

# Simulacije molekulske dinamike kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III s inhibitorima

---

**Tir, Nora**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2016**

*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:217:692350>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-27**



*Repository / Repozitorij:*

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



NORA TIR

Simulacije molekulske dinamike kompleksa ljudske  
dipeptidil-peptidaze III s inhibitorima

Diplomski rad

Mentor:

Dr. sc. Sanja Tomić

Zagreb, 2016.

NORA TIR

Molecular dynamics simulations of complexes of human  
dipeptidyl peptidase III with inhibitors

Master's thesis

Supervisor:

Dr. sc. Sanja Tomić

Zagreb, 2016.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju Zavoda za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom prof. dr. sc. Sanje Tomić u sklopu Sveučilišnog diplomskog studija kemije pri Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Računi su izvedeni na računalnim stanicama u sklopu Laboratorija za kemijsku i biološku kristalografiju Zavoda za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković i Hrvatskoj nacionalnoj mreži računala (CRO-NGI) u sklopu Sveučilišnog računskog centra (SRCE) Sveučilišta u Zagrebu.

## Sadržaj

SAŽETAK.....	v
ABSTRACT .....	vi
§ 1. Uvod.....	1
1.1. Cilj rada.....	2
§ 2. Literaturni pregled.....	3
2.1. Peptidaze.....	3
2.2. Računalna kemija.....	7
§ 3. Računalne metode.....	14
3.1. Priprema sustava .....	14
3.2. MD simulacije .....	16
3.3. Računi slobodne energije vezanja.....	17
3.4. Analize promjena geometrije .....	18
§ 4. Rezultati i rasprava .....	20
4.1. Promjene geometrije kompleksa tijekom MD simulacija.....	20
4.2. Slobodne energije vezanja.....	30
4.3. Koordinacija iona cinka .....	33
§ 5. Zaključak.....	36
§ 6. Popis oznaka, kratica i simbola.....	39
§ 7. Literaturna vrela.....	40
§ 8. Životopis.....	44

## SAŽETAK

Simulacije molekulske dinamike kompleksa ljudske dipeptidil-peptidaze III s inhibitorima

Nora Tir

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

Dipeptidil-peptidaza III (DPP III) je o cinku ovisna peptidaza koja katalizira hidrolizu druge peptidne veze s N-kraja svojih supstrata. Enzim je široke supstratne specifičnosti, nepoznate osnovne fiziološke uloge, široke zastupljenosti među organizmima te prepoznatih uloga u procesima od interesa za razvoj lijekova.

U ovom radu provedene su simulacije molekulske dinamike kompleksa ljudske DPP III s dvama inhibitorima za koje su poznati postotci inhibicije u odnosu na sintetski supstrat Arg-Arg-2-naftilamid. Za simulacije su korištene dvije konformacije enzima različite kompaktnosti kako bi se, računima slobodne energije vezanja, utvrdilo koja je povoljnija za vezanje liganda i upoznale interakcije liganda s aminokiselinskim ostacima te cinkovim ionom u aktivnom mjestu. Dobiveni rezultati mogli bi poslužiti u daljnjem razvoju i testiranju potencijalnih inhibitora ovog enzima.

(44 stranice, 33 slike, 4 tablice, 56 literaturnih navoda, izvornik na hrvatskom jeziku)

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

Ključne riječi: ljudska dipeptidil-peptidaza III/ metalopeptidaze/ molekulska dinamika/ inhibitori/ slobodna energija vezanja/ supstratna specifičnost

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

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

Dr. sc. Zlatko Mihalić, red. prof., Prirodoslovno-matematički fakultet

Dr. sc. Marko Močibob, docent, Prirodoslovno-matematički fakultet

Dr. sc. Ivica Đilović, docent, Prirodoslovno-matematički fakultet

Rad prihvaćen: svibanj 2016.

## ABSTRACT

Molecular dynamics simulations of complexes of human dipeptidyl peptidase III with inhibitors

Nora Tir

Rudjer Boskovic Institute, Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb, Croatia

Dipeptidyl peptidase III (DPP III) is a zinc dependent peptidase which catalyses hydrolysis of the second N-terminal peptide bond of its substrates. DPP III is an enzyme of broad substrate specificity and it has been found in many organisms. Although its fundamental physiological role is unknown, it has been recognised in several processes of interest for the drug development.

In this thesis, molecular dynamic simulations were done for the complexes of human DPP III with two inhibitors for which the percentages of inhibition have been measured for the Arg-Arg-2-naphthylamide synthetic substrate hydrolysis. Two enzyme conformations of different compactness were used for the simulations. Subsequently, the binding free energies were calculated in order to find out which one is more favorable for ligand binding and to obtain an insight into the ligand-protein interactions. The obtained results might be useful in future development and testing of potential inhibitors of this enzyme.

(44 pages, 33 figures, 4 tables, 56 references, original in Croatian)

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

Keywords: human dipeptidyl peptidase III/ metallopeptidases/ molecular dynamics/ inhibitors/ free energy of binding/ substrate specificity

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

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

Dr. Zlatko Mihalić, Full Prof., Faculty of Science

Dr. Marko Močibob, Assistant Prof., Faculty of Science

Dr. Ivica Đilović, Assistant Prof., Faculty of Science

Thesis accepted: May 2016

## § 1. Uvod

Peptidaze su enzimi koji hidroliziraju peptidnu vezu unutar ili pri kraju polipeptidnog lanca. Metalopeptidaze su skupina peptidaza koje za svoju katalitičku aktivnost zahtijevaju prisutnost dvovalentnog metalnog kationa. On obično omogućuje nukleofilni napad molekule vode na peptidnu vezu. Najčešće prisutni ioni metala u metalopeptidazama su  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  i  $Cu^{2+}$ , a aminokiseline koje ih najčešće koordiniraju su histidin, glutamat, aspartat i cistein.

Dipeptidil-peptidaze pripadaju egzo-peptidazama koje hidroliziraju drugu peptidnu vezu s N-kraja svojih supstrata. Kod sisavaca su pronađena četiri tipa ovog enzima u stanicama većine do danas ispitanih tkiva koji pokazuju različitu supstratnu specifičnost te osjetljivost na inhibitore.<sup>1</sup>

Dipeptidil-peptidaza III (DPP III; EC 3.4.14.4) je enzim ovisan o cinkovom ionu molekulske mase 80-85 kDa, ovisno o organizmu, i izoelektične točke kod pH oko 4,5.<sup>2</sup> Na temelju podataka dobivenih sekvenciranjem cijelog genoma, ortolozi DPP III pronađeni su u više od 50 organizama uključujući niže eukariote, poput kvasca i vinske mušice, i neke specifične bakterije.<sup>3</sup> Većinom se nalazi u citoplazmi stanica mnogih tkiva, no djelomično je pročišćena i okarakterizirana kao membranski protein iz mozga štakora.<sup>4</sup> Najnovija istraživanja pokazala su prisutnost DPP III i u jezgri stanica mišje jetre kao odgovor na oksidativni stres.<sup>5</sup>

Prema klasifikaciji baze MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) DPP III pripada obitelji metalopeptidaza M49 i sadrži dva očuvana strukturna motiva koja sudjeluju u vezanju cinkovog iona: HEXXGH i EEXR(K)AE(D).<sup>6</sup> Prema terciarnoj strukturi enzim se može podijeliti na dvije domene, „gornju“ i „donju“, između kojih je velika šupljina. Zbog takve 3D strukture veoma je fleksibilan i prihvaća širok spektar supstrata, ponajviše oligopeptide od četiri do osam aminokiselina.<sup>7</sup> Cinkov ion smješten je u gornjoj domeni,<sup>8</sup> a u njegovoj koordinaciji sudjeluju histidini iz prvog motiva (H450 i H455) te glutamat, E508, iz drugog motiva, no računi su pokazali da u koordinaciji može sudjelovati i E451.

Točne fiziološke uloge DPP III nisu potpuno razjašnjene, ali često se povezuje s mehanizmima regulacije boli jer su niske aktivnosti ovog enzima opažene u leđnoj moždini pojedinaca koji su patili od akutne boli.<sup>9</sup> Visoka koncentracija tog enzima pronađena je u površinskim slojevima neurona leđnog roga leđne moždine štakora,<sup>10</sup> a to je ujedno područje visokih koncentracija neuropeptida koje DPP III uspješno hidrolizira. Veliki afinitet ljudske DPP III prema važnim neuropeptidima, poput enkefalinâ i endomorfina, pokazan je istraživanjima *in vitro*<sup>11</sup> što dodatno upućuje na njezinu potencijalnu ulogu u sustavu regulacije boli kod sisavaca. Povećana ekspresija ovog enzima uočena je u malignom tumoru jajnika što se može iskoristiti kao potencijalni biomarker za karcinom.<sup>12</sup> Nadalje, naslućuje se



uloga DPP III i u nastanku katarakte te endogenim obrambenim mehanizmima stanica protiv oksidativnog stresa.<sup>13</sup>

### 1.1. Cilj rada

Cilj ovog rada bio je istražiti načine vezanja dvaju potencijalnih inhibitora ljudske DPP III u dvije konformacije enzima, kompaktniju, koja je preuzeta iz proteinske baze podataka (eng. *protein data bank*, PDB) pod kodom 3T6B, i manje kompaktnu, dobivenu prethodnim simulacijama slobodne DPP III, pri čemu je kao ishodište korištena istegnuta struktura (PDB kôd: 3FVY). Inhibitorima su eksperimentalno određeni postotci inhibicije s obzirom na smanjeni stupanj hidrolize sintetskog supstrata arginil-arginil-2-naftilamida (RRNA) u prisutnosti navedenih spojeva.

Početne konformacije liganada u proteinu dobivene su metodom molekuskog uklapanja (eng. *docking*) i optimizirane. Simulacije molekulske dinamike provedene su pri 300 i 400 K kako bi se bolje pretražila ploha potencijalne energije i ligandi bolje smjestili u aktivno mjesto. Analiza rezultata obuhvatila je praćenje fleksibilnosti pojedinih kompleksa, koordinacije cinkovog iona i račun slobodne energije vezanja liganda dvjema metodama, MM-PBSA (eng. *Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area*) i MM-GBSA (eng. *Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area*).

U konačnici, slobodne energije vezanja inhibitora u aktivno mjesto enzima istih početnih konformacija uspoređene su kako bi se odredila relativna stabilnost. Ispitane su i interakcije aminokiselinskih ostataka u aktivnom mjestu enzima te koordinacija cinkovog iona u konačnim konfiguracijama sustava. Povezivanjem tih rezultata sa strukturama inhibitora dobiva se osnova za dizajn novih i boljih inhibitora.

## § 2. Literaturni pregled

### 2.1. Peptidaze

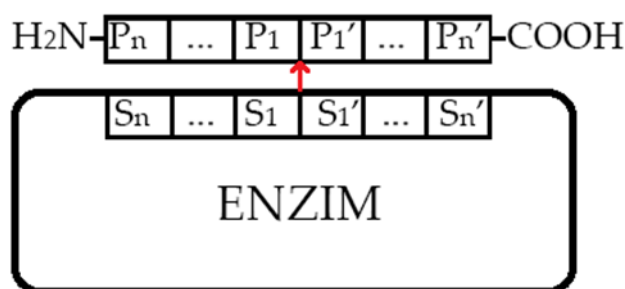
Enzimi se prema vrsti reakcije koju kataliziraju dijele na 6 osnovnih skupina ili klasa: oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, ligaze, izomeraze i liaze. Svaka skupina sadrži i podskupine ili podklase koje se razlikuju po vrsti veze na kojoj se odvija odgovarajuća reakcija. Podskupine se mogu dalje podijeliti na pod-podskupine, a enzimu se još pripisuje i serijski broj. Dakle, svakom se enzimu pripisuju četiri jedinstvena broja koja čine njegovu EC oznaku (eng. *Enzyme Commission*).<sup>14</sup>

Peptidaze pripadaju hidrolazama, enzimima koji kataliziraju hidrolitičko cijepanje peptidne veze i nose oznaku EC 3.4. Ako cijepaju peptidnu vezu unutar (poli)peptidnog lanca, zovu se još endopeptidaze, a ako cijepaju peptidnu vezu na krajevima (poli)peptidnog lanca, zovu se egzopeptidaze. Egzopeptidaze mogu biti specifične za N-kraj (poli)peptidnog lanca i onda se govori o aminopeptidazama, koje cijepaju terminalnu peptidnu vezu, dipeptidil-peptidazama i tripeptidil-peptidazama koje cijepaju drugu, odnosno treću peptidnu vezu s N-kraja. Egzopeptidaze specifične za C-kraj (poli)peptidnog lanca zovu se karboksipeptidaze, ako cijepaju terminalnu peptidnu vezu, peptidil-dipeptidaze i peptidil-tripeptidaze koje cijepaju drugu, odnosno treću peptidnu vezu s C-kraja.

Peptidaze se, također, mogu pronaći razvrstane u MEROPS bazi podataka. MEROPS baza podataka služi i kao izvor informacija o proteinima koji inhibiraju peptidaze. Peptidaze su hijerarhijski razvrstane na temelju statistički značajnih sličnosti u slijedu aminokiselina u obitelji, a homologne obitelji grupirane su u klan. Svaka obitelj i klan imaju svoje oznake. Obitelj može sadržavati samo jedan enzim ako nisu poznati homolozi, a označava se slovom koje predstavlja katalitički tip peptidaze, uz jedinstveni broj tog enzima. Katalitički tipovi su: aspartatne (A), cisteinske (C), glutamatne (G), serinske (S), treoninske (T), asparaginske (N) peptidaze, metalopeptidaze (M), peptidaze miješanog tipa (P) i peptidaze kojima je tip još nepoznat (U). Klan sadrži sve moderne peptidaze koje su se razvile iz jednog evolucijskog izvora peptidaza i pretstavlja jednu ili više obitelji koje su evolucijski povezane što se dokazuje ili prema sličnosti tercijarnih struktura ili po aminokiselinskim sljedovima u katalitičkim mjestima. Svaki se klan označava dvama slovima od kojih prvi označava katalitički tip obitelji. (MEROPS, v 10.0, travanj 2016.)

Supstratna specifičnost peptidaza uglavnom je uvjetovana aminokiselinskim slijedom i prostornom orijentiranošću aminokiselina u aktivnom mjestu enzima. U skladu s tim razvijen je model i terminologija za opisivanje supstratne specifičnosti peptidaza. Na slici 1 prikazan je takav model. Od  $P_1$  do  $P_n$  označeni su aminokiselinski ostatci peptidnog

supstrata prema N-kraju od peptidne veze koja se cijepa. Od  $P_1'$  do  $P_n'$  označeni su aminokiselinski ostaci peptidnog supstrata prema C-kraju od peptidne veze koja se cijepa. Podmjestu u aktivnom mjestu enzima u koja se smještaju odgovarajući aminokiselinski ostaci supstrata nose oznake  $S_1$  do  $S_n$ , odnosno od  $S_1'$  do  $S_n'$ .<sup>15</sup>



**Slika 1. Shematski prikaz vezanja peptidnog supstrata u aktivno mjesto peptidaze.** Crvenom strelicom označeno je mjesto cijepanja peptidne veze (između aminokiselinskih ostataka  $P_1$  i  $P_1'$ ).  $P_1$ - $P_n$  označava aminokiselinske ostatke peptidnog supstrata od mjesta hidrolize prema N-kraju, a  $P_1'$ - $P_n'$  označava aminokiselinske ostatke peptidnog supstrata od mjesta hidrolize prema C-kraju supstrata koji se smještaju u odgovarajuća podmjestu na enzimu označena sa  $S_1$ - $S_n$  i  $S_1'$ - $S_n'$ .

### 2.1.1. Dipeptidil-peptidaza III

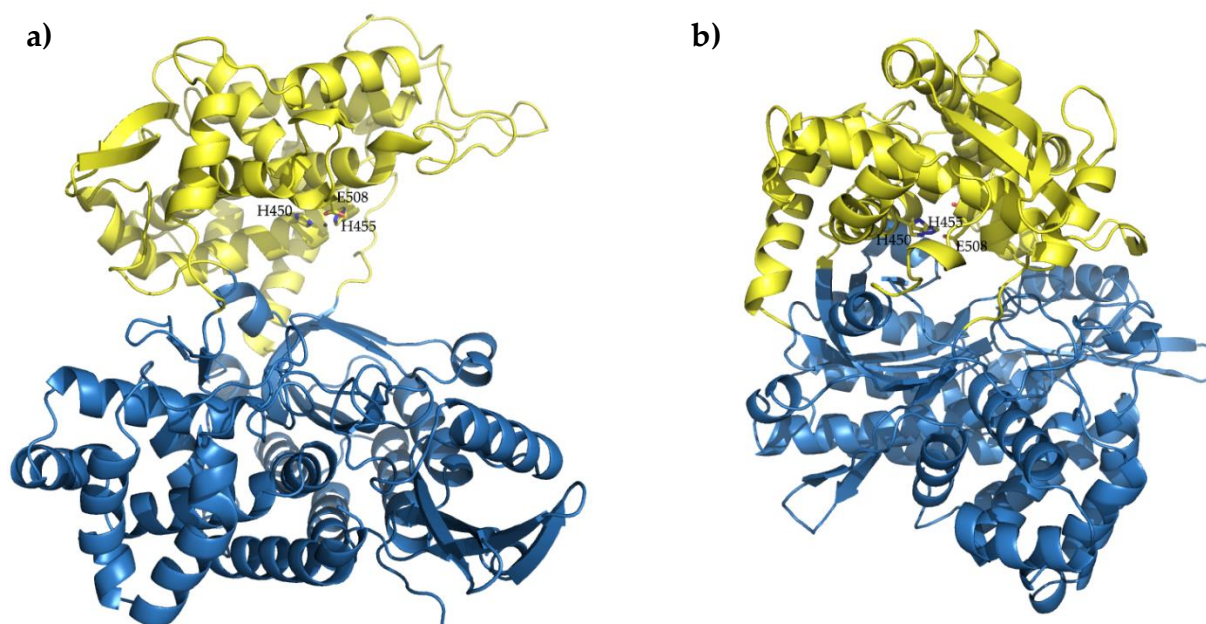
Dipeptidil-peptidaze su enzimi koji hidroliziraju drugu peptidnu vezu s nesupstituiranog N-kraja svojih (poli)peptidnih supstrata. Pronađena su i okarakterizirana četiri tipa dipeptidil-peptidaza (DPP I-IV) kod sisavaca. Tipovi dipeptidil-peptidaza međusobno se razlikuju prema smještaju u stanici, supstratnoj specifičnosti i osjetljivosti na inhibitore.<sup>1</sup> Dipeptidil-peptidaza III (DPP III, EC 3.4.14.4) pronađena je u prednjem režnju goveđe hipofize i prvotno je nazvana dipeptidil-arilamidaza III zato što hidrolizira sintetski supstrat arginil-arginil-2-naftilamid (RRNA), kao i tetrapeptide pri pH 8-9. Optimalna temperatura za hidroliznu aktivnost DPP III je 37 °C, a pri fiziološkom pH zadržava se 45% aktivnosti prema RRNA.<sup>16</sup> U bazi podataka MEROPS svrstana je u obitelj metalopeptidaza M49 i njezin je jedini član. DPP III sadrži cinkov ion koji je zaslužan za katalitičku aktivnost i jedinstveni heksapeptid, HEXXH, odgovoran za vezanje metalnog iona te katalitičku aktivnost enzima.

DPP III je pronađena u stanicama mnogih prokariota i eukariota, a izolirana je i pročišćena iz ljudske placente,<sup>17</sup> leće,<sup>18</sup> eritrocita,<sup>7</sup> stanica mozga,<sup>19</sup> jetre štakora,<sup>20</sup> mišića svinje,<sup>21</sup> sluzave plijesni (*Dyctiostelium discoideum*)<sup>22</sup> i kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*).<sup>23</sup> Pretežno je pronađena u citoplazmi kao monomerni protein relativne molekulske mase oko 80 kDa i izoelektrične točke oko pH 4,5. Inhibicija aktivnosti DPP III kelirajućim agensima i sulfhidrilnim reagensima<sup>17</sup> potvrđuje da joj je katalitička aktivnost ovisna o metalnom ionu. Također, enzim inhibiraju i aromatski dipeptidi poput YY i YF.<sup>17</sup>

DPP III pokazuje specifičnost prema oligopeptidima veličine četiri do osam aminokiselina, RRNA te nekim neuropeptidima, posebno onima koji imaju hidrofobni aminokiselinski ostatak na P<sub>1</sub>' položaju. Istraživanja *in vitro* pokazala su visok afinitet DPP III prema angiotenzinima, peptidnim hormonima koji pripadaju sustavu renin-angiotenzin i reguliraju krvni tlak, te enkefalinima, peptidima koji se oslobađaju u stanicama sisavaca kao odgovor na bol.<sup>4</sup> Sintetski pentapeptidi sekvence slične hemorfinima, opioidnim peptidima dobivenima iz hemoglobina, pokazali su se uspješnim nekompetitivnim inhibitorima DPP III izolirane iz površinskih slojeva neurona leđnog roga leđne moždine štakora. To dodatno ukazuje na važnost ovoga enzima u mehanizmu regulacije boli u leđnoj moždini.<sup>10</sup> Poznato je da se endogeni opioidni peptidi, enkefalini i endomorfini, mogu obrađivati proteolitičkim cijepanjem i tako uzrokovati osjećaj boli. Osim hidrolize endogenih opioidnih peptida, DPP III pokazuje aktivnost prema egzorfinima, opioidnim peptidima nastalima iz vanjskih izvora, primjerice, proteina iz hrane. Također, DPP III može, za razliku od mnogih drugih peptidaza, hidrolizirati peptidnu vezu iza prolina<sup>2</sup> što je u skladu s njezinom strukturnom fleksibilnošću. S druge strane, fiziološka uloga i regulacija DPP III *in vivo* nisu još razjašnjene<sup>24</sup> premda je predloženo sudjelovanje ovoga enzima u posljednjim koracima unutarstaničnog katabolizma proteina i regulativna uloga u mnogim različitim biokemijskim procesima koji uključuju bioaktivne oligopeptide.<sup>25,26</sup> Također, izmjerena je i povećana specifična aktivnost DPP III u malignim tkivima jajnika što se povezuje s povećanom ekspresijom ovog enzima tijekom prijelaza benignog u maligni tumor, a to povećanje ovisi o histološkom stupnju primarnog karcinoma jajnika. Prema tome, povećana specifična aktivnost DPP III može biti biokemijski indikator maligniteta endometrija i jajnika kod ljudi.<sup>12</sup> Otkrivanje vezanja DPP III na KEAP1 ubikvitin-ligazu preko motiva ETGE koje sprječava vezanje supstrata Nrf2, transkripcijskog faktora zaslužnog za aktivaciju transkripcije citoprotektivnih gena, i njegovu ubikvitinaciju upućuje na ulogu DPP III u regulaciji oksidativnog stresa.<sup>27</sup> U končnici, sva dosadašnja saznanja upućuju na potencijalnu važnost DPP III kao mete za mnoge lijekove.

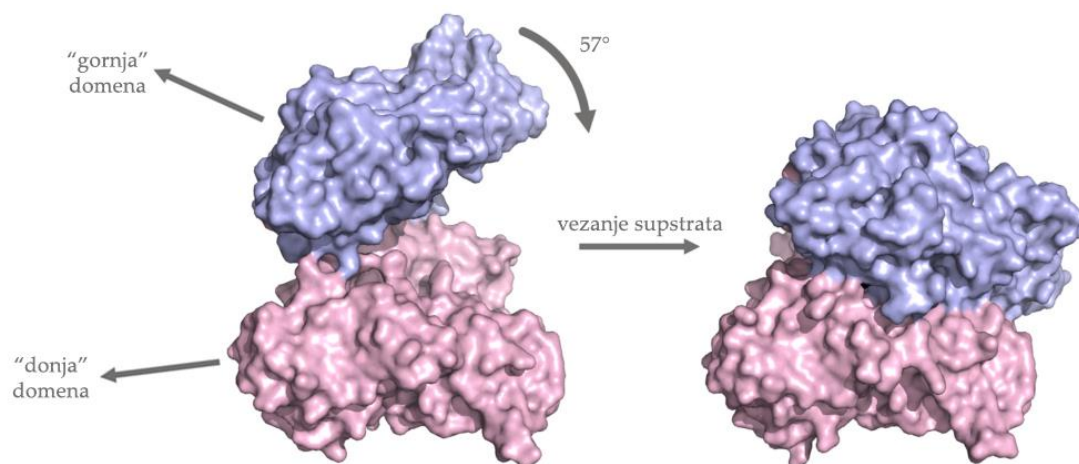
Prva određena kristalna struktura DPP III bila je ona kvašćevog (*Saccharomyces cerevisiae*) ortologa (PDB kôd: 3CSK) i ukazala je na novi način smatanja proteina, različit od ostalih peptidaza ovisnih o ionu cinka koji se kod DPP III nalazi u gornjoj domeni i koordiniran je bočnim ograncima dvaju histidina i jednog glutamata te molekulom vode.<sup>8</sup> Ljudskoj DPP III riješena je kristalna struktura godinu dana kasnije (PDB kôd: 3FVY, slika 2 a) i, premda je po redosljedu aminokiselinskih ostataka sličnost s kvašćevom tek oko 36%, tercijarne strukture su gotovo identične. Tri godine kasnije određena je kristalna struktura mutanta E451A ljudske DPP III u kompleksu s tinorfinom (PDB kôdovi: 3T6B, slika 2 b, i 3T6J). U kompleksu, DPP III je znatno kompaktnija, tj. njezine domene su bliže jedna drugoj nego u slobodnom proteinu. Značajna razlika u kompaktnosti navedenih struktura upućuje na izrazitu unutarnju pokretljivost DPP III i sugerira način vezanja supstrata u aktivno

mjesto. Nedavno je određeno još nekoliko kristalnih struktura kompleksa ljudske DPP III s prirodnim ligandima.<sup>28</sup>



**Slika 2.** a) Kristalna struktura ljudske DPP III (PDB kôd: 3FVY) s cinkovim ionom i aminokiselinskim ostatcima koji ga koordiniraju. b) Kristalna struktura E451A mutanta ljudske DPP III (PDB kôd: 3T6B) kojoj nedostaje ion cinka u aktivnom mjestu, ali položaji aminokiselinskih ostataka koji ga koordiniraju odgovara njihovim položajima u 3FVY strukturi. Žuto je obojena gornja domena, a plavo donja. Aminokiselinski ostatci koji koordiniraju ion cinka, H450, H455 i E508, prikazani su štapićima. Slike su priređene u programu PyMol.<sup>29</sup>

Smatra se da vezanje supstrata uzrokuje konformacijsku promjenu enzima koja se može opisati kao „zatvaranje“ pri čemu se kut između dviju domena smanji za oko 60°, a sekundarna struktura domena ostaje nepromijenjena (slika 3). Navedena konformacijska promjena rezultat je povećanja entropije. Naime, pokazano je da je vezanje tinorfina endoterman proces. Dakle, entropijski član ima veći doprinos u ukupnoj promjeni Gibbsove energije uzrokujući ukupnu egzergonost procesa. Izračunato je da vezanjem supstrata dolazi do izbacivanja nekoliko desetaka strukturiranih molekula vode iz udubine među domenama enzima. Opažena konformacijska promjena pojašnjava široku supstratnu specifičnost DPP III.<sup>30</sup>



Slika 3. "Zatvaranje" domena ljudske DPP III prilikom vezanja tinorfina.<sup>30</sup>

### 2.1.2. Ligandi DPP III

Specifičnost ljudske DPP III, kao ni ostalih DPP III, prema peptidnim supstratima nije precizno određena, no uočeno je da su joj najbolji supstrati oligopeptidi s četiri do osam aminokiselina (hidrolitičko djelovanje na tripeptide je slabo), pri čemu preferira one s hidrofobnim aminokiselinskim ostatkom na položaju P<sub>1</sub>.<sup>7</sup> Od poznatih sintetskih supstrata najbolji je RRNA pri čemu je pH oko 8,6 optimalan za njegovu hidrolizu pri 37 °C, a pri fiziološkom pH DPP III zadržava 45 % hidrolitičke aktivnosti prema ovom supstratu.

Inhibitori korišteni u ovom radu, gvanidiniokarbonil-pirol-arilni konjugati, poznati su interkalatori za dvolančanu DNA i RNA te se koriste kao fluorescentne sonde za spektroskopska mjerenja. Sadrže gvanidiniokarbonil-pirolni kation povezan na aromatski supstituent preko fleksibilne poveznice (eng. *linker*).<sup>31</sup> Ligand **1** kao aromatski supstituent ima pirenski sustav, a ligand **2** fenantridinski. Zbog svoje fleksibilnosti, izduženosti, spektroskopske aktivnosti te istovremene interkalacije arilne jedinice i elektrostatskih interakcija gvanidinijeve skupine s okosnicom nukleinskih kiselina ispitan je njihov utjecaj na aktivnost DPP III čiji su supstrati sličnih svojstava.

## 2.2. Računalna kemija

Računalna kemija ili molekulsko modeliranje grana je kemije koja se zasniva na teorijskoj kemiji i fizici, a koristi se za računanje i predviđanje svojstava molekula, od njihove strukture i elektronskih svojstava do konformacijskih promjena i mehanizama kemijskih reakcija. Metode molekulskog modeliranja mogu se podijeliti prema složenosti teorije koju koriste na metode kvantne mehanike, semiempirijske, empirijske i metode koje kombiniraju kvantnu i molekulsku mehaniku. Metode koje koriste visoku razinu teorije i pomoću kojih se dobivaju elektronska svojstva molekula pripadaju metodama kvantne mehanike i primjenjive su samo

---

za male molekule. Empirijske i semiempirijske metode manje su točne, uključuju i eksperimentalne parametre, zanemaruju elektronska svojstva molekula i primjenjive su za velike molekule i (bio)makromolekule.

### 2.2.1. Metode polja sila

Empirijske metode računalne kemije su metode koje zanemaruju elektronsku strukturu atoma i oni se promatraju kao kuglice određene mase. Molekule se ovim metodama promatraju kao sustavi kuglica povezanih oprugama, a njihova se stuktorna svojstva ispituju pomoću zakona klasične mehanike. Ukupna potencijalna energija molekule, odnosno sustava, izražena je kao funkcija položaja atoma i sadrži parametre koji opisuju veze, kuteve i nevezne interakcije među atomima. Parametri koji ulaze u izraze za potencijalnu energiju sustava dobiveni su eksperimentalno, primjerice spektroskopskim metodama, i/ili kvantno-mehaničkim računima na manjim molekulama pa se empirijske metode temelje na pretpostavci prenosivosti nekih svojstava atoma i veza, kao skupova konstanti, od manjih molekula na veće. Budući da se funkcija ukupne potencijalne energije sustava s pripadnim parametrima naziva polje sila, tzv. metode polja sila pripadaju empirijskim metodama molekulskog modeliranja.

Polje sila sastoji se od „veznog“, koji opisuje interakcije između atoma povezanih kovalentnom vezom, i „neveznog“ člana koji opisuje elektrostatske i van der Waalsove interakcije među atomima. Ako se elektrostatske interakcije opisuju Coulombovim potencijalom, odnosno kao interakcije između točkastih naboja, polje sila je aditivno. Ako polje sila uključuje eksplicitni član koji uzima u obzir polarizaciju raspodjele naboja zbog utjecaja okoline, ono je neaditivno ili polarizabilno. Opći oblik aditivnog polja sila može se zapisati izrazom:

$$U_{ukupna} = U_{veza} + U_{kut} + U_{torzija} + U_{vdW\ interakcije} + U_{elektrostatske\ interakcije}$$

$$U_{ukupna} = \sum_{veze} k_{veza} (r - r_{eq})^2 + \sum_{kutevi} k_{kut} (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{torzije} \sum_n \frac{1}{2} V_n [1 + \cos(n\omega - \gamma)]$$

$$+ \sum_i^N \sum_j^N \left( 4\varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon r_{ij}} \right)$$

Članovi koji se odnose na energiju istezanja veze ( $U_{veza}$ ) i energiju promjene kuta atoma povezanih kovalentnom vezom ( $U_{kut}$ ) imaju oblik harmonijskog potencijala gdje su  $r$  i  $\theta$  udaljenost, odnosno valentni kut, a  $r_{eq}$  i  $\theta_{eq}$  njihove ravnotežne vrijednosti. Konstanta odgovarajuće sile označava se s  $k$ . Promjena torzijskog kuta ( $U_{torzija}$ ) opisana je periodičnom funkcijom gdje  $V_n$  upućuje na visinu barijere za rotaciju za kut  $\omega$ ,  $n$  je multiplicitet, odnosno minimalan broj nultočaka funkcije prilikom rotacije veze za  $360^\circ$ , a  $\gamma$  je fazni faktor koji određuje položaj minimuma energije.<sup>32</sup> Za opis planarnih aromatskih sustava i konjugiranih sustava koristi se funkcija energije „neprave torzije“ koja ima oblik potencialne funkcije harmoničkog oscilatora. Član koji opisuje van der Waalsove interakcije ( $U_{vdW\ interakcije}$ ) sadrži Lennard-Jonesov potencijal, pri čemu je  $\sigma_{ij}$  sudarni promjer atoma  $i$  i  $j$ ,  $\varepsilon_{ij}$  dubina potencijalne



jame, a  $r_{ij}$  udaljenost između jezgara atoma  $i$  i  $j$ . Elektrostatski doprinos ( $U_{\text{elektrostatske interakcije}}$ ) neveznom članu polja sila dan je Coulombovim potencijalom gdje je  $q$  naboj atoma, a  $\epsilon$  efektivna dielektrična konstanta medija. Polja sila navedenog oblika pripadaju prvoj generaciji i to su AMBER, CHARMM, OPLS i GROMOS. Neka polja sila mogu sadržavati i tzv. mješoviti član koji uključuje spregnuta gibanja između, primjerice, istežanja veza i savijanja kovalentnih kutova te istežanja veza i promjene torzijskih kutova. Polja sila druge generacije uključuju pored empirijski određenih parametara i one određene kvantno-mehaničkim računima.

Metode polja sila dijele se na metode molekulske mehanike (MM) i molekulske dinamike (MD). MM metode koriste se za određivanje geometrije molekule koja odgovara minimumu na plohi potencijalne energije, a MD metode za proučavanje ponašanja sustava u nekom vremenskom periodu.

### 2.2.2. AMBER polje sila

Pojam AMBER (eng. *Assisted Model Building with Energy Refinement*) obuhvaća skup polja sila koja opisuju strukturalna svojstva biomakromolekula (nukleinskih kiselina, proteina, ugljikohidrata i lipida) i paket programa za simulacije molekulske dinamike. Simulacije se najčešće provode u vodenim otopinama (iako su u novije vrijeme česte i simulacije sustava s membranama) i koriste se za ispitivanje međudjelovanja molekula i utvrđivanje njihovih konformacijskih promjena. Nove verzije polja sila omogućuju proučavanje polimera, ali postoje ograničenja kod malih organskih molekula zbog dostupnih parametara i modela na kojem se polja sila temelje.<sup>33</sup>

Kako bi se obuhvatile i male organske molekule u AMBER polja sila, razvijeno je tzv. opće AMBER polje sila (eng. *General Amber force field*, GAFF) koje sadrži 33 osnovna tipa atoma i 22 posebna tipa atoma što omogućava karakterizaciju organskih molekula i s heteroatomima poput N, O, S, P, F, Cl, Br i I. GAFF je u potpunosti kompatibilno s AMBER poljima sila. Zajedno, ova polja sila mogu se primjeniti za proučavanje složenih sustava koji sadrže makromolekule i male organske molekule što je veoma korisno u ispitivanju načina vezanja liganda u receptor, dizajniranju lijekova te računanju slobodnih energija vezanja.<sup>34</sup>

### 2.2.3. Simulacije molekulske dinamike

Za male molekule u plinovitoj fazi moguće je predvidjeti točna termodinamička svojstva nakon minimizacije potencijalne energije sustava, ali za predviđanje svojstava tekućina, otopina i čvrstih tvari, procesa adsorpcije molekula te ponašanje makromolekula u različitim uvjetima gdje je prisutno mnogo bliskih minimuma na plohi potencijalne energije ne može se pretražiti cijela ploha kako bi se predvidjela željena svojstva sustava. Računalne metode

simulacije omogućavaju predviđanje termodinamičkih svojstava i sustava za koje nema eksperimentalnih podataka, pružaju strukturne informacije o konformacijskim promjenama molekula te njihovoj raspodjeli u sustavu. Simulacije molekulske dinamike (MD) koriste se kako bi se ispitala dinamika približno realnih sustava. Vremenskim uprosječivanjem veličina sakupljenih tijekom dovoljno dugih simulacija mogu se odrediti termodinamička, odnosno makroskopska svojstva simuliranog sustava koja se mogu eksperimentalno izmjeriti. Monte Carlo (MC) simulacije nalaze novu konfiguraciju sustava nasumičnim pomicanjem pojedinog atoma ili molekule koristeći poseban skup kriterija za odluku o prihvatanju ili odbacivanju nove konfiguracije. Pored potencijalne energije u MD simulacijama važnu ulogu ima kinetička energija o kojoj ovisi brzina i vjerodostojnost pretraživanja plohe potencijalne energije. U MC simulaciji ukupna energija određena je izravno iz funkcije potencijalne energije.

Razvoj sustava tijekom MD simulacije definiran je jednadžbama gibanja, najčešće Newtonovim. Prema Newtonovim jednadžbama gibanja sila koja djeluje na pojedini atom,  $F_i$ , jednaka je umnošku njegove mase,  $m_i$ , i druge derivacije njegovog položaja u vremenu:

$$F_i = m_i \frac{\partial^2 \mathbf{q}_i}{\partial t^2} = m_i \frac{\partial \mathbf{v}_i}{\partial t}$$

odnosno negativnoj derivaciji potencijalne energije s obzirom na interne koordinate,  $q_i$ :

$$F_i = - \frac{\partial U(\mathbf{q}_1, \mathbf{q}_2, \dots, \mathbf{q}_n)}{\partial \mathbf{q}_i}.$$

Budući da se sila koja djeluje na pojedini atom kontinuirano mijenja s promjenom položaja, jednadžba gibanja dobivena kombinacijom prethodnih dviju jednadžbi mora se integrirati da bi se dobila vremenska ovisnost promjene položaja i brzina atoma, a njihova gibanja u nekom sustavu su spregnuta. Jednadžbe takvog gibanja ne mogu se riješiti analitički već se rješavaju numerički, rastavljanjem računa na niz veoma kratkih vremenskih intervala, obično od 1 fs što je za red veličine kraće od perioda vibracije C-H veze koje predstavlja najbrže gibanje u klasičnom molekulskom sustavu te ograničava vrijeme simulacije. Tako je za simulaciju od 10 ns potrebno  $10^7$  računskih koraka što je za velike sustave veoma dugotrajno. Vremenski interval može se dva do tri puta povećati korištenjem tzv. SHAKE algoritma<sup>35</sup> kojim se „zamrzavaju“ određeni stupnjevi slobode gibanja atoma, najčešće vibracije veze atoma vodika s nekim težim atomom.

Početna konfiguracija sustava obično je neka poznata struktura dobivena rentgenskom strukturnom analizom, a početne se brzine dodjeljuju nasumično svakom atomu ili molekuli prateći Maxwell-Boltzmannovu raspodjelu pri definiranoj temperaturi. Tijekom simulacija u redovitim razmacima na temelju kinetičke energije računa se trenutna temperatura sustava kako bi se došlo do ukupne energije sustava te odgovarajuće sile na pojedini atom. Nakon svakog koraka računaju se sile na atome i u kombinaciji s trenutnim

položajima i brzinama određuju se novi položaji i brzine. Tijekom svakog koraka, intervala od 1 do 2 fs, koristi se pretpostavka da je sila koja djeluje na atom konstantna. Atomi se zatim pomiču u nove položaje, računa se novi skup sila i postupak se ponavlja. Na taj se način tijekom MD simulacija dobivaju trajektorije koje opisuju promjenu strukture i energije sustava s vremenom.

Kako bi se uvjeti promatranog sustava što više podudarali s realnima i rezultati eventualno mogli usporediti s eksperimentalnima, simulacije se provode u otapalu (voda za biomakromolekule) koje se može opisati implicitno, tzv. model kontinuuma, ili eksplicitno simulacijama pojedinačnih molekula vode, ili kombinacijom oba pristupa. Jedan od eksplicitnih modela vode, korišten i u ovom radu, jest TIP3P model kod kojega molekula vode ima tri središta elektrostatskih interakcija, parcijalni negativni naboj pripisan je atomu kisika i neutraliziran je dvama parcijalnim pozitivnim nabojima na atomima vodika, van der Waalsove interakcije imaju središte samo na atomu kisika, a kovalentne veze se ne računaju (molekula je kruta).<sup>36</sup> Sustav koji se promatra zajedno s molekulama otapala, i eventualno ionima dodanima za neutralizaciju sustava poput Na<sup>+</sup> i Cl<sup>-</sup>, smješta se u tzv. kutiju (eng. *box*) koja je najčešće krnji oktaedar. Također, nužno je koristiti periodične rubne uvjete (eng. *periodic boundary conditions*) kako bi se izbjegli neželjeni rubni efekti kada molekule u sustavu dolaze do rubova kutije. Na taj se način kutija sa sustavom preslikava u sve tri dimenzije prostora premda se simulacije odnose samo na središnju kutiju, a sve ostale su virtualne. Kada tijekom simulacije neka molekula prijeđe izvan granica kutije, zamjenit će je njezina slika iz susjedne virtualne kutije. U središnjoj kutiji su, dakle, očuvani broj čestica, masa, temperatura i tlak.

Osim otapala, potrebno je sustav održavati u uvjetima sličnim eksperimentalnim, odnosno pri stalnom volumenu i temperaturi (dobiva se kanonski ansambl struktura) ili stalnom tlaku i temperaturi (dobiva se izobarno-izotermni ansambl struktura). Za te se svrhe koriste određeni termostati, poput Berendsenovog,<sup>37</sup> Langevinovog<sup>38</sup> i Nosé-Hooverovog,<sup>39</sup> te barostati, poput Brendsenovog.

#### 2.2.4. Slobodna energija vezanja

*Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann* (ili *Generalized Born*) *Surface Area* (MM-PB(GB)SA) računi metode su koje se temelje na rezultatima MD (ili MC) simulacija i koriste se za računanje promjene slobodne energije između dva stanja, primjerice vezanog i slobodnog stanja receptora i liganda. Razlike se dobivaju zbrajanjem doprinosa slobodne energije sustava u vakuumu i slobodne energije otapanja (solvatacije) sustava pri čemu se koristi implicitna reprezentacija otapala.

$$\Delta_r G^{\circ}_{vezanja,sol} = \Delta_r G^{\circ}_{vezanja,vakuu} + (\Delta_{sol} G^{\circ}_{kompleks} - \Delta_{sol} G^{\circ}_{ligand} - \Delta_{sol} G^{\circ}_{receptor})$$

Slobodna energija solvatacije ima polarni i nepolarni doprinos. Polarni (elektrostatski) doprinos slobodnoj energiji otapanja može se dobiti numeričkim rješavanjem linearne Poisson-Boltzmannove (PB) jednačbe ili poopćene Bornove jednačbe (eng. *Generalized Born, GB*), a nepolarni doprinos računanjem površine dostupne otapalu (eng. *solvent accessible surface area, SASA*).<sup>40</sup> Entropijski doprinos ukupnoj slobodnoj energiji, temeljen na analizi normalnih modova, i/ili na analizi mogućih rotamera pojedinih ostataka u sustavu i samih molekula koje su u interakciji, može se dodati kao poboljšanje računa.

## § 3. Računalne metode

### 3.1. Priprema sustava

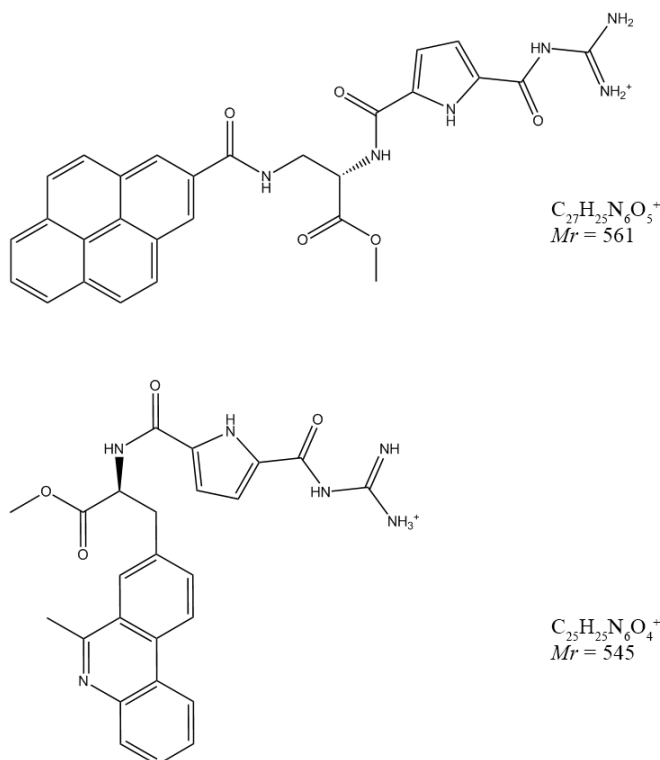
U ovom radu koristile su se dvije različite početne konformacije ljudske DPP III za MD simulacije vezanja liganada. Kompaktna trodimenzionalna struktura DPP III preuzeta je iz proteinske baze podataka (PDB kod: 3T6B), a manje kompaktna struktura dobivena je prethodno<sup>41</sup> kao rezultat 72 ns simulacije strukture 3FVY i u radu je označena kao cWT<sub>MD</sub>.

U strukturama DPP III korištenima u ovom radu nedostajala su prva tri aminokiselinska ostatka koji pripadaju petlji udaljenoj od šupljine enzima i ne utječu na vezanje supstrata, a nedostaju i u kristalnim strukturama u proteinskoj bazi podataka.

Struktura označena kao 3T6B odgovara kompleksu E451A mutanta ljudske DPP III s tinorfinom bez cinkovog iona u aktivnom mjestu. Za potrebe modeliranja molekula tinorfina uklonjena je iz aktivnog mjesta enzima, A451 je mutiran u E451, a ion cinka dodan tako da mu je položaj u aktivnom mjestu određen sravnjivanjem strukture 3T6B sa strukturom 3FVY iz proteinske baze podataka. Kriterij sravnjivanja bio je položaj H450, H455 i E508. Dobivena struktura predstavlja kompaktnu konformaciju enzima u radu označenu kao cWT.

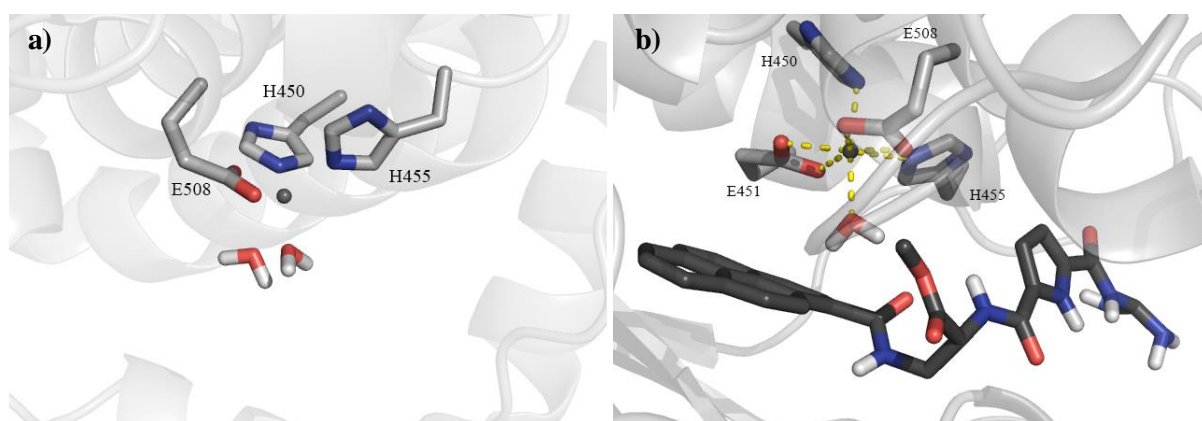
Za obje strukture protonacijska stanja aminokiselinskih ostataka određena su pomoću servera WHATIF (pri pH=7, <http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html/index.html>), a za histidine protonacijsko stanje određeno je prema mogućnosti stvaranja vodikovih veza s aminokiselinskim ostatcima u susjedstvu.

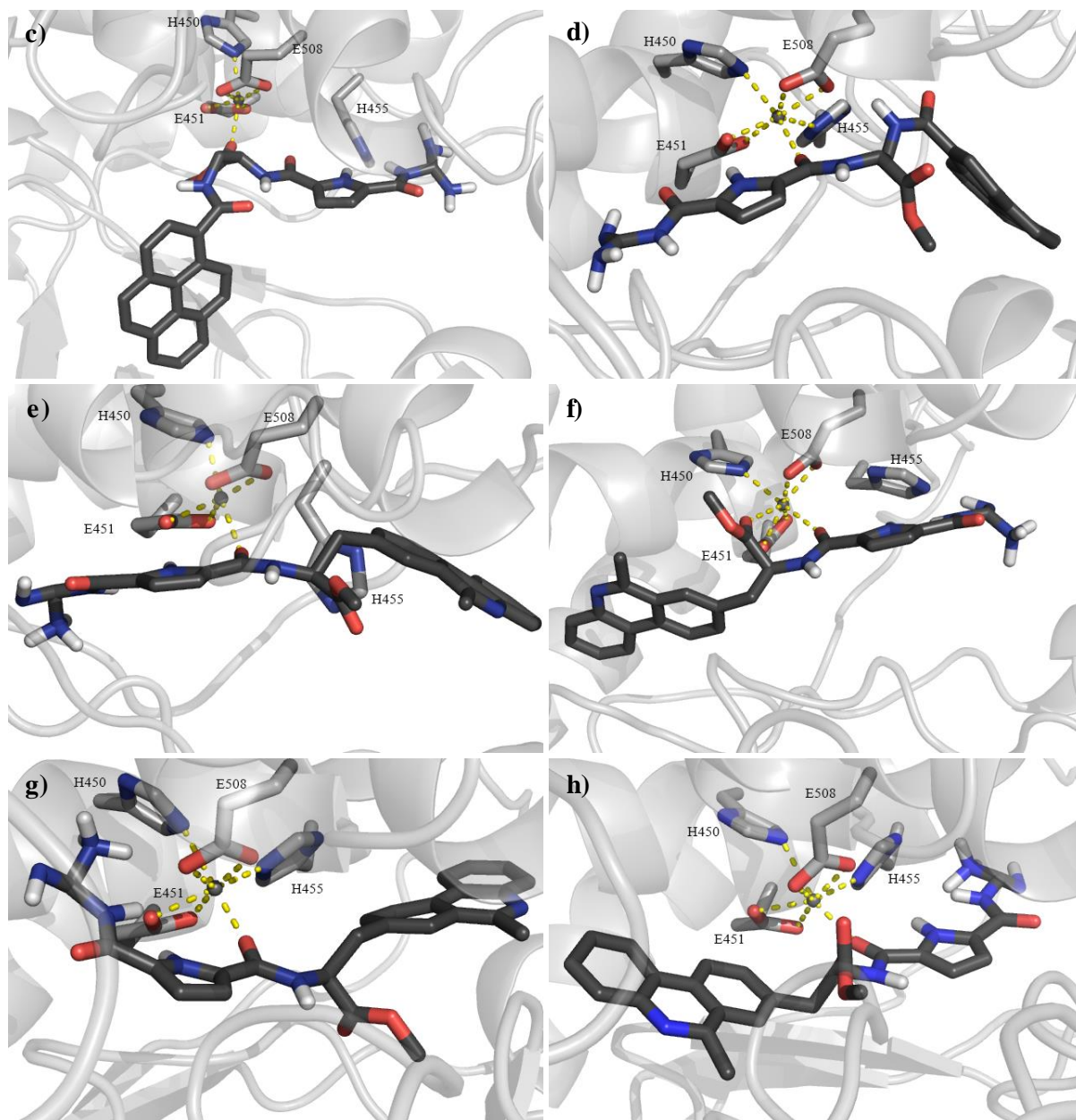
3D strukture liganda  $C_{27}H_{25}N_6O_5^+$ , u radu označenim s **1**, i  $C_{25}H_{25}N_6O_4^+$ , u radu označenim s **2**, (nose pozitivan naboj jer su protonirani na jednom dušikovom atomu gvanidinijeve skupine) (slika 4) konstruirane su u programu GaussView 5.0,<sup>42</sup> a parametrizacija je provedena pomoću programa *antechamber* iz programskog paketa AMBER14<sup>43</sup> korištenjem polja sila GAFF i AM1-BCC naboja. Parametri za ion cinka prethodno su razvijeni tako da je naboj iznosio +2,0 *e*, van der Waalsov radijus 1,22 Å, a energija minimuma van der Waalsove interakcije 0,250 kcal mol<sup>-1</sup>.<sup>44, 45</sup>



Slika 4. Inhibitori korišteni za MD simulacije kompleksa s DPP III.

Kompleksi su priređeni programom AUTODOCK4.2<sup>46</sup> ili ručno, rotiranjem liganda nakon uklapanja (eng. *docking*) za 180° kako bi se aromatski sustav doveo u položaj sličan položaju RRNA u aktivnom mjestu DPP III.<sup>47</sup> Za uklapanje se koristio algoritam Lamarckov genetički algoritam, a središte „kutije“ unutar koje je definirano aktivno mjesto proteina određeno je koordinatama iona cinka. Najzastupljeniji način vezanja liganda odabran je kao ishodište za daljnju konformacijsku pretragu pomoću MD simulacija. Aktivno mjesto ljudske DPP III i koordinacija iona cinka u eksperimentalno (difrakcijom X-zraka) određenoj strukturi (PDB kôd: 3FVY) i u kompleksima čije su simulacije predmet ovog rada prikazani su na slici 5 a-h. cWT<sub>MD</sub>-1(AD1), cWT<sub>MD</sub>-1(AD2), cWT<sub>MD</sub>-2(AD) i cWT-2(AD) dobiveni su molekulskim uklapanjem pomoću programa AUTODOCK4.2, a cWT-1, cWT<sub>MD</sub>-2 i cWT-2 dobiveni su ručnom promjenom položaja liganda iz onih dobivenih uklapanjem.





**Slika 5.** Konformacije kompleksa DPP III s ligandima nakon minimizacije i uravnoteživanja. a) 3FVY preuzeta iz proteinske baze podataka, b) cWT-1, c) cWT<sub>MD</sub>-1(AD1), d) cWT<sub>MD</sub>-1(AD2), e) cWT<sub>MD</sub>-2(AD), f) cWT<sub>MD</sub>-2, g) cWT-2(AD) i h) cWT-2.

### 3.2. MD simulacije

U radu su se koristili programi iz programskog paketa AMBER12-15. U programu *tleap* kompleksi su prvo smješteni u kutiju oblika krnjeg oktaedra rubova udaljenih od bilo kojeg atoma proteina barem 11 Å. Kutija je ispunjena TIP3P molekulama vode (oko 20 000 molekula), a kompleksi neutralizirani Na<sup>+</sup> ionima smještenima u blizini negativno nabijenih aminokiselinskih ostataka na površini proteina. Takav sustav simuliran je uz periodične

rubne uvjete. Elektrostatske interakcije računale su se *particle-mesh* Ewaldovom metodom.<sup>48</sup> Polje sila korišteno za simulacije bilo je ff12SB.<sup>49-51</sup>

Tri kruga minimizacije provedena su prije MD simulacija pomoću programa *sander*. Prvi krug sastojao se od 1500 koraka minimizacije od kojih se za prvih 470 koraka koristila metoda najstrmijeg spusta (eng. *steepest descent*), a za ostale metoda konjugiranog gradijenta. Pomicali su se samo molekule vode, a položaji atoma kompleksa ograničeni su harmonijskim potencijalom konstante sile  $133,89 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ . U drugom, koji se sastojao od 2500 koraka i trećem krugu, koji se sastojao od 1500 koraka, zadržan je broj koraka minimizacije metodom najstrmijeg spusta i konjugiranog gradijenta, a konstanta sile za ograničavanje položaja atoma okosnice proteina iznosila je  $50,21 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$  u drugom, odnosno  $4,18 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$  u trećem krugu.

Nakon optimizacije geometrije kompleksa, sustav je uravnotežen zagrijavanjem od 0 do 300 K tijekom 30 ps, uz korak simulacije od 1 fs, korištenjem Langevinovog termostata s frekvencijom sudara od  $1 \text{ ps}^{-1}$  (*NVT* ansambl). Drugi korak uravnoteživanja sustava, također tijekom 30 ps, uz korak od 1 fs, proveden je u uvjetima konstantnog tlaka od 1 atm s izotropnim skaliranjem položaja korištenjem Brendsenovog barostata kako bi se prilagodila gustoća sustava. Željena temperatura (300 K) održavana je korištenjem Langevinovog termostata (*NPT* ansambl).

Produktivna MD simulacija provedena je za svaki kompleks pri dvije temperature. Nakon uravnoteživanja je provedeno 20 ns simulacije pri 300 K, uz korištenje SHAKE algoritma, za ograničavanje veza s atomom vodika, tako da je vremenski korak simulacija povećan na 2 fs. Temperatura je održavana Langevinovim termostatom, a tlak Brendsenovim barostatom uz izotropno skaliranje položaja atoma (*NPT* ansambl). Zatim je uslijedilo zagrijavanje sustava od 300 do 400 K u trajanju od 100 ps uz uvjete konstantnog volumena i temperature (*NVT* ansambl) pri čemu nije korišten SHAKE algoritam, a korak u simulacijama iznosio je 1 fs. Uslijedila je simulacija pri 400 K, analogna početnoj pri 300 K (*NPT* ansambl uz SHAKE algoritam), u trajanju od 20 ns. Sustav se potom hladio 100 ps do 300 K analogno zagrijavanju (*NVT* ansambl bez SHAKE algoritma). Posljednji krug simulacije proveden je pri 300 K u trajanju od 20 ns na isti način kao i prvi krug. Položaji atoma i dimenzije kutije zapisivani su svake 2 ps prilikom simulacija *NPT* ansambla.

### 3.3. Računi slobodne energije vezanja

Za računanje slobodnih energija vezanja liganda u aktivno mjesto proteina koristila se python skripta MMPBSA.py iz programskog paketa AMBER12. Budući da su MD simulacije provedene samo na kompleksima enzima s ligandima, a ne i za svaku komponentu posebno, račun je proveden nakon razdvajanja koordinata prikupljenih simulacijama kompleksa u



otapalu na komponente: koordinate enzima (receptora), koordinate liganda i koordinate kompleksa, pri čemu su koordinate molekula vode i iona zanemarene.

Račun slobodnih energija proveden je MM-PBSA i MM-GBSA računima na koordinatama ekstrahiranim (izvađenim) iz trajektorije generirane tijekom posljednjih 5 ns simulacija s razmakom od 200 ps. Zbog računalne zahtjevnosti izbjegnuto je računanje entropijskog doprinosa slobodnoj energiji. Za MM-PBSA račune ionska jakost otopine s kompleksom iznosila je 0,1 mM, dielektrična konstanta enzima i kompleksa iznosila je 2, a otapala 80. Napolarni doprinos slobodnoj energiji otapanja računao se prema izrazu:  $\Delta_{sol}H_{np} = \gamma SASA + \beta$ , gdje je  $\gamma$ , površinska napetost, iznosila  $0,0378 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ , a odsječak (eng. *offset*),  $\beta$ ,  $-0,5692 \text{ kJ mol}^{-1}$ . U MM-GBSA računima, za polarni doprinos slobodnoj energiji otapanja koristio se model koji su razvili Hawkins, Cramer i Truhlar.<sup>51</sup> Ionska jakost iznosila je 0,1 M, dielektrična konstanta enzima i kompleksa 1, a otapala 80. Napolarni doprinos slobodnoj energiji otapanja računao se na isti način kao i kod MM-PBSA pristupa.

### 3.4. Analize promjena geometrije

#### 3.4.1. RMSD (eng. root mean square deviation)

Korijen iz srednjeg kvadrata odstupanja (*RMSD*) računa se prema izrazu:

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

gdje je  $N$  broj atoma,  $r_{A,i}$  položaj  $i$ -tog atoma u strukturi A, a  $r_{B,i}$  položaj istog atoma u strukturi B. *RMSD* je pokazatelj odstupanja strukture od referentne, najčešće početne, tijekom MD simulacije. Za svaki kompleks u programu *cpptraj* programskog paketa AMBER14 provedene su *RMSD* analize okosnice pojedinih domena proteina od kojih je gornja definirana aminokiselinskim ostacima N336-F370, Y417-K458 i T493-R669, a donja Q4-V335, S374-Y416 i L670-W726. Fleksibilna petlja, L459-E492, izostavljena je iz računa za *RMSD* vrijednosti gornje domene.

#### 3.4.2. RMSF (eng. root mean square fluctuations)

Korijen srednjeg kvadrata fluktuacija (*RMSF*) računa se prema izrazu:

$$RMSF = \sqrt{\frac{\sum_{t_j-1}^T (r_i(t_j) - r_i^{ref})^2}{T}}$$

*RMSF* je mjera odstupanja položaja  $i$ -tog atoma, aminokiselinskog ostatka ili dijela proteina od referentnog položaja,  $r_i^{ref}$ , u vremenu  $T$ , a računa vremenski prosjek za pojedini atom, aminokiselinski ostatak ili dio proteina te ne daje vremenski ovisne vrijednosti. Prilikom

obrade rezultata MD simulacije, *RMSF* se računa po pojedinom aminokiselinskom ostatku. *RMSF* analiza proteina provedena je za zadnjih 10 ns simulacija kada se očekuje da kompleks ne mijenja mnogo svoju konformaciju. Najveće *RMSF* vrijednosti pripadaju onim aminokiselinskim ostacima čiji se položaji najviše mijenjaju tijekom simulacije.

### 3.4.3. Radijus giracije

Radijus giracije,  $R_g$ , računa se prema formuli:

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

gdje je  $R_i$  položaj  $i$ -tog atoma od centra mase molekule,  $R_{CM}$ , a  $N$  je ukupan broj atoma. Radijus giracije mjeri je globularnosti proteina: što je on manji, protein je globularniji, odnosno kompaktniji. U ovom radu radijus giracije računao se za atome okosnice proteina.

### 3.4.4. Promjene udaljenosti između atoma

Kako bi se detaljnije pratila promjena konformacije enzima, praćene su promjene udaljenosti između  $C\alpha$  atoma aminokiselinskih ostataka D186 (u donjoj domeni) i S500 (u gornjoj domeni) te Q400 (u donjoj domeni) i S500, tijekom MD simulacija. Ovi aminokiselinski ostatci odabrani su najbolje opisuju međusobni odnos dviju domena.

Također, praćena je i promjena koordinacije iona cinka. Mjerile su se udaljenosti iona cinka od kisikovih atoma bočnih ogranaka E451 i E508 te od  $N\epsilon$  bočnih ogranaka H450 i H455. U kompleksu cWT-1 praćena je promjena udaljenosti iona cinka od kisikovog atoma središnje peptidne veze.

## § 4. Rezultati i rasprava

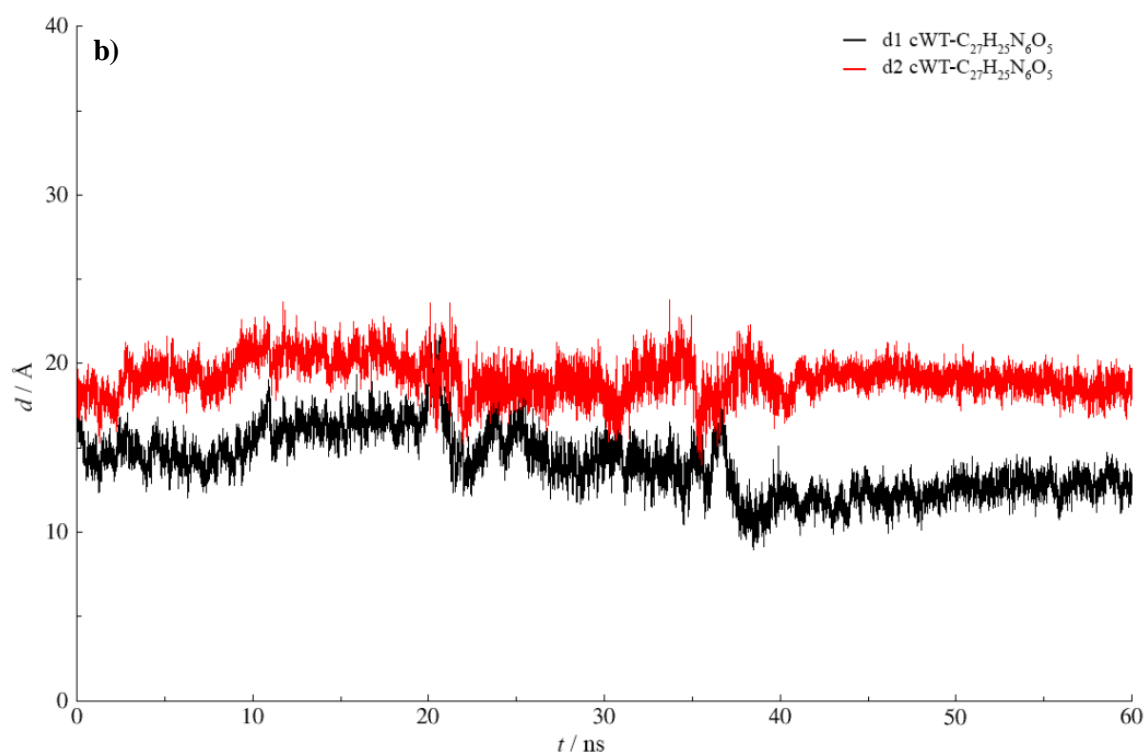
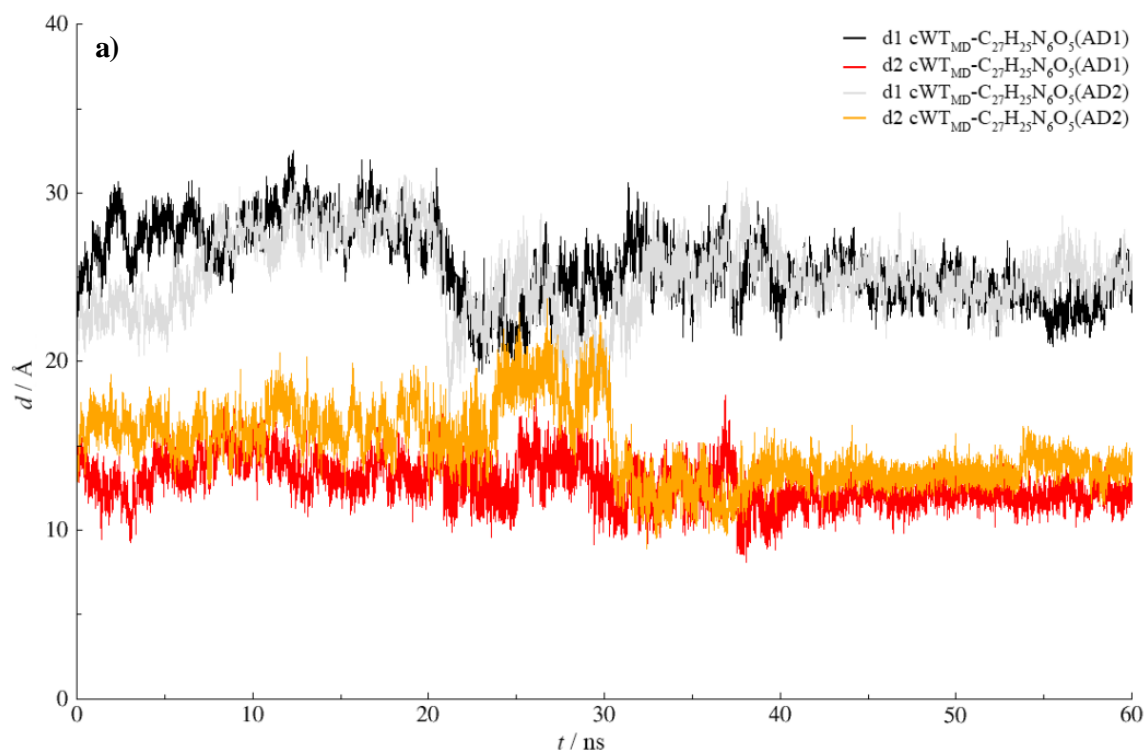
### 4.1. Promjene geometrije kompleksa tijekom MD simulacija

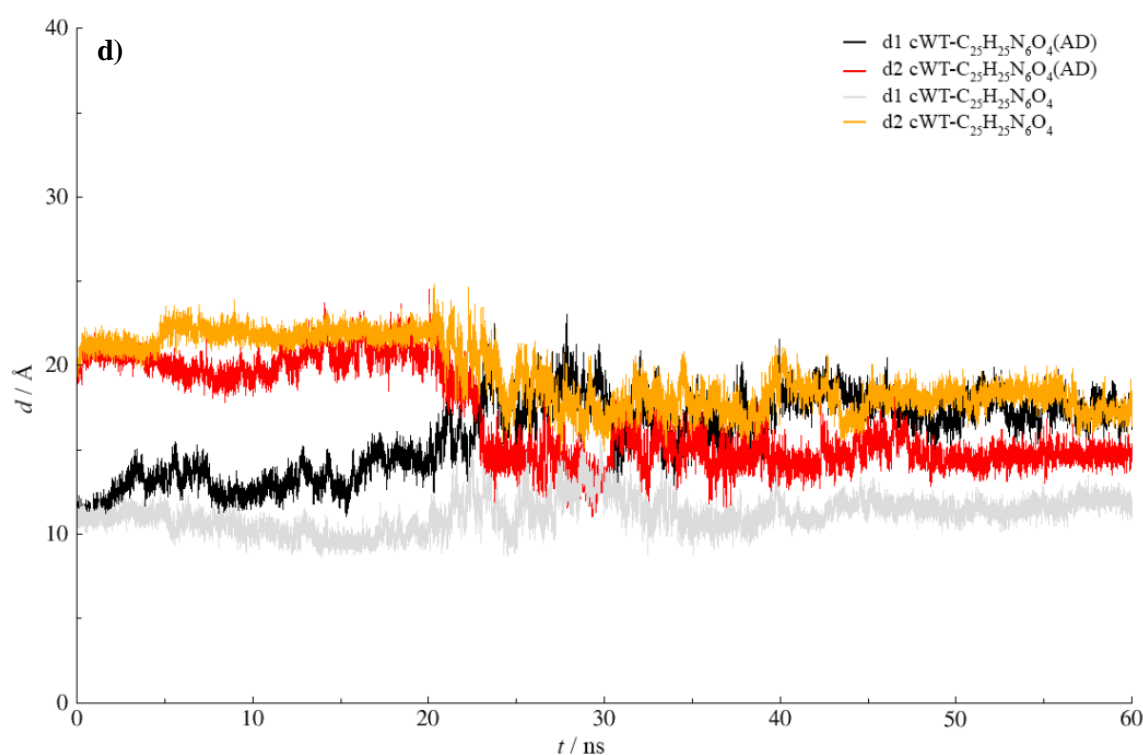
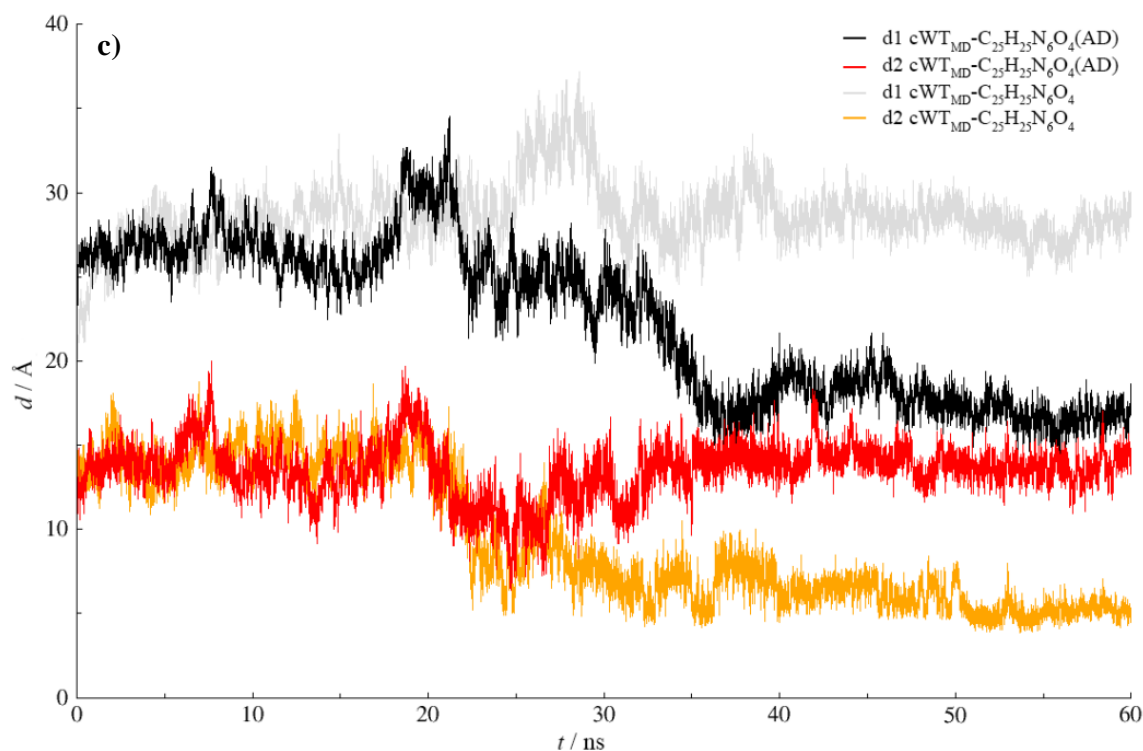
Otprije je poznato da DPP III preferira supstrate s nesupstituiranim amino krajem.<sup>1</sup> Ako uz to sadrže aromatski sustav, najvjerojatnije će se vezati na  $\beta$  ploču donje domene sastavljenu od 5  $\beta$  vrpca.<sup>30</sup> Ta  $\beta$  ploča nalazi se neposredno uz pukotinu koja dijeli donju od gornje domene i njezin položaj definira veličinu aktivnog mjesta. Kompetitivni inhibitori DPP III ispitani u ovom radu poput prirodnih peptida imaju pozitivno nabijenu krajnju amino skupinu, tri peptidne veze i veliki aromatski sustav na P<sub>1</sub>' položaju.

Kompleks ljudske DPP III u kompaktnoj konformaciji s ligandom **1** dobiven je na osnovi kompleksa E451A mutanta ljudske DPP III s tinorfinom<sup>30</sup> tako da je aromatski sustav okrenut prema unutrašnjosti enzima. Ovaj kompleks nazvan je cWT-1. Kompleksi manje kompaktne konformacije DPP III, DPP III<sub>MD</sub>, s istim ligandom dobiveni su pomoću programa AUTODOCK4.2, pri čemu su izdvojena dva, energetski najpovoljnija, načina uklapanja liganda. Kompleksi su nazvani cWT<sub>MD</sub>-1(AD1) i cWT<sub>MD</sub>-1(AD2).

Jedan kompleks ljudske DPP III u kompaktnoj konformaciji s ligandom **2**, dobiven je pomoću programa AUTODOCK4.2 (cWT-2(AD)), a drugi rotacijom liganda u tom kompleksu za 180° analogno položaju RRNA u DPP III<sup>47</sup> (cWT-2). Isto je učinjeno i s kompleksima manje kompaktnog enzima, DPP III<sub>MD</sub>, s ligandom **2** koji su nazvani cWT<sub>MD</sub>-2(AD) i cWT<sub>MD</sub>-2.

Svi navedeni kompleksi simulirani su po 60,2 ns. Kako bi utvrdili stabilnost kompleksa i utjecaj liganada na strukturu i dinamička svojstva proteina analiziran je niz geometrijskih parametara. U svrhu analize međusobnog položaja dviju domena praćena je promjena udaljenosti,  $d$ , između C $\alpha$  atoma D186 i S500 (d1) te Q400 i S500 (d2) (slika 6 a-d). Ranije studije pokazale su da navedene udaljenosti najbolje opisuju međusobni položaj dviju domena.<sup>53</sup>

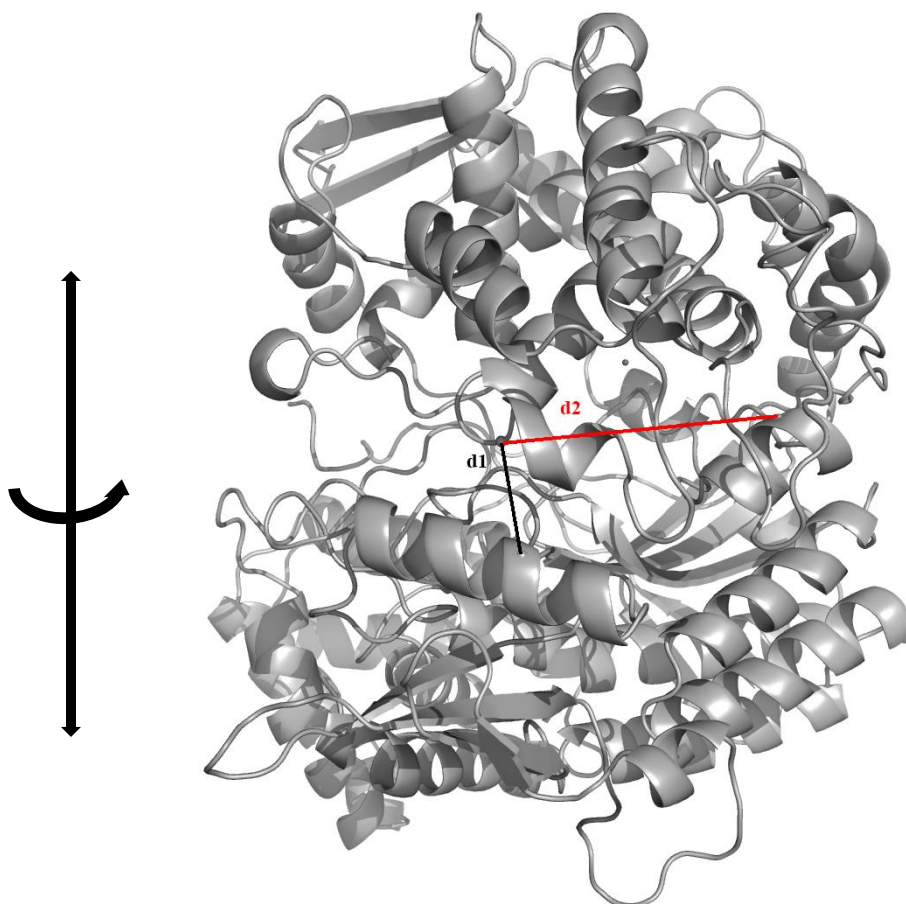




**Slika 6.** Udaljenosti između  $Ca$  atoma aminokiselinskih parova D186-S500 (d1) i Q400-S500 (d2) tijekom MD simulacija. **a)** Komplex manje kompaktne DPP III s ligandom 1 dobiven u AUTODOCK-u,  $cWT_{MD-1}(AD1)$  i  $cWT_{MD-1}(AD2)$ ; **b)** kompleks kompaktne DPP III s ligandom 1,  $cWT-1$ , **c)** kompleksi manje kompaktne DPP III s ligandom 2,  $cWT_{MD-2}(AD)$  i  $cWT_{MD-2}$ , **d)** kompleksi kompaktne DPP III s ligandom 2,  $cWT-2(AD)$  i  $cWT-2$ .

Tijekom simulacije, najmanja promjena udaljenosti d1 u prosjeku se dogodila kod kompleksa  $cWT-2$  (slika 6 d), a najveća kod kompleksa  $cWT_{MD-2}(AD)$  (slika 6 c). Najmanja promjena

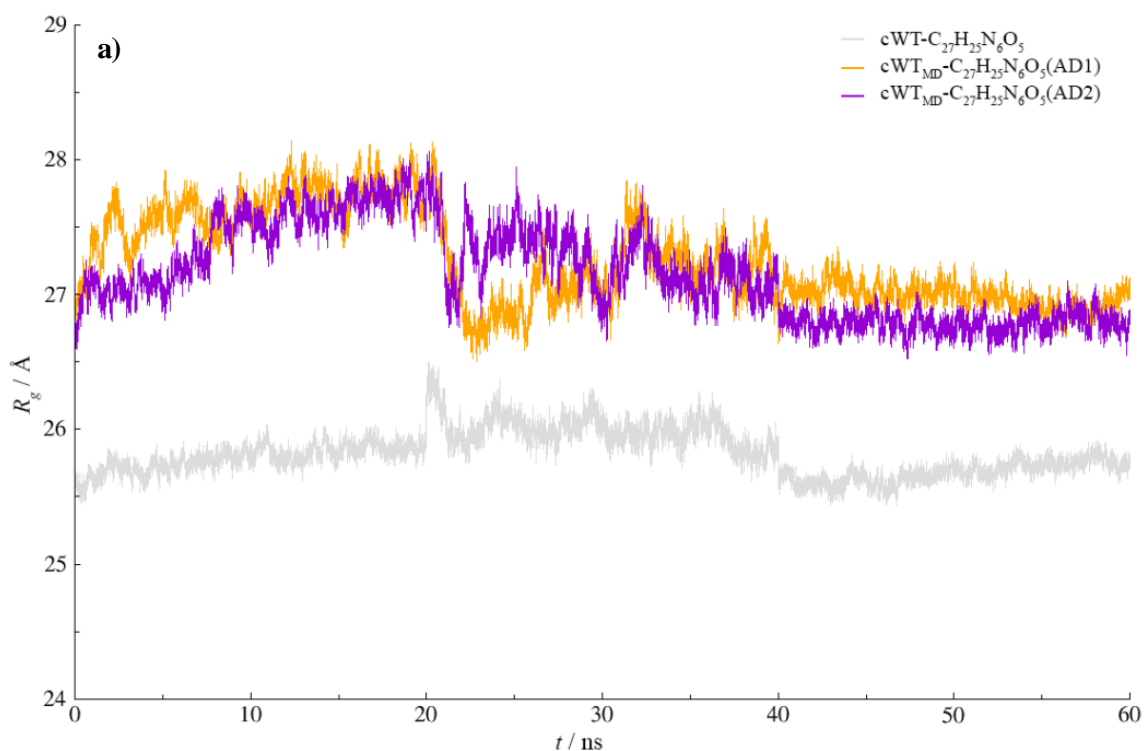
udaljenosti d2 u prosjeku se dogodila kod kompleksa cWT-1 (slika 6 b), a najveća kod cWT<sub>MD</sub>-2 (slika 6 c). Dobiveni rezultati ukazuju da ligand 2 ima veći utjecaj na dinamiku enzima od liganda 1. Udaljenost d1 bila je veća u svim kompleksima u kojima je enzim početno bio u manje kompaktnoj konformaciji i ostala je veća od udaljenosti d2 tijekom cijele simulacije. Kod kompleksa u kojem je enzim početno bio u kompaktnijoj konformaciji udaljenost d2 veća je od udaljenosti d1 na početku simulacije i takav odnos među njima sačuvan je tijekom simulacija kompleksa cWT-1 i cWT-2. Tijekom simulacije cWT-2(AD) kompleksa, nakon 22 ns, dolazi do izmjene i udaljenost d1 postaje veća od udaljenosti d2 i takva ostaje do kraja simulacije. Tijekom simulacije cWT<sub>MD</sub>-2(AD) kompleksa opaža se, nakon 35 ns, značajno smanjenje razlike udaljenosti d1 i d2. Kako odnos udaljenosti d1 i d2 opisuje odnos dviju domena proteina, može se zaključiti da vezanje liganda 2 na način predviđen programom AUTODOCK4.2 dovodi do promjene međusobne orijentacije domena koja se može opisati kao antiperiplanarna rotacija. Na slici 7 prikazane su udaljenosti d1 i d2 te smjer promjene konformacije proteina.

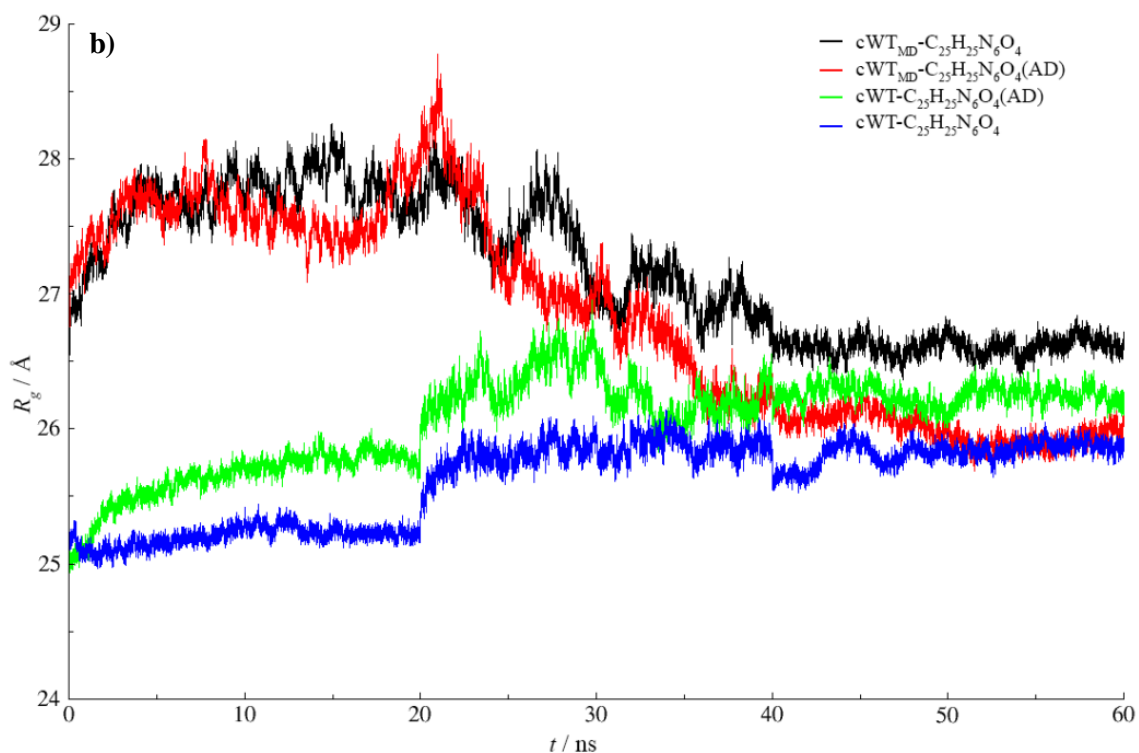


Slika 7. Udaljenosti C $\alpha$  atoma aminokiselinskih ostataka D18 i S500 (d1), odnosno Q400 i S500 (d2) te smjer promjene konformacije DPP III.

Radius giracije okosnice proteina pratio se tijekom MD simulacije svakog kompleksa. Na slici 8 a uspoređeni su radijusi giracije kompleksa DPP III s ligandom 1, a na slici 8 b radijusi giracije kompleksa DPP III s ligandom 2. Promjene radiusa giracije su veće u

kompleksima s ligandom **2** nego s ligandom **1**, u skladu s prethodnim zaključkom da taj ligand značajnije perturbira protein.  $R_g$  se ponešto povećava kod svih kompleksa u početnoj fazi simulacija što upućuje na međusobno razmicanje dviju domena u svrhu boljeg smještanja liganda. Različito od simulacija ostalih kompleksa, tijekom simulacija kompleksa liganda **2** s početno kompaktnijom konformacijom enzima, cWT-2 i cWT-2(AD),  $R_g$  se konstantno povećava do 30 ns te u periodu 25-30 ns.  $R_g$  enzima u kompleksu cWT-2(AD) odgovara onome kod manje kompaktne strukture. Dobiveni rezultati upućuju na to da „zatvaranje“ enzima nije jednosmjernan proces. cWT<sub>MD</sub>-1(AD1) i cWT<sub>MD</sub>-1(AD2) imaju veoma sličan profil  $R_g$  većinu vremena (slika 8 a).





Slika 8. Radijusi giracije kompleksa DPP III s a) ligandom 1 i b) ligandom 2.

U tablici 1 nalaze se prosječne vrijednosti udaljenosti između aminokiselinskih parova D186-S500 i Q400-S500 te prosječne vrijednosti radijusa giracije tijekom zadnjih 5 ns simulacije i pripadne standardne devijacije.

Tablica 1. Prosječne udaljenosti između aminokiselinskih parova D186-S500 ( $\langle d1 \rangle$ ) i Q400-S500 ( $\langle d2 \rangle$ ) te prosječni radijus giracije,  $\langle R_g \rangle$ , s pripadnim standardnim devijacijama,  $\sigma$ , svih kompleksa tijekom zadnjih 5 ns simulacije.

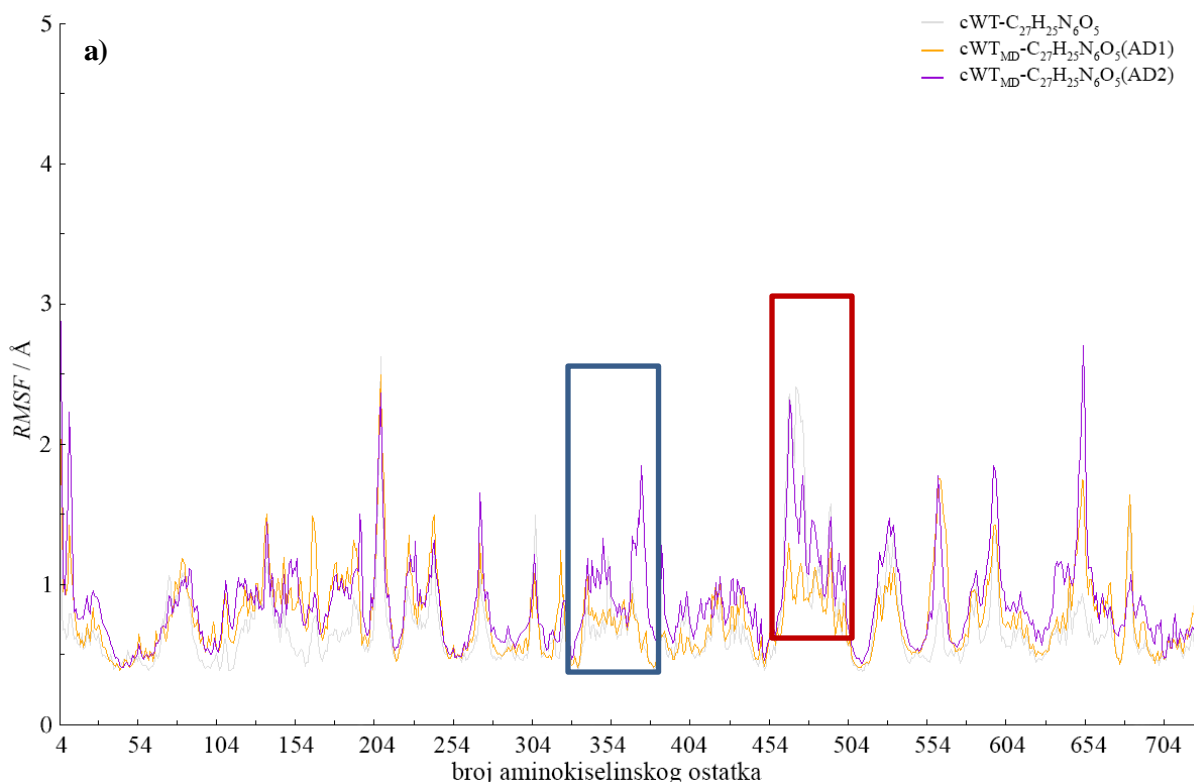
	$\langle d1 \rangle \pm \sigma / \text{\AA}$	$\langle d2 \rangle \pm \sigma / \text{\AA}$	$\langle R_g \rangle \pm \sigma / \text{\AA}$
cWT-1	$12,9 \pm 0,6$	$18,6 \pm 0,6$	$25,76 \pm 0,05$
cWT <sub>MD</sub> -1(AD1)	$24 \pm 1$	$12,1 \pm 0,6$	$26,91 \pm 0,08$
cWT <sub>MD</sub> -1(AD2)	$25,2 \pm 0,9$	$13,8 \pm 0,6$	$26,81 \pm 0,08$
cWT-2(AD)	$17,5 \pm 0,7$	$14,7 \pm 0,4$	$26,24 \pm 0,06$
cWT-2	$11,9 \pm 0,4$	$17,6 \pm 0,7$	$25,88 \pm 0,05$
cWT <sub>MD</sub> -2(AD)	$16,6 \pm 0,7$	$13,7 \pm 0,8$	$25,93 \pm 0,07$
cWT <sub>MD</sub> -2	$27,9 \pm 0,9$	$5,2 \pm 0,4$	$26,65 \pm 0,06$

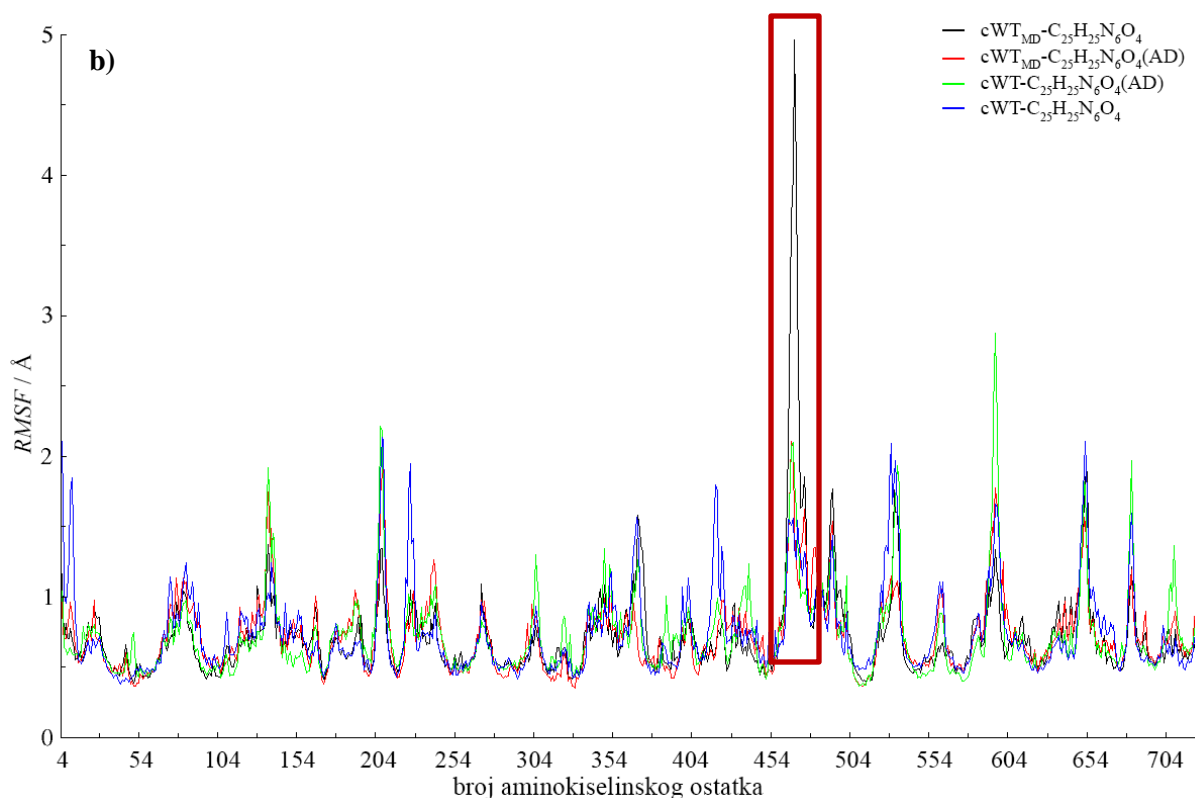
Iz tablice je vidljivo da kompleksi s enzimom u kompaktnijoj konformaciji imaju veću prosječnu udaljenost  $d1$  od onih u kojima je enzim početno bio u manje kompaktnoj



koformaciji. Udaljenost  $d_2$  manja je kod kompleksa u kojima je enzim početno bio u manje kompaktnej konformaciji. Prosječna vrijednost  $R_g$  tijekom posljednjih 5 ns pokazuje povećanje globularnosti enzima koji je početno bio u manje kompaktnej konformaciji tijekom simulacije, što je posebno istaknuto u slučaju kompleksa cWT<sub>MD</sub>-2(AD), dok tijekom simulacije kompleksa s kompaktnim enzimom dolazi do blagog „otvaranja“ tijekom čitave MD simulacije. Razlike vrijednosti prosječnih  $R_g$  enzima na kraju MD simulacija kompleksa s istim ligandom uglavnom su vrlo male (unutar 1 Å) i ukazuju da se enzim iz manje kompaktnej konformacije približio kompaktnej, odnosno „zatvorio“ se. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da su kompleksi ljudske DPP III s ligandima **1** i **2** u otapalu kompaktni, no da je ta kompaktnost ipak nešto manja od one uočene u kristalnoj strukturi DPP III s tinorfinom (PDB kôd: 3T6B).<sup>30</sup>

Kako bi se ispitali utjecaji pojedinih aminokiselinskih ostataka na ukupnu fleksibilnost proteina, izrađen je *RMSF* profil DPP III tijekom zadnjih 10 ns MD simulacija kompleksa s ligandima **1** i **2**. Na slici 9 a prikazani su *RMSF* profili kompleksa DPP III s ligandom **1**, a na slici 9 b prikazani su *RMSF* profili kompleksa DPP III s ligandom **2**.

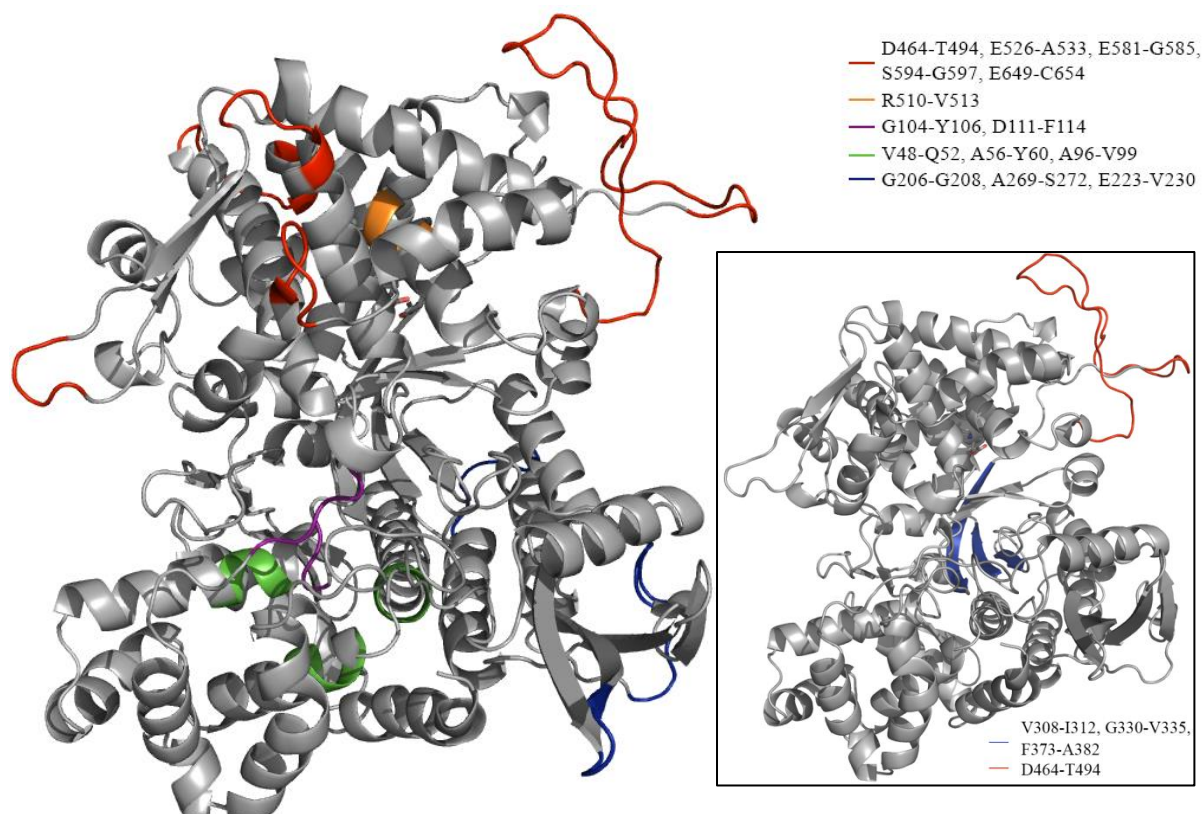




**Slika 9. RMSF profili kompleksa DPP III s a) ligandom 1 i b) ligandom 2.** Plavi kvadrat označava aminokiselinske ostatke koji pripadaju  $\beta$  pločama donje domene, a crveni kvadrati označavaju aminokiselinske ostatke koji pripadaju velikoj fleksibilnoj petlji na gornjoj domeni.

Iz RMSF profila uočljive su znatnije fluktuacije istih aminokiselinskih ostataka u svakom kompleksu. Najveće RMSF vrijednosti pokazuju ostatci G206-G208, A269-S272, E223-V230, D464-T494 (dio koji pripada velikoj fleksibilnoj petlji gornje domene), E526-A533, E581-G585, S594-G597 i E649-C654 i većinom pripadaju nekoj od petlji proteina (slika 10). Aminokiselinski ostatci koji pokazuju najmanje fluktuacije tijekom zadnjih 5 ns simulacije su V48-Q52, A56-Y60 i A96-V99, koji pripadaju zavojnicama u donjoj domeni proteina, G104-Y106 i D111-F114, koji pripadaju petlji u donjoj domeni uvučenoj prema unutrašnjosti proteina, te R510-V513, koji pripadaju najviše „zakopanoj“ zavojnici u gornjoj domeni, iznad očuvanog motiva HELLGH.

Položaj liganda u aktivnom mjestu najviše utječe na fluktuacije aminokiselinskih ostataka iz  $\beta$  ploča donje domene (V308-I312, G330-V335, F373-A382) i fleksibilne petlje na gornjoj domeni. Navedena petlja nalazi se između dvaju heksapeptida HELLGH i EECRAE karakterističnih za DPP III obitelj enzima i dio su aktivnog mjesta enzima te sadrže aminokiselinske ostatke koji koordiniraju cinkov ion.

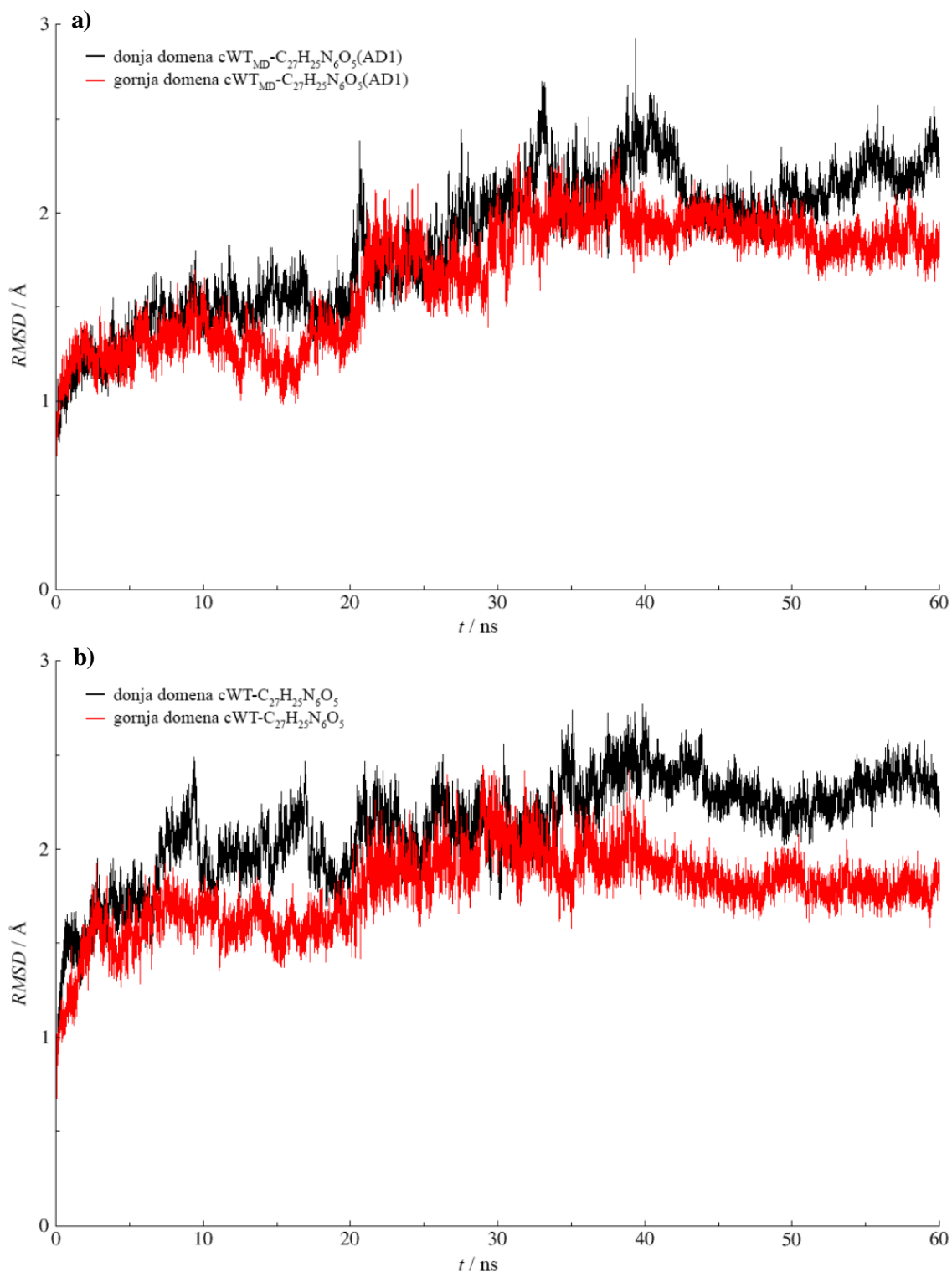


**Slika 10. Prikaz pojedinih dijelova DPP III s obzirom na RMSF profile.** Crvenom i plavom bojom označeni su aminokiselinski ostatci čije su RMSF vrijednosti najveće, a narančastom, ljubičastom i zelenom bojom ostatci čije su RMSF vrijednosti najmanje. U okviru desno prikazana je struktura DPP III s obojenim  $\beta$  pločama (plavo) i fleksibilnom petljom (crveno) koje odgovaraju aminokiselinskim ostacima u plavom odnosno crvenom kvadratu na RMSF profilima.

RMSD profili pojedinih domena izrađeni su za komplekse s ligandom koji se eksperimentalno pokazao kao bolji inhibitor (tablica 2), odnosno za cWT-1 i cWT<sub>MD</sub>-1(AD1) komplekse (slika 11).

**Tablica 2. Postotak inhibicije ljudske DPP III dobiven preliminarnim ispitivanjima na Institutu Ruđer Bošković.** Inhibitori su predinkubirani s enzimom 15 min u puferu (50 mM Tris-HCl, pH 7,4) pri 25 °C. Test aktivnosti proveden je uz sintetski supstrat RRNA ( $c = 40 \mu\text{M}$ ) tijekom 15 min pri 37 °C.<sup>54</sup>

Inhibitor	$c(\text{inhibitor}) / \mu\text{M}$	% inhibicije
ligand 1	20	80
ligand 2	35	45



Slika 11. RMSD profili donje (crno) i gornje (crveno) domene, bez fleksibilne petlje (L459-G492), DPP III u kompleksima. a) cWT<sub>MD</sub>-1(AD1) i b) cWT-1.

Donja domena, definirana aminokiselinskim ostatcima Q4-V335, S374-Y416 i L670-W726, u oba je kompleksa prošla ponešto veću konformacijsku promjenu. Tijekom simulacije pri 400 K, kompleks cWT<sub>MD</sub>-1(AD1) (slika 11 a) znatnije je mijenjao svoju konformaciju od cWT-1 koji je, u prosjeku, prošao manju konformacijsku promjenu (slika 11 b). Budući da je kod

cWT-1 enzim početno bio kompaktniji za razliku od cWT<sub>MD</sub>-1(AD1), navedene razlike su i očekivane.

#### 4.2. Slobodne energije vezanja

Entalpijski doprinos slobodnoj energiji vezanja liganda i DPP III izračunat je MM-GBSA (tablica 3) i MM-PBSA (tablica 4) pristupom. Za račun su se uzorkovale strukture tijekom zadnjih 5 ns simulacije u intervalima od 200 ps.

**Tablica 3. Doprinosi Gibbsovoj slobodnoj energiji vezanja određeni MM-GBSA pristupom i pripadne standardne devijacije izračunate tijekom posljednjih 5 ns simulacije.**  $G_{GB}$  je polarni doprinos, a  $G_{SURF}$  je nepolarni doprinos slobodnoj energiji solvatacije,  $G_{gas}$  je ukupna slobodna energija kompleksa u plinovitoj fazi (vakuumu),  $G_{solv}$  je ukupni doprinos slobodnoj energiji usljed solvatacije kompleksa, a  $G_{uk}$  je ukupna slobodna enegija vezanja liganda i receptora.

	$(\Delta G_{GB} \pm \sigma) /$ $\text{kJ mol}^{-1}$	$(\Delta G_{SURF} \pm \sigma) /$ $\text{kJ mol}^{-1}$	$(\Delta G_{gas} \pm \sigma) /$ $\text{kJ mol}^{-1}$	$(\Delta G_{solv} \pm \sigma)$ $/ \text{kJ mol}^{-1}$	$(\Delta G_{uk} \pm \sigma) /$ $\text{kJ mol}^{-1}$
cWT-1	361 ± 11	-8,0 ± 0,3	-387 ± 13	353 ± 11	-34 ± 5
cWT <sub>MD</sub> -1(AD1)	387 ± 8	-7,5 ± 0,2	-437 ± 10	379 ± 8	-58 ± 4
cWT <sub>MD</sub> -1(AD2)	373 ± 11	-7,0 ± 0,2	-415 ± 14	366 ± 11	-49 ± 5
cWT-2(AD)	358 ± 12	-7,1 ± 0,2	-358 ± 11	330 ± 12	-28 ± 3
cWT-2	-172 ± 11	-6,8 ± 0,2	160 ± 12	-179 ± 10	-19 ± 4
cWT <sub>MD</sub> -2(AD)	380 ± 5	-7,9 ± 0,2	-417 ± 8	372 ± 6	-44 ± 4
cWT <sub>MD</sub> -2	428 ± 8	-7,5 ± 0,2	-473 ± 9	421 ± 8	-52 ± 4

Rezultati MM-GBSA računa pokazuju niže vrijednosti slobodne energije vezanja kompleksa kod kojih je DPP III početno bila u manje kompaktnoj konformaciji. Budući da je u obzir uzeto samo zadnjih 5 ns simulacije tijekom kojih su kompleksi postigli ravnotežnu konformaciju, ovi rezultati, zajedno s rezultatima analize međusobnih položaja dviju domena, upućuju na to da je enzim iz manje kompaktne konformacije postigao kompaktniju koja bolje veže ligand. U kompleksima u kojima je enzim početno bio u kompaktnijoj konformaciji ligand se najvjerojatnije nije uspio povoljnije smjestiti između domena.

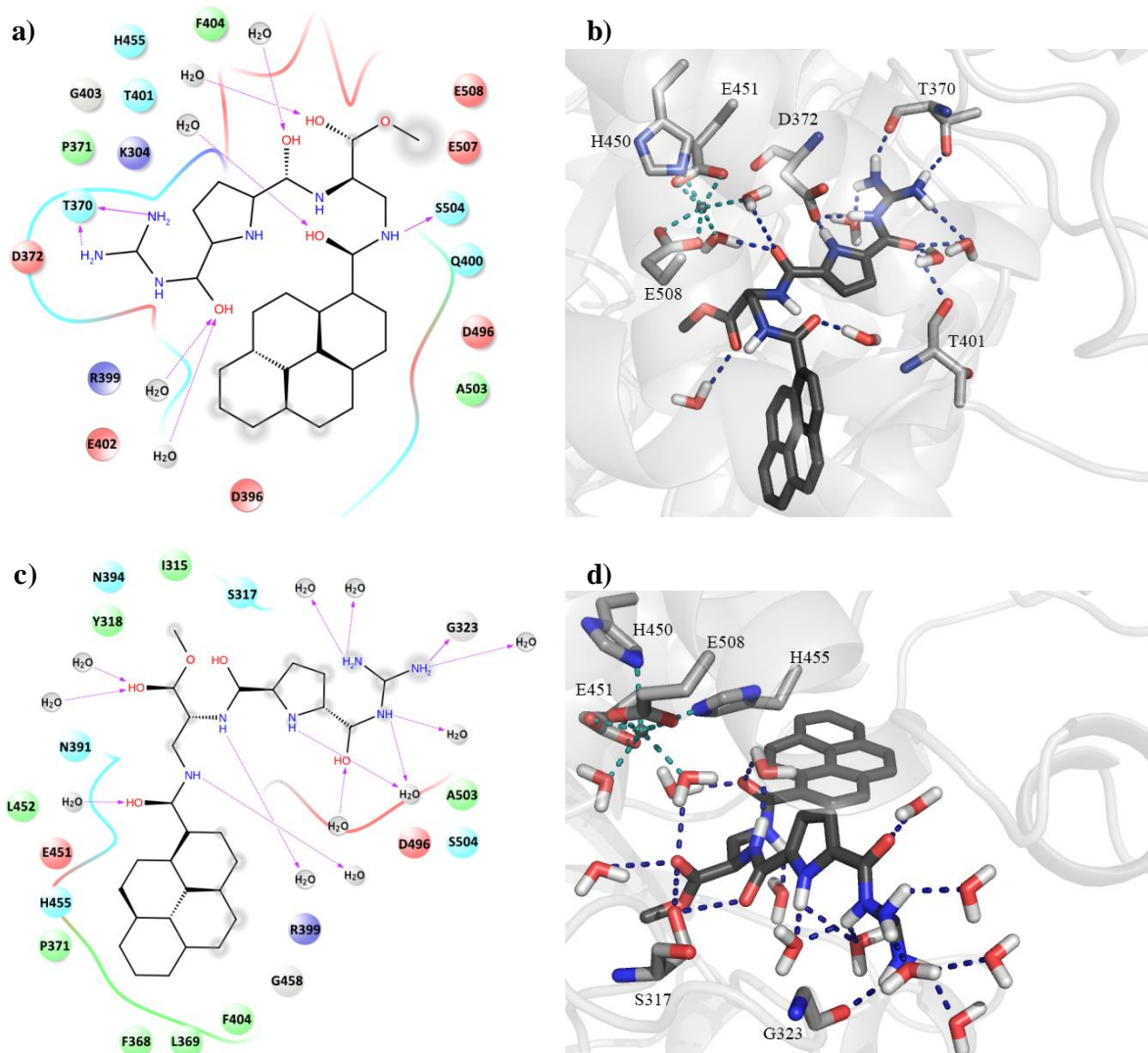
**Tablica 4. Doprinosi Gibbsovoj slobodnoj energiji vezanja određeni MM-PBSA pristupom i pripadne standardne devijacije izračunate tijekom posljednjih 5 ns simulacije.**  $G_{PB}$  je polarni doprinos, a  $G_{SURF}$  je nepolarni doprinos slobodnoj energiji solvatacije,  $G_{gas}$  je ukupna slobodna energija kompleksa u plinovitoj fazi (vakuumu),  $G_{solv}$  je ukupni doprinos slobodnoj energiji usljed solvatacije kompleksa, a  $G_{uk}$  je ukupna slobodna enegija vezanja liganda i receptora.

	$(\Delta G_{PB} \pm \sigma) /$ kJ mol <sup>-1</sup>	$(\Delta G_{SURF} \pm \sigma) /$ kJ mol <sup>-1</sup>	$(\Delta G_{gas} \pm \sigma) /$ kJ mol <sup>-1</sup>	$(\Delta G_{solv} \pm \sigma) /$ kJ mol <sup>-1</sup>	$(\Delta G_{uk} \pm \sigma) /$ kJ mol <sup>-1</sup>
<b>cWT-1</b>	189 ± 7	-7,8 ± 0,2	-227 ± 7	181 ± 7	-46 ± 4
<b>cWT<sub>MD</sub>-1(AD1)</b>	193 ± 6	-7,4 ± 0,1	-252 ± 6	186 ± 6	-66 ± 4
<b>cWT<sub>MD</sub>-1(AD2)</b>	182 ± 6	-7,1 ± 0,2	-236 ± 7	175 ± 6	-61 ± 4
<b>cWT-2(AD)</b>	176 ± 7	-6,2 ± 0,1	-210 ± 6	170 ± 7	-40 ± 4
<b>cWT-2</b>	-71 ± 8	-5,7 ± 0,2	56 ± 6	-77 ± 8	-21 ± 5
<b>cWT<sub>MD</sub>-2(AD)</b>	192 ± 5	-7,6 ± 0,1	-236 ± 4	184 ± 5	-51 ± 4
<b>cWT<sub>MD</sub>-2</b>	218 ± 6	-5,6 ± 0,1	-264 ± 5	212 ± 6	-52 ± 4

Rezultati MM-PBSA računa očekivano daju niže vrijednosti od MM-GBSA računa premda su vrijednosti slobodne energije vezanja liganda za pojedini kompleks u istom odnosu. Ligand se, dakle, tijekom simulacije bolje smjestio u enzim koji je početno bio u manje kompaktnoj konformaciji.

Rezultati računa slobodnih energija vezanja upućuju na veću stabilnost kompleksa DPP III s ligandom **1** nego s ligandom **2** što je u skladu s preliminarnim mjerenjima koja su pokazala veći stupanj inhibicije reakcije hidrolize DPP III supstrata RRNA od strane prvog spoja. Preliminarna eksperimentalna mjerenja ukazala su i da je njihovo vezanje egzergono ( $\Delta_r G(\mathbf{1}) = -34,3$  kJ mol<sup>-1</sup>,  $\Delta_r G(\mathbf{2}) = -33,7$  kJ mol<sup>-1</sup>), no dok je vezanje liganda **1** egzotermno ( $\Delta_r H = -17,9$  kJ mol<sup>-1</sup>), vezanje liganda **2** je endotermno ( $\Delta_r H = 24,1$  kJ mol<sup>-1</sup>) što upućuje na to da je način njegovog vezanja u aktivno mjesto DPP III određeno u cWT-2 kompleksu.<sup>54</sup>

Interakcije liganda **1** s aminokiselinskim ostatcima DPP III i molekulama vode za komplekse cWT<sub>MD</sub>-1(AD1) i cWT-1 prikazane su grafički i prostorno na slici 12.



**Slika 12.** Interakcije liganda 1 s DPP III i molekulama vode na kraju simulacije. **a)** 2D dijagram interakcija i **b)** prostorni prikaz interakcija za kompleks  $cWT_{MD-1}(AD1)$ . **c)** 2D dijagram interakcija i **d)** prostorni prikaz interakcija za kompleks  $cWT-1$ . U 2D prikazima, crvenom bojom prikazani su svi negativno nabijeni aminokiselinski ostatci, plavom bojom svi pozitivno nabijeni, zelenom svi hidrofobni, tirkiznom svi polarni aminokiselinski ostatci, a glicin je posebno obojan sivom bojom. Sivi krugovi na atomima liganda označavaju izloženost otapalu. Ljubičaste strjelice označavaju vodikove veze s atomima iz okosnice (puna linija) i bočnih ogranaka aminokiselina (iscrtkano). Slike su pripremljene u programu Maestro.<sup>55</sup> 3D prikazi pripremljeni su u PyMolu.

Iz 2D i 3D prikaza interakcija uočljivo je da u kompleksu  $cWT_{MD-1}(AD1)$ , koji je pokazao manju energiju vezanja liganda, prisutno više interakcija liganda s aminokiselinskim ostatcima enzima, odnosno došlo je do stvaranja vodikovih veza između dva dušikova atoma gvanidinijske skupine liganda i kisikovih atoma T370, dušikova atoma liganda i kisikovog atoma bočnog ogranka S504 te kisikovog atoma hidroksilne skupine liganda i kisikovog atoma peptidne veze T401. Kompleks  $cWT_{MD-1}(AD1)$  na kraju simulacije sadrži 7 molekula vode koje sudjeluju u interakcijama s ligandom.

U kompleksu  $cWT-1$ , koji je pokazao višu energiju vezanja liganda, prisutno je manje interakcija liganda s aminokiselinskim ostatcima. Vodikove veze prisutne su između karbonilnog kisikovog atoma u esterskoj vezi te kisikovog atoma u redišnjoj amidnoj vezi i

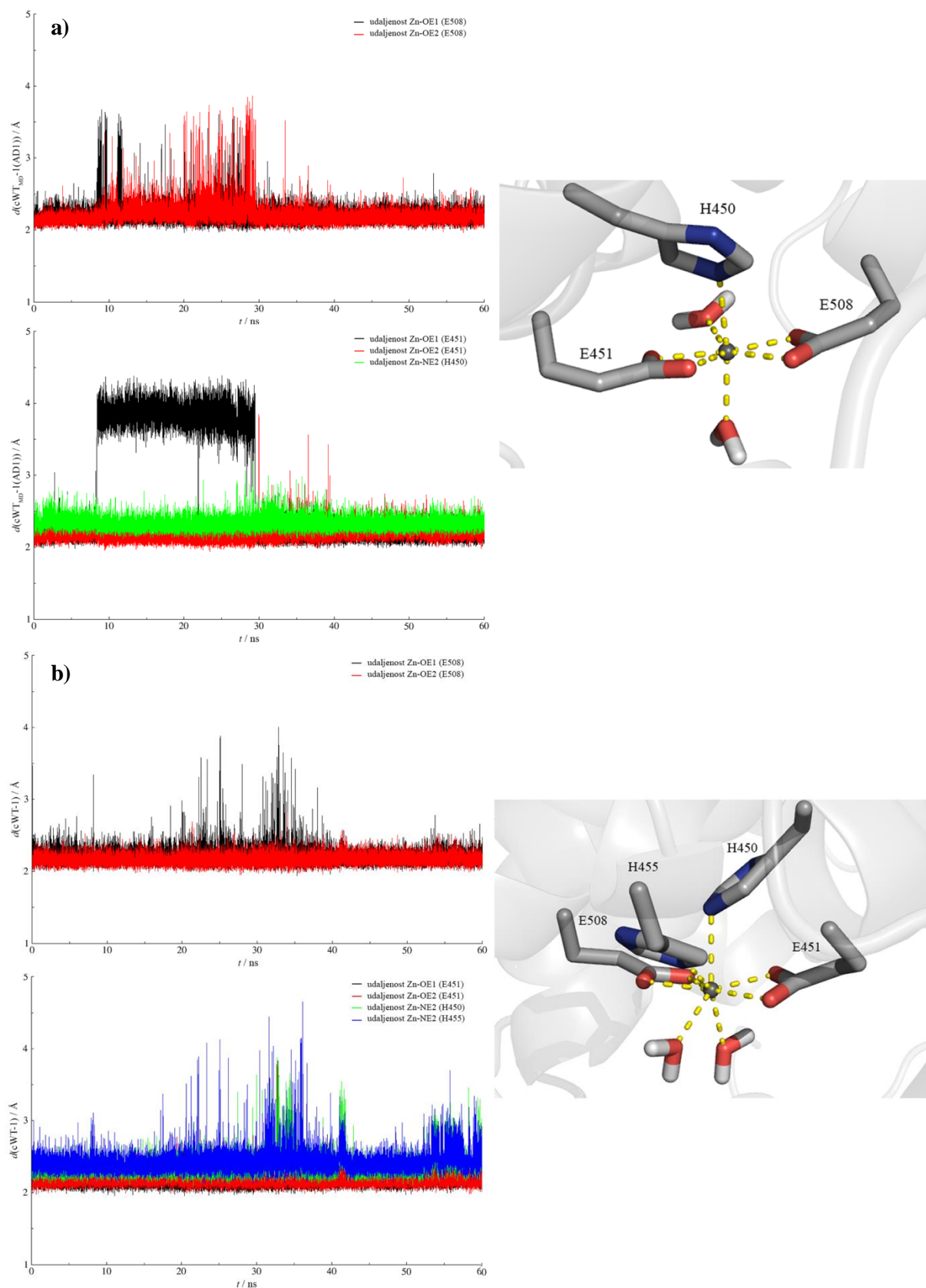
kisikovog atoma hidroksilne skupine S317. Dušikov atom gvanidinijeve skupine liganda povezan donira vodikovu vezu karbonilnom kisikovom atomu G323. Preostale interakcije u koje ligand **1** stupa su vodikove veze s 13 molekula vode. Dijagrami, dakle, potvrđuju da je veća stabilizacija liganda u aktivnom mjestu u slučaju početno manje kompaktne konformacije enzima. To je u skladu i sa sklonošću „otvaranja“ enzima u kompaktnijoj konformaciji vidljivo iz profila radijusa giracije (slika 8) te *RMSD* profila pojedinih domena (slika 11).

### 4.3. Koordinacija iona cinka

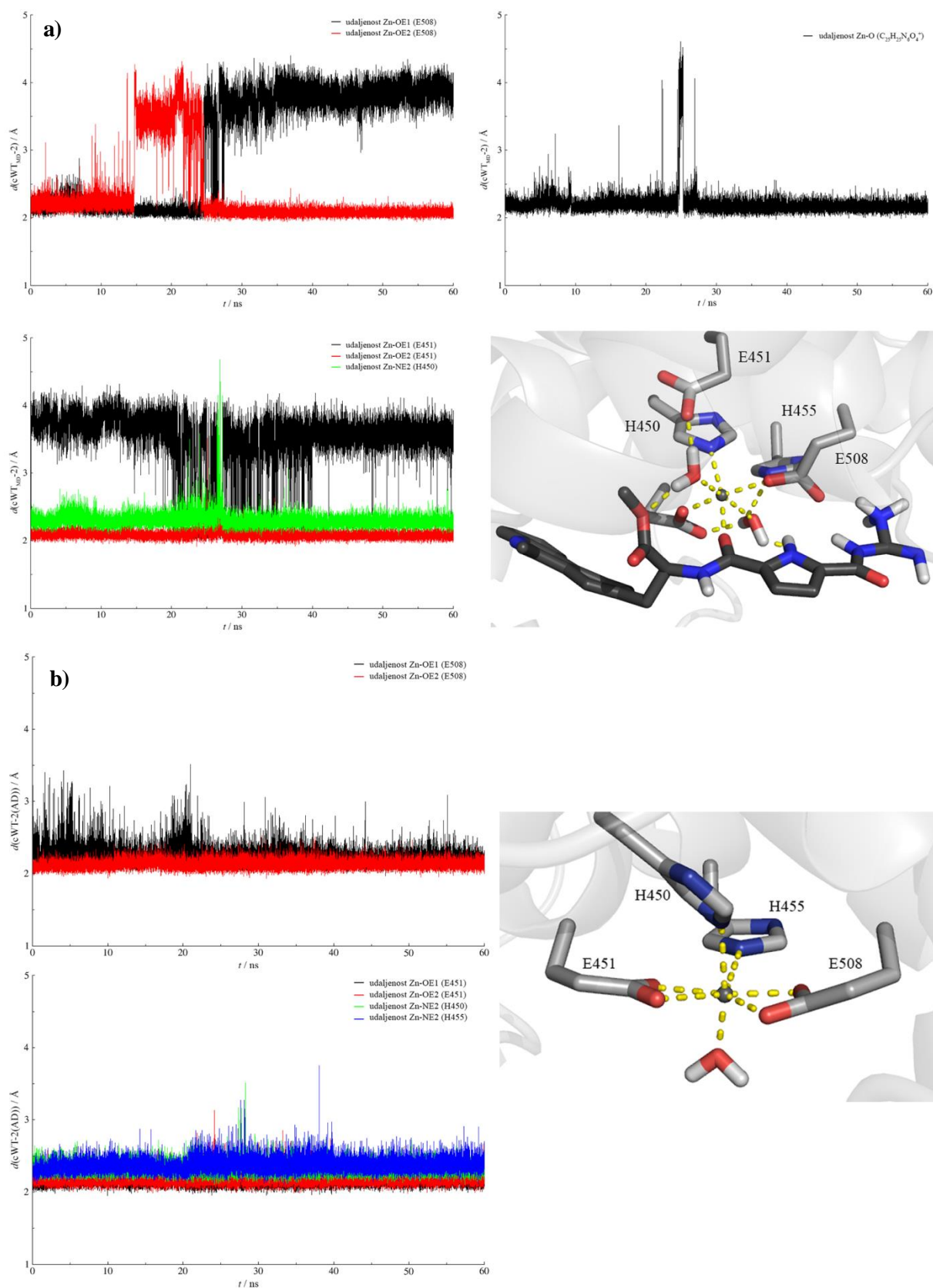
Koordinacijski broj iona cinka najčešće je 4 (tetraedarska koordinacija), 5 (trigonsko bipiramidalna koordinacija), 6 (oktaedarska koordinacija) i 7 (pentagonsko bipiramidalna koordinacija). Promjene koordinacije iona cinka praćene su tijekom simulacije promatranjem njegove udaljenosti od pojedinih kisikovih atoma bočnih ogranaka E451 i E508 te  $N\epsilon$  atoma imidazolnog prstena H450 i H455. Prikazani su rezultati za komplekse s ligandom **1** (slika 13) i s ligandom **2** (slika 14) koji imaju manje slobodne energije vezanja za pojedinu početnu konformaciju enzima.

Na kraju simulacija, cinkov ion pretežno ima koordinacijski broj 7 što upućuje da je  $2+$ , naboj iona cinka u simulacijama prevelik te da bi, za potrebe daljnjih MD simulacija, trebalo poboljšati parametre tog metalnog iona. Na znatno nižu vrijednost naboja na ionu cinka upućuju i QM/MM računi koordinacije cinkovog iona<sup>41</sup> i enzimske reakcije.<sup>56</sup> U prikazanim kompleksima ligand ne koordinira cinkov ion i koordinacijsku sferu popunjavaju molekule vode. Kisikovi atomi bočnih ogranaka E451 i E508 uvijek bidentatno koordiniraju cinkov ion.





**Slika 13.** Udaljenosti kisikovih atoma E451 i E508 te N $\epsilon$  atoma H450 i H455 od cinkovog iona u kompleksima DPP III s ligandom 1. a) Kompleks cWT<sub>MD</sub>-1(AD1) i b) kompleks cWT-1. Za pojedine komplekse prikazane su i koordinacijske sfere cinkovog iona u zadnjoj strukturi simulacije.



**Slika 14.** Udaljenosti kisikovih atoma E451 i E508 te Nε atoma H450 i H455 od cinkovog iona u kompleksima DPP III s ligandom 2. a) Komplex cWT<sub>MD</sub>-2 i b) kompleks cWT-2(AD). Za pojedine komplekse prikazane su i koordinacijske sfere cinkovog iona u zadnjoj strukturi simulacije.

## § 5. Zaključak

MD simulacije kompleksa ljudske DPP III s dva inhibitora provedene su u trajanju od 60,2 ns. Nakon početnih 20 ns simulacije pri 300 K, svaki je sustav zagrijan tijekom 100 ps do 400 K, simuliran 20 ns pri toj temperaturi, ohlađen do 300 K tijekom sljedećih 100 ps te simuliran pri toj temperaturi 20 ns. Na taj je način omogućeno bolje pretraživanje plohe potencijalne energije i smještanje liganda u aktivno mjesto enzima.

Iz preliminarnih ispitivanja provedenih na Institutu Ruđer Bošković<sup>54</sup> dobiveno je da ligand **1** bolje inhibira aktivnost ljudske DPP III u odnosu na supstrat RRNA od liganda **2** (tablica 2). U skladu s tim, očekivano je bolje vezanje liganda **1** u aktivno mjesto što su rezultati simulacija molekulske dinamike i potvrdili. *RMSF* analiza (slika 9) ukazala je na manje fluktuacije enzima u kompleksu s ligandom **1** u odnosu na ligand **2**, a praćenjem radijusa giracije (slika 8) utvrđeno je da je konformacija kompleksa s tim ligandom globularnija. Također, očekivani načini vezanja liganda u aktivno mjesto bili su oni koji podsjećaju na vezanje tinorfina (VVYPW) u kompleksu s ljudskom DPP III (PDB kôd: 3T6B) koji je u aktivnom mjestu orijentiran tako da tvori  $\beta$  ploču antiparalelno smještenu u odnosu na  $\beta$  ploču donje domene enzima definiranu aminokiselinskim ostacima G389-I392. Za usporedbu, provedene su simulacije kompleksa dobivenih programom AUTODOCK4.2 kod kojih su aromatski sustavi orijentirani prema ulazu u pukotinu između domena.

Usporedbom prosječnih vrijednosti radijusa giracije tijekom posljednjih 5 ns simulacije (tablica 1) može se zaključiti da DPP III ima najkompaktniju strukturu u kompleksu s ligandom **1** kada je kao početna konformacija u simulacijama korištena eksperimentalno određena kompaktna, odnosno „zatvorena“ struktura DPP III (PDB kôd: 3T6B). Nadalje, analiza radijusa giracije kompleksa s DPP III početno u manje kompaktnoj konformaciji (slika 8 a) upućuje na „zatvaranja“ enzima tijekom simulacije. Iz profila radijusa giracije kompleksa s ligandom **2** (slika 8 b) može se zaključiti da je taj ligand u prosjeku uzrokovao veće konformacijske promjene enzima tijekom simulacija iako ima manji, fenantridinski, aromatski sustav.

Detaljniji uvid u konformacijske promjene domena proteina dobiven je *RMSD* analizom (slika 11). Od interesa su bili kompleksi DPP III s boljim inhibitorom, a iz gornje domene izuzeta je velika fleksibilna petlja (L459-G492) kako bi se dobio bolji uvid u konformacijske promjene aminokiselinskih ostataka važnih za katalitičku sposobnost enzima. Iz *RMSD* profila vidljivo je da je donja domena više utjecala na konformacijsku promjenu enzima djelomično zato što obuhvaća više aminokiselinskih ostataka, a djelomično zato što je iz gornje domene izuzeta velika fleksibilna petlja.

Račun entalpijskog doprinosa slobodnoj energiji vezanja liganda i proteina MM-GBSA i MM-PBSA pristupom pokazao je da kod kompleksa s DPP III u početno manje

kompaktnoj konformaciji dolazi do ostvarivanja povoljnijih interakcija s ligandom od onih s DPP III u početno kompaktnijoj konformaciji (tablica 3 i 4). To je najvjerojatnije posljedica veće mogućnosti zauzimanja povoljnije konformacije liganda zbog većeg prostora u šupljini između domena proteina. Zatvaranjem proteina postupno se pomiču i aminokiselinski ostatci kako bi što bolje stabilizirali ligand uz istovremeni izlazak molekula vode u okolinu.

Analizom interakcija liganda **1** s aminokiselinskim ostacima i molekulama vode u šupljini enzima na kraju simulacije potvrđena je sklonost smještanja liganda bliže gornjoj domeni. Kompleks s enzimom u početno manje kompaktnoj konformaciji na kraju MD simulacije sadrži manje molekula vode, njih 7, u šupljini između domena što se slaže s rezultatima *RMSD* analize domena i promjenom radijusa giracije tijekom cijele simulacije. Otvaranje kompaktnijeg oblika enzima dovelo je do ulaska molekula vode, njih 13, u šupljinu između domena i prigušenja interakcija liganda s aminokiselinskim ostacima. Stoga je entalpijski doprinos stabilizaciji kompleksa cWT-1 manji u odnosu na stabilizaciju cWT<sub>MD</sub>-1(AD1) i cWT<sub>MD</sub>-1(AD2) kompleksa (tablica 3 i 4).

Enzim, dakle, mjenja svoju geometriju približavanjem domena prilikom vezanja liganda, ali u tom obliku ne ostaje trajno jer se otvara kako bi otpustio ligand ili produkt. Ovim radom pokazalo se da je za vezanje liganda u aktivno mjesto enzima povoljnija manje kompaktna konformacija enzima. Ligand se tada može bolje smjestiti u aktivno mjesto dok se enzim istovremeno "zatvara" smještajući aminokiselinske ostatke u aktivnom mjestu tako da bolje stabiliziraju ligand. Uloga visoko očuvanih aminokiselinskih ostataka u M49 prođici u skladu je s očekivanjima:<sup>47</sup> E508 i H455 koordiniraju ion cinka tijekom simulacija, uočena je i blizina R399 za koji je ustanovljena destabilizacija kompleksa DPP III sa supstratima.<sup>41</sup> Kompleksi kod kojih je enzim početno bio u manje kompaktnoj konformaciji zatvarali su se tijekom MD simulacija. Kompleks kod kojeg je došlo do "odstupanja" u doprinosu pojedinih komponenti slobodnoj energiji vezanja, cWT-2, eksperimentalno je također pokazao odstupanje u reakcijskoj entalpiji,<sup>54</sup> ali i veći pozitivan entropijski efekt tako da je konačna reakcijska Gibbsova energija podjednaka za oba ispitana liganda. Usporedba s eksperimentom upućuje na to da je način vezanja liganda sličan onome koji je dobiven kristalizacijom DPP III u kompleksu s tinorfinom<sup>30</sup> kao i niža konačna reakcijska Gibbsova energija kompleksa cWT<sub>MD</sub>-2 od cWT<sub>MD</sub>-2(AD). Nešto veći koordinacijski brojevi cinkovog iona u odnosu na najzastupljenije u kristalnim strukturama i one dobivene QM/MM računima u kompaktnom obliku enzima,<sup>41</sup> upućuju na njegovu neodgovarajuću parametrizaciju, stoga bi se u daljnjim računalnim istraživanjima DPP III prvo trebao riješiti taj problem.

Budući da inhibitori ispitivani u ovom radu nisu stvarali očekivane interakcije s S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> i S<sub>1</sub>' mjestima enzima, sama konstrukcija kompetitivnih inhibitora mogla bi se usmjeriti na njihovu veću sličnost s aminokiselinskim supstratima koji nisu podložni hidrolizi i sadrže, primjerice, veze stabilnije od peptidnih. Poželjno bi bilo i da sadrže aromatske supstituente na C-kraju, poput naftalenskih ili većih sustava, i bočne ogranke koji mogu stvarati β ploče

---

ili njima veoma slične sekundarne strukture. Mogli bi se možda konstruirati oligopeptidi u kojima bi spojevi veoma slični tirozinu ili fenilalaninu, s ponešto većim aromatskim sustavom, bili središnji dio.

## § 6. Popis oznaka, kratica i simbola

Å	ångström, mjerna jedinica za duljinu; $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$
AM1	semiempirijska metoda, Austin Model 1
AMBER	skup polja sila i programski paket za molekulsku mehaniku (eng. <i>Assisted Model Building with Energy Refinement</i> )
atm	standardna atmosfera, mjerna jedinica za tlak; $1 \text{ atm} = 101325 \text{ Pa}$
BCC	model naboja (eng. <i>bond charge correction</i> )
cWT	kompaktni oblik ljudske DPP III (PDB kôd: 3T6B)
cWT <sub>MD</sub>	manje kompaktni oblik ljudske DPP III dobiven nakon 72 ns simulacije strukture pod kôdom 3FVY
DPP III	Dipeptidil-peptidaza III
EC	broj kojim se klasificiraju enzimi (eng. <i>Enzyme Classification</i> )
GAFF	opće AMBER polje sila (eng. <i>General Amber force field</i> )
MC	Monte Carlo
MD	molekulska dinamika
MM	molekulska mehanika
MM-GBSA	metoda za računanje slobodne energije (eng. <i>Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area</i> )
MM-PBSA	metoda za računanje slobodne energije (eng. <i>Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area</i> )
NPT	izotermno-izobarni ansambl
NVT	kanonski ansambl
PDB	proteinska baza podataka (eng. <i>protein data bank</i> )
$R_g$	radijus giracije (eng. <i>radius of gyration</i> )
RMSD	korijen iz srednjeg kvadrata odstupanja (eng. <i>root mean square deviation</i> )
RMSF	korijen iz srednjeg kvadrata fluktuacije (eng. <i>root mean square fluctuation</i> )
RRNA	arginil-arginil-2-naftilamid
SASA	površina dostupna otapalu (eng. <i>solvent accessible surface area</i> )

## § 7. Literaturna vrela

1. J. K. McDonald, A. J. Barrett, *Mammalian Proteases: A Glossary and Bibliography*, Vol. 2 Exopeptidases. Academic Press London, 1986, str. 1-6, 127-131.
2. M. Baršun, N. Jajčanin, B. Vukelić, J. Špoljarić, M. Abramić, Human dipeptidyl peptidase III acts as a post-proline-cleaving enzyme on endomorphins., *Biol. Chem.* **388** (2007) 343-348.
3. M. Abramić, J. Špoljarić, Š. Šimaga, Prokaryotic homologs help to define consensus sequences in peptidase family M49., *Period. Biol.* **106** (2004) 161-168.
4. C. M. Lee, S. H. Snyder, Dipeptidylaminopeptidase III of rat brain. Selective affinity for enkephalin and angiotensin., *J. Biol. Chem.* **257** (1982) 12043-12050.
5. S. Sobočanec, V. Filić, M. Matovina, D. Majhen, Ž. Mačak Šafranko, M. Popović Hadžija, Ž. Krsnik, A. Gudan Kurilj, A. Šarić, M. Abramić, T. Balog, Prominent role of exopeptidase DPP III in estrogen-mediated protection against hyperoxia *in vivo.*, *Redox Biol.* **8** (2016) 149-159.
6. K. Fukasawa, K. M. Fukasawa, H. Iwamoto, J. Hirose, M. Harada, The HELLGH motif of rat liver dipeptidyl peptidase III is involved in zinc coordination and the catalytic activity of the enzyme., *Biochemistry* **38** (1999) 8299–8303.
7. M. Abramić, M. Zubanović, L. Vitale, Dipeptidyl peptidase III from human erythrocytes., *Bio. Chem. Hoppe-Seyler* **369** (1988) 29–38.
8. P. K. Baral, N. Jajčanin-Jozić, S. Deller, P. Macheroux, M. Abramić, K. Gruber, The first structure of dipeptidyl-peptidase III provides insight into the catalytic mechanism and mode of substrate binding., *J. Biol. Chem.* **283** (2008) 22316–22324.
9. H. Sato, K. Kimura, Y. Yamamoto, T. Hazato, Activity of DPP III in human cerebrospinal fluid derived from patients with pain., *Masui.* **52** (2003) 257–263.
10. T. Chiba, Y. H. Li, T. Yamane, O. Ogikubo, M. Fukuoka, R. Arai, S. Takahashi, T. Ohtsuka, I. Ohkubo, N. Matsui, Inhibition of recombinant dipeptidyl peptidase III by synthetic hemorphin-like peptides., *Peptides* **24** (2003) 773–778.
11. M. Baršun, N. Jajčanin, B. Vukelić, J. Špoljarić, M. Abramić, Human dipeptidyl peptidase III acts as a post-proline-cleaving enzyme on endomorphins., *Biol. Chem.* **388** (2007) 343–348.
12. Š. Šimaga, D. Babić, M. Osmak, M. Sprem, M. Abramić, Tumor cytosol dipeptidyl peptidase III activity is increased with histological aggressiveness of ovarian primary carcinomas., *Gynecol. Oncol.* **91** (2003) 194–200.
13. H. Zhan, Y. Yamamoto, S. Shumiya, M. Kunimatsu, K. Nishi, I. Ohkubo, K. Kani, Peptidases play an important role in cataractogenesis: an immunohistochemical study on lenses derived from Shumiya cataract rats., *Histochem. J.* **33** (2001) 511–521.

14. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Enzyme Nomenclature. Recommendation of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes*, (Academic Press, Inc.: San Diego, California, USA, 1992).
15. I. Schechter, A. Berger, On the size of the active site in proteases. I. Papain., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27** (1967) 157–62.
16. S. Ellis, J. M. Nuenke, Dipeptidyl arylamidase III of the pituitary. Purification and characterization., *J. Biol. Chem.* **242** (1967) 4623–4629.
17. Y. Shimamori, Y. Watanabe, Y. Fujimoto, Purification and characterization of dipeptidyl aminopeptidase III from human placenta., *Chem. Pharm. Bull.* **34** (1986) 3333–3340.
18. A. A. Swanson, B. Albers-Jackson, J. K. McDonald, Mammalian lens dipeptidyl aminopeptidase III., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **84** (1978) 1151–1159.
19. Y. Inaoka, H. Tamaoki, Purification and characterization of enkephalinase B from rat brain membrane., *Biochim. Biophys. Acta* **925** (1987) 27–35.
20. I. Ohkubo, Y. H. Li, T. Maeda, Y. Yamamoto, T. Yamane, P. G. Du, K. Nishi, Dipeptidyl peptidase III from rat liver cytosol: purification, molecular cloning and immunohistochemical localization., *Biol. Chem.* **380** (1999) 1421–1430.
21. M. A. Sentandreu, F. Toldrá, Biochemical Properties of Dipeptidyl Peptidase III Purified from Porcine Skeletal Muscle., *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 3977–3984.
22. J. Huang, J. Kim, P. Ramamurthy, T. H. D. Jones, The purification, specificity, and role of dipeptidyl peptidase III in *Dictyostelium discoideum*., *Exp. Mycol.* **16** (1992) 102–109.
23. Y. Watanabe, Y. Kumagai, Y. Fujimoto, Presence of a dipeptidyl aminopeptidase III in *Saccharomyces cerevisiae*., *Chem. Pharm. Bull.* **38** (1990) 246–248.
24. Š. Šimaga, D. Babić, M. Osmak, J. Ilić-Forko, L. Vitale, D. Milicić, M. Abramić, Dipeptidyl peptidase III in malignant and non-malignant gynaecological tissue., *Eur. J. Cancer* **34** (1998) 399–405.
25. T. Vanha-Perttula, Dipeptidyl peptidase III and alanyl aminopeptidase in the human seminal plasma: origin and biochemical properties., *Clin. Chim. Acta.* **177** (1988) 179–196.
26. S. C. Prajapati, S. S. Chauhan, Dipeptidyl peptidase III: a multifaceted oligopeptide N-end cutter, *FEBS J.* **278** (2011) 3256–3276.
27. B. E. Hast, D. Goldfarb, K. M. Mulvaney, M. A. Hast, P. F. Siesser, F. Yan, D.N. Hayes, M. B. Major, Proteomic analysis of ubiquitin ligase KEAP1 reveals associated proteins that inhibit NRF2 ubiquitination., *Cancer Res.* **73** (2013) 2199–2210.
28. P. Kumar, V. Reithofer, M. Reisinger, T. Pavkov-Keller, S. Wallner, P. Macheroux, K. Gruber, Substrate complexes of human dipeptidyl peptidase III reveal the mechanism of enzyme inhibition., *Sci. Rep.* **6** (2016) 23787–23787.



29. W. L. Delano, The PyMOL Molecular Graphic System, (2010)
30. G. A. Bezerra, E. Dobrovetsky, R. Viertlmayr, A. Dong, A. Binter, M. Abramić, P. Macheroux, S. Dhe-Paganon, K. Gruber, Entropy-driven binding of opioid peptides induces a large domain motion in human dipeptidyl peptidase III., *PNAS* **109** (2012) 6525–6530.
31. K. Gröger, D. Baretić, I. Piantanida, M. Marjanović, M. Kralj, M. Grabar, S. Tomić, C. Schmuck, Guanidiniocarbonyl-pyrrole-aryl conjugates as nucleic acid sensors: switch of binding mode and spectroscopic responses by introducing additional binding sites into the linker., *Org. Biomol. Chem.* **9** (2011) 198-209.
32. A. R. Leach, *Molecular Modelling: Principles and Applications*, 2. izd., Pearson Education, 2001.
33. R. Donev (ur.), *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, Vol. 94, Elsevier, Academic Press, London, 2014, str. 269-313.
34. D. A. Case i sur., Amber 14 Reference Manual, 2014.
35. J.-P. Ryckaert, G. Ciccotti, H. J. Berendsen, Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes., *J. Comput. Phys.* **23** (1977) 327–341.
36. W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water., *J. Chem. Phys.* **79** (1983) 926–935.
37. H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. Di Nola, J. R. Haak, Molecular dynamics with coupling to an external bath., *J. Chem. Phys.* **81** (1984) 3684–3690.
38. G. Grest, K. Kremer, Molecular dynamics simulation for polymers in the presence of a heat bath., *Phys. Rev. A* **33** (1986) 3628–3631.
39. W. Hoover, Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions., *Phys. Rev. A* **31** (1985) 1695–1697.
40. M. L. Connolly, Analytical molecular surface calculation., *J. Appl. Crystallogr.* **16** (1983) 548–558.
41. A. Tomić, S. Tomić, Hunting the human DPP III active conformation: combined thermodynamic and QM/MM calculations., *Dalton Trans.* **43** (2014) 15503-15514.
42. R. Dennington, T. Keith, J. Millam, GaussView, v. 5.0, Semichem Inc., Shawnee Mission, KS, 2009.
43. D. A. Case, V. Babin, J. T. Berryman, R. M. Betz, Q. Cai, D. S. Cerutti, T. E. Cheatham, III, T. A. Darden, R. E. Duke, H. Gohlke, A. W. Goetz, S. Gusarov, N. Homeyer, P. Janowski, J. Kaus, I. Kolossváry, A. Kovalenko, T. S. Lee, S. LeGrand, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K. M. Merz, F. Paesani, D. R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, R. Salomon-Ferrer, G. Seabra, C. L. Simmerling, W. Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, R. M.

- Wolf, X. Wu, P. A. Kollman, AMBER 14, University of California, San Francisco, (2014)
44. B. Bertoša, B. Kojić-Prodić, R. C. Wade, S. Tomić, Mechanism of auxin interaction with Auxin Binding Protein (ABP1): a molecular dynamics simulation study., *Biophys. J.* **94** (2008) 27–37.
45. I. Dokmanić, M. Sikić, S. Tomić, Metals in proteins: correlation between the metal-ion type, coordination number and the amino-acid residues involved in the coordination., *Acta Crystallogr. Sect. D, Biol. Crystallogr.* **64** (2008) 257–263.
46. G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson, Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **16** (2009) 2785-2791.
47. A. Tomić, M. Abramić, J. Špoljarić, D. Agić, D. M. Smith, S. Tomić, Human dipeptidyl peptidase III: insights into ligand binding from a combined experimental and computational approach, *J. Mol. Recognit.* **24** (2011) 804-814.
48. A. Toukmaji, C. Sagui, J. Board, T. Darden, Efficient particle-mesh Ewald based approach to fixed and induced dipolar interactions., *J. Chem. Phys.* **113** (2000) 10913–10927.
49. T. E. Cheatham, P. Cieplak, P. A. Kollman, A modified version of the Cornell et al. force field with improved sugar pucker phases and helical repeat., *J. Biomol. Struct. Dyn.* **16** (1999) 845-862.
50. J. M. Wang, P. Cieplak, P. A. Kollman, How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules?, *J. Comput. Chem.*, **21** (2000) 1049- 1074.
51. M. Zgarbova, M. Otyepka, J. Sponer, A. Mladek, P. Banas, T. E. Cheatham, P. Jurecka, Refinement of the Cornell et al. nucleic acids force field based on reference quantum chemical calculations of glycosidic torsion profiles., *J. Chem. Theory Comput.*, **7** (2011) 2886- 2902.
52. G. D. Hawkins, C. J. Cramer, D. G. Truhlar, Pairwise solute descreening of solute charges from a dielectric medium. *Chem. Phys. Lett.*, **246** (1995) 122–129.
53. A. Tomić, M. Gonzalez, S. Tomić, The large scale conformational change of the human DPP III substrate prefers the „closed“ form., *J. Chem. Inf. Model.* **52** (2012) 1583-1594.
54. Osobna komunikacija s dr. sc. Marijom Abramić.
55. Maestro, v. 10.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
56. Osobna komunikacija s dr. sc. Antonijom Tomić.

## § 8. Životopis

Nora Tir rođena je 29. prosinca 1992. godine u Požegi gdje je pohađala osnovnu školu i bila dio prve generacije požeške Katoličke klasične gimnazije s pravom javnosti koju je predstavljala na školskim i županijskim natjecanjima iz kemije od 2008. do 2011. godine. Godine 2011. upisala je preddiplomski studij kemije na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a 2014. izradila je Završni rad na Zavodu za biokemiju pod mentorstvom doc. dr. sc. Jasmine Rokov-Plavec. Od 2015. godine volontira na znanstvenim i neznantstvenim poljima. Unutar Kemijskog odsjeka, volontirala je na Zavodu za organsku kemiju kod doc. dr. sc. Rosane Ribić gdje se bavila sintezom glikokonjugata. Zatim je kratko s dr. sc. Vesnom Simunović na Zavodu za biokemiju radila *microscale* termoforetska mjerenja te uobičajene biokemijske eksperimentalne metode izvan okvira praktikuma razvijala je pod vodstvom dr. sc. Marija Kekeza i dr. sc. Morane Dulić. Osim rada u laboratoriju, sudjelovala je u radionicama iz biokemije na Otvorenom danu Kemijskog odsjeka 2015. i 2016. godine. Izvan fakulteta, sudjelovala je u Ljetnoj tvornici znanosti u Splitu na radionici iz kemije za djecu 3. i 4. razreda osnovne škole 2015. godine. Volontersko iskustvo rada s djecom iste godine upotrijebila je za sudjelovanje na projektu udruge "Fokus" pod nazivom "Pametni volonteri: od mentora do Male škole pametnog učenja". Godine 2016. iskustvo rada s djecom i mladima povezuje sa znanošću i postaje demonstrator u Praktikumumu iz biokemije.