur., 2016). Sravnjivanje struktura je izvršeno naredbom *align* u računalnom programu *PyMOL*. Ioni pufera i molekule vode prisutne u strukturi 5E2Q su uklonjeni. Popis mutacija prisutnih u preuzetoj strukturi dan je u prilogu 1. (tablica P1). Svi aminokiselinski ostatci s popisa su izmijenjeni kako bi se dobio protein divljeg tipa. Transformacija aminokiselina je provedena izmjenom „pdb“ datoteke i automatskom izgradnjom aminokiselinskih ostataka u računalnom programu *tleap*, koji je dostupan u sklopu paketa *AmberTools16* (Case i sur., 2016., <http://ambermd.org>). Na temelju mogućnosti stvaranja vodikovih veza s okolnim aminokiselinskim ostacima i mogućnošću koordinacije kationa cinka za svaki je histidin određeno nalazi li se vodik na ϵ ili δ dušikovom atomu bočnog ogranka. U slučaju histidina H568 su kroz odvojene simulacije ispitana dva stanja. Jedno je neutralni histidin s vodikom na $N\epsilon$ atomu (HIE 568), a drugo ispitano stanje je protonirani histidin (HIP568) koji je pozitivno nabijen. Ang-(1-7) u aktivnom mjestu pripremljen je u programu *PyMOL* (The *PyMOL* Molecular Graphics System, Version 2.0) uklanjanjem fenilalanina iz aminokiselinskog slijeda angiotenzina II i dodavanjem terminalnog kisika prolinu. Struktura stabilnog analoga izgrađena je uz pomoć programa *GaussView* (Dennington i sur., 2009) i *PyMOL*. Nakon što je struktura izgrađena, stabilni je analog u aktivno mjesto smješten ručno pomoću programa *PyMOL* korištenjem kompleksa hDPP III s angiotenzinom II kao predložak. Uzimajući u obzir predloženi mehanizam reakcije (Kumar i sur., 2016; Tomić i sur., 2016) i prethodno provedene simulacije, u strukturu kompleksa dodana je molekula vode (HOH1) tako da sudjeluje u koordinaciji cinka (slika 6.). U simulacijama (10 ns) bez dodataka spomenute molekule vode, bočni lanac katalitičkog glutamata E451 ostaje udaljen od aktivnog mjesta enzima. Kako je u strukturi 5E2Q, glutamat E451 mutiran u alanin, a njegov bočni lanac izgrađen od strane programa *tleap*, odlučila sam se za dodatak vode početnoj strukturi jer on dovodi do rotacije glutamata E451 u povoljan položaj već tijekom postupka optimizacije sustava koji je opisan u idućem poglavlju.



Slika 6. Dodatak molekule vode (HOH1) u početnu strukturu. Molekula je dodana na temelju ranije provedenih simulacija tako da atom kisika sudjeluje u koordinaciji cinkova kationa – siva sfera na slici. Uz vodu prikazani su i aminokiselinski ostatci enzima koji sudjeluju u koordinaciji (H450, H455 i E508) te Y318, E451 i H568 koji su važni za katalizu. Radi boljeg razlikovanja, ugljikovi atomi liganda obojeni su ljubičasto, a proteina sivo. Slika je generirana alatom *VMD* (Humphrey i sur., 1996) nakon pripreme sustava u alatu *tleap* i prvog koraka optimizacije geometrije u programu *pmemd.cuda.MPI*.

Parametrizacija proteina i Ang-(1-7) provedena je unutar polja sila ff14SB (Maier i sur., 2015), dok je analog ACCA3 parametriziran pomoću alata *Antechamber* (Wang i sur., 2006), koristeći polje sila GAFF (Wang i sur., 2004) i naboje AM1-BCC (Jakalian i sur., 2002). Za parametrizaciju kationa cinka korišteni su parametri razvijeni u Laboratoriju za biokemiju proteina i molekularno modeliranje Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković. Razvijeni parametri zahtijevaju da se prilikom pripreme sustava u alatu *tleap*, dodaju veze koje kation cinka vežu s ϵ dušikovim atomima s bočnih lanca histidina H450 i H455 te s jednim od dva kisika na bočnom lancu glutamata E508 (slika 6.). Dosljedno tome, posebno pripremljeni parametri korišteni su i za spomenute aminokiselinske ostatke.

Kompleksi su smješteni u simulacijsku ćeliju u obliku krnjeg oktaedra ispunjenog molekulama vode tipa TIP3P (Jorgensen i sur., 1983). Sloj vode oko kompleksa iznosio je barem 14 Å. Kako bi se sustav neutralizirao, sustavu je dodano 25 iona natrija, u slučaju kada je histidin H568 neutralan, odnosno 24 iona kada je histidin H568 protoniran (Joung i Cheatham, 2008).

2.2. Simulacije molekulske dinamike

2.2.1. Optimizacija sustava

Prije samih simulacija molekulske dinamike, potrebno je optimizirati geometriju sustava kako bi se uklonili nepovoljni kontakti. Takvi kontakti mogu dovesti do rušenja simulacije ili ju odvesti u smjeru koji nije realističan (Leach, 2001). Geometrija je optimizirana u tri ciklusa. U prvom ciklusu su kroz 1500 koraka optimizirane molekule otapala dok su atomi cinka i kompleksa bili ukrućeni harmoničkim potencijalom s konstantom sile $32 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$. U drugom optimizacijskom ciklusu (2500 koraka) harmonički potencijal s konstantom sile $1 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ je primijenjen na atome proteinske okosnice, dok su atomi otapala, liganda i cinka bili slobodni u svom kretanju. U posljednjem ciklusu, svi su atomi bili slobodni, a geometrija je optimizirana u 5000 koraka. U sva tri ciklusa optimizacija se u prvih 470 koraka provodila metodom SD a potom se do kraja pojedinog ciklusa koristila metoda CG. Računi uključeni u optimizaciju geometrije provedeni su u okviru računalnog programa *pmemd.cuda.MPI* (Le Grand i sur., 2013) iz programskog paketa AMBER16 (Case i sur., 2016., <http://ambermd.org>) na grafičkom procesoru.

2.2.2. Molekulska dinamika

Uravnoteženje sustava je provedeno u dva koraka. U prvom je sustav zagrijan na 300 K tijekom 100 ps, prilikom čega je korišten *NVT* ansambl. Duljina vremenskog koraka iznosila je 1 fs. Ostatak simulacija proveden je pri konstantnoj temperaturi i tlaku (300 K, 1 atm, *NpT* ansambl). Temperatura je održavana koristeći Langevinov termostat (Grest i Kremer, 1986) s frekvencijom sudara od 1 ps^{-1} , dok je tlak održavan Berendsenovim barostatom (Berendsen i sur., 1984). Kovalentne veze s vodicima su ograničene pomoću algoritma SHAKE. Njegova je primjena dozvolila da vremenski korak tijekom simulacija bude duljine 2 fs. Interakcije dugog doseg određene su metodom PME (Salomon-Ferrer i sur., 2013). Ukupno je provedeno 101 ns simulacija u *NpT* ansamblu za svaki kompleks i za svako protonacijsko stanje (ukupno četiri). Strukture generirane tijekom uravnoteženja (prva nanosekunda) izuzete su iz daljnjih analiza. Koordinate su uzorkovane svakih 1000 koraka (2 ps), a jednakom učestalošću su ispisivani i podaci o sustavu (tlak, temperatura, gustoća, energija i dr.). Računi su provedeni računalnim programom *pmemd.cuda.MPI* iz programskog paketa AMBER16 (Case i sur., 2016) na grafičkim procesorima.

2.3. Račun slobodne energije

Za račun relativne slobodne energije vezanja liganda korištena je skripta pisana programerskim jezikom *Python - MMPBSA.py* (Miller i sur., 2012). Skripta je dostupna u računalnom paketu *AmberTools16*. Prije samog računa pripremljene su topološke datoteke receptora, liganda i kompleksa bez eksplicitnog otapala. Datoteke su pripremljene koristeći skriptu *ante-MMPBSA.py* na temelju topološke datoteke otopljenog kompleksa koja je dobivena prilikom pripreme sustava alatom *tLeap*. Vibracijski doprinos entropiji nije promatran zbog velike zahtjevnosti njegova računa i pretpostavke da je sličan za uspoređivane sustave. Slobodna energija vezanja izračunata je na intervalima u trajanju od 5 ns koji su uzorkovani tijekom 100 ns simulacija MD. Konačna vrijednost dana za pojedini interval je prosječna vrijednost energija izračunatih svako 100 ps (ukupno je 50 vrijednosti izračunato po intervalu). Računi energija MM-PBSA provedeni su pri koncentraciji soli od $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$. Dielektrična konstanta otapala iznosila je 80, dok je dielektrična konstanta unutar proteina postavljena na 2. Brid ćelije iznosio je $0,5 \text{ \AA}$. Napolarni doprinos slobodnoj energiji otapanja određen je pristupom koji uključuje račun doprinosa stvaranja šupljine i disperzijskog člana (Chunhu Tan i sur., 2007).

2.4. Analiza podataka

Važan dio analize bilo je pregledavanje generiranih trajektorija (niz reprezentacija sustava koji je dobiven uzorkovanjem MD simulacija). U tu svrhu sam koristila računalne programe *PyMOL* i *VMD* (Humphrey i sur., 1996). Kako bih okarakterizirala promjene koje se odvijaju tijekom 100 ns simulacija, odlučila sam pratiti nekoliko odrednica geometrije kompleksa, koordinacijski broj cinkova kationa i vodikove veze između proteina i liganda. Svi računi opisani niže u poglavlju provedeni su alatom *cpptraj* (Roe i Cheatham, 2013) koji je dio paketa *AmberTools16*. Svi grafovi generirani su u programu *RStudio* uz korištenje funkcija i naredbi iz paketa *ggplot2*.

2.4.1. Korijen iz srednjeg kvadrata odstupanja

Korijen iz srednjeg kvadrata odstupanja ili RMSD (od engl. *root mean square deviation*) je mjera sličnosti dviju struktura. U ovom radu je parametar RMSD korišten za praćenje promjena u okosnici enzima hDPP III tijekom 100 ns simulacija. RMSD se računa prema formuli:

$$RMSD_j = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_{j,i} - r_{ref,i})^2}$$

U formuli N predstavlja ukupan broj atoma (u ovom slučaju broj atoma okosnice proteina), $r_{j,i}$ predstavlja položaj i -tog atoma u strukturi j -tog vremenskog koraka. Analogno, $r_{ref,i}$ predstavlja položaj i -tog atoma u početnoj, referentnoj strukturi. Osim za okosnicu cjelovitog proteina, račun parametra RMSD je korišten i za praćenje promjena u strukturi pojedinih domena koje su opisane u uvodu rada.

2.4.2. Korijen iz srednjeg kvadrata fluktuacija

Korijen iz srednjeg kvadrata fluktuacija ili RMSF (od engl. *root mean square fluctuation*) ukazuje koliko određena jedinica strukture fluktuirala tijekom vremena simulacije (Bertoša i Mrnjavac, 2015). Pod jedinicom strukture misli se na atom, monomer ili veći dio strukture makromolekule. Vrijednost RMSF po atomu računa se prema formuli:

$$RMSF_i = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{j=1}^T (r_i(t_j) - \tilde{r}_i)^2}$$

U formuli T predstavlja ukupan broj vremenskih koraka, $r_i(j)$ označava položaj i -tog atoma u j -tom vremenskom koraku, a \tilde{r}_i je položaj i -tog atoma u referentnoj, u ovom slučaju početnoj, strukturi. Za protein hDPP III, vrijednost RMSF je izračunata po aminokiselinskom ostatku, a u račun su uključeni samo C_α atomi. Prilikom računa vrijednosti RMSF za ligande, u obzir su uzeti svi teški atomi molekule (vodici nisu uključeni).

2.4.3. Radijus giracije

U biofizici se radijus giracije definira kao srednji kvadrat sume udaljenosti pojedinih atoma od centra mase makromolekule, a služi kao mjera kompaktnosti makromolekule (Bertoša i Mrnjavac, 2015). Manja vrijednost radijusa giracije upućuje na veći stupanj zatvorenosti enzima hDPP III. Radijus giracije računa se prema formuli:

$$R_g = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_i - R_{cm})^2}$$

N označava ukupan broj atoma u molekuli, r_i položaj i -tog atoma molekule, a R_{cm} položaj centra mase molekule. Kao i za izračun vrijednosti RMSD, u račun radijusa giracije uvršteni su samo atomi okosnice enzima.

2.4.4. Udaljenosti parova atoma

Zbog fleksibilnih petlja koje su prisutne u strukturi enzima hDPP III, radijus giracije nije najbolji pokazatelj stupnja zatvorenosti ovog enzima. U literaturi se kao bolji opis stupnja zatvorenosti spominju udaljenosti D186-S500 i Q400-S500 (Tomić i sur., 2015). Slika P2. iz priloga 3 prikazuje ove udaljenosti u slučaju otvorene i zatvorene konformacije enzima hDPP III. Udaljenosti su definirane između C_α atoma odgovarajućih aminokiselinskih ostataka, a praćene su tijekom 100 ns MD simulacija.

Osim za mjerenje stupnja zatvorenosti enzima hDPP III, različite udaljenosti su mjerene i kako bi se pobliže opisala koordinacija kationa cinka, promjene položaja aminokiselinskih ostataka enzima unutar veznog mjesta i razlike u vezanju peptida Ang-(1-7) i ACCA3.

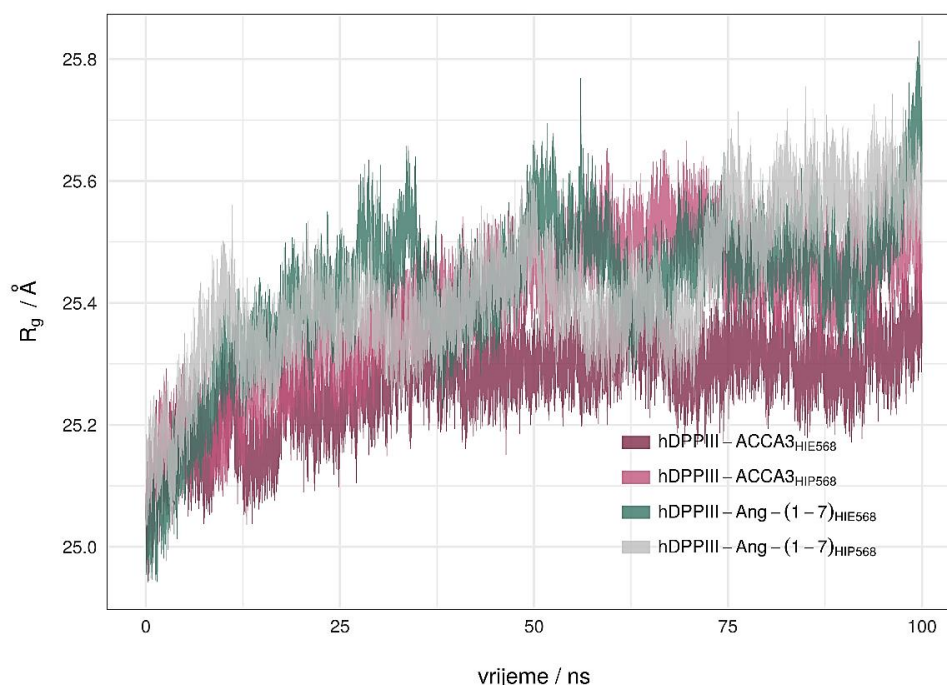
2.4.5. Interakcije proteina i liganada

Vodikove veze između enzima i liganada analizirane su na intervalima duljine 5 ns kroz cijelu duljinu trajektorije. U analizi je maksimalna duljina veze iznosila 3 Å, dok je minimalna vrijednost kuta iznosila 135°. Kako bi se bolje prikazale vodikove veze i ostale interakcije između proteina i liganada, u programu *Maestro* (Schrödinger Release 2018-2: *Maestro*, <https://www.schrodinger.com/maestro>) generirani su 2D grafovi interakcija.

3. Rezultati

3.1. Strukturne i dinamičke odrednice kompleksa

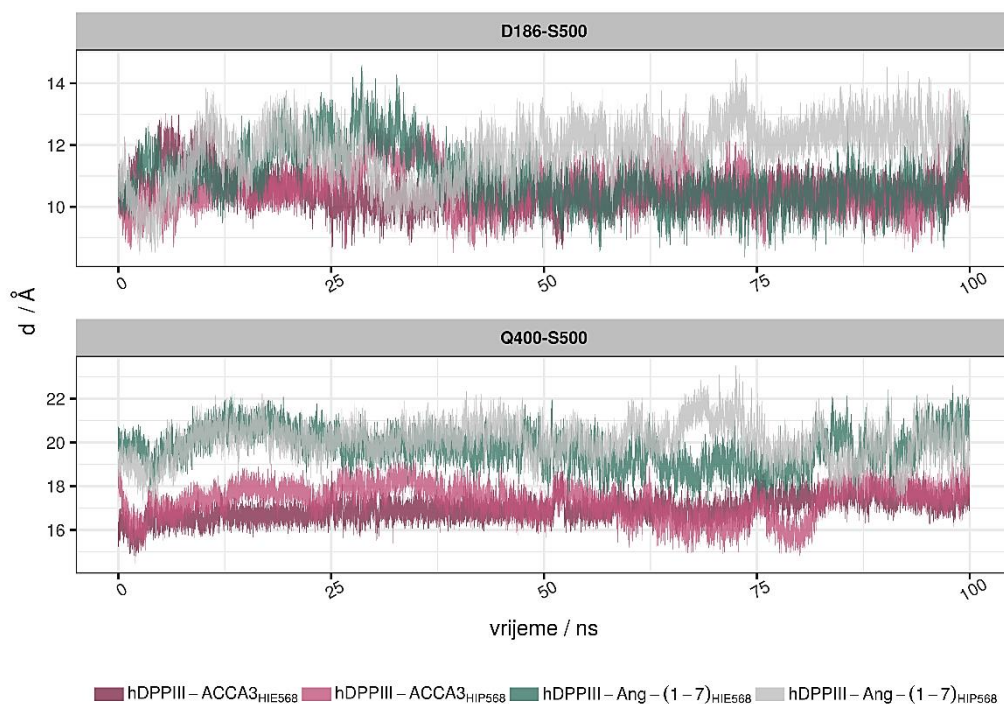
Rezultati analize radijusa giracije (slika 7.) pokazali su da enzim hDPP III ima najmanji radijus giracije tijekom simulacija kompleksa hDPP III-ACCA3_{HIE568}. Tijekom ostalih simulacija dolazi do nešto većeg porasta radijusa giracije, odnosno smanjenja kompaktnosti enzima. Primijećeno je i da je razlika u kompaktnosti između kompleksa s Ang-(1-7) i kompleksa s analogom ACCA3 izraženija u simulacijama s neutralnim histidinom (HIE568) nego s protoniranim histidinom (HIP568). Promjene radijusa giracije dobro su pratile promjene broja molekula vode u međudomenskom prostoru (slika P3.), a najmanje voda je ušlo u međudomenski prostor kompleksa s najnižim radijusom giracije.



Slika 7. Promjene radijusa giracije (R_g) tijekom MD simulacija kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) s angiotenzinom-(1-7) (Ang-(1-7)) i njegovim stabilnim analogom ACCA3. Za svaki kompleks praćene su dvije MD simulacije u kojima se enzimi razlikuju u protonacijskom stanju histidina, H568 – neutralni (HIE568) i protonirani (HIP568).

Kod simulacija s neutralnim histidinom HIE568, opažene su česte promjene udaljenosti D186-S500 u početnom dijelu simulacija (slika 8.), dok je u kasnijim fazama simulacije njezina duljina uglavnom bila unutar intervala 9 – 11 Å. Sličan trend primijećen je i u kompleksu hDPP III-ACCA3_{HIP568}, ali ne i u kompleksu hDPP III-Ang-(1-7)_{HIP568}. U potonjem kompleksu udaljenost D186-S500 se kontinuirano povećavala u intervalu od približno 30. do 85. ns, te je tijekom završnih 15-ak ns MD simulacija poprimala vrijednosti od 12 do 13 Å. Neovisno o

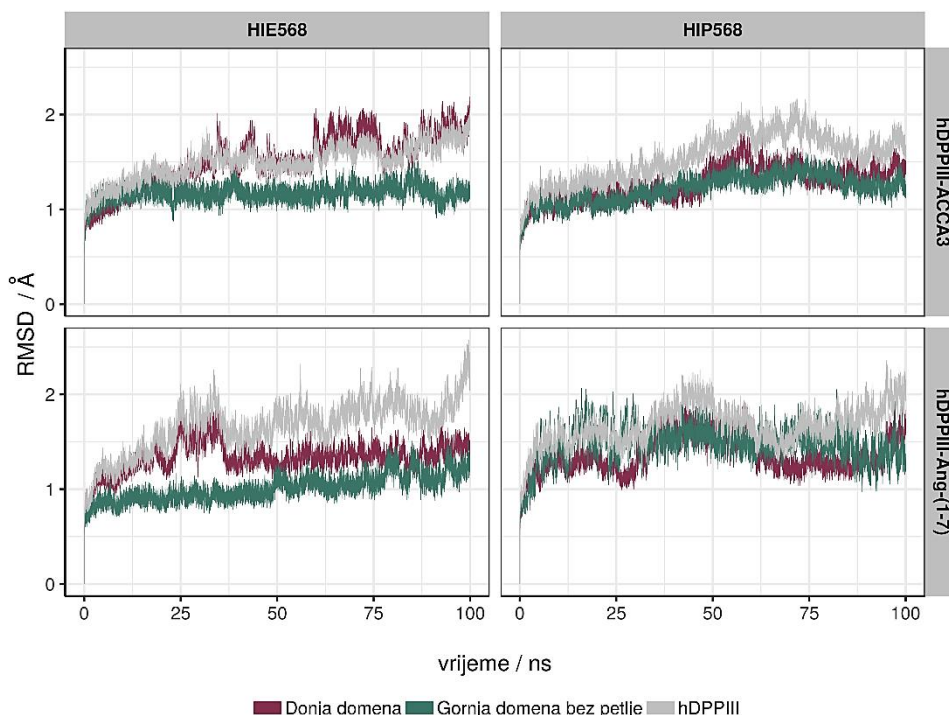
protonacijskom stanju histidina H568, vrijednost udaljenosti Q400-S500 bila je veća u kompleksu hDPP III-Ang-(1-7) nego u kompleksu hDPP III-ACCA3 (slika 8.).



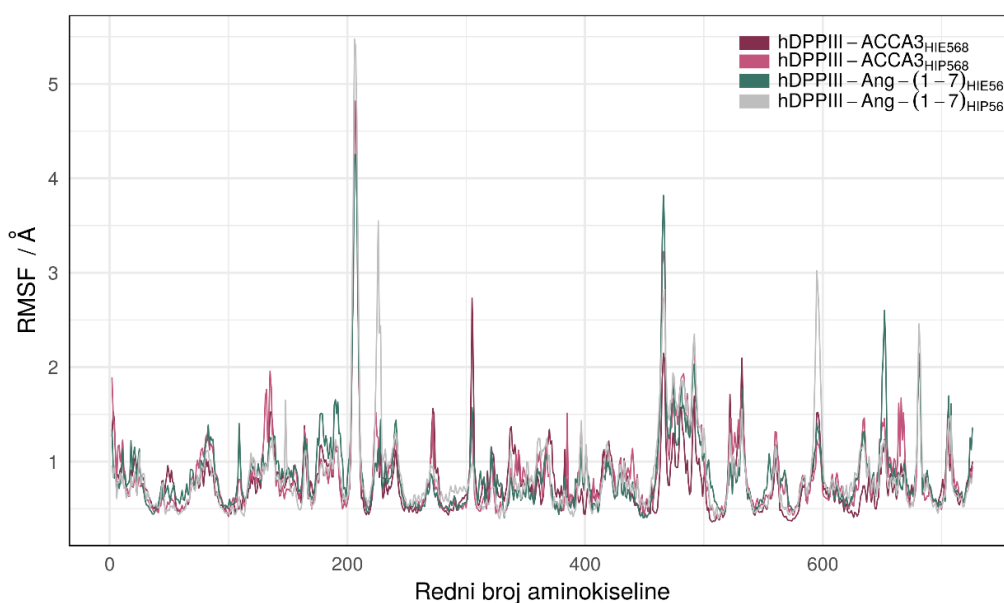
Slika 8. Udaljenosti (d) između C_{α} atoma aminokiselinskih ostataka D186 i S500 te Q400 i S500. Ove dvije udaljenosti predložene su kao mjere odnosa dviju domena i zatvorenosti ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III). Ang-(1-7) označava angiotenzin-(1-7), a ACCA3 njegov stabilni analog. Za svaki kompleks praćene su dvije MD simulacije koje se razlikuju u protonacijskom stanju histidina, H568 – neutralni (HIE568) i protonirani (HIP568).

Slika 9. prikazuje rezultate analize parametra RMSD za protein hDPP III. Promjene vrijednosti RMSD čitavog proteina i pojedinih domena su usporedive, pogotovo u simulacijama s protoniranim histidinom HIP568. U kompleksu hDPP III-ACCA3_{HIE568} struktura donje domene značajnije se mijenjala od strukture gornje domene tijekom završnih 70-ak ns MD simulacija, dok su promjene strukture iste domene u kompleksu hDPP III-Ang-(1-7)_{HIE568} dinamičnije tijekom početnih 40-ak ns. Kako bih detaljnije ispitala pozadinu strukturnih promjena proteina, odlučila sam analizirati razlike u vrijednostima RMSF pojedinog aminokiselinskog ostatka (slika 10.). Najveće vrijednosti, koje se mogu primijetiti kao visoki pikovi, odgovaraju vrijednostima RMSF aminokiselinskih ostataka iz nestrukturiranih petlji proteina hDPP III. Što se tiče aminokiselinskih ostataka iz aktivnog mjesta proteina, nisu primijećene značajnije razlike između dva kompleksa s različitim ligandima. Slika 11. prikazuje strukturu enzima hDPP III s naznačenim aminokiselinskim ostatcima koji su značajnije fluktuirali (imali veće vrijednosti RMSF) tijekom simulacija kompleksa s Ang-(1-7) (zeleno), odnosno kompleksa s ACCA3 (ljubičasto). Istaknuti su samo

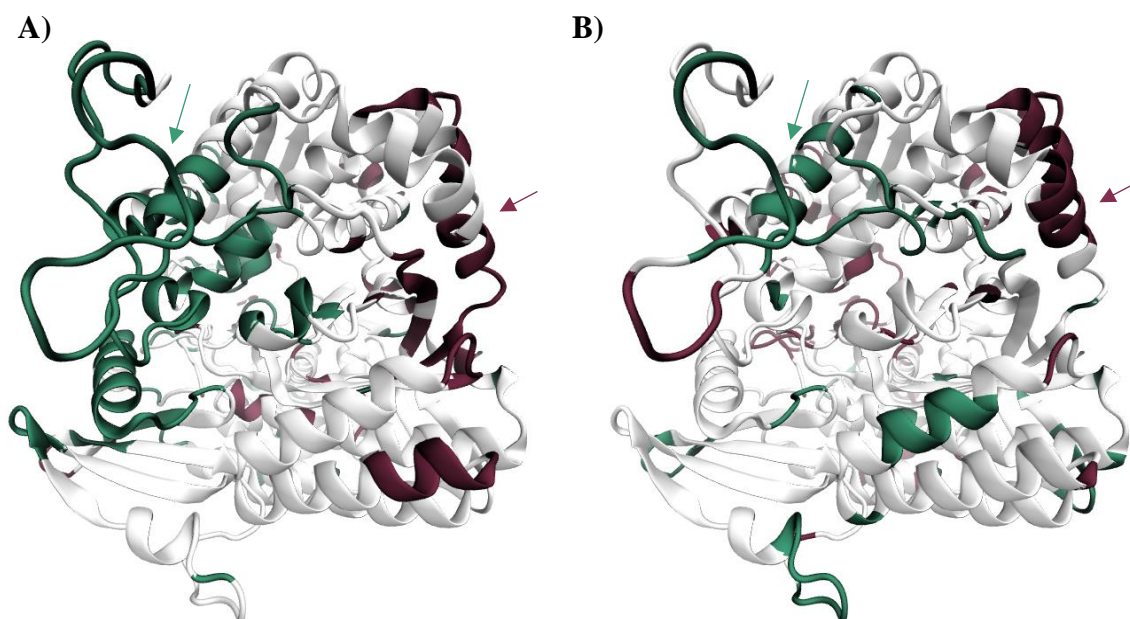
aminokiselinski ostatci enzima, čija je razlika u vrijednostima RMSF između dva različita kompleksa bila veća od srednje vrijednosti razlika svih aminokiselinskih ostataka.



Slika 9. Korijen iz srednjeg kvadrata odstupanja (RMSD) strukture čitavog proteina ljudske dipeptidil-peptidaze (hDPP III) i njegovih pojedinačnih domena. Promjene vrijednosti RMSD praćene su tijekom MD simulacija kompleksa hDPP III s angiotenzinom-(1-7) (Ang-(1-7)) i njegovim stabilnim analogom ACCA3. Za svaki kompleks praćene su dvije MD simulacije u kojima se enzimi razlikuju u protonacijskom stanju histidina, H568 – neutralni (HIE568) i protonirani (HIP568).



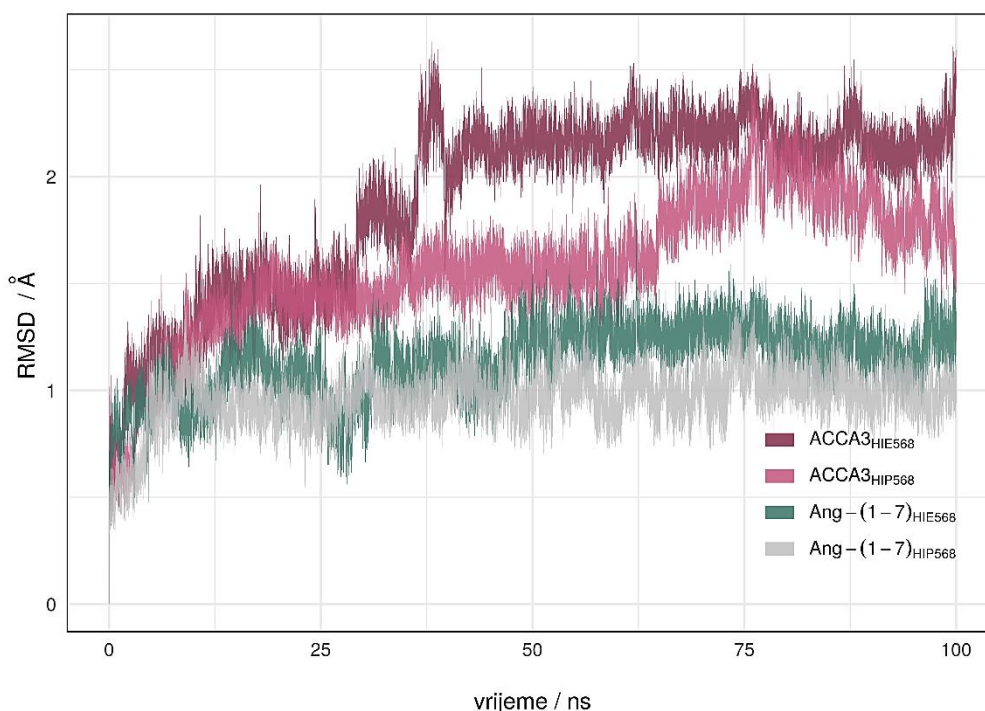
Slika 10. Korijeni iz srednjih kvadrata fluktuacija (RMSF) aminokiselinskih ostataka ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) izračunati za 100 ns MD simulacija kompleksa hDPP III s angiotenzinom-(1-7) (Ang-(1-7)) i njegovim stabilnim analogom ACCA3. Za svaki kompleks razmotrena su dva stanja histidina, H568 – neutralni (HIE568) i protonirani (HIP568).



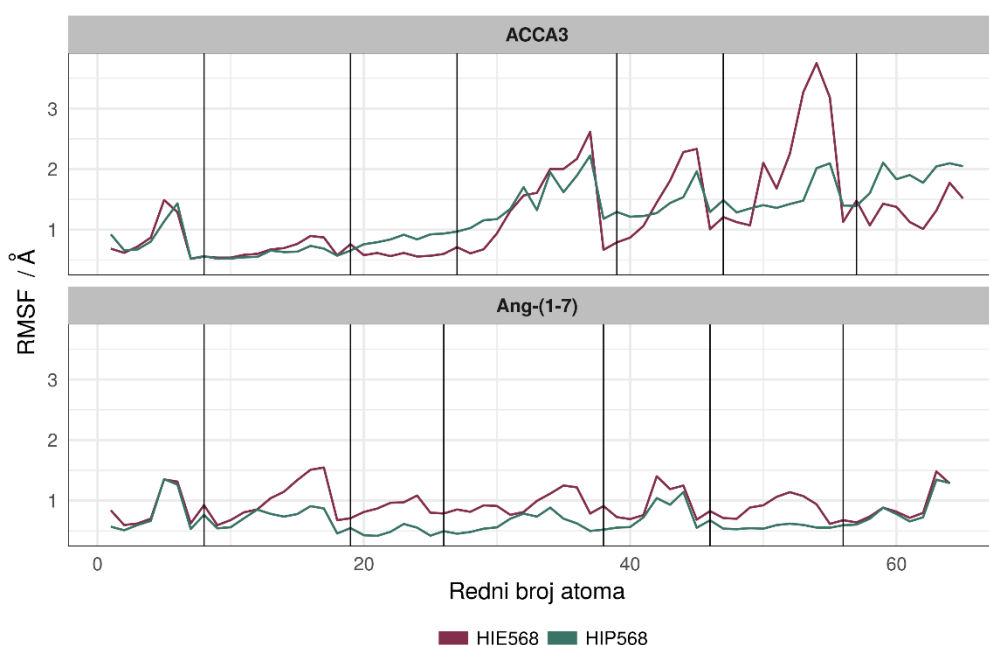
Slika 11. Aminokiselinski ostatci ljudske dipeptidil-peptidaze (hDPP III), čije se vrijednosti RMSF razlikuju ovisno o ligandu s kojim je enzim hDPP III simuliran u kompleksu. **A)** Simulacije s neutralnim histidinom H568. **B)** Simulacije s protoniranim histidinom H568. Zeleno su naznačeni ostatci koji značajnije fluktuiraju u kompleksu s angiotenzinom-(1-7) (Ang-(1-7)), a ljubičasto oni koji značajnije fluktuiraju u kompleksu sa stabilnim analogom ACCA3. Prikazani su samo ostatci čija je razlika u fluktuiranju veća od prosječne razlike svih aminokiselinskih ostataka enzima hDPP III. Strelicama su naznačeni dijelovi kod kojih je isti trend primijećen neovisno o protonacijskom stanju histidina H568.

Zanimljivo je da su neovisno o protonacijskom stanju histidina H568, aminokiselinski ostatci tzv. „ETGE“ fleksibilne petlje i zavojnice, koja pripada gornjoj domeni i nalazi se iznad ulaza u međudomensku pukotinu, jače fluktuirali tijekom simulacija kompleksa hDPP III-Ang-(1-7) (zeleni strelica na slici 11.), dok su aminokiselinski ostatci zavojnice koja povezuje dvije domene sa stražnje strane (ljubičasti strelica na slici 11.) značajnije fluktuirali u kompleksu hDPP III-ACCA3.

RMSD analiza liganada (slika 12.) pokazala je da unutar veznog mjesta analog ACCA3 prolazio kroz veće strukturne promjene nego Ang-(1-7), neovisno o protonacijskom stanju histidina H568. Uz vrijednosti RMSD praćene su i vrijednosti RMSF atoma liganada, uz iznimku atoma vodika (slika 13.). Može se primijetiti da su aminokiselinski ostatci analoga ACCA3 na položajima P2'-P5' fluktuirali više nego prve tri aminokiseline s N-kraja, što je posebice bilo primjetno za histidin na položaju P4' kada se analog ACCA3 nalazio unutar kompleksa, čiji je histidin H568 bio neutralan. Usporedba početne i konačne strukture trajektorije (slika 14.) pruža dobar uvid u pozadinu rezultata dobivenih analizom vrijednosti RMSD i RMSF liganada.

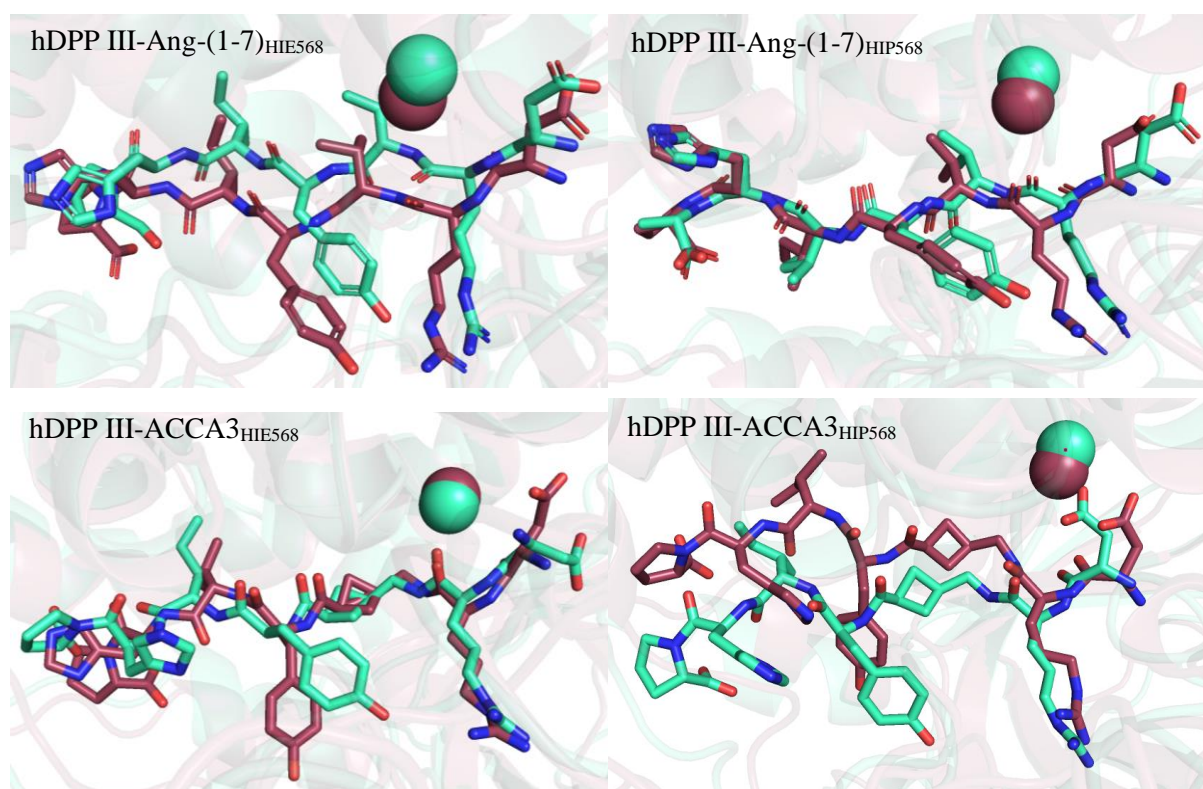


Slika 12. Korijen iz srednjeg kvadrata devijacija (RMSD) liganada vezanih u kompleksu s ljudskom dipeptidil-peptidazom III (hDPP III). Ang-(1-7) označava angiotenzin-(1-7), a ACCA3 njegov stabilni analog. Za svaki kompleks praćene su dvije MD simulacije u kojima se enzimi razlikuju u protonacijskom stanju histidina, H568 – neutralni (HIE568) i protonirani (HIP568).



Slika 13. Korijeni iz srednjih kvadrata fluktuacije (RMSF) atoma liganada izračunati za 100 ns MD simulacija kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze (hDPP III) s angiotenzinom-(1-7) (Ang-(1-7)) i njegovim stabilnim analogom ACCA3. Za svaki kompleks razmotrena su dva stanja histidina, H568 – neutralni (HIE568) i protonirani (HIP568). Vertikalne linije razgraničavaju atome koji pripadaju različitim aminokiselinama, a podudaraju se s rednim brojem kisika okosnice. Atomi su navedeni redoslijedom (N-C_α-atomi bočnog ogranka-C-O), a vrijednosti RMSF atoma vodika nisu prikazane.

Položaji aminokiselinskih ostataka Ang-(1-7) ostali su više-manje očuvani tijekom simulacija, što je posebno uočljivo kad je histidin H568 bio protoniran. U slučaju neutralnog histidina H568 došlo je do blagog pomicanja Ang-(1-7), dok je orijentacija bočnih ogranaka ostala poprilično očuvana (slika 14.). Strukturne promjene analoga ACCA3 su izraženije od onih za Ang-(1-7). Kod simulacija s neutralnim histidinom HIE568 konformacija okosnice analoga ACCA3 uglavnom je očuvana, ali ne i konformacija bočnih ogranaka. Tako se, na primjer, uslijed rotacije oko veze C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$, položaj bočnog ogranaka histidina na položaju P4' značajno promijenio. Tijekom simulacija kompleksa hDPP III-ACCA3_{HIP568} došlo je do rotacije okosnice liganda uslijed ulaska karboksilne skupine aspartata na položaju P2 u prvu koordinacijsku sferu iona cinka. Nadalje, može se primijetiti kako su tijekom simulacija aminokiselinski ostatci peptida ACCA3 na položajima P2'-P5' podliježali značajnijim strukturnim promjenama nego preostala tri neovisno o protonacijskom stanju histidina H568.



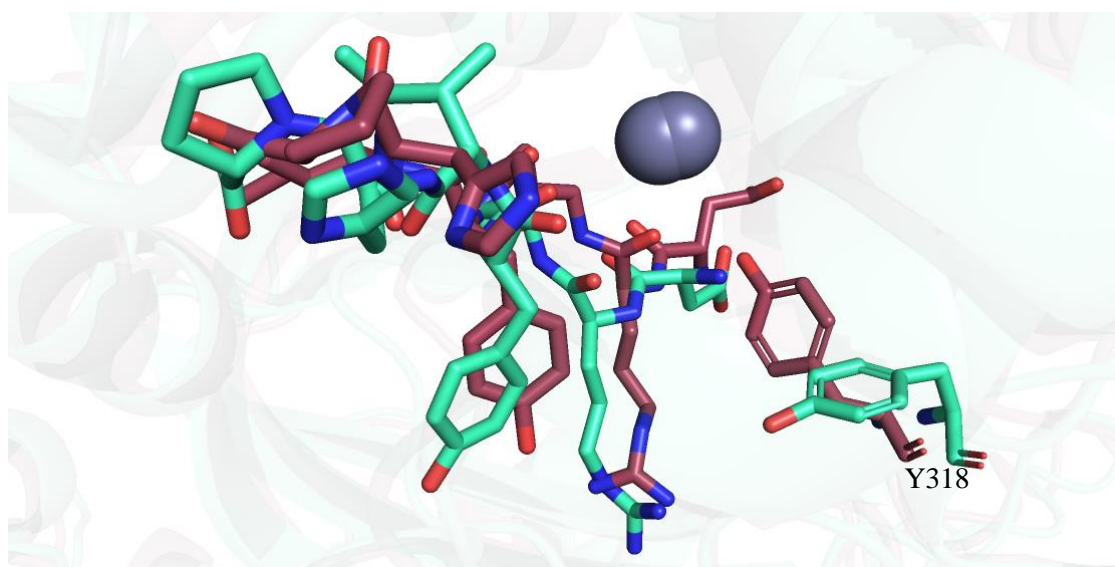
Slika 14. Pozicioniranje liganda u veznom mjestu ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) u prvoj i posljednjoj točki trajektorije, koja je dobivena uzorkovanjem MD simulacija kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) s angiotenzinom-(1-7) (Ang-(1-7)) i njegovim stabilnim analogom ACCA3. Za svaki kompleks praćene su dvije MD simulacije u kojima se enzimi razlikuju u protonacijskom stanju histidina, H568 – neutralni (HIE568) i protonirani (HIP568). Ljubičasto su označeni ugljikovi atomi liganda u prvoj, a zeleno u posljednjoj točki trajektorije. Analogno tome obojene su i sfere koje predstavljaju ion cinka. Slike su napravljene u programu *PyMOL*.

3.2. Karakterizacija aktivnog mjesta

Prilikom vizualizacije trajektorija primijećene su razlike u ponašanju i položaju aminokiselinskih ostataka E451, Y318 i H568 u kompleksima s različitim ligandima. Zbog eksperimentalno dokazane važnosti E451, Y318 i H568, te kako bi se što bolje okarakterizirale primijećene razlike između kompleksa s Ang-(1-7) i kompleksa s analogom ACCA3, praćen je položaj ta tri aminokiselinska ostatka tijekom simulacija.

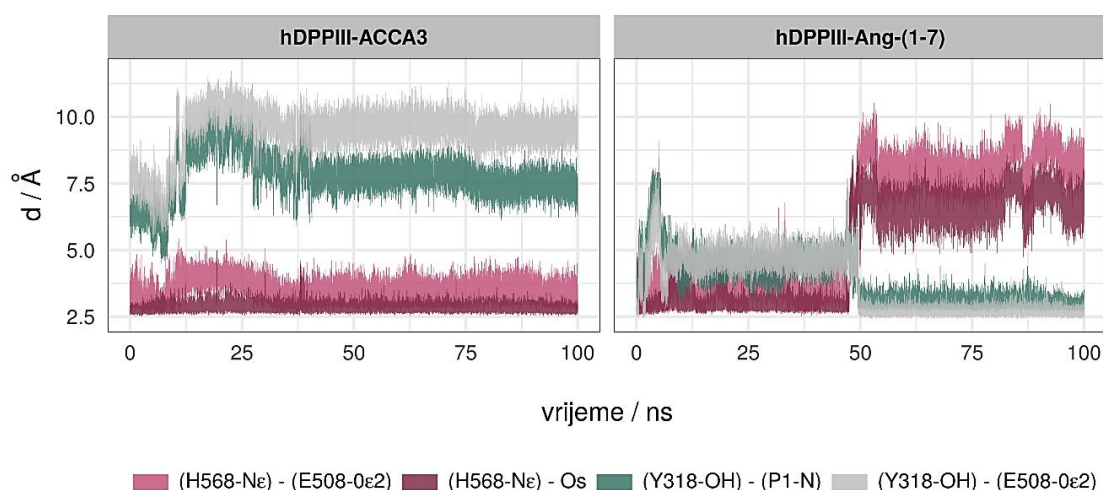
3.2.1. Simulacije s neutralnim histidinom H568 (HIE568)

Najprimjetnija razlika između simulacija kompleksa enzima hDPP III s različitim ligandima zabilježena je u položaju tirozina Y318. Naime, već tijekom uravnoteženja kompleksa s analogom ACCA3 došlo je do pomaka tirozina Y318 iz početnog položaja, u blizini dušika okosnice arginina (P1-N), prema bočnom lancu arginina na položaju P1 (slika 15.). U novom položaju tirozin Y318 je povremeno ostvarivao vodikovu vezu s okolnim molekulama vode i gvanidijevom skupinom arginina, koji se nalazi na položaju P1 analoga ACCA3. Tirozin Y318 se zadržao u tome položaju tijekom čitave MD simulacije kompleksa hDPP III-ACCA3, dok njegovo približavanje bočnom lancu arginina Ang-(1-7) nije primijećeno.



Slika 15. Položaj tirozina Y318 unutar kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) sa stabilnim analogom angiotenzina-(1-7) (ACCA3). Kod simulacija u kojima je histidin H568 enzima bio u neutralnom stanju, bočni lanac tirozina Y318 pomiče se prema bočnom lancu arginina analoga ACCA3. Ljubičasto su označeni ugljikovi atomi liganda i tirozina Y318 prije pomaka, a zeleno ugljikovi atomi liganda i tirozina Y318 nakon pomaka tirozina Y318 iz početnog položaja. Siva sfera predstavlja kation cinka. Slika je napravljena u programu *PyMOL*.

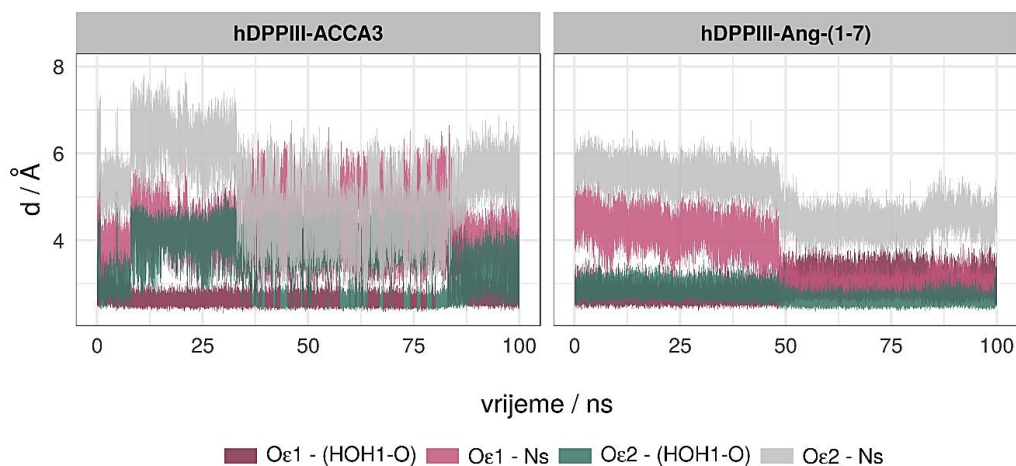
Praćene su udaljenosti kisika bočnog lanca tirozina Y318 (Y318-OH) od kisika bočnog lanca glutamata E508, koji nije vezan na cinkov dikation (E508-O ϵ 2), i dušika iz okosnice arginina liganada (P1-N), a rezultati su prikazani na slici 16. Vidljivo je da unutar kompleksa hDPP III-ACCA3, tirozin Y318 ostaje daleko od E508-O ϵ 2 i P1-N. U kompleksu hDPP III-Ang-(1-7) te su udaljenosti bile znatno manje, a do dodatnog približavanja je došlo u drugoj polovici simulacija. Iz usporede udaljenosti, koje su prikazane desno na slici 16., može se vidjeti da je ovo približavanje potaknuto odmicanjem histidina H568 iz aktivnog mjesta. Naime, na početku simulacije imidazolski prsten histidina H568 nalazi se u blizini kisika uz peptidnu vezu koja se hidrolitički cijepa (Os). Oko 45. ns došlo je do rotacije histidina H568 oko veze C α -C β čime se njegova odaljenost od kisika Os povećala (desno na slici 16.). S druge strane, u kompleksu hDPP III-ACCA3, imidazolski prsten histidina H568 ostaje u blizini kisika Os tijekom čitave simulacije (lijevo na slici 16.). Tijekom simulacija uočena je česta rotacija glutamata E508 oko veze C γ -C δ kojom se kisik E508-O ϵ 2 približava i ponovno udaljava od imidazolskog prstena histidina H568 (slika 16.), pri čemu povremeno nastaju i vodikove veze.



Slika 16. Udaljenosti (d) atoma dušika bočnog lanca histidina H568 (H568-N ϵ) i kisika bočnog lanca tirozina Y318 (Y318-OH) od dušika okosnice arginina na položaju P1 (P1-N) i kisika bočnog lanca glutamata E508 koji nije vezan za cink u pripremi sustava (E508-O ϵ 2). Udaljenosti su praćene tijekom 100 ns MD simulacija kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) s angiotenzinom-(1-7) (Ang-(1-7)) i njegovim stabilnim analogom ACCA3, tijekom kojih je histidin H568 enzima bio u neutralnom stanju.

Iz rezultata na slici 17. (desno), očito je da je odmicanje dušika H568-N ϵ od kisika Os, kod simulacija kompleksa s Ang-(1-7) (slika 16, desno), rezultiralo i dodatnim smanjenjem udaljenosti O ϵ glutamata E451 od dušika peptidne veze koja se hidrolitički cijepa (Ns), što je rezultiralo nastajanjem vodikove veze. Ostvarenje ove veze nije primijećeno kod simulacija kompleksa hDPP III-ACCA3 (lijevo na slici 17.). Unutar ovog kompleksa katalitički glutamat

E451 je jače fluktuirao i uglavnom stvarao samo jednu vodikovu vezu s molekulom vode koja koordinira ion cinka, HOH1, dok je u simulacijama kompleksa hDPP III-Ang-(1-7), glutamat E451 često uspostavljao čak dvije vodikove veze s vodom HOH1 (slika 17.).



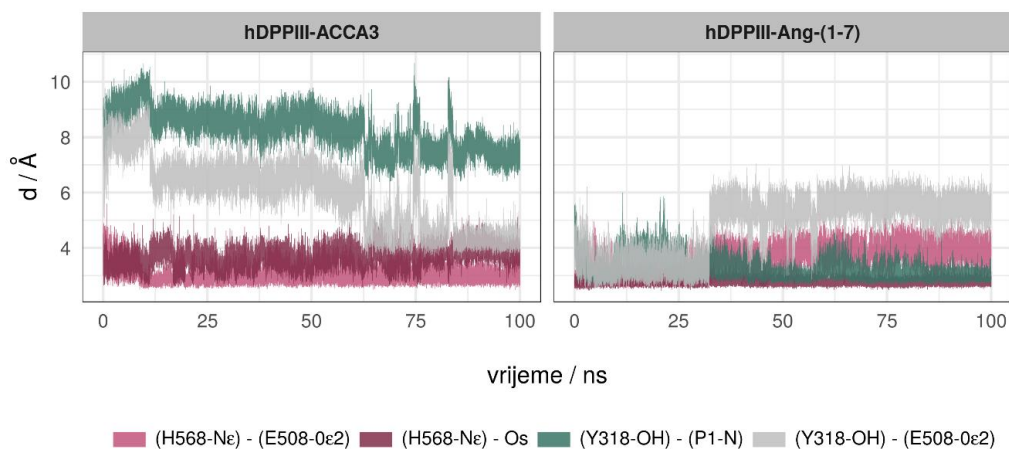
Slika 17. Udaljenosti (d) kisika vode, koja sudjeluje u hidrolizi peptidne veze, (HOH1-O) i dušika veze koja se hidrolitički cijepa (Ns) od kisikovih atoma bočnog lanca glutamata E451 ($O_{\epsilon 1}$ i $O_{\epsilon 2}$). Udaljenosti su praćene tijekom 100 ns MD simulacija kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) s angiotenzinom-(1-7) (Ang-(1-7)) i njegovim stabilnim analogom ACCA3, tijekom kojih je histidin H568 enzima bio u neutralnom stanju.

Praćenje udaljenosti kisika HOH1 od karbonilnog ugljika (Cs) veze, koju ista voda nukleofilno napada, prikazano je na slici P4. A. Srednja vrijednost te udaljenosti nije se značajno razlikovala između kompleksa s različitim ligandima ($3,337 \pm 0,205 \text{ \AA}$ za kompleks s Ang-(1-7), odnosno $3,220 \pm 0,249 \text{ \AA}$ za kompleks s analogom ACCA3).

3.2.2. Simulacije s protoniranim histidinom H568 (HIP568)

Neovisno o vezanom ligandu, protonacija histidina H568 značajno je utjecala na izgled aktivnog mjesta enzima hDPP III. Tako katalitički nepovoljna rotacija histidina H568 oko veze C_{α} - C_{β} , nije primijećena ni u jednom od simuliranih kompleksa. Histidin H568 ostaje u aktivnom mjestu, a njegov atom N_{δ} povremeno stvara vodikovu vezu s kisikom bočnog lanca ili okosnice glutamina Q566 unutar kompleksa hDPP III s analogom ACCA3, odnosno Ang-(1-7). Atom H568- N_{ϵ} zadržava se bliže kisiku O_{ϵ} unutar kompleksa s Ang-(1-7) nego unutar kompleksa s analogom ACCA3 (slika 18.). Tijekom vizualizacije primijećeno je da se kisik E508- $O_{\epsilon 2}$ povremeno približavao imidazolskom prstenu histidina H568. Usporedbom udaljenosti atoma E508- $O_{\epsilon 2}$ i H568- N_{ϵ} u različitim kompleksima (slika 18.), može se primijetiti da je kisik E508- $O_{\epsilon 2}$ više vremena proveo u blizini dušika H568- N_{ϵ} kod simulacija

kompleksa s analogom ACCA3, te da dolazi do povezivanja atoma H568-N ϵ i E508-O ϵ 2 vodikovom vezom.

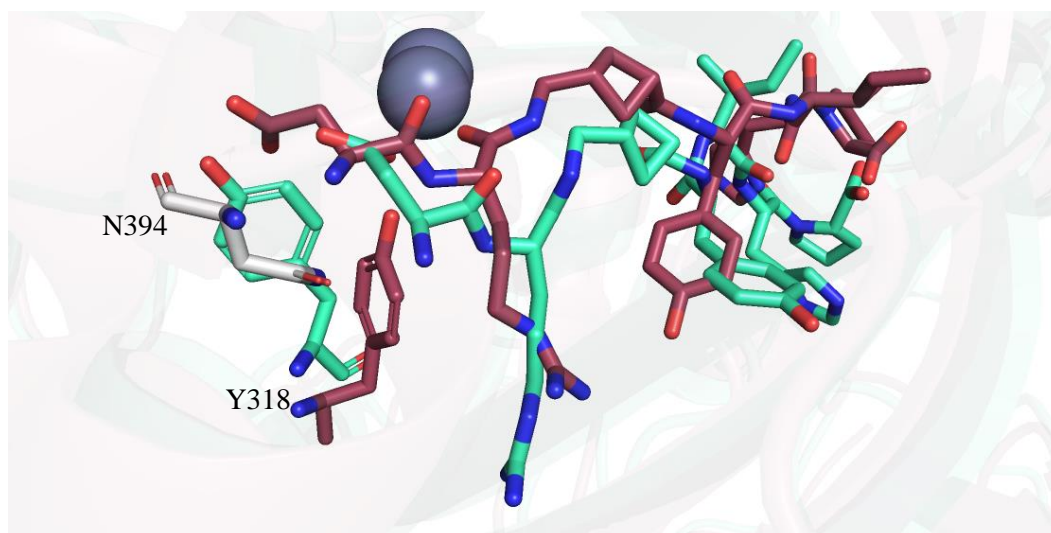


Slika 18. Udaljenosti (d) atoma dušika bočnog lanaca histidina H568 (H568-N ϵ) i kisika bočnog lanca tirozina Y318 (Y318-OH) od dušika okosnice arginina na položaju P1 (P1-N) i kisika bočnog lanca glutamata E508 koji nije vezan za cink u pripremi sustava (E508-O ϵ 2). Udaljenosti su praćene tijekom 100 ns MD simulacija kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) s angiotenzinom-(1-7) (Ang-(1-7)) i njegovim stabilnim analogom ACCA3, tijekom kojih je histidin H568 enzima bio u protoniranom stanju.

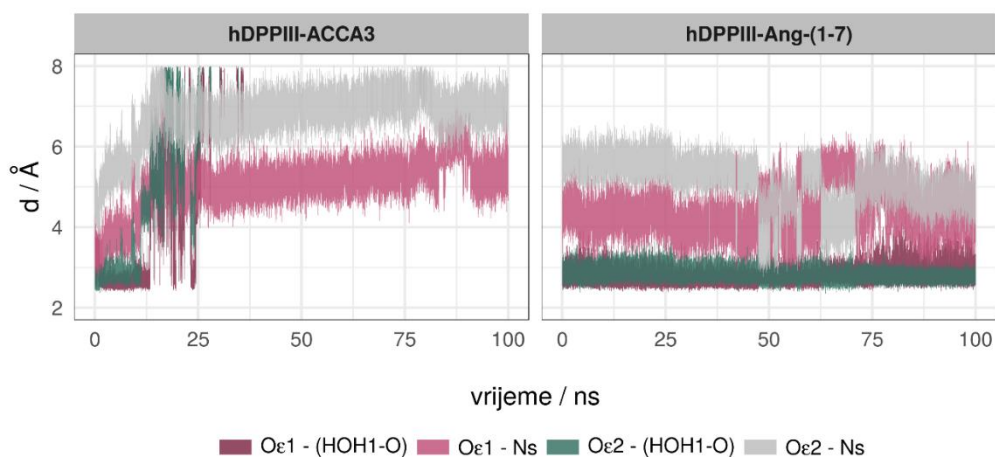
Nadalje, zapaženo je da se kisik Y318-OH u kompleksu hDPP III-Ang-(1-7) zadržava u blizini dušika P1-N tijekom čitave simulacije, ali ne i u blizini kisika E508-O ϵ 2 (slika 18., desno). Zanimljivo je da je ponovno uočen odmak tirozina Y318 iz aktivnog mjesta kompleksa hDPP III-ACCA3, ali ovoga puta ne prema bočnom lancu arginina na položaju P1, već prema kisiku okosnice asparagina N394 (slika 19.). U tome položaju tirozin Y318 ostvaruje vodikove veze sa spomenutim kisikom asparagina N394 i okolnim molekulama vode. U posljednjih 40-ak ns MD simulacije uočeno je približavanje kisika bočnih lanaca tirozina Y318 i glutamata E508 (lijevo na slici 18.). Tijekom ove faze simulacije kisik Y318-OH se više približio kisiku E508-O ϵ 1, dok E508-O ϵ 2 ostaje vezan vodikovom vezom za dušik H568-N ϵ . S druge strane, približavanje atoma Y318-OH i P1-N nije primijećeno tijekom simulacija kompleksa s analogom ACCA3 (slika 18., lijevo).

U odnosu na simulacije s neutralnim histidinom HIE568, primijećene su i razlike u ponašanju glutamata E451 i vode HOH1. Najveća promjena je odlazak vode HOH1 iz aktivnog mjesta kompleksa hDPP III-ACCA3, u kojem je primijećena i puno veća udaljenost kisika bočnog lanca glutamata E451 od dušika N ϵ (slika 20., lijevo). U kompleksu s Ang-(1-7) te su udaljenosti bile manje, no nije primijećeno nastajanje vodikove veze (desno na slici 20.), kao što je to bilo u slučaju simulacije s neutralnim histidinom HIE568 (slika 17., desno). Tijekom simulacija kompleksa s Ang-(1-7) udaljenost ugljika C δ od kisika vode HOH1 nije se značajno

razlikovala od one u simulacijama s neutralnim histidinom HIE568 (slika P4.), a njezina srednja vrijednost je iznosila $3,326 \pm 0,261$ Å. S druge strane, u kompleksu s analogom ACCA3 ova je udaljenost bila značajno povećana čak i tijekom dijela simulacije u kojem voda HOH1 koordinira ion cinka, te je u tom periodu iznosila $4,268 \pm 0,328$ Å.



Slika 19. Položaj tirozina Y318 unutar kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) sa stabilnim analogom angiotenzina-(1-7) (ACCA3). Kod simulacija u kojima je histidin H568 enzima u protoniranom stanju, bočni lanac tirozina Y318 se nalazi izvan aktivnog mjesta enzima, ali ne na istom položaju kao što je slučaj u simulacijama s neutralnim histidinom H568. Ljubičasto su označeni ugljikovi atomi liganda i tirozina Y318 prije pomaka, a zeleno ugljikovi atomi liganda i tirozina Y318 nakon pomaka tirozina Y318 iz početnog položaja. Siva sfera predstavlja kation cinka, a radi boljeg isticanja sivo su označeni ugljikovi atomi asparagina N394 s čijim kisikom okosnice tirozina Y318 stvara vodikovu vezu u novom položaju. Slika je pripravljena u programu *PyMOL*.



Slika 20. Udaljenosti (d) kisika vode, koja sudjeluje u hidrolizi peptidne veze, (HOH1-O) i dušika iz veze koja se hidrolitički cijepa (Ns) od kisikovih atoma bočnog lanca glutamata E451 (O ϵ 1 i O ϵ 2). Udaljenosti su praćene tijekom 100 ns MD simulacija kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) s angiotenzinom-(1-7) (Ang-(1-7)) i njegovim stabilnim analogom ACCA3, tijekom kojih je histidin H568 enzima bio u protoniranom stanju.

3.3. Koordinacija kationa cinka

Prilikom vizualizacije trajektorija uočeni su atomi koji tijekom 100 ns koordiniraju kation cinka. Srednje udaljenosti atoma liganada od metalnog iona dane su u tablici 2. zajedno s njihovim standardnim devijacijama. Aminokiselinski ostatci H450, H455 i E508, koji su vezani za kation cinka tijekom pripreme sustava, stabilno sudjeluju u koordinaciji tijekom svih izvedenih simulacija. Uz molekulu HOH1 primijećena je i pojava druge molekule vode u koordinaciji metalnog kationa (HOH2). Praćenjem udaljenosti tih atoma i cinka određeni su svi oblici koordinacije metala prisutni tijekom MD simulacija, te je određena njihova učestalost (tablice 3. i 4.). Ukoliko je udaljenost cinka i nekog atoma bila $\leq 2,5 \text{ \AA}$, pretpostavljeno je da taj atom sudjeluje u koordinaciji u danoj točki trajektorije.

Tablica 2. Srednje udaljenosti (\bar{d}) atoma od kationa cinka i njihove standardne devijacije (sd) tijekom MD simulacija kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) s angiotenzinom-(1-7) (Ang-(1-7)) i njegovim stabilnim analogom ACCA3. Za svaki kompleks promatrano je neutralno (HIE568) i protonirano (HIP568) stanje histidina H568, a praćene su udaljenosti samo onih atoma koji tijekom pojedine simulacije u nekom trenutku koordiniraju ion cinka.

Atom	HIE568				HIP568			
	hDPP III- Ang-(1-7)		hDPP III- ACCA3		hDPP III- Ang-(1-7)		hDPP III- ACCA3	
	\bar{d} (Å)	sd (Å)	\bar{d} (Å)	sd (Å)	\bar{d} (Å)	sd (Å)	\bar{d} (Å)	sd (Å)
E508-O ϵ 1	1,904	0,058	1,908	0,059	1,917	0,066	1,951	0,059
E508-O ϵ 2	2,505	0,183	2,361	0,151	2,548	0,198	2,579	0,154
H450-N ϵ	2,034	0,056	2,045	0,056	2,042	0,059	2,090	0,056
H455-N ϵ	2,022	0,057	2,038	0,057	2,031	0,059	2,060	0,055
E451-O ϵ 1	-	-	-	-	4,170	0,558	3,522	0,472
E451-O ϵ 2	-	-	-	-	3,633	1,062	2,236	0,440
HOH1-O	2,211	0,090	2,196	0,103	2,200	0,099	2,242	0,106
HOH2-O*	2,287	0,096	-	-	2,251	0,095	-	-
Os	4,484	0,393	3,157	0,733	4,480	0,438	7,069	0,495
P2-O ϵ 1	-	-	-	-	-	-	3,598	0,782
P2-O ϵ 2	-	-	-	-	-	-	2,956	0,775

* u račun su uzete u obzir isključivo udaljenosti za vrijeme koordinacije ($\leq 2,5 \text{ \AA}$)

3.3.1. Simulacije s neutralnim histidinom H568 (HIE568)

Neovisno o tome s kojim ligandom je protein hDPP III vezan u kompleks, njegov kation cinka najčešće je bio koordiniran s pet, a najrjeđe s četiri atoma (tablica 3.). Koordinacijski broj šest bio je učestaliji kod simulacija kompleksa s Ang-(1-7), dok su koordinacijski brojevi četiri i pet bili zastupljeniji u simulacijama kompleksa hDPP III-ACCA3 (tablica 3.). Nedugo nakon početka simulacija kompleksa hDPP III-Ang-(1-7), u koordinacijsku sferu kationa cinka uz već postojeću molekulu HOH1, ušla je i druga molekula vode (HOH2), a nakon odmicanja

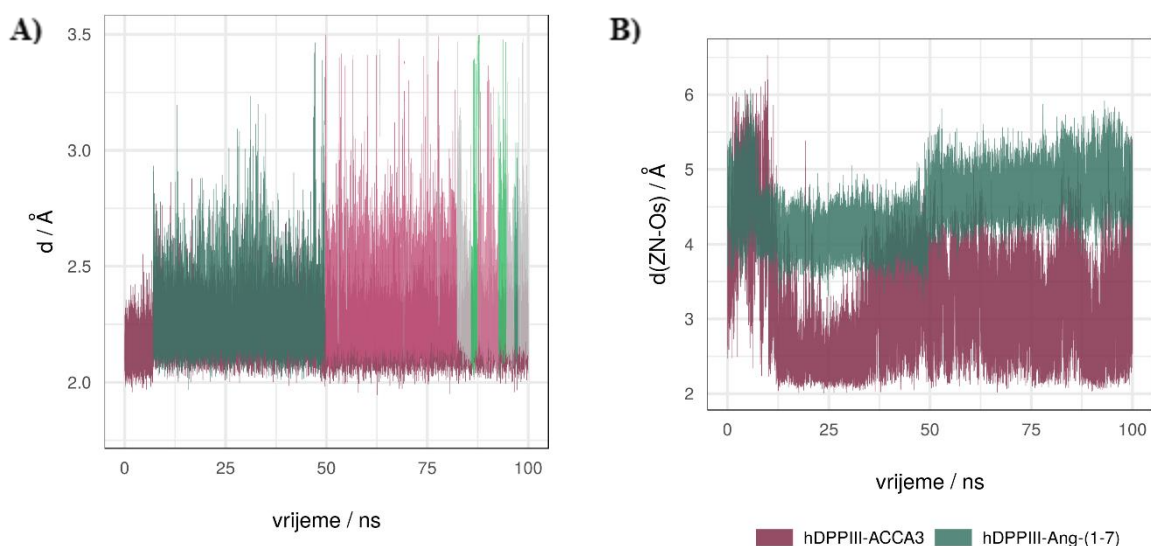
histidina H568 iz početnog položaja, zapaženo je učestalije izmjenjivanje voda na tom veznom mjestu (slika 22. A), dok je molekula HOH1 koordinirala cink tijekom čitave simulacije.

Tablica 3. Oblici koordinacije kationa cinka tijekom MD simulacija kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III), pri čemu je histidin H568 bio neutralan, s angiotenzinom-(1-7) (Ang-(1-7)) i njegovim stabilnim analogom ACCA3. Za svaki oblik koordinacije dan je i pripadajući vremenski udio njegove prisutnosti. N predstavlja koordinacijski broj, a znak „+“ sudjelovanje atoma u koordinaciji. Slova „m“ i „b“ označuju monodentatno, odnosno bidentatno koordiniranje kationa cinka. Brojem 2 je naznačeno ukoliko dvije molekule vode sudjeluju u koordinaciji.

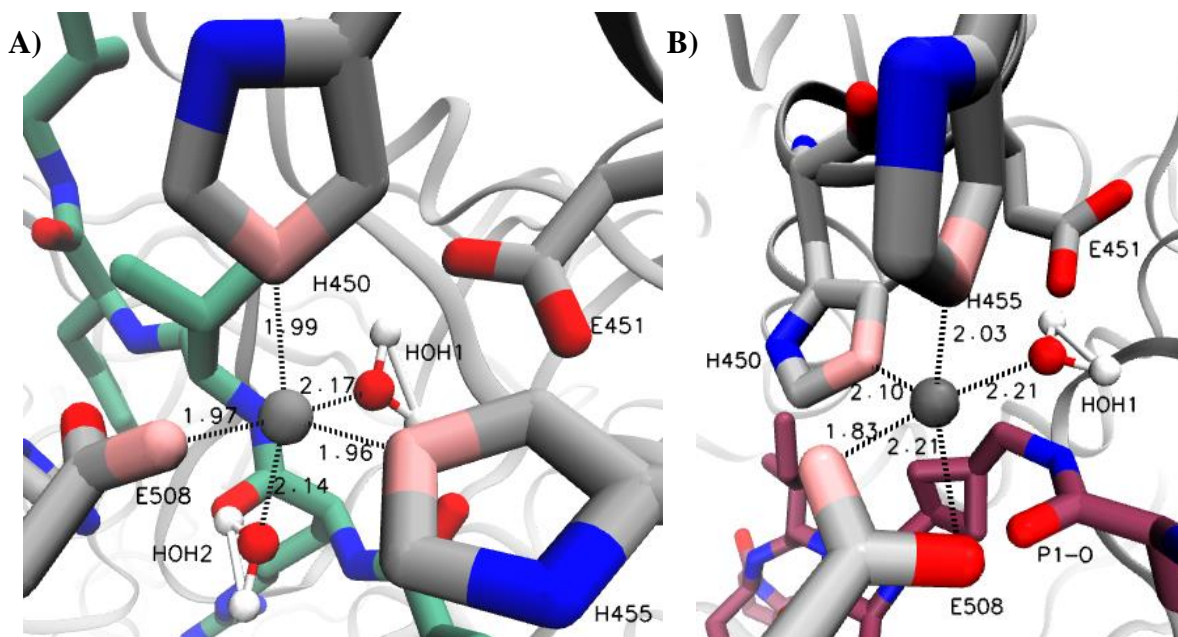
N	Os	H450	H455	E508	Voda	Vremenski udio (%)	
						hDPP III-ACCA3	hDPP III-Ang-(1-7)
6	+	+	+	b	+	13,18	0
6	-	+	+	b	2	0	37,5
5	-	+	+	b	+	66,98	13,74
5	+	+	+	m	+	8,9	0
5	+	+	+	b	-	0,9	0
5	-	+	+	m	2	0	44,38
4	-	+	+	m	+	9,62	4,36
4	+	+	+	m	-	0,24	0
4	-	+	+	b	-	0,18	0,02

Iako s ukupnom učestalošću manjom od 2 %, kod simulacija kompleksa hDPP III-ACCA3, primijećena su tri oblika koordinacije u kojima ne sudjeluje molekula HOH1 (tablica 3.), a pojava molekule HOH2 u koordinaciji cinkovog kationa nije primijećena. U istom kompleksu uočeno da kisik Os liganda povremeno sudjeluje u koordinaciji metalnog kationa, dok tijekom simulacija kompleksa hDPP III-Ang-(1-7) ni u jednom trenutku nije zabilježena koordinacija cinka ligandom (slika 22. B).

Iz tablice 3. vidljivo je da je u koordinaciji metalnog kationa glutamat E508 češće sudjelovao s oba kisika bočnog lanca (bidentatno) nego s jednim (monodentatno), dok je razlika u zastupljenosti ta dva oblika manja za kompleks hDPP III-Ang-(1-7) (cca 51 % i 49 % vremena) nego za kompleks hDPP III-ACCA3 (cca 81 % i 19 % vremena). Najučestaliji oblici koordinacije kationa cinka za pojedini kompleks prikazani su na slici 22.



Slika 21. Udaljenost (d) kationa cinka od: **A)** atoma kisika različitih molekula vode koje sudjeluju u koordinaciji cinka tijekom simulacija kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) s angiotenzinom-(1-7) (Ang-(1-7)), **B)** kisika okosnice dva različita liganda (angiotenzina-(1-7) i njegovog stabilnog analoga ACCA3). Riječ je o kisiku koji se nalazi pokraj veze koja se cijepa tijekom katalize (Os).



Slika 22. Najzastupljeniji oblici koordinacije kationa cinka tijekom simulacija kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) s **A)** angiotenzinom-(1-7) (Ang-(1-7)) i **B)** njegovim stabilnim analogom ACCA3, pri čemu je histidin H568 neutralan. Slika je napravljena u računalnom programu *VMD* (Humphrey i sur., 1996). Radi boljeg razlikovanja, ugljikovi atomi proteina označeni su sivom, dok su ugljikovi atomi liganda označeni zeleno, odnosno ljubičasto. Tamo siva sfera predstavlja kation cinka.

3.3.2. Simulacije s protoniranim histidinom H568 (HIP568)

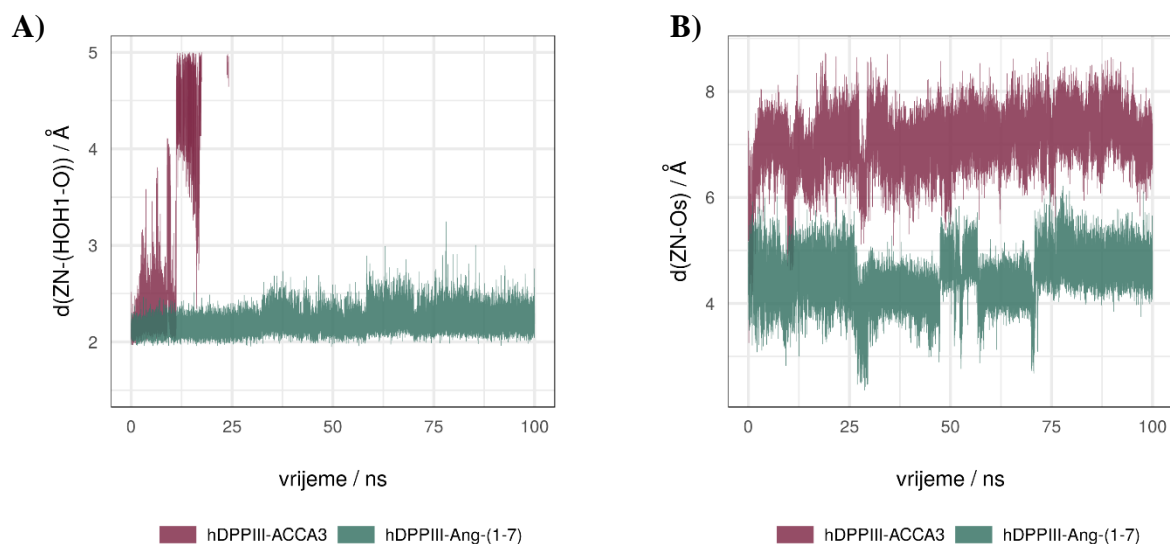
Rezultati iz tablice 4. pokazuju da je, u slučaju kompleksa hDPP III-Ang-(1-7), protonacija histidina H568 dovela do značajnog smanjenja učestalosti koordinacijskog broja šest i povećanja učestalosti koordinacijskih brojeva četiri i pet. S druge strane, u kompleksu hDPP III-ACCA3 protonacija histidina H568 vodi k povećanju učestalosti koordinacijskog broja četiri i šest, nauštrb smanjenja zastupljenosti koordinacijskog broja pet. U simulacijama kompleksa hDPP III-Ang-(1-7) ponovno se mogla uočiti pojava molekule HOH2 u koordinaciji (cca 22 % vremena, tablica 4.), ali puno rjeđe nego u slučaju kada je histidin H568 neutralan (cca 82 % vremena, tablica 3.).

Tablica 4. Oblici koordinacije kationa cinka tijekom MD simulacija kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III), pri čemu je histidin H568 bio protoniran, s angiotenzinom-(1-7) (Ang-(1-7)) i njegovim stabilnim analogom ACCA3. Za svaki oblik koordinacije dan je i pripadajući vremenski udio njegove prisutnosti. N predstavlja koordinacijski broj, a znak „+“ sudjelovanje atoma u koordinaciji. Slova „m“ i „b“ označuju monodentatno, odnosno bidentatno koordiniranje kationa cinka. Brojem 2 je naznačeno ukoliko dvije molekule vode sudjeluju u koordinaciji.

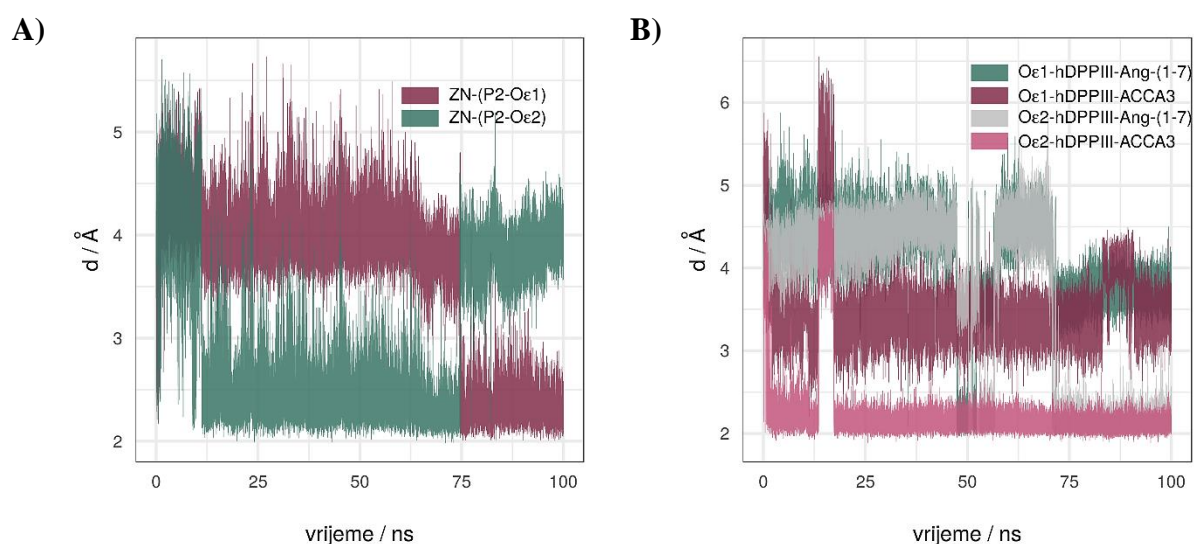
N	P2 - Oε	Os	H450	E451	H455	E508	Voda	Vremenski udio (%)	
								hDPP III-ACCA3	hDPP III-Ang-(1-7)
6	m	-	+	-	+	b	+	0,06	0
6	-	-	+	m	+	b	+	1,0	3,02
6	m	-	+	m	+	b	-	17,64	0
6	m	-	+	b	+	m	-	0,04	0
6	-	+	+	-	+	b	+	0	0,02
6	-	-	+	-	+	b	2	0	5,68
5	-	-	+	-	+	b	+	0,84	31,96
5	-	-	+	m	+	m	+	7,12	33,3
5	-	-	+	m	+	b	-	6,9	0,08
5	m	-	+	m	+	m	-	49,02	0
5	m	-	+	-	+	b	-	1,44	0
5	-	-	+	-	+	m	2	0	16,04
4	-	-	+	-	+	m	+	0,58	9,54
4	-	-	+	m	+	m	-	12,94	0,34
4	-	-	+	-	+	b	-	1,62	0
4	m	-	+	-	+	m	-	0,56	0
3	-	-	+	-	+	m	-	0,24	0,02

U kompleksu hDPP III-ACCA3 dolazi do potpunog izbacivanja molekule HOH1 iz koordinacijske sfere cinka na samom početku MD simulacija (slika 23. A). Tijekom simulacija s protoniranim histidinom HIP568, osim u iznimno kratkom vremenskom intervalu (cca 0,02 % vremena), Ang-(1-7) ne sudjeluje u koordinaciji metalnog iona (slika 23. B) i nalazi se na

približno istoj udaljenosti od njega kao i u prethodnim simulacijama (4 – 5,5 Å). Za razliku od Ang-(1-7), analog ACCA3 koordinira ion cinka tijekom više od 2/3 simulacijskog vremena, pri čemu se koordinacija ostvaruje preko karboksilne skupine aspartata na položaju P2. Udaljenosti kisika karboksilne skupine aspartata na položaju P2 (P2-Oε) prikazane su na slici 24. A, te se može uočiti izmjena atoma kisika u koordinaciji cinka.



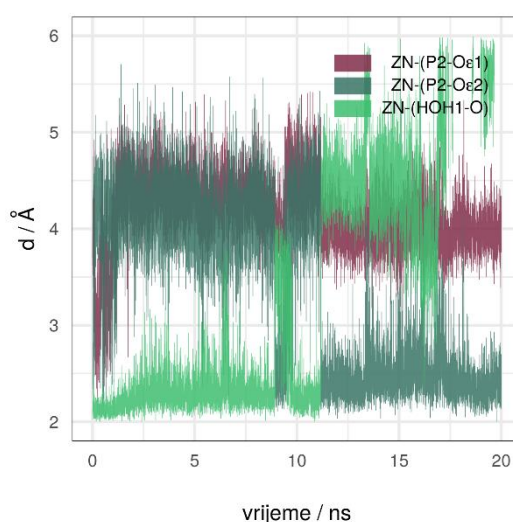
Slika 23. Udaljenost (d) kationa cinka od: **A)** molekule vode koja sudjeluje u njegovoj koordinaciji, **B)** kisika liganda koji se nalazi pokraj peptidne veze koju enzym cijepa. Udaljenosti su praćene tijekom 100 ns MD simulacija kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) s angiotenzinom-(1-7) (Ang-(1-7)) i njegovim stabilnim analogom ACCA3, pri čemu je histidin H568 protoniran.



Slika 24. **A)** Udaljenosti (d) između kationa cinka i kisika bočnog lanca aspartata na položaju P2 stabilnog analoga angiotenzina-(1-7) (ACCA3). **B)** Udaljenosti (d) kationa cinka od kisika bočnog ogranka katalitičkog glutamata E451 tijekom 100 ns MD simulacija kompleksa enzima ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) s angiotenzinom-(1-7) (Ang-(1-7)) i njegovim stabilnim analogom ACCA3, pri čemu je histidin H568 protoniran.

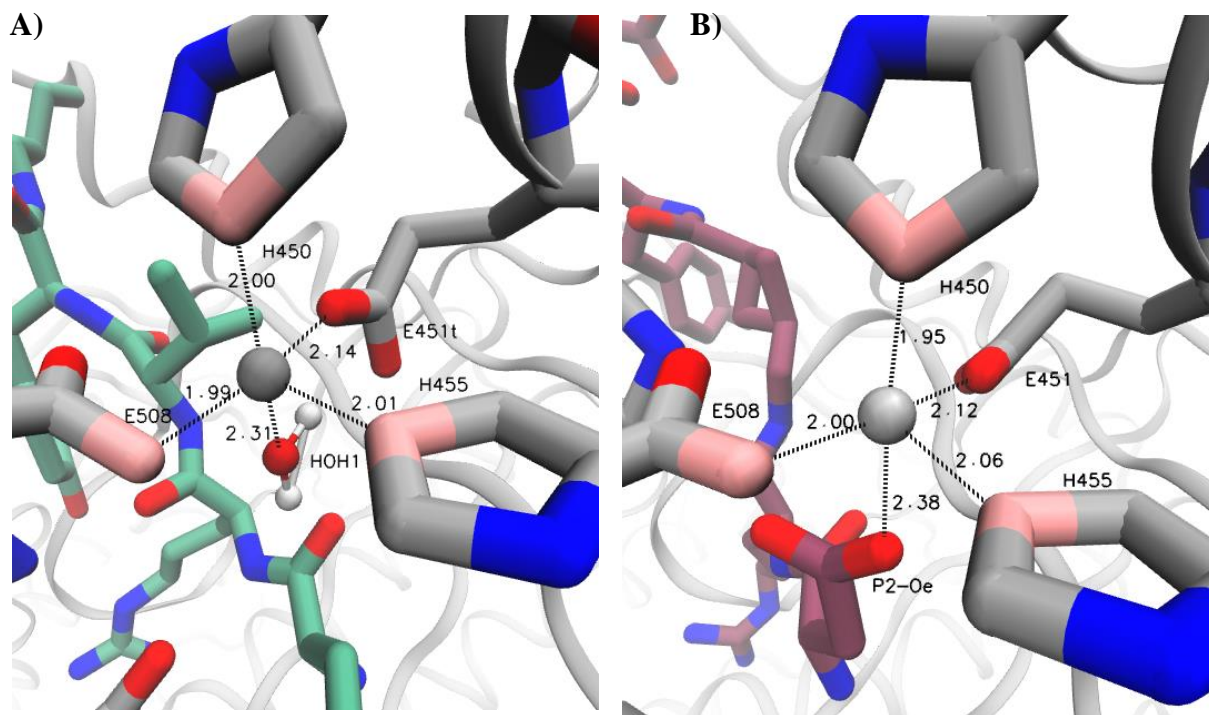
Novina kod simulacija s protoniranim histidinom HIP568 je i sudjelovanje kisika bočnog lanca katalitičkog glutamata E451 u koordinaciji metalnog iona, pri čemu je taj oblik koordinacije bio učestaliji tijekom simulacija kompleksa s analogom ACCA3 nego s Ang-(1-7) (cca 95 %, odnosno 37 % simulacijskog vremena), a prisutan je i prije izlaska vode HOH1 iz koordinacije (slika 24.).

Udaljenosti kisika molekule HOH1 i kisika P2-O ϵ od metalnog kationa tijekom početne faze MD simulacija kompleksa hDPP III-ACCA3 prikazane su na slici 25. Uočava se da kisici aspartata na položaju P2 kompetitiraju s kisikom molekule HOH1 za mjesto u koordinacijskoj ljusci metala.



Slika 25. Udaljenost (d) kationa cinka od kisika bočnog lanca aspartata na položaju P2 stabilnog analoga angiotenzina-(1-7) (ACCA3). Prikazane su udaljenosti tijekom prvih 20 ns MD simulacija kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) s peptidom ACCA3 za vrijeme kojih je histidin H568 enzima bio protoniran.

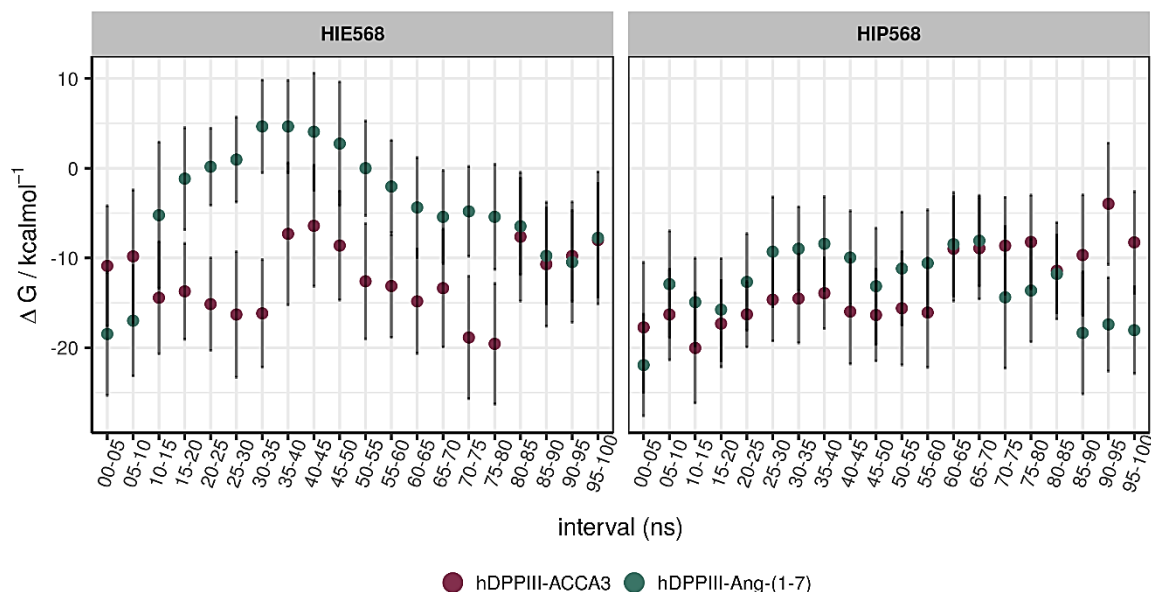
Protonacija histidina H568 utjecala je na ponašanje kisika bočnog lanca glutamata E508. Tako je u odnosu na simulacije s neutralnim histidinom HIE568 došlo do promjene odnosa zastupljenosti monodentatnog i bidentatnog koordiniranja cinka. Za oba kompleksa glutamat E508 je češće u koordinaciji sudjelovao monodentatno nego bidentatno što je suprotno rezultatima simulacija s neutralnim histidinom HIE568. S druge strane, razlika u zastupljenosti ta dva oblika ponovno je manja za kompleks hDPP III-Ang-(1-7) (cca 59 % i 41 % vremena, tablica 4.) nego za kompleks hDPP III-ACCA3 (cca 70 % i 30 % vremena, tablica 4.). Na slici 26. prikazani su najučestaliji oblici koordinacije kationa cinka tijekom simulacija kompleksa.



Slika 26. Najzastupljeniji oblici koordinacije kationa cinka tijekom simulacija kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) s **A)** angiotenzinom-(1-7) (Ang-(1-7)) i **B)** njegovim stabilnim analogom ACCA3, pri čemu je histidin H568 protoniran. Slika je napravljena u računalnom programu *VMD* (Humphrey i sur., 1996). Radi boljeg razlikovanja, ugljikovi atomi proteina označeni su sivom, dok su ugljikovi atomi liganda označeni zeleno, odnosno ljubičasto. Tamo siva sfera predstavlja kation cinka.

3.4. Slobodna energija vezanja liganda

Slika 27. prikazuje rezultate izračuna slobodne energije vezanja liganda metodom MM-PBSA. Dinamičnije promjene u iznosu slobodne energije vezanja primijećene su tijekom simulacija s neutralnim histidinom HIE568 nego tijekom simulacija s protoniranim histidinom HIP568. Može se primijetiti i kako je u simulacijama s neutralnim histidinom HIE568 postojala veća razlika u energiji vezanja između kompleksa hDPP III-Ang-(1-7) i hDPP III-ACCA3 nego što je slučaj kod simulacija s protoniranim histidinom HIP568. Srednje vrijednosti slobodne energije za svaki kompleks i svako protonacijsko stanje histidina H568 dane su u tablici 5. Neovisno o protonacijskom stanju histidina H568, kompleks hDPP III-ACCA3 ima nižu srednju energiju MM-PBSA nego kompleks hDPP III-Ang-(1-7), ali je u slučaju protoniranog histidina H568 razlika bila zanemariva, štoviše, najniža energija kompleksa s Ang-(1-7) niža je od najniže energije MM-PBSA kompleksa s analogom ACCA3 i što je važnije, uočena je stabilizacija hDPP III-Ang-(1-7) kompleksa u završnoj fazi simulacija.



Slika 27. Kretanje iznosa slobodne energije vezanja MM-PBSA (ΔG) izračunate na intervalima od po 5 ns tijekom 100 ns MD simulacija kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) s angiotenzinom-(1-7) (Ang-(1-7)) i njegovim stabilnim analogom ACCA3. Za svaki kompleks ispitana su dva različita stanja protonacije histidina, H568 – neutralni (HIE568) i protonirani (HIP568).

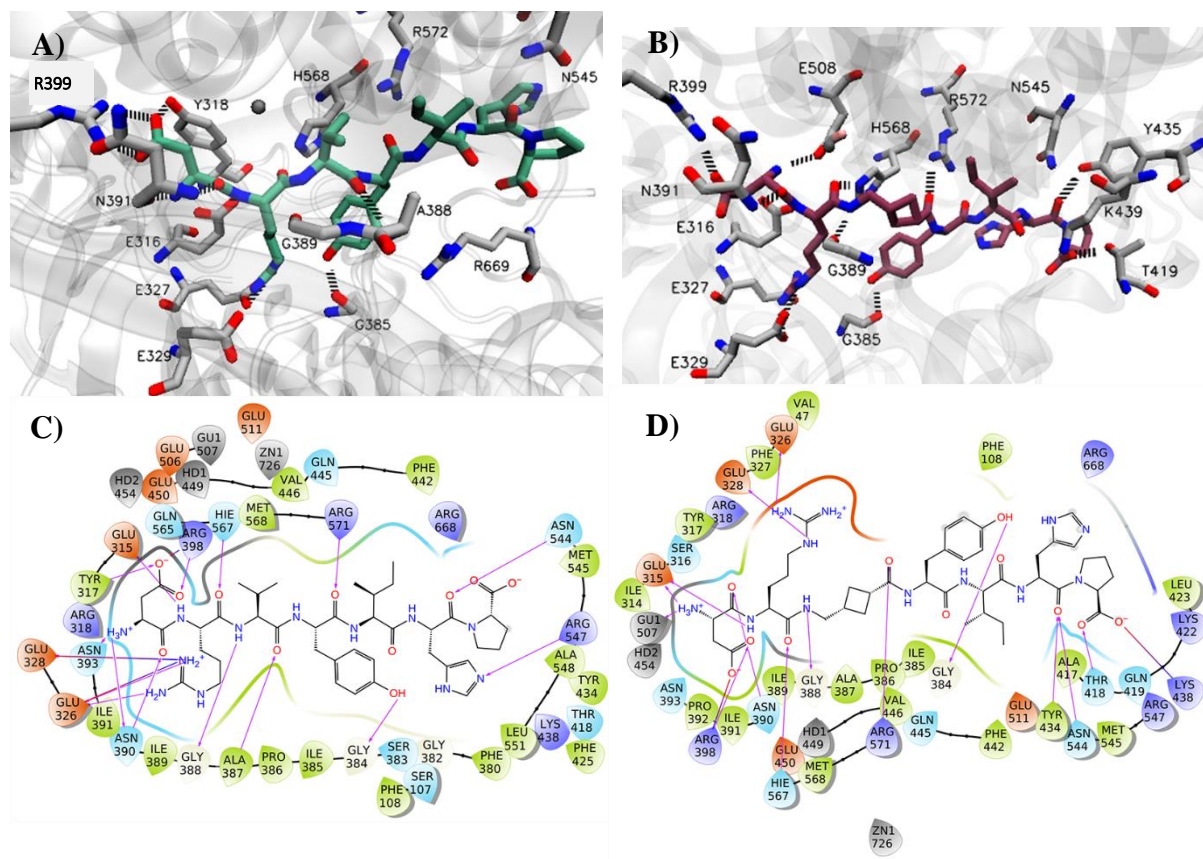
Tablica 5. Srednje vrijednosti i standardne devijacije 20 slobodnih energija vezanja liganda izračunatih metodom MM-PBSA na intervalima od 5 ns, uzorkovanih tijekom 100 ns MD simulacija kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) s angiotenzinom-(1-7) (Ang-(1-7)) i njegovim stabilnim analogom ACCA3. Za oba kompleksa ispitana su dva različita stanja protonacije histidina, H568 – neutralni (HIE568) i protonirani (HIP568)

Kompleks	H568	$\Delta G_{\text{MM-PBSA}}$ (kcal mol ⁻¹)	<i>sd</i> (kcal mol ⁻¹)
hDPP III-ACCA3	HIE568	-12,4	3,8
hDPP III-ACCA3	HIP568	-13,1	4,3
hDPP III-Ang-(1-7)	HIE568	-4,1	6,5
hDPP III-Ang-(1-7)	HIP568	-13,0	3,9

3.5. Interakcije proteina i liganada

Iz intervala s najnižim slobodnim energijama MM-PBSA izdvojene su strukture s najvećim brojem međumolekulskih vodikovih veza. Prikazi interakcija liganada s enzimom hDPP III dani su na slikama 28. i 29, a zastupljenost pojedinih vodikovih veza, koje su bile ostvarene tijekom intervala s najnižim slobodnim energijama MM-PBSA, dana je u tablicama P2. i P3. Zamjena valina s aminokiselinom ACCA u slijedu Ang-(1-7) narušila je mogućnost ostvarivanja vodikove veze s kisikom okosnice alanina A388 iz β -vrpce veznog mjesta enzima. Umjesto toga, kisik aminokiselinskog ostatka ACCA stvarao je vrlo stabilne vodikove veze s dušicima bočnog lanca arginina R572 (slike 28. i 29.). Bočni lanac arginina R572 sudjelovao je i u vezanju Ang-(1-7), ali je tom slučaju vodikovu vezu ostvarivao s kisikom okosnice

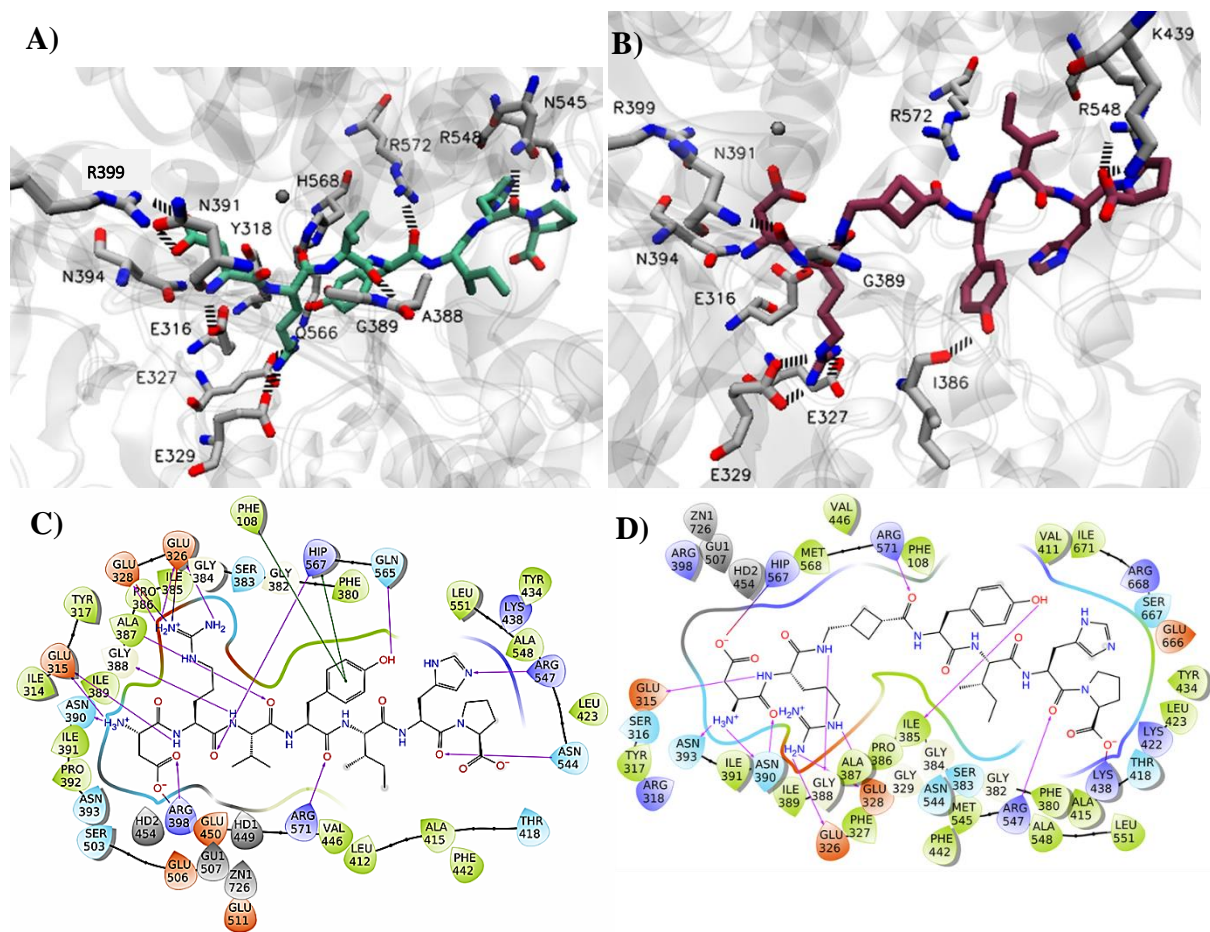
tirozina na položaju P2'. Ista veza uočena je i prilikom vezanja analoga ACCA3, ali je na svim promatranim intervalima bila manje stabilna od već opisane veze arginina R572 s aminokiselinom ACCA.



Slika 28. Međumolekulske interakcije unutar kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III), čiji je histidin H568 neutralan, s **A,C**) angiotenzinom-(1-7) (Ang-(1-7)) i **B,D**) njegovim stabilnim analogom ACCA3. Na trodimenzionalnom prikazu (**A** i **B**), koji je napravljen u programu *VMD*, iscrtane linije označavaju međumolekulske vodikove veze, a štapićastim modelom prikazani su ligandi i aminokiselininski ostatci enzima koji tijekom intervala s minimalnom energijom MM-PBSA ostvaruju vodikovu vezu s ligandom u više od 15 % struktura. Dvodimenzionalni graf interakcija (**C** i **D**) pripremljen je u programu *Maestro*. Ljubičaste strelice prikazuju vodikove veze, a crveno-plave označavaju značajne elektrostatske interakcije. Numeracija aminokiselininskih ostataka enzima razlikuje se između 2D i 3D prikaza ($n_{3D}=n_{2D}+1$).

Od ostalih interakcija liganada s β -vrpcom enzima ističe se vodikova veza između dušika aminokiseline na položaju P1 (valin ili ACCA) i kisika okosnice glicina G389 koja je bila stabilnija u kompleksu s analogom ACCA3. Asparagin N391 iz iste β -vrpce ostvarivao je čak dvije vodikove veze s ligandima. Prva veza ostvarena je između dušika okosnice N391 i kisika okosnice aspartata liganda, koja je primijećena je u svim kompleksima. Druga veza, između N-terminalnog dušika liganda i kisika okosnice asparagina N391 nije bila prisutna samo u kompleksu hDPP III-ACCA3_{HIE568}. U slučaju neutralnog histidina H568, N-terminalni

dušik peptida ACCA3 ostvarivao je vodikovu vezu s glutamatom E508 koja nije primijećena ni u jednom drugom kompleksu. Tijekom simulacija s protoniranim histidinom HIP568, N-terminalni dušici liganada bili su stabilizirani i ostvarivanjem vodikove veze s kisikom bočnog lanca asparagina N394. Ulogu u stabilizaciji N-kraja liganda imao je i glutamat E316, čiji kisici bočnog lanca vežu N-terminalni dušik vodikovim vezama. Uloga glutamata E316 u stabilizaciji N-kraja bila je najmanje značajna za kompleks hDPP III-ACCA3_{HIP568}.



Slika 29. Međumolekulske interakcije unutar kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III), čiji je histidin H568 protoniran, s **A,C**) angiotenzinom-(1-7) (Ang-(1-7)) i **B,D**) njegovim stabilnim analogom ACCA3. Na trodimenzionalnom prikazu (**A** i **B**), koji je napravljen u programu *VMD*, iscrtane linije označavaju međumolekulske vodikove veze, ostvarene u strukturi kompleksa, a štapićastim modelom su prikazani ligandi i aminokiselinski ostatci enzima koji unutar intervala s minimalnom energijom MM-PBSA ostvaruju vodikovu vezu s ligandom u više od 15 % struktura. Dvodimenzionalni graf interakcija (**C** i **D**) pripremljen je u programu *Maestro*. Ljubičaste strelice prikazuju vodikove veze, crveno-plave označavaju značajne elektrostatske interakcije, a zelene π - π interakcije. Numeracija (n) aminokiselinskih ostataka enzima se razlikuje između 2D i 3D prikaza ($n_{3D}=n_{2D}+1$).

Gvanidijeva skupina arginina na položaju P1 stabilizirana je vodikovim vezama i elektrostatskim interakcijama s bočnim lancima glutamata E327 i E329, što je zajedničko svim kompleksima. S druge strane, način stabilizacije atoma okosnice arginina na položaju P1 razlikuje se među simuliranim kompleksima. Tako, dušik okosnice arginina ostvaruje vodikove veze s kisicima bočnog lanca glutamata E316, koje su bile stabilnije u slučaju vezanja Ang-(1-7) nego u slučaju vezanja analoga ACCA3. U kompleksu hDPP III-Ang-(1-7)_{HIP568}, isti dušik ostvarivao je vodikovu vezu s kisikom bočnog lanca tirozina Y318, dok u slučaju neutralnog histidina H568 ova veza nije primijećena tijekom intervala s najnižom energijom MM-PBSA, ali se može primijetiti u drugom dijelu MD simulacije nakon odmicanja histidina H568 koje je opisan u poglavlju 3.1.1. Prije odmicanja histidina H568 kisik Y318-OH, unutar kompleksa hDPP III-Ang-(1-7)_{HIE568}, stvarao je vodikovu vezu s kisicima bočnog lanca aspartata na položaju P2 Ang-(1-7) (slika 29. A). Bočni lanac N-terminalnog aspartata (P2) liganada bio je stabiliziran elektrostatskim interakcijama i vodikovim vezama s bočnim lancem arginina R399. Interakcije su bile najmanje stabilne u kompleksu hDPP III-ACCA3_{HIP568} gdje je bočni lanac aspartata liganda bio stabiliziran elektrostatskim interakcijama s cinkom i protoniranim histidinom H568. Stabilna vodikova veza između atoma Os i H568-N ϵ primijećena je tijekom svih simulacija osim simulacije kompleksa hDPP III-ACCA3_{HIP568}, a tijekom simulacija kompleksa hDPP III-Ang-(1-7)_{HIE568} veza je bila stabilna samo tijekom prvih 45 ns simulacije, koje uključuju i interval s najnižom energijom MM-PBSA. Nakon odmicanja histidina H568 kisik Os je ostvarivao vodikove veze isključivo s okolnim molekulama vode kao što je bio slučaj i tijekom simulacija kompleksa hDPP III-ACCA3_{HIP568}.

Unutar kompleksa s neutralnim histidinom HIE568 bočni lanac tirozina na položaju P2' peptida Ang-(1-7) i ACCA3 bio je stabiliziran vodikovom vezom s kisikom glicina G385, a u manjoj mjeri ova je veza bila prisutna i u kompleksu hDPP III-Ang-(1-7)_{HIP568}. Osim toga, u kompleksu hDPP III-Ang-(1-7)_{HIP568} bočni lanac tirozina liganda bio je stabiliziran vodikovom vezom s glutaminom Q566 te π - π interakcijama s bočnim lancima fenilalanina F109 i histidina HIP568 (slika 29. A). S druge strane, unutar kompleksa hDPP III-ACCA3_{HIP568}, kisik izoleucina I386 ostvaruje vodikovu vezu s tirozinom liganda (slika 29. B).

Neovisno o protonacijskom stanju histidina H568, bočni lanac lizina K439 sudjelovao je u stabilizaciji kisika terminalne, karboksilne skupine peptida ACCA3 i kisika okosnice izoleucina na položaju P3' (slike 28. B i 29. B), ali nije sudjelovao u vezanju Ang-(1-7). U kompleksu hDPP III-Ang-(1-7)_{HIE568} terminalna karboksilna skupina Ang-(1-7) stabilizirana je povremenim interakcijama s argininom R669. Tijekom intervala s najnižom energijom MM-PBSA takve stabilizirajuće interakcije nisu primijećene u kompleksu hDPP III-Ang-(1-7)_{HIP568},

ali su prisutne tijekom zadnjih 15-ak ns simulacije kada dolazi do zamjetnije stabilizacije tog kompleksa (slika 15.). Prije ostvarivanja interakcija s argininom, unutar kompleksa hDPP III-Ang-(1-7)_{HIP568} u stabilizaciji terminalne karboksilne skupine Ang-(1-7) sudjelovao je bočni lanac treonina T419 koji je imao istu ulogu u kompleksu hDPP III-ACCA3_{HIE568}.

4. Rasprava

Analize kompaktnosti i međusobnog položaja dviju domena pokazuju da je kompleks enzima hDPP III sa stabilnim analogom nešto kompaktniji od kompleksa s Ang-(1-7), dok su vrijednosti udaljenosti D186-S500 i Q400-S500 enzima hDPP III u kompleksu s Ang-(1-7) bliže kristalografski određenoj zatvorenoj konformaciji enzima (Kumar i sur., 2016). Na temelju usporedbe RMSD profila za čitav protein i pojedinačne domene možemo zaključiti kako su strukturne razlike proteina u navedenim kompleksima pretežno unutar-domenske promjene, dok su međudomenske razlike znatno manje. Zanimljivo je da dio, koji više fluktuiru u kompleksu s Ang-(1-7), pripada tzv. „ETGE“ fleksibilnoj petlji enzima, kojom enzim hDPP III prepoznaje protein Keap1 (Gundić i sur., 2016), dok dio koji više fluktuiru tijekom simulacija kompleksa s analogom ACCA3 pripada zavojnici koja služi kao „zglob“ pri dugodosežnim gibanjima domena (Tomić i sur., 2015). Ipak, rezultati analize vrijednosti RMSF enzima nisu ukazali na značajnije razlike koje bi se mogle povezati s razlikama u katalitičkoj aktivnosti kompleksa enzima hDPP III s peptidima Ang-(1-7) i ACCA3.

S obzirom na način pripreme kompleksa, rezultati analize parametra RMSD liganada unutar veznog mjesta su očekivani. Naime, u početnoj strukturi svi atomi Ang-(1-7) bili su na istim položajima kao i u kristalnoj strukturi jer je kompleks pripremljen uklanjanjem fenilalanina s C-kraja angiotenzina II. S druge strane, zamjena valina s aminokiselinom ACCA uvodi veće promjene u položaju atoma pa tako prilikom pripreme kompleksa hDPP III-ACCA3 dolazi do translacije aminokiselinskih ostataka koji se nalaze C-terminalno od valina, koji se tijekom simulacija najvjerojatnije moraju reorijentirati kako bi se bolje uklopili u vezno mjesto enzima. Taj zaključak potvrđen je rezultatima analize vrijednosti RMSF atoma liganada koji upućuju da upravo atomi aminokiselinskih ostataka C-terminalno od aminokiseline ACCA najviše fluktuiraju i mijenjaju svoj početni položaj.

Usporedba rezultata simulacija provedenih s neutralnim i protoniranim histidinom H568 jasno ukazuje na značaj protonacije za uspostavu konfiguracije aktivnog mjesta koja će biti povoljna za katalitičku reakciju hidrolize peptidne veze. Tako tijekom simulacija kompleksa s Ang-(1-7), protonirani histidin H568 ostaje u aktivnom mjestu stabilno vezan s kisikom Os, dok se neutralni histidin H568 tijekom simulacija udaljava iz aktivnog mjesta enzima. Uzmemo li u obzir predloženu ulogu histidina H568 u stabilizaciji prijelaznog stanja i pozicioniranju supstrata (Tomić i sur., 2016), njegovo odmicanje od kisika Os peptida Ang-(1-7) rotacijom oko veze C_α-C_β, koje je zamijećeno kod simulacija s neutralnim histidinom H568, nije katalitički povoljno. Naime, pretpostavlja se da ostvarivanjem stabilne vodikove

veze s kisikom Os, histidin H568 dovodi do odvlačenja negativnog naboja s karbonilnog ugljika Cs, čime se olakšava nukleofilno napadanje aktivirane vode na peptidnu vezu (Tomić i sur., 2016). Budući da tijekom ranijih simulacija kompleksa hDPP III s peptidnim supstratima (Matovina i sur., 2017.; Tomić i sur., 2016) nije opaženo navedeno odmicanje histidina H568 od supstrata, može se pretpostaviti da je ovdje dobiven rezultat posljedica stohastičke prirode MD simulacija, tj. da je tijekom simulacije kompleksa hDPP III-Ang-(1-7) pretražen dio konformacijskog prostora slabo zastupljen u realnim sustavima. Bilo bi zanimljivo provesti nove simulacije kako bi se konformacijski prostor kompleksa pomnije istražio, no zbog vremenskog ograničenja to nije napravljeno u okviru ovog rada. Može se reći da su rezultati simulacija potvrdili važnost histidina H568 u pozicioniranju supstrata, s obzirom da je nestanak vodikove veze između dušika H568-N ϵ i kisika Os, tijekom simulacija s neutralnim histidinom HIE568, omogućio vezanje kisika E451-O ϵ enzima i dušika Ns peptida Ang-(1-7), koje nije povoljno za inicijaciju katalitičke reakcije.

Odmicanje histidina H568 omogućilo je i približavanje kisika Y318-OH atomima P1-N i E508-O ϵ . Kako dosadašnja QM i QM/MM istraživanja upućuju na ulogu tirozina Y138 u pozicioniranju supstrata i glutamata E508 (Tomić i sur., 2016), ne može se reći da je ona potvrđena rezultatima MD simulacija s neutralnim histidinom HIE568 jer se povoljne veze kisika Y318-OH s glutamatom E508 i supstratom ostvaruju paralelno s drugim, katalitički nepovoljnim, promjenama. S druge strane, tijekom simulacija s protoniranim histidinom HIP568, kisik Y318-OH se zadržava u blizini dušika P1-N tijekom čitave simulacije, što mnogo vjernije preslikava njegovu ulogu u pozicioniranju supstrata (Tomić i sur., 2016) i dokazanu važnost za katalitičku aktivnost enzima hDPP III (Salopek-Sondi i sur., 2008). Nadalje, tijekom simulacija s protoniranim histidinom HIP568 primijećeno je više naznaka o sudjelovanju tirozina Y318 u stabilizaciji glutamata E508. Tako u kompleksu s Ang-(1-7) dolazi do povremenog ostvarivanja vodikove veze, dok se u kasnim fazama simulacija kompleksa hDPP III-ACCA3, kisik Y318-OH približava kisiku glutamata E508 vezanom za cink.

Tijekom svih simulacija uočena je rotacija glutamata E508 oko veze C γ -C δ , kojom se E508-O ϵ 2 približava imidazolskom prstenu histidina H568. Ova rotacija češća je tijekom simulacija s neutralnim histidinom HIE568 za vrijeme kojih omogućuje kratkotrajno ostvarivanje vodikove veze između bočnih lanaca aminokiselinskih ostataka H568 i E508. Tijekom simulacija s protoniranim histidinom HIP568, rotacija glutamata E508 oko veze C γ -C δ je rjeđa jer je spriječena stvaranjem stabilne vodikove veze između atoma E508-O ϵ 2 i H568-N ϵ u kompleksu s analogom ACCA3, te stabilizirajućih interakcija, u prvom redu

elektrostatskih, u kompleksu s Ang-(1-7). Često zadiranje kisika E508-O ϵ 2 u koordinacijsku ljusku cinka i smanjena uloga tirozina Y318 u njegovoj stabilizaciji, koji odstupaju od dosadašnjih saznanja (Tomić i sur., 2016., Tomić i Tomić, 2014), mogli bi biti posljedica toga što parametri za kation cinka i aminokiselinske ostatke koji ga koordiniraju (H450, H455 i E508) ne oslikavaju dovoljno dobro realni sustav. Naime, rotacija glutamata E508 oko veze C γ -C δ najvjerojatnije vodi k izmjeni dva kisika bočnog lanca glutamata E508 u koordinaciji cinka. S obzirom da je jedan kisik u pripremi sustava vezan na cinkov ion, do takve izmjene nije moglo doći tijekom provedenih simulacija. Potrebna su detaljnija istraživanja koja bi ispitala jesu li konstante i ravnotežne vrijednosti veza i kutova koji uključuju kation cinka u skladu s kristalografskim podacima ili su previše restriktivni.

Bolja stabilizacija glutamata E508 s protoniranim histidinom HIP568 popraćena je smanjenjem zastupljenosti bidentatnog koordiniranja cinka bočnim lancem glutamata E508, ali tijekom istih simulacija dolazi do zadiranja katalitičkog glutamata E451 u koordinacijsku sferu cinka. Rezultati QM/MM istraživanja na enzimu hDPP III bez vezanog liganda (Tomić i Tomić, 2014) pokazali su da je oblik koordinacije u kojoj sudjeluje glutamat E451, i koji je najzastupljeniji oblik tijekom simulacija kompleksa hDPP III-Ang-(1-7)_{HIP568} (oblik 5[1:1:0]), energetski povoljniji od najzastupljenijeg oblika koordinacije u kompleksu hDPP III-Ang-(1-7)_{HIE568}, u kojem je glutamat E451 zamijenjen drugom molekulom vode (oblik 5[0:2:0]). S obzirom na to, simulacije s protoniranim histidinom HIP568 bolje predstavljaju realni sustav kompleksa enzima hDPP III sa supstratom. Značajnije odstupanje od rezultata QM/MM istraživanja je izostanak oblika koordinacije u kojem, uz atome iz oblika 5[1:1:0], u koordinaciji cinka sudjeluje i kisik iz druge molekule vode iz koordinacijske sfere cinka (oblik 6[1:2:0]). Naime, prema istom QM/MM istraživanju (Tomić i Tomić, 2014) oblik koordinacije 6[1:2:0] je stabilniji od oblika 5[0:2:0], ali, neovisno o protonaciji histidina H568, nije uočen tijekom simulacija, no treba imati na umu da u su spomenuti QM/MM računi provedeni bez prisustva supstrata u veznom mjestu. Nadalje, ne treba zanemariti stohastički karakter MD simulacija i činjenicu da je simulacijsko vrijeme od 100 ns prekratko da bi se detaljnije ispitala stvarna vremenska zastupljenost pojedinih oblika koordinacije kationa cinka u promatranim kompleksima. Svakako bi bilo poželjno provesti seriju od nekoliko dodatnih, po mogućnosti duljih MD simulacija.

S obzirom na važnost tirozina Y318 za katalizu (Salopek-Sondi i sur., 2008), njegovo udaljšavanje iz aktivnog mjesta, koje je primijećeno neovisno o protonacijskom stanju histidina H568 tijekom simulacija kompleksa hDPP III-ACCA3, moglo bi biti jedan od uzroka uočenih razlika u pozicioniranju peptida Ang-(1-7) i ACCA3, te ležati u pozadini stabilnosti analoga

ACCA3 na cijepanje enzimom hDPP III. Zanimljivo, protonacija histidina H568 uzrokovala je potpuno izbacivanje molekule HOH1 iz koordinacije cinka u kompleksu hDPP III-ACCA3. Umjesto vode HOH1 u koordinaciju cinka ulaze kisici bočnog lanca aspartata na položaju P2, što dovodi do značajne promijene u načinu pozicioniranja analoga ACCA3 u aktivnom mjestu rezultat čega je narušavanje katalitički aktivne konformacije kompleksa. S druge strane, tijekom simulacija kompleksa hDPP III-ACCA3_{HIE568} voda značajan dio vremena provodi u koordinaciji cinka, a njezina veza s glutamatom E451 je manje stabilna nego što je slučaj u kompleksu s Ang-(1-7). S obzirom na predloženu ulogu glutamata E451 u deprotonaciji vode (Tomić i sur., 2016), destabilizacija vodikovih veza, koje ε kisici glutamata E451 ostvaruju s molekulom vode, mogla bi narušiti katalitičku aktivnost enzima hDPP III. Uz to, u koordinaciju povremeno ulazi i kisik Os liganda ACCA3 čije je sudjelovanje u koordinaciji predloženo u slučaju vezanja peptidnih inhibitora, odnosno supstrata koji se cijepaju anhidridnim mehanizmom (Kumar i sur., 2016). Budući da je udio struktura u kojima kisik Os koordinira kation cinka malen, ne može se tvrditi da bi se ACCA3 mogao cijepati anhidridnim mehanizmom.

S obzirom da je Ang-(1-7) potvrđen kao jako dobar supstrat prema kojem enzim hDPP III pokazuje visok afinitet (Cruz-Diaz i sur., 2016., Wester i sur., 2017), rezultati analize metodom MM-PBSA upućuju da bi protonacija histidina H568 mogla voditi vjernijem prikazu realnog sustava zbog izostajanja pozitivnih vrijednosti slobodne energije vezanja za kompleks hDPP III-Ang-(1-7). Neovisno o protonacijskom stanju histidina H568 uočeno je i da je kompleks enzima hDPP III s analogom ACCA3 tijekom simulacija stabilniji od kompleksa s Ang-(1-7), što potencijalno čini analog ACCA3 kompetitivnim inhibitorom enzima hDPP III. Ova tvrdnja zahtijeva eksperimentalnu potvrdu, budući da do trenutka pisanja rada nije pronađena informacija o tome da je proveden eksperiment koji testira potencijal peptida ACCA3 kao inhibitora enzima hDPP III. Eksperimentalna potvrda posebice je važna s obzirom da je provedena tek jedna simulacija za svaki kompleks, a uz to, u slučaju simulacija s protoniranim histidinom HIP568 razlika u slobodnim energijama dva kompleksa nije bila značajna. Ukoliko se peptid ACCA3 potvrdi kao dobar kompetitivni inhibitor, mogli bi se ispitati i drugi peptidi posebice stabilni analog Ang-(3-7), čiji je izoleucin zamijenjen s aminokiselinom ACCA, budući da je pokazano kako enzim hDPP III pokazuje veći afinitet prema Ang-(3-7) nego prema Ang-(1-7) (Cruz-Diaz i sur., 2016). Nadalje, peptid ACCA3 bi, kao inhibitor enzima hDPP III, osim u sustavu RAA, sudjelovao i u nizu drugih procesa koji uključuju enzim hDPP III. Tako bi, zbog uloge enzima hDPP III u patološkim stanjima kao što su pojava mreine i rast tumora (Tomić i sur., 2016), peptid ACCA3 potencijalno imao i dodatan

terapeutski značaj, uz to što djeluje kao stabilni analog Ang-(1-7) (Wester i sur., 2017). Osim toga, uočeno vezanje analoga ACCA3, koje uključuje njegovo sudjelovanje u koordinaciji cinka uz izbacivanje vode HOH1, pružalo bi vrlo zanimljiv mehanizam inhibicije enzima hDPP III, koji nije uočen u drugim istraživanjima, pa bi značajnost tog rezultata bilo poželjno provjeriti novim, i po mogućnosti dužim, MD simulacijama.

Analiza interakcija liganada i enzima hDPP III potvrdila je važnost nekoliko evolucijski očuvanih aminokiselinskih ostataka u vezanju liganada. Potvrđena je stabilnost interakcija očuvanog glutamata E329 s gvanidijevom skupinom arginina na položaju P1, koja je prisutna i u kristalnoj strukturi kompleksa enzima hDPP III s angiotenzinom II (Kumar i sur., 2016). Uz glutamat E329, u istoj ulozi je primijećen i glutamat E327, čija evolucijska očuvanost nije zabilježena. Tako glutamati E329 i E327 stvaraju negativno nabijen džep, koji unutar veznog mjesta stabilizira pozitivno nabijen bočni ogranak aminokiselinskog ostatka na položaju P1, što je uočeno i u ranijim računalnim istraživanjima kompleksa sa sintetskim supstratom Arg-Arg-2-naftilamidom (Tomić i Tomić, 2014). U svim razmatranim kompleksima uočena je vodikova veza između O ϵ glutamata E316 i dušika P1-N. Na temelju toga može se zaključiti da bi glutamat E316 mogao imati važnu ulogu u vezanju liganda ili pozicioniranju supstrata, što je dodatno potkrijepljeno njegovom evolucijskom očuvanošću (Prajapati i Chauhan, 2011), te ulogom u stabilizaciji N-terminalnog dušika liganada, koja je zapažena i u kristalografski određenoj strukturi kompleksa enzima hDPP III s angiotenzinom II (Kumar i sur., 2016). Kako uvođenje aminokiseline ACCA umjesto valina u strukturi Ang-(1-7) povećava duljinu okosnice liganda, očekivane su promjene u interakcijama koje s proteinom ostvaruju dijelovi liganada koji se nalaze C-terminalno od položaja P1'. Osim toga, supstitucijom valina narušena je interakcija s alaninom A388 iz β -ploče veznog mjesta, a otprije je poznato kako enzim hDPP III preferira peptidne ligande čiji aminokiselinski ostatci na položajima P2-P2' imaju mogućnost organizacije u β -vrpcu, koja se antiparalelno veže s aminokiselinama iz β -ploče veznog mjesta (Tomić i Tomić, 2014). Unatoč tomu što su inače preferirane međumolekulske interakcije, utvrđene u kompleksima enzima hDPP III s peptidnim supstratima, narušene, kompleks hDPP III-ACCA3 se pokazao izrazito stabilnim čemu pridonosi niz novonastalih međumolekulskih interakcija. Među njima se posebno ističu stabilne vodikove veze aminokiselinskih ostataka na položajima P2-P2' s gvanidijevom skupinom evolucijski očuvanog arginina R572 (Prajapati i Chauhan, 2011).

5. Zaključak

U radu su uspoređena strukturna i dinamička svojstva, te međumolekulske interakcije kompleksa enzima hDPP III s Ang-(1-7) i njegovim stabilnim analogom ACCA3 tijekom 100 ns MD simulacija kompleksa u vodi. Dodatno je ispitan utjecaj protonacije histidina H568 na konfiguraciju aktivnog mjesta, te su okarakterizirani novi parametri za cinkov dikation.

Enzim hDPP III je nešto kompaktniji kada je u kompleksu s analogom ACCA3, ali je u kompleksu s Ang-(1-7) bliže kristalografski određenoj zatvorenoj konformaciji (Kumar i sur., 2016). Tijekom simulacija, analog ACCA3 prolazi kroz veće strukturne promjene od Ang-(1-7) kako bi se bočni ogranci njegovih aminokiselinskih ostataka bolje uklopili u vezno mjesto.

Protonacija histidina H568 pogodno je utjecala uspostavi konfiguracije aktivnog mjesta povoljne za katalitičku reakciju hidrolize peptidne veze. To se u prvom redu odnosi na stabiliziranje supstrata i glutamata E508 bočnim lancima aminokiselinskih ostataka Y318 i H568 što je u skladu njihovom eksperimentalno dokazanom važnosti za katalizu (Salopek-Sondi i sur., 2008.; Tomić i sur., 2011). Osim toga, način vezanja analoga ACCA3 tijekom simulacija s protoniranim histidinom HIP568, koji podrazumijeva sudjelovanje kisika P2-O ϵ u koordinaciji cinka, uz istiskivanje katalitički aktivne vode, pruža pouzdanije dokaze o razlici u stabilnosti Ang-(1-7) i analoga ACCA3.

Parametri korišteni za ion cinka uspješno preslikavaju realni sustav u tome što se najzastupljenijim pokazao koordinacijski broj pet. Uz to najzastupljeniji oblik koordinacije za kompleks hDPP III-Ang-(1-7)_{HIP568} je i energetski povoljniji od onog za kompleks hDPP III-Ang-(1-7)_{HIE568} (Tomić i Tomić, 2014), simulacije s protoniranim histidinom HIP568 bolje predstavljaju realni sustav kompleksa enzima hDPP III sa supstratom. Ipak, često sudjelovanje glutamata E451 u koordinaciji cinka, te smanjena uloga tirozina Y318 u stabilizaciji glutamata E508, upućuju na potrebu za dodatnim modifikacijama korištenih parametara, te dodatnim, po mogućnosti duljim, MD simulacijama koji bi pružili još vjerniju sliku realnog sustava.

Račun slobodne energije metodom MM-PBSA pokazao je da su kompleksi enzima hDPP III s peptidima Ang-(1-7) i ACCA3 stabilniji kada je histidin H568 protoniran, a razlika je bila značajnija za kompleks s Ang-(1-7). Prisutne su i naznake veće stabilnosti kompleksa s analogom ACCA3 od kompleksa s Ang-(1-7). Vrijedno bi bilo dodatnim računalnim simulacijama i eksperimentalnim istraživanjima ispitati stvarnu značajnost te razlike jer bi veći afinitet enzima hDPP III prema peptidu ACCA3, uz dokazanu stabilnost peptida ACCA3 na cijepanje enzimom hDPP III (Wester i sur., 2017), činio peptid ACCA3 dobrim kompetitivnim inhibitorom enzima hDPP III, potencijalno mu dajući dodatan terapijski značaj.

6. Literatura

- Auld DS (2013). Catalytic mechanisms for metallopeptidases. U: Rawlings ND, Salvesen G (ur.) Handbook of proteolytic enzymes. Academic Press, Cambridge, str. 370–396.
- Baral PK, Jajcanin-Jozić N, Deller S, Macheroux P, Abramić M, Gruber K (2008). The first structure of dipeptidyl-peptidase III provides insight into the catalytic mechanism and mode of substrate binding. *J Biol Chem* **283**: 22316–24.
- Barrett AJ, Rawlings ND (2013). Introduction: metallopeptidases and their clans. U: Rawlings ND, Salvesen G (ur.) Handbook of proteolytic enzymes. Academic Press, Cambridge, str. 325–370.
- Becker OM, MacKerell AD, Roux B, Watanabe M (2001). Computational biochemistry and biophysics. Marcel Dekker Inc., New York.
- Berendsen HJC, Postma JPM, Gunsteren WF van, DiNola A, Haak JR (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* **81**: 3684–3690.
- Bertoša B, Mrnjavac N (2015). Upute za vježbe iz računalne biofizike. Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Beynon R, Bond JS (2001). Proteolytic enzymes – A practical approach. Oxford University Press, New York.
- Bezerra GA, Dobrovetsky E, Viertlmayr R, Dong A, Binter A, Abramic M, i ostali (2012). Entropy-driven binding of opioid peptides induces a large domain motion in human dipeptidyl peptidase III. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 6525–6530.
- Blumberger J, Lamoureux G, Klein ML (2007). Peptide hydrolysis in thermolysin: *Ab initio* QM/MM investigation of the Glu143-assisted water addition mechanism. *J Chem Theory Comput* **3**: 1837–1850.
- Case DA, Betz RM, Cerutti DS, Cheatham TE, Darden TA, Duke RE, i ostali (2016). AMBER16. University of California, San Francisco.
- Cruz-Diaz N, Wilson BA, Chappell MC (2017). Peptidases and the renin-angiotensin system: the alternative angiotensin-(1-7) cascade. U: Senturk M (ur.) Enzyme inhibitors and activators. IntechOpen. str. 3–24.
- Cruz-Diaz N, Wilson BA, Pirro NT, Brosnihan KB, Marshall AC, Chappell MC (2016). Identification of dipeptidyl peptidase 3 as the angiotensin-(1–7) degrading peptidase in human HK-2 renal epithelial cells. *Peptides* **83**: 29–37.
- Dennington R, Keith TA, Millam JM (2009). GaussView, Version 5. Semicem Inc., Shawnee Mission.
- Frey PA, Hegeman AD (2007). Enzymatic reaction mechanism. Oxford University Press, New York.
- Genheden S, Ryde U (2015). The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin Drug Discov* **10**: 449–61.
- Grand S Le, Götz AW, Walker RC (2013). SPFP: Speed without compromise – A mixed precision model for GPU accelerated molecular dynamics simulations. *Comput Phys Commun* **184**: 374–380.

- Grest GS, Kremer K (1986). Molecular dynamics simulation for polymers in the presence of a heat bath. *Phys Rev A* **33**: 3628–3631.
- Gundić M, Tomić A, Wade RC, Matovina M, Karačić Z, Kazazić S, i ostali (2016). Human DPP III – Keap1 interactions: A combined experimental and computational study. *Croat Chem Acta* **89**: 217–228.
- Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* **14**: 33–8, 27–8.
- Jakalian A, Jack DB, Bayly CI (2002). Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. *J Comput Chem* **23**: 1623–1641.
- Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys* **79**: 926–935.
- Joung IS, Cheatham TE (2008). Determination of alkali and halide monovalent ion parameters for use in explicitly solvated biomolecular simulations. *J Phys Chem B* **112**: 9020–9041.
- Kumar P, Reithofer V, Reisinger M, Wallner S, Pavkov-Keller T, Macheroux P, i ostali (2016). Substrate complexes of human dipeptidyl peptidase III reveal the mechanism of enzyme inhibition. *Sci Rep* **6**: 23787.
- Leach AR (2001). Molecular modelling: Principles and applications. Pearson Education Limited, Essex.
- Liu Y, Kern JT, Walker JR, Johnson JA, Schultz PG, Luesch H (2007). A genomic screen for activators of the antioxidant response element. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 5205–5210.
- López-Otín C, Bond JS (2008). Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem* **283**: 30433–7.
- Maestro, Schrödinger, LLC, New York, 2018. na <https://www.schrodinger.com/maestro>
- Maier JA, Martinez C, Kasavajhala K, Wickstrom L, Hauser KE, Simmerling C (2015). ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. *J Chem Theory Comput* **11**: 3696–3713.
- Matovina M, Agić D, Abramić M, Matić S, Karačić Z, Tomić S (2017). New findings about human dipeptidyl peptidase III based on mutations found in cancer. *RSC Adv* **7**: 36326–36334.
- Miller BR, McGee TD, Swails JM, Homeyer N, Gohlke H, Roitberg AE (2012). MMPBSA.py: An efficient program for end-state free energy calculations. *J Chem Theory Comput* **8**: 3314–3321.
- Prajapati SC, Chauhan SS (2011). Dipeptidyl peptidase III: A multifaceted oligopeptide N-end cutter. *FEBS J* **278**: 3256–3276.
- Rawlings ND, Barrett AJ, Thomas PD, Huang X, Bateman A, Finn RD (2018). The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res* **46**: D624–D632.
- Roe DR, Cheatham TE (2013). PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *J Chem Theory Comput* **9**: 3084–3095.

- Sabljić I, Mestrovic N, Vukelić B, Macheroux P, Gruber K, Luic M, i ostali (2017). Crystal structure of dipeptidyl peptidase III from the human gut symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron*. *PLoS One* **12**: e0187295–e0187295.
- Sabljić I, Tomić M, Matovina M, Sucec I, Tomasić Paic A, Tomić A, i ostali (2018). The first dipeptidyl peptidase III from a thermophile: Structural basis for thermal stability and reduced activity. *PLoS One* **13**: e0192488–e0192488.
- Salomon-Ferrer R, Götz AW, Poole D, Grand S Le, Walker RC (2013). Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. II. Explicit solvent particle mesh Ewald. *J Chem Theory Comput* **9**: 3878–3888.
- Salopek-Sondi B, Vukelić B, Špoljarić J, Šimaga Š, Vujaklija D, Makarević J, i ostali (2008). Functional tyrosine residue in the active center of human dipeptidyl peptidase III. *Biol Chem* **389**: 163–167.
- Schechter I, Berger A (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* **27**: 157–62.
- Tan C, Tan Y-H, Luo R (2007). Implicit nonpolar solvent models. *J Phys Chem* **111(42)**: 12263–12274.
- Tomić A, Abramić M, Špoljarić J, Agić D, Smith DM, Tomić S (2011). Human dipeptidyl peptidase III: Insights into ligand binding from a combined experimental and computational approach. *J Mol Recognit* **24**: 804–814.
- Tomić A, Berynskyy M, Wade RC, Tomić S (2015). Molecular simulations reveal that the long range fluctuations of human DPP III change upon ligand binding. *Mol Biosyst* **11**: 3068–3080.
- Tomić A, González M, Tomić S (2012). The large scale conformational change of the human DPP III – Substrate prefers the “closed” form. *J Chem Inf Model* **52**: 1583–1594.
- Tomić A, Kovačević B, Tomić S (2016). Concerted nitrogen inversion and hydrogen bonding to Glu451 are responsible for protein-controlled suppression of the reverse reaction in human DPP III. *Phys Chem Chem Phys* **18**: 27245–27256.
- Tomić A, Tomić S (2014). Hunting the human DPP III active conformation: Combined thermodynamic and QM/MM calculations. *Dalton Trans* **43**: 15503–14.
- Wang J, Wang W, Kollman PA, Case DA (2006). Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *J Mol Graph Model* **25**: 247–260.
- Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, Kollman PA, Case DA (2004). Development and testing of a general amber force field. *J Comput Chem* **25**: 1157–1174.
- Wester A, Devocelle M, Tallant EA, Chappell MC, Gallagher PE, Paradisi F (2017). Stabilization of angiotensin-(1–7) by key substitution with a cyclic non-natural amino acid. *Amino Acids* **49**: 1733–1742.
- Wilson BA, Cruz-Diaz N, Marshall AC, Pirro NT, Su Y, Gwathmey TM, i ostali (2015). An angiotensin-(1–7) peptidase in the kidney cortex, proximal tubules, and human HK-2 epithelial cells that is distinct from insulin-degrading enzyme. *Am J Physiol Physiol* **308**: F594–F601.
- Xu T, Xie C, Yao D, Zhou CZ, Liu J (2017). Crystal structures of aflatoxin-oxidase from

Armillariella tabescens reveal a dual activity enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **494**: 621–625.

The PyMOL molecular graphics system, Version 2.0. na <https://pymol.org/>.

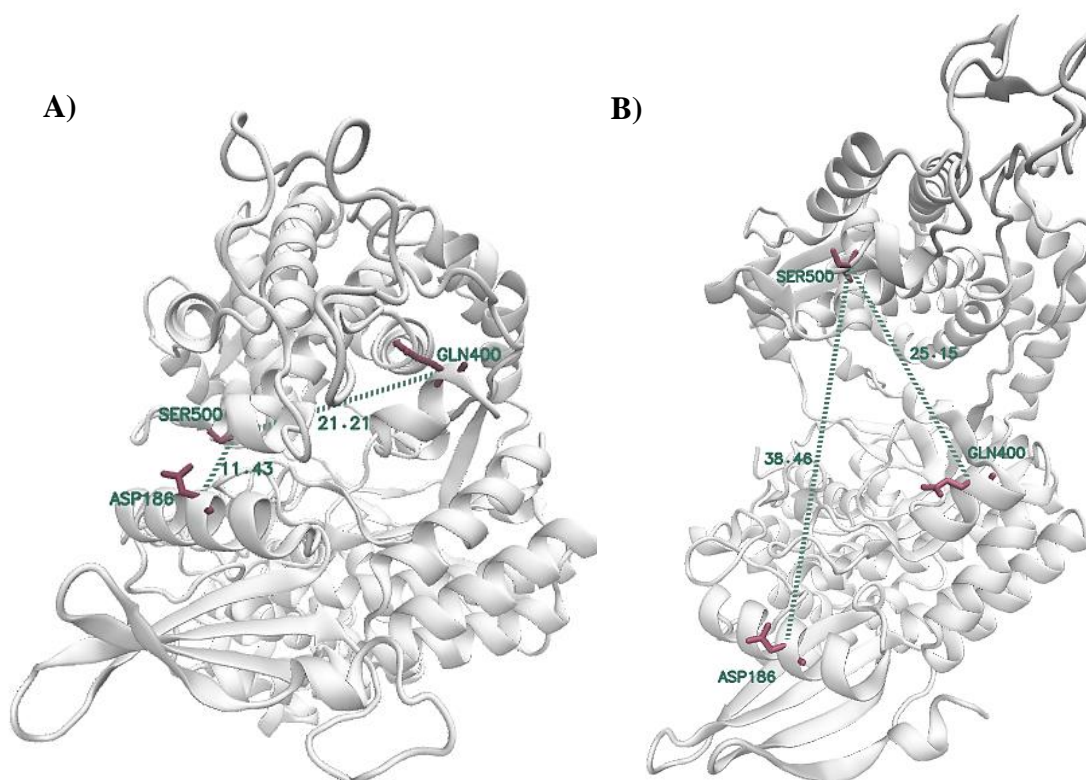
7. Prilozi

Prilog 1.

Tablica P1. Popis mutacija prisutnih u aminokiselinskom slijedu ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) čija je struktura preuzeta iz proteinske baze podataka (PDB ID: 5E2Q). Uz svaku mutaciju dana je i aminokiselina prisutna u slijedu enzima divljeg tipa.

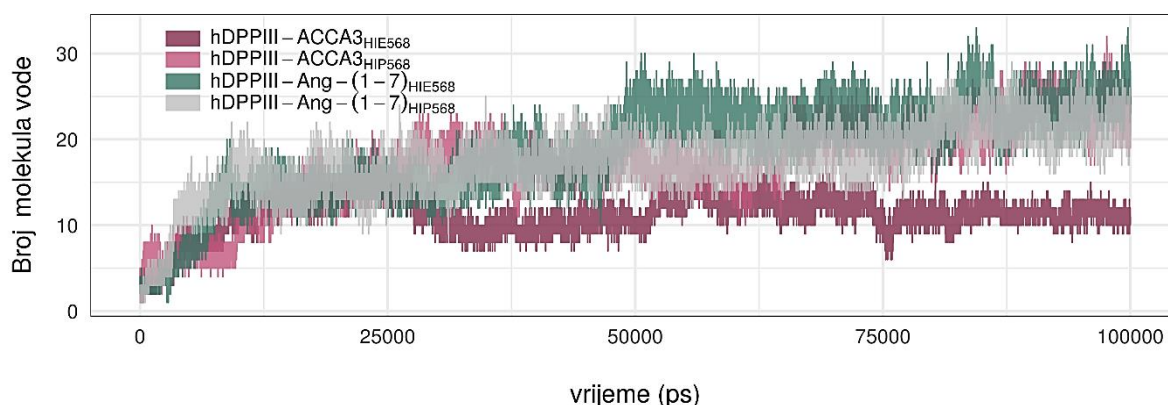
Redni broj	Divlji tip	5E2Q
207	GLU	CYS
451	GLU	ALA
491	SER	CYS
519	CYS	SER
654	CYS	SER

Prilog 2.



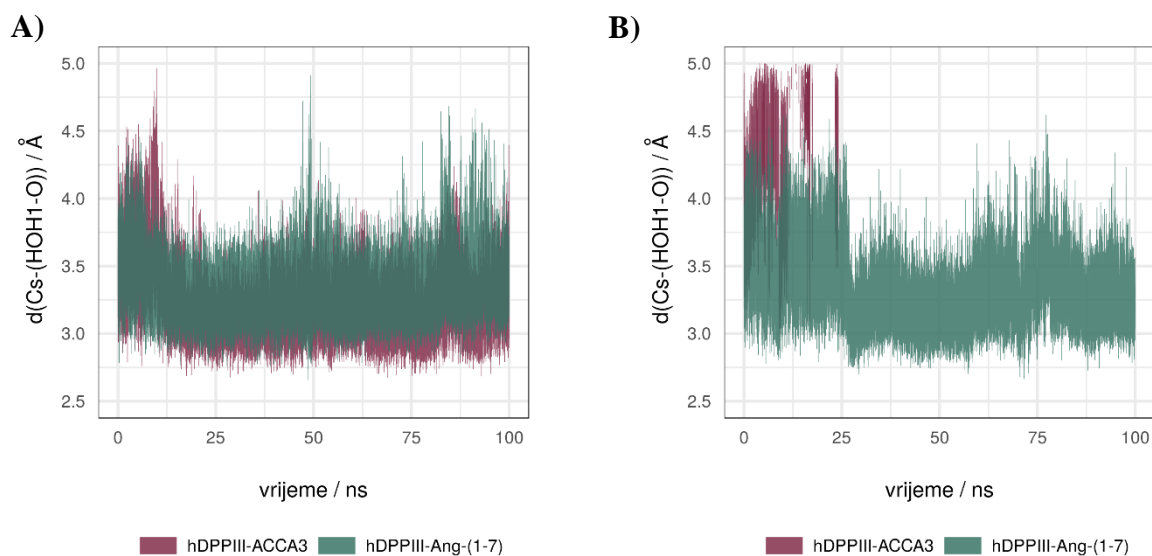
Slika P2. Udaljenosti D186-S500 i Q400-S500 kao mjere zatvorenosti ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III). Udaljenosti su definirane među C_{α} atomima odgovarajućih aminokiselinskih ostataka, a prikazane su udaljenosti za **A**) zatvorenu konformaciju enzima hDPP III (PDB ID: 5EGY) i **B**) otvorenu konformaciju enzima hDPP III (PDB ID: 3FVY). Slika je napravljena alatom VMD (Humphrey i sur., 1996.) prema predlošku iz rada Tomić i sur., 2015.

Prilog 3.



Slika P3. Broj molekula vode koje su unutar sfere radijusa 10 Å od kationa cinka. Slika prikazuje broj molekula praćen tijekom 100 ns MD simulacija ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) s angiotenzinom-(1-7) (Ang-(1-7)) i njegovim stabilnim analogom ACCA3. Za svaki kompleks praćene su dvije MD simulacije koje se razlikuju u protonacijskom stanju histidina, H568 – neutralni (HIE568) i protonirani (HIP568).

Prilog 4.



Slika P4. Udaljenost (d) karbonilnog ugljika peptidne veze koja se hidrolitički cijepa (Cs) od kisika vode koja hidrolitički napada istu vezu (HOH1-O). Udaljenosti su praćene tijekom 100 ns MD simulacija kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) s angiotenzinom-(1-7) (Ang-(1-7)) i njegovim stabilnim analogom ACCA3, tijekom kojih je histidin H568 enzima bio u **A**) neutralnom ili **B**) protoniranom stanju.

Prilog 5.

Tablica P2. Vremenska zastupljenost (%) pojedine vodikove veze u kojoj atom liganda sudjeluje kao donor. Analiza je provedena na 5 ns intervalima s najnižom slobodnom energijom MM-PBSA kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) s angiotenzinom-(1-7) (Ang-(1-7)) i njegovim stabilnim analogom ACCA3. Za svaki kompleks ispitana su dva protonacijska stanja histidina, H568 – neutralni (HIE568) i protonirani (HIP568).

Akceptor	Donor	Vremenska zastupljenost (%)			
		HIE568		HIP568	
		Ang-(1-7)	ACCA3	Ang-(1-7)	ACCA3
E329-sc1	P1-sc	98,36	65	97,67	94,12
E329-sc1	P1-sc	-	49,52	-	80,4
E329-sc2	P1-sc	-	47,2	-	-
E327-sc1	P1-sc	61,12	23,44	90,16	62,24
E327-sc1	P1-sc	59,4	-	58,36	55,08
E327-sc2	P1-sc	33,8	79,64	55,12	19,08
E327-sc2	P1-sc	32,96	-	-	-
N391-mc	P2-mc	50,8	-	43,6	43,16
N391-mc	P2-mc	22,96	-	16,52	17
N391-mc	P2-mc	16,08	-	-	-
E316-sc2	P2-mc	42,88	-	55,08	-
E316-sc2	P2-mc	23,84	23,48	20,24	-
E316-sc1	P1-mc	22,12	82	18,88	79,96
E316-sc2	P2-mc	17,32	79,16	-	-
G389-mc	P1'-mc	29,68	81,04	32,64	58,96
G385-mc	P2'-sc	27,48	82,68	-	-
E508-sc	P2-mc	-	87,92	-	-
Q566-sc	P2'-sc	-	-	64,12	-
Y318	P1-mc	-	-	34,16	-
N394-sc	P2-mc	-	-	29,08	49,52
N394-sc	P2-mc	-	-	-	17
I386-mc	P2'-sc	-	-	-	99,08

Prilog 6.

Tablica P3. Vremenska zastupljenost (%) pojedine vodikove veze u kojoj atom liganda sudjeluje kao akceptor. Analiza je provedena na 5 ns intervalima s najnižom slobodnom energijom MM-PBSA kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) s angiotenzinom-(1-7) (Ang-(1-7)) i njegovim stabilnim analogom ACCA3. Za svaki kompleks ispitana su dva protonacijska stanja histidina, H568 – neutralni (HIE568) i protonirani (HIP568).

Donor	Akceptor	Vremenska zastupljenost (%)			
		HIE568		HIP568	
		Ang-(1-7)	ACCA3	Ang-(1-7)	ACCA3
R572-sc1	P2'-sc	94,6	62,08	83,04	-
R572-sc2	P2'-sc	30,4	-	20,72	-
R572-sc2	P1'-mc	-	94,28	-	79,2
R572-sc3	P1'-mc	-	-	-	58,88
A388-mc	P1'-mc	78,2	-	78,52	-
R399-sc1	P2-sc1	72,64	57,48	53,92	16,56
R399-sc2	P2-sc2	28,96	-	42,84	-
R399-sc2	P2-sc2	23,44	-	28,52	-
R399-sc2	P2-sc1	15,08	-	21,84	-
N545-sc	P4'-sc	62,68	50,44	-	-
N545-sc	P4'-mc	-	-	52,4	-
Y318-sc	P2-sc1	57,24	-	-	-
H568-sc	P1-mc	50,76	82,2	40,64	-
Y435-sc	P4'-sc	-	78,56	-	-
T419-sc	P5'-mc	-	59,36	-	-
N391-mc	P2-mc	-	44,8	-	49,72
K439	P5'-mc	-	18,88	-	46,36
K439	P5'-mc	-	18,56	-	37,04
K439	P3'-mc	-	16,92	-	-
K439	P3'-mc	-	16,36	-	-
R548	P4'-sc	-	-	20,96	-
R548	P4'-mc	-	-	-	92,32

8. Životopis

Ime i prezime: Ivana Čavka

Datum i mjesto rođenja: 17.3.1995., Split, Republika Hrvatska

Obrazovanje:

2016. – 2018. Sveučilišni diplomski studij molekularne biologije, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
2013. – 2016. Sveučilišni preddiplomski studij molekularne biologije, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
2009. – 2013. III. Gimnazija Split, Split

Sudjelovanja i priznanja:

2014. 7. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka
2014. 6. Noć Biologije
2015. 7. Noć Biologije
2017. 9. Noć Biologije
2018. 10. Noć Biologije
2016. Nagrada Fakultetskog vijeća za izvrstan uspjeh u studiranju