



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Dejan Agić

NOVI INHIBITORI METALOPEPTIDAZA PORODICE M49

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2013.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

Dejan Agić

**NEW INHIBITORS OF
METALLOPEPTIDASES OF THE
FAMILY M49**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2013.



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

DEJAN AGIĆ

NOVI INHIBITORI METALOPEPTIDAZA PORODICE M49

DOKTORSKI RAD

Mentor: Dr. sc. Marija Abramić

Zagreb, 2013.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

Dejan Agić

**NEW INHIBITORS OF
METALLOPEPTIDASES OF THE
FAMILY M49**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Dr. Marija Abramić

Zagreb, 2013.

Ovaj je doktorski rad većim dijelom izrađen u Laboratoriju za celularnu biokemiju Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta "Ruđer Bošković" u Zagrebu, i to pod vodstvom dr. sc. Marije Abramić, znanstvene savjetnice Instituta "Ruđer Bošković". Molekulsko modeliranje izrađeno je u Zavodu za kemiju Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku te u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju Zavoda za fizičku kemiju Instituta "Ruđer Bošković", pod neposrednim vodstvom dr. sc. Sanje Tomić, znanstvene savjetnice Instituta "Ruđer Bošković".

Zahvala

Prije svega zahvaljujem dr. sc. Mariji Abramić koja je, usprkos svojim brojnim obvezama na poslovima voditeljice Laboratorija za celularnu biokemiju, pristala biti mojom mentoricom i voditi me u izradbi ovoga doktorata. Zahvaljujem joj što mi je nesebično, strpljivo i usrdno prenosila svoje znanje, kao i na ukazanom povjerenju, stručnoj pomoći i podršci tijekom izradbe i pisanja ovoga doktorskog rada.

Veliku zahvalnost dugujem i dr. sc. Sanji Tomić, neposrednoj voditeljici u dijelu doktorata koji se odnosi na računalne simulacije, na stručnim uputama i savjetima te pruženoj pomoći pri svladavanju metoda molekulskoga modeliranja.

Zahvaljujem dr. sc. Bojani Vukelić na vrijednim sugestijama, savjetima i pomoći pri izolaciji enzima.

Najljepša hvala svim kolegama u Laboratoriju za celularnu biokemiju na razumijevanju i pruženoj prijateljskoj podršci tijekom izradbe ove disertacije.

Hvala dr. sc. Elizabeti Has-Schön koja me povezala s istraživačkom skupinom na Institutu "Ruđer Bošković" u Zagrebu te dr. sc. Dragi Bešli sa Zavoda za kemiju Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku na velikoj podršci i razumijevanju tijekom izradbe eksperimentalnog dijela doktorskoga rada u Zagrebu.

Hvala svima koji su mi na bilo koji način pomogli ili su imali dobru namjeru to učiniti.

Konačno, posebno zahvaljujem svojoj obitelji - supruzi Ivančici, kćeri Luciji i sinu Jakovu na njihovoj ljubavi, bezuvjetnoj podršci i neizmjerenoj vjeri u moj uspjeh. Ovaj doktorat je za vas!

U Osijeku, 31. svibnja 2013.

Dejan Agić

SADRŽAJ

Sažetak	XI
Abstract	XII
1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	
2.1. Peptidaze (proteolitički enzimi)	4
2.1.1. Podjela peptidaza	4
2.1.2. Supstratna specifičnost peptidaza	6
2.1.3. Otkriće i značaj peptidaza	7
2.2. Metalopeptidaze	10
2.2.1. Opća obilježja metalopeptidaza	10
2.2.2. Katalitički mehanizam metalopeptidaza	11
2.2.3. Fiziološke uloge metalopeptidaza	17
2.2.3.1. Angiotenzin-konvertirajući enzim (ACE)	17
2.2.3.2. Neprilizin (NEP)	18
2.2.3.3. Aminopeptidaza osjetljiva na puromicin (PSA)	21
2.3. Porodica metalopeptidaza M49	22
2.3.1. Dipeptidil-peptidaza III	22
2.3.1.1. Opće značajke	22
2.3.1.2. Struktura i katalitički mehanizam	23
2.3.1.3. Supstratna specifičnost	29
2.3.1.4. Fiziološka uloga	29
2.3.2. Inhibitori DPP III	30

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali	34
3.1.1. Eritrociti	34
3.1.2. Kemikalije i oprema	34
3.2. Eksperimentalne biokemijske metode	36
3.2.1. Određivanje aktivnosti ljudske DPP III (standardni test)	36
3.2.2. Određivanje aktivnosti aminopeptidaza	36
3.2.3. Određivanje kinetičkih konstanti DPP III pročišćene iz ljudskih eritrocita	38
3.2.3.1. Određivanje kinetičkih konstanti uz arginil-arginil-7-amido-4-metil kumarin (Arg-Arg-AMC)	38
3.2.3.2. Određivanje kinetičkih konstanti uz Arg-Arg-2NA	38
3.2.4. Metode pročišćavanja proteina	39
3.2.4.1. Kromatografija na ionskom izmjenjivaču	39
3.2.4.2. Gel-filtracija	40
3.2.4.3. Kromatografija na hidroksilapatitu	41
3.2.5. Elektroforetske metode	42
3.2.5.1. Elektroforeza u nativnim uvjetima	42
3.2.5.2. Elektroforeza u denaturirajućim uvjetima	42
3.2.6. Ugušćivanje otopina	43
3.2.7. Određivanje koncentracije proteina	43
3.2.8. Utjecaj pH i iona kobalta, Co^{2+} na hidrolizu Arg-Arg-AMC ljudskom DPP III	44
3.2.9. Utjecaj derivata benzimidazola na aktivnost DPP III i PSA	44
3.2.9.1. Određivanje IC_{50}	44
3.2.9.2. Ispitivanje reverzibilnosti inhibicije benzimidazolnim spojem 1'	45
3.2.9.3. Određivanje kinetičkih konstanti za inaktivaciju DPP III benzimidazolnim spojem 1'	46

3.3. Računalne metode	46
3.3.1. Molekulsko modeliranje	47
3.3.2. Izraz za potencijalnu energiju	48
3.3.3. Metoda prijanjanja („docking“)	49
3.3.4. Molekulska dinamika (MD)	50
3.3.5. Priprema sustava	52
3.3.6. Parametrizacija	53
3.3.7. Optimizacija sustava i simulacija uravnoteženja	53
3.3.8. Molekulsko dinamičke simulacije	54
3.3.9. Analiza podataka	55
 4. REZULTATI	
 4.1. Pročišćavanje DPP III i PSA iz ljudskih eritrocita	59
4.1.1. Uklanjanje krvne plazme i pranje eritrocita	59
4.1.2. Liziranje eritrocita	59
4.1.3. Kromatografija na stupcu DEAE-celuloze	61
4.1.4. Rekromatografija na stupcu DEAE-celuloze	61
4.1.5. Kromatografija na hidroksilapatitu	62
4.1.6. Pročišćavanje DPP III brzom tekućinskom kromatografijom proteina	63
4.1.7. Pročišćavanje PSA gel-filtracijom na Sephacrylu S-200 Superfine	66
4.1.8. Pročišćavanje PSA brzom tekućinskom kromatografijom proteina	67
4.2. Hidrolitička aktivnost pročišćene DPP III prema sintetskom supstratu Arg-Arg-AMC	68
4.2.1. Ispitivanje utjecaja pH i iona kobalta, Co^{2+} na brzinu hidrolize Arg-Arg-AMC	68
4.2.2. Ovisnost brzine hidrolize o koncentraciji Arg-Arg-AMC	70
4.2.2.1. Kinetička karakterizacija	70

4.3. Ispitivanje potencijalnih inhibitora ljudske DPP III	71
4.3.1. Derivati benzimidazola - kandidati za nove inhibitore	71
4.3.2. Inhibitorni učinak i određivanje IC ₅₀	72
4.3.3. Tip i mehanizam inhibicije	74
4.3.4. Kinetika inaktivacije ljudske DPP III spojem 1'	78
4.3.5. Specifičnost djelovanja	79
4.4. Molekulske dinamičke simulacije ljudske DPP III u kompleksu sa supstratom Arg-Arg-AMC	81
4.4.1. Promjene u strukturi proteina tijekom MD simulacija	81
4.4.2. Koordinacija iona cinka	88
4.4.3. Interakcije Arg-Arg-AMC s ljudskom DPP III	90
4.5. Molekulske dinamičke simulacije ljudske DPP III u kompleksu sa spojem 1'	93
4.5.1. Promjene u strukturi proteina tijekom MD simulacija	93
4.5.2. Koordinacija iona cinka	99
4.5.3. Interakcije spoja 1' s ljudskom DPP III	101
4.6. Molekulske dinamičke simulacije kvaščeve DPP III	104
4.6.1. Promjene u strukturi proteina tijekom MD simulacija	104
4.6.2. Koordinacija iona cinka	109
4.7. Molekulske dinamičke simulacije kvaščeve DPP III u kompleksu sa spojem 1'	111
4.7.1. Promjene u strukturi proteina tijekom MD simulacija	111
4.7.2. Koordinacija iona cinka	115
4.7.3. Interakcije spoja 1' s kvaščevom DPP III	117
4.8. Molekulske dinamičke simulacije kvaščeve DPP III u kompleksu s hidroksamatnim spojem Tyr-Phe-NHOH	119
4.8.1. Promjene u strukturi proteina tijekom MD simulacija	119
4.8.2. Koordinacija iona cinka	124

4.8.3. Interakcije Tyr-Phe-NHOH s kvaščevom DPP III	125
5. RASPRAVA	129
6. ZAKLJUČCI	147
7. POPIS LITERATURE	149
8. POPIS KRATICA I OZNAKA	162
9. ŽIVOTOPIS	164

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorski rad

NOVI INHIBITORI METALOPEPTIDAZA PORODICE M49

DEJAN AGIĆ

Zavod za kemiju
Poljoprivredni fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku,
Kralja Petra Svačića 1d, Osijek, Hrvatska

Dipeptidil-peptidaza III (DPP III), metalopeptidaza iz porodice M49, je enzim s ulogom u unutarstaničnom katabolizmu proteina i obrani od oksidativnog stresa. Kristalografski određene strukture ljudske i kvašćeve DPP III slične su i otkrivaju dvo-domenski protein.

S ciljem pronalaženja novih nepeptidnih inhibitora ljudske DPP III, taj enzim je pročišćen iz eritrocita i istražen je utjecaj niza ciklobutanskih derivata supstituiranih benzimidazola na njegovu aktivnost. Za derivat benzimidazola s izrazitim inhibitornim djelovanjem ($IC_{50} \approx 3 \mu\text{mol L}^{-1}$) te za supstrat arginil-arginil-7-amido-4-metil kumarin ($K_m = 13,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, $k_{cat} = 3,9 \text{ s}^{-1}$), korištenjem metoda molekuskog modeliranja sagrađeni su nekovalentni kompleksi s ljudskom DPP III i ispitan je utjecaj ovih liganada na strukturu i fleksibilnost enzima. Istim pristupom utvrđene su i interakcije kvašćeve DPP III s tim derivatom benzimidazola te s hidroksamatnim inhibitorom Tyr-Phe-NHOH.

Rezultati otkrivaju da su ciklobutanski derivati benzimidazola novi inhibitori metalopeptidaza porodice M49 te omogućuju uvid u interakcije bitne za vezanje liganda u njihovo aktivno mjesto.

Ključne riječi: metalopeptidaze; porodica M49; dipeptidil-peptidaza III; derivati benzimidazola; molekulsko modeliranje.

(166 + XII stranica, 97 slika, 3 sheme, 24 tablice, 182 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Mentor: Dr. sc. Marija Abramić, zn. savj., Institut "Ruđer Bošković"

Ocjenitelji: Dr. sc. Ivana Weygand-Đurašević, red. prof., Prirodoslovno-matematički fakultet
Dr. sc. Marija Abramić, zn. savj., Institut "Ruđer Bošković"
Dr. sc. Sanja Tomić, zn. savj., Institut "Ruđer Bošković"

Rad prihvaćen: 29. svibnja 2013.

ABSTRACT

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

NEW INHIBITORS OF METALLOPEPTIDASES OF THE FAMILY M49

DEJAN AGIĆ

Department of Chemistry
Faculty of Agriculture, University of J. J. Strossmayer in Osijek,
Kralja Petra Svačića 1d, Osijek, Croatia

Dipeptidyl peptidase III (DPP III) is a member of metallopeptidase family M49 involved in intracellular protein catabolism and antioxidative defense. The crystal structures of human and yeast DPP III are similar, revealing a two-domain protein.

In order to find new non-peptidic inhibitors of human DPP III, this enzyme was purified from the erythrocytes and the effect of a set of cyclobutane derivatives containing substituted benzimidazole moieties was screened on its activity. Using the molecular modeling, the complexes between one such compound with a potent inhibitory potential ($IC_{50} \approx 3 \mu\text{mol L}^{-1}$), and the substrate arginyl-arginyl-7-amido-4-methyl coumarin ($K_m = 13.5 \mu\text{mol L}^{-1}$, $k_{cat} = 3.9 \text{ s}^{-1}$) with human DPP III were built, and the influence of these ligands on enzyme's structure and flexibility was investigated. By the same approach, the interactions of the yeast DPP III with the same benzimidazole derivative, and with hydroxamate inhibitor Tyr-Phe-NHOH, were identified.

Obtained results indicate the benzimidazole derivatives as new inhibitors of the M49 family metallopeptidases, and reveal the interactions essential for the ligand binding into their active site.

Key words: metallopeptidases; M49 family; dipeptidyl peptidase III; benzimidazole derivatives; molecular modeling.

(166 + XII pages, 97 figures, 3 schemes, 24 tables, 182 references, original in Croatian)

Supervisor: Dr. Marija Abramić, Senior Scientist, Ruđer Bošković Institute

Reviewers: Dr. Ivana Weygand-Đurašević, Prof., Faculty of Science
Dr. Marija Abramić, Senior Scientist, Ruđer Bošković Institute
Dr. Sanja Tomić, Senior Scientist, Ruđer Bošković Institute

Thesis accepted: May 29th, 2013.

1. UVOD

Peptidaze (proteaze) su enzimi koji kataliziraju hidrolizu peptidne veze. Imaju bitnu ulogu u katabolizmu proteina, a sudjeluju i u mnogim drugim važnim biološkim procesima poput posttranslacijskih modifikacija proteina, otpuštanja aktivnih peptida, morfogeneze tkiva, angiogeneze i apoptoze. Aktivnost ovih enzima regulirana je genetičkom kontrolom, ograničenom proteolizom (aktivacija zimogena) te prisustvom aktivatora i inhibitora. Poremećaji u aktivnosti peptidaza mogu biti povezani s nastankom kardiovaskularnih, upalnih, neurodegenerativnih, infektivnih te malignih bolesti. Zbog uloge u (pato)fiziološkim procesima peptidaze se primjenjuju kao biomarkeri u dijagnostici i prognostici te kao potencijalne mete za razvoj specifičnih lijekova¹.

Prema mjestu hidrolize supstrata peptidaze se dijele na egzo- i endopeptidaze. Egzopeptidaze koje djeluju na amino-kraju supstrata klasificiraju se na amino-, dipeptidil-, i tripeptidil-peptidaze. Aminopeptidaze se nadalje razvrstavaju prema relativnoj efikasnosti kojom oslobađaju pojedine aminokiseline s kraja peptidnog supstrata. Općenito im nedostaje specifičnost za samo jedan aminokiselinski ostatak, te se za njihovu identifikaciju koriste i dodatni kriteriji, u koje spada i osjetljivost prema inhibitorima². Kod mnogih aminopeptidaza katalitička je aktivnost ovisna o ionu metala, te pripadaju velikoj skupini metalopeptidaza.

Porodica dipeptidil-peptidaza III prepoznata je kao zasebna porodica metalopeptidaza (u bazi *MEROPS*, www.merops.ac.uk, označena je i kao porodica peptidaza M49)³, po jedinstvenom motivu aktivnog mjesta HEXXGH⁴. Osim aminokiselinskih ostataka koji sudjeluju u ligaciji iona cinka, o vezanju supstrata i mehanizmu katalize ovog tipa metalopeptidaza malo se zna, što otežava nalaženje selektivnog inhibitora. Dipeptidil-peptidaza III (EC 3.4.14.4) otkrivena je u ekstraktu hipofize putem hidrolize sintetskog supstrata Arg-Arg-2-naftilamida (Arg₂-2NA), a pročišćena je i biokemijski okarakterizirana iz više vrsta tkiva sisavaca te iz vinske mušice, sluzave plijesni i kvasca⁵. Zahvaljujući sekvenciranju čitavih genoma i bioinformatičkoj analizi, otkrivena je rasprostranjenost DPP III kod gotovo svih oblika života (*MEROPS*). Najnoviji podaci karakterizacije ljudskog proteoma (eng. *human central proteome*) ukazuju kako je DPP III dobro eksprimirana u svim staničnim linijama⁶.

Za aktivnost ovog enzima bitan je ion cinka, Zn²⁺ koji je sastavni dio katalitičke domene⁷. Fiziološka uloga DPP III zbog njezine relativne nespecifičnosti prema peptidnim supstratima kao i zbog nedostatka selektivnih inhibitora do danas nije precizno određena. S obzirom na prisutnost DPP III u stanicama raznih tkiva sisavaca pretpostavlja se da sudjeluje u procesima unutarstaničnoga katabolizma proteina i peptida. Studiji DPP III

sisavaca *in vitro* pokazali su da ovaj enzim preferira supstrate veličine tetra- do oktapeptida^{5,8}. Veliki afinitet DPP III ustanovljen je za nekolicinu biološki aktivnih peptida iz reda angiotenzina te enkefalina i endomorfina, što upućuje na njezinu regulatornu ulogu u hipertenziji odnosno sustavu modulacije boli^{9,10}.

Primarna struktura DPP III prvi put je određena za enzim iz štakora, čiji je gen kloniran i sekvencioniran. Nadalje je kloniran gen za DPP III čovjeka, kvasca i vinske mušice. Na temelju usporedbe primarnih struktura štakorske i DPP III iz drugih izvora, utvrđeno je da je uz HEXXGH sačuvan još jedan karakteristični motiv, EEXR(K)AE(D)^{4,11}.

Rješenje 3-D strukture kvašćeva, a potom i ljudskog ortologa porodice M49, otkrilo je kako ovaj protein ima novi način smatanja. Kvašćeva i ljudska DPP III sastoji se od gornje i donje domene međusobno odvojene širokom pukotinom. Područje aktivnog mjesta s ionom cinka smješteno je na donjem dijelu gornje domene i usmjereno ka pukotini¹². Unatoč novom načinu smatanja proteina DPP III, na temelju uočene sličnosti u koordinaciji cinka, čini se kako je katalitički mehanizam hidrolize peptidne veze ovog enzima sličan mehanizmu cink–ovisnih endopeptidaza neprilizina i termolizina.

Inhibitori su se dosad pokazali važnim u određivanju mehanizma djelovanja i fiziološke uloge nekolicine metalopeptidaza sisavaca¹³. Poznato je da kelirajući, tiolni i reducirajući reagensi imaju inhibitorni učinak na aktivnost DPP III. Međutim, njihovo djelovanje nije specifično i ispoljit će se prema nizu drugih (metalo)peptidaza. Nedavna ispitivanja utjecaja dipeptidnih derivata hidroksamske kiseline na ljudsku DPP III, pokazala su da ovi spojevi kompetitivno inhibiraju enzim¹⁴. Iako neki drugi peptidni spojevi iskazuju snažnu inhibiciju, njihovu primjenu kao potencijalnih meta u razvoju lijekova umanjuje spoznaja da su osjetljivi na djelovanje lokalnih peptidaza. S obzirom na to da su istraživanja specifičnih inhibitora metalopeptidaza porodice M49 vrlo rijetka, pronalazak novih selektivnih inhibitora veće stabilnosti *in vivo* predstavljao bi relevantan znanstveni izazov.

Glavni cilj ovoga rada bio je usmjeren na istraživanje, odnosno pronalaženje novih relativno specifičnih nepeptidnih inhibitora ljudske DPP III, odnosno metalopeptidaza porodice M49 i ispitivanje mehanizma njihova inhibitornog djelovanja.

U prvom dijelu rada trebalo je najprije do homogenosti pročistiti DPP III iz ljudskih eritrocita primjenom klasičnih biokemijskih metoda pročišćavanja proteina, uz spektrofotometrijsko i fluorimetrijsko određivanje peptidazne aktivnosti, i elektroforetsku kontrolu čistoće preparata. Uslijedilo je sustavno ispitivanje utjecaja niza heterocikličkih spojeva (pretežno derivata benzimidazola) - kandidata za inhibitore, na aktivnost pročišćene DPP III, a s odabranim spojem koji je pokazivao potentan inhibitorni učinak, provedeno je

ispitivanje tipa i mehanizma inhibicije. Specifičnost djelovanja najjačih novih nepeptidnih inhibitora ljudske DPP III provjeravalo se ispitivanjem njihova utjecaja na aktivnost pročišćene eritrocitne aminopeptidaze osjetljive na puromicin (PSA). U okviru ovoga doktorskog rada izmjerena je kinetika hidrolize sintetskog supstrata arginil-arginil-7-amido-4-metil kumarina (Arg-Arg-AMC) s DPP III, fluorimetrijskom metodom, i određene su kinetičke konstante K_m i k_{cat} .

U drugom dijelu rada, primjenom metoda molekuskoga modeliranja ("docking" i molekulska dinamičke simulacije), željelo se razjasniti:

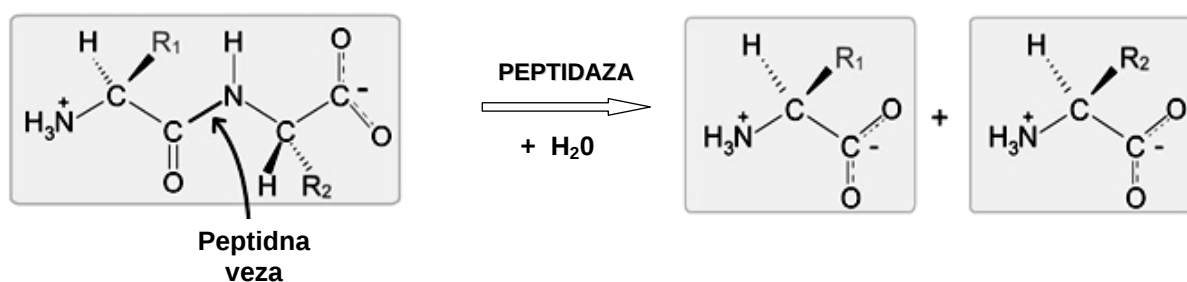
- a) mehanizam vezanja sintetskoga supstrata Arg-Arg-AMC u područje aktivnog mjesta ljudske DPP III;
- b) mehanizam vezanja najjačega nepeptidnog inhibitora (derivata benzimidazola) za ljudsku i kvašćevu DPP III i
- c) vezanje hidroksamskog spoja Tyr-Phe-NHOH na kvašćevu DPP III.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Peptidaze (proteolitički enzimi)

2.1.1. Podjela peptidaza

Prema izdanju enzimske nomenklature iz 1992. godine koju donosi Komisija za nomenklaturu Internacionalne unije za biokemiju i molekularnu biologiju (NC-IUBMB) peptidaze su svrstane u četvrti podrazred (3.4.) unutar trećeg (3.) razreda enzima - hidrolaza. Unutar navedenog podrazreda peptidaze su razvrstane u 13 pod-podrazreda. Naziv peptidaze (sinonim: proteaze i proteolitički enzimi) danas se koristi za sve enzime koji kataliziraju hidrolizu peptidne veze u peptidima i proteinima^{15,16} (slika 2.1).

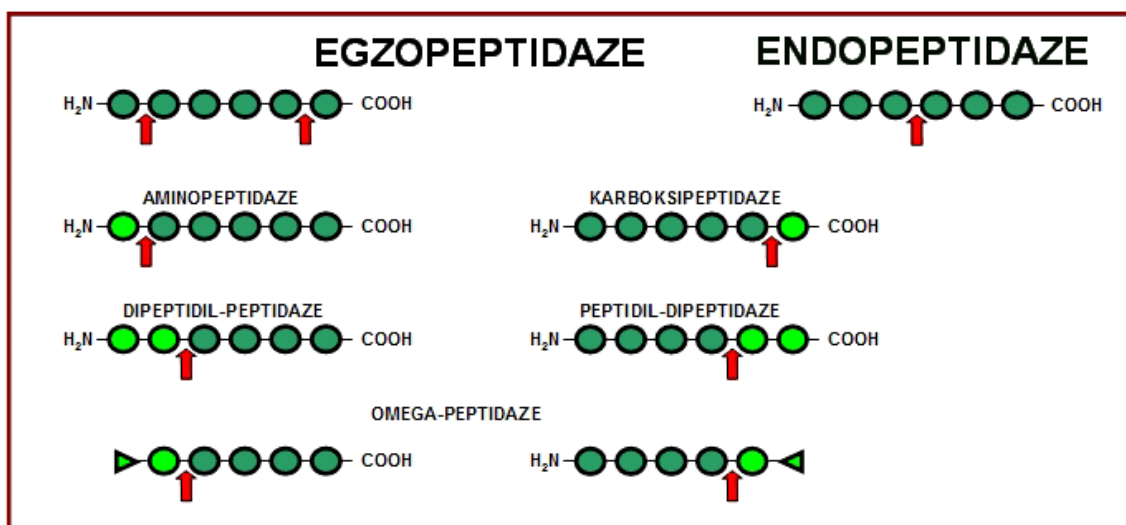


Slika 2.1. Hidroliza peptidne veze

Iako dijele opći mehanizam nukleofilnog napada na karbonilni C-atom peptidne veze, kod peptidaza su se tijekom evolucije razvili različiti katalitički mehanizmi hidrolize supstrata, a ta je spoznaja iskorištena pri njihovoj daljnjoj klasifikaciji. Peptidaze su stoga podijeljene na osnovu nekoliko kriterija: prema kemijskoj prirodi katalitičkog mjesta, položaju veze koju cijepaju, broju aminokiselina koje odcjepljuju i evolucijskoj povezanosti izvedenoj na osnovi primarne strukture. Izvorna klasifikacija peptidaza temeljila se upravo prema prirodi aktivnog mjesta odnosno funkcionalnoj grupi koja je izravno odgovorna za katalizu. Prema ovoj klasifikaciji peptidaze su podijeljene na serinske (S), treoninske (T), cisteinske (C), metalopeptidaze (M), aspartatne (A) i glutamatne (G). Nukleofilni napad prve tri grupe peptidaza posredovan je putem reaktivnih OH^- odnosno S^- skupina (kovalentna kataliza), dok posljednje tri grupe peptidaza koriste metalni ion odnosno bočni ostatak asparaginske/glutaminske kiseline za mobilizaciju i polarizaciju vode čime kisik molekule

vode postaje nukleofil (nekovalentna kataliza). Pored navedenih katalitičkih tipova peptidaza, Rawlings i sur.¹⁷ navode postojanje novog (7.) tipa proteolitičkih enzima kojeg sadrže lijaze i u kojima ostatak asparagina služi kao nukleofil.

Cijepaju li peptidnu vezu negdje u sredini ili pri kraju (poli)peptidnog lanca, peptidaze se dijele na endopeptidaze i egzopeptidaze¹⁵. Endopeptidaze cijepaju peptidne veze u unutarnjim dijelovima (poli)peptidnih lanaca, dalje od NH₂- i C-krajeva. Dodatna podjela endopeptidaza unutar pojedinih grupa načinjena je prema specifičnosti za određene aminokiseline koje tvore osjetljivu peptidnu vezu. Egzopeptidaze se klasificiraju prema specifičnosti koju pokazuju za kraj polipeptidnog lanca kojeg hidroliziraju i prema broju aminokiselina koje odcjepljuju. One egzopeptidaze koje djeluju na C-kraj polipeptida i oslobađaju jednu aminokiselinu nazivaju se karboksipeptidaze, a ukoliko oslobađaju dipeptid, zovu se peptidil-dipeptidaze. Egzopeptidaze koje cijepaju dipeptide ili tripeptide su dipeptidaze odnosno tripeptidaze, a one koje odcjepljuju krajnju aminokiselinu koja je supstituirana nazivaju se omega peptidaze. Egzopeptidaze koje djeluju na slobodni NH₂-kraj polipeptida i oslobađaju jednu aminokiselinu nazivaju se aminopeptidaze, dok one koje oslobađaju dipeptid su dipeptidil-peptidaze (slika 2.2).



Slika 2.2. Podjela peptidaza prema mjestu cijepanja. Aminokiseline koje se odcjepljuju prikazane su svijetlozelenim krugom, a crvena strelica označava mjesto djelovanja enzima.

Hijerarhijski sustav podjele peptidaza izgrađen po konceptu katalitičkog tipa, obitelji i klana predložili su Rawlings i Barrett¹⁸ i koristi se u bazi podataka MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>)³. Prema ovom sustavu peptidaze koje imaju statistički značajno

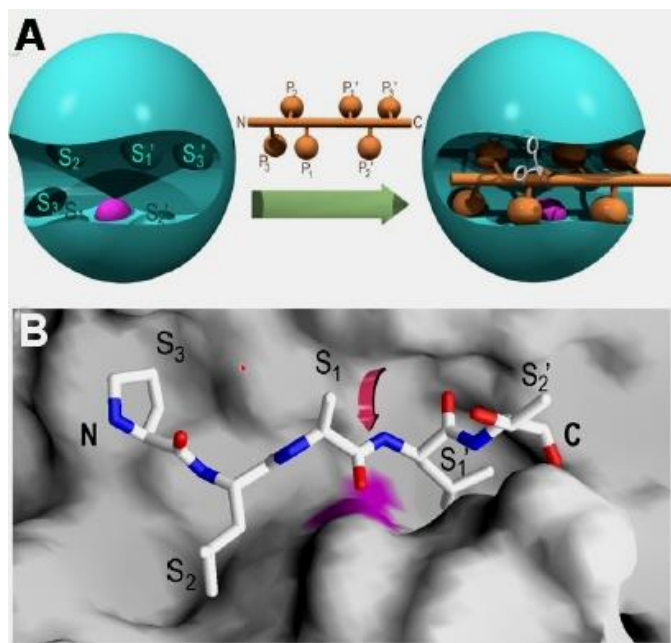
sličnu primarnu strukturu u domeni odgovornoj za katalitičku aktivnost svrstavaju se u istu porodicu. Porodica se označava brojem, a unutar nje može postojati i pod-porodica. Peptidaze koje imaju zajedničko evolucijsko podrijetlo svrstavaju se u klanove³. Klan predstavlja jednu ili više obitelji kao dokaz njihovih evolucijskih odnosa prema sličnoj tercijarnoj strukturi odnosno u slučaju kada struktura nije poznata, prema aminokiselinskim ostacima koje su sastavni dio katalitičkog mjesta ili se pak nalaze u njegovoj blizini. Isto načelo svrstavanja u obitelji i klanove primjenjuje se prilikom klasifikacije proteinskih inhibitora peptidaza^{3,19}.

2.1.2. Supstratna specifičnost peptidaza

Procesu katalize prethodi vezanje enzima sa supstratom te se prvotno smatralo kako aktivno mjesto enzima ima oblik komplementaran supstratu. Ova jednostavna tvrdnja proistekla je iz modela „ključa i ključanice“ koju je još 1894. godine postavio E. Fischer²⁰. Iako je u svojoj osnovi ovaj model i danas prihvatljiv oblik tumačenja specifičnosti interakcije enzima i supstrata, kasnija istraživanjima upotpunila su ovaj prikaz predlaganjem modela pobuđene prilagodbe (eng. *induced fit*). Prema ovom modelu konformacija enzima mijenja se tijekom interakcije sa supstratom te mu postaje komplementarna tek nakon vezanja²¹.

Posebnost katalitičkog djelovanja peptidaza očituje se i u njihovoj *specifičnosti* prema slijedu aminokiselinskih ostataka peptidnog supstrata. Specifičnost većine peptidaza prema supstratu je vrlo složena. Schechter i Berger²² su 1967. godine predložili model i terminologiju za opisivanje aktivnog mjesta peptidaza.

Aminokiselinski ostaci peptidnog supstrata označeni su, brojeći od veze koja se cijepa, s P1, P2, P3-Pn prema N-kraju, odnosno P1', P2', P3'-Pn' prema C-kraju supstrata. Veza koja se cijepa nalazi se između P1 i P1' (slika 2.3A i B). Podmjestu na enzimu u koja se smještaju bočni lanci aminokiselina peptidnog supstrata označavaju se analogno, kao S1, S2, S3-Sn prema N-kraju supstrata, odnosno S1', S2', S3'-Sn' prema C-kraju.



Slika 2.3. Podmjesta u aktivnom mjestu peptidaza. Preuzeto iz (23) i prilagođeno. (A) (lijevo) Trodimenzionalni model metaloendopeptidaze (tirkizni elipsoid) s pukotinom aktivnog mjesta i metalnim ionom (ljubičasta kuglica). (A) (sredina) Model peptidnog supstrata u izduženoj konformaciji. Aminokiselinski ostaci peptidnog supstrata označeni su kao P1, P2, P3 (brojeći od veze koja se cijepa prema N-kraju peptida) odnosno P1', P2', P3' (prema C-kraju peptida). (A) (desno) Model Michaelisovog kompleksa u reakcijskom položaju. Škare označavaju mjesto cijepanja („cleavage point“). (B) Izgled molekularne površine u veznom mjestu ljudske matriks metalopeptidaze. Ljubičasto područje površine označava položaj katalitičkog iona cinka. Štapićasti model supstrata, pripremljen na temelju eksperimentalne strukture inhibitora, ukazuje na podmjesta na enzimu označena kao S1, S2, S3, odnosno S1', S2', u koja se smještaju njegovi bočni ostaci. Crvena strelica označava peptidnu vezu koja se cijepa.

2.1.3. Otkriće i značaj peptidaza

Postojanje peptidaza utvrđeno je još u 19. stoljeću prilikom proučavanja probavnih procesa u kojima ovi enzimi imaju važnu ulogu pri razgradnji nutritivnih proteina. Kao rezultat tih proučavanja, godine 1930. Northrop je izolirao i kristalizirao pepsin, prvu peptidazu priređenu u kristaliničnom obliku²⁴. Daljnji razvoj biokemijskih metoda omogućio je bolju i specifičniju izolaciju, pročišćavanje i karakterizaciju peptidaza koje do današnjih dana čine jednu od najviše proučavanih i najvećih grupa enzima. Prema sadašnjim podacima baze podataka DEGRADOME, ljudski se degradom (skup peptidaza jednog organizma) sastoji od najmanje 578 peptidaza, dok je nešto veći broj otkriven u miša i štakora²⁵.

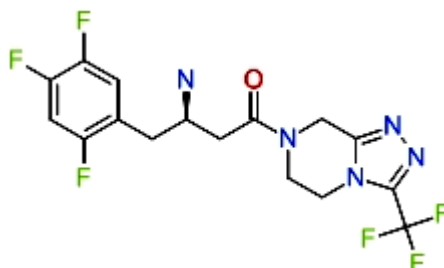
Od navedenog broja ljudskih peptidaza njih 191 pripada klasi metalopeptidaza, 178 je serinskih, 161 cisteinskih, 27 treoninskih i 21 aspartatnih peptidaza.

Dugo se smatralo kako je primarna uloga peptidaza vezana upravo uz proces probave i unutarstranični katabolizam proteina. Međutim, već prvi rad u kojem je opisan mehanizam zgrušavanja krvi doveo je do spoznaje kako se aktivacija proteina zbiva putem ograničene proteolize te kako ona (ograničena proteoliza) predstavlja učinkovit način regulacije^{26,27}. Danas je poznato kako peptidaze svojom aktivnošću sudjeluju u kaskadnom prijenosu signala te su uključene u kontrolu brojnih fizioloških procesa poput proliferacije stanica, apoptoze, replikacije DNA, imunog odgovora, zacjeljivanja rana, embrionalnog razvoja, fibrinolize, fertilizacije i transporta proteina kroz membrane^{28,29}.

U odnosu na druge mehanizme pretvorbi signala koji uključuju reverzibilne procese poput glikozilacije i fosforilacije, proteoliza molekule glasnika jest nepovratan proces koji zahtijeva čvrstu unutarstaničnu kontrolu. Promjene u regulaciji i kontroli signalnog puta mogu rezultirati nedovoljnom ili prekomjernom proteolitičkom aktivnošću. Povećana proteolitička aktivnost može biti posljedica endogenih i egzogenih faktora što na posljeticu može biti uzrokom nastanka upalnih, kardiovaskularnih, neuroloških, malignih, bakterijskih, virusnih i parazitskih bolesti^{30,31}. Prekomjerna aktivnost peptidaza može se zaustaviti korištenjem pogodnih inhibitora. Ta se spoznaja iskoristila pri dizajniranju lijekova za terapijske svrhe, a peptidaze su postale važna meta u medicinskim istraživanjima. Budući da je poznato da otprilike 2 % svih do sada sekvencioniranih genoma čine geni koji kodiraju za peptidaze, ne iznenađuje raznolikost njihovih fizioloških uloga^{32,33}. U prilog važnosti ovih enzima govori činjenica da su mutacije gena za proteaze povezane s nastankom oko 100 različitih nasljednih bolesti među kojima su određeni tipovi Parkinsonove i Alzheimerove bolesti²⁵.

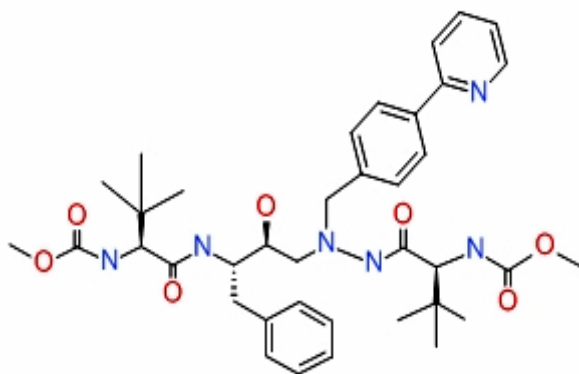
Primjer dobro proučavane serinske proteaze je dipeptidil peptidaza IV (DPP IV) (3.4.14.5.). Ova membranska egzopeptidaza sudjeluje u aktivaciji, diferencijaciji i proliferaciji T-stanica³⁴, ima ulogu u progresiji tumora³⁵ i infekciji HIV-om³⁶, a kao regulatorna peptidaza djeluje na veliki broj biološki aktivnih peptida poput endomorfina³⁷, neuropeptida Y³⁸, supstancije P³⁹, bradikininina, hormona rasta⁴⁰ i određenih kemokina³⁴. Enzim je odgovoran za brzu razgradnju inkretina kao što je peptid 1 sličan glukagonu („*glucagon-like peptide 1*“ GLP-1) i inzulinotropni polipeptid ovisan o glukozu („*glucose-dependent insulinotropic polypeptide*“ GIP) te stoga ima važnu ulogu u metabolizmu glukoze⁴¹. Razvoj selektivnih inhibitora DPP IV omogućio je da ova peptidaza postane terapijska meta pri liječenju oboljelih od šećerne bolesti tipa 2. Terapija putem inhibicije DPP IV dovodi do porasta razine

inkretina (uglavnom GLP-1) čime se utječe na smanjenje razine glukoze u krvi. Osim sitagliptina (poznat kao MK-0431), potentnog inhibitora DPP IV (slika 2.4) koji je bio prvi odobreni lijek za dijabetes tipa 2, do danas su kao potencijalni lijekovi za ovu bolest sintetizirani i testirani mnogi njegovi derivati^{42,43}.



Slika 2.4. Struktura sitagliptina ((3R)-3-amino-1-[3-(trifluorometil)-6,8-dihidro-5H-[1,2,4] triazolo-[4,3-a]pirazin-7-il]-4-(2,4,5-trifluorofenil) butan-1-on). Preuzeto iz (44).

Kao drugi primjer klinički ciljane terapije je inhibicija proteaze virusa ljudske imunodeficijencije (EC 3.4.23.16, HIV-1 protease, HIV PR). Ova aspartatna proteaza važna je za životni ciklus retrovirusa HIV-a koji uzrokuje sindrom stečene imunodeficijencije (eng. *acquired immunodeficiency syndrome*; AIDS)⁴⁵. Virus HIV-a koristi HIV-1 proteazu za proizvodnju proteina koji se ugrađuju u nove kopije infektive HIV čestice⁴⁶. Ukoliko je HIV-1 peptidaza inhibirana, nastaju defektne kopije HIV čestica koje više nisu u stanju inficirati nove stanice. Kao potentni antiretroviralni inhibitor ove proteaze u terapijske se svrhe koristi atazanavir (slika 2.5) čija primjena u odnosu na druge inhibitore peptidaza nije povezana sa značajnijom pojavom dislipidemije⁴⁷.

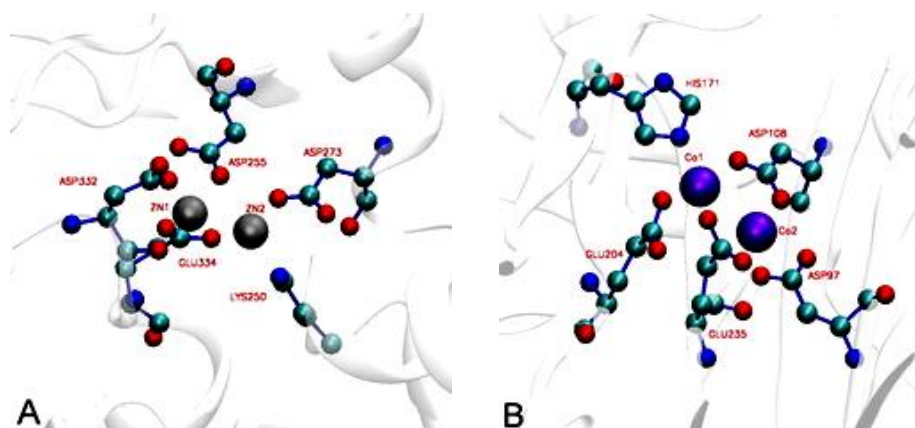


Slika 2.5. Struktura atazanavira (metil N-[(2S)-1-[2-[(2S,3S)-2-hidroksi-3-[[[(2S)-2-(metoksi-karbonilamino)-3,3-dimetilbutanoil]amino]-4-fenilbutil]-2-[(4-piridin-2-ilfenil)metil] hidrazinil]-3,3-dimetil-1-oksobutan-2-il] karbamat). Preuzeto iz (44).

2.2. Metalopeptidaze

2.2.1. Opća obilježja metalopeptidaza

Metalopeptidaze su proteolitički enzimi kojima je za katalitičku aktivnost neophodan divalentni metalni kation. Pronađene su kod svih prokariotskih i eukariotskih organizama, a odlikuje ih velika raznolikost primarnih struktura. Ovisno o broju metalnih iona potrebnih za katalizu, metalopeptidaze su podijeljene u dvije grupe. Prvoj velikoj grupi metalopeptidaza za katalitičku aktivnost neophodan je jedan ion metala, najčešće cink, (Zn^{2+}), a rjeđe kobalt (Co^{2+}), mangan (Mn^{2+}), bakar (Cu^{2+}) ili nikal (Ni^{2+}). Ostalim metalopeptidazama neophodna su dva iona metala koji djeluju „ko-katalitički“ (slika 2.6). Sve poznate metalopeptidaze s „ko-katalitičkim“ metalnim ionima imaju egzopeptidaznu, dok one koje sadrže jedan metalni ion mogu imati egzopeptidaznu ili endopeptidaznu aktivnost⁴⁸. Čini se kako je velika zastupljenost cinka kao kofaktora metalopeptidaza povezana s fleksibilnosti koordinacijske geometrije ovog metala kao i s njegovom sposobnosti koordinacije s više liganda i brze izmjene istih. Zamjenom iona Zn^{2+} s Co^{2+} ili Mn^{2+} katalitička aktivnost metalopeptidaza ostala je zadržana upravo zbog fleksibilnosti koordinacijske geometrije zamjenjenih metalnih iona⁴⁹.



Slika 2.6. Metalopeptidaze s dva iona metala u aktivnom mjestu. (A) Prikaz aktivnog mjesta leucil-aminopeptidaze iz goveđe leće (PDB ID: 1LAM). Ligandi Zn1 su Asp255, Asp332 i Glu334, a od Zn2 su Lys250, Asp255, Asp273 i Glu334. (B) Prikaz aktivnog mjesta metionil-aminopeptidaze iz *E. coli* (PDB ID: 1MAT). Ligandi Co1 su Asp108, His171, Glu204 i Glu235, a od Co2 su Asp97, Asp108 i Glu235. Atomi liganda prikazani su modelom kuglica i štapića, ugljikovi atomi označeni su tirkiznom bojom; kisika crvenom i dušika plavom. Ioni Zn^{2+} i Co^{2+} prikazani su sivom odnosno ljubičastom sferom.

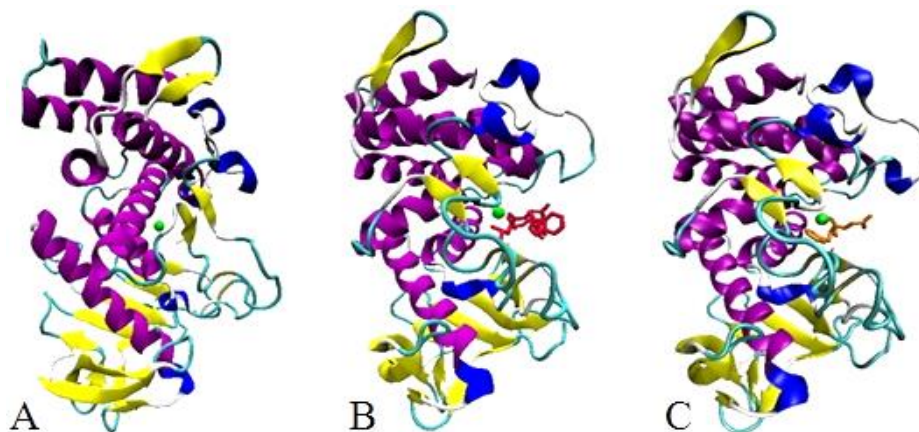
Prema najnovijim podacima baze MEROPS, metalopeptidaze su raspodijeljene u 63 evolucijske porodice, koje su svrstane unutar 16 klanova³. Porodice metalopeptidaza koje posjeduju jedan katalitički metalni ion, najčešće Zn^{2+} , pripadaju klanovima MA, MC, MD, ME, MK, MM, MO, MP, MS i MT, dok je "ko-katalitički" ioni Zn^{2+} zastupljen u porodicama koje pripadaju klanovima MF, MH, MJ i MN. Metalopeptidazama unutar klanova MG i MQ za aktivnost su potrebni "ko-katalitički" ioni Co^{2+} ili Mn^{2+} . Metalni ion vezan je za protein preko aminokiselinskih ostataka (liganada), uglavnom tri i to su: His, Glu, Asp ili Lys. Jakost interakcije metalnog iona i proteina poslužila je da se metaloenzimi podjele na one koji čvrsto vežu ione metala (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} ili Cu^{2+}) uz konstantu disocijacije, K_d manju od 10^{-8} mol L^{-1} i one koji slabije vežu metalne ione (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} ili Ca^{2+}) uz konstantu disocijacije od 10^{-3} do 10^{-8} mol L^{-1} ⁵⁰. Veliki broj poznatih metalopeptidaza sadrži karakteristični strukturni motiv His-Glu-Xaa-Xaa-His (skraćeno: HEXXH) za koji su kristalografske studije pokazale kako čini dio veznog mjesta iona cinka, tj. da su dva histidina iz tog motiva ligandi metalnog iona⁵¹. Ovisno o prirodi trećeg aminokiselinskog liganda metala, prema Rawlingsu i Barrettu¹⁸ ove metalopeptidaze su dalje razvrstane na dvije grupe. Prvu grupu čine metalopeptidaze kojima je treći ligand metala glutaminska kiselina udaljena 18-72 ostatka od „HEXXH“ motiva prema C-kraju (porodice „HEXXH+ E“), dok je u drugoj grupi treći ligand histidin ili asparaginska kiselina unutar motiva „HEXXHXXGXXH[D]“. Postoje i dodatne klasifikacije koje u obzir uzimaju kriterije trodimenzionalne strukture metalopeptidaza te je po toj osnovi predložena i hijerarhija ovih enzima na razred, pleme, klan i obitelj²³. Međutim, zbog sve većeg broja dostupnih podataka strukturnih analiza metalopeptidaza kao i njihovih uspoređi, navedeni je način klasifikacije u stalnom razvoju.

2.2.2. Katalitički mehanizam metalopeptidaza

Među prvim metalopeptidazama koje sadrže jedan katalitički atom cinka, a čiji je mehanizam djelovanja iscrpno proučavan, jesu termolizin, endopeptidaza iz bakterije *Bacillus thermoproteolyticus*⁵² i karboksiptidaza A goveda⁵³. Ostali enzime iz ove grupe imaju sličan katalitički mehanizam koji se može razlikovati u motivima veznog mjesta iona metala i aminokiselinskim ostacima enzima koji sudjeluju u procesu hidrolize peptidne veze⁵⁴.

Termolizin (EC 3.4.24.27) je endopeptidaza molekulske mase 34,6 kDa, termostabilni protein s 316 aminokiselinskih ostataka u polipeptidnom lancu, predstavnik porodice metalopeptidaza M4. Sudjeluje u reakcijama proteolize i esterolize s maksimumom aktivnosti

pri neutralnom pH. Prva struktura termolizina riješena je 1972. godine metodom rendgenske kristalografije⁵², a do danas je objavljeno preko 150 3-D struktura slobodnog enzima kao i kompleksa enzima s inhibitorima (odabrani primjeri su dani na slici 2.7A-C).

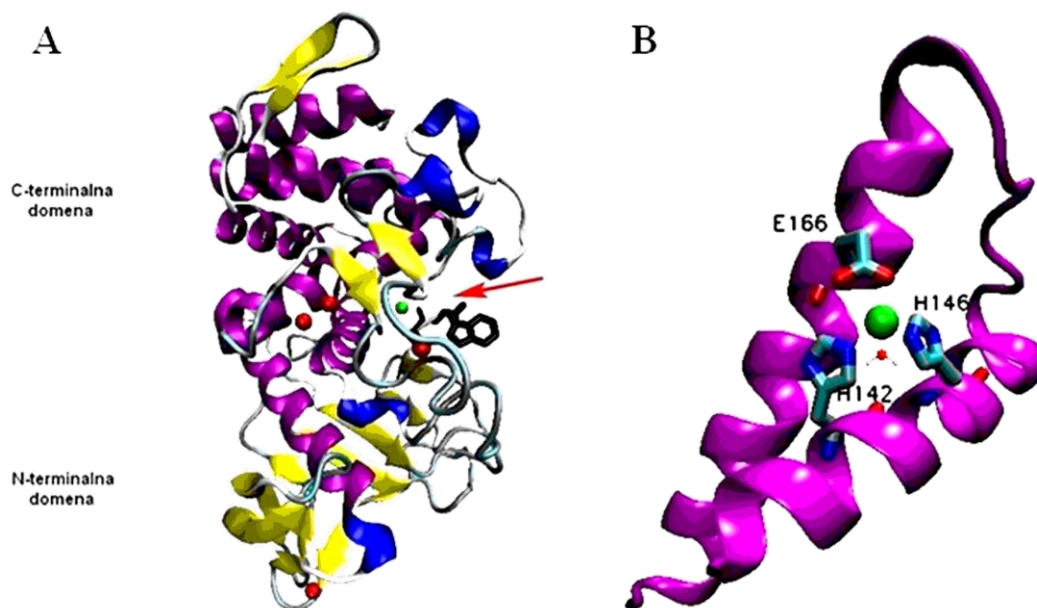


Slika 2.7. Kristalna struktura termolizina. (A) Nativni enzim (PDB ID: 1TLX). (B) Kompleks s inhibitorom fosforamidatom (PDB ID: 1TLP). (C) Kompleks s inhibitorom (S)-tiorfanom (PDB ID: 1ZDP). α -zavojnice prikazane su ljubičastom, 3_{10} -zavojnice plavom, β -vrpce žutom, a petlje tirkiznom bojom. Ion Zn^{2+} prikazan je zelenom kuglicom, molekula fosforamidata i (S)-tiorfana modelom štapića crvene odnosno narančaste boje.

Termolizin specifično hidrolizira peptidne veze supstrata zahvaljujući uglavnom podmjestu S1' koje prihvaća velike hidrofobne aminokiselinske ostatke (Leu, Phe, Ile) u položaju supstrata P1'⁵⁵. Proučavanje termolizina pomoglo je pri otkrićima inhibitora enzima koji imaju sličnu topologiju aktivnog mjesta (primjerice neprilizina)⁵⁶. Kelirajući agensi etilendiaminotetraoctena kiselina (EDTA) i 1,10-fenantrolin inhibiraju termolizin u milimolarnoj koncentraciji. Potentno inhibitorno djelovanje pokazuju modificirani analozi supstrata koji sadrže skupinu koja jako veže ion cinka (hidroksamat, fosforamidat, fosfonamidat, sulfhidril, karboksilat). Hidroksamatna skupina sadržana je primjerice u sastavu inhibitora galardina [$\text{HONHCOCH}_2\text{CH}(\text{i-Bu})\text{CO-L-Trp-NHMe}$] čiji izomeri 6A i 6B inhibiraju termolizin s konstantom inhibicije K_i od 20, odnosno 7 nmol L^{-1} ⁵⁷. Fosforamidatna skupina sastavni je dio fosforamidona (N-(α -ramnopiranozil-oksihidroksifosfono)-L-Leu-L-Trp), koji kod neutralnog pH inhibira termolizin s konstantom inhibicije, K_i od 30 nmol L^{-1} , dok je među najjačim inhibitorima ovoga enzima fosfonamidatni inhibitor Z-Phe^{P*}-L-Leu-L-Ala ($K_i = 0,068 \text{ nmol L}^{-1}$)⁵⁸.

U kristalnoj strukturi termolizina zapažaju se dvije domene: N-terminalna domena koja je sastavljena većinom od β -vrpca i C-terminalna domena u kojoj dominiraju α -zavojnice

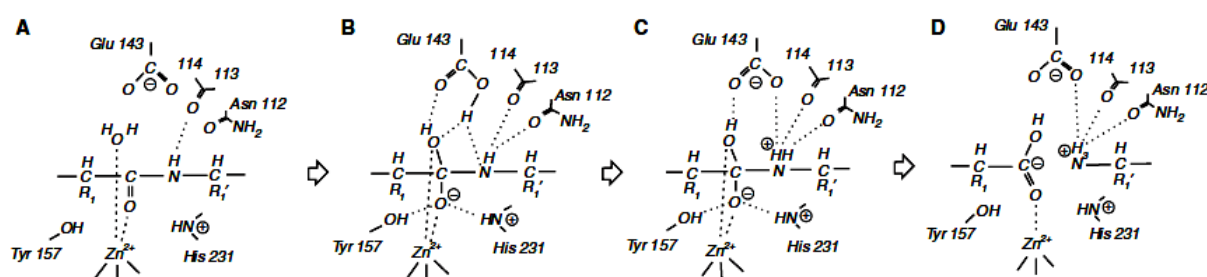
(slika 2.8A). Aktivno mjesto smješteno je u dubokom procjepu između ovih domena, a čine ga dvije α -zavojnice koje su povezane zavojem te jedan atom cinka. Osim iona cinka, molekula termolizina sadrži još četiri iona kalcija koji su neophodni za njegovu termostabilnost. Ligandi iona cinka su ostaci His142 i His146 iz "HEXXH" motiva, Glu166, te molekula vode, a zajedno grade vezno mjesto cinka u tetraedarskoj geometriji (slika 2.8B).



Slika 2.8. Kristalna struktura termolizina. (A) Kompleks termolizina i peptida L-valil-L-triptofana (PDB ID: 3TMN). (B) Aktivno mjesto termolizina. Modelom štapića crne boje označena je molekula L-valil-L-triptofana, ion Ca^{2+} prikazan je crvenom, a ion Zn^{2+} zelenom kuglicom. Crvena strelica označava područje aktivnog mjesta na enzimu.

Unatoč opsežnim studijama termolizina i njegovih homologa, metodama kristalografije, usmjerene mutageneze i enzimске kinetike, katalitički mehanizam još uvijek nije potpuno razjašnjen, iako je poznato da je posrijedi opća kiselo-bazna kataliza. Predložena su dva mehanizma hidrolitičkog djelovanja termolizina⁵⁹. Prema prvom mehanizmu proton akceptor je glutamat (Glu143) iz HEXXH motiva, a u drugom kao opća baza za vrijeme katalize djeluje histidinski ostatak (His231) aktivnog mjesta. Aktivirana molekula vode ili hidroksidni ion napada karbonilni ugljik peptidne veze koja se cijepa. Pretpostavlja se da nadolazeći supstrat istiskuje molekulu vode prema Glu143. Oba atoma vodika iz molekule vode vežu se vodikovim vezama na kisikove atome pobočne karboksilne skupine Glu143, dok

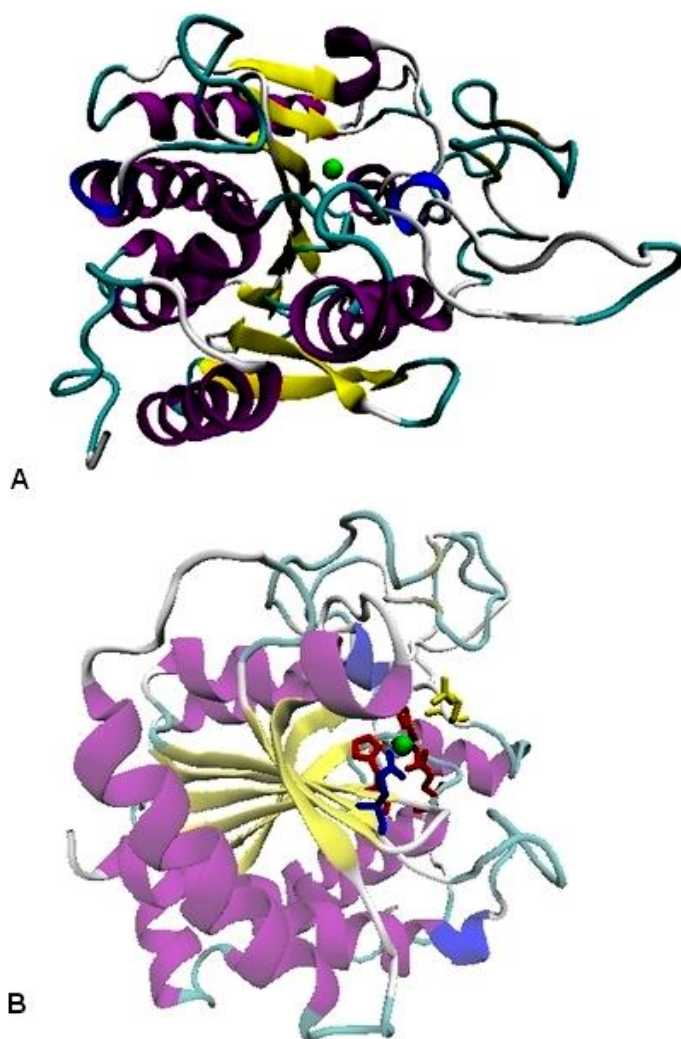
je kisik molekule vode još uvijek koordinacijski vezan s atomom cinka. Ovime se povećava nukleofilnost molekule vode, koja napada karbonilni ugljik veze koja se cijepa i nastaje intermedijer (slika 2.9A). Karbonilni kisik veze koja se cijepa početno koordinira atom cinka, a dodatno je stabiliziran vodikovom vezom s His231 odnosno Tyr157 (slika 2.9B). Proton kojeg prihvaća Glu143 brzo se premješta na odlazeći dušik. Pri tome kisik sporednog lanca Asn112 i karbonil okosnice Ala113 prihvaćaju vodikove veze od dvostruko protoniranog dušika veze koja se cijepa (slika 2.9C). Drugi prijenos protona preko Glu143 na odlazeći dušik uzrokuje raspad inermedijera na produkte (slika 2.9D).



Slika 2.9. Prvi predloženi mehanizam termolizina. Glu143 iz motiva „HEXXH“ za vrijeme katalize djeluje kao proton akceptor. Dolazeći supstrat istiskuje molekulu vode prema Glu143, dok kisik iz molekule vode još uvijek koordinira ion cinka (A). Voda napada karbonilni ugljik veze koja se cijepa i nastaje intermedijer (B). Proton kojeg prihvaća Glu143 premješta se na dušik peptidne veze. Kisik na sporednom lancu Asn112 i karbonil okosnice Ala113 prihvaćaju vodikove veze od dvostruko protoniranog dušika peptidne veze koja se cijepa (C). Drugi prijenos protona preko Glu143 na odlazeći dušik uzrokuje raspad inermedijera na produkte (D). Preuzeto iz (59) i prerađeno.

Karboksipeptidaza A (EC 3.4.17.1) iz gušterače goveda prva je okarakterizirana metalopeptidaza⁶⁰. Enzim vrši hidrolitičko cijepanje aminokiselina sa C-kraja peptidnog supstrata pri čemu u položaju P1' preferira aromatske (Tyr, Trp, Phe) ili velike alifatske aminokiselinske ogranke (Leu, Ile). Ova egzopeptidaza sintetizira se u inaktivnoj formi proenzima i kao takva izlučuje u dvanaesniku gdje se proteolitički aktivira tripsinom⁶¹. Molekula karboksipeptidaze A sadrži 309 aminokiselinskih ostataka i jedan atom cinka koji je bitan za katalitičku aktivnost. Trodimenzionalnu strukturu razriješio je 1967. godine William Lipscomb, dok su detalji kristalne strukture nativnog enzima visoke rezolucije (1,54 Å) objavljeni 1983. godine⁶² (slika 2.10A). Uvid u kristalnu strukturu karboksipeptidaze A

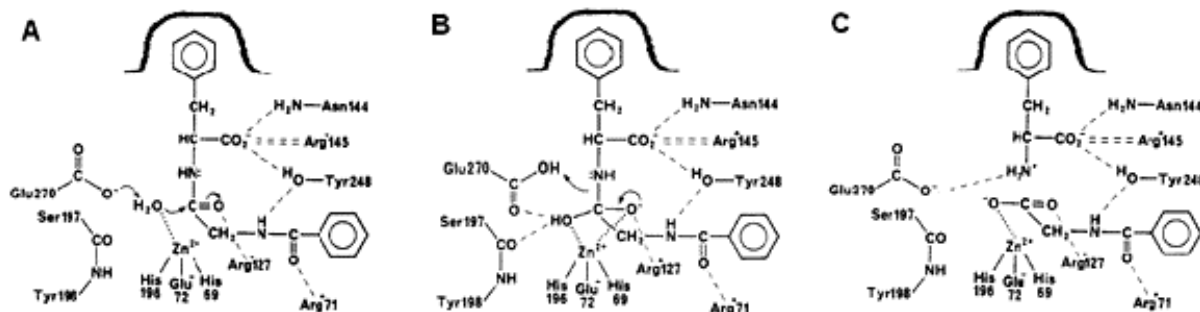
prikazuje 9 α -zavojnica koje prema unutrašnjem dijelu proteina oblikuju prolaz unutar kojeg se nalazi β -nabrana ploča sastavljen od 8 β -vrpce. Ovakav prostorni raspored α -zavojnica osigurava izoliranost β motiva od direktnog vodenog okružja. Prema dosadašnjim spoznajama, aktivno mjesto je u pukotini koja se nalazi u blizini površine enzima, a sadrži ion cinka koji je u tetraedarskoj geometriji povezan s His69, His196, Glu72 (slika 2.10B) i molekulom vode koja je vodikovom vezom povezana s važnim katalitičkim ostatkom Glu270.



Slika 2.10. Kristalna struktura karboksipeptidaze A iz gušterače goveda (PDB ID: 5CPA).

(A) Prostorni raspored sekundarnih struktura. (B) Prikaz prolaza s β -nabranom pločom i područjem aktivnog mjesta. α -zavojnice prikazane su ljubičastom, 3_{10} -zavojnice plavom, β -vrpce žutom, a petlje tirkiznom bojom. Ligandi Zn^{2+} (zelena kuglica) prikazani su modelom štapića: His69, Glu72 i His196 crvenom; Arg127 žutom, a Glu270 plavom bojom.

Na osnovi opsežnih kristalografskih studija kompleksa enzima s ketonskim analogima supstrata⁶³ i kompleksa s fosfonatnim inhibitorima⁶⁴ kao analogima prijelaznog stanja predložen je mehanizam opće kiselo-bazne katalize^{61,65} (slika 2.11).



Slika 2.11. Katalitički mehanizam karboksipeptidaze A. (A) Michaelisov kompleks enzim-supstrat; (B) stabilizirani tetraedarski intermedijer; (C) raspad intermedijera na produkte. Preuzeto iz (65).

Stvaranjem vodikove veze između karbonilne grupe peptidnog supstrata i Arg127 dolazi do polarizacije karbonilnog kisika čime se olakšava nukleofilni napad aktiviranom molekulom vode. Fenilna grupa peptidnog supstrata u položaju P1' ulazi u hidrofobni džep enzima, dok Asn144, Arg145, Tyr248 i Arg71 stvaraju vodikove veze s karboksilnom i amidnom odnosno karbonilnom grupom peptida te utječu na položaj supstrata pri katalizi. Djelovanjem Glu270 (opća baza) molekula vode vezana s Zn²⁺ gubi proton pri čemu nastali hidroksilni anion vrši nukleofilni napad na karbonilni ugljik veze koja se cijepa (slika 2.11A). Nastali hidroksilni anion stvara vodikovu vezu s Glu270 i Ser197 uz istovremeno zadržavanje veze s ugljikom karbonilne veze. U ovome trenutku ion Zn²⁺ je pentakoordiniran, a novonastali intermedijer podložan je raspadu (slika 2.11B). Prijelaz tetraedarskog intermedijera u produkte dešava se pri prijenosu protona s Glu270 (opća kiselina) na odlazeću amino-grupu (slika 2.11C). Osim navedenih aminokiselina, za ostatke Tyr198 i Ser199 u položaju S2, Phe279 u položaju S3 te Asp122, Arg124 i Glu128 u položaju S4 određeno je da su važni za katalitičku aktivnost i vezanje većih supstrata⁶⁶.

Model karboksipeptidaze A intenzivno se koristi kao meta pri dizajniranju i razvoju novih inhibitora patofiziološki značajnih metalo-enzima kao što su matiks metalopeptidaze i angiotenzin konvertirajući enzim.

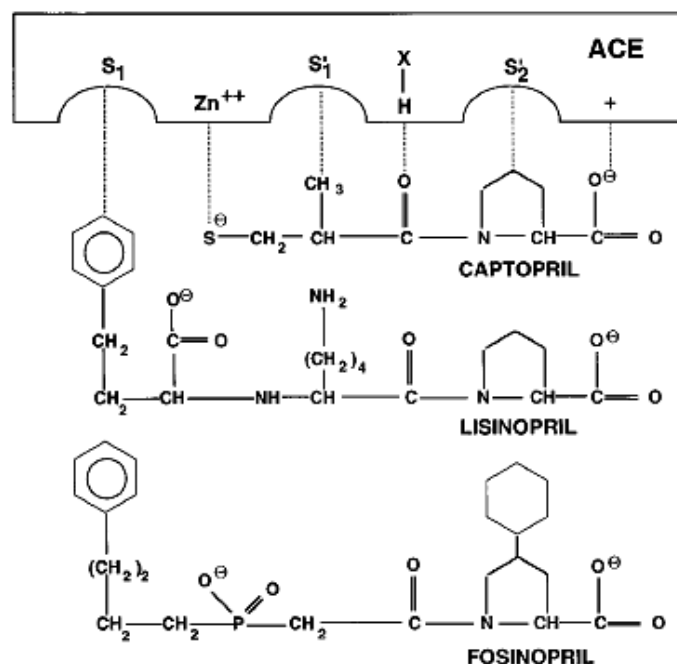
2.2.3. Fiziološke uloge metalopeptidaza

Danas je poznat veliki broj različitih biološki aktivnih peptida od kojih mnogi imaju važne fiziološke uloge u živčanom i endokrinom sustavu. Vežući se na membranske receptore ovi peptidi utječu na modulaciju brojnih signalnih puteva čime se ostvaruje njihov fiziološki učinak. Signalizacija putem (neuro)peptida i peptidnih hormona zaustavlja se izvanstaničnom proteolizom, ili, unutarstaničnom razgradnjom, nakon internalizacije peptida ili kompleksa peptid-receptor^{67,68,69}. Među peptidazama koje sudjeluju u razgradnji ili modifikaciji (neuro)peptida gotovo sve su cink-ovisne metalopeptidaze⁶⁷. Njihovi predstavnici su angiotenzin-konvertirajući enzim (ACE), neprilizin (NEP), aminopeptidaza N (APN) i aminopeptidaza osjetljiva na puromicin (PSA).

2.2.3.1. Angiotenzin-konvertirajući enzim (EC 3.4.15.1, ACE)

Ova cink-ovisna peptidaza opisana je 1956. godine kao “*hypertensin-converting enzyme*”⁷⁰. Dio je sustava renin-angiotenzin, ključnog za regulaciju krvnog tlaka kod sisavaca. ACE prevodi dekapeptid angiotenzin I u oktapeptid angiotenzin II, snažni vazokonstriktor. Primarna katalitička aktivnost ACE je „peptidil-dipeptidazna“, tj. odcjepljenje dipeptida s C-kraja peptidnih supstrata angiotenzina I i bradikinina. Međutim, pri hidrolizi nekih peptida koji su amidirani na C-kraju (npr. supstanca P) ACE ispoljava endopeptidaznu aktivnost⁷¹.

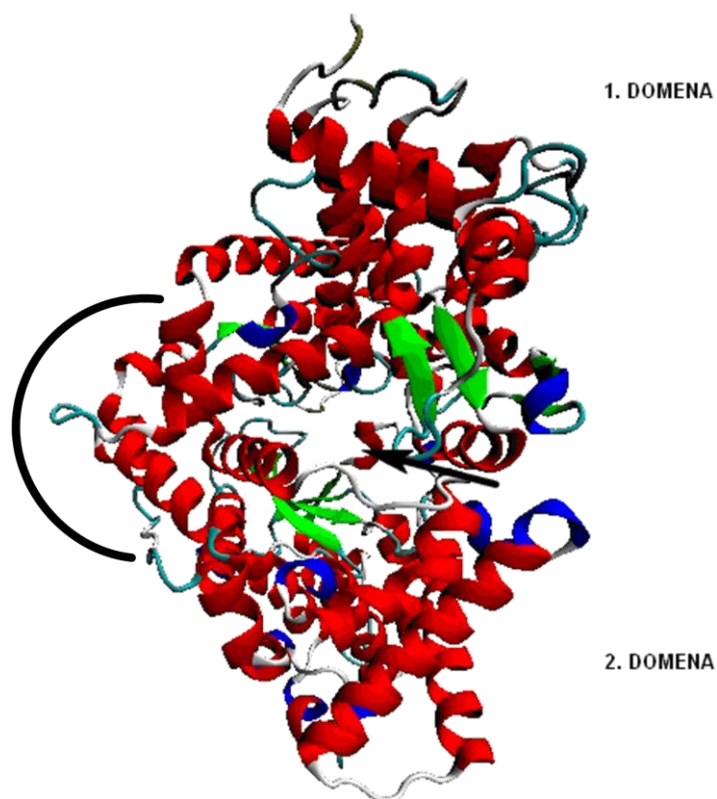
U sisavaca su zastupljene dvije izoforme ACE: veća izoforma (~ 170 kDa) je prisutna u mnogim tkivima i naziva se somatski ACE, a manja izoforma (~ 100 kDa) je prisutna samo u testisima i naziva se germinalni ACE⁷¹. Obje izoforme ACE su vezane za staničnu membranu. Izvanstanični dio somatskog ACE usmjeren je prema lumenu krvne žile, a građen je od dvije homologne domene te sadrži dva aktivna mjesta. Za razliku od somatskog ACE, germinalni ACE sadrži samo jedno aktivno mjesto^{72,73}. Inhibitori ACE kao što su kaptopril, lizinopril i fosinopril (slika 2.12) koriste se u liječenju hipertenzije kao i drugih bolesti krvožilnog sustava poput zatajenja srca i infarkta miokarda te predstavljaju jednu od najuspješnijih kliničkih primjena inhibicije metalopeptidaza⁷⁴.



Slika 2.12. Struktura i prikaz vezanja inhibitora u aktivno mjesto ACE. Vezanje inhibitora za enzim ostvaruje se preko podmjesta S₁, S₁' i S₂'. Kaptopril i fosinopril koordiniraju katalitički ion Zn²⁺ putem sulfidrilne odnosno fosfinilne grupe, dok lizinopril veže metalni ion putem karboksilne grupe. Preuzeto iz (74) i prilagođeno.

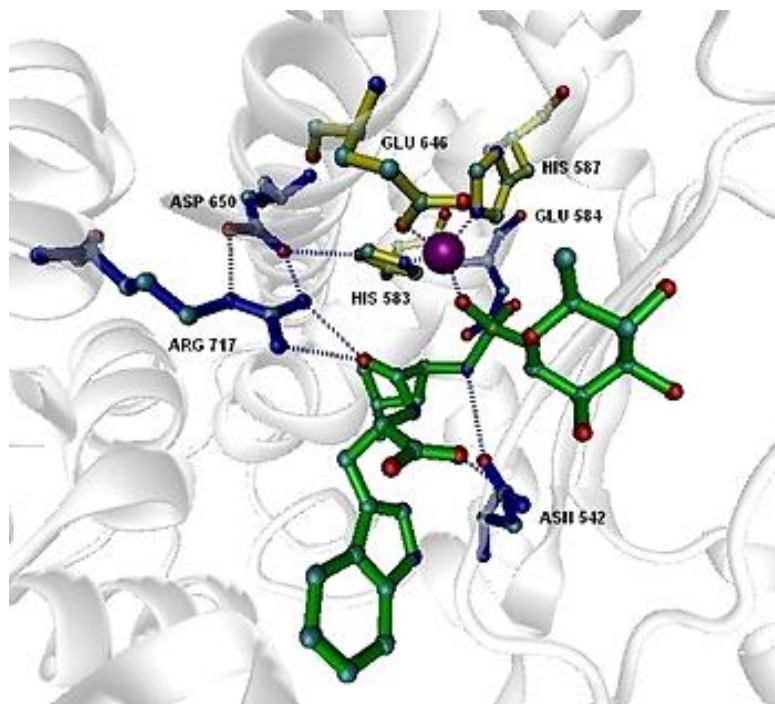
2.2.3.2. Neprilizin (EC 3.4.24.11, neutralna endopeptidaza; NEP)

NEP je cink-ovisna endopeptidaza sisavaca, izvorno pročišćena iz zečjeg bubrega⁷⁵. To je integralni membranski glikoprotein tipa II, veličine 90-110 kDa. Čine ga kratka N-terminalna citoplazmatska domena, transmembranska α zavojnica i veliki C-terminalni izvanstanični dio molekule u kojem je smješteno aktivno mjesto. Uvid u kristalnu strukturu izvanstaničnog dijela NEP otkriva postojanje dvije domene. Prva, veća domena građena je od 3 segmenta i nadovezuje se na transmembranski dio. Sadrži aminokiseline važne za koordinaciju cinka i katalitičku aktivnost. Druga, manja domena, sastoji se od dva polipeptidna segmenta. Obje domene međusobno su povezane sa četiri α -zavojnice i grade središnju pukotinu aktivnog mjesta (slika 2.13).



Slika 2.13. Kristalna struktura izvanstaničnog dijela ljudske NEP (PDB ID: 1DMT). Crna strelica označava područje središnje pukotine, dok crni polukrug obilježava područje povezivanja domena. α -zavojnice prikazane su crvenom, 3_{10} -zavojnice plavom, β -vrpce zelenom, a petlje tirkiznom bojom.

Sličnost geometrije aktivnog mjesta ljudske NEP i termolizina, kao i postignuta inhibicija NEP fosforamidonom, poznatim inhibitorom termolizina upućivala je da bi ova dva enzima mogla imati sličan katalitički mehanizam. Tek je razjašnjenje kristalne strukture kompleksa izvanstaničnog dijela ljudske NEP (ostaci 52-749) i fosforamidona (slika 2.14), doprinijelo boljem razumijevanju supstratne specifičnosti te potvrdi sličnosti katalitičkog mehanizma NEP s onim u termolizina⁷⁶.



Slika 2.14. Prikaz aktivnog mjesta ljudske NEP u kompleksu s inhibitorom fosforamidonom [N-(α -ramnopiranozil-oksihidroksifosfono)-L-leucil-L-triptofan] (PDB ID:1DMT), prema Carsonu i Turneru⁷⁷. Ligandi Zn^{2+} (ljubičasta kuglica): His583, His587 i Glu646 prikazani su modelom štapića žute boje dok su drugi aminokiselinski ostaci bitni za vezanje liganda ili katalizu: Asn542, Glu584, Asp650 i Arg717 prikazani plavom bojom. Molekula fosforamidona označena je modelom štapića zelene bojom, a isprekidane linije predstavljaju koordinacijske i vodikove veze.

NEP je široko zastupljena u mnogim tkivima sisavaca, a osobito u membranama bubrega i crijeva⁷⁸. U pogledu fizioloških uloga ovog enzima navodi se njegova uključenost u degradaciji regulatornih peptida poput enkefalina, neurotenzina, supstance P, atrijskog natriuretičkog peptida (ANP), bradikinina i endotelina. Pronalazak potentnih inhibitora NEP potaknut je razvojem novih analgetika i antihipertenzivnih agenasa^{77,78}. Zbog značajnog povećanja razine β -amiloidnog ($A\beta$) peptida, primarnog patogenog faktora Alzheimerove bolesti, koje je uočeno u miševa kojima nedostaje gen za NEP, smatra se kako enzim ima ulogu u odgradnji ovog neurotoksičnog peptida te da bi ponovna selektivna ekspresija NEP mogla poslužiti kao novi pristup u liječenju ove bolesti^{78,79,80}.

2.2.3.3. Aminopeptidaza osjetljiva na puromicin (EC 3.4.11.14; PSA; ApPS)

PSA, poznata još kao citosolna alanil-aminopeptidaza, prvi put je okarakterizirana 1981. godine iz mozga štakora kao cink-ovisna metalopeptidaza molekulske mase 99 kDa⁸¹. PSA je kao uglavnom citosolni protein, zastupljena u mnogim tkivima sisavaca, dok je membranski oblik enzima pronađen u mozgu^{81,82,83}. To je aminopeptidaza široke specifičnosti, član porodice metalopeptidaza M1. Enzim pročišćen iz citosola ljudskih eritrocita preferira bazične aminokiseline Lys i Arg na N-kraju svojih supstrata⁸⁴. Za aminopeptidazu iz jetre štakora poznato je da hidrolizira brojne aminoacil-7-amido-4-metil kumarinske supstrate (Ala-, Leu-, Arg-, Tyr- i Met-). Poput ljudskog homologa, uz inhibiciju kelirajućim agensima, enzim se pokazao osjetljivim na djelovanje antibiotika puromicina ($K_i = 186 \text{ nmolL}^{-1}$) te poznatih inhibitora aminopeptidaza poput amastatina ($K_i = 4 \text{ nmolL}^{-1}$) i bestatina ($K_i = 14 \text{ nmolL}^{-1}$)⁸⁵.

PSA *in vitro* hidrolizira veliki broj peptida poput proktolina, timopentina, enkefalina, Lys-bradikinina, angiotenzina III, ali pravi fiziološki supstrati još su nedovoljno poznati⁸⁶. Zna se da PSA sudjeluje u procesuiranju peptida za prezentaciju glavnim sustavom tkivne snošljivosti klase I (eng. *major histocompatibility complex class I*; MHC-1), da ima ulogu u regulaciji staničnog ciklusa, apoptoze, intracelularnog katabolizma proteina te da je uključena u reproduktivnu funkciju⁸⁷. Zbog uloge pri nastajanju β -amiloidnog peptida, pretpostavljeno je njeno sudjelovanje u progresiji Alzheimerove bolesti⁸⁸, a zbog njenog sudjelovanja u degradaciji poliglutaminske bjelančevine huntingtina smatra se da utječe na patogenezu Huntingtonove i drugih neurodegenerativnih poliglutaminskih bolesti⁸⁹. Budući da je poznato da protein tau, koji stabilizira mikrotubule živčanih stanica i čija je akumulacija povećana kod Parkinsonove bolesti predstavlja fiziološki supstrat PSA, pretpostavlja se kako ova aminopeptidaza ima utjecaj na patogenezu te bolesti^{90,91}. Novija istraživanja pokazuju kako je PSA glavna proteaza uključena u izravnu razgradnju pogrešno smotane i akumulirane neurotoksične superoksid-dismutaze 1 (SOD1) pronađene u motornim neuronima transgeničnih miševa i pacijenata oboljelih od amiotrofične lateralne skleroze (ALS), što je dodatna potvrda moguće zaštitne uloge PSA u patologiji neurodegenerativnih bolesti⁹².

2.3. Porodica metalopeptidaza M49

Dipeptidil-peptidaze se ubrajaju u skupinu egzopeptidaza, koje odcjepljuju dipeptidne ostake od N-kraja peptidnih supstrata. Od četiri glavna tipa dipeptidil-peptidaza, samo je dipeptidil-peptidaza III (DPP III) metalo-enzim. Porodica DPP III (porodica metalopeptidaza M49) prepoznata je kao zasebna porodica na temelju jedinstvenog, evolucijski očuvanog motiva aktivnog mjesta „HEXXGH“ odgovornog za vezanje iona cinka i katalitičku aktivnosti enzima, kao i prema statistički značajnim sličnostima aminokiselinskih slijedova svojih članova. Prema podacima baze MEROPS³ (travanj 2013.) porodica M49 broji oko 390 metalopeptidaza čija je rasprostranjenost zahvaljujući bioinformatičkoj analizi čitavih genoma organizama otkrivena kod gotovo svih oblika života.

2.3.1. Dipeptidil-peptidaza III

2.3.1.1. Opće značajke

Dipeptidil-peptidaza III (DPP III; EC 3.4.14.4) je otkrivena u ekstraktu prednjeg režnja goveđe hipofize putem hidrolitičkog cijepanja sintetskog supstrata Arg-Arg-2-naftilamida (Arg-Arg-2NA) i nazvana dipeptidil-arilamidaza III⁹³. Zbog načina hidrolitičkog cijepanja i iskazanog afiniteta prema različitim vrstama bioaktivnih peptida DPP III je poznata i kao dipeptidil-aminopeptidaza III⁹⁴, angiotenzinaza⁹⁵ i enkefalinaza B^{5,93}. Do danas je DPP III pročišćena i biokemijski okarakterizirana kao citosolni monomerni enzim (molekularne mase 66-86 kDa i pI kod pH ~ 4,5), većinom iz tkiva sisavaca i to iz ljudske posteljice⁹⁶, leće⁹⁷ i eritrocita⁹⁵, mozga zamorca⁸, štakora⁹⁴ i koze⁹⁸, jetre⁹⁹ i eritrocita štakora¹⁰⁰, svinjskih mišića¹⁰¹ i goveđe leće⁹⁷. Osim iz tkiva sisavaca, DPP III je okarakterizirana iz vinske mušice *Drosophila melanogaster*¹⁰², sluzave plijesni *Dictyostelium discoideum*¹⁰³, kvasca *Saccharomyces cerevisiae*¹⁰⁴ te kao rekombinantni protein porijeklom iz bakterije *Bacteroides thetaiotaomicron*¹⁰⁵. Iako je DPP III opisana kao citosolni protein, uočena je njena asocijacija sa staničnom membranom u mozgu štakora^{94,106} i crijevu žohara¹⁰⁷, dok je kod vinske mušice enzim opisan i kao citosolni i kao membranski protein¹⁰³.

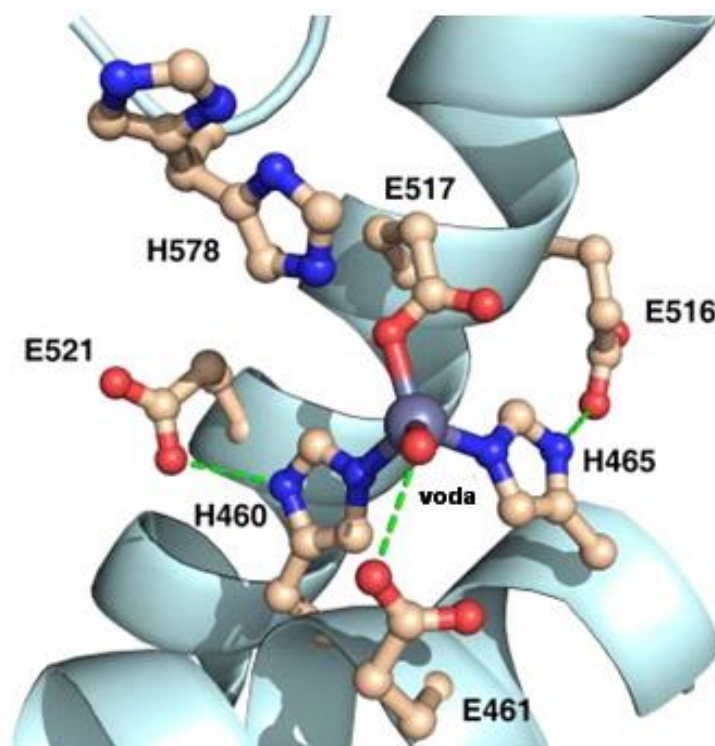
Pri određivanju enzimске aktivnosti do sada opisanih DPP III najčešće su korišteni različiti sintetski dipeptidil-arilamidni supstrati od kojih enzim najbolje hidrolizira

Arg-Arg-2NA⁹⁵. Optimalna temperatura za aktivnost enzima iz tkiva sisavaca je pri 37 °C, a linearan gubitak peptidazne aktivnosti utvrđen je pri višim temperaturama kao i potpuna inaktivacija enzima pri 55 °C^{93,94,95,100,108}. Primijećena je osjetljivost većine pročišćenih enzima na smrzavanje, uz gubitak aktivnosti i do 60 %⁹³, dok čuvanje enzima u glicerolu ($\phi = 0,40 - 0,50$) nije uzrokovalo značajniji gubitak aktivnosti na temperaturama do -20 °C⁹⁵. Maksimum hidrolitičke aktivnosti DPP III prema Arg-Arg-2NA zabilježen je pri blago lužnatim uvjetima (pH 8,0 - 9,0), a za bioaktivne peptide poput angiotenzina II i Leu-enkefalina, u neutralnom području (pH 7,4)^{93,94,95,99,109,110}.

Zajednička karakteristika DPP III iz različitih izvora je ovisnost enzimske aktivnosti o divalentnom metalnom ionu i aktivacija ionima Co^{2+} ^{5,100}. Reaktivirajući učinak na enzim imaju ioni Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} i Ca^{2+} ⁹⁵. Kationi teških metala poput Cd^{2+} , Hg^{2+} i Pb^{2+} inhibitorno djeluju na aktivnost enzima, a sličan učinak imaju pri višim koncentracijama i kationi Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} i Mn^{2+} . Među općim značajkama većine istraženih DPP III je inhibicija kelirajućim agensima i sulfhidrilnim reagensima⁵. Dokaz da DPP III pripada cink-ovisnim peptidazama pružilo je istraživanje Fukasawe i sur. koji su odredili sadržaj Zn^{2+} (oko 1 gion Zn^{2+} po molu proteina) i konstantu disocijacije cinka za enzim iz ljudske placente (250 pmol L⁻¹) i za rekombinantnu DPP III štakorske jetre⁷.

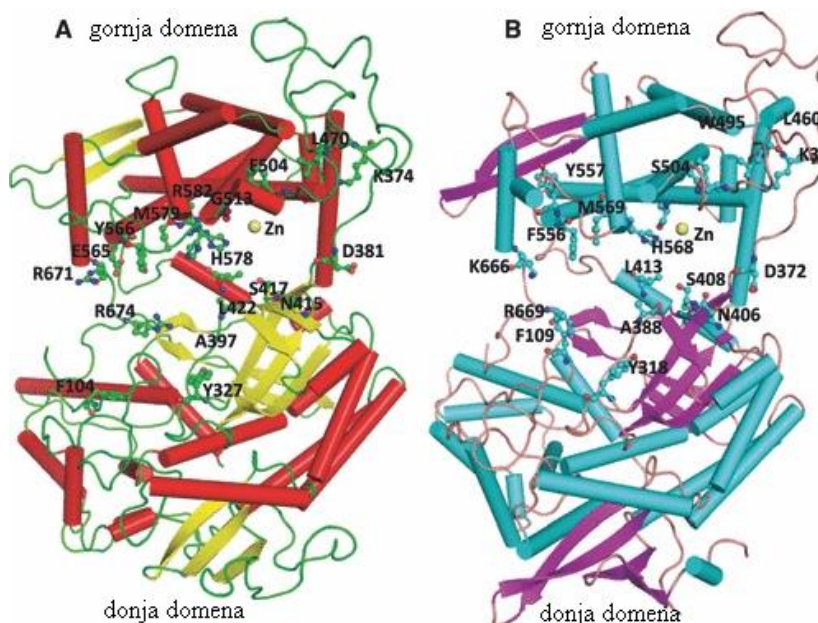
2.3.1.2. Struktura i katalitički mehanizam

Primarna struktura DPP III (738 aminokiselina) prvi put je određena 1998. godine za enzim iz jetre štakora, čiji je gen kloniran i sekvencioniran⁷ nakon čega je uslijedilo kloniranje cDNA za ljudsku DPP III, i DPP III iz vinske mušice te ulaganje sekvenci čitavih genoma u baze podataka. Na temelju usporedbi primarnih struktura štakorske i DPP III iz drugih izvora, utvrđena je sačuvanost karakterističnih motiva $\text{H}^{450}\text{EXXGH}^{455}$ i $\text{E}^{507}\text{EXR(K)AE}^{512}(\text{D})$ (ostaci označeni prema DPP III sisavaca)⁴. Iako je sličnost aminokiselinskih slijedova štakorske i ljudske DPP III vrlo velika, primjećene su i razlike u svojstvima koje ukazuju na različitu topologiju njihovih aktivnih mjesta¹⁰⁰. Metodom usmjerene mutageneze ustanovljeno je da ostatak Glu451 prvog motiva ima važnost za katalitičku aktivnost enzima, dok su ostaci His450 i His455 prvog motiva kao i ostatak Glu508 iz drugog motiva uključeni u koordinaciju cinka aktivnog mjesta¹¹, što je potvrđeno nedavnim rješenjem kristalne strukture kvaščeve DPP III¹² (PDB kod: 3csk) (slika 2.15) i ljudske DPP III¹¹¹ (PDB kod: 3fvy).



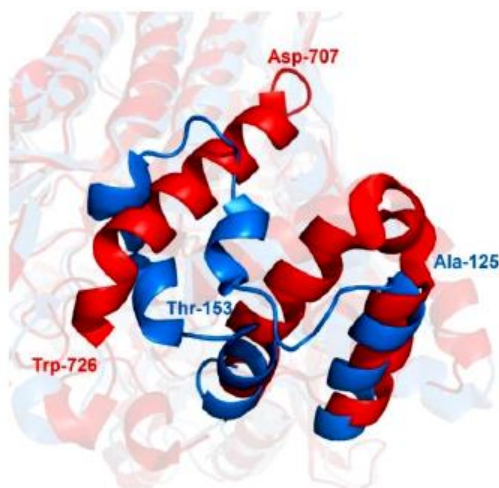
Slika 2.15. Aktivno mjesto kvaščeve DPP III. Cink je tetraedarski koordiniran pobočnim ostacima His460, His465, Glu517 i molekulom vode, dok Glu516, Glu521 i Glu461 sudjeluju u izgradnji aktivnog mjesta vodikovim vezama s His465, His460 i molekulom vode. Jednoslovnom oznakom i brojem prikazani su aminokiselinski ostaci, dok je katalitički ion cinka prikazan ljubičastom kuglicom. Preuzeto iz (12).

Uvid u kristalnu strukturu kvaščeve DPP III (711 aminokiselina) otkrio je kako ovaj protein ima novi način smatanja¹². Kristalne strukture kvaščeve i ljudske DPP III (737 aminokiselina) vrlo su slične (slika 2.16AiB). To su molekule izduženog oblika ($75 \times 60 \times 50 \text{ \AA}$, dimenzije kvaščeve holotipa) u kojem prevladavaju α - elementi sekundarne strukture^{12,112}. Unatoč maloj sličnosti primarnih struktura ljudske i kvaščeve DPP III (35 %), postotak uspješno poravnatih aminokiselinskih ostataka trodimenzionalnih (3-D) struktura vrlo je velik (94 %)¹¹³. Molekula proteina može se raščlaniti u dvije domene koje su međusobno razdvojene širokim rascjepom. Gornja domena izgrađena je većim dijelom od α - zavojnica, dok se u donjoj domeni izmjenjuju α - i β - elementi sekundarne strukture. Područje aktivnog mjesta s katalitičkim ionom Zn^{2+} te motivima „HELLGH“ i „EECRAE“ smješteno je u donjem dijelu gornje domene, usmjereno ka rascjepu.



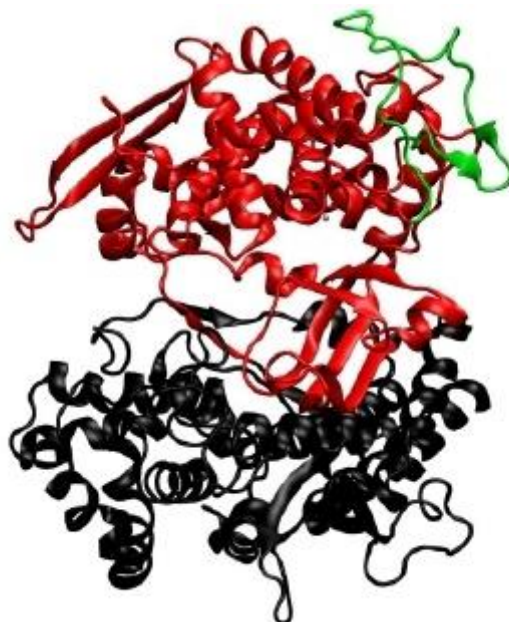
Slika 2.16. Usporedni prikaz kristalnih struktura A) kvašćeve DPP III (PDB kod: 3csk) i B) ljudske DPP III (PDB kod: 3fvy). Ion cinka prikazan je žutom kuglicom, dok su aminokiselinski ostaci veznog mjesta supstrata označeni jednoslovnom oznakom i brojem. Preuzeto iz (112).

Preklapanjem 3-D struktura ljudske DPP III i kvašćeve holotipa, dobivena je vrijednost rmsd od $2,17 \text{ \AA}^{114}$, dok bolje preklapanje 3-D struktura ljudske DPP III i kvašćeve enzima uz rmsd od $1,4 \text{ \AA}$ navode Bezerra i sur.¹¹⁵ te opisuju regije po kojima se ove dvije strukture najviše razlikuju (slika 2.17).



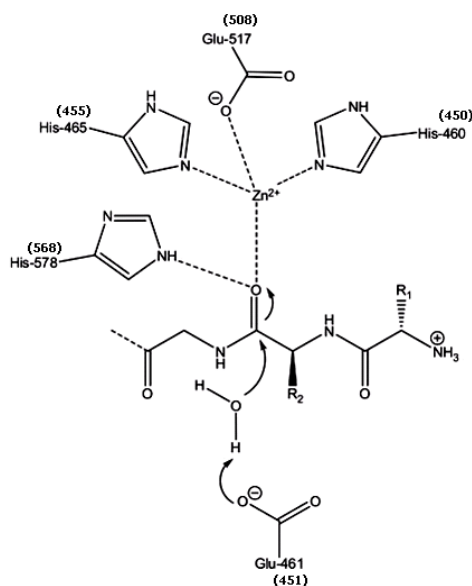
Slika 2.17. Prikaz regija ljudske DPP III₁₋₇₂₆ (crveno) i kvašćeve DPP III (plavo) po kojima se dvije strukture najviše razlikuju. Na helikalnom mjestu ljudske DPP III (ostaci 129-145) nalazi se duža, voluminozna petlja (ostaci 125-153) kvašćeve enzima. Ljudski enzim sadrži dodatni C-terminalni helikalni dio (ostaci 707-726) koji nije prisutan u strukturi kvašćeve DPP III. Preuzeto iz (115).

Fleksibilnost proteinskih regija ljudske DPP III izračunata rmsf analizom tijekom simulacije od 30 ns pokazuje (slika 2.18.) kako je najfleksibilniji dio proteina (obojen zeleno) građen većinom od zavoja i petlji i dio je gornje domene, manje fleksibilna je donja domena (obojena crno) dok je najkrući dio proteina (obojen crveno) u blizini veznog mjesta¹¹⁶.



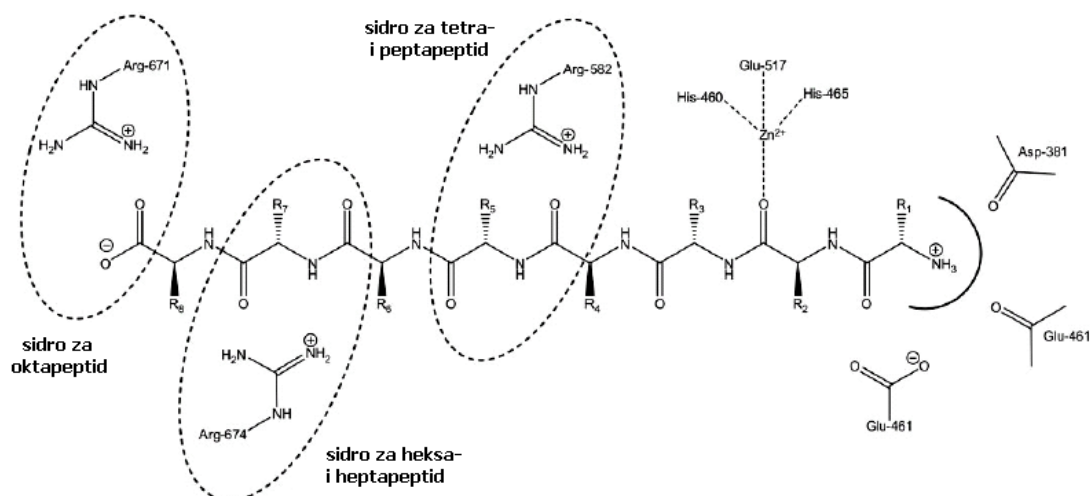
Slika 2.18. Fleksibilnost proteina ljudske DPP III tijekom simulacije duge 30 ns. Preuzeto iz (116) i prilagođeno.

Unatoč novom načinu smatanja način koordinacije iona cinka te razmještaj katalitički važnih ostataka u DPP III vrlo je sličan dvjema cink-ovisnim endopeptidazama neprilizinu i termolizinu te se pretpostavlja da je i katalitički mehanizam hidrolize peptidne veze enzima porodice M49 sličan mehanizmu navedenih peptidaza. Prema predloženom mehanizmu¹² (slika 2.19), karbnilna skupina nadolazećeg supstrata istiskuje molekulu vode iz koordinacijske sfere cinka prema Glu461 (opća baza) koji deprotonira molekulu vode. Ovime se povećava nukleofilnost vode koja napada karbnilni ugljik veze koja se cijepa. Pretpostavlja se kako je nastali oksianionski intermedijer vjerojatno stabiliziran vodikovom vezom s aminokiselinskim ostatkom His578, odnosno His568 u ljudskoj DPP III,^{12,116}.



Slika 2.19. Predloženi katalitički mehanizam DPP III. Broj u zagradi odgovara aminokiselinskom ostatku ljudskog ortologa. Preuzeto iz (12) i prerađeno.

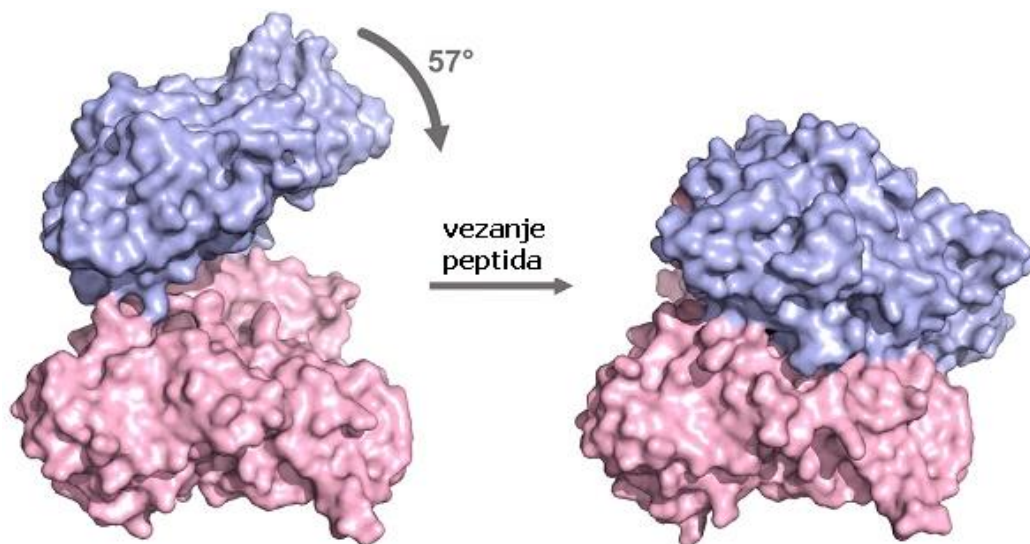
U nedostatku kristalne strukture kompleksa DPP III sa supstratom, učinjen je računalni model strukture kompleksa kvaščeve DPP III i oktapeptida Ala₈¹². Prema modelu, supstrat se veže u pukotinu između domena. Moguća vezna mjesta N-kraja supstrata karakterizirana su negativnim elektrostatskim potencijalom površine Glu461 i Asp381, dok su vezna mjesta C-kraja supstrata karakterizirana pozitivnim elektrostatskim potencijalom površine Arg582, Arg674 i Arg671 (serija „Arg sidara“) (slika 2.20).



Slika 2.20. Vezanje oktapeptida Ala₈ za DPP III. Preuzeto iz (12) i prerađeno.

Istraživanja provedena računalnim simulacijama divljeg tipa i mutanta ljudske DPP III otkrivaju kako vezanje supstrata Arg-Arg-2NA za protein inducira reorganizaciju veznog mjesta i njegovo djelomično zatvaranje¹¹⁶. Uspoređujući kristalnu strukturu ljudske DPP III i kompleksa sa i bez supstrata dobivenih duljim molekulsko dinamičkim simulacijama pokazano je da kristalna struktura proteina postoji samo u „otvorenom“ obliku, dok se za slobodni enzim i njegov kompleks sa supstratom u otopini pretpostavlja da postoje i u „otvorenom“ i u „zatvorenom“ obliku¹¹⁴. Vezanjem liganda bilo u „otvoreni“ bilo u „zatvoreni“ oblik enzima zaustavlja se daljnje zatvaranje proteina i dodatno ukrućuje aminokiselinske ostatke koji ostvaruju interakcije sa supstratom, kao i α -heliks koji povezuje gornju i donju domenu, te dio donje domene blizu aktivnog mjesta. Prema izračunu slobodne energije vezanja, supstrat se čvršće veže u „zatvoreni“ nego u „otvoreni“ oblik enzima, a rezultati simulacija nadalje ukazuju na važnost Trp300, Tyr318, Asp372, Asn391, Arg399, Phe404, Lys405 i Asn406 pri zatvaranju proteina kao i na njihovo sudjelovanje u stabilizaciji položaja supstrata u aktivnom mjestu enzima¹¹⁴.

Nedavno razrješenje prve kristalne strukture kompleksa ljudske DPP III s opioidnim pentapeptidom tinorfinom (PDB kod: 3T6B) otkriva kako vezanje peptida u područje aktivnog mjesta uzrokuje značajno pomicanja domena čime kompleks poprima „zatvoreni“ oblik (slika 2.21)¹¹⁵.



Slika 2.21. Pomicanje domena pri vezanju tinorfina za ljudsku DPP III. Prikaz površine slobodne DPP III (lijevo) i kompleksa DPP III s tinorfinom (desno). Gornja domena prikazana je svijetlo plavom, a donja domena ružičastom bojom. Preuzeto iz (115) i prerađeno.

Rezultati izotermalne titracijske kalorimetrije ukazuju da je vezanje tinorfina te peptida endomorfina-1, Leu-enkefalina i Ile-Val-Tyr-Pro-Trp za enzim jako endoterman i entropijski vođen proces popraćen otpuštanjem velikog broja molekula vode iz područja procjepa s aktivnim mjestom¹¹⁵. Navedenu tvrdnju podupiru Tomić i sur.¹¹⁴ temeljem promjena komponenti Gibbsove slobodne energije pri simulacijama molekulske dinamike.

2.3.1.3. Supstratna specifičnost

Proučavanja supstratne specifičnosti pokazala su kako DPP III najbolje odcjepljuje dipeptide od N-kraja peptidnog supstrata sastavljenog od četiri do osam aminokiselina, dok je hidrolitičko djelovanje na tripeptide slabije izraženo, a izostaje kod peptida koji u sastavu imaju više od 10 aminokiselina^{5,94,95}. Istraživanja *in vitro* na štakorskoj⁹⁴, ljudskoj⁹⁵ i DPP III zamorca⁸ pokazuju visoki afinitet enzima prema biokativnim peptidima iz reda enkefalina i angiotenzina, dok je za enzim iz mozga koze pokazano da hidrolizira i adenokortikotropni hormon (ACTH)¹¹⁷. Ispitivanjem većeg broja peptida utvrđeno je da DPP III preferira hidrofobne aminokiselinske ostatke u položaju P1'. Smatralo se kako DPP III ne hidrolizira peptide koji na položajima P1 i P1' imaju prolin^{8,95}. Međutim, Baršun i sur.¹⁰ 2007. godine po prvi put otkrivaju da enzim iz ljudskih eritrocita *in vitro* hidrolizira opioidni peptid endomorfina-1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂) oslobađajući pritom dipeptid Tyr-Pro čime je dokazano kako ova metalopeptidaza može hidrolizirati i peptidne supstrate koji na položaju P1 sadrže ostatak prolina. Isti autori navode kako enzim ima visoki afinitet prema peptidima iz reda hemorfina i egzorfina.

2.3.1.4. Fiziološka uloga

Zbog relativne nespecifičnosti prema peptidnim supstratima kao i zbog nedostatka selektivnih inhibitora metalopeptidaza porodice M49, fiziološki supstrati DPP III do danas nisu točno utvrđeni niti je precizno određena njezina fiziološka uloga. S obzirom na široku rasprostranjenost enzima u tkivima i stanicama sisavaca te *in vitro* hidrolizu širokog spektra oligopeptida pretpostavlja se kako DPP III ima opću ulogu u katabolizmu unutarstaničnih proteina. Prisutnost visoke razine DPP III u mozgu i neuronima kičmene moždine štakora^{9,118} kao i niska razina enzima u cerebrospinalnoj tekućini pacijenata koji su patili od akutne boli¹¹⁹ ukazuju na potencijalnu ulogu DPP III u modulaciji razine neuropeptida, a time

i regulaciji osjeta boli. U prilog tome ide već spomenuti visoki afinitet ljudske DPP III *in vitro* prema enkefalinima i endomorfina^{10,94}. Pokazano je da kod kukaca ovaj enzim sudjeluje u odgradnji miotropnog neuropeptida proktolina¹⁰². Visoki afinitet DPP III prema vazokonstriktornom oktapaptidu angiotenzinu II upućuje na njeno sudjelovanje u regulaciji krvnog tlaka¹²⁰. Povišena razina aktivnosti i proteina DPP III detektirana je u karcinomima endometrija¹²¹ i jajnika¹²² što ovaj enzim čini mogućim biomarkerom malignih oboljenja. Provedenim istraživanjem na životinjskom modelu Zhang i sur.¹²³ predlažu potencijalnu uloga DPP III u nastanku očne mrežice. Nedavni rezultati analiza utjecaja ekspresije velikog broja gena otkrili su DPP III kao jedan od aktivatora antioksidacijskog elementa (eng. *antioxidant response element*; ARE) te se pretpostavlja da bi enzim mogao doprinositi staničnoj obrani protiv oksidativnog stresa¹²⁴. Najnoviji podaci karakterizacije ljudskog proteoma (eng. *human central proteome*) ukazuju kako je DPP III široko zastupljen i dobro ekspresiran protein u svim staničnim linijama⁶.

2.3.2. Inhibitori DPP III

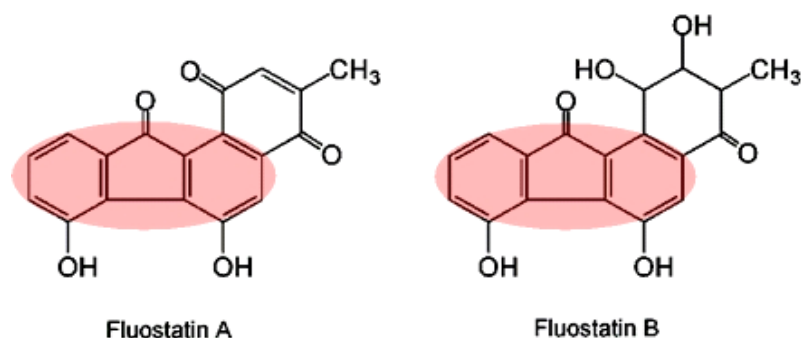
Kako je ranije navedeno inhibicija kelirajućim agensima i sulfhidrilnim reagensima opća je značajka DPP III iz različitih izvora. Prve podatke o smanjenju aktivnosti DPP III djelovanjem tiolnih reagenasa objavili su Ellis i sur. 1967. godine⁹³. Pokazali su kako je enzim iz hipofize goveda izrazito osjetljiv na djelovanje *para*-kloromerkurisulfonata (*p*-CMS) i *N*-etilmaleimida (NEM) koji su potpuno inhibirali enzim pri koncentraciji od 0,25 nmol L⁻¹ odnosno 10 μmol L⁻¹.

Osjetljivost prema sulfhidrilnim reagensima *para*-kloromerkurbenzoatom (*p*-CMB), 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojevom kiselinom) (DTNB), 4,4'-ditiodipiridinom (DTDP), *N*-etilmaleimidom (NEM) i jodoacetamidom (IAA) dokazana je tijekom kasnijih istraživanja i za DPP III iz drugih izvora te je utvrđeno kako stupanj inhibicije ovisi o izvoru enzima. Tako je primjerice za enzim iz eritrocita štakora pokazano kako koncentracija *para*-hidroksimerkuribenazonata (*p*HMB) potrebna za 50 %-tnu inhibiciju iznosi 3 nmol L⁻¹ dok je isti stupanj inhibicije enzima iz ljudskih eritrocita postignut tek primjenom 1 μmol L⁻¹ reagensa¹⁰⁰. Kvašćev enzim¹⁰⁴ kao i enzim iz ljudske posteljice⁹⁶ bili su znatno osjetljiviji (>1000 puta) prema *p*-CMB u odnosu na enzim iz mozga zamorca⁸ i enzim iz srži nadbubrežne žlijezde goveda¹²⁵. Zanimljivo je kako enzim iz ljudskih eritrocita uopće nije bio inhibiran s 1 mmol L⁻¹ IAA,⁹⁵ dok je znatnu osjetljivost pri istoj koncentraciji spoja pokazala

DPP III iz mozga zamorca⁸. Nadalje, djelomična inhibicija s 1 mmol L⁻¹ NEM pokazana je za enzim iz sjemenske tekućine čovjeka¹⁰⁸ i srži nadbubrežne žlijezde goveda¹²⁵ dok je DPP III iz mozga zamorca⁸ bio izrazito inhibiran pri koncentraciji od 0,2 mmol L⁻¹.

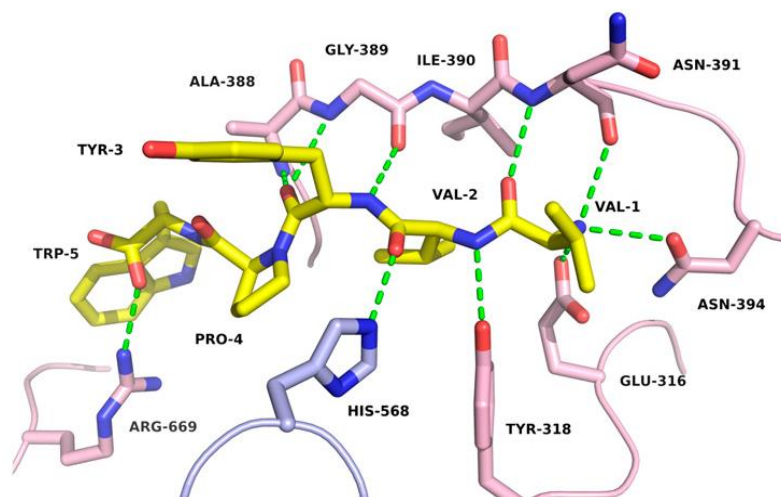
Zbog iskazanog inhibitornog djelovanja sulfhidrilnih reagenasa na aktivnost DPP III smatralo se kako je reaktivna SH-grupa ostataka cisteina važna za katalitički mehanizam enzima. S obzirom na to da niti jedan ostatak cisteina ne koordinira katalitički atom cinka, važnost SH-grupa(e) za aktivnost enzima proučavana je metodom ciljane mutageneze te je pokazano kako je modifikacija ostatka Cys176 štakorske¹²⁶, Cys639 kvaščeve¹²⁷ i Cys450 bakterijske¹⁰⁵ DPP III uključena u inaktivaciju ovih enzima sulfhidrilnim reagensima, a potencijalno i u regulaciju njihove aktivnosti. Istraživanja Abramić i sur.¹¹⁸ pokazala su da peptidni supstrati poput angiotenzina III i Leu-enkefalina usporavaju inaktivaciju ljudske i štakorske DPP III što ukazuje kako su reaktivni cisteinski ostaci smješteni u/ili blizu aktivnog mjesta enzima. Usporedbom kinetičkih rezultata inaktivacije pročišćene štakorske i ljudske DPP III s pHMB, zaključeno je da enzim štakora sadrži dvije vrste SH-grupa koje su različite po reaktivnosti, dok je reaktivnost SH-grupa ljudske DPP III podjednaka¹¹⁸.

Nadalje, DPP III je, ovisno o izvoru enzima, djelomično ili potpuno inhibirana kelatorima metala kao što su EDTA, etilenglikoltetraoctena kiselina (EGTA) i 1,10-fenantrolin, u koncentraciji 0,5-10 mmol L⁻¹^{8,96,98,99,100,108,125,128}. Iako su ispitivanja osjetljivosti enzima kelirajućim agensima upućivala kako je DPP III metalopeptidaza, enzim je dugo vremena bio svrstavan među serinske peptidaze. Razlog tome bila je osjetljivost enzima prema inhibitorima serinskih peptidaza kao što su diizopropil-fluorofosfat (DFP), fenilmetilsulfonil-fluorid (PMSF), 3,4-dikloroizokumarin (3,4-DCI) i tozil fenilalanil klorometil keton (TPCK)^{7,98,100,108}. Unatoč pokazanoj osjetljivosti DPP III prema navedenim vrstama spojeva, njihovo inhibitorno djelovanje nije specifično i ispoljiti će se prema nizu drugih (metalo)peptidaza. S ciljem pronalaska specifičnih inhibitora DPP III, Nishikiori i sur. izolirali su iz mikrobne kulture BMG520-yF2 spoj acetil-L-leucil-L-argininal i utvrdili njegovo inhibitorno djelovanje na štakorsku DPP III¹²⁹. Inhibitorni učinak ove supstance bio je neznatno manji u odnosu na strukturno sličan leupeptin (*N*-acetil-L-leucil-L-leucil-L-argininal), poznati inhibitor serinskih i tiolnih peptidaza. Ispitujući filtrate bakterijskih kultura *Streptomyces* sp. TA-3391, Akiyama i sur. izolirali su tetracikličke spojeve fluostatin A i B (slika 2.22) i ustanovili da inhibiraju DPP III iz ljudske placente, pri čemu se fluostatin A pokazao kao snažniji reverzibilni inhibitor enzima, s konstantom inhibicije, K_i od 14 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Ovi spojevi nisu imali inhibitorno djelovanje na druge tipove dipeptidil-peptidaza, pa su autori pretpostavili da su to selektivni inhibitori DPP III¹³⁰.



Slika 2.22. Strukturna formula fluostatina A i B. Oba spoja sadrže fluorenonski kromofor (svijetlo ružičasti elipsoid). Preuzeto iz (131) i prerađeno.

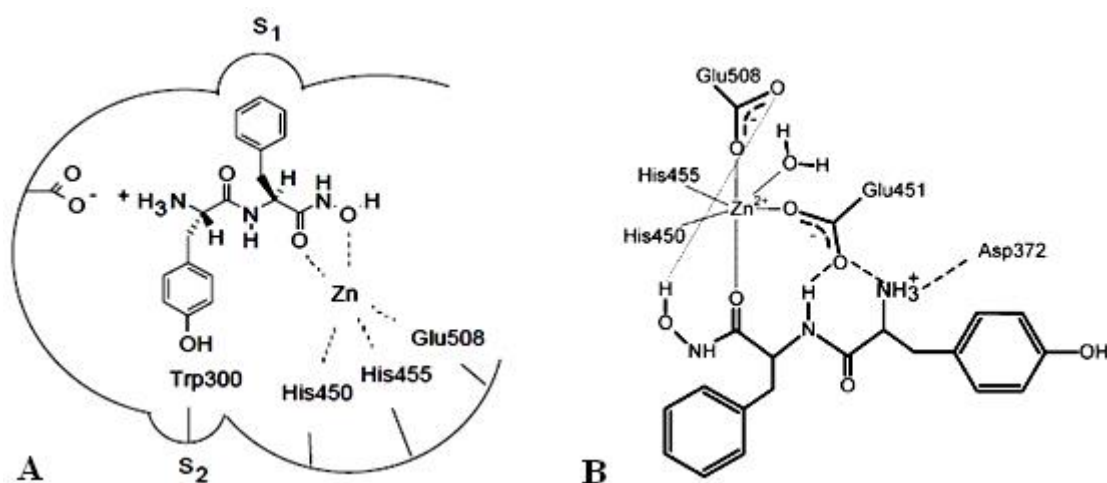
U potrazi za specifičnim endogenim inhibitorima enzima koji odgrađuju enkefaline, Nishimura i sur. izolirali su heptapeptid spinorfin (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr) iz kičmene moždine goveda¹³². Inhibitorno djelovanje spinorfina potvrđeno je i za dipeptidil-aminopeptidazu pročišćenu iz mikrosoma majmuskog mozga ($K_i = 0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), dok je ono izostalo kod enkefalin-degradirajućih enzima (uključujući AP N i DPP III) izoliranih iz perifernih tkiva¹³³. Kao specifičniji inhibitor DPP III pokazao se skraćeni oblik spinorfina, sintetski pentapeptid tinorfin (Val-Val-Tyr-Pro-Trp) koji je inhibirao DPP III pročišćenu iz mozga majmuna uz konstantu inhibicije, K_i od 75 nmol L^{-1} ¹³⁴. Uvidom u kristalnu strukturu kompleksa rekombinantne ljudske DPP III₁₋₇₂₆ s tinorfinom detaljno je objašnjen način vezanja ovog opioidnog peptida u područje aktivnog mjesta enzima (slika 2.23)¹¹⁵.



Slika 2.23. Polarne interakcije tinorfina s ljudskom DPP III₁₋₇₂₆. Bočni ostatak tinorfina u P2 (Val-1) obuhvaćen je enzimom i usidren polarnim interakcijama s bočnim ostacima Glu316, Asn394 i Asn391; Val-2 iz P1 povezan je vodikovim vezama s His568 i Tyr318; ostatak iz P1' (Tyr-3) u interakciji je s Ala388 i Gly389, a P3' (Trp-5) s Arg-669. Preuzeto iz (115).

Uspoređujući strukturu i inhibitorni utjecaj niza sintetskih pentapeptida sličnih hemorfinima, Chiba i sur.⁹ pokazali su da je tetrapeptidna jezgra Val-Tyr-Pro-Trp bitna za inhibitorna svojstva ovih peptida iako sam tetrapeptid ne inhibira DPP III. Dodavanjem alifatskih i aromatskih aminokiselina N-kraju ovog tetrapeptida postiže se snažni inhibitorni utjecaj na rekombinantnu DPP III štakora slijedom (prema vrijednosti konstante inhibicije, K_i): Ile > Trp > Phe > Tyr > Leu > Ala > Val > Ser > Gly¹¹².

Novija istraživanja su pokazala snažnu inhibiciju aktivnosti rekombinantne ljudske DPP III hidroksamatom Tyr-Phe-NHOH ($K_i = 0,15 \mu\text{mol L}^{-1}$)¹⁴. Inhibitorni učinak ovog spoja pokazao se važnim pri utvrđivanju uloge Tyr318 i Asn406 u mehanizmu vezanja liganda i katalizi ljudske DPPIII^{54,135}. Iako se pretpostavljalo kako je za inhibitorni učinak peptidinih hidroksamata odgovoran kelirajući utjecaj njihove hidroksamske skupine, Špoljarić i sur.¹⁴ su pokazali važnost interakcija peptidnog dijela inhibitora s podmjestima S_1 i S_2 na enzimu (slika 2.24A). Do sličnog zaključka dolaze Tomić i sur.¹¹⁶ računalnim molekulsko dinamičkim simulacijama ljudske DPP III u kompleksu s Tyr-Phe-NHOH (slika 2.24B).



Slika 2.24. Shematski prikaz vezanja Tyr-Phe-NHOH u aktivno mjesto ljudske DPP III. Slika A preuzeta je iz literaturnog navoda (14), a slika B iz (116).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

U eksperimentalnom dijelu ovog doktorskog rada korišteni su:

3.1.1. Eritrociti

Humani eritrociti korišteni za izolaciju enzima dipeptidil-peptidaze III (DPP III) i aminopeptidaze osjetljive na puromicin (PSA) bili su nabavljeni od Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu, Zagreb. Eritrociti su dobiveni iz krvi koja je pripadala davatelju krvne grupe 0, Rh pozitivan.

3.1.2. Kemikalije i oprema

Standardne kemikalije: 7-amino-4-metil kumarin (AMC), natrijev dodecil-sulfat (SDS), trikloroctena kiselina (TCA), Tris-baza, Tween 80 (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, SAD); glicin i merkaptometanol (2-ME) (*GE Healthcare, Amersham Biosciences AB*, Uppsala, Švedska); puromicin, glicerol, β -naftilamin (2-NA) (*Serva*, Heidelberg, Njemačka); 1,4 ditioeritrol (DTE) (*Boehringer*, Mannheim, Njemačka); kalijev dikromat ($K_2Cr_2O_7$) i srebrov nitrat ($AgNO_3$) (*Bio-Rad*, Richmond, SAD); cinkov acetat ($Zn(CH_3COO)_2$), cinkov klorid, ($ZnCl_2$), dimetilsulfoksid (DMSO), etanol, fosfatna i klorovodična kiselina, kobaltov klorid ($CoCl_2$), natrijev hidroksid, natrijev karbonat, octena kiselina i druge kemikalije bile su čistoće p.a. (*Kemika*, Zagreb, Hrvatska).

Supstrati: arginil-arginil-2-naftilamid (Arg-Arg-2NA), arginil-2-naftilamid (Arg-2NA), alanil-2-naftilamid (Ala-2NA), arginil-arginil-7-amido-4-metil kumarin (Arg-Arg-AMC), Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln (valorfin), Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂ (endomorfina-1) (*Bachem*, Bubendorf, Švicarska); arginil-*p*-nitroanilid (Arg-*p*Nan) (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, SAD).

Inhibitori: derivate benzimidazola (spojevi **1-8** i **1'-16'**) sintetizirale su dr. sc. Marijana Hranjec i dr. sc. Kristina Starčević na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu; etilendiaminotetraoctena kiselina (EDTA) (*Kemika*, Zagreb, Hrvatska).

Boje: Fast Blue Salt BN (FBB) (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, SAD); Coomassie Brilliant Blue G-250 (*BDH Chemicals Ltd*, Engleska).

Kolone i sorbensi za kromatografiju: za gel-filtraciju korišten je Sephacryl S-200 Superfine i Sephadex G-25 (PD-10) proizvođača Pharmacia (Uppsala, Švedska), za ionsko-izmjenjivačku kromatografiju DEAE-celuloza (*Serva*, Heidelberg, Njemačka), za brzu tekućinsku kromatografiju proteina (FPLC) - anionski izmjenjivač Mono Q HR 5/5 (*Pharmacia*, Uppsala, Švedska). Hidroksilapatit je bio proizvod od *Clarkson Chem. Comp.*, Williamsport, SAD.

Oprema za elektroforezu: sustav za horizontalnu elektroforezu PhastSystem i kupovne pločice za elektroforezu u gradijentu poliakrilamidnog gela (PhastGel) (*Pharmacia*, Uppsala, Švedska); sustav za vertikalnu elektroforezu Mighty Small II Mini (*Hoefer*, San Francisco, SAD) i niskomolekularni standardi proteina za određivanje molekulske mase (GE Healthcare, Amersham Biosciences AB).

Oprema za ugušćivanje i filtriranje: komorice i membrana Diaflo PM-10 (*Amicon Ltd.*, Oosterhout, Nizozemska); membrana Microcon YM-10 (MWCO 10 kDa) (*Millipore*, Bedford, MA, SAD); komorice za mikrodijalizu D-Tube Dialyzer Mini (MWCO 6-8 kDa) (*Merck Bioscience*, Darmstadt, Njemačka).

Ostala oprema: skupljač frakcija (*LKB*, Bromma, Švedska); peristaltička pumpa P-1 (*Pharmacia*, Uppsala, Švedska); preparativna centrifuga RC-5B (*Sorvall*, Norwalk, SAD); stolna centrifuga Z231 M (*Hermle*, Wehingen, Njemačka); vodena kupelj (*Köttermann*, Hänigsen, Njemačka); spektrofotometar SP8-100 UV/VIS (*PyeUnicam*, Cambridge, Velika Britanija); spektrofluorimetar LS 50 (*Perkin Elmer*, Beaconsfield, Velika Britanija).

Za potrebe računalnih metoda (priprema sustava za simulaciju molekulskom dinamikom te analizu podataka) korišten je Linux operativni sustav i računalo Satellite L750-1N3 - Intel Core i7 267QM pri 1,33MHz, 4GB RAM (*Toshiba*, Tokyo, Japan), dok su simulacije molekulskom dinamikom provedene na računalnom klasteru Isabella Sveučilišnog računskog centra (Srce) Sveučilišta u Zagrebu.

3.2. Eksperimentalne biokemijske metode

3.2.1. Određivanje aktivnosti ljudske DPP III (standardni test)

Za određivanje aktivnost ljudske DPP III korišten je sintetski supstrat Arg-Arg-2-naftilamid (Arg-Arg-2NA), a za vizualizaciju produkta primijenjena je kolorimetrijska metoda prema Nagatsuu i sur.¹³⁶. Produkt enzimske hidrolize 2-naftilamin stvara diazokopulacijom sa stabiliziranom tetrazonijevom soli *o*-dianisidina, Fast Blue BN (FBB), obojeni spoj kojemu se mjeri apsorbancija pri $\lambda = 530$ nm uz dužinu puta svjetlosti od 1 cm.

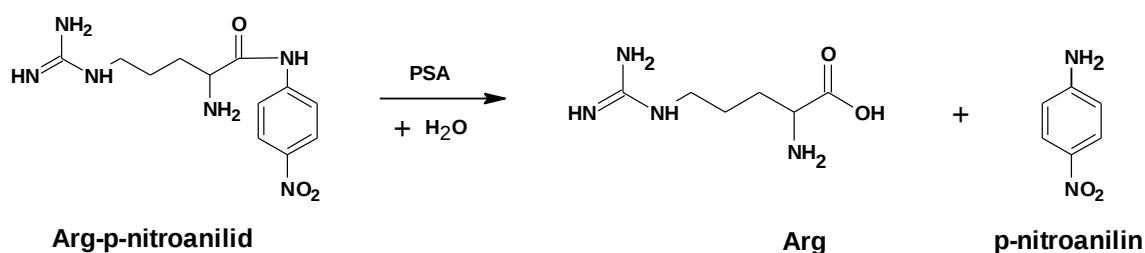
Reakcijska smjesa s 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl pufera pH 8,6, 0,1 mmol L⁻¹ CoCl₂ i određenom količinom enzimskog uzorka predinkubirana je 3 minute na 37 °C u vodenoj kupelji. Reakcija je započeta dodatkom Arg-Arg-2NA (koncentracija supstrata u reakcijskoj smjesi iznosila je 40 μ mol L⁻¹, a volumen reakcijske smjese bio je 1 mL), nakon čega je smjesa inkubirana 15 minuta uz tresenje u vodenoj kupelji pri istoj temperaturi. Reakcija je prekidana dodatkom 200 μ L svježe pripremljene otopine FBB soli (1,5 mg u 1 mL) u 2,1 mol L⁻¹ Na-acetatnom puferu pH 4,2 s Tweenom 80 ($\varphi = 0,10$). Nakon razvijanja od 10 minuta na 23 °C, intenzitet nastale ružičasto-crvene boje mjeren je spektrofotometrom, prema slijepoj probi koja je bila istoga sastava kao reakcijska smjesa ali bez dodatka enzima, a rađena je u svrhu utvrđivanja spontanog raspada supstrata. Također je načinjena i kontrola u kojoj je uzorak enzima dodan reakcijskoj smjesi nakon dodatka FBB boje, radi utvrđivanja nespecifične diazokopulacije (reakcijska smjesa u 0-toj minuti). Baždarni pravac izrađen je s otopinama 2-naftilamina poznatih koncentracija. Jedinica enzimske aktivnosti (j) definirana je kao ona količina enzima koja u jednoj minuti razgradi 1 μ mol supstrata kod standardnih uvjeta.

3.2.2. Određivanje aktivnosti aminopeptidaza

Za određivanje aktivnosti kloridom aktivirane alanil-aminopeptidaze (Ala-AP), reakcijska smjesa sadržavala je 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl pufer, pH 7,4, 0,1 mol L⁻¹ NaCl i određenu količinu enzimskog uzorka. Nakon predinkubacije od 3 minute na 37 °C, reakcija je započeta dodatkom Ala-2NA odnosno Arg-2NA (koncentracija supstrata u reakcijskoj smjesi

iznosila je $88,4 \mu\text{mol L}^{-1}$) te je smjesa inkubirana 15 minuta uz tresenje u vodenoj kupelji pri istoj temperaturi. Za prekid reakcije i vizualizaciju produkta korištena je opisana kolorimetrijska metoda.

Aktivnost aminopeptidaze osjetljive na puromicin (PSA) određena je istom metodom uz Arg-2NA kao supstrat, kod istih uvjeta, uz samo jednu modifikaciju: reakcijska smjesa nije sadržavala NaCl. Za određivanje aktivnosti PSA u frakcijama iza gel-filtracije na Sephacrylu S-200 Superfine korišten je sintetski supstrat Arg-*p*-nitroanilid (Arg-*p*Nan) koji enzimskom hidrolizom daje produkt *p*-nitroanilin kojemu se mjeri apsorbancija pri $\lambda = 405 \text{ nm}$ (slika 3.1).



Slika 3.1. Hidroliza Arg-*p*-nitroanilida.

Reakcijska smjesa tada je sadržavala 60 mmol L^{-1} Na-fosfatni (Na-PO_4) pufer pH 7,0, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ CoCl_2 , 2 mmol L^{-1} DTE i određenu količinu enzimskog uzorka. Nakon predinkubacije od 3 minute na 37°C , reakcija je započeta dodatkom Arg-*p*Nan do koncentracije 3 mmol L^{-1} . Reakcijska smjesa potom je inkubirana 35 minuta u vodenoj kupelji pri istoj temperaturi, a intenzitet nastale žute boje mjeren je spektrofotometrom, prema slijepoj probi, pri valnoj duljini od 405 nm .

Za praćenje aktivnosti aminopeptidaza u frakcijama nakon kromatografije i gel-filtracije te u odsječcima gela nakon elektroforeze korišteni su naftilamidni supstrati i opisana kolorimetrijska metoda prema Nagatsu-u i sur, izvedena polukvantitativno u volumenu od $100 \mu\text{L}$ u porculanskim jažicama. Reakcijska smjesa je nakon dodavanja u jažice inkubirana od 15 do 30 minuta (za određivanje DPP III) odnosno od 30 do 120 minuta (za određivanje kloridom aktivirane Ala-AP, kloridom aktivirane Arg-AP i PSA) u termostatu na 37°C , a intenzitet boje nastale nakon prekida reakcije procijenjen je vizualno i označen gradacijom od 1 do 4.

Reakcijska smjesa volumena 1 mL s 20 mmol L⁻¹ Na-PO₄ puferom pH 7,4 i različitim koncentracijama supstrata bila je predinkubirana 2 minute na 37 °C nakon čega je dodan enzim, a reakcijska smjesa inkubirana 10 minuta pri istoj temperaturi. Reakcija je prekidana zakiseljavanjem s 0,2 mL 2,0 mol L⁻¹ Na-acetatnog pufera pH 4,2. Nakon stajanja od 10 minuta na sobnoj temperaturi, intenzitet fluorescencije nastalog produkta izmjeren je pri $\lambda_{\text{pobuđenja}} = 332 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{emisije}} = 420 \text{ nm}$. Koncentracija supstrata u reakcijskoj smjesi iznosila je od 4 do 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$, a koncentracija enzima (pročišćena DPP III) bila je 0,058 nmol L⁻¹. Baždarni pravac izrađen je na osnovi mjerenja fluorescencije u istim uvjetima s poznatim odvagama 2-naftilamina.

3.2.4. Metode pročišćavanja proteina

Za pročišćavanje DPP III i PSA iz humanih eritrocita korištena je kromatografija na DEAE-celulozi, hidroksilapatitu, gel-filtracija na Sephacrylu S-200 i Sephadexu G-25 te brza tekućinska kromatografija proteina na anionskom izmjenjivaču Mono Q. Cjelokupno pročišćavanje enzima izvedeno je pri 4 °C, osim brze tekućinske kromatografije proteina koja je izvedena pri sobnoj temperaturi.

3.2.4.1. Kromatografija na ionskom izmjenjivaču

Osnovni princip ionske izmjene je razdvajanje molekula na temelju njihova naboja. Razdvajanje proteina ovom metodom zasniva se na reverzibilnom izmjenjivanju iona uzorka s protuionima ionskog izmjenjivača. Do razdvajanja dolazi zbog razlike u jačini ionske veze, odnosno stupnja elektrostatskog međudjelovanja naboja na površini molekule proteina i nabijenih grupa ionskog izmjenjivača. Ove interakcije mogu se kontrolirati mijenjanjem ionske jakosti i pH elucijskog pufera.

Za početak pročišćavanja DPP III i PSA korišten je anionski izmjenjivač DEAE-celuloza. Kromatografija je izvedena na stupcu 5 × 14 cm (275 mL) uz protok od 60 mL h⁻¹ koji je bio reguliran peristaltičkom pumpom. Stupac je uravnotežen s 3 volumena 10 mmol L⁻¹ Na-PO₄ pufera pH 6,8. Nakon nanošenja uzorka, elucija proteina prvo je provedena propuštanjem 2 volumena istog pufera, a nastavljena propuštanjem jednog volumena početnog pufera koji je sadržavao 20 mmol L⁻¹ NaCl, te 3 volumena 120 mmol L⁻¹ NaCl u istom puferu. Daljnje ispiranje proteina provedeno je uz kontinuirani gradijent

od 120 do 600 mmol L⁻¹ NaCl u 10 mmol L⁻¹ Na-PO₄ puferu pH 6,8. Volumen gradijenta iznosio je 1900 mL, a volumen frakcija 9,5 mL.

Rekromatografija je izvedena na stupcu (0,9 × 28,5 cm) DEAE-celuloze uz protok od 18 mL h⁻¹. Stupac je uravnotežen s 4 volumena 10 mmol L⁻¹ Na-PO₄ pufera pH 6,8. Ispiranje vezanih proteina provedeno je startnim puferom uz kontinuirani gradijent koncentracije NaCl od 120 do 600 mmol L⁻¹. Nosač je nakon elucije uzorka ispran s 1 mol L⁻¹ NaCl u istom puferu i regeneriran prema uputama proizvođača.

Za završni korak pročišćavanja humane DPP III i PSA korištena je **brza tekućinska kromatografija proteina**. (eng. *Fast Protein Liquid Chromatography*; FPLC) na koloni jakog anionskog izmjenjivača Mono Q, FPLC je automatizirana izvedba kromatografije, ubrzana primjenom povišenog tlaka. Pročišćavanje uzorka provedeno je na stupcu Mono Q HR 5/5 uz gradijent koncentracije NaCl od 1 × 10⁻³ mol L⁻¹ do 1 mol L⁻¹ u 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl puferu pH 7,2. Protok pufera tijekom kromatografije iznosio je 0,5 mL min⁻¹, a eluat je sakupljan u frakcije volumena od 0,5 mL. Upotrebljeni radni tlak iznosio je ~ 5 MPa.

Uzorak PSA pročišćavan je na istom stupcu Mono Q uz kontinuirani gradijent koncentracije od 1 mmol L⁻¹ do 1 mol L⁻¹ u 50 mmol L⁻¹ u Tris-HCl puferu pH 7,2 s 1 mmol L⁻¹ DTE. Protok pufera tijekom kromatografije i volumen frakcija bili su kao i kod pročišćavanja DPP III. Upotrebljeni radni tlak iznosio je ~ 5 MPa. Sve otopine pufera korištene tijekom kromatografije prethodno su profiltrirane i odzračene.

3.2.4.2. Gel-filtracija

Gel-filtracija je vrsta tekućinske kromatografije kojom se molekule razdvajaju na osnovi razlike u njihovoj veličini i obliku. Uzorak se nanosi na kolonu ispunjenu poroznim zrnima inertne tvari - gela, koja sadrže pore određenih veličina i predstavljaju stacionarnu fazu, a uronjena su u mobilnu fazu. Punilo kolone djeluje kao molekulsko sito. Molekule koje su veće od pora gela ne ulaze u pore već prolaze kroz prostor između čestica gela i kroz kolonu prolaze najbrže, nošene puferom za eluciju. Manje molekule ulaze djelomično ili potpuno u pore gela, sporije prolaze kroz kolonu i eluiraju se redom prema opadajućoj veličini.

Kao punilo za gel-filtraciju korišten je Sephacryl S-200 Superfine prikladan za razdjeljivanje globularnih proteina mase od 5 do 250 kDa. Stupac gela veličine 1,5 × 90 cm uravnotežen je u 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl puferu pH 7,2 s 200 mmol L⁻¹ NaCl i 2 mmol L⁻¹ DTE. Volumeni uzoraka nanosenih na stupac iznosili su od 1,6 do 1,8 % volumena stupca gela. Protok je tijekom postupka kromatografije iznosio 19 mL h⁻¹ i bio je reguliran pumpom.

Za potrebe rekromatografije na DEAE-celulozi i brze tekućinske kromatografije proteina na koloni anionskog izmjenjivača Mono Q, proteinski uzorci su bili prethodno odsoljeni gel-filtracijom na stupcu ($2,5 \times 16,5$ cm) Sephadexa G-25 ili na komercijalno dostupnoj koloni PD-10 ($1,45 \times 5$ cm) sa istim punilom.

3.2.4.3. Kromatografija na hidroksilapatitu

Kromatografija na hidroksilapatitu zasniva se na reverzibilnoj i nespecifičnoj adsorpciji proteina na površinu kristala hidroksilapatita. Hidroksilapatit je modificirani oblik kalcijevog fosfata kemijske formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Budući je hidroksilapatit vrlo krhak materijal, potrebno je izbjegavati dugo i snažno miješanje naročito u puferima visoke ionske jakosti, jer dolazi do lomljenja kristala u manje fragmente koji stvaraju otpor protoku tekućine. Mehanizam adsorpcije proteina na hidroksilapatitu uključuje Ca^{2+} i PO_4^{2-} skupine na površini kristala. Adsorpcija amino-skupina proteinskih ostataka posljedica je nespecifičnog elektrostatskog djelovanja između pozitivnog naboja amino-skupine i negativnog naboja hidroksilapatita. Adsorpcija karboksilnih skupina proteinskih ostataka isključivo je posljedica kompleksiranja s ionima kalcija. Bazični proteini eluiraju se ili specifičnim istiskivanjem s ionima Ca^{2+} ili Mg^{2+} koji stvaraju komplekse s fosfatima sorbensa, neutralizirajući njihov negativan naboj ili upotrebom aniona (F^- , Cl^- , ClO_4^- i PO_4^{2-}). Elucija kiselih proteina postiže se istiskivanjem njihovih karboksilnih skupina ionima koji s kalcijem tvore jače komplekse (F^- ili PO_4^{2-}).

Za potrebe kromatografije, hidroksilapatit je u obliku suspenzije čuvan u 1 mmol L^{-1} Na- PO_4 puferu pH 6,8 i njime je punjena kolona do konačnog stupca hidroksilapatita od $1,5 \times 6,5$ cm. Prije nanošenja uzorka, stupac nosača je ekvilibriran propuštanjem tri volumena početnog pufera (10 mmol L^{-1} Na- PO_4 pufer pH 6,8). Koncentracijski gradijent ($10 - 200 \text{ mmol L}^{-1}$ Na- PO_4 pufer pH 6,8) korišten je za eluciju proteina. Protok je za vrijeme kromatografije reguliran peristaltičkom pumpom i iznosio je 10 mL h^{-1} . Po završenoj kromatografiji, stupac je ispran s još dva volumena startnog pufera i zatim regeneriran ispiranjem s 1 mol L^{-1} Na- PO_4 puferom pH 6,8 za ponovnu upotrebu.

3.2.5. Elektroforetske metode

Za određivanje čistoće i relativne molekulske mase pročišćenog enzima korištena je elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (PAGE). Elektroforetsko razdvajanje molekula u poliakrilamidnom gelu temelji se na različitoj brzini kretanja molekula kroz gel pod djelovanjem električnog polja, u ovisnosti o njihovom neto naboju i veličini.

3.2.5.1. Elektroforeza u nativnim uvjetima

PAGE nativnih uzoraka provedena je sustavom za horizontalnu elektroforezu PhastSystem prema uputama proizvođača (*Pharmacia*, Separation Technique File No. 120). Koristile su se kupovne pločice dimenzija 50 × 43 mm, debljine 0,45 mm, s gradijentom gustoće poliakrilamidnog gela 4 - 15 % i 10 - 15 %. Dužina gela za sabijanje iznosila je 13 mm, a dužina gela za razdvajanje bila je 32 mm. Uzorci su na površinu gela nanošeni automatskim spuštanjem aplikatora. Elektroforeza u nativnim uvjetima izvođena je uz jakost struje od 6,6 mA i napon od 380 V, pri 15 °C u trajanju od 40 minuta. Usporedo s uzorcima enzima nanošeni su i standardi - proteini poznate molekularne mase: albumin iz goveđeg seruma (M_r 67 000), dehidrogenaza mliječne kiseline (M_r 140 000), katalaza (M_r 232 000), feritin (M_r 440 000) i tiroglobulin (M_r 669 000). Nakon provedene PAGE, proteini uzorka i standarda u gelu bojani su s PhastGel Blue R prema *PhastSystem Development Technique* File No. 200, odnosno ako je u uzorku bila manja količina proteina, bojanje je provedeno sa srebrom, zbog veće osjetljivosti, po metodi koju su razradili Hempelmann i Kaminsky¹³⁹. Kako bi se utvrdio položaj egzopeptidaza nakon elektroforeze, neobojeni gel je rezan u trake debljine oko 3 mm u kojima je zatim polukvantitativno određena aktivnost uz naftilamidne supstrate kako je to ranije opisano.

3.2.5.2. Elektroforeza u denaturirajućim uvjetima

Elektroforeza u denaturirajućim uvjetima provedena je sustavom za vertikalnu elektroforezu - Hoefer Mighty Small II Mini metodom po Laemmliju¹⁴⁰ te već spomenutim sustavom za horizontalnu elektroforezu PhastSystem prema uputama proizvođača (*PhastSystem Separation Technique* File No. 110). SDS-PAGE po Laemmliju provedena je s

priređenim gelovima dimenzija 100×80 mm, debljine 0,75 mm. Dužina gela za sabijanje iznosila je oko 20 mm, a dužina gela za razdvajanje oko 50 mm. Uzorci i standardi za određivanje relativne molekulske mase su prije nanošenja na gel obrađeni kuhanjem 5 minuta pri $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ u otopini sastava: SDS ($\gamma = 0,10$), 2-ME ($\varphi = 0,05$), glicerol ($\varphi = 0,1$) bromfenol modrilo ($\gamma = 0,01$), $0,50\text{ mol L}^{-1}$ Tris-HCl pufer pH 6,8. Obrađeni uzorci nanijeti su u utore gela, a elektroforeza izvođena uz pufer sastava: $0,025\text{ mol L}^{-1}$ Tris-HCl, $0,192\text{ mol L}^{-1}$ glicin, SDS ($\gamma = 0,001$), pH 8,3 uz konstantnu jakost struje od 15 mA i napon od 77 do 175 V, u trajanju od 75 minuta na sobnoj temperaturi. Korišteni proteinski standardi su bili: α -laktoalbumin (M_r 14 400), inhibitor tripsina iz soje (M_r 20 100) anhidraza karbonatne kiseline (M_r 30 000), albumin jajeta (M_r 43 000), albumin iz goveđeg seruma (M_r 67 000) i fosforilaza B (M_r 94 000). Na aparaturi PhastSystem, SDS-PAGE je provedena na pločicama s 8 - 25 % poliakrilamidnog gela, dimenzija 50×43 mm i debljine 0,45 mm. Uzorci su prethodno obrađeni kuhanjem 5 minuta pri $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ u otopini sastava: SDS ($\gamma = 0,125$), 2-ME ($\varphi = 0,05$), bromfenol modrilo ($\gamma = 0,01$), 1 mmol L^{-1} EDTA, 10 mmol L^{-1} Tris-HCl pufer pH 8,0. Elektroforeza u denaturirajućim uvjetima izvođena je uz jakost struje od 10 mA i napon od 250 V, u trajanju od 20 minuta pri temperaturi $15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Korišteni su isti standardi proteina niskih molekulskih masa kao i prilikom izvedbe SDS-PAGE u vertikalnom sustavu. Nakon izvršene elektroforeze, proteinske trake u gelu bojane su srebrom¹³⁹. Prema položaju obojenih proteinskih standarda u gelu izrađen je standardni pravac na osnovi kojega je određena molekulska masa enzima.

3.2.6. Ugušćivanje otopina

Ugušćivanje proteinskih otopina većeg volumena provedeno je ultrafiltracijom kroz Diaflo PM-10 i PM-30 membrane u komoricama, uz predtlak dušika pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za ugušćivanje otopina manjeg volumena korišten je sustav za koncentriranje s Diaflo membranama Microcon YM-10 uz primjenu centrifugalne sile do $14000 \times g$ pri istoj temperaturi.

3.2.7. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina tijekom izolacije enzima kao i u konačnim enzimskim preparatima određivana je korištenjem kolorimetrijske metode po Bradfordu¹⁴¹ koja se zasniva na mjerenju apsorbancije nastalog kompleksa proteina i boje Coomassie Brilliant

Blue G-250 pri $\lambda = 595$ nm. Reakcijska smjesa priređena je miješanjem određenog volumenu uzorka s deioniziranom vodom do 0,1 mL, nakon čega je dodan 1,0 mL Bradford reagens sastava: Coomassie Brilliant Blue G-250 ($\gamma = 1 \times 10^{-4}$), etanol ($\varphi = 0,047$) i fosfatna kiselina ($\varphi = 0,085$). Smjesa je potom intenzivno miješana na vibracijskoj mješalici, te ostavljena stajati 45 minuta pri sobnoj temperaturi. Intenzitet razvijene boje mjereno je spektrofotometrom prema slijepoj probi koja je umjesto uzorka sadržavala deioniziranu vodu. Baždarni pravac za određivanja koncentracije proteina izrađen je s poznatim količinama albumina iz govedeg seruma.

3.2.8. Utjecaj pH i iona kobalta, Co^{2+} na hidrolizu Arg-Arg-AMC

ljudskom DPP III

Za ispitivanje utjecaja pH na hidrolizu Arg-Arg-AMC ljudskom DPP III korišten je 50 mmol L^{-1} Tris-HCl pufer vrijednosti pH od 7,35, 7,95, 8,5, 9,0 i 9,35. Enzim (0,058 nmol L^{-1}) je predinkubiran u puferu određene pH vrijednosti 3 minute na 23 °C, a reakcija je započeta dodatkom supstrata Arg-Arg-AMC (40 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Nastanak produkta AMC kontinuirano je praćen mjerenjem intenziteta fluorescencije pri $\lambda_{\text{pobuđenja}} = 370$ nm i $\lambda_{\text{emisije}} = 460$ nm u vremenu od 3 minute na istoj temperaturi.

U svrhu ispitivanja utjecaja dvovalentnog kationa kobalta, u reakcijsku smjesu dodavan je CoCl_2 u koncentraciji od 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do 1 mmol L^{-1} . Enzim (0,058 nmol L^{-1}) je predinkubiran u 50 mmol L^{-1} Tris-HCl puferu pH 7,4 ili 8,5 uz poznatu koncentraciju CoCl_2 3 minute na 23 °C, a reakcija je započeta dodatkom Arg-Arg-AMC čija je koncentracija u reakcijskoj smjesi iznosila 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Nastanak produkta praćen je u istim uvjetima kako je to opisano pri ispitivanju utjecaja pH.

3.2.9. Utjecaj derivata benzimidazola na aktivnost DPP III i PSA

3.2.9.1. Određivanje IC_{50}

Određivanje utjecaja na pročišćeni preparat enzima (DPP III ili PSA) provedeno je predinkubacijom u 50 mmol L^{-1} Tris-HCl puferu pH 7,4 uz prisustvo pojedinog benzimidazolnog spoja u koncentraciji od 1 do 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Vrijeme predinkubacije iznosilo je 15 minuta (10 minuta na 25 °C i 5 minuta na 37 °C). Enzimski reakcija započeta je zatim

dodatkom supstrata ($40 \mu\text{mol L}^{-1}$ Arg-Arg-2NA odnosno $88,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ Arg-2NA) i određena standardnim testom na 37°C . Ukupan volumen reakcijske smjese bio je 1 mL. Koncentracija DPP III u inkubacijskoj smjesi iznosila je $0,3 \text{ nmol L}^{-1}$ dok je za PSA iznosila $0,1 \text{ nmol L}^{-1}$. Osnovne otopine derivata benzimidazolnih spojeva bile su priređene njihovim otapanjem u dimetilsulfoksidu (DMSO) u koncentraciji od $0,1$ do 2 mmol L^{-1} od kojih su se razrjeđivanjem s 50 mmol L^{-1} Tris-HCl puferom pH 7,4 pripremale otopine nižih koncentracija. IC_{50} je opisan kao koncentracija inhibitora koja uzrokuje 50 % smanjenja enzimске aktivnosti u zadanim eksperimentalnim uvjetima. Vrijednosti IC_{50} određene su iz grafičkog prikaza odnosa % preostale aktivnosti enzima i koncentracija pojedinog benzimidazolnog spoja.

3.2.9.2. Ispitivanje reverzibilnosti inhibicije benzimidazolnim spojem 1'

Enzim ($12 - 14 \text{ nmol L}^{-1}$ DPP III ili $2,5 \text{ nmol L}^{-1}$ PSA) je predinkubiran u 50 mmol L^{-1} Tris-HCl puferu pH 7,4 tijekom 5 minuta na 37°C u prisustvu benzimidazolnog spoja (5 do $20 \mu\text{mol L}^{-1}$) u smjesi volumena $100 \mu\text{L}$, nakon čega su uzimani alikvoti (5 i $10 \mu\text{L}$) predinkubacijske smjese radi određivanja preostale aktivnosti. Enzimska reakcija započeta je dodatkom supstrata, a nastanak produkta praćen je u istim uvjetima, kako je to već opisano (standardni test u 1 mL inkubacijske smjese). Za ispitivanje reverzibilnosti inhibicije koristila se i metoda dijaliziranja te ultrafiltracije. U tu svrhu enzim je predinkubiran u 50 mmol L^{-1} Tris-HCl puferu pH 7,4 s odabranim benzimidazolnim spojem u vremenu do 60 minuta odnosno dok testom nije utvrđen gotovo potpuni inhibitorni učinak na aktivnost enzima. Alikvot pripremljenog uzorka inhibiranog enzima ($200 \mu\text{L}$) dodan je u komoricu za mikrodijalizu te je dijaliziran prema 10 mmol L^{-1} Tris-HCl puferu pH 7,4 uz dodatak $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ Zn-aceteta. Volumen pufera za dijalizu iznosio je 300 mL, a dijaliziranje je trajalo 18 odnosno 94 sata pri temperaturi od 4°C uz blago miješanje otopine na magnetskoj mješalici. Od početka dijalize, svježe pripremljena otopina pufera za dijalizu istog volumena izmjenjena je još tri puta (u 1., 3. i 15. satu).

Za potrebe ultrafiltracije, $100 \mu\text{L}$ alikvota pripremljene predinkubacijske smjese (enzim inhibiran benzimidazolnom spojem) pet puta je razrijeđen puferom i centrifugiran (45 minuta, $14\,000 \times g$, 4°C) u pet ciklusa u komorici za ultrafiltraciju. Nakon svakog ciklusa u komoricu je dodana nova količina pufera do ukupnog volumena od $500 \mu\text{L}$.

3.2.9.3. Određivanje kinetičkih konstanti za inaktivaciju DPP III benzimidazolnim spojem 1'

Red reakcije za inaktivaciju DPP III spojem 1' određen je prema grafičkom prikazu odnosa logaritma % preostale aktivnosti o vremenu predinkubacije. Vrijednost konstante brzine za reakciju inaktivacije dobivena je iz nagiba pravca u linearnom grafičkom prikazu ovisnosti $\log[(a_0-x)/(b_0-x)]$ o vremenu prema jednadžbi :

$$\log[(a_0-x)/(b_0-x)] = (k/2,303) \cdot (a_0 - b_0) t + \log(a_0 / b_0) \quad (1)$$

gdje je a_0 početna koncentracija inhibitora, b_0 početna koncentracija enzima, x koncentracija enzima inhibiranog u vremenu t , i k konstanta brzine reakcije drugog reda.

Disocijacijska konstanta, K_i za inicijalno reverzibilni kompleks enzima i inhibitora određena je iz brzine enzimске reakcije u prisustvu i odsustvu inhibitora prema metodi koju je opisao Tornheim¹⁴² koristeći jednadžbu:

$$K_i = [I] / ((V_0 / V - 1) (1 + [S] / K_m)) \quad (2)$$

gdje V_0 i V predstavljaju početnu brzinu reakcije u prisustvu i odsustvu inhibitora, $[S]$ početnu koncentraciju supstrata, a K_m Michaelisovu konstantu.

Za određivanje ove konstante, koncentracija inhibitora u reakcijskoj smjesi iznosila je $2,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ uz koncentraciju supstrata od $120 \mu\text{mol L}^{-1}$.

3.3. Računalne metode

Kako bi se bolje shvatio mehanizam vezanja liganda u područje aktivnog mjesta ljudske odnosno kvaščeve DPP III te njihov utjecaj na strukturu i fleksibilnost enzima, korištene su metode molekulskog modeliranja. Korištenjem metoda prijanjanja (eng. *docking*) utvrdili su se načini nekovalentnog vezanja liganda u područje aktivnog mjesta enzima, dok su za daljnje praćenje njihove interakcije korištene molekulske dinamičke simulacije (MD).

U daljnjem tekstu tumači se teorijska osnova računalnih metoda koje su u ovom radu primijenjene i opisuje postupak pripreme sustava za MD simulaciju, njeno izvođenje te navode načini analize dobivenih podataka.

3.3.1. Molekulsko modeliranje

Molekulsko modeliranje skupni je naziv koji obuhvaća teorijske metode i računalne tehnike koje se danas uveliko koriste u računalnoj kemiji i biologiji za modeliranje molekula i molekulskih sustava. Većina istraživanja molekulskim modeliranjem započinju izborom metoda (razinom teorijskog pristupa) kojim će se na pogodan način opisati sustav od interesa. Pri tome izbor metode treba dobro odražavati prirodu sustava kao i njegove dimenzije.

Dva najčešća računalna pristupa jesu kvantno-mehanički (QM) i molekulsko-mehanički (MM). Metode QM pristupa (*ab initio* i semi-empirijske) temelje se na aproksimativnim rješenjima Schrödingerove jednačbe pri čemu se gibanje elektrona najčešće promatra u polju stacionarnih atomskih jezgri. Za razliku od njih empirijske metode (molekulska mehanika, molekulska dinamika i Monte Carlo metode) ne zadiru u subatomsku strukturu atoma, već atome promatraju kao čvrste kuglice koje se ponašaju prema zakonima klasične fizike. Empirijske metode, zbog bitno manjeg broja stupnjeva slobode računski su brže od QM metoda, te se koriste za opisivanje velikih molekulskih sustava od više tisuća atoma. Zbog svoje složenosti QM metode se uglavnom koriste za sustave do nekoliko stotina atoma. Učinkovitost i pouzdanost empirijskih metoda uveliko ovisi o kvaliteti i vjerodostojnosti parametara kojima se atomi u sustavu opisuju. Ovi parametri razlikuju se od sustava do sustava, izrazito ovise o vrsti atoma, njihovom valentnom stanju i bližem okolišu, a zajedno s jednačbama za potencijalnu energiju molekule čine **polje sila**.

Prva upotreba polja sila javlja se 1960-tih godina s razvojem molekulske mehanike, a primarna svrha bila im je predviđanje molekulskih struktura, vibracijskih spektara i entalpija malih organskih molekula. Danas se za modeliranje organskih molekula koriste specijalizirana polja sila poput MM2, MM3, MM4 i CFF koja su optimizirana za određenu skupinu spojeva (npr. ugljikovodici, alkoholi, eteri, amidi) dok se pri modeliranju složenijih molekula (nukleinske kiseline i proteini) uglavnom koriste specijalizirana polja sila: CHARM, AMBER i GROMOS. Osim specijaliziranih polja sila, postoje i općenita (generalna) polja sila poput UFF, MMFF, COMPASS i PIPF koja posjeduju parametre za veliki broj vrsta atoma¹⁴³.

3.3.2. Izraz za potencijalnu energiju

U molekularnoj mehanici potencijalna energija sustava dana je kao zbroj niza energetskih članova, a jedan od najjednostavnijih i najčešće korištenih izraza je:

$$E_{MM} = E_{stretch} + E_{bend} + E_{tors} + E_{ele} + E_{vdw} \quad (3)$$

Prva tri člana u gornjoj jednadžbi računaju vezne interakcije među kovalentno povezanim atomima, dok posljednja dva člana predstavljaju nevezni doprinos potencijalnoj energiji sustava. Za atome iz iste molekule nevezne interakcije računaju se samo ukoliko su razdvojeni s bar tri kovalentne veze:

$E_{stretch}$ - energetske promjene koje se javljaju u molekuli kao posljedica odstupanja duljine kovalentne veze od ravnotežne vrijednosti:

$$E_{stretch} = \frac{1}{2} k_l (l - l_0)^2 \quad (4)$$

gdje k_l predstavlja konstantu sile, l_0 ravnotežnu (optimalnu) vrijednost duljine kovalentne veze, a l je stvarna duljina veza.

E_{bend} - energetske promjene koje se javljaju u molekuli kao posljedica promjene valentnih kuteva:

$$E_{bend} = \frac{1}{2} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (5)$$

gdje k_θ predstavlja konstantu sile, θ_0 je referentna, ravnotežna vrijednost valentnog kuta, a θ je trenutna vrijednost tog kuta.

E_{tors} - energetske promjene koje se javljaju u molekuli kao posljedica promjene torzijskih (dihedralnih) kuteva:

$$E_{tors} = \sum_{n=0}^N \frac{1}{2} V_n [1 + \cos(n\phi - \gamma)] \quad (6)$$

gdje V_n predstavlja konstantu sile, n je multiplicitet ravnotežnog kuta, odnosno veličina koja daje broj minimalnih točaka u funkciji pri rotaciji oko središnje veze za 360° , ϕ je vrijednost torzijskog kuta, dok je γ pomak u fazi.

E_{ele} - energetske promjene koje se javljaju u molekuli kao posljedica elektrostatskih interakcija. Koristeći jednadžbu za interakciju monopola, elektrostatska energija sustava računa se kao zbroj interakcija između svih parova atoma:

$$E_{ele} = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon r_{ij}} \quad (7)$$

gdje q_i i q_j predstavljaju parcijalne atomske naboje, r_{ij} je udaljenost između atoma, a ϵ je dielektrična konstanta medija koji ih razdvaja (vakuum, otopina).

E_{vdw} - energetske promjene koje se javljaju u molekuli kao posljedica van der Waalsovih interakcija i najčešće se računaju izrazom za Lennard-Jonesov 12-6 potencijal:

$$E_{vdw} = \sum_{ab} \left[\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right] \quad (8)$$

gdje $A_{ij}B_{ij}$ predstavljaju parametre ovisne o vrsti atoma (ij) između kojih se računa interakcija, a r_{ij} je njihova udaljenost.

3.3.3. Metoda prijanjanja („docking“)

U području molekulskog modeliranja metoda prijanjanja se koristi u svrhu predviđanja optimalne orijentacije jedne molekule (ligand) prema drugoj (receptor) pri njihovu vezanju u stabilan kompleks. Metoda koristi različite algoritme (npr. Lamarckov genetički algoritam, genetički algoritam) u svrhu pretraživanja mogućih međusobnih orijentacija receptora i liganda, dok se prikladnost pronađenih konformacija ocjenjuje na temelju njihove energije te geometrijske i elektrostatske komplementarnosti. U slučaju enzim-supstrat kompleksa, sustavu se može pristupiti po modelu „ključa i ključanice“ ili modelu „pobuđene prilagodbe“. Pri tome je važno odrediti: hoće li se promatrani sustav smatrati krutim, ili, manje ili više, fleksibilnim (fleksibilan ligand i kruti enzim ili fleksibilan ligand i bočni ogranci aminokiselinskih ostataka u veznom mjestu enzima). Računalni programi za dokiranje kao što su DOCK¹⁴⁴, AutoDock¹⁴⁵ i GOLD¹⁴⁶ neprestano se razvijaju omogućujući sve veću gibljivost molekula koje prijanjaju, uključivanje efekta otapala te izbor različitih statističkih metoda pri nalaženju optimalne orijentacije.

U radu je za potrebe predviđanja optimalne orijentacije enzima i molekule supstrata/inhibitora pri njihovu nekovalentnom vezanju u kompleks korišten program AutoDock¹⁴⁵. Ovaj program zahtijeva unošenje trodimenzionalnih struktura receptora i

liganda kojima se na temelju izabranog polja sila dodjeljuju parametri (parcijalni atomski naboji i stupanj hidrofobnosti/hidrofilnosti) te se u diskretnim točkama trodimenzionalnih rešetki kojima se molekule receptora (čitavo ili samo pretpostavljeno vezno mjesto) opisuju, računaju vrijednosti potencijalnih energija interakcije receptora sa svakim pojedinim tipom atoma sadržanim u molekuli liganda. Takav pristup bitno ubrzava račun jer se energije interakcije ne moraju nanovo računati za svaki novi položaj liganda, već se koriste ranije izračunate energije interakcija u odgovarajućim točkama. Tijekom postupka položaj liganda nasumično se mijenja. Svaki položaj vrednuje se na temelju izračunatih energija interakcije.

3.3.4. Molekulska dinamika (MD)

Molekulska dinamika (MD) je empirijska metoda kod koje se pored potencijalne energije sustava razmatra i njegova kinetička energija te na taj način omogućuje proučavanje molekula u uvjetima koji su bliski realnim. MD simulacijama mogu se dobiti detaljne informacije o strukturnim i dinamičkim svojstvima proteina i nukleinskih kiselina te o njihovim eventualnim promjenama uslijed točkastih mutacija ili kompleksiranja (nastajanja kompleksa). Polazište kod MD simulacija je trodimenzionalna struktura molekule, odnosno kompleksa. Brookhaven Protein Databank (PDB)¹⁴⁷ je najveća baza trodimenzionalnih struktura bioloških makromolekula i njihovih kompleksa određenih rendgenskom strukturnom analizom ili nuklearnom magnetskom rezonancijom (NMR). Početne brzine pridružuju se atomima u sustavu koji se simulira prema Maxwell-Boltzmannovoj raspodjeli za zadanu temperaturu:

$$\sqrt{\left(\frac{m}{2\pi k_B T}\right)^3} \quad 4\pi v^2 e^{-\frac{mv^2}{2k_B T}} \quad (9)$$

gdje m predstavlja masu čestice, k_B je Boltzmannova konstanta ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), a T temperatura u kelvinima.

Zbog dobivene kinetičke energije atomi napuštaju svoje početne položaje što dovodi do promjene položaja molekule na plohi potencijalne energije. Prema drugom Newtonovom zakonu odnosno jednadžbi gibanja:

$$F_i = m_i \cdot a_i = m \frac{d^2 r_i}{dt^2} \quad (10)$$

u kojemu je F_i sila koja djeluje na atom i , m_i njegova masa, a_i njegovo ubrzanje i $r_i (x_p, y_p, z_p)$ koordinate, odnosno položaj atoma, moguće je u svakom trenutku utvrditi ubrzanje atoma u sustavu.

Brzine i položaji atoma u sustava, nakon nekog vremena t dobivaju se integriranjem Newtonovih jednadžbi gibanja s obzirom na početno stanje sustava. Time se generira putanja (trajektorija) sustava¹⁴⁸. U većini slučajeva sila koja djeluje na atom ovisna je o položaju tog atoma kao i o položaju svih ostalih atoma s kojima je u interakciji, a jednadžbe koje ovakvu prirodu gibanja opisuju vrlo su složene te sustav nema analitičko rješenje. Jednadžbe gibanja stoga se numerički rješavaju koristeći različite algoritme poput *Verlet*¹⁴⁹ algoritma, *velocity Verlet*¹⁵⁰ algoritma, *leap-frog*¹⁵¹ algoritma i *Beeman*¹⁵² algoritma. Brzine i položaji atoma mogu se računati u istom trenutku ili s pomakom u vremenu. Primjerice, *leap-frog* algoritam najprije računa brzinu atoma u vremenu (koraku) $t + 1/2\delta t$, a zatim koristeći ovu brzinu (kao početnu) računa položaj atoma u vremenu $t + \delta t$ te se čitav postupak ponavlja. Kod ovog algoritma brzine se računaju eksplicitno što je preciznije nego da se određuju iz omjera pređenog puta i vremena, kao što je slučaj kod nekih metoda, dok je nedostatak što izračun brzine i položaja ne ide istovremeno.

Kako bi rezultati MD simulacija bili vjerodostojni treba pažljivo odabrati vremenski korak pri numeričkoj integraciji, budući da aproksimacije koju algoritmi koriste za posljedicu ima nakupljanje grešaka u računu. Što je vremenski korak veći, simulacije dužeg trajanja su dosežnije, međutim broj nakupljenih grešaka je veći što može dovesti do gubitka energije sustava, njegove nestabilnosti i raspada. Korištenjem maloga vremenskog koraka nastoji se izbjeći nakupljanje grešaka, no ovaj odabir zahtjeva više računalnog vremena potrebnog za simulaciju što je u praksi bitan ograničavajući čimbenik. Izbor vremenskoga koraka pri MD simulacijama u pravilu je rezultat ravnoteže između točnosti dobivenih rezultata i računalne ekonomičnosti kojom se dana simulacija izvodi. Pri simulacijama fleksibilnih molekula obično se odabire vremenski korak koji je za jedan red veličine manji od periode najbržega gibanja u sustavu. Kod biomolekulskih sustava najviše frekvencije vibracija odnose se na veze istezanja vodikovih atoma čija perioda iznosi oko 10 femtosekundi (slučaj C-H veze) te se kao najmanji korak u MD simulacijama ovih sustava uzima 1 femtosekunda (fs).

Gibanja visokih frekvencija predstavljaju stanovito ograničenje pri primjeni produženoga vremenskog koraka, a problem se rješava zamrzavanjem najbržih gibanja na ravnotežnu vrijednost (bez utjecaja na preostale stupnjeve slobode), čime se omogućava produžavanje vremenskog koraka. Primjena ove aproksimacije omogućava upotrebu vremenskog koraka od 2 fs. Kao najčešća metoda koja primjenjuje ovu aproksimaciju koristi se dvofazni SHAKE¹⁵³ algoritam koji omogućava rješavanje jednadžbe gibanja uz istovremenu primjenu ograničenja na pojedine stupnjeve slobode.

Simulaciji molekulskom dinamikom prethodi priprema sustava koja je u ovome radu uključivala pripremu strukturnog modela proteina, strukture liganda i njihovih kompleksa, parametrizaciju te pripremu ulaznih datoteka neophodnih za optimizaciju i uravnoteženje sustava. Za potrebe pripreme sustava i izvođenje MD simulacija te za analizu dobivenih podataka korišteni su programi računalnog paketa AMBER10: *Antechamber*, *LeaP*, *Sander*, *ptraj* i *mm-pbsa*¹⁵⁴.

3.3.5. Priprema sustava

Strukture slobodnog enzima odnosno njihovih kompleksa s ligandima izgrađene su na temelju difrakcijom X-zraka određenih struktura ljudske DPP III (PDB kod 3fvy) i mutanta C130S kvaščeve DPP III (PDB kod 3csk). Eksperimentalno određene strukture preuzete su iz PDB banke podataka¹⁴⁷. Priprema modela proteina za potrebe simulacije zahtjevala je određene modifikacije na preuzetim “*pdb* datotekama“. Tako su aminokiselinski ostaci (Pro224, Ser225, Leu226 i Asp227) koji nedostaju u eksperimentalno određenoj strukturi ljudske DPP III dodani programom *LeaP*. Kako rendgenskom strukturnom analizom nisu određeni položaji atoma vodika u navedenim strukturama DPP III, početna protonacija proteina (pri pH 7,0) određena je korištenjem WHATIF servera¹⁵⁵. Protonacija aminokiselinskih ostataka histidina prilagođena je njihovom okolišu kako bi mogućnost stvaranja vodikovih veza s okolnim aminokiselinskim ostacima bila što veća, odnosno, kako bi se postigla odgovarajuća koordinacija ostataka koji sudjeluju u koordinaciji dikationa cinka u aktivnom mjestu. U fiziološkim (eksperimentalnim) uvjetima bazične aminokiseline proteina, arginin i lizin pozitivno su nabijene (+1), dok su negativno nabijene (-1) kisele aminokiseline, glutaminska i asparaginska. Molekule vode te ioni magnezija, Mg^{2+} i klora, Cl^- uklonjeni su iz eksperimentalno određenih struktura budući je njihovo prisustvo posljedica uvjeta koji su se koristili pri kristalizaciji.

Za simulacije pripremljeni modeli struktura ljudskog i kvašćeva enzima sadržavali su polipeptidni lanac sa 723 odnosno sa 710 aminokiselinska ostataka te jedan ion cinka, Zn^{2+} u aktivnom mjestu. Kompleksi ljudske DPP III kao ligande sadržavali su: benzimidazolni spoj **1'** i sintetski susprst Arg-Arg-AMC, dok su kompleksi kvašćeve DPP III kao ligande sadržavali benzimidazolni spoj **1'** odnosno molekulu Tyr-Phe-NHOH. Kao početna struktura enzima pri simulaciji kompleksa ljudske DPP III s benzimidazolnim spojem **1'** u radu je korištena struktura DPP III dobivena nakon MD simulacije duge 30 ns. Strukture navedenih liganda sagrađene su korištenjem računalnog programa ChemDraw Ultra 10.0^{156,157}, nakon čega su programom Chem3D Ultra10.0¹⁵⁸ uz upotrebu polja sila MM2 određene njihove stabilne/najstabilnije konformacije. Ovako pripremljene strukture liganda smještene su u blizinu aktivnog mjesta enzima te su programom AutoDock 4¹⁴⁵ utvrđeni načini njihova nekovalentnog vezanja za enzim. Konformacije nastalih kompleksa ocijenjene kao najvjerojatnije korištene su u daljnjem modeliranju. Korištenjem programa *LeaP* sustav je neutraliziran dodatkom iona natrija, Na^+ i smješten u središte krnjeg oktaedra ispunjenog molekulama vode. Kako bi se smanjilo vrijeme potrebno za simulaciju sustavu u kojem najveći dio atoma pripada atomima vode korišten je TIP3P tip molekula vode. Karakteristika TIP3P voda je da su naboji raspodjeljeni u tri točke koje predstavljaju središta atoma O i H, a duljine veza i kutevi se tijekom simulacije ne mijenjaju (kruti su). Pripremljeni sustavi sadržavali su ~ 80 700 atoma od kojih je ~ 69 000 pripadalo atomima molekula vode.

3.3.6. Parametrizacija

Za parametrizaciju sustava korištena su Amber polja sila *ff03*¹⁵⁹ za protein i GAFF¹⁶⁰ za ligande, dok su za ion cinka, Zn^{+2} korišteni parametri iz prijašnjih publikacija^{161,162}. Pridruživanje parametara enzimu i njegovim kompleksima s ligandom izvršeno je programom *LeaP*.

3.3.7. Optimizacija sustava i simulacija uravnoteženja

U svrhu relaksacije, odnosno uklanjanja intra-molekulskih naprezanja, geometrija pripremljenih sustava optimizirana je u četiri ciklusa. Svaki ciklus imao je 300 koraka, a za optimizaciju je u prvih 150 koraka korišten algoritam najstrmijeg spusta (*steepest descent*), dok je u preostalih 150 koraka korišten algoritam konjugiranih gradijenata

(*conjugate gradients*). U prva dva ciklusa ograničeno je gibanje samo atoma proteina i ion cinka primjenom harmoničkog potencijala, konstante sile od 32 kcal/(molÅ²), dok je u preostala dva ciklusa isto ograničenje primijenjeno samo na ion cinka.

Slijedilo je zagrijavanje sustava na 300 K i uravnoteženje gustoće otapala. Tijekom zagrijavanja gibanje svih atoma proteina i liganda te iona cinka, Zn²⁺, ograničeno je primjenom harmoničkog potencijala, konstante sile od 30 odnosno 32 kcal/(molÅ²). Zagrijavanje je provedeno pri konstantnom volumenu sustava, a temperatura je linearno povećavana od 0 do 300 K. Uravnoteženje gustoće otapala postignuto je simulacijama uz konstantan tlak (1 atm) i temperaturu (300 K) (NPT ansambl). Konstanta sile kojom je ograničeno gibanje atoma proteina i liganda iznosila je 10 kcal/(molÅ²), dok je na Zn²⁺ primijenjeno isto ograničenje kao u prvom ciklusu. Vremenski korak u simulacijama uravnoteženja iznosio je 1 fs, ciklus zagrijavanja trajao je 30 ps, a uravnoteženja gustoće 20 ps. Za postupak optimizacije i simulacije uravnoteženja korišten je program *Sander*.

3.3.8. Molekulsko dinamičke simulacije

Uravnoteženi sustavi pripremljenih kompleksa podvrgnuti su molekulsko dinamičkim simulacijama u trajanju od nekoliko desetaka ns uz konstantan tlak (1 atm) i stalnu temperaturu od 300 K (NPT ansambl) i/ili uz kratkotrajno (800 ps) povišenje temperature sustava. Simulacije uz povišenje temperature primijenjene su nakon prvih 20 ns simulacije sustava pri stalnoj temperaturi (300 K) na slijedeći način: prvih 300 ps temperatura je linearno povećavana od 300 do 500 K, u sljedećem intervalu od 200 ps sustav je simuliran na 500 K, a tijekom narednih 300 ps temperatura je linearno smanjivana do 300 K. Posljednjih 20 ns sustav je simuliran pri istim uvjetima pri kojima je izvršena simulacija početnih 20 ns.

Za održavanje konstantne temperature sustava upotrijebljen je algoritam Langevinove dinamike uz frekvenciju sudara od 1 ps⁻¹ dok su elektrostatske interakcije računate korištenjem Ewaldovog algoritma (Particle Mesh Ewald, PME)^{163,164}. Simulacijski korak iznosio je 2 fs osim pri simulacijama promjene temperature kada je ta vrijednost bila 1 fs. Strukture su tijekom prvih 20 ns bilježene u razmacima od 1 ps, a tijekom posljednjih 20 ns svake 2 ps. U ukupnom vremenu od 40,8 ns MD simulacije prikupljeno je preko 30 000 struktura koje su sadržane u priređenim datotekama s nastavkom *.mcrd*. Cjelokupan postupak MD simulacije proveden je paraleliziranom verzijom programa *Sander* (iz paketa programa *AMBER11*) na 8 procesorskih jedinica (CPU).

3.3.9. Analiza podataka

Programom *ptraj* izvršene su sljedeće analize trajektorija prikupljenih tijekom MD simulacija:

- RMSD (eng. *Root mean square distance*, rmsd) analiza, koja predstavlja mjeru prosječne udaljenosti atoma C_α, C, N i O proteinskog skeleta u strukturama dobivenim tijekom MD simulacija u odnosu na njihove položaje u početnoj strukturi:

$$\text{rmsd}(t) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_i(t) - r_i^{\text{ref}})^2} \quad (11)$$

gdje $N = \sum i$, $r_i(t)$ predstavljaju položaje atoma i (C_α, C, N i O) u vremetu t , a r^{ref} su položaji atoma u referentnoj, u našem slučaju početnoj strukturi. Provedenom rmsd analizom dobiveni su podaci o stupnju promjene oblika proteina tijekom simulacije.

- RMSF (eng. *Root mean square fluctuation*, rmsf) analiza koja predstavlja mjeru prosječnog odstupanja položaja atoma C_α, C, N i O proteinskog skeleta tijekom simulacija u odnosu na njihov referentni položaj:

$$\text{rmsf}(i) = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t_j=1}^T (r_i(t_j) - r_i^{\text{ref}})^2} \quad (12)$$

gdje T predstavlja vremensko razdoblje korišteno za izračun srednje vrijednosti fluktuacija položaja atoma i (C_α, C, N i O) u odnosu na referentne, srednje, položaje atoma r^{ref} . Delta rmsf (Δrmsf) izračunata je kao razlika vrijednost rmsf pojedinoga aminokiselinskog ostatka i srednje rmsf cijelog proteina.

- Račun radijusa giracije (eng. *Radius of gyration*, *RG*) koji je pokazatelj globularnosti (kompaktnosti) konformacija prikupljenih tijekom MD simulacije sustava, a izračunat je formulom:

(13)

$$RG = \sqrt{\sum_{i=1}^{i=N} (r_i - R_c)^2 / N}$$

gdje R_c predstavlja koordinate centra masa proteina, r_i koordinate atoma i , dok je N broj teških atoma proteina.

- Analiza međusobnih udaljenosti odabranih atoma receptora, liganda i cinka aktivnog mjesta, te analiza kuta zatvaranja gornje i donje domene receptora.

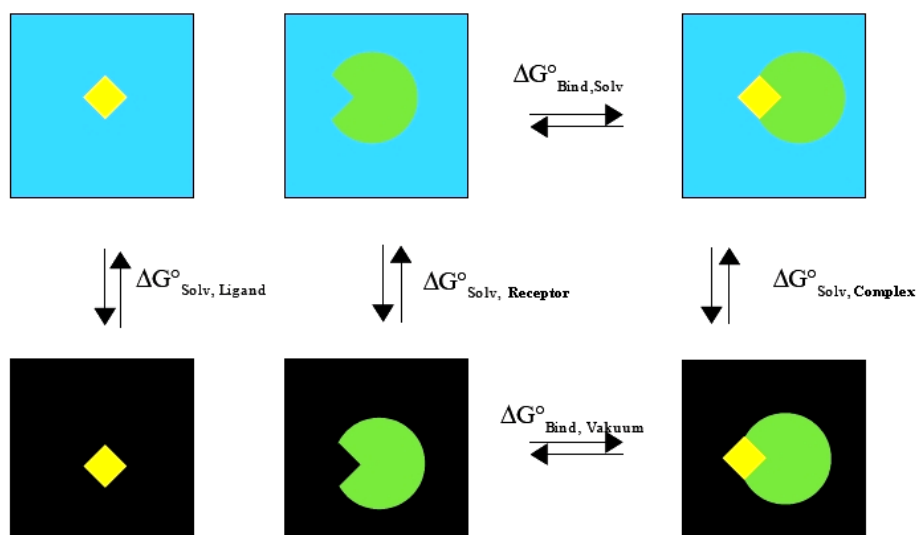
Program *mm pbsa* korišten je za izračun slobodnih energija vezanja liganda za enzim. Karakteristika MM-PBSA (eng. *Molecular mechanic - Poisson-Boltzmann solvent accessible area*)¹⁶⁵ metode je da se eksplicitno otapalo zamjenjuje s kontinuumom dielektrične konstante, $\epsilon_r = 78$ određene ionske jakosti. Dielektrična konstanta na granici proteina i otapala je promjenjiva i elektrostatska energija se računa prema Poisson-Boltzmanovoj jednažbi.

MM-PBSA metoda koristi termodinamički ciklus (slika 3.3) na osnovi kojeg se slobodna energija vezanja $\Delta G^\circ_{\text{Vez,Solv}}$ izračunava formulom:

$$\Delta G^\circ_{\text{Vez,Solv}} = \Delta G^\circ_{\text{Vez,Vakuum}} + \Delta G^\circ_{\text{Solv,Kompleks}} - (\Delta G^\circ_{\text{Solv,Ligand}} + \Delta G^\circ_{\text{Solv,Receptor}}) \quad (14)$$

pri čemu se energija vezanja u vakuumu, $\Delta G^\circ_{\text{Vez,Vakuum}}$ korigira s energijom solvatacije, $\Delta G^\circ_{\text{Solv}}$:

$$\Delta G^\circ_{\text{Vez,Solv}} = \Delta G^\circ_{\text{Vez,Vakuum}} + \Delta G^\circ_{\text{Solv}} \quad (15)$$



Slika 3.3. Termodinamički ciklus prikazuje način na koji se slobodna energija molekula u otopini $\Delta G^{\circ}_{\text{Bind, Solv}}$ može izračunati kao funkcija slobodne energije molekula izračunate u vakuumu $\Delta G^{\circ}_{\text{Bind, Vakuum}}$. Preuzeto iz (166) i prerađeno.

Energija solvatacije izračunata je kao suma polarnih doprinosa, izračunatih korištenjem Poisson-Boltzmanove jednačbe i empirijskog izraza za nepolarne doprinose:

$$\Delta G^{\circ}_{\text{Solv}} = \Delta G^{\circ}_{\text{EL}, \epsilon=80} - \Delta G^{\circ}_{\text{EL}, \epsilon=1} + \Delta G^{\circ}_{\text{NP}} \quad (16)$$

gdje $\Delta G^{\circ}_{\text{EL}, \epsilon=80} - \Delta G^{\circ}_{\text{EL}, \epsilon=1}$ predstavlja polarni, a $\Delta G^{\circ}_{\text{NP}}$ nepolarni doprinos slobodnoj energiji otapanja proteina.

Polarna komponenta dobivena je rješavanjem Poisson-Boltzmannove jednačbe:

$$\nabla [\epsilon(r) \nabla \phi(r)] - \epsilon(r) h(r)^2 \sinh[\phi(r)] + 4\pi\rho(r) / kT = 0 \quad (17)$$

gdje je $\epsilon(r)$ elektrostatska konstanta, $\phi(r)$ elektrostatski potencijal, $\rho(r)$ gustoća naboja, k Boltzmannova konstanta i T temperatura u kelvinima;

dok je nepolarna komponenta, $\Delta G^{\circ}_{\text{NP}}$ izračunata na temelju promjene otapalu dostupne površine, korištenjem empirijskog izraza:

$$\Delta G^{\circ}_{\text{NP}} = \gamma \text{SASA} + \beta \quad (18)$$

gdje su γ i β empirijske konstante,¹⁶⁷ ($\gamma = 0,00542 \text{ kcal}/(\text{mol}\text{\AA}^2)$ i $\beta = 0,92 \text{ kcal/mol}$), a SASA površina dostupna otapalu, izračunata programom MolSurf¹⁶⁸.

Slobodna energija vezanja u vakuumu određena je kao suma srednje molekulske mehaničke energije vezanja, ΔE_{MM}° i entropijskog doprinosa $T \Delta S_{NMA}^{\circ}$:

$$\Delta G_{VezVakuum}^{\circ} = \Delta E_{MM}^{\circ} - T \Delta S_{NMA}^{\circ} \quad (19)$$

Entropijski doprinos slobodnoj energiji vezanja dobiven je primjenom analize normalnih modova. Promjena energije dana jednačbom (19) mjeri je tendencije kojom ligand i receptor stvaraju stabilan kompleks.

Pri svakom koraku MD simulacije promjena potencijalne energije usljed nastajanja kompleksa (u vakuumu) računata je jednačbom:

$$\Delta E = E_{Kompleks} - (E_{Receptor} + E_{Ligand}) \quad (20)$$

Za izračun slobodne energije vezanja izabrano je 200 struktura koje su prikupljane iz trajektorija sličnih vrijednosti RMSD. Duljina trajektorije iznosila je 2 ns, a strukture su bilježene svakih 10 ps.

Vizualna analiza struktura i animacija trajektorija dobivenih tijekom MD simulacija izvršena je programom Visual Molecular Dynamics (VMD 1.9)¹⁶⁹.

4. REZULTATI

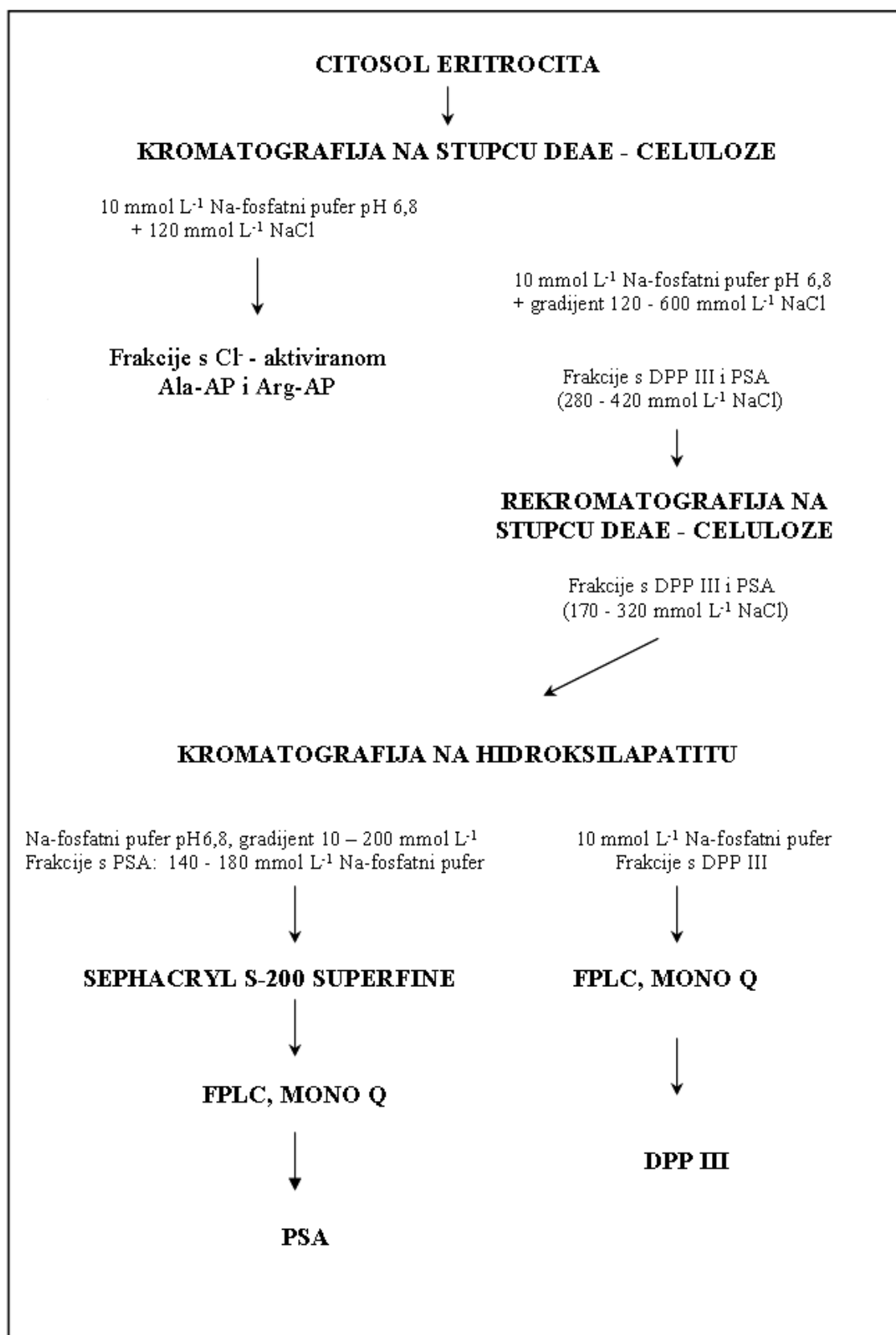
4.1. Pročišćavanje DPP III i PSA iz ljudskih eritrocita

4.1.1. Uklanjanje krvne plazme i pranje eritrocita

Prvi korak u pročišćavanju egzopeptidaza iz eritrocita bio je uklanjanje krvne plazme uzorku od 300 mL suspendiranih eritrocita. U tu svrhu uzorak je centrifugiran ($4500\times g$, 5 min, 4 °C). Centrifugiranjem dobiveni talog sadržavao je eritrocite i manji dio drugih krvnih stanica, dok je nadtalog sadržavao krvnu plazmu te je dekantiran. Talog je pran 3 puta s 3 puta većim volumenom fiziološke otopine (NaCl, $\varphi = 0,009$), a između pranja eritrociti su sakupljeni centrifugiranjem ($1350\times g$, 10 min, 4 °C). Nadtalog nakon svakog centrifugiranja dekantiran je, uz pažljivo uklanjanje bjeličaste prevlake (ostatak leukocita) s površine istaloženih eritrocita. Eritrociti su zatim pohranjeni na -22 °C.

4.1.2. Liziranje eritrocita

Eritrociti su prvo odmrznuti, a potom su uz dodatak 3 puta većeg volumena destilirane vode ostavljeni da liziraju 60 min pri 4 °C uz povremeno miješanje. Nakon toga, membrane eritrocita se od citosola odvojilo centrifugiranjem ($20\,000\times g$, 45 min, 4 °C). Ovim postupcima priređeno je 610 mL citosola eritrocita kojemu je pH vrijednost podešena na 6,8 te se s njim krenulo u pročišćavanje DPP III i PSA (shema 4.1). Aktivnost DPP III tijekom procesa pročišćavanja praćena je kolorimetrijskom metodom uz Arg-Arg-2NA kao supstrat. Specifična aktivnost citosola eritrocita uz Arg-Arg-2NA iznosila je $2,0\times 10^{-3}$ j mg^{-1} . Aktivnost PSA određivana je kolorimetrijskim metodama uz supstrate Arg-2NA ili Arg-pNan. Osim DPP III i PSA, praćena je još i aktivnost alanil-aminopeptidaze aktivirane kloridom uz supstrat Ala-2NA te kloridom aktivirane arginil-aminopeptidaze uz Arg-2NA kao supstrat.



Shema 4.1. Pročišćavanje DPP III i PSA iz citosola ljudskih eritrocita.

4.1.3. Kromatografija na stupcu DEAE-celuloze

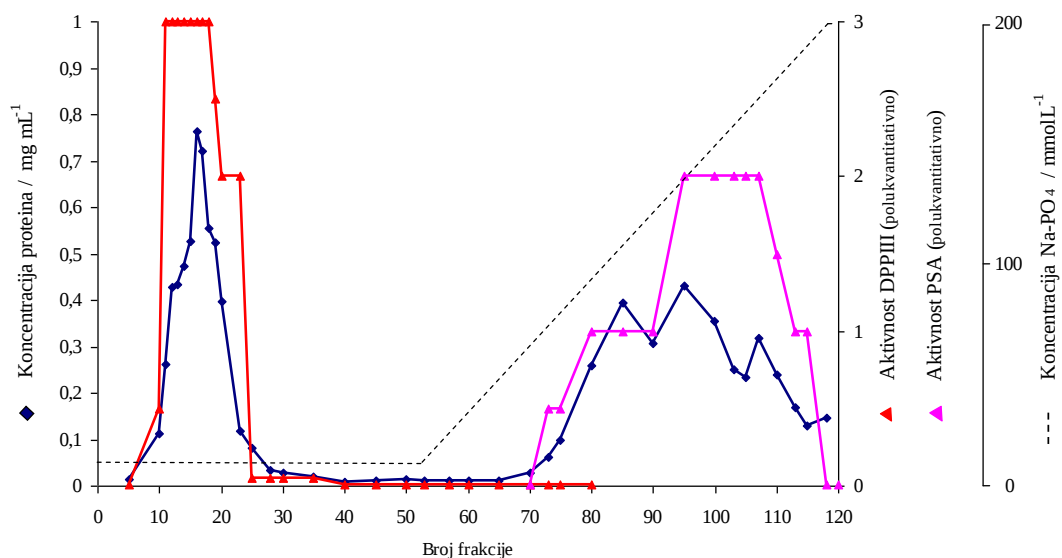
Za uklanjanje hemoglobina koji je činio glavninu proteina u citosolu eritrocita, korištena je kromatografija na DEAE-celulozi za koju je ranije utvrđeno da daje dobre rezultate u ovom koraku pročišćavanja⁹⁵. Preparat citosola eritrocita (610 mL) nanesen je na stupac DEAE-celuloze, a nevezani hemoglobin ispran početnim puferom. Hemoglobinske frakcije sadržavale su 91 % od ukupno nanesenih proteina na stupac DEAE-celuloze. Ispiranje vezanih proteina započeto je startnim puferom kojemu je dodan 20 mmol L⁻¹ NaCl, nastavljeno s puferom koji je sadržavao NaCl koncentracije 120 mmol L⁻¹ i na kraju s gradijentom koncentracije (od 120 do 600 mmol L⁻¹) NaCl, što je rezultiralo elucijom alanil-aminopeptidaze aktivirane kloridom, odnosno arginil-aminopeptidaze aktivirane kloridom te DPP III i PSA. Glavnina aktivnosti uz Arg-Arg-2NA nalazila se u frakcijama koje su eluirane s 280-420 mmol L⁻¹ NaCl (slika 4.1). Aktivne frakcije (71-120) su spojene te ugušćene 12,7 puta ultrafiltracijom kroz membranu PM-10. Specifična aktivnost spojenih frakcija uz Arg-Arg-2NA iznosila je prije ugušćivanja ~ 0,61 j mg⁻¹, a u ugušćenom uzorku ~ 0,93 j mg⁻¹.

4.1.4. Rekromatografija na stupcu DEAE-celuloze

Radi daljnjeg pročišćavanja ionsko izmjenjivačkom kromatografijom, uzorak ugušćenih aktivnih frakcija eluiranih gradijentom NaCl iza DEAE-celuloze bilo je potrebno odsoliti. To je provedeno gel-filtracijom na stupcu (2,5×16,5 cm) Sephadexa G-25. Volumen nanesenog uzorka za odsoljavanje iznosio je 1/10 volumena stupca Sephadexa G-25, a ispiranje je provedeno uz 10 mmol L⁻¹ Na-PO₄ pufer pH 6,8. Gel-filtracijom je sakupljeno 30 frakcija (volumen frakcije iznosio je 3 mL), a glavnu aktivnost uz Arg-Arg-2NA (supstrat DPP III) kao i uz Arg-2NA (supstrat PSA) imale su frakcije od 13 do 18. Odsoljeni uzorak volumena 80 mL nanesen je na stupac (0,9×28,5 cm) DEAE-celuloze, a kromatografija provedena kako je opisano u Materijalima i metodama. Ukupni volumen koncentracijskog gradijenta NaCl bio je 200 mL, a volumen frakcija 3 mL. Glavnina aktivnosti uz Arg-Arg-2NA bila je sadržana u frakcijama od 7 do 25, a uz Arg-2NA u frakcijama od 7 do 10. Frakcije od 7 do 25 zatim su spojene te ugušćene 8,3 puta ultrafiltracijom kroz membranu PM-10. Specifična aktivnost ugušćenih frakcija uz Arg-Arg-2NA iznosila je 1,3 j mg⁻¹, a uz Arg-2NA iznosila je 6,0·10⁻³ j mg⁻¹. Provedenom rekromatografijom DPP III je dodatno pročišćena 2,3 puta, a iskorištenje aktivnosti uz Arg-Arg-2NA bilo je 75 %.

4.1.5. Kromatografija na hidroksilapatitu

Nakon rekromatografije na DEAE-celulozi, enzimski preparat je još uvijek sadržavao DPP III i PSA. Za razdvajanje ovih dvaju proteina korištena je kromatografija na hidroksilapatitu te uvjeti pri kojima se DPP III ne veže, dok PSA ostaje vezana na ovom sorbentu⁹⁵. Ugušćeni preparat enzima iza rekromatografije na DEAE-celulozi nanesen je na stupac hidroksilapatita prethodno uravnotežen s 10 mmol L⁻¹ Na-PO₄ puferom pH 6,8. Nakon propuštanja uzorka, DPP III je eluirana početnim puferom, a nakon toga je eluirana PSA, gradijentom od 70 do 200 mmol L⁻¹ Na-PO₄ pufera. Glavnina aktivnosti uz Arg-2NA bila je sadržana u frakcijama s koncentracijom Na-PO₄ pufera od 140 do 180 mmol L⁻¹ (slika 4.1). Provedenom kromatografijom, DPP III je dodatno pročišćena za oko 20 puta uz iskorištenje aktivnosti od 76 %. Specifična aktivnost spojenih frakcija uz Arg-Arg-2NA iznosila je 26,6 j mg⁻¹. Aktivne frakcije potom su, radi pripreme za daljnje pročišćavanje, odsoljene gel-filtracijom na Sephadexu G-25.

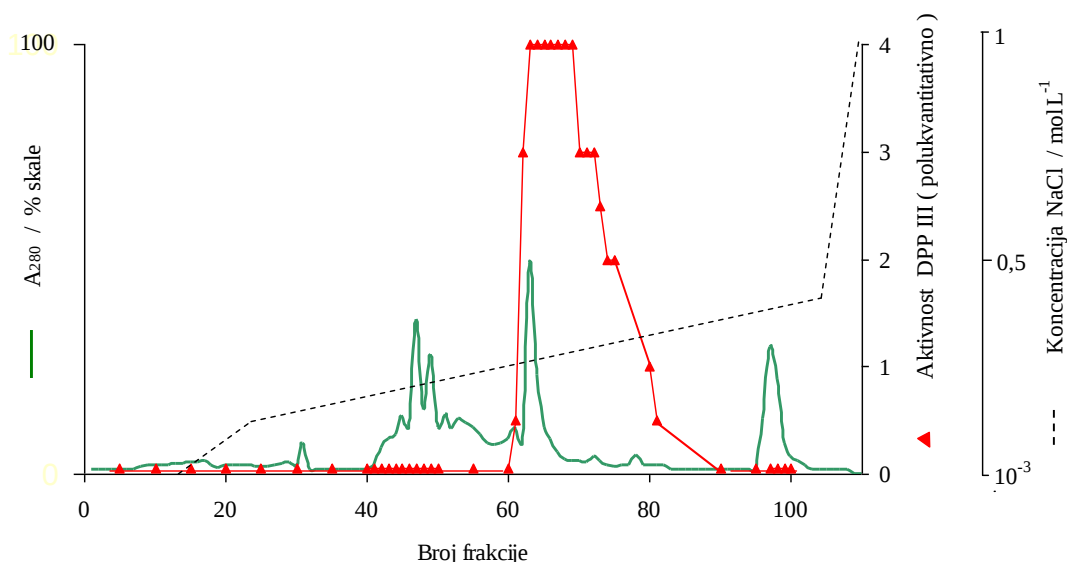


Slika 4.1. Kromatografija uzorka aktivnih frakcija DPP III i PSA iza rekromatografije na DEAE-celulozi na stupcu hidroksilapatita (1,5×6,5 cm) u 10 mmol L⁻¹ Na-PO₄ puferu pH 6,8. Gradijent za eluciju: 10 do 200 mmol L⁻¹ Na-PO₄ pufer pH 6,8; protok 10 mL h⁻¹; volumen frakcija 1,1 mL. Na stupac je nanoseno 46 mg proteina. Aktivnost DPP III i PSA određena je uz Arg-Arg-2NA odnosno Arg-2NA.

Za određivanje čistoće enzimskih preparata iza pojedinih stupnjeva pročišćavanja provedena je elektroforeza u denaturirajućim uvjetima, a gelovi zatim bojani srebrom. Uspoređujući preparat nakon rekromatografije na DEAE-celulozi (slika 4.3, uzorak 3) s preparatom nakon kromatografije na hidroksilapatitu (slika 4.3, uzorak 4) vidljivo je da se na hidroksilapatitu uspjelo odvojiti glavninu niskomolekularnih kontaminanata.

4.1.6. Pročišćavanje DPP III brzom tekućinskom kromatografijom proteina

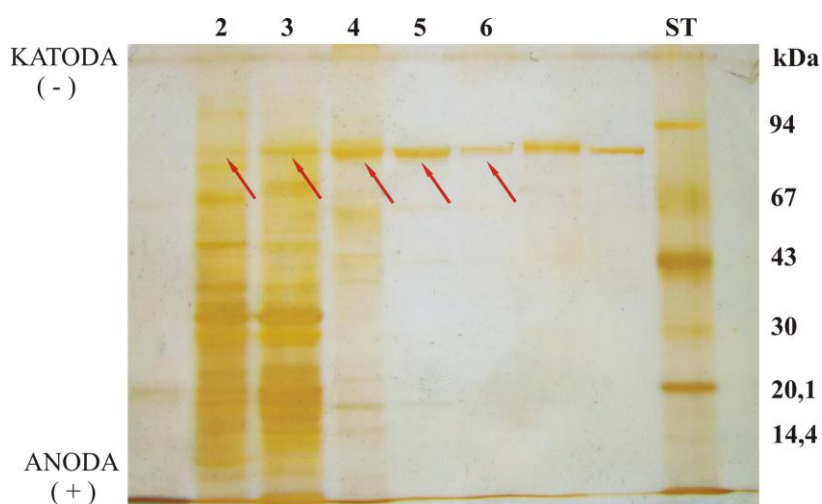
Završni korak pročišćavanja DPP III bila je brza tekućinska kromatografija proteina, FPLC, na anionskom izmjenjivaču Mono Q. Odsoljeni preparat enzima dobiven kromatografijom na hidroksilapatitu nanosen je na kolonu Mono Q HR 5/5 uravnoteženu s 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl puferom pH 7,2. DPP III je eluirana uz gradijent NaCl koncentracije od 250 do 320 mmol L⁻¹. Glavnina aktivnosti uz Arg-Arg-2NA bila je sadržana u frakcijama od 63 do 65 (frakcije s koncentracijom NaCl od 255 do 270 mmol L⁻¹) (slika 4.2). Aktivne frakcije spojene su i čuvane pohranjene na -10 °C uz prethodni dodatak glicerola ($\varphi = 0,22$). Ovom kromatografijom uzorak je dodatno pročišćen 3,6 puta. Specifična aktivnost priređenog preparata uz Arg-Arg-2NA iznosila je 96 j mg⁻¹.



Slika 4.2. Pročišćavanje uzorka DPP III brzom tekućinskom kromatografijom proteina na stupcu Mono Q HR 5/5. Gradijent za eluciju: 250-320 mmol L⁻¹ NaCl u 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl puferu pH 7,2; protok 0,5 mL min⁻¹; volumen frakcija ~ 0,5 mL. Na stupac je nanoseno 1,6 mg proteina. Aktivnost DPP III određena je uz Arg-Arg-2NA.

Provedena kromatografija na Mono Q davala je preparat koji je na gelu pokazao postojanje samo jedne proteinske vrpce (slika 4.3, uzorak 5 i 6).

Tijek pročišćavanja DPP III iz ljudskih eritrocita prikazan je u tablici 4.1. Elektroforezom nativnih preparata u gradijentu gustoće poliakrilamidnog gela 4-15 % i 10-15 % određeno je da relativna molekulska masa DPP III iznosi $\sim 79\,400$ odnosno $\sim 68\,400$. Određena relativna molekulska masa denaturirane DPP III na pločici gela gradijenta gustoće 8-25 % iznosila je $\sim 73\,300$ (nije pokazano) odnosno $\sim 87\,000$ u homogenom 10 % poliakrilamidnom gelu.



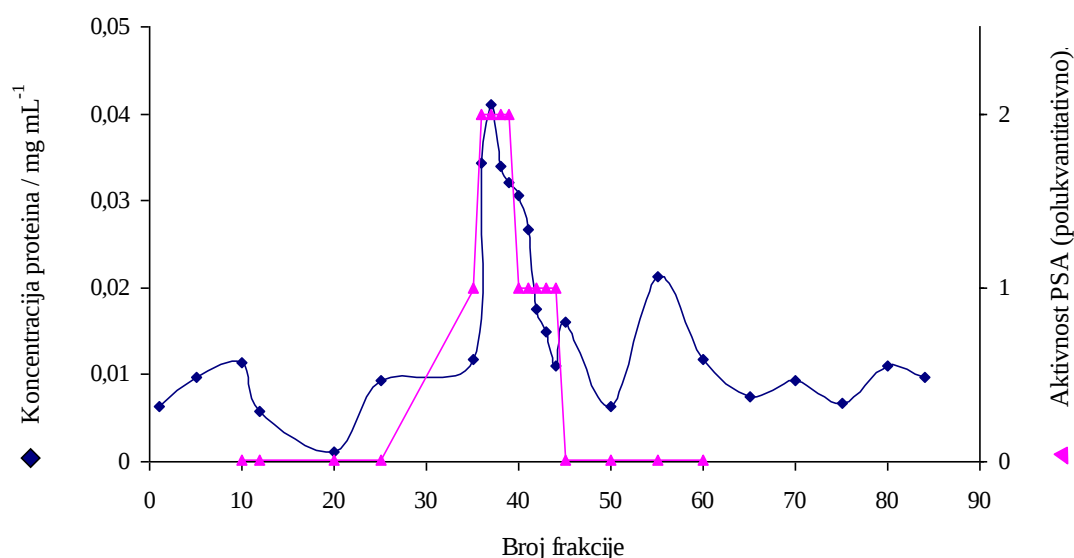
Slika 4.3. Tijek pročišćavanja ljudske DPP III ilustriran sa SDS-PAGE u 10 % gelu. Uzorci: ST - niskomolekularni proteinski standardi; α -laktoalbumin (14,4 kDa), inhibitor tripsina iz soje (20,1 kDa) anhidraza karbonatne kiseline (30 kDa), albumin jajeta (43 kDa), albumin iz govedeg seruma (67 kDa) i fosforilaza B (94 kDa); 2 - spojene i ugušćene frakcije (71-120) nakon kromatografije na DEAE-celulozi; 3 - ugušćene frakcije gradijenta (7-25) nakon rekromatografije na DEAE-celulozi; 4 - ugušćene frakcije (11-15) eluirane sa startnim puferom nakon kromatografije na hidroksilapatitu; 5 - spojene aktivne frakcije (63-65) iza Mono Q; 6 - spojene aktivne frakcije (66-67) iza Mono Q. Crvene strelice označavaju položaj proteinske vrpce koja odgovara molekulskoj masi ljudske DPP III. Proteinske vrpce detektirane su bojanjem srebrom.

Tablica 4.1. Pročišćavanje DPP III iz ljudskih eritrocita.

Stupanj pročišćavanja	Volumen / mL	Koncentracija proteina / mg mL ⁻¹	Ukupni proteini / mg	Specifična aktivnost / j mg ⁻¹	Ukupna aktivnost / j	Iskorištenje aktivnosti / %	Faktor čišćenja / x
Citosol	610	143,06	87266,60	$2,0 \cdot 10^{-3}$	176,46	100	—
Aktivne (odsoljene) frakcije nakon kromatografije na DEAE-celulozi	77	1,85	142,45	0,57	80,62	45,68	279,90
Aktivne frakcije nakon rekromatografije na DEAE- celulozi	8,6	5,39	46,31	1,30	60,44	34,25	645,40
Aktivne frakcije nakon hidroksilapatita	4,8	0,36	1,73	26,63	46,02	26,08	13170,60
Aktivne frakcije nakon Mono Q	1,65	0,12	0,20	96	19,46	11,03	47423,40

4.1.7. Pročišćavanje PSA gel-filtracijom na Sephacrylu S-200 Superfine

Nakon što je kromatografijom na hidroksilapatitu odvojen od DPP III, uzorak PSA je ugušćen (~ 4 puta) do volumena od 4 mL ultrafiltracijom kroz membranu PM-10 uz dodatak 2 mmol L^{-1} 2-ME. Po dva mL ugušćenog enzimskog uzorka nanošena su na stupac Sephacryla S-200 Superfine volumena 160 mL, da bi tim postupkom bio pročišćen cjelokupan uzorak enzima. Glavnina aktivnosti uz Arg-pNan bila je sadržana u frakcijama od 37 do 42 (slika 4.4.), koje su spojene te ugušćene 3 puta ultrafiltracijom kroz membranu PM-30. Specifična aktivnost priređenog preparata uz Arg-2NA iznosila je $1,06 \text{ j mg}^{-1}$.



Slika 4.4. Gel-filtracija uzorka aktivnih frakcija PSA iza kromatografije na hidroksilapatitu.

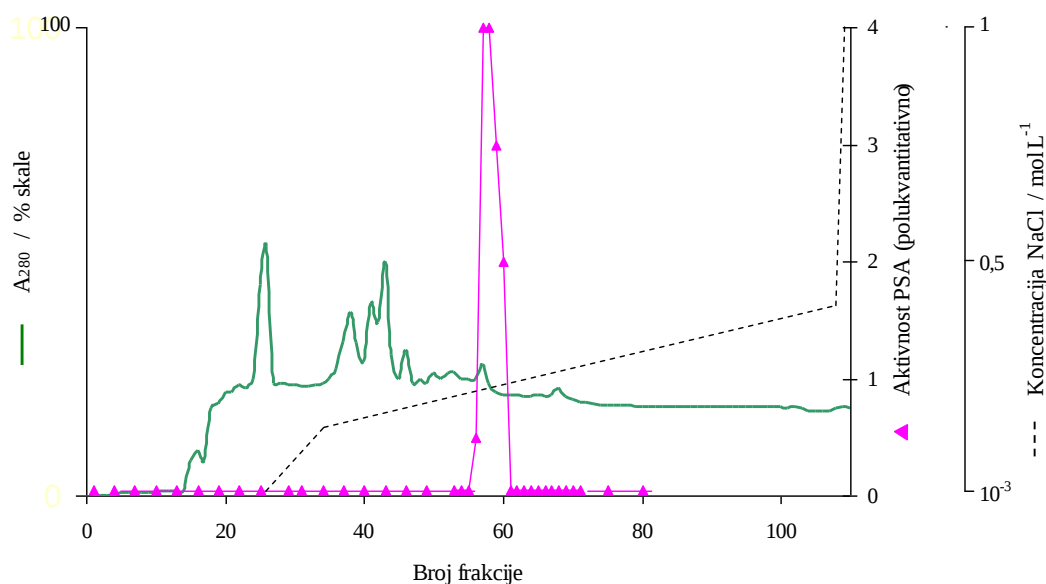
Na stupac ($1,5 \times 90 \text{ cm}$) Sephacryla S-200 Superfine u 50 mmol L^{-1} Tris-HCl puferu pH 7,2 s 200 mmol L^{-1} NaCl i 2 mM 2-ME nanoseno je $2,8 \text{ mg}$ proteina. Protok je bio 19 mL h^{-1} , a volumen frakcija $2,3 \text{ mL}$. Aktivnost PSA određena je uz Arg-pNan.

Radi daljnjeg pročišćavanja, uzorku PSA iza gel-filtracije na Sephacrylu S-200 Superfine uklonjen je NaCl odsoljavanjem na Sephadexu G-25. Volumen nanesenog uzorka za odsoljavanje iznosio je $1/13$ volumena stupca, a ispiranje je provedeno uz 50 mmol L^{-1} Tris-HCl pufer pH 7,2. Sakupljeno je 50 frakcija od po $\sim 2,9 \text{ mL}$, a glavnina aktivnosti nalazila se u frakcijama od 14 do 19. Spojenim aktivnim frakcijama dodan je $1,4$ ditioeritrol (1 mmol L^{-1}) i one su potom ugušćene ultrafiltracijom do $6,7 \text{ mL}$.

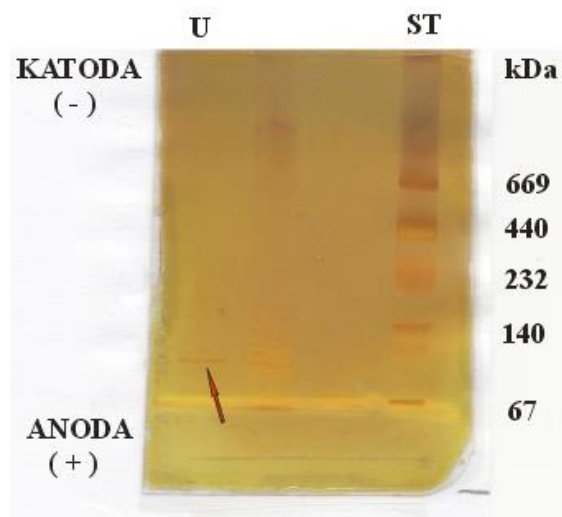
4.1.8. Pročišćavanje PSA brzom tekućinskom kromatografijom proteina

Odsoljeni preparat enzima, dalje je pročišćavan brzom tekućinskom kromatografijom proteina na koloni Mono Q HR 5/5 koja je uravnotežena s 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl puferom pH 7,2 koji je sadržavao 1 mmol L⁻¹ DTE. Nakon nanošenja i vezanja uzorka na sorbens, uslijedilo je ispiranje PSA uz gradijent soli NaCl-a koncentracije od 150 do 350 mmol L⁻¹. Glavnina aktivnosti uz Arg-2NA nalazila se u frakcijama 57 do 62 (frakcije s koncentracijom NaCl od 230 do 250 mmol L⁻¹) (slika 4.5). Aktivne frakcije zatim su spojene i čuvane pohranjene na -10 °C u glicerolu ($\phi = 0,22$). Specifična aktivnost preparata uz Arg-2NA iznosila je 5,28 j mg⁻¹. Bojenje proteina nakon SDS-PAGE u preparatu dobivenom nakon Mono Q pokazalo je postojanje jedne proteinske vrpce (slika 4.6). Rezanjem gela u trake i određivanjem aktivnosti uz supstrat Arg-2NA pokazalo je podudaranje područja proteina uzorka s područjem hidrolitičke aktivnosti.

Relativna molekulska masa PSA određena elektroforezom nativnih preparata u gradijentu poliakrilamidnog gela 4-15 % i 10-15 % iznosila je ~ 100 000. Elektroforezom denaturiranog preparata na ploči gradijent gela 8-25 % određena je relativna molekulska masa PSA od ~ 113 000.



Slika 4.5. Pročišćavanje uzorka PSA brzom tekućinskom kromatografijom proteina na stupcu Mono Q HR 5/5. Gradijent za eluciju 150 - 350 mmol L⁻¹ NaCl u 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl puferu pH 7,2 s 1 mmol L⁻¹ DTE. Protok: 0,5 mL min⁻¹; volumen frakcija 0,5 mL; osjetljivost UV-monitora: 0,005. Na stupac je naneseno 1,6 mg proteina. Aktivnost PSA određena je uz Arg-2NA



Slika 4.6. Preparat pročišćene ljudske PSA nakon SDS-PAGE u 10 % gelu. Uzorci: ST - visokomolekularni proteinski standardi; albumin iz govedeg seruma (67 kDa), dehidrogenaza mliječne kiseline (140 kDa), katalaza (232 kDa), feritin (440 kDa) i tiroglobulin (669 kDa); U - aktivna frakcija 58 iza Mono Q. Crvena strelica označava položaj proteinske vrpce koja odgovara relativnoj molekulskoj masi ljudske PSA. Proteinske vrpce detektirane su bojanjem srebrom.

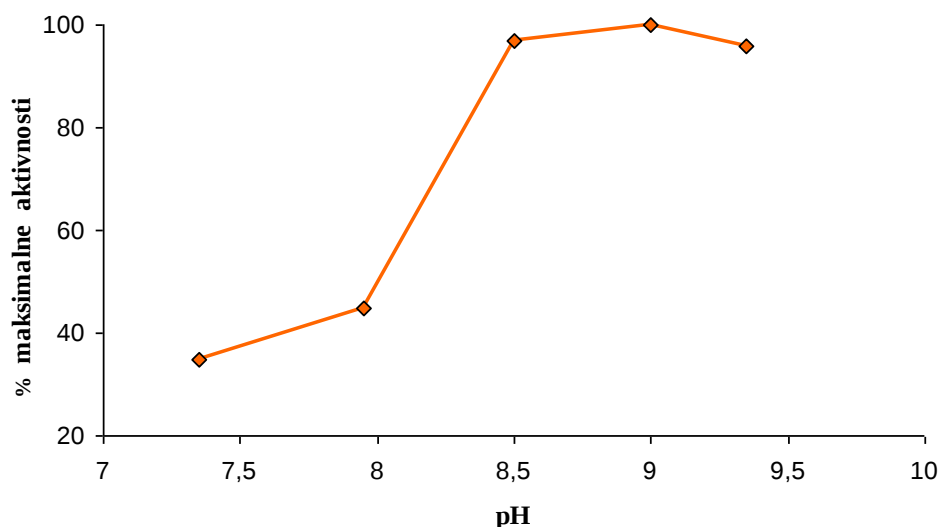
4.2. Hidrolitička aktivnost pročišćene DPP III prema sintetskom supstratu

Arg-Arg-AMC

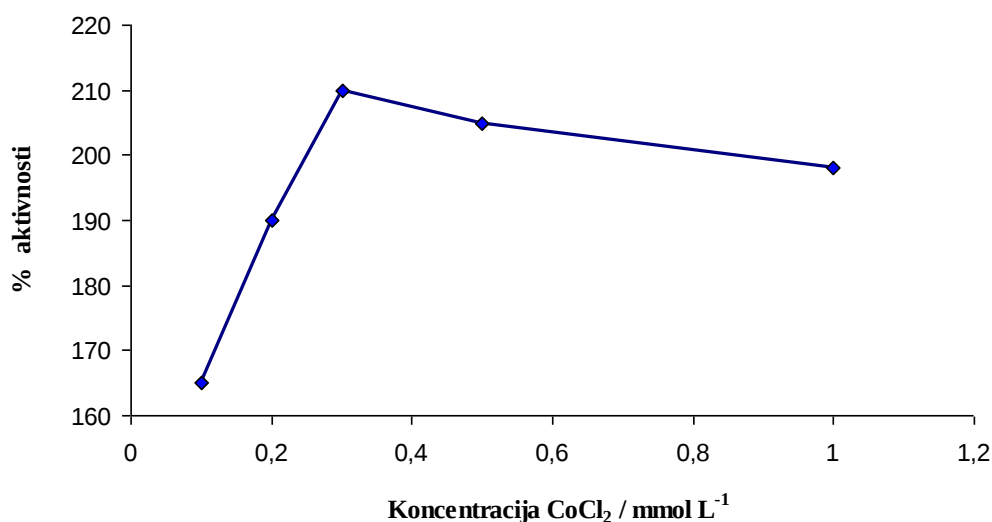
4.2.1. Ispitivanje utjecaja pH i iona kobalta, Co^{2+} na brzinu hidrolize Arg-Arg-AMC

Kako bi se ispitao utjecaj pH na brzinu hidrolize Arg-Arg-AMC katalizirane ljudskom DPP III, pročišćeni enzim je predinkubiran u puferu određene pH vrijednosti, bez dodatka Co^{2+} 3 minute na 23 °C, nakon čega je dodan supstrat. Izvršenim kontinuiranim mjerenjem fluorescencije nastalog produkta određeno je da se optimalno pH područje za hidrolizu Arg-Arg-AMC kataliziranu ljudskom DPP III nalazi između pH 8,5 i 9,35 (slika 4.7).

Kako bi se ispitalo pri kojoj se koncentraciji kobalta postiže maksimum aktivnosti ljudske DPP III uz Arg-Arg-AMC pri fiziološkom pH, ispitan je dodatak CoCl_2 od 0,1 do 1 mmol L^{-1} . Iz slike 4.8 vidi se da aktivacija ljudske DPP III raste s porastom koncentracije CoCl_2 sve do 0,3 mmol L^{-1} kada je postignuta maksimalna aktivacija od oko dva puta.



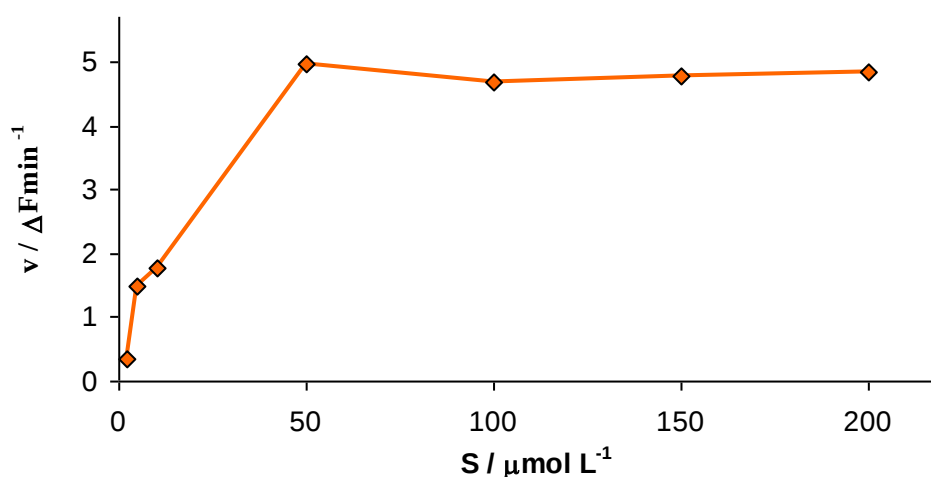
Slika 4.7. Ovisnost brzine hidrolize Arg-Arg-AMC ljudskom DPP III o pH. Reakcijska smjesa sadržavala je $0,058 \text{ nmol L}^{-1}$ enzim u 50 mmol L^{-1} Tris-HCl puferu pH vrijednosti 7,35, 7,95, 8,5, 9,0 i 9,3 uz $40 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ Arg-Arg-AMC kao supstrat. Nastanak produkta praćen je mjerenjem fluorescencije kako je to opisano u Materijalima i metodama.



Slika 4.8. Ovisnost hidrolitičke aktivnosti ljudske DPP III prema Arg-Arg-AMC o koncentraciji CoCl_2 . Reakcijska smjesa sadržavala je $0,058 \text{ nmol L}^{-1}$ enzim u 50 mmol L^{-1} Tris-HCl puferu pH 7,4 uz dodatak 0,1, 0,2, 0,3, 0,5 i 1 mmol L^{-1} CoCl_2 i $20 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ Arg-Arg-AMC. Nastanak produkta praćen je na način kako je to opisano u Materijalima i metodama. Aktivnost enzima bez dodatka CoCl_2 predstavlja 100 % aktivnosti.

4.2.2. Ovisnost brzine hidrolize o koncentraciji Arg-Arg-AMC

Ispitivanje ovisnosti brzine hidrolize o koncentraciji supstrata pri fiziološkom pH (7,4) vršeno je upotrebom većeg raspona koncentracije supstrata (od 2 do 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) čime je utvrđeno da reakcija hidrolize Arg-Arg-AMC s ljudskom DPP III slijedi Michaelis-Mentenovu kinetiku (slika 4.9).



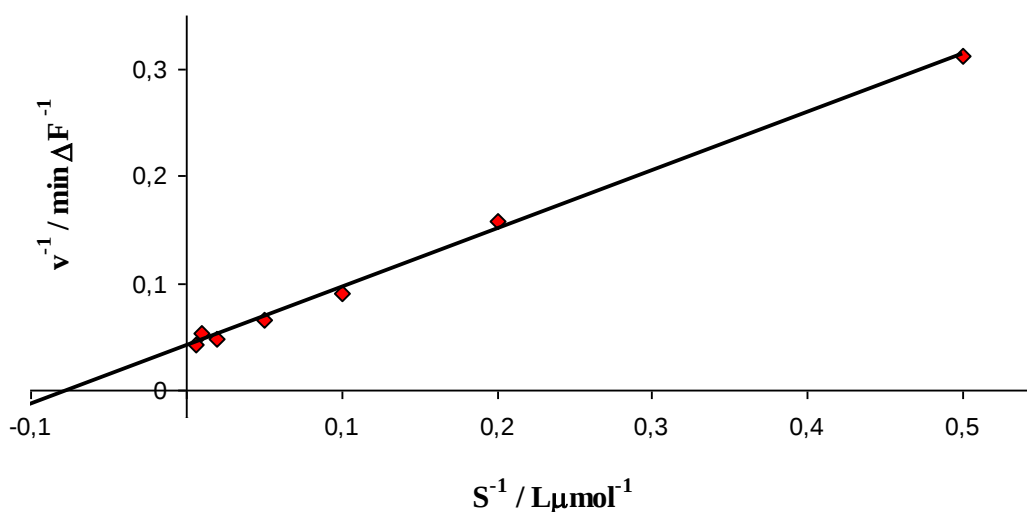
Slika 4.9. Ovisnost brzine hidrolize o koncentraciji supstrata, Arg-Arg-AMC. Reakcijska smjesa sadržavala je 0,058 nmol L^{-1} enzim u 50 mmol L^{-1} Tris-HCl puferu pH 7,4 uz dodatak 2, 5, 10, 50, 150 i 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Arg-Arg-AMC. Nastanak produkta praćen je na način kako je to opisano u Materijalima i metodama.

4.2.2.1. Kinetička karakterizacija

Za potrebe izračunavanja kinetičkih konstanti K_m i k_{cat} eksperiment ispitivanja ovisnosti početne brzine hidrolize o koncentraciji supstrata ponovljen je 7 puta, uz raspon koncentracije supstrata u reakcijskoj smjesi od 2 do 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Vrijednost za K_m izračunata po Lineweaver-Burku iznosila je $13,50 \pm 1,52 \mu\text{mol L}^{-1}$, a po Hanesu $13,20 \pm 1,35 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Maksimalna brzina kojom ljudska DPP III hidrolizira Arg-Arg-AMC izračunata iz linearizacije prema Lineweaver-Burku iznosila je $0,013 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ (slika 4.10). Katalitička konstanta k_{cat} iznosila je $3,86 \text{ s}^{-1}$, dok je katalitička efikasnost (k_{cat}/K_m) iznosila $2,86 \cdot 10^5 \text{ mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$.



Slika 4.10. Grafički prikaz prema Lineweaver-Burku za hidrolizu Arg-Arg-AMC ljudskom DPP III. Reakcijska smjesa sadržavala je $0,058 \text{ nmol L}^{-1}$ enzim u 50 mmol L^{-1} Tris-HCl puferu pH 7,4 uz dodatak 2, 5, 10, 20, 50, 150 i $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ Arg-Arg-AMC. Nastanak produkta praćen je na način kako je to opisano u Materijalima i metodama.

4.3. Ispitivanje potencijalnih inhibitora ljudske DPP III

4.3.1. Derivati benzimidazola - kandidati za nove inhibitore

Pronalaženje kandidata za nove (ne)peptidne inhibitore ljudske DPP III, odnosno metalopeptidaza porodice M49 temeljilo se na literaturnim podacima dostupnim do 2005. godine (kada su započeta istraživanja u ovom radu) o inhibitornom učinku kelatora metala na aktivnost ovih enzima i aminokiselinskim ostacima koji vežu cink u njihovom aktivnom mjestu^{5,7,100}. Stoga su kao kandidate za nove inhibitore predloženi heterociklički spojevi koji bi stvarali komplekse s metalnim ionom aktivnog mjesta. Nadalje, s obzirom na to da DPP III zahtijeva slobodnu amino-skupinu u svojim supstratima, da preferira sintetski supstrat Arg-Arg-2NA te da prethodna istraživanja upućuju na postojanje hidrofobnog džepa unutar mjesta za vezanje supstrata, predloženo je da ti heterociklički spojevi sadrže bazične (npr. amidino) i hidrofobne skupine.

Kao polazna struktura odabrana je benzimidazolna jezgra za koju je pokazano da kao gradivni dio nekih inhibitora metalo- i serinskih peptidaza ima mogućnost stvaranja vodikovih veza i π - π interakcija s imidazolinskim prstenom ostataka histidina važnih za aktivnost ovih enzima^{170,171}. Priređena su ukupno 24 benzimidazolna spoja kojima su bili varirani supstituenti, kako bi se mogao dobiti uvid u odnos potencijalne inhibitorne aktivnosti i strukture tih spojeva.

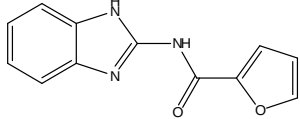
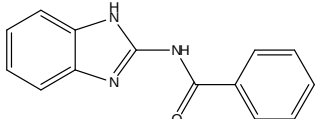
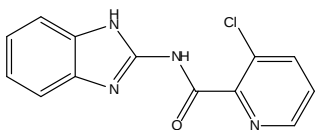
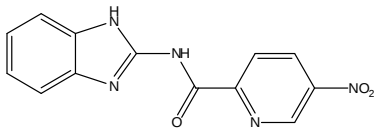
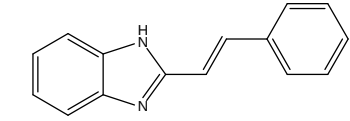
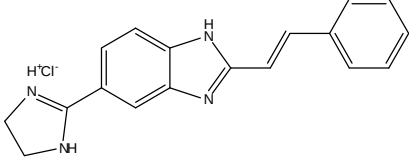
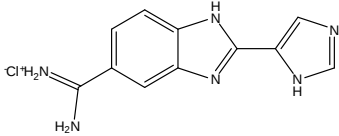
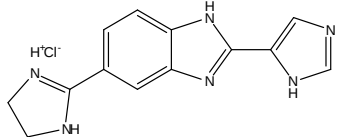
4.3.2. Inhibitorni učinak i određivanje IC₅₀

Ispitivanja inhibitornog djelovanja na ljudsku DPP III prvo su izvedena na 8 derivata benzimidazola čije su strukture imale jednu amidino skupinu. Spojevi **1** - **4** sadržavali su benzimidazolnu jezgru koja je putem amidne veze povezana s drugim aromatskim prstenom. Benzimidazolna odnosno amidino supstituirana benzimidazolna jezgra povezana je etenilnom razmaknicom s fenilnom skupinom u spojevima **5** i **6** dok je u spojevima **7** i **8** imidazolinski prsten putem kratke razmaknice spojen s amidino supstituiranom benzimidazolnom jezgrom.

Sistematsko ispitivanje djelovanja benzimidazolnih spojeva na aktivnost ljudske DPP III započeto je postavljenjem praga osjetljivosti (koncentracija benzimidazolnog spoja u inkubacijskoj smjesi bila je 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) te praćenjem inhibitornog učinka kod fiziološkog pH (7,4) uz supstrat Arg-Arg-2NA. Spojevima koji su u navedenoj koncentraciji pokazali inhibitorno djelovanje određena je vrijednosti IC₅₀ kako je to opisano u Materijalima i metodama.

Rezultati ispitivanja prvih 8 derivata benzimidazola prikazani su u tablici 4.2. Vidljivo je da inhibitorni učinak na enzim nisu imali spojevi **1** - **4**, djelomičnu inhibiciju davao je spoj **5**, dok su nešto jači inhibitorni učinak imali spojevi **6**, **7** i **8** uz IC₅₀ koja je iznosila ~ 10, 53 i 18 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Ovo preliminarno ispitivanje pokazalo je da amidino-supstituirani derivati benzimidazola (spojevi **6** - **8**) uzrokuju umjerenu inhibiciju humane DPP III.

Tablica 4.2. Utjecaj derivata benzimidazola na aktivnost ljudske DPP III.

Spoj br.	Struktura	Inhibicija pri koncentraciji 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	IC_{50} / $\mu\text{mol L}^{-1}$
1		ne	-
2		ne	-
3		ne	-
4		ne	-
5		djelomično	> 100
6		potpuno	~ 10
7		potpuno	53
8		potpuno	18

Reakcijska smjesa sadržavala je 0,3 nmol L^{-1} enzim u 50 mmol L^{-1} Tris-HCl puferu pH 7,4, 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ benzimidazalnog spoja i 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Arg-Arg-2NA. Predinkubacija s efektorom, određivanje aktivnosti enzima i IC_{50} opisani su u Materijalima i metodama.

Uz pretpostavku da bi inhibitorni učinak na ovu metalopeptidazu mogao biti veći ukoliko bi molekula inhibitora sadržavala dva amidino-supstituirana benzimidazolna prstena, kao što je to pokazano kod potentnih inhibitora serinskih peptidaza¹⁷², priređeno je 16 novih ciklobutanskih derivata benzimidazola. Ciklobutanski prsten ovih spojeva na položajima 2 i 4 sadržavao je identičnu fenilnu, furilnu ili tienilnu skupinu dok je na položajima 1 i 3 imao identično postavljene amidino-supstituirane benzimidazolne prstenove (tablica 4.3). Uvođenjem ciklobutanskog prstena u strukturu inhibitora omogućeno je postizanje rigidne konformacije navedenim skupinama.

Svih je 16 ciklobutanskih derivata benzimidazola (tablica 4.3) pri koncentraciji od 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ u potpunosti inhibiralo aktivnost enzima. Najjači inhibitorni učinak imali su spojevi **5'** i **1'** čija je vrijednost IC_{50} iznosila $\sim 1,7$ odnosno $\sim 2,6$ $\mu\text{mol L}^{-1}$, dok je vrijednost IC_{50} za spojeve **2'**, **6'**, **8'**, **9'** i **10'** iznosila od 5 do 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Ostali ciklobutanski derivati benzimidazola inhibirali su enzim uz vrijednost IC_{50} koja je bila veća (spoj **4'**, **7'**, **11'**, **12'**, **13'**, **15'** i **16'**) ili puno veća (spoj **3'** i **14'**) od 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

4.3.3. Tip i mehanizam inhibicije

Radi daljnjeg ispitivanje tipa i mehanizma inhibicije ljudske DPP III amidino-supstituiranim benzimidazolnim spojevima odabran je spoj **1'** (1,3-di-[5-(2-imidazolinil)-2-benzimidazolil]-2,4-di-fenil-ciklobutan dihidroklorid). Reverzibilnost inhibicije prvo je ispitana razrjeđenjem predinkubacijske smjese (5 i 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ spoj **1'** i 14 nmol L^{-1} enzim) potpuno inhibiranog enzima te mjerenjem preostale aktivnosti. Nakon 5-minutne predinkubacije uz 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ spoj **1'** na 37 °C preostala aktivnost enzima dobivena razrjeđenjem predinkubacijske smjese 100 i 200 puta bila je 37 % odnosno 41 % čime je pri navedenim uvjetima reakcije utvrđena djelomična reverzibilnost inhibicije. Predinkubacijom enzima uz 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ spoj **1'** preostala aktivnost dobivena razrjeđenjem 100 puta bila je ~ 1 %, dok je gotovo potpuna inaktivacija enzima uz 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ spoj **1'** zabilježena tek nakon 12-satne predinkubacije što je upućivalo na zaključak da je inhibicija osim o koncentraciji spoja i vremenski ovisna. Povrat aktivnosti potpuno inaktiviranog enzima pokušao je uklanjanjem spoja **1'** (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) iz predinkubacijske smjese dijalizom i ultrafiltracijom.

Ultrafiltracijom u pet ciklusa u komorici Microcon YM-10, čija je membrana imala gornju granicu prolaska molekula molekularne mase 10 kDa iz predinkubacijske smjese uklonjeno je oko 99,5 % spoja **1'**. Iako je navedenim postupkom postignuta submikromolarna koncentracija ($\sim 0,09$ $\mu\text{mol L}^{-1}$) spoja **1'** u smjesi, nije došlo do povrata enzimске aktivnosti.

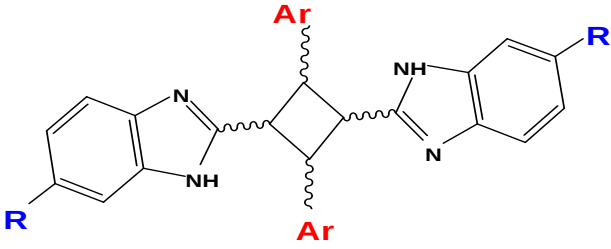
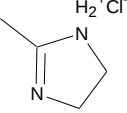
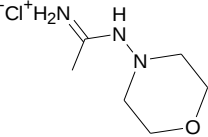
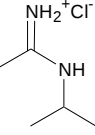
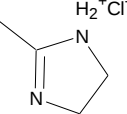
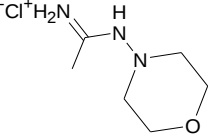
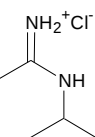
Nakon 18-satnog dijaliziranja predinkubacijske smjese prema 10 mmol L⁻¹ Tris-HCl puferu pH 7,4 nije zabilježen povrat aktivnosti, a niti produženim dijaliziranjem (do 94 sata) nije postignuta značajnija reaktivacija. Dodatak 10 μmol L⁻¹ Zn-aceteta puferu za dijalizu nije imao utjecaj na povrat aktivnosti.

Nadalje je ispitan utjecaj dodatka dvovalentnog kationa metala (0,1 i 1 mmol L⁻¹ CoCl₂ odnosno 0,1 mmol L⁻¹ Zn-acetat) u predinkubacijsku smjesu enzima i inhibitora - spoja **1'**. Niža koncentracija soli kobalta nije imala utjecaja na stupanj inhibicije koji je iznosio 100 % dok je slabljenje inhibicije postignuto pri 10 puta većoj koncentraciji kobalta kada je zabilježeno ~ 82 % inhibicije kao i uz dodatak Zn-acetata pri čemu je postignuto ~ 86 % inhibicije.

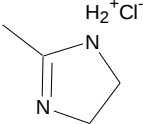
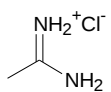
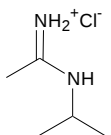
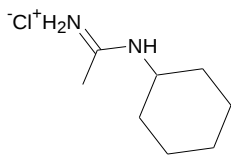
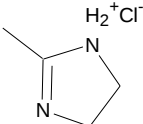
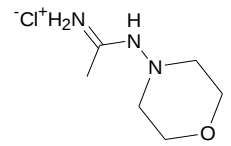
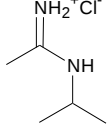
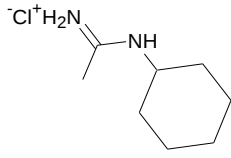
Za potrebe ispitivanja utjecaja pH na inhibiciju ljudske DPP III, preparat enzima predinkubiran je sa spojem **1'** (1 i 3 μmol L⁻¹) u puferu pH vrijednosti 7,4 i 8,6, a zatim je određena preostala aktivnost enzima. Uz 1 μmol L⁻¹ spoj **1'** povišenje pH pufera nije imalo utjecaja na inhibiciju enzima, dok je pri većoj koncentraciji spoja **1'** povišenje pH uzrokovalo pad enzimske aktivnosti za ~ 16 %, u odnosu na stupanj inhibicije kod pH 7,4.

Sljedeći korak bio je ispitati da li prisustvo peptidnog supstrata štiti ljudsku DPP III od inaktivacije spojem **1'**. Pritom su korišteni heptapeptid valorfin i tetrapeptid endomorfín-1. Dugo (34-satno) dijaliziranje uzorka prethodno potpuno inaktiviranog enzima spojem **1'** (5 μmol L⁻¹) uz prisustvo 5 μmol L⁻¹ valorfina prema fosfatnom puferu pH 7,4 davalo je povrat aktivnosti za ~ 20 %. Nadalje, ~ 62 % preostale aktivnosti zabilježeno je u slučaju kada je dijaliziranom uzorku (uz dodatak 0,1 μmol L⁻¹ valorfina) izvršeno daljnje uklanjanje spoja **1'** ultrafiltracijom u komorici Microcon YM-10 kroz tri ciklusa. Inkubacija enzima sa spojem **1'** (5 μmol L⁻¹) uz 1 μmol L⁻¹ valorfin tijekom 30 minuta davala je za ~ 43 % veću aktivnosti u odnosu na tretman bez valorfina. Zaštitni učinak na inaktivaciju utvrđen je i uz 30 μmol L⁻¹ endomorfín-1 koji je već nakon 9-minutne inkubacije uzrokovao za ~ 22 % veću aktivnost u odnosu na tretman bez dodatka peptidnog supstrata.

Tablica 4.3. Utjecaj ciklobutanskih derivata benzimidazola na aktivnost ljudske DPP III

				
Spoj br.	Ar	R	Inhibicija pri koncentraciji 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	IC ₅₀ / $\mu\text{mol L}^{-1}$
1'	fenil		potpuno	2,8
2'	fenil		potpuno	5,6
3'	fenil		potpuno	>> 10
4'	fenil		potpuno	> 10
5'	o-Cl-fenil		potpuno	1,7
6'	o-Cl-fenil		potpuno	~ 7
7'	o-Cl-fenil		potpuno	> 10
8'	o-Cl-fenil		potpuno	~ 6

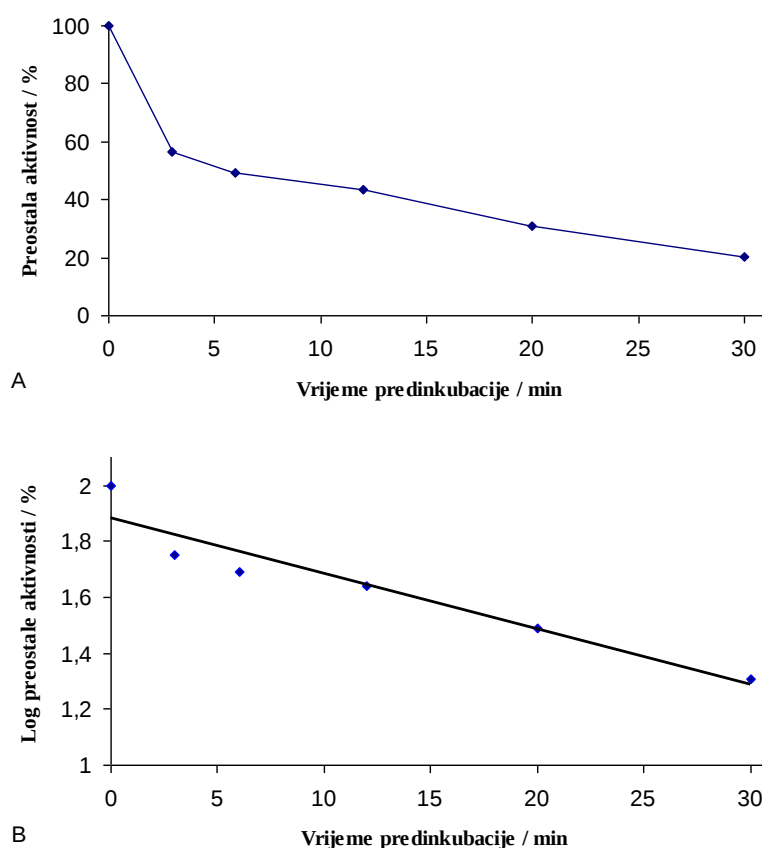
Tablica 4.3. (nastavak)

Spoj br.	Ar	R	Inhibicija pri koncentraciji 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	IC ₅₀ / $\mu\text{mol L}^{-1}$
9'	2-furil		potpuno	~ 8
10'	2-furil		potpuno	~ 9
11'	2-furil		potpuno	> 10
12'	2-furil		potpuno	> 10
13'	2-tienil		potpuno	> 10
14'	2-tienil		potpuno	>> 10
15'	2-tienil		potpuno	> 10
16'	2-tienil		potpuno	> 10

Enzim (0,3 nmol L⁻¹) je predinkubiran s potencijalnim inhibitorom u 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl puferu pH 7,4, 10 min kod 25 °C i 5 min kod 37 °C. Zatim je dodan supstrat, 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Arg-Arg-2NA i provedena enzimska reakcija, kako je opisano u Materijalima i metodama.

4.3.4. Kinetika inaktivacije ljudske DPP III spojem 1'

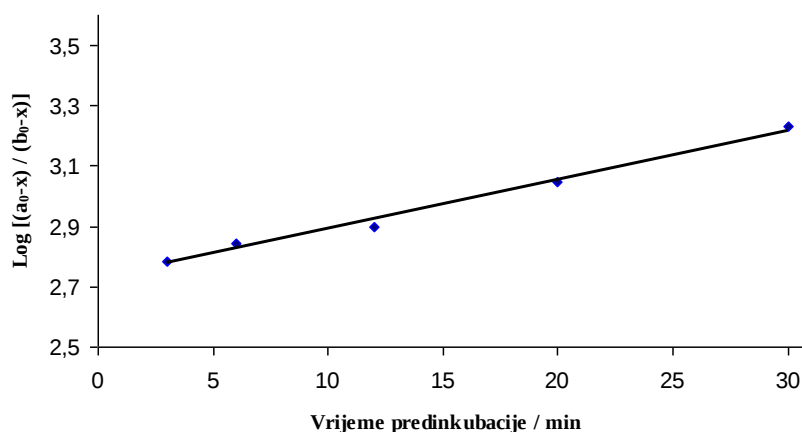
Vremenski tijek inaktivacije ljudske DPP III spojem 1' praćen je pod uvjetima reakcije pseudo-prvog reda (inhibitor u velikom molarnom suvišku), kako je opisano u Materijalima i metodama. Enzim je uravnotežen u puferu nakon čega je dodan ispitivani spoj, a smjesa je potom predinkubirana na 23 °C u vremenu do 30 minuta tijekom kojeg su uzimani alikvoti za određivanje preostale aktivnosti. Iz grafičkog prikaza (slika 4.11A) vidljivo je da je u prvih 6 minuta predinkubacije enzima ($14,5 \text{ nmol L}^{-1}$) sa spojem 1' ($5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) izgubljeno ~ 51 % aktivnosti enzima, a produljenim vremenom predinkubacije postignuta je daljnja inaktivacija enzima te je nakon pola sata zabilježeno tek ~ 20 % preostale aktivnosti. Grafički prikaz ovisnosti logaritma preostale aktivnosti o vremenu daje pravac (slika 4.11B) što ukazuje da inaktivacija ljudske DPP III spojem 1' u navedenim uvjetima velikog molarnog suviška ($345\times$) slijedi kinetiku pseudo-prvog reda.



Slika 4.11. (A)-Vremenski tijek inaktivacije ljudske DPP III spojem 1'; (B)-Određivanje reda reakcije. Enzim $14,5 \text{ nmol L}^{-1}$ je uravnotežen u 20 mmol L^{-1} Na-PO₄ puferu pH 7,4 na 23 °C nakon čega je dodan $5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ spoj 1'. U vremenskim intervalima od 3, 6, 12, 20 i 30 minuta uzimani su alikvoti ($10 \text{ } \mu\text{L}$) predinkubacijske smjese radi određivanja preostale aktivnosti.

Srednja vrijednost konstante brzine reakcije drugog reda za reakciju inaktivacije ljudske DPP III spojem **1'** iznosila je $6924 \pm 549 \text{ mol}^{-1} \text{ L min}^{-1}$, a dobivena je iz nagiba pravca grafičkog prikaza ovisnosti $\log[(a_0-x)/(b_0-x)]$ o vremenu (slika 4.12) prema modelu kako je to opisano u Materijalima i metodama.

Konstanta disocijacije (početnog reverzibilnog) kompleksa ljudske DPP III i spoja **1'** izračunata je metodom po Tornheimu, i iznosila je $0,20 \pm 0,007 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Spoj **1'**, u koncentraciji od $2,6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ uzrokovao je $\sim 50 \%$ inhibicije enzima, dok je koncentracija supstrata za to određivanje bila ~ 10 puta veća od vrijednosti Michaelisove konstante za Arg-Arg-2NA koja je iznosila $12,00 \pm 1,58 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.



Slika 4.12. Određivanje konstante brzine reakcije drugog reda za inaktivaciju ljudske DPP III spojem **1'.** Kinetički podaci vremenskog tijeka inaktivacije ljudske DPP III spojem **1'** (slika 4.12A) prikazani su prema modelu za reakciju drugog reda: $\log[(a_0-x)/(b_0-x)] = k/2,303 \cdot (a_0 - b_0)t + \log(a_0 / b_0)$. Vrijednost konstante brzine reakcije drugog reda određena je iz nagiba pravca koristeći linearnu regresijsku analizu.

4.3.5. Specifičnost djelovanja

Specifičnost inhibitornog djelovanja benzimidazolnih spojeva koji su pokazali najjaču inhibiciju ljudske DPP III (**1'**, **2'**, **5'**, **6'** i **8'**) provjerena je ispitivanjem na prethodno, iz ljudskih eritrocita izoliranoj cink-aminopeptidazi PSA. Navedeni spojevi imali su inhibitorni učinak na enzim pri koncentracijama koje su bile nešto niže od $5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (tablica 4.4). Kao i u slučaju DPP III, najjači inhibitorni učinak imao je spoj **5'** uz IC_{50} od $\sim 0,7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, dok je spoj **1'** pokazao IC_{50} od $\sim 2,8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

Predinkubacijom enzima u fosfatnom puferu pH 7,4 uz $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ spoj **1'** tijekom 15 i 30 minuta na 24°C preostala aktivnost enzima izmjerena standardnim testom (uz nepromijenjenu koncentraciju spoja **1'**) bila je $\sim 12\%$ odnosno $\sim 8\%$ čime je potvrđena vremenska ovisnost inaktivacije enzima ovim spojem.

Radi ispitivanja reverzibilnosti inhibicije, alikvot smjese nakon predinkubacije od 30 minuta razrijeđen je pri čemu je koncentracija spoja **1'** u standardnom testu aktivnosti iznosila $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$. Pri navedenim uvjetima reakcije, preostala aktivnost enzima iznosila je $\sim 90\%$ čime je utvrđen reverzibilni karakter inhibicije PSA.

Tablica 4.4. Vrijednosti IC_{50} ciklobutanskih derivata supstituiranih benzimidazola za PSA iz ljudskih eritrocita.

Spoj br.	IC_{50} / $\mu\text{mol L}^{-1}$
1'	2,8
2'	3,4
5'	0,7
6'	2,5
8'	4.0

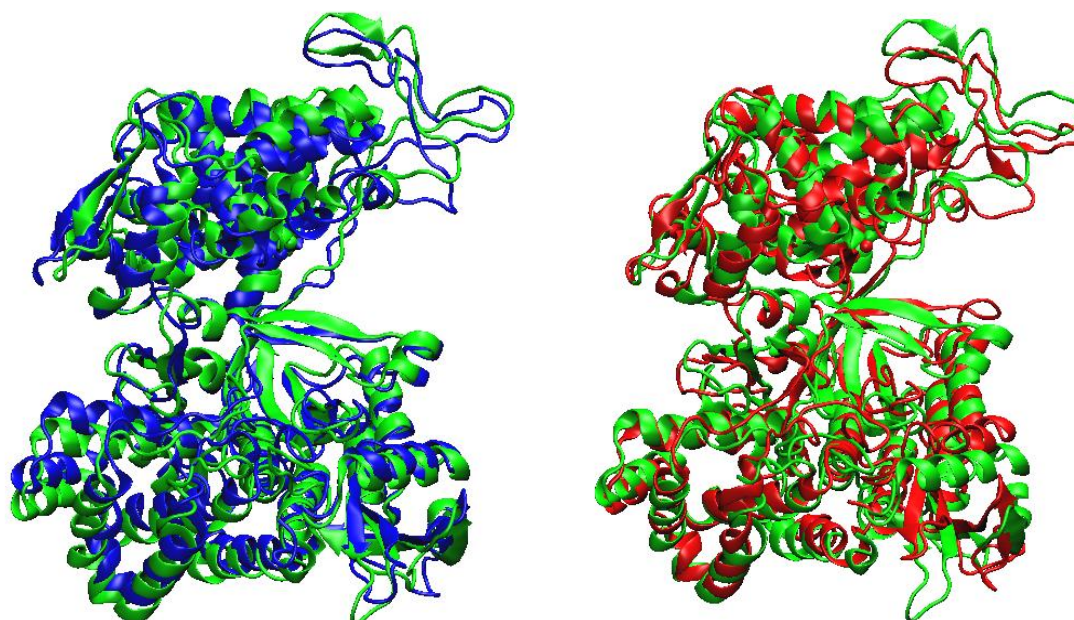
Enzim ($0,1 \text{ nmol L}^{-1}$) je predinkubiran s benzimidazolnim spojem ($1 - 10 \mu\text{mol L}^{-1}$) 15 min na 25°C u 50 mmol L^{-1} Tris-HCl puferu pH 7,4, prije dodatka supstrata ($88,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ Arg-2NA) i određivanja preostale aktivnosti, kako je opisano u Materijalima i metodama.

Pored dobivenih biokemijskih rezultata, a s ciljem boljeg shvaćanja utjecaja vezanja liganda (supstrat i inhibitor) na strukturu i fleksibilnost ljudske i kvašćeve DPP III te interakcije liganda s aktivnim mjestom enzima korištene su molekulsko dinamičke simulacije čiji su rezultati dani u narednim poglavljima Rezultata.

4.4. Molekulsko dinamičke simulacije ljudske DPP III u kompleksu sa supstratom Arg-Arg-AMC

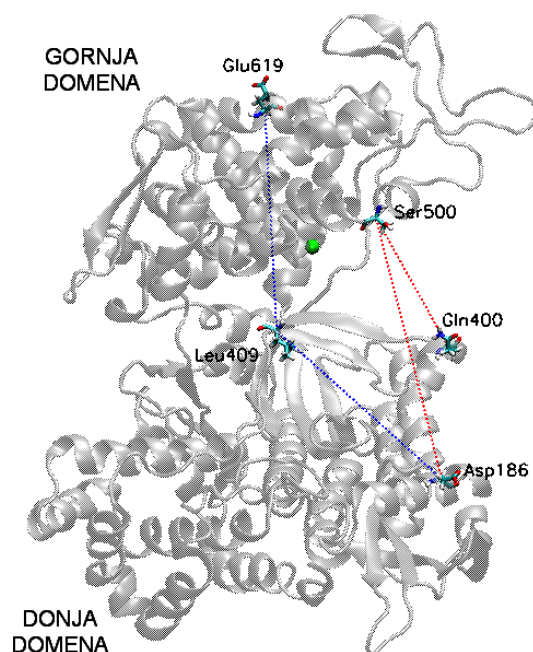
4.4.1. Promjene u strukturi proteina tijekom MD simulacija

Pripremljen i optimiziran kompleks simuliran je tijekom 40,8 ns pri stalnoj temperaturi sustava (300 K), a radi učinkovitijeg istraživanja konformacijskih promjena izvršena je i simulacija uz promjenu, točnije povišenje temperature tijekom kraćega vremenskog razdoblja kako je to opisano u Materijalima i metodama. Uspoređujući strukture dobivene nakon simulacija s početnom strukturom koja je korištena za MD simulacije uočen je pomak domena proteina jedne prema drugoj u oba sustava (slika 4.13).



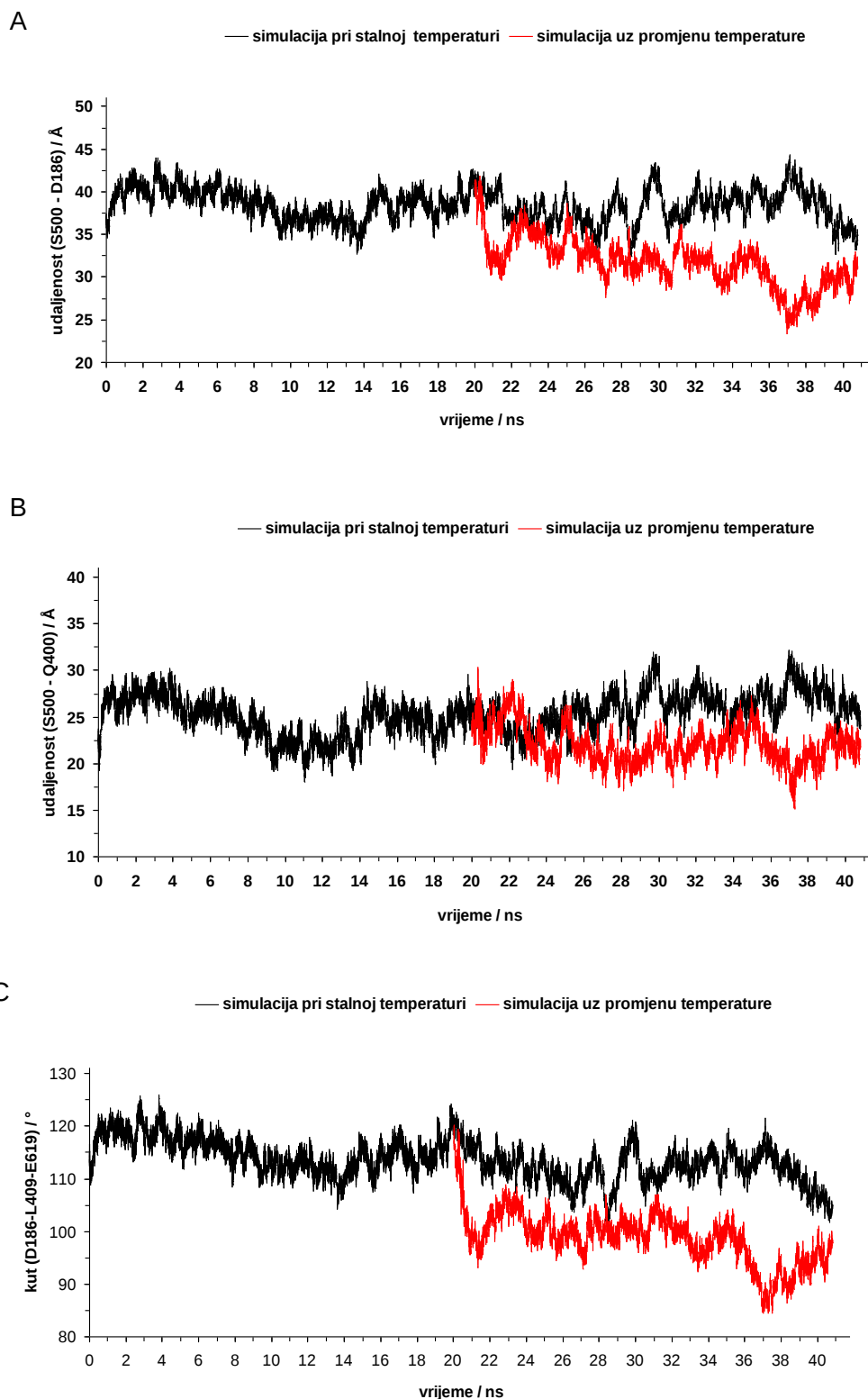
Slika 4.13. Promjene u terciarnoj strukturi proteina ljudske DPP III u kompleksu s Arg-Arg-AMC nakon 40,8 ns MD simulacija u odnosu na početnu strukturu. Preklopljena početna struktura (zeleno) sa strukturom dobivenom MD simulacijom pri stalnoj temperaturi (plavo) i uz promjenu temperature (crveno).

Radi detaljnijeg proučavanja pomicanja domena tijekom MD simulacija praćene su promjene u udaljenostima alfa ugljikovih atoma kao i kut između aminokiselinskih ostataka koje pripadaju gornjoj i donjoj domeni proteina (slika 4.14).



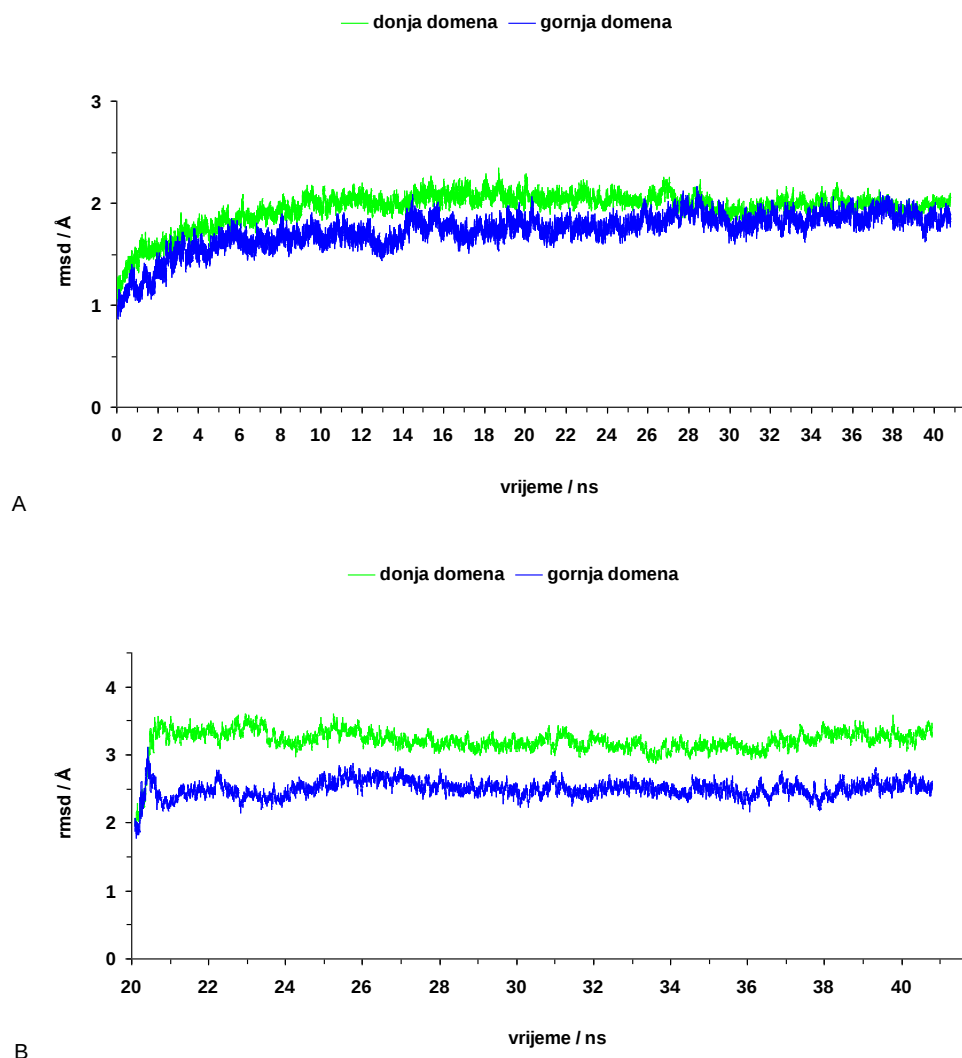
Slika 4.14. Položaj aminokiselinskih ostataka, odabranih za praćenje pomicanja domena proteina ljudske DPP III tijekom MD simulacija. Kut što ga čine Asp186-Leu409-Glu619 označen je plavom, a udaljenosti Ser500-Asp186 i Ser500-Gln400 crvenom isprekidanom linijom. Navedeni aminokiselinski ostaci prikazani su na početnoj strukturi DPP III (sivo), a položaj ion cinka prikazan je zelenom kuglicom.

Iz grafičkog prikaza (slika 4.15A-C) vidljivo je kako tijekom MD simulacija dolazi do smanjenja udaljenosti između alfa ugljikovih atoma kao i kuta odabranih aminokiselina. Udaljenost Ser500-Asp186 (slika 4.15A) u posljednjoj ns simulacije pri stalnoj temperaturi smanjila se ~ 4 Å odnosno pri simulaciji uz promjenu temperature ~ 7 Å, dok se udaljenost Ser500-Gln400 (slika 4.15 B) u oba slučaja neznatno smanjila (< 3 Å) u odnosu na udaljenost koje su aminokiseline imale u prvoj ns. Simulacijom uz promjenu temperature kut kojeg čine Asp186-Leu409-Glu619 smanjio se za $\sim 18^\circ$, dok se tijekom simulacija na konstantnoj temperaturi smanjio za $\sim 12^\circ$. Značajnije smanjenje kuta postiže se neposredno nakon zagrijavanja na 500 K te daljnjom simulacijom sustava kada je u 38. ns zabilježeno smanjenje kuta za $\sim 29^\circ$ kao i smanjenje udaljenosti Ser500-Asp186 za ~ 14 Å te Ser500-Gln400 za ~ 10 Å u odnosu na vrijednosti u prvoj ns (slika 4.15C).



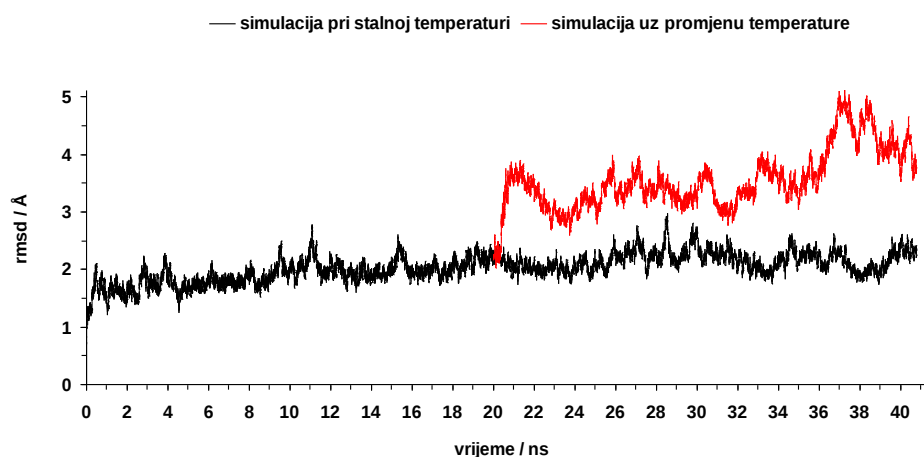
Slika 4.15. Promjene u strukturi proteina ljudske DPP III u kompleksu s Arg-Arg-AMC tijekom MD simulacija prikazane kao promjene u udaljenostima alfa ugljikovih atoma i kuta između pojedinih aminokiselinskih ostataka. Udaljenost (A) Ser500-Asp186, (B) Ser500-Gln400 te kut (C) kojeg čine Asp186-Leu409-Glu619.

Tijekom navedenih MD simulacija sekundarna struktura proteina (opisano niže u tekstu), kao i prostorni oblik donje (ostaci 4-335, 374-416 i 670-726) i gornje domene (ostaci 336-373 i 417-669) nisu se bitno mijenjali (slika 4.16AiB).



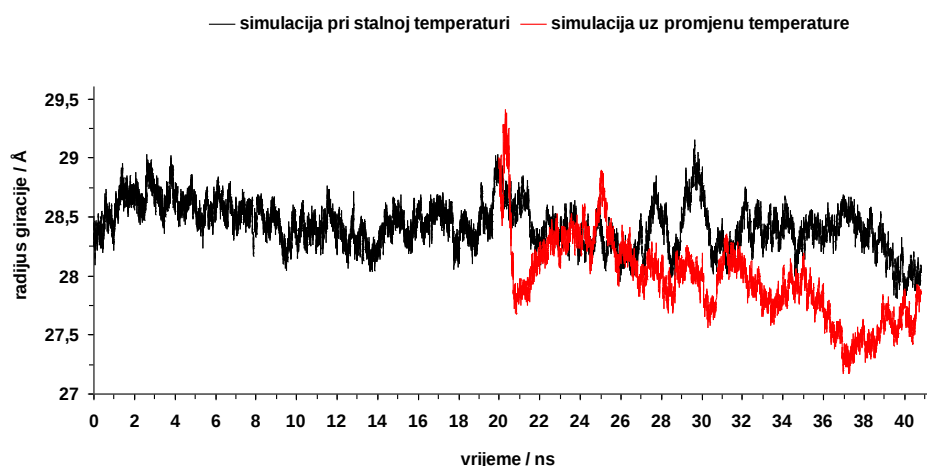
Slika 4.16. Promjena oblika proteinskog skeleta donje i gornje domene ljudske DPP III u kompleksu s Arg-Arg-AMC tijekom MD simulacija (A) pri stalnoj temperaturi i (B) nakon zagrijavanja.

Usporedbom rmsd (slika 4.17) uočava se veća promjene 3D strukture proteina u slučaju simulacija kod kojih je korišteno zagrijavanje u odnosu na simulacije pri stalnoj temperaturi. Srednji rmsd proteinskog skeleta za prvih 20 ns simulacije pri stalnoj temperaturi iznosi $1,89 \pm 0,23$ Å odnosno $2,16 \pm 0,18$ Å za posljednjih 20,8 ns dok za isto razdoblje simulacije uz promjenu temperature iznosi $3,56 \pm 0,52$ Å.



Slika 4.17. Promjena oblika proteinskog skeleta ljudske DPP III u kompleksu s Arg-Arg-AMC tijekom MD simulacija.

Rezultati analiza radijusa giracije (slika 4.18 i tablica 4.5) pokazuju kako globularnost proteina pri simulaciji uz stalnu temperaturu opada u prve dvije ns nakon čega je vidljiv postepen porast do 15. ns. Tijekom MD simulacija globularnost se postepeno smanjuje, pri čemu su varijacije radiusa giracije unutar 1 Å. Znatno veće promjene globularnosti opažene su tijekom simulacija sa zagrijavanjem, kada promjene radiusa giracije dostižu vrijednost od oko 2 Å, pri čemu se najveći stupanj globularnosti postiže tijekom 38. ns.



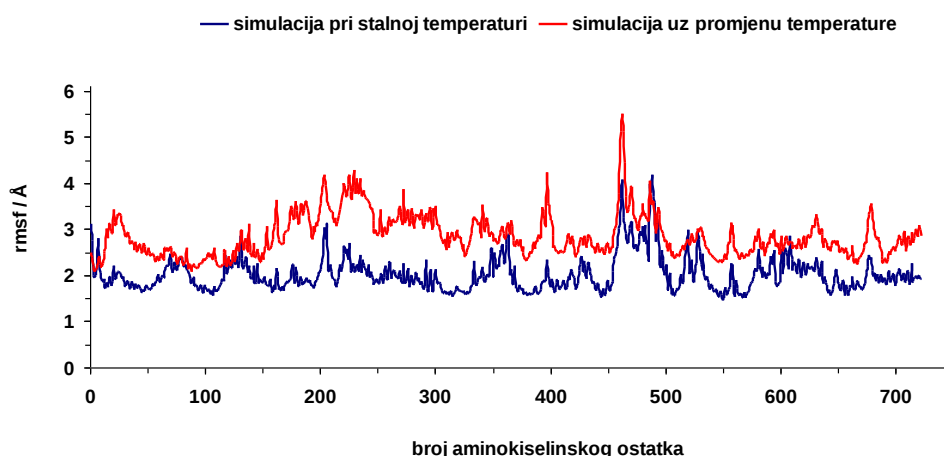
Slika 4.18. Radijus giracije proteina ljudske DPP III u kompleksu s Arg-Arg-AMC tijekom MD simulacija.

Tablica 4.5. Srednje vrijednosti radijusa giracije (RG) proteinskog skeleta ljudske DPP III u kompleksu s Arg-Arg-AMC nad odabranim trajektorijama tijekom MD simulacija i standardna devijacija (SD) izračunata za naznačeno razdoblje.

Trajektorija	$\langle RG \rangle \pm SD / \text{\AA}$
2. ns *	$28,37 \pm 0,09$
22. ns *	$28,69 \pm 0,18$
22. ns **	$27,93 \pm 0,11$
38. ns **	$27,36 \pm 0,09$
40. ns *	$28,07 \pm 0,09$
40. ns **	$27,62 \pm 0,12$

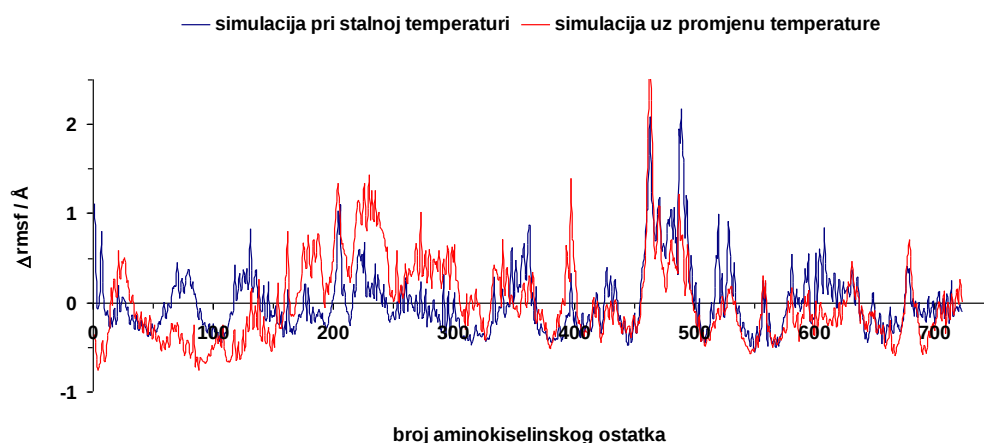
* Simulacija pri stalnoj temperaturi sustava. **Simulacija uz promjenu temperature sustava.

Kako bi se dobio bolji uvid u fleksibilnost proteinskih regija u završnim fazama MD simulacija izvršena je rmsf analiza proteinskog skeleta u posljednje dvije ns. Uspoređujući profil rmsf (slika 4.19), uočava se veća apsolutna fleksibilnost proteinskog skeleta pri simulaciji uz zagrijavanje u odnosu na sustav simuliran pri stalnoj temperaturi.

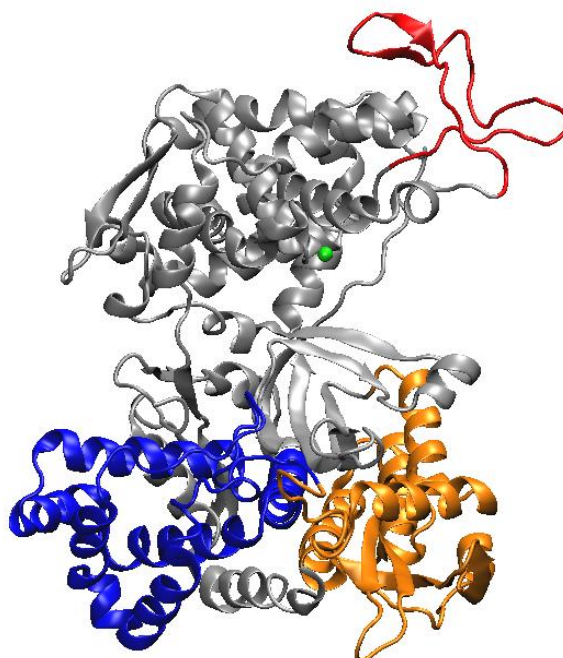


Slika 4.19. Rmsf proteinskog skeleta ljudske DPP III u kompleksu s Arg-Arg-AMC za vrijeme posljednje dvije ns MD simulacija.

Prema profilu $\Delta rmsf$ (slika 4.20) slabije je fleksibilan dio donje domene građen uglavnom od α -zavojnica (ostaci 33-163), dok je fleksibilniji dio donje domene (ostaci 164-305) kod zagrijavanog sustava u odnosu na sustav simuliran pri stalnoj temperaturi. Najfleksibilniji dio proteina u oba sustava građen je od zavoja i petlji (ostaci 460-491), a pripada gornjoj domeni (slika 4.21).



Slika 4.20. Profil $\Delta rmsf$ proteinskog skeleta ljudske DPP III u kompleksu s Arg-Arg-AMC za posljednje dvije ns MD simulacije.



Slika 4.21. Fleksibilnost proteinskog skeleta prikazana na početnoj strukturi ljudske DPP III u kompleksu s Arg-Arg-AMC. Dijelovi donje domene, ostaci 33-163 (plavo) i ostaci 164-305 (narančasto) te gornje domene, ostaci 460-491 (crveno). Položaj iona cinka prikazan je zelenom kuglicom.

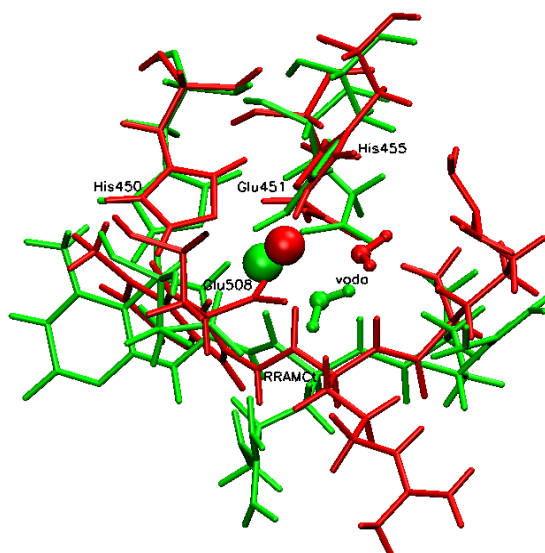
Unatoč promjenama u tercijarnoj strukturi, sekundarna struktura proteina nije se značajno mijenjala tijekom MD simulacije oba promatrana sustava (tablica 4.6). Primjećen je izostanak antiparalelne β -ploče u sastavu petlje gornje domene (ostaci 476-478 i 482-484) kod strukture u posljednjoj ns simulacije u oba sustava kao i pojava paralelne β -ploče (ostaci 489-491 i 461-463) u sastavu iste petlje kod sustava simuliranog uz promjenu temperature.

Tablica 4.6. Elementi sekundarne strukture proteina ljudske DPP III u kompleksu s Arg-Arg-AMC tijekom MD simulacija izračunati korištenjem poslužitelja "2Struc: the secondary structure server"¹⁷³.

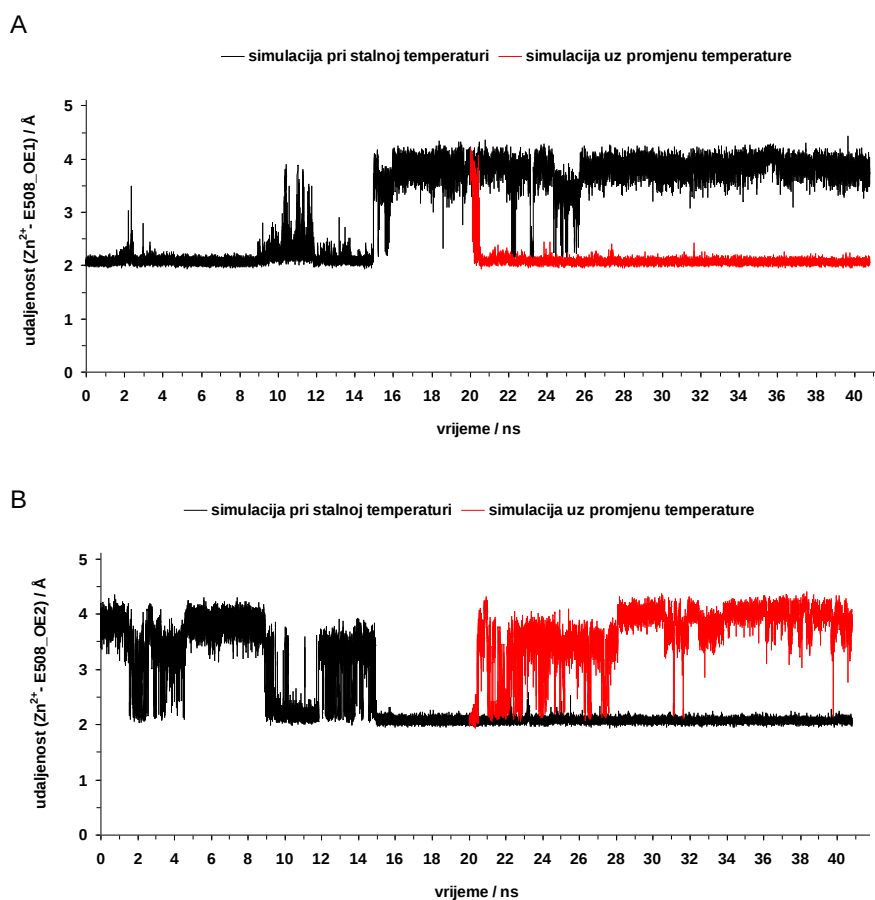
STRUKTURA	Elementi sekundarne strukture proteina		
	Zavojnica (%)	β -ploča (%)	Ostalo (%)
Početna za MD simulaciju	45,6	13,0	41,4
Nakon 20. ns	43,4	11,9	44,7
Nakon 40,8. ns	43,4	11,8	44,8
Nakon zagrijavanja pri 500 K	40,4	9,5	50,1
U 20. ns nakon zagrijavanja	40,2	11,3	48,5

4.4.2. Koordinacija iona cinka

Tijekom simulacija katalitički ion cinka je heksa-koordiniran ostacima His450, His455, Glu451, Glu508 te karbonilnim kisikom druge peptidne veze od N-kraja supstrata i molekulom vode (slika 4.22). Osim Glu508, ostale koordinacijske veze sa cinkom stabilizirale su se tijekom prve ns i ostale očuvane tijekom simulacija. Prvih 15 ns simulacije pri stalnoj temperaturi cink je uglavnom monodentatno koordiniran karbonilnim kisikom OE1 Glu508, dok se bidentatna koordinacija povremeno javlja tijekom 2.-5. i 9.-15. ns. Stabilizacija Glu508 javlja se nakon 15. ns uspostavom monodentantne koordinacije iona cinka putem kisika OE2. Zagrijavanjem sustava i daljnjom simulacijom atom glutamata OE2 napušta koordinacijsku sferu cinka te ga zamjenjuje atom OE1 koji tu ostaje do kraja simulacije (slika 4.23AiB). Ostatak Glu451 tijekom cijelog razdoblja simulacije koordinira ion cinka monodentatno atomom kisika OE1 dok oba histidina koordinacijsku vezu ostvaruju preko Nε dušika imidazolinskog prstena. Čitavom dužinom simulacije ion cinka koordiniran je s jednom molekulom vode, dok je na udaljenosti 5,0 Å od iona cinka tijekom simulacije pri stalnoj temperaturi kao i uz promjenu temperature broj voda u prosjeku 19 odnosno 16 molekula.



Slika 4.22. Koordinacija iona cinka ljudske DPP III u kompleksu s Arg-Arg-AMC nakon 40,8 ns MD simulacija pri stalnoj temperaturi (zeleno) i uz promjenu temperature (crveno). Ion cinka prikazan je kuglicom, supstrat (RRAMC) i aminokiselinski ostaci modelom štapića.



Slika 4.23. Udaljenost (A) OE1 i (B) OE2 atoma kisika karboksilne skupine Glu508 od iona cinka tijekom 40,8 ns MD simulacija ljudske DPP III u kompleksu s Arg-Arg-AMC.

4.4.3. Interakcije Arg-Arg-AMC s ljudskom DPP III

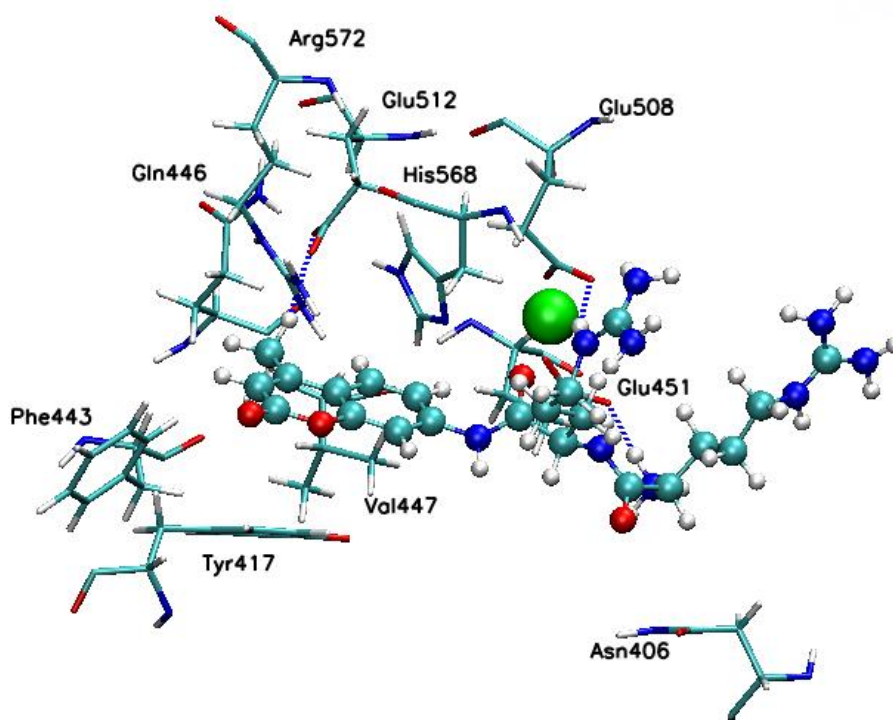
Proučavanja interakcija supstrata Arg-Arg-AMC u području aktivnog mjesta enzima izvršeno je na optimiziranim strukturama dobivenim nakon 40,8 ns MD simulacije. U strukturi dobivenoj simulacijom pri stalnoj temperaturi N-kraj supstrata ostvaruje vodikovu vezu s karboksilnim atomom kisika OE2 glutamata 451 te elektrostatsku interakciju s karbonilnim kisikom Asn406 (tablica 4.7 i slika 4.24). Izostanak interakcija javlja se u položaju P2 dok je u položaju P1 vodikovom vezom gvanidino skupina arginina vezana na kisik OE1 glutamata 508. Najveći broj interakcija supstrata ostvaren je u položaju P1' u kojem je kumarinska jezgra okružena uglavnom hidrofobnim i neutralnim aminokiselinama uz stvaranje većeg broja van der Waalsova privlačnih sila. Veći broj interakcija javlja se u strukturi simuliranoj uz promjenu temperature (tablica 4.8 i slika 4.25) ostvarivanjem uglavnom van der Waalsovih privlačnih sila ostataka Phe404 i His455 te vodikove veze Asp372, i elektrostatske interakcije Glu507 s gvanidino skupinom arginina u položaju P2, dok je kumarinska jezgra vezana putem van der Waalsovih privlačnih sila i elektrostatskih interakcija s bočnim lancima Leu413, Tyr417, Phe443, Val447, Glu512, His568 i Arg572.

Tablica 4.7. Interakcije Arg-Arg-AMC s ljudskom DPP III nakon 40,8 ns MD simulacija pri stalnoj temperaturi.

P2		P1		P1'	
⁺ H ₃ N-		-Arg-		-AMC	
S2		S1		S1'	
Asn406	ele (BL)	Glu508	H (BL)	Phe443	vdw (BL)
Glu451	H (BL)			Tyr417	ele, vdw (BL)
				Gln446	vdw (BL)
				Val447	vdw (BL)
				Glu512	H, ele (BL)
				His568	CH- π (BL)
				Arg572	ele (BL)

ele – elektrostatske interakcije, H-vodikova veza, vdw- van der Waalsova privlačna sila,

(BL) - interakcija s bočnim lancem.

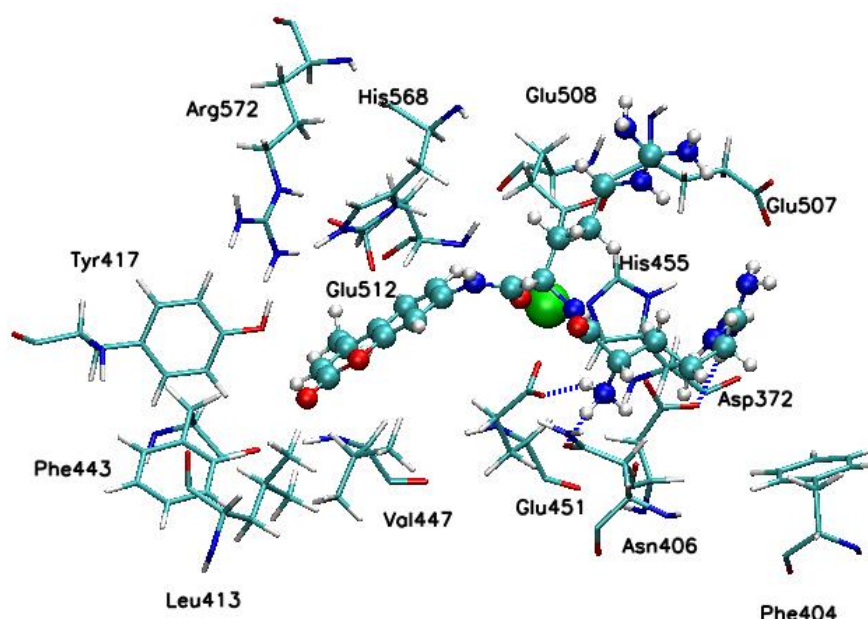


Slika 4.24. Položaj i interakcije Arg-Arg-AMC s ljudskom DPP III nakon 40,8 ns MD simulacije pri stalnoj temperaturi. Molekula supstrata prikazana je modelom kuglica i štapića, a aminokiselinski ostaci proteina modelom štapića. Ion cinka predstavljen je zelenom kuglicom, a vodikove veze plavom isprekidanom linijom.

Tablica 4.8. Interakcije Arg-Arg-AMC s ljudskom DPP III nakon 40,8 ns MD simulacija uz promjenu temperature.

		P2		P1		P1'	
⁺ H ₃ N-		-Arg-		-Arg-		-AMC	
		S2		S1		S1'	
Asn406	H (BL)	Asp372	H (BL)	Glu508	ele (BL)	Leu413	ele, vdw (BL)
Asp372	ele (O)	Phe404	vdw (BL)			Tyr417	ele (BL)
Glu451	H (BL)	His455	vdw (O)			Phe443	ele, vdw (BL)
		Glu507	ele (BL)			Val447	ele, vdw (BL)
						Glu512	ele (BL)
						His568	vdw (BL)
						Arg572	ele, vdw (BL)

ele – elektrostatske interakcije, H-vodikova veza, vdw- van der Waalsova privlačna sila, (O) - interakcija s okosnicom proteina, (BL) - interakcija s bočnim lancem.



Slika 4.25. Položaj i interakcije Arg-Arg-AMC s ljudskom DPP III nakon 40,8 ns MD simulacija uz promjenu temperature. Molekula supstrata prikazana je modelom kuglica i štapića, a aminokiselinski ostaci proteina modelom štapića. Ion cinka predstavljen je zelenom kuglicom, a vodikove veze plavom isprekidanom linijom.

Slobodna energija vezanja računata je MM-PPSA metodom na intervalima od po 2 ns (tablica 4.9). Vrijednost energije tijekom simulacije postepeno se smanjuje i najniža je u završnoj fazi simulacije oba promatrana sustava. Energija izračunata u posljednjem vremenskom intervalu (38.- 40. ns) približno je 10 kcal mol⁻¹ niža u sustavu simuliranom uz zagrijavanje, što je u skladu s opaženim većim brojem protein-ligand interakcija u konačnoj strukturi kompleksa u tom sustavu (tablica 4.8).

Tablica 4.9. Slobodna energija vezanja izračunata MM-PBSA metodom za trajektorije generirane tijekom MD simulacija ljudske DPP III u kompleksu s Arg-Arg-AMC u intervalima od po 2 ns.

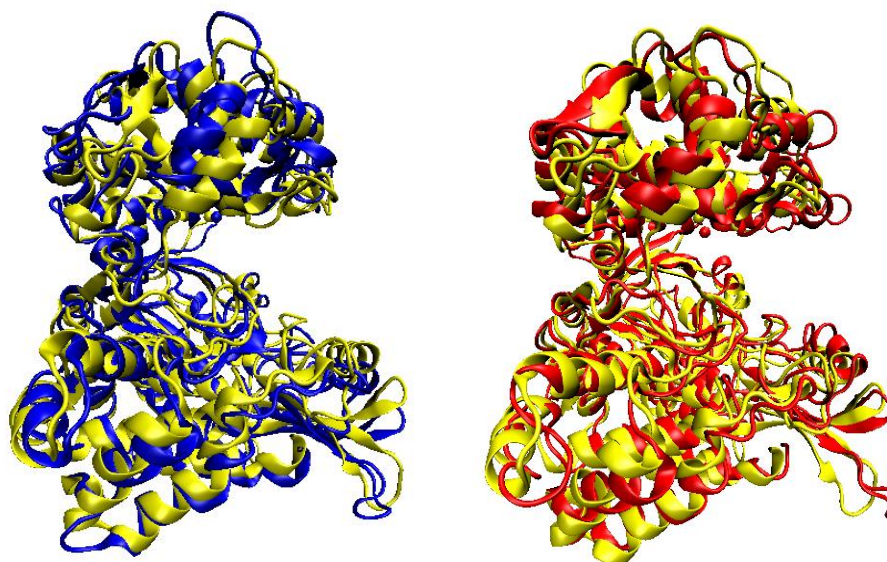
Trajektorija	$G_{\text{MM-PBSA}} / \text{kcal mol}^{-1}$
7-9 ns*	-36,71 ± 4,60
14-16 ns*	- 33,83 ± 5,29
19-21 ns*	- 35,87 ± 5,80
38-40 ns*	- 40,23 ± 4,34
38-40 ns**	- 50,52 ± 5,13

* Simulacija pri stalnoj temperaturi sustava. **Simulacija uz promjenu temperature sustava.

4.5. Molekulsko dinamičke simulacije ljudske DPP III u kompleksu sa spojem 1'

4.5.1. Promjene u strukturi proteina tijekom MD simulacija

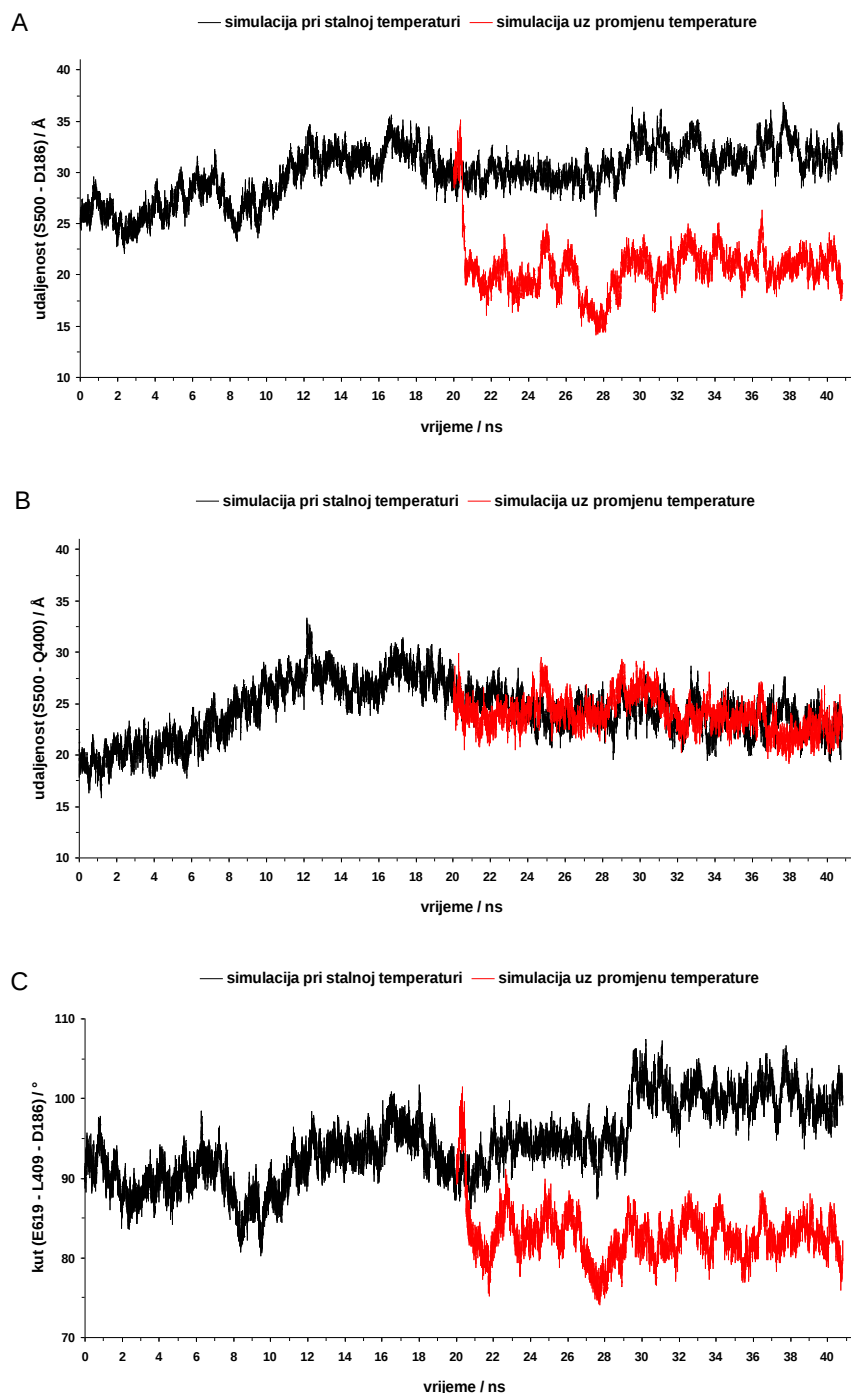
Za pripremu kompleksa i molekulsko dinamičke simulacije korištena je struktura slobodnog enzima prethodno simulirana 30 ns pri stalnoj temperaturi od 300 K. Uspoređujući početnu strukturu sa strukturom dobivenom simulacijom uz stalnu temperaturu primjećeno je međusobno udaljavanje domena, dok je kod simulacija sa zagrijavanjem došlo do njihovog približavanja (slika 4.26).



Slika 4.26. Promjene u terciarnoj strukturi proteina ljudske DPP III u kompleksu sa spojem 1' nakon 40,8 ns MD simulacija u odnosu na početnu strukturu. Preklopljena početna struktura (žuto) sa strukturom dobivenom MD simulacijom pri stalnoj temperaturi (plavo) i uz promjenu temperature (crveno).

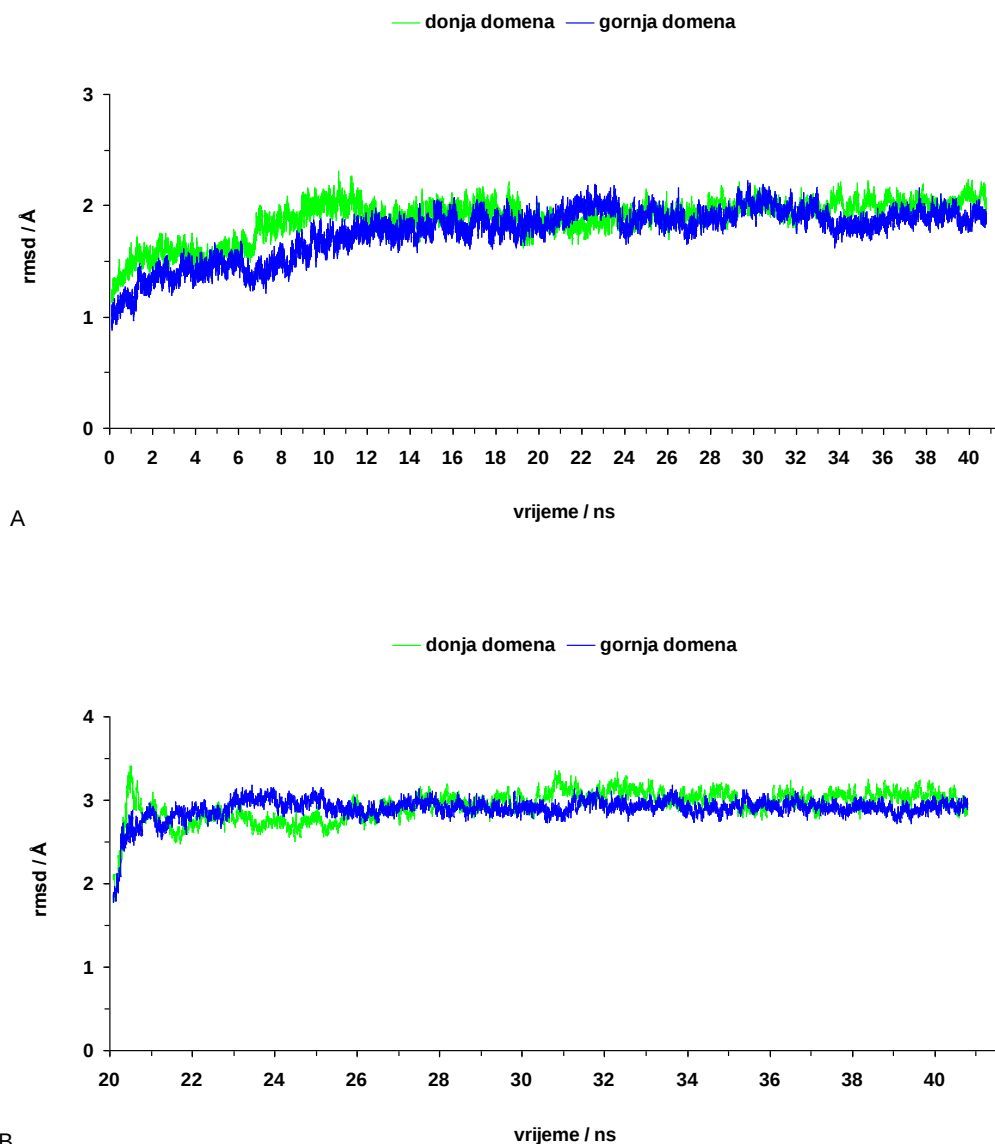
Detaljnije proučavanje pomicanja domena tijekom MD simulacija praćeno je promjenom udaljenosti kao i kuta između izabranih aminokiselinskih ostataka kako je to opisano u poglavlju 4.4.1. Tijekom simulacije pri stalnoj temperaturi (slika 4.27A) vidljivo je povećanje udaljenosti Ser500-Asp186 za ~ 6 Å u odnosu na udaljenost u 1. ns, dok tijekom zagrijavanja sustava dolazi do smanjenja udaljenosti za ~ 8 Å. Udaljenosti Ser500-Gln400 značajno se povećava (~ 10 Å) tijekom početnih 18 ns MD simulacije (slika 4.27B), a potom se smanjuje u oba promatrana sustava te je u posljednoj ns simulacije ta udaljenost ~ 4 Å veća

u odnosu na početnu udaljenost. Kut koji čine Asp186-Leu409-Glu619 tijekom simulacije pri stalnoj temperaturi povećao se za $\sim 8^\circ$, no tijekom zagrijavanja sustava došlo je do znatnog smanjenja kuta (slika 4.27C).



Slika 4.27. Promjene u strukturi proteina ljudske DPP III u kompleksu sa spojem 1' tijekom MD simulacija prikazane kao promjene u udaljenostima alfa ugljikovih atoma i kutu između aminokiselinskih ostataka. Udaljenost (A) Ser500-Asp186, (B) Ser500-Gln400 te kut (C) Asp186-Leu409-Glu619.

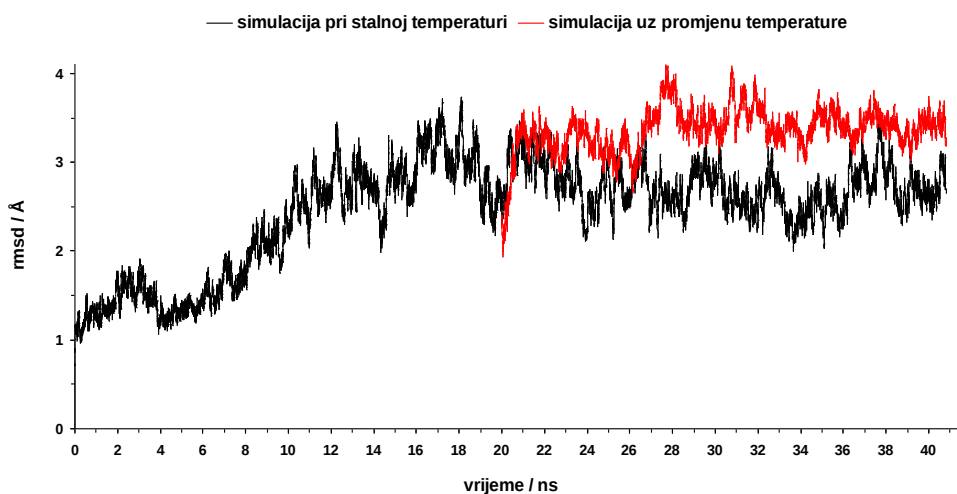
Udaljavanje odnosno približavanje domena pri navedenim MD simulacijama nije uzrokovalo značajnije promjene prostornog oblika donje (ostaci 4-335, 374-416 i 670-726) odnosno gornje domene proteina (ostaci 336-373 i 417-669) (slika 4.28AiB).



Slika 4.28. Promjena oblika proteinskog skeleta donje i gornje domene ljudske DPP III u kompleksu sa spojem 1' tijekom MD simulacija (A) pri stalnoj temperaturi i (B) nakon zagrijavanja.

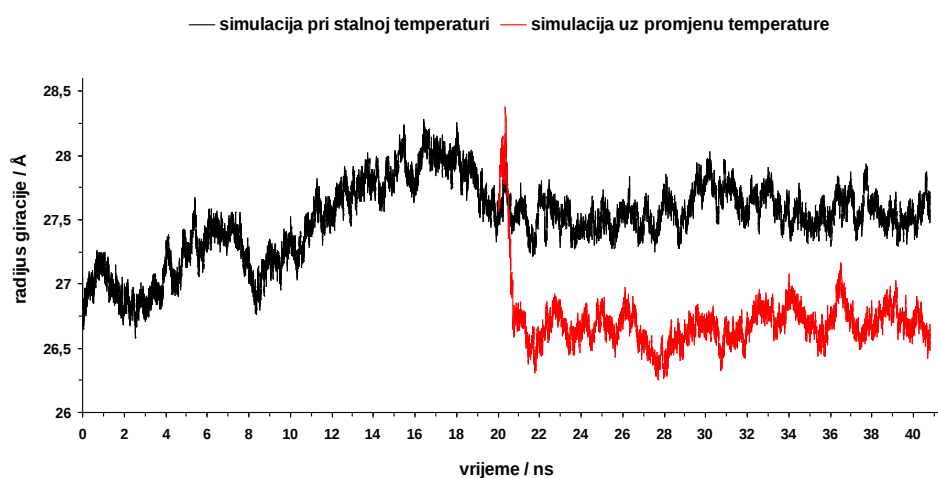
Promjena oblika proteinskog skeleta značajna je tijekom prvih 18 ns nakon čega dolazi do stabilizacije strukture proteina koja je izraženija kod simulacija na stalnoj temperaturi (slika 4.29). U prvih 18 ns pri stalnoj temperaturi srednji rmsd je $2,12 \pm 0,69$ Å, dok za

preostalo razdoblje iznosi $2,73 \pm 0,28 \text{ \AA}$ odnosno $3,36 \pm 0,25 \text{ \AA}$ pri simulaciji uz promjenu temperature.



Slika 4.29. Promjena oblika proteinskog skeleta ljudske DPP III u kompleksu sa spojem 1' tijekom MD simulacija.

Prema analizama radijusa giracije (slika 4.30 i tablica 4.10) globularnost proteina znatno se smanjuje tijekom simulacije pri stalnoj temperaturi sve do 18. ns, a kroz naredne tri ns uočava se njezin porast nakon čega do kraja simulacija više ne dolazi do bitnih promjena globularnosti. Tijekom zagrijavanja sustava dolazi do značajnog porasta globularnosti proteina nakon čega se do kraja simulacija vrlo malo mijenja.



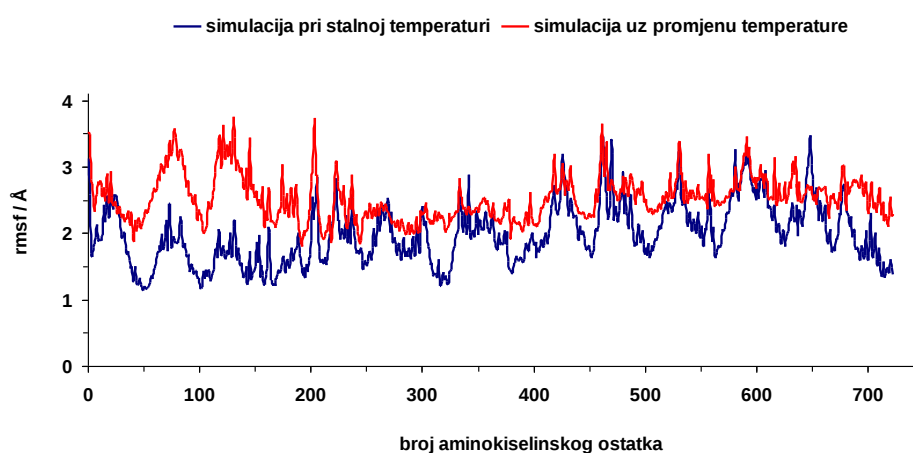
Slika 4.30. Radijus giracije proteina ljudske DPP III u kompleksu sa spojem 1' tijekom MD simulacija.

Tablica 4.10. Srednje vrijednosti radijusa giracije (RG) proteinskog skeleta tijekom MD simulacija ljudske DPP III u kompleksu sa spojem 1' i standardna devijacija (SD) izračunata za naznačeno razdoblje.

Trajektorija	$\langle RG \rangle \pm SD / \text{\AA}$
2. ns *	$26,96 \pm 0,13$
17. ns *	$28,00 \pm 0,12$
22. ns *	$27,47 \pm 0,13$
22. ns **	$26,68 \pm 0,12$
40. ns *	$27,58 \pm 0,10$
40. ns **	$26,67 \pm 0,09$

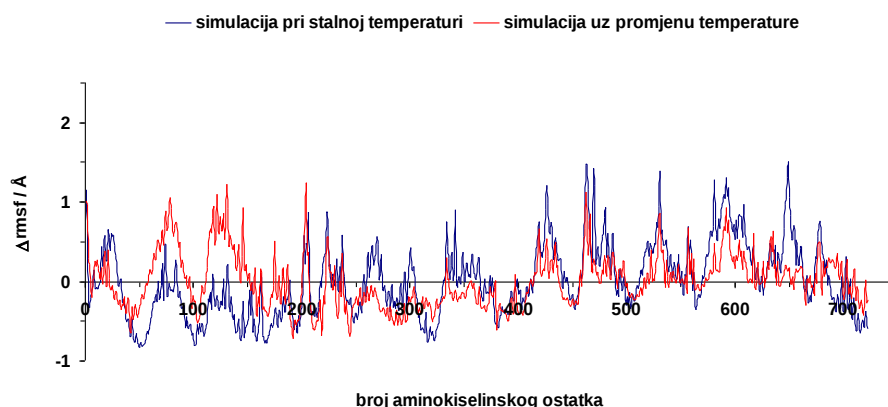
* Simulacija pri stalnoj temperaturi sustava. **Simulacija uz promjenu temperature sustava.

Uspoređujući profil rmsf za posljednje dvije ns simulacije (slika 4.31) vidljiva je veća apsolutna fleksibilnost proteinskog skeleta kod sustava simuliranog uz zagrijavanje.

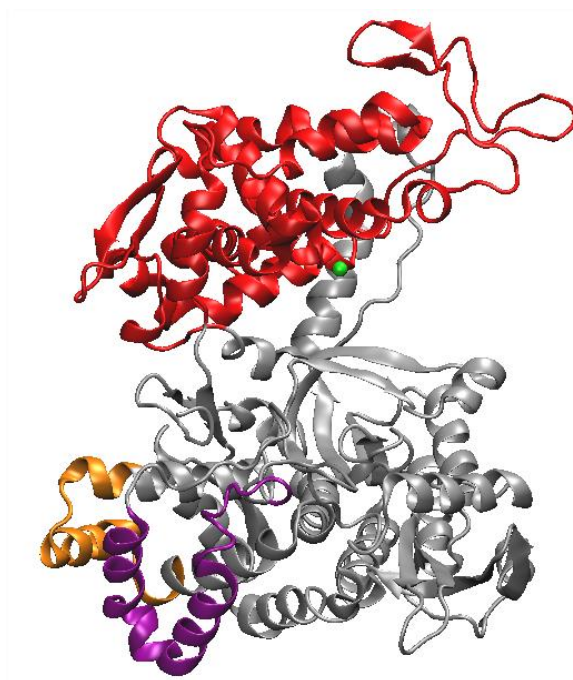


Slika 4.31. Rmsf proteinskog skeleta ljudske DPP III u kompleksu sa spojem 1' za posljednje dvije ns MD simulacije.

Prema profilu $\Delta rmsf$ (slika 4.32) vidljiva je povećana fleksibilnost velikog dijela gornje domene (ostaci 415-664) sastavljene većinom od α -zavojnica u oba promatrana sustava, dok se povećanje fleksibilnosti u odnosu na nezagrijavani sustav uočava kod dijelova donje domene (ostaci 65-88 i 117-155) (slika 4.33). U odnosu na zagrijavani sustav, slabije je fleksibilan dio (ostaci 45-180, 305-334 i 719-723) koji pripada donjoj domeni.



Slika 4.32. Profil $\Delta rmsf$ proteinskog skeleta ljudske DPP III u kompleksu sa spojem 1' za posljednje dvije ns MD simulacije.



Slika 4.33. Fleksibilnost proteinskog skeleta prikazana na početnoj strukturi ljudske DPP III u kompleksu sa spojem 1'. Dijelovi donje domene, ostaci 65-88 (narančasto) i ostaci 117-155 (ljubičasto) te gornje domene, ostaci 415-664 (crveno). Položaj iona cinka prikazan je zelenom kuglicom.

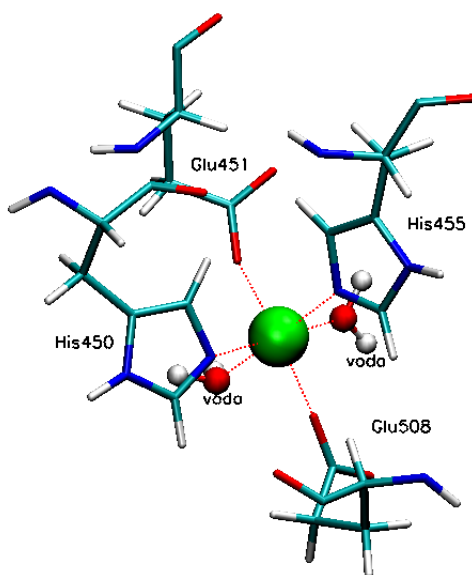
Prema analizama elemenata sekundarne strukture proteina (tablica 4.11) vidljive su promjene u sastavu zavojnica neposredno nakon zagrijavanja te u preostalom razdoblju simulacije oba sustava, dok se elementi β -ploče nisu bitno mijenjale.

Tablica 4.11. Elementi sekundarne strukture proteina ljudske DPP III u kompleksu sa spojem 1' tijekom MD simulacija izračunati korištenjem poslužitelja : "2Struc: the secondary structure server" (<http://2struc.cryst.bbk.ac.uk/>)¹⁷³.

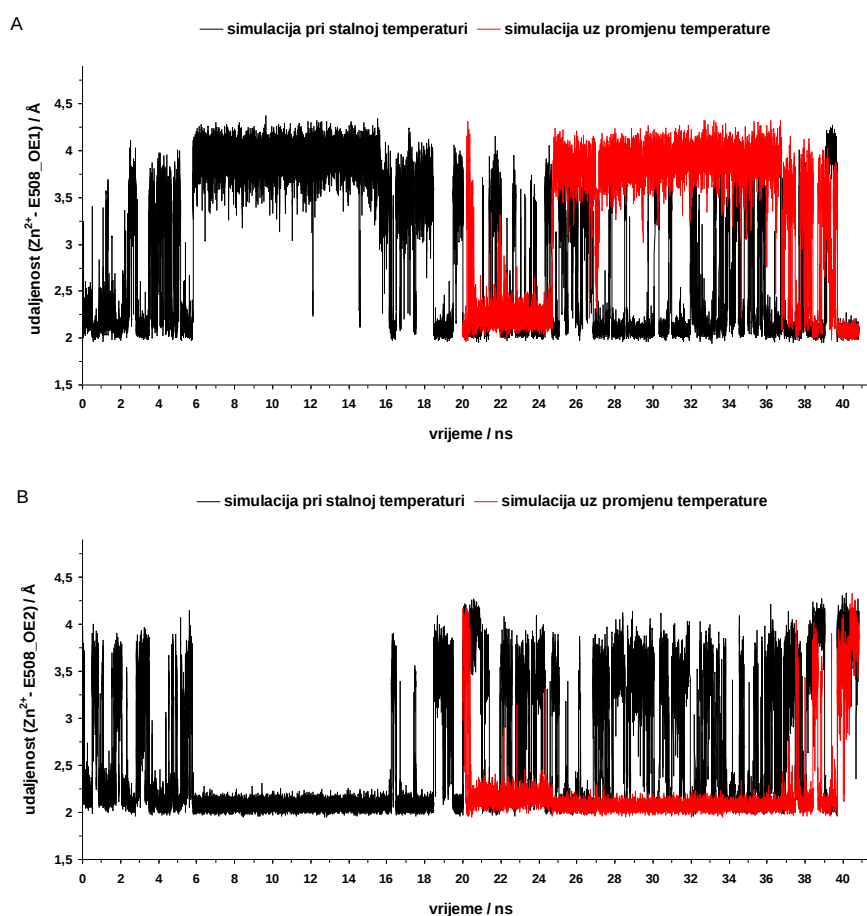
STRUKTURA	Elementi sekundarne strukture proteina		
	Zavojnica (%)	β -ploča (%)	Ostalo (%)
Početna za MD simulaciju	49,0	13,4	37,6
Nakon 20. ns	45,1	13,3	41,6
Nakon 40,8. ns	42,6	10,9	46,5
Nakon zagrijavanja pri 500 K	39,3	12,3	48,4
U 20. ns nakon zagrijavanja	41,4	13,0	45,6

4.5.2. Koordinacija iona cinka

Tijekom čitavog razdoblja simulacije cink je u oba sustava heksa-koordiniran s ostacima His450, His455, Glu451, Glu508 i dvije molekule vode (slika 4.34). Stabilizacija koordinacijske veze cinka postiže se već u 1. ns preko Ne atoma dušika imidazolinskog prstena oba histidina kao i kisikom molekula vode. Ostatak Glu451 koordinira ion cinka uglavnom monodentatno atomom kisika OE1 u oba sustava dok se bidentatna koordinacija javlja neposredno nakon zagrijavanja sustava i u tom stanju ostaje ~ 4 ns nakon čega atom kisika OE2 napušta koordinacijsku sferu cinka. Koordinacija iona cinka ostatkom Glu508 tijekom simulacije pri stalnoj temperaturi uglavnom je bidentatna u prvih 8 ns. nakon čega atom kisika OE1 napušta koordinacijsku sferu cinka koja je stabilno koordinirana atomom OE2 sve do 19. ns kada veza Glu508 s cinkom postaje bidentatna da bi pri kraju simulacije OE2 napustio koordinacijsku sferu cinka. Neposredno nakon zagrijavanja te narednih 5 ns simulacije cink je bidentatno koordiniran ostatkom Glu508 nakon čega atom kisika OE1 napušta koordinacijsku sferu te je koordinacija u preostalom razdoblju uglavnom monodentatna atomom OE2 (slika 4.35 AiB), pri kraju simulacija ponovo dolazi do izmjene atoma kisika karboksilne skupine Glu508 u koordinacijskoj sferi cinka. Katalitički ion cinka tijekom simulacije okružen je s ~ 10 molekula vode na udaljenosti do 5,0 Å od kojih se dvije nalaze na udaljenosti do 2,5 Å i popunjavaju oktaedarsku koordinaciju iona cinka.



Slika 4.34. Koordinacija iona cinka prikazana na strukturi ljudske DPP III u kompleksu sa spojem 1' dobivenoj nakon 40,8 ns MD simulacije uz promjenu temperature. Ion cinka prikazan je kuglicom, a koordinacijske veze crvenom isprekidanom linijom.



Slika 4.35. Udaljenost (A) OE1 i (B) OE2 atoma kisika karboksilne skupine Glu508 od iona cinka tijekom 40,8 ns MD simulacija ljudske DPP III u kompleksu sa spojem 1'.

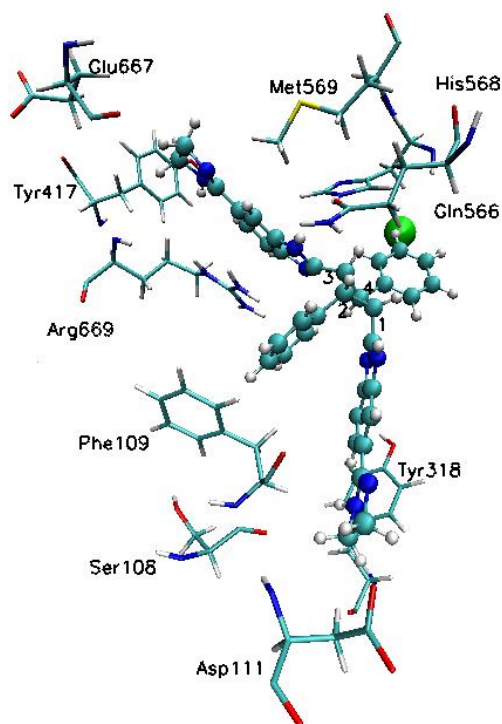
4.5.3. Interakcije spoja 1' s ljudskom DPP III

Analiza intermolekularnih protein - spoj 1' interakcija izvršena je u konačnim strukturama dobivenim MD simulacijama. U kompleksu simuliranom pri stalnoj temperaturi spoj 1' najviše interakcija ostvaruje sa svojim imidazolinskim skupinama i to s ostacima Ser108, Asp111, Tyr318, Tyr417, Met569 i Glu667. Benzimidazolne skupine međudjeluju s ostacima Tyr318, Gln566, His568, i Arg669 putem CH- π i elektrostatskih sila. Manje interakcija ostvaruje se putem fenilnih skupina i to uglavnom stvaranjem “face to edge” veze s Phe109 odnosno CH- π i elektrostatskim interakcijama s Arg 669 i Gln566 (tablica 4.11 i slika 4.36). U kompleksu simuliranom uz promjenu temperature fenilne skupine spoja 1' s ostacima Ile386, Pro387, Ala388, Phe556, Gln566 i Met569 interagiraju uglavnom van der Waalsovima i elektrostatskim silama (tablica 4.12 i slika 4.37). Uglavnom elektrostatskim interakcijama imidazolinske su skupine povezane ostacima Ser108, Gly110, Tyr318, Tyr417, Asn545 i Glu667 te vodikovom vezom s Ala416, dok benzimidazolne skupine ostvaruju veze s Tyr318 i Tyr417. Ciklobutanski prsten s His568 ostvaruje van der Waalsove i elektrostatske interakcije.

Tablica 4.11. Interakcije spoja 1' s ljudskom DPP III nakon MD simulacije duge 40,8 ns pri stalnoj temperaturi.

Aminokiselinski ostatak proteina	Vrsta interakcija
Ser108	ele (O)
Phe109	„face to edge“ (BL)
Asp111	ele (BL)
Tyr318	ele (O, BL), CH- π (BL)
Tyr417	vdw (BL)
Gln566	ele (BL)
His568	CH- π (BL), vdw (BL)
Met569	vdw (BL), ele (BL)
Glu667	ele (BL)
Arg669	CH- π (BL), ele (BL)

ele - elektrostatske interakcije, H-vodikova veza, vdw- van der Waalsova privlačna sila, (O) - interakcija s okosnicom proteina, (BL) - interakcija s bočnim lancem.

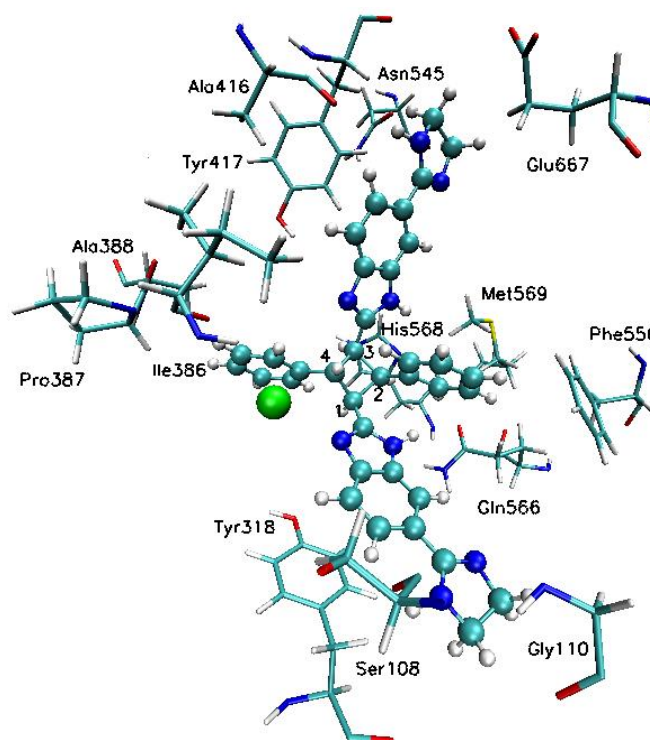


Slika 4.36. Položaj i interakcije spoja 1' u kompleksu s ljudskom DPP III nakon 40,8 ns MD simulacije pri stalnoj temperaturi. Spoj 1' prikazan je modelom kuglica i štapića, a aminokiselinski ostaci proteina modelom štapića. Ion cinka predstavljen je zelenom kuglicom, dok su položaji supstituenata ciklobutanskog prstena označeni brojevima 1- 4.

Tablica 4.12. Interakcije spoja 1' s ljudskom DPP III nakon MD simulacije duge 40,8 ns uz promjenu temperature.

Aminokiselinski ostatak proteina	Vrsta interakcija
Ser108	ele (O)
Gly110	ele (O)
Tyr318	ele (O, BL), vdw (BL) „stacking“ „face-face“
Ile386	H (O)
Pro387	vdw (O)
Ala388	vdw (BL)
Ala416	H (O)
Tyr417	ele CH- π , vdw (BL)
Asn545	ele (BL)
Phe556	vdw, CH- π (BL)
Gln566	ele (BL)
His568	ele, vdw (BL)
Met569	vdw (BL)
Glu667	ele (BL)

ele - elektrostatske interakcije, H-vodikova veza, vdw - van der Waalsova privlačna sila, (O) - interakcija s okosnicom proteina, (BL) - interakcija s bočnim lancem.



Slika 4.37. Položaj i interakcije spoja 1' u kompleksu s ljudskom DPP III nakon 40,8 ns MD simulacije uz promjenu temperature. Spoj 1' prikazan je modelom kuglica i štapića, a aminokiselinski ostaci proteina modelom štapića. Ion cinka predstavljen je zelenom kuglicom, dok su položaji supstituenata ciklobutanskog prstena označeni brojevima 1-4.

Slobodna energija vezanja računata MM-PBSA metodom se nije bitno mijenjala tijekom MD simulacija (tablica 4.13) i samo je neznatno niža za kompleks simuliran pri stalnoj temperaturi sustava.

Tablica 4.13. Slobodna energija vezanja izračunata MM-PBSA metodom za trajektorije u trajanju od po 2 ns generirane tijekom MD simulacija ljudske DPP III u kompleksu sa spojem 1'.

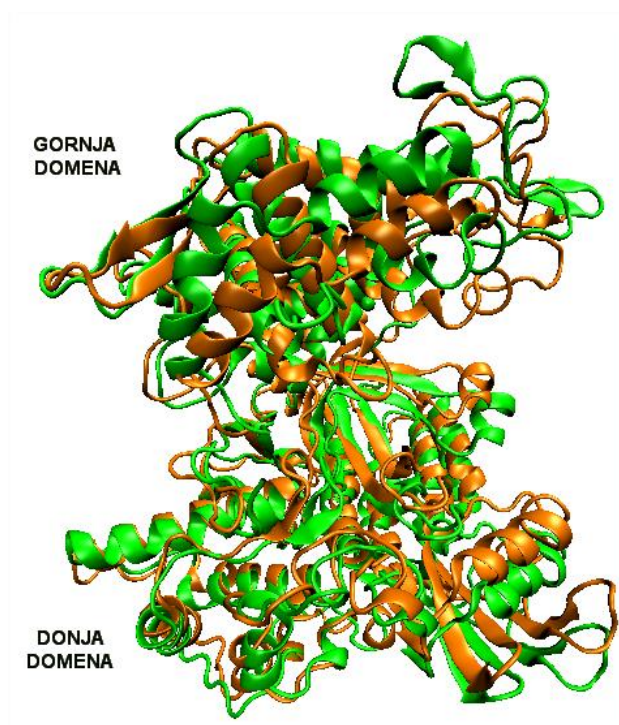
Trajektorija	$G_{\text{MM-PBSA}} / \text{kcal mol}^{-1}$
13-15 ns*	$-41,48 \pm 3,01$
19-21 ns*	$-41,70 \pm 3,72$
28-30 ns*	$-43,79 \pm 2,42$
28-30 ns **	$-43,03 \pm 3,77$
38-40 ns*	$-43,32 \pm 2,78$
38-40 ns**	$-42,07 \pm 2,77$

* Simulacija pri stalnoj temperaturi sustava. **Simulacija uz promjenu temperature sustava.

4.6. Molekulsko dinamičke simulacije kvaščeve DPP III

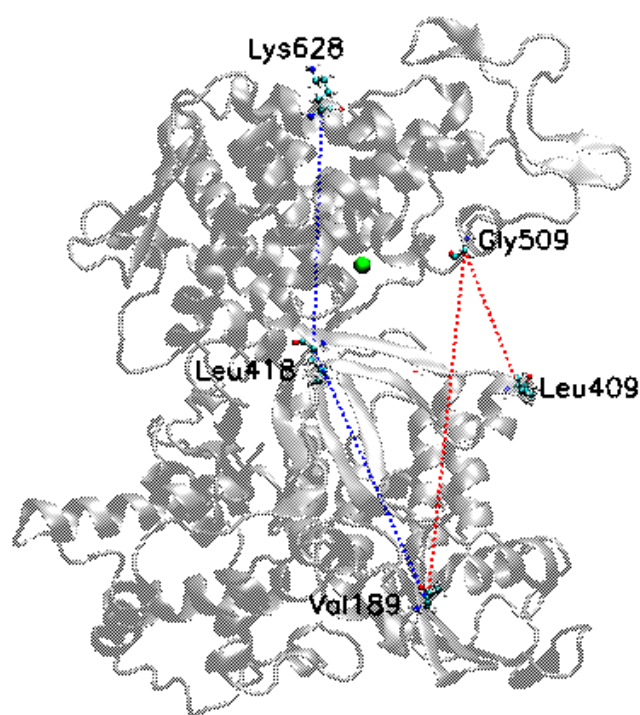
4.6.1. Promjene u strukturi proteina tijekom MD simulacija

Nakon pripreme i optimizacije proteina (kako je to opisano u Materijalima i metodama) provedena je produktivna MD simulacija u trajanju od 30 ns pri stalnoj temperaturi sustava. Uspoređujući početnu strukturu sa strukturom dobivenom nakon provedene simulacije vidljiv je pomak gornje i donje domene simuliranog proteina jedne prema drugoj (slika 4.38).



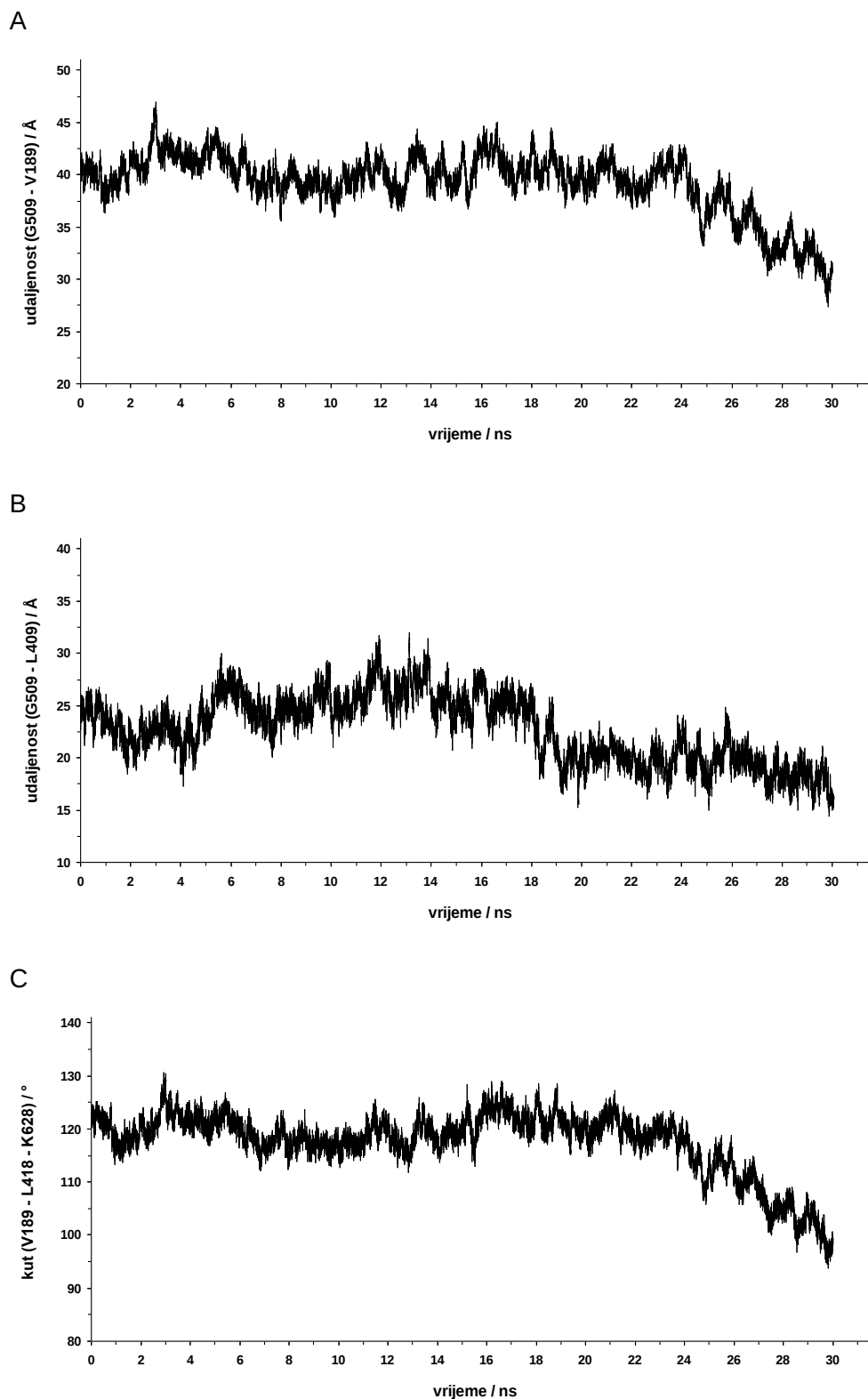
Slika 4.38. Promjene u terciarnoj strukturi kvaščeve DPP III nakon 30 ns MD simulacija na stalnoj temperaturi u odnosu na početnu strukturu. Početna struktura DPP III obojana je zeleno, a konačna narančasto.

Praćenje promjena u udaljenostima alfa ugljikovih atoma kao i kuta između aminokiselinskih ostataka (ekvivalentnim ljudskoj DPP III) koje pripadaju gornjoj i donjoj domeni proteina poslužilo je za detaljnije proučavanje pomicanja domena tijekom MD simulacije (slika 4.39).



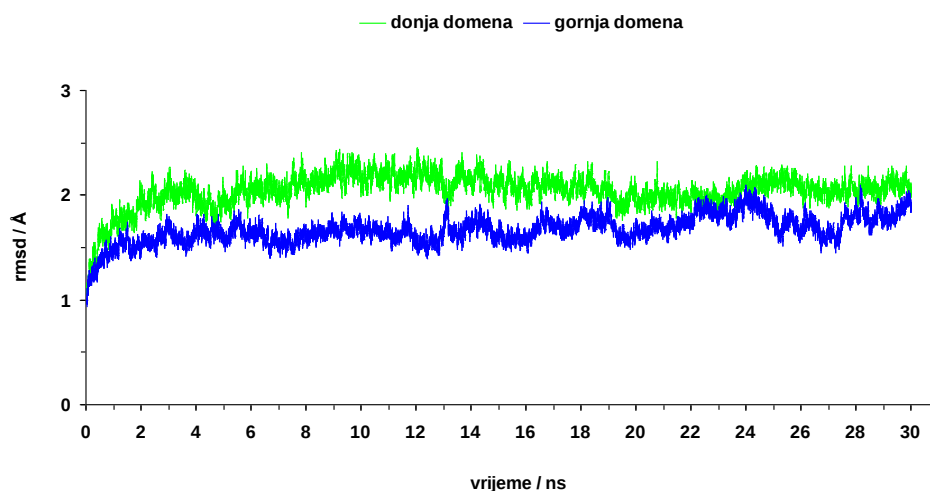
Slika 4.39. Položaj aminokiselinskih ostataka odabranih za praćenje pomicanja domena proteina kvaščeve DPP III tijekom MD simulacija. Kut što ga čine Ca atomi aminokiselinskih ostataka Val189-Leu418-Lys628 označen je plavom, a udaljenosti Gly509-Val189 i Gly509-Leu409 crvenom isprekidanom linijom. Navedeni aminokiselinski ostaci prikazani su na početnoj strukturi kvaščeve DPP III (sivo), a položaj iona cinka prikazan je zelenom sferom.

Iz grafičkog prikaza (slika 4.40A-C) vidljivo je kako se tijekom MD simulacije smanjuje udaljenosti između alfa ugljikovih atoma kao i kuta odabranih aminokiselina. Udaljenost Gly509-Val189 uglavnom se nije bitno mijenjala tijekom prvih 24 ns nakon čega se do kraja simulacije u odnosu na udaljenost u početnoj fazi smanjuje ~ 10 Å. Iako se u prvih 14 ns udaljenost Gly509-Leu409 uglavnom povećava, daljnjom simulacijom udaljenost se smanjuje te je u posljednjoj ns za ~ 10 Å manja od udaljenosti na početku simulacija. Kut što ga čine Val189-Leu418-Lys628 uglavnom se nije bitno mijenjao tijekom prvih 22 ns, a tek produljenom simulacijom dolazi do smanjena kuta za $\sim 22^\circ$.



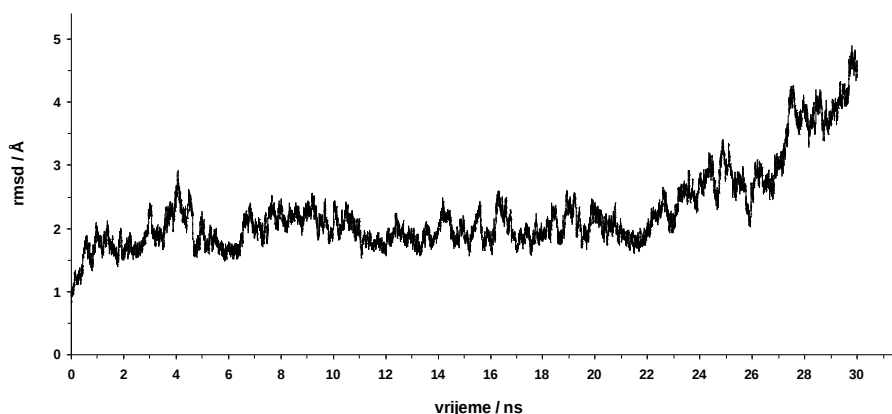
Slika 4.40. Promjene u strukturi proteina kvaščeve DPP III tijekom MD simulacija prikazane kao promjene udaljenosti alfa ugljikovih atoma i kuta između aminokiselinskih ostataka. Udaljenost (A) Gly509-Val189, (B) Gly509-Leu409 te kut (C) kojeg čine Val189-Leu418-Lys628.

Tijekom MD simulacije prostorni oblik donje (ostaci 2-343, 385-414 i 677-711) i gornje domene (ostaci 344-384 i 415-676) nije se bitno mijenjao (slika 4.41).



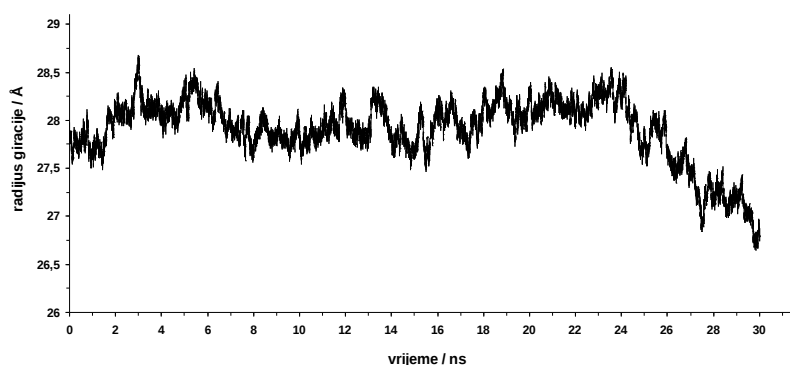
Slika 4.41. Promjena oblika proteinskog skeleta donje i gornje domene kvaščeve DPP III tijekom MD simulacija.

Struktura proteina stabilizira se već nakon 1. ns MD simulacija uz srednji rmsd za prve 22 ns od $1,94 \pm 0,25$, nakon čega protein mijenja svoj oblik i za zadnjih 8 ns rmsd iznosi $3,08 \pm 0,67$ Å (slika 4.42)



Slika 4.42. Promjena oblika proteinskog skeleta kvaščeve DPP III tijekom 30 ns MD simulacija.

Globularnost proteina je uz manje oscilacije očuvana sve do 24. ns. Posljednjih 6 ns kompaktnost proteina značajno se povećava (slika 4.43 i tablica 4.14) .

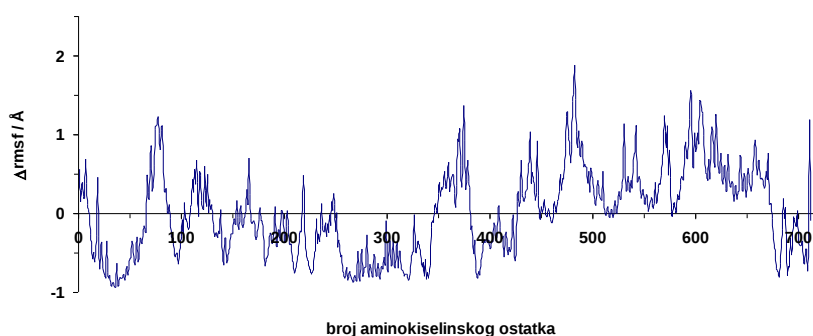


Slika 4.43. Radijus giracije proteinskog skeleta kvaščeve DPP III tijekom MD simulacija.

Tablica 4.14. Srednje vrijednosti i standardne devijacije (SD) radijusa giracije (RG) proteinskog skeleta kvaščeve DPP III izračunate na trajektorijama generiranim tijekom MD simulacije.

Trajektorija	$\langle \text{RG} \rangle \pm \text{SD} / \text{Å}$
2. ns	$27,84 \pm 0,18$
24. ns	$28,29 \pm 0,10$
40. ns	$27,02 \pm 0,10$

Analizom fluktuacije aminokiselinskih ostataka tijekom posljednje dvije ns simulacije uočava se da je relativna fleksibilnost gornje domene (ostaci 352-381 i 429-673) bitno veća od fleksibilnosti donje domene (slika 4.44).



Slika 4.44. Profil Δrmsf proteinskog skeleta kvaščeve DPP III za posljednje dvije ns MD simulacija.

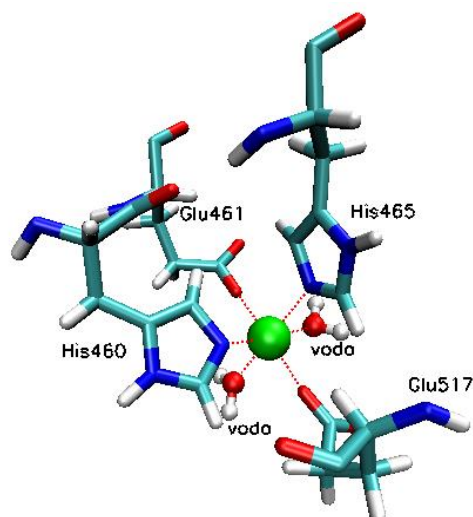
Iako je tijekom simuliranog razdoblja došlo do promjena u terciarnoj strukturi, sekundarna struktura proteina nije se značajno mijenjala (tablica 4.15).

Tablica 4.15. Elementi sekundarne strukture kvaščeve DPP III tijekom MD simulacija izračunati korištenjem poslužitelja "2Struc: the secondary structure server" (<http://2struc.cryst.bbk.ac.uk/>)¹⁷³

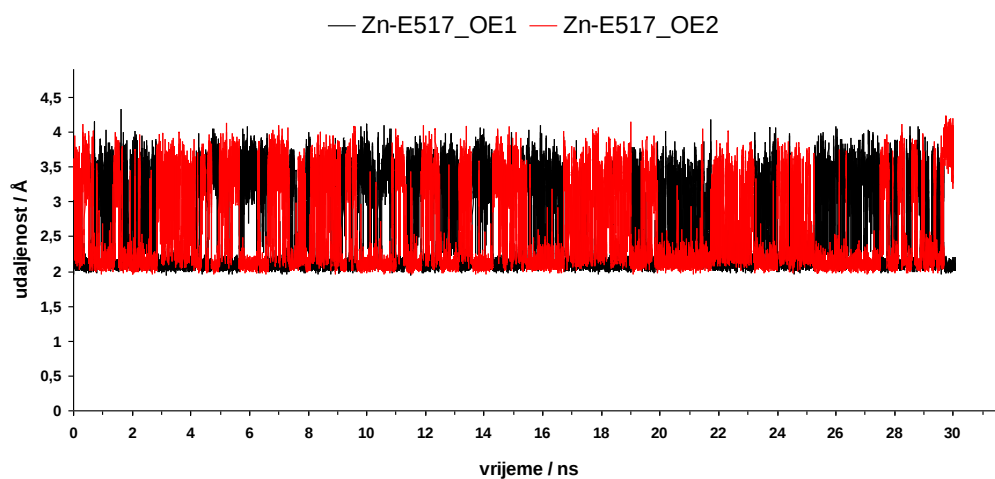
STRUKTURA	Elementi sekundarne strukture proteina		
	Zavojnica (%)	β -ploča (%)	Ostalo (%)
Početna za MD simulaciju	42,3	12,8	44,9
Nakon 20. ns	41,0	12,1	46,9
Nakon 30. ns	41,0	11,0	48,0

4.6.2. Koordinacija iona cinka

Cink je tijekom simulacije koordiniran ostacima His465, His460, Glu461, Glu517 i s dvije molekule vode (slika 4.45). Osim Glu517, ostale koordinacijske veze sa cinkom stabilizirale su se tijekom prve ns i ostale očuvane do kraja simulacije. Ostatak Glu461 koordinira cinka monodentatno atomom kisika OE2, dok oba histidina koordinacijsku vezu ostvaruju preko Ne atoma dušika imidazolinskog prstena. Iako prevladava bidentatno vezanje karboksilne skupine Glu517, putem atoma kisika OE1 i OE2, koordinacija iona cinka s ovim ostatkom uglavnom se nije stabilizirala tijekom simulacije (slika 4.46). Osim dvije molekule vode koje se nalaze u koordinacijskoj sferi cinka, još je 8 molekula vode koje okružuju cink na udaljenosti do 5,0 Å tijekom čitavog razdoblja MD simulacije.



Slika 4.45. Koordinacija iona cinka prikazana na strukturi kvaščeve DPP III dobivenoj nakon 30 ns MD simulacija. Ion cinka prikazan je zelenom kuglicom, a koordinacijske veze crvenom isprekidanom linijom.



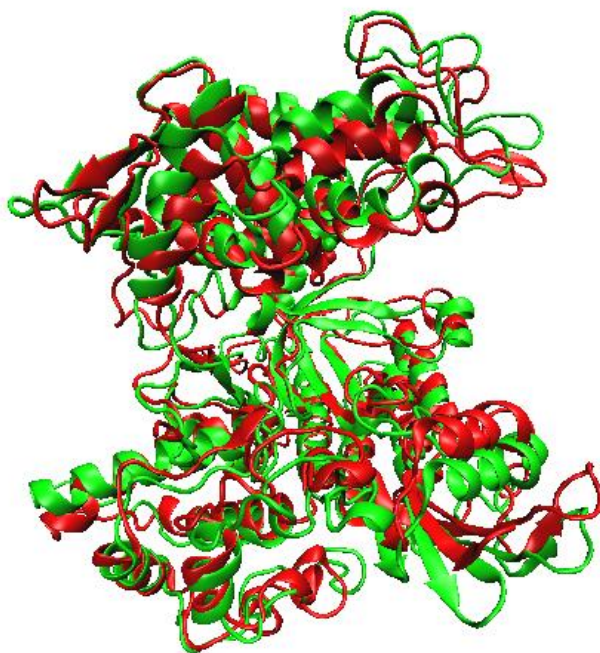
Slika 4.46. Udaljenost OE1 i OE2 atoma kisika karboksilne skupine Glu517 od iona cinka tijekom 30 ns MD simulacija kvaščeve DPP III.

4.7. Molekulske dinamičke simulacije kvaščeve DPP III u kompleksu sa spojem 1'

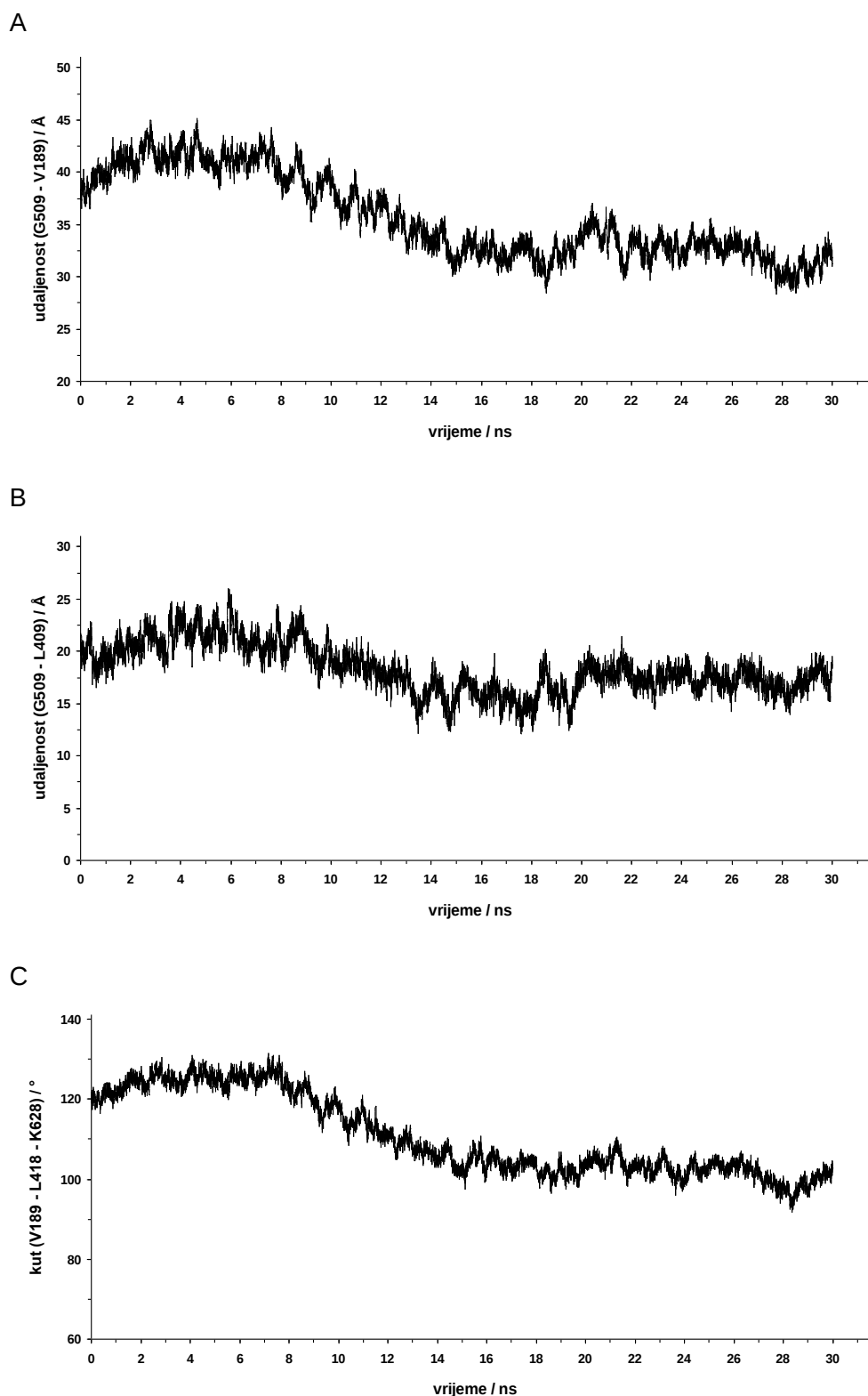
4.7.1. Promjene u strukturi proteina tijekom MD simulacija

Za potrebe molekulske dinamičke simulacije pripremljeni kompleks je optimiziran i simuliran 30 ns pri stalnoj temperaturi od 300K. Usporedbom konačne strukture kompleksa s početnom uočava se međusobno približavanje dviju domena (slika 4.47).

Početkom simulacije (1.- 4. ns) dolazi do udaljavanja Gly509 i Val189 (slika 4.48A), no daljnjom simulacijom ta se udaljenost smanjuje te je u 30. ns za ~ 7 Å manja u odnosu na udaljenost u 1. ns. Udaljenost Gly509-Leu409 također se u početnoj fazi MD simulacija povećava, a zatim do 13. ns smanjuje, nakon čega uglavnom ostaje nepromijenjena (slika 4.48B). Manje povećanje kuta koga čine Val189-Leu418-Lys628 javlja se tijekom prvih 7 ns, a daljnjom simulacijom kut se smanjuje te je u posljednjoj ns za $\sim 19^\circ$ manji u odnosu na početni (slika 4.48C).

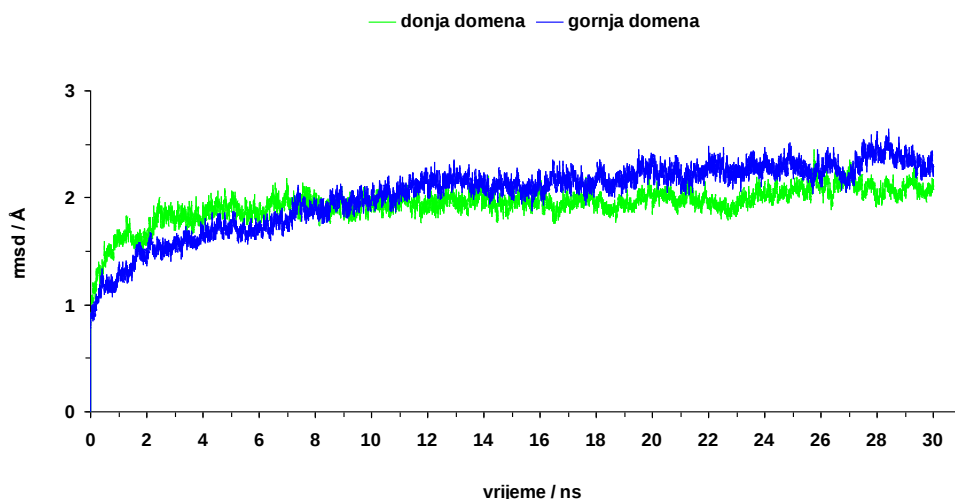


Slika 4.47. Promjene u terciarnoj strukturi kvaščeve DPP III u kompleksu sa spojem 1' nakon 30 ns MD simulacija u odnosu na početnu strukturu. Preklopljena početna struktura (zeleno) sa strukturom dobivenom MD simulacijom pri stalnoj temperaturi od 300 K (crveno).



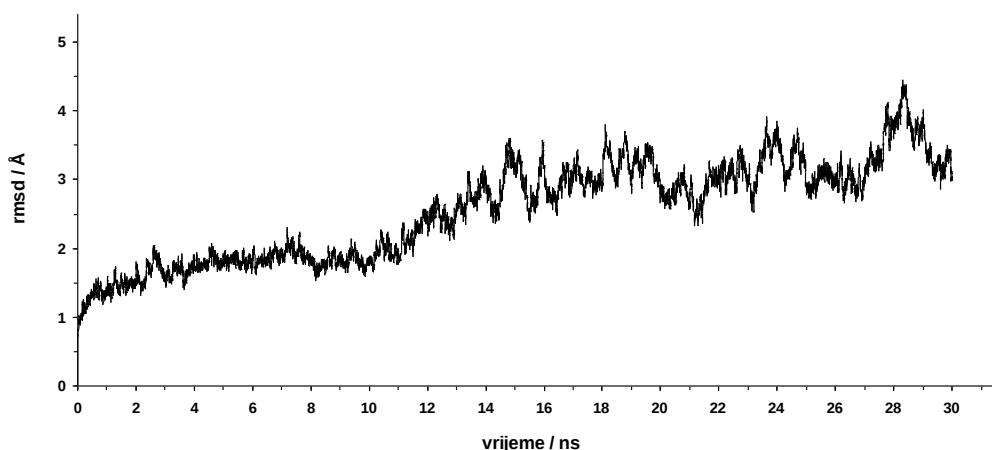
Slika 4.48. Promjene u strukturi proteina kvaščeve DPP III u kompleksu sa spojem 1' tijekom MD simulacija prikazane kao promjene u udaljenostima alfa ugljikovih atoma i kutu između aminokiselinjskih ostataka. Udaljenost (A) Gly509-Val189, (B) Gly509-Leu409 te kut (C) kojeg čine Val189-Leu418-Lys628.

Približavanje domena tijekom simulacije uglavnom nije uzrokovalo značajnije promjene prostornog oblika donje (ostaci 2-343, 385-414 i 677-711) i gornje domene (ostaci 344-384 i 415-676) proteina (slika 4.49).



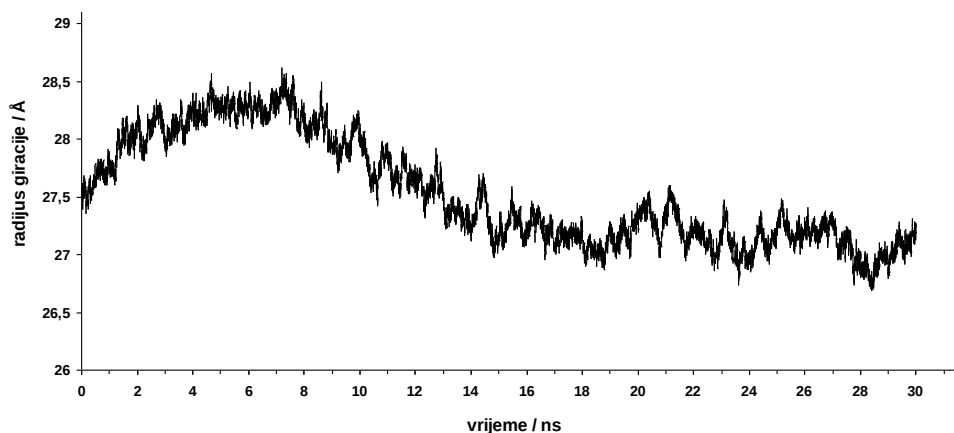
Slika 4.49. Promjena oblika proteinskog skeleta donje i gornje domene kvaščeve DPP III u kompleksu sa spojem 1' tijekom MD simulacija pri stalnoj temperaturi.

Promjene proteinskog oblika tijekom simulacije odražavaju se na rmsd (slika 4.50), tako srednji rmsd proteinskog skeleta za prvih 10 ns iznosi $1,70 \pm 0,23$ Å, a za posljednjih 20 ns simulacije $2,97 \pm 0,47$ Å.



Slika 4.50. Promjene oblika proteinskog skeleta kvaščeve DPP III u kompleksu sa spojem 1' tijekom MD simulacija.

Profil radijusa giracije tijekom simulacija ukazuje na smanjenje globularnosti proteina tijekom prvih 8 ns, nakon čega uglavnom raste (slika 4.51 i tablica 4.16).

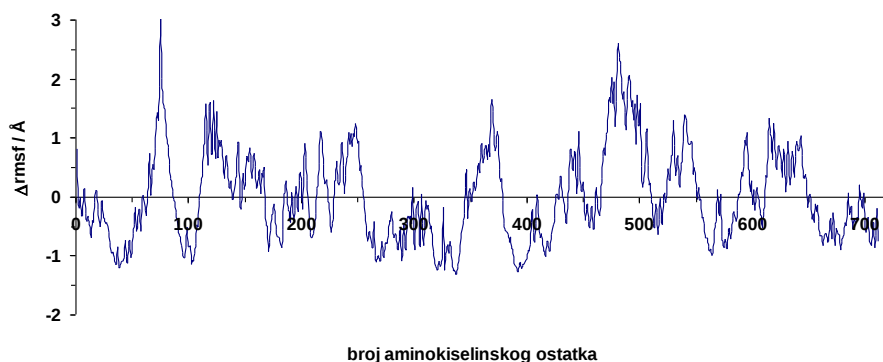


Slika 4.51. Radijus giracije proteina kvaščeve DPP III u kompleksu sa spojem 1' tijekom MD simulacija.

Tablica 4.16. Srednje i standardne devijacije (SD) radijusa giracije (RG) proteinskog skeleta kvaščeve DPP III izračunate na trajektorijama generiranim tijekom MD simulacije kvaščeve DPP III u kompleksu sa spojem 1'.

Trajektorija	$\langle \text{RG} \rangle \pm \text{SD} / \text{\AA}$
2. ns	$27,94 \pm 0,14$
8. ns	$28,31 \pm 0,13$
30. ns	$27,08 \pm 0,09$

Analizom fluktuacija aminokiselinskih ostataka tijekom posljednje dvije ns simulacije uočava se povećana pokretljivost „vanjskog dijela“ proteina, područja donje domene opisanih s ostacima 67-85, 117-137, 229-254 te gornje domene opisanih s ostacima 358-378, 466-509, 527-549, 625-648 (slika 4.52). Manje pokretljiva područja donje domene, ostaci 28-62, 89-109, 258-343, 380-423 te gornje domene, ostaci 556-586, čine „unutrašnji dio“ proteina te dio, ostaci 654-711, koji se proteže kroz obje domene i povezuje ih.



Slika 4.52. Profil $\Delta rmsf$ proteinskog skeleta kvaščeve DPP III u kompleksu sa spojem 1' za posljednje dvije ns MD simulacija.

Unatoč promjenama u tercijarnoj strukturi, sekundarna struktura proteina nije se značajnije mijenjala tijekom MD simulacije (tablica 4.17).

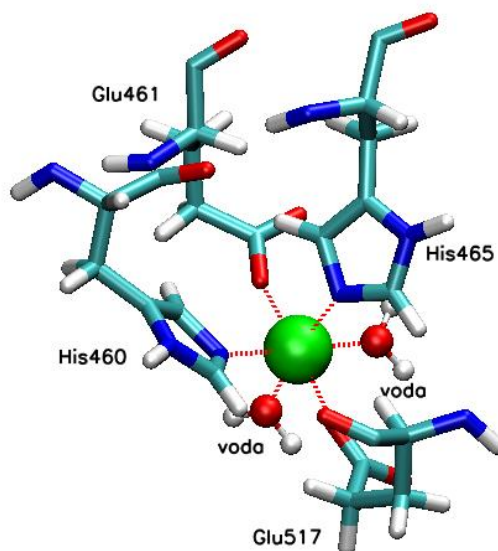
Tablica 4.17. Elementi sekundarne strukture proteina u kompleksu sa spojem 1' tijekom MD simulacija izračunati korištenjem poslužitelja "2Struc: the secondary structure server" (<http://2struc.cryst.bbk.ac.uk/>)¹⁷³.

STRUKTURA	Elementi sekundarne strukture proteina		
	Zavojnica (%)	β -ploča (%)	Ostalo (%)
Početna za MD simulaciju	41,7	12,1	46,2
Nakon 20. ns	41,3	11,5	47,2
Nakon 30. ns	41,4	10,6	48,0

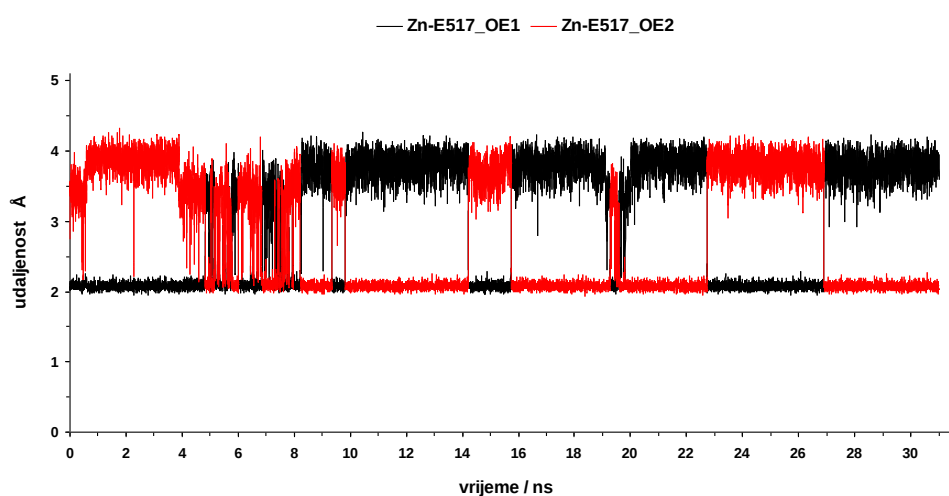
4.7.2. Koordinacija iona cinka

Tijekom simulacije katalitički ion cinka je heksa-koordiniran ostacima His465, His460, Glu461, Glu517 i s dvije molekule vode (slika 4.53). Osim Glu517, ostale koordinacijske veze sa cinkom stabilizirale su se tijekom prve ns i ostale očuvane tijekom simulacije. Ostatak Glu461 koordinira ion cinka monodentatno atomom kisika OE1 dok oba histidina koordinacijsku vezu ostvaruju Ne atomom dušika imidazolinskog prstena. U početnim fazama simulacije Glu517 koordinira ion cinka monodentatno karboksilnim

kisikom OE1 nakon čega dolazi do izmjene kisika karboksilne skupine u koordinacijskoj sferi metala (slika 4.54). Pored dvije molekule vode koje se nalaze u koordinacijskoj sferi cinka i popunjavaju oktaedarsku geometriju veznog mjesta, još je 8 molekula vode koje okružuju cink na udaljenosti do 5,0 Å kroz čitavo razdoblje MD simulacija.



Slika 4.53. Koordinacija iona cinka prikazana na strukturi kvaščeve DPP III u kompleksu sa spojem 1' dobivenoj nakon 30 ns MD simulacija. Ion cinka prikazan je zelenom kuglicom, a koordinacijske veze crvenom isprekidanom linijom.



Slika 4.54. Udaljenost OE1 i OE2 atoma kisika karboksilne skupine Glu517 od iona cinka tijekom 30 ns MD simulacija kvaščeve DPP III u kompleksu sa spojem 1'.

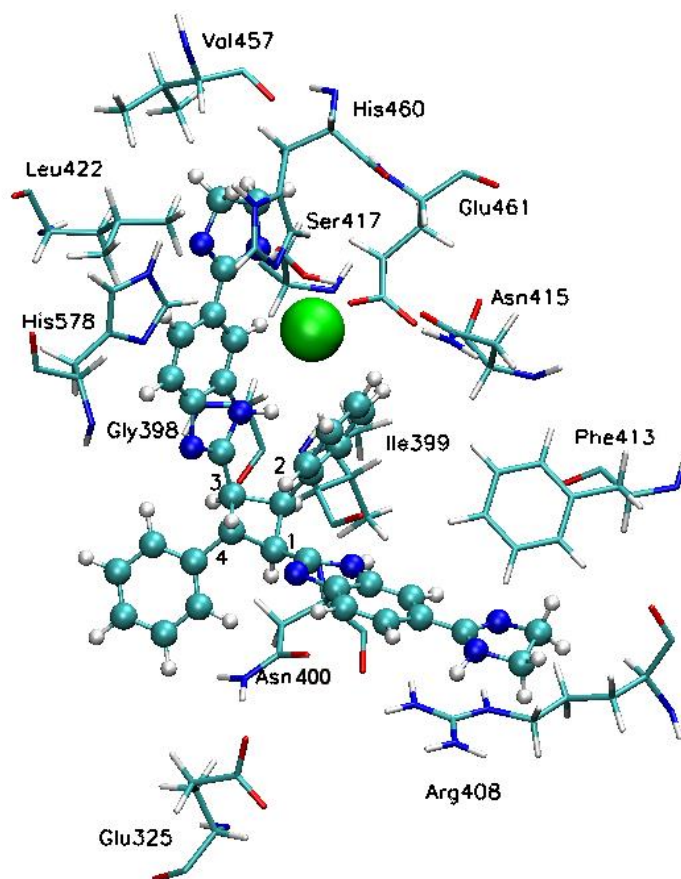
4.7.3. Interakcije spoja 1' s kvaščevom DPP III

U kompleksu dobivenom MD simulacijom imidazolinske skupine spoja 1' ostvaruju većinom elektrostatske interakcije s ostacima Arg408, Ser417, Leu422, His460 i Val457, dok su benzimidazolne skupine u okružju Ile399, Asn400, Phe413 i His578 s kojima su uglavnom ostvaruju van der Waalsove i elektrostatske interakcije. Na isti način interagiraju fenilne skupine spoja 1' s Glu325, Asn415 i Glu461 te ciklobutanski prsten s Gly398 i Ile399. (tablica 4.18 i slika 4.55).

Tablica 4.18. Interakcije spoja 1' s kvaščevom DPP III nakon MD simulacije duge 30 ns.

Aminokiselinski ostatak proteina	Vrsta interakcija
Glu325	ele, vdw (BL)
Gly398	ele, vdw (O)
Ile399	ele (O)
Asn400	ele (BL)
Arg408	ele (BL), „stacking“ i vdw,(BL)
Phe413	ele (BL), vdw (BL)+ „stacking -twisted“
Asn415	ele (BL)
Ser417	ele (BL)
Leu422	ele (BL), vdw (BL)
His460	ele/vdw (BL)
Glu461	ele (BL)
Val457	ele (O), vdw (BL)
His578	vdw (BL)

ele - elektrostatske interakcije, H-vodikova veza, vdw - van der Waalsova privlačna sila, (O) - interakcija okosnicom proteina, (BL) - interakcija bočnim lancem.



Slika 4.55. Položaj i interakcije spoja 1' s kvaščevom DPP III nakon 30 ns MD simulacija pri stalnoj temperaturi. Spoj 1' prikazan je modelom kuglica i štapića, a aminokiselinski ostaci proteina modelom štapića. Ion cinka predstavljen je zelenom kuglicom, dok su položaji supstituenata ciklobutanskog prstena spoja 1' označeni brojevima 1- 4.

Stabilnost kompleksa povećavala se tijekom MD simulacija što se zaključuje i iz vrijednosti slobodnih energija vezanja izračunatih MMPBSA metodom na trajektorijama generiranim tijekom intervala u trajanju od 2 ns (tablica 4.19).

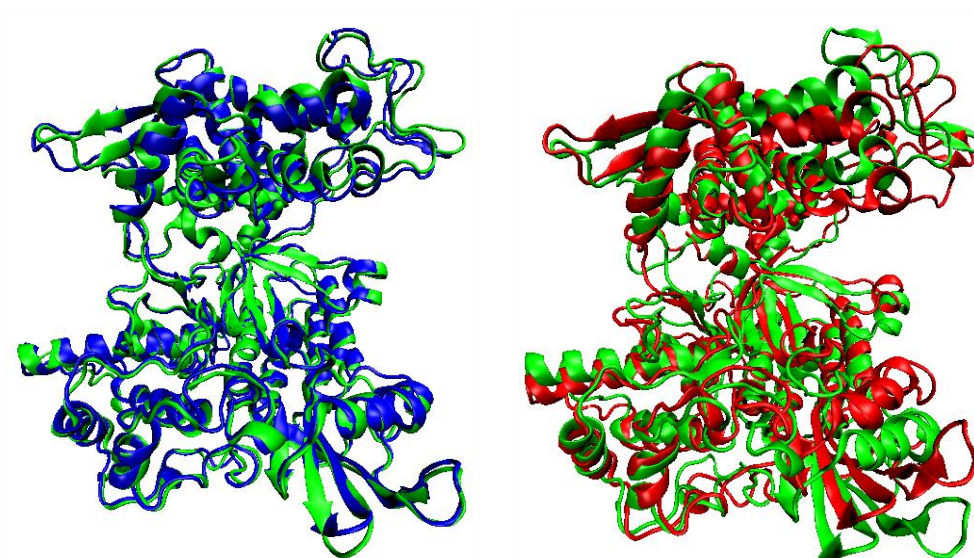
Tablica 4.19. Slobodna energija vezanja izračunata MM-PBSA metodom za trajektorije u trajanju od po 2 ns generirane tijekom MD simulacija kvaščeve DPP III u kompleksu sa spojem 1'.

Trajektorija	$G_{\text{MM-PBSA}} / \text{kcal mol}^{-1}$
2-4 ns	$-33,86 \pm 3,87$
5-7 ns	$-32,71 \pm 3,34$
17-19 ns	$-35,85 \pm 5,01$
22-24 ns	$-35,05 \pm 5,70$
28-30 ns	$-39,85 \pm 3,12$

4.8. Molekulske dinamičke simulacije kvašćeve DPP III u kompleksu s hidroksamatnim spojem Tyr-Phe-NHOH

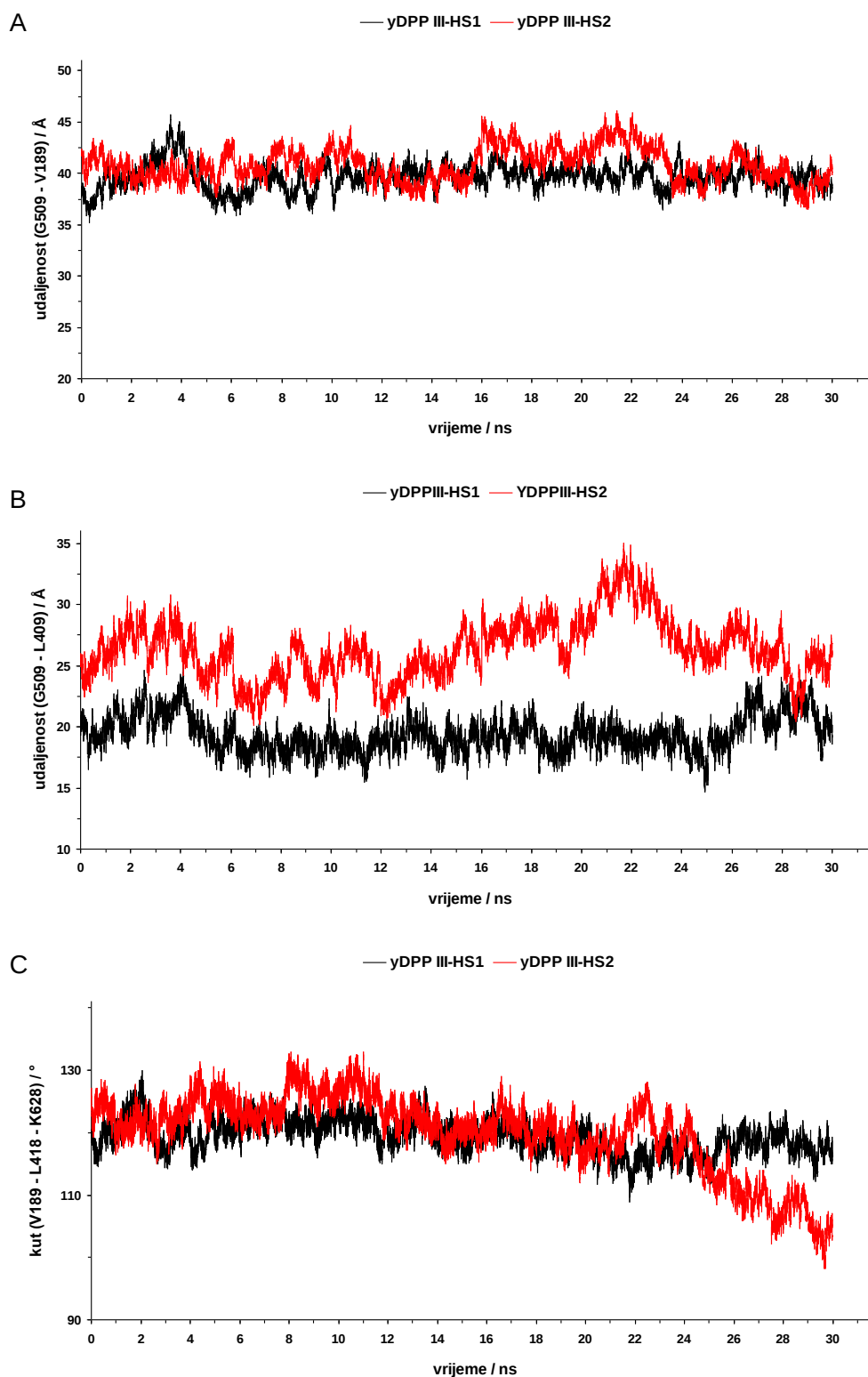
4.8.1. Promjene u strukturi proteina tijekom MD simulacija

MD simulacije provedene su s pripremljena dva kompleksa različite orijentacije u vremenu 30 ns. U prvom kompleksu (yDPP III-HS1) karbonilni kisik prve peptidne veze s N-kraja Tyr-Phe-NHOH koordinira katalitički ion cinka, dok je u drugom kompleksu (yDPP III-HS2) ta veza ostvarena putem karbonilnog kisika druge peptidne veze s N-kraja Tyr-Phe-NHOH. Uspoređujući početne strukture navednih kompleksa s konačnim uočava se međusobno približavanje domena, pri čemu je pomak izraženiji kod kompleksa yDPPIII-HS2 (slika 4.56).



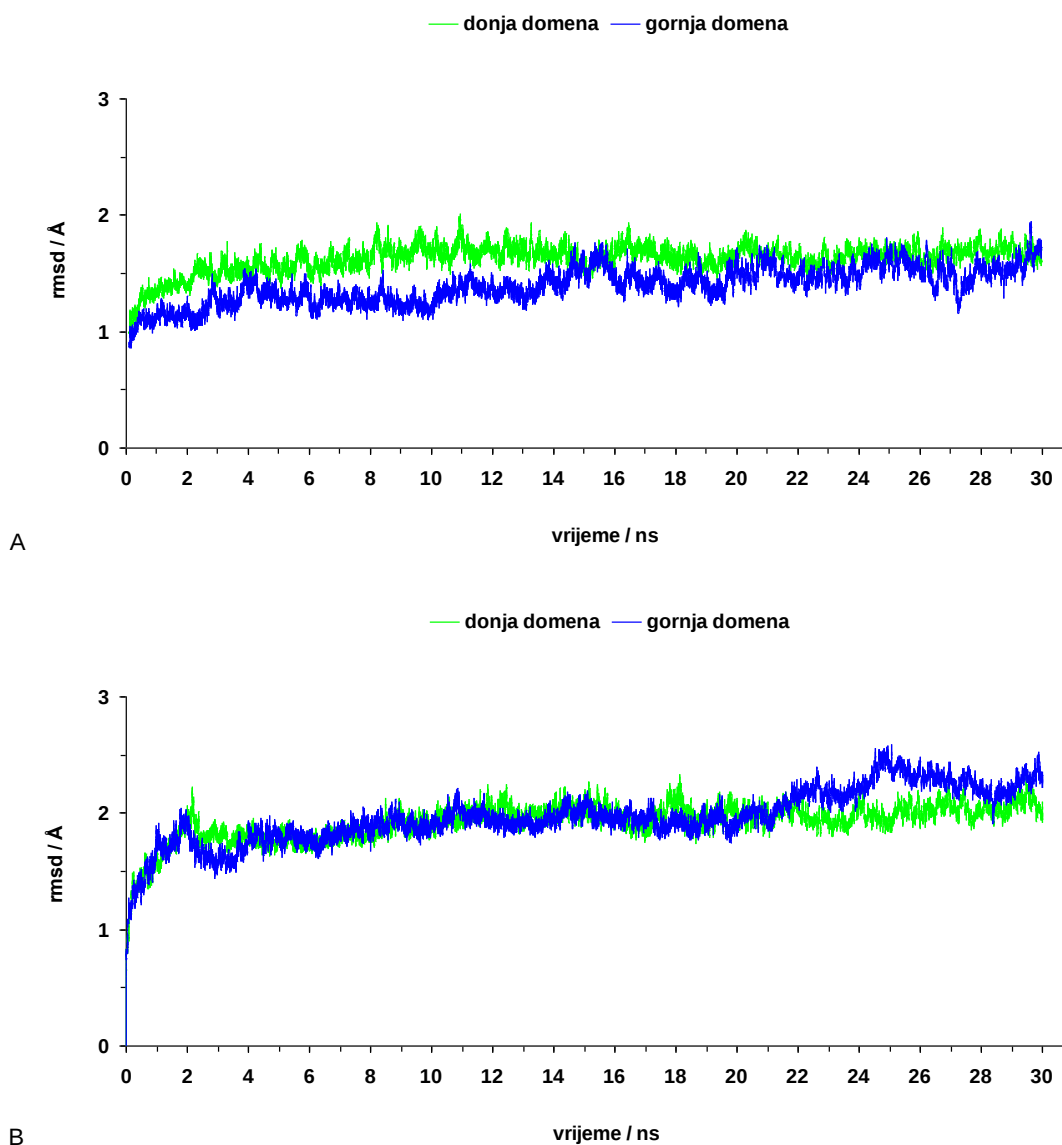
Slika 4.56. Promjene u terciarnoj strukturi proteina kompleksa yDPP III-HS1 i yDPP III-HS2 nakon 30 ns MD simulacija u odnosu na početnu strukturu. Preklopljena početna struktura (zeleno) sa strukturom dobivenom MD simulacijom kompleksa yDPP III-HS1 (plavo) i yDPP III-HS2 (crveno).

Tijekom simulacija kompleksa udaljenosti između alfa ugljikovih atoma Gly509-Val189 uglavnom se nije mijenjala (slika 4.57A), dok se udaljenost Gly509-Leu409 tijekom 21. i 22. ns simulacije kompleksa yDPP III-HS2 nakratko povećala (slika 4.57B). Kut što ga čine Val189-Leu418-Lys628 sporo se smanjuje tijekom simulacija uz značajnije smanjenje od $\sim 20^\circ$ u posljednjih 7 ns MD simulacija kompleksa yDPP III-HS2 (slika 4.57C).



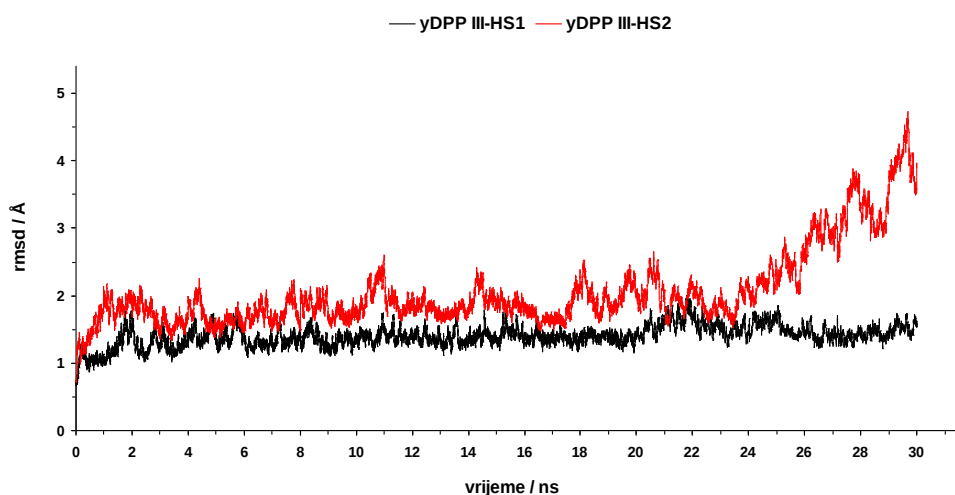
Slika 4.57. Promjene u strukturi proteina kompleksa yDPP III-HS1 i yDPP III-HS2 tijekom MD simulacija prikazane kao promjene u udaljenostima alfa ugljikovih atoma i kutu između aminokiselinskih ostataka. Udaljenost (A) Gly509-Val189, (B) Gly509-Leu409 te, kut (C) kojeg čine Val189-Leu418-Lys628.

Tijekom navedenih MD simulacija prostorni oblik svake pojedine domene uglavnom je ostao sačuvan (slika 4.58AiB)



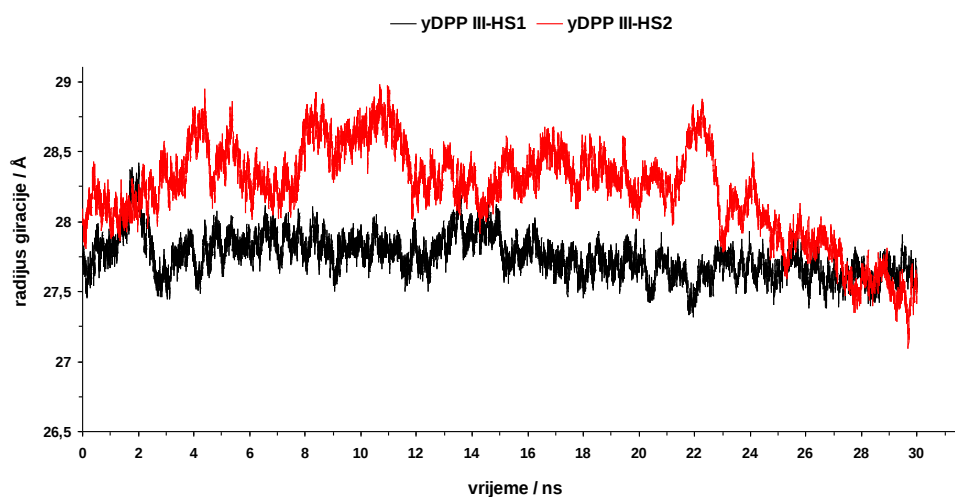
Slika 4.58. Promjena oblika proteinskog skeleta donje i gornje domene u kompleksu (A) yDPP III-HS1 i (B) yDPP III-HS2 tijekom MD simulacije duge 30 ns

Iz grafičkog prikaza (slika 4.59) vidljivo je kako se oblik proteinskog skeleta uglavnom ne mijenja tijekom simulacije kompleksa yDPP III-HS1, dok se kod kompleksa yDPP III-HS2 u posljednjih 6 ns simulacije rmsd značajno povećala. Srednji rmsd za cijelo razdoblje simulacije kompleksa yDPP III-HS1 je $1,38 \pm 0,15 \text{ Å}$ dok za kompleks yDPP III-HS2 u prvih 24 ns iznosi $1,81 \pm 0,22 \text{ Å}$, odnosno $2,99 \pm 0,64 \text{ Å}$ u posljednjih 6 ns.



Slika 4.59. Promjena oblika proteinskog skeleta kompleksa yDPP III-HS1 i yDPP III-HS2 tijekom MD simulacija.

Globularnost (slika 4.60 i tablica 4.20) proteina uglavnom postupno raste tijekom simulacije kompleksa yDPP III-HS1 dok se tijekom prvih 23 ns simulacije kompleksa yDPP III-HS2 uglavnom smanjuje, nakon čega se do kraja simulacije povećava.

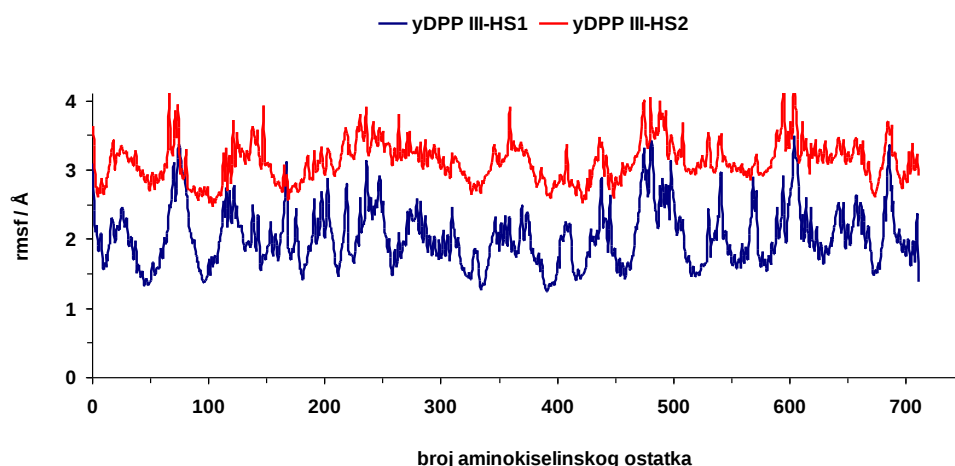


Slika 4.60. Radijus giracije proteina kompleksa yDPP III-HS1 i yDPP III-HS2 tijekom MD simulacije duge 30 ns.

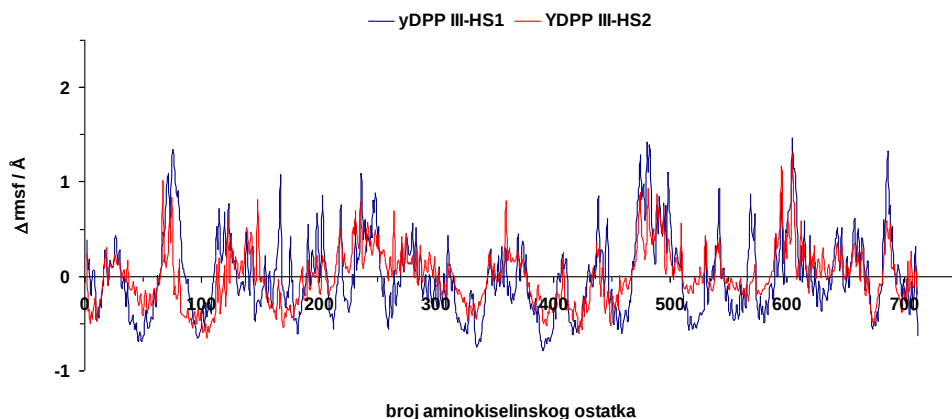
Tablica 4.20. Srednje vrijednosti i standardna devijacija (SD) radijusa giracije (RG) proteinskog skeleta kompleksa yDPP III-HS1 i yDPP III-HS2 izračunate na trajektorijama odabranim tijekom MD simulacija.

Sustav	Trajektorija	$\langle RG \rangle \pm SD / \text{\AA}$
yDPP III-HS1	2. ns	$28,00 \pm 0,17$
yDPP III-HS2	2. ns	$28,06 \pm 0,08$
yDPP III-HS1	23. ns	$27,64 \pm 0,09$
yDPP III-HS2	23. ns	$28,47 \pm 0,27$
yDPP III-HS1	30. ns	$27,64 \pm 0,08$
yDPP III-HS2	30. ns	$27,46 \pm 0,11$

Uspoređujući profil rmsf za posljednje dvije ns simulacije (slika 4.61) vidljiva je veća apsolutna fleksibilnost proteinskog skeleta kod kompleksa yDPP III-HS2 u odnosu na kompleks yDPP III-HS1. Profil $\Delta rmsf$ (slika 4.62) upućuje na manje razlike u relativnoj gibljivosti pojedinih dijelova proteina kod simuliranih kompleksa, no u oba slučaja kao područja veće relativne fleksibilnosti ističu se dijelovi udaljeniji od procjepa: područja donje domene određena ostacima 70-77 i 683-691 te dijelovi gornje domene, ostaci 220-260, 470-500 i 592-615. Slabije je gibljiv veći dio donje domene (ostaci 35-61 i 82-120) kao i područja u blizini aktivnog mjesta (ostaci 318-337, 386-467 i 515-585).



Slika 4.61. Profil rmsf proteinskog skeleta kompleksa yDPP III-HS1 i yDPP III-HS2 za posljednje dvije ns MD simulacije.



Slika 4.62. Profil Δ_{rmsf} proteinskog skeleta kompleksa yDPP III-HS1 i yDPP III-HS2 za posljednje dvije ns MD simulacija.

U odnosu na početnu strukturu kompleksa yDPP III-HS1, sekundarna struktura dobivena nakon 30 ns nije se bitno mijenjala, dok se manje smanjenje udjela zavojnica javlja kod kompleksa yDPP III-HS2 (tablica 4.21).

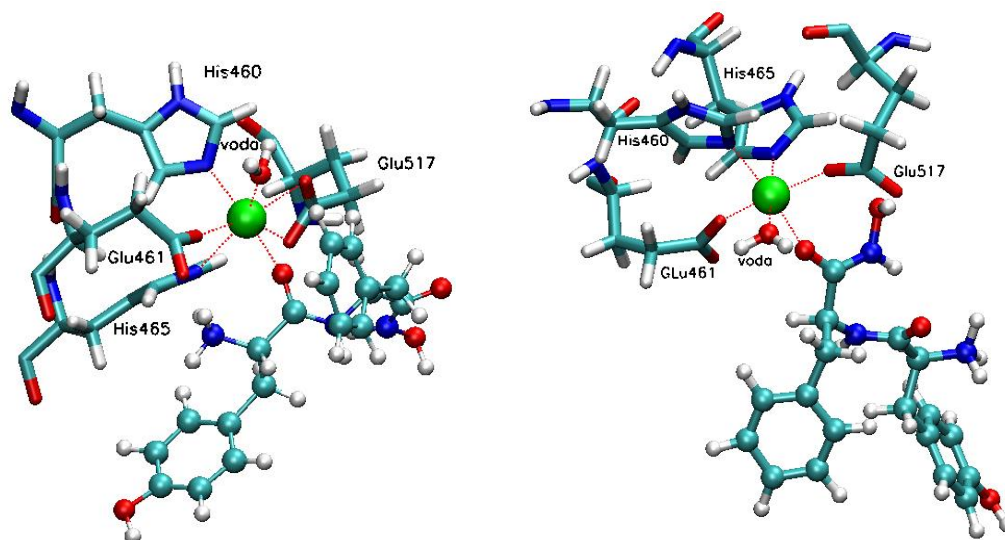
Tablica 4.21. Elementi sekundarne strukture kompleksa yDPP III-HS1 i yDPP III-HS2 tijekom MD simulacija izračunati korištenjem poslužitelja "2Struc: the secondary structure server" (<http://2struc.cryst.bbk.ac.uk/>)¹⁷³.

STRUKTURA	Elementi sekundarne strukture proteina		
	Zavojnica (%)	β -ploča (%)	Ostalo (%)
Početna yDPP III-HS1	42,4	10,0	47,6
Početna yDPP III-HS2	44,5	11,7	43,8
yDPP III-HS1 nakon 30 ns	42,1	11,1	46,8
yDPP III-HS2 nakon 30 ns	39,2	12,1	48,7

4.8.2. Koordinacija iona cinka

Ion cinka je tijekom simulacije oba kompleksa uglavnom heksa-koordiniran ostacima His465, His460, Glu461, Glu517, karbonilnim kisikom prve (kod yDPP III-HS1) odnosno druge (kod yDPP III-HS2) peptidne veze s N-kraja Tyr-Phe-NHOH i jednom molekulom vode (slika 4.63). Navedene koordinacijske veze sa cinkom stabilizirale su se tijekom prve ns i uglavnom ostale očuvane tijekom simulacija. Ostatak Glu461 koordinira ion cinka monodentatno atomom kisika OE1 dok oba histidina koordinacijsku vezu ostvaruju Ne

atomom dušika imidazolinskog prstena u oba kompleksa. Jedina razlika u koordinaciji cinka u navedenim kompleksima je koordinacija s ostatkom Glu517 koji kod yDPP III-HS1 vezu ostvaruje bidentatno dok je monodentatna veza ostvarena kod yDPP III-HS2 putem karboksilnog kisika OE1. Osim aminokiselinskih ostataka, na udaljenosti do 5,0 Å od iona cinka nalazi se od 8 do 10 molekula vode tijekom cijelog razdoblja simulacije.



Slika 4.63. Koordinacija iona cinka kompleksa yDPP III-HS1 (lijevo) i yDPP III-HS2 (desno) nakon 30 ns MD simulacija. Molekula Tyr-Phe-NHOH prikazana je modelom kuglica i štapića, ion cinka zelenom kuglicom, a koordinacijske veze crvenom isprekidanom linijom.

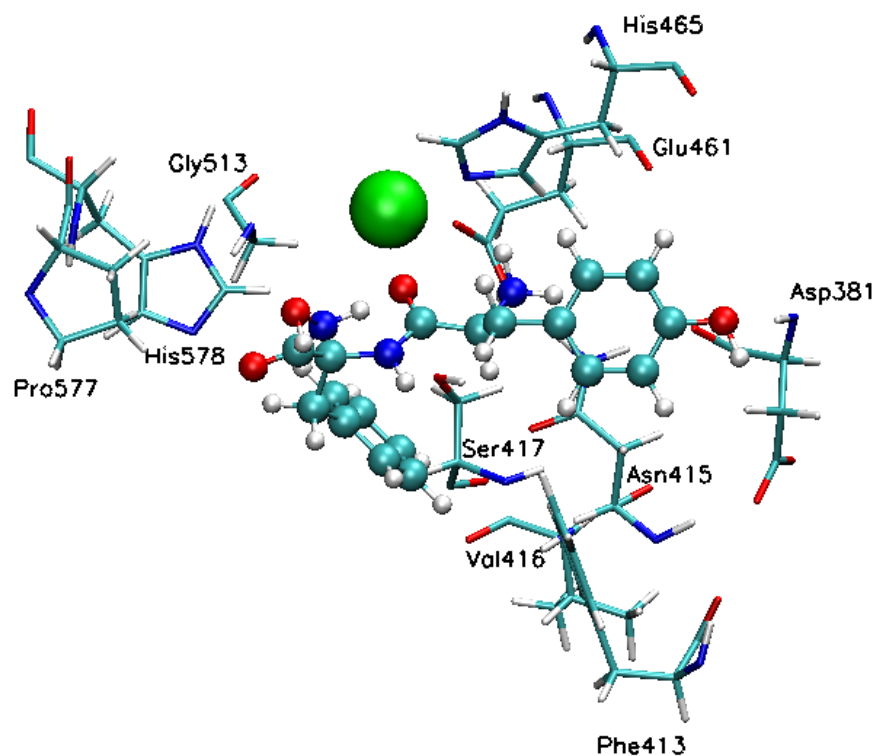
4.8.3. Interakcije Tyr-Phe-NHOH s kvaščevom DPP III

U prvom kompleksu (yDPP III-HS1) N-kraj peptidnog hidroksamata ostvaruje vodikovu vezu s karboksilnim kisikom OE1 Glu461 te elektrostatske interakcije s Nε atomom dušika His465. Tirozin na položaju P1 u hidrofobnom je okružju Phe413 dok s Asp381 ostvaruje elektrostatsku i van der Waalsovu interakciju. Uglavnom elektrostatskim interakcijama s Asn415, Ser417 i His578 te vodikovom vezom s Val416, stabiliziran je fenilni ostatak na položaju P1', dok hidroksamska skupina ostvaruje elektrostatske interakcije s bočnim lancem Pro577 i s kisikom okosnice Gly513 (tablica 4.22 i slika 4.64). U odnosu na yDPP III-HS1 kod kompleksa yDPP III-HS2 izostaju interakcije s N-krajem peptidnog hidroksamata. Tirozin na položaju P2 elektrostatski interreagira s Arg508 i Asn400, dok je s Arg403 povezan vodikovom vezom. Na položaju P1, fenilalanin je najvećim dijelom elektrostatskim interakcijama povezan s Ile399, Asn415, Val416 i Ser417 te s Glu461. Hidroksamska skupina na položaju P1' povezana je o vodikovom vezom s atomom kisika OE2 glutamata 517 (tablica 4.23 i slika 4.65).

Tablica 4.22. Interakcije Tyr-Phe-NHOH s kvaščevom DPP III u kompleksu yDPP III-HS1 nakon MD simulacije duge 30 ns.

P1				P1'		P2'	
+H3N-			-Tyr-	-Phe-		-NHOH	
S1				S1'		S2'	
Glu461	H (BL)	Asp381	ele (O, BL), vdw (BL)	Asn415	ele (BL)	Gly513	ele (O)
His465	ele (BL)	Phe413	„face to edge“ „stacking“ (BL)	Val416	H, ele (O)	Pro577	ele (BL)
				Ser417	ele (BL)		
				His578	ele, vdw (BL)		

ele - elektrostatske interakcije, H-vodikova veza, vdw- van der Waalsova privlačna sila,
(O) - interakcija s okosnicom proteina, (BL) - interakcija s bočnim lancem.

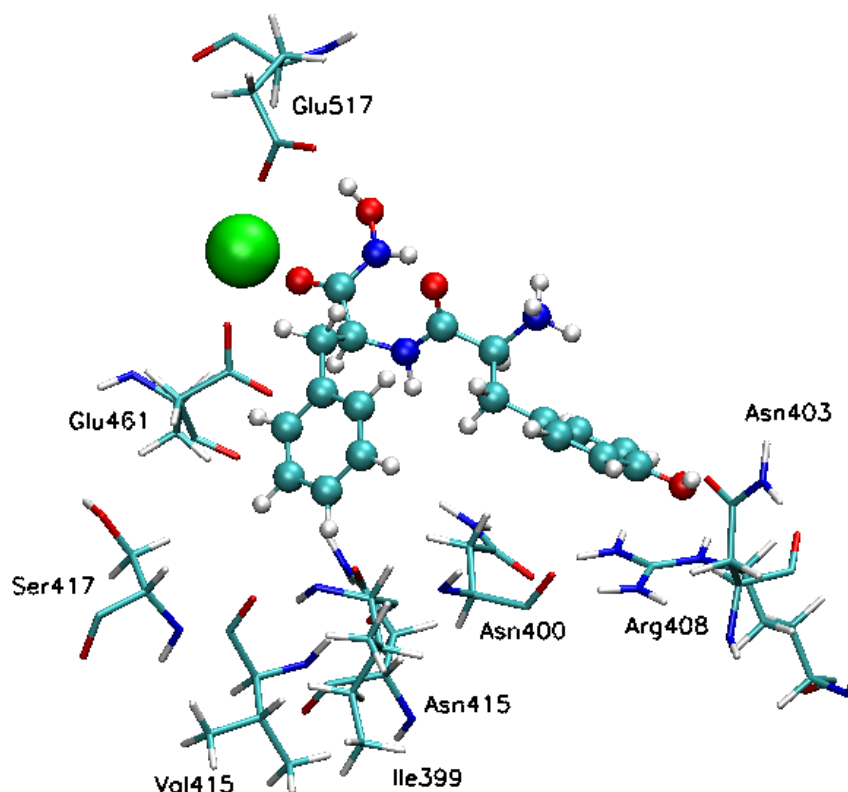


Slika 4.64. Položaj i interakcije Tyr-Phe-NHOH s kvaščevom DPP III u kompleksu yDPP III-HS1 nakon MD simulacije duge 30 ns. Molekula Tyr-Phe-NHOH je prikazana modelom kuglica i štapića, a ion cinka zelenom kuglicom.

Tablica 4.23. Interakcije Tyr-Phe-NHOH s kvaščevom DPP III u kompleksu yDPP III-HS2 nakon MD simulacije duge 30 ns.

		P2	P1		P1'	
⁺ H ₃ N-		-Tyr-	-Phe-		-NHOH	
		S2	S1		S1'	
	Asn400	ele (O, BL)	Ile399	ele (O)	Glu517	H (BL)
	Asn403	H (BL)	Asn415	ele (BL)		
	Arg408	ele (BL)	Val416	ele (O)		
			Glu461	ele (BL)		
			Ser417	vdw(BL)		

ele - elektrostatske interakcije, H-vodikova veza, vdw- van der Waalsova privlačna sila, (O) - interakcija s okosnicom proteina, (BL) - interakcija s bočnim lancem.



Slika 4.65. Položaj i interakcije Tyr-Phe-NHOH s kvaščevom DPP III u kompleksu yDPP III-HS2 nakon MD simulacije duge 30 ns. Molekula Tyr-Phe-NHOH je prikazana modelom kuglica i štapića, a ion cinka zelenom kuglicom.

Slobodna energija vezanja izračunata MM-PBSA metodom za trajektorije vremenskog intervala od 2 ns generirane tijekom MD simulacije, (tablica 4.24) u pravilu je niža za kompleks yDPP III-HS1.

Tablica 4.24. Slobodna energija vezanja izračunata MM-PBSA metodom za trajektorije u trajanju od po 2 ns generirane tijekom MD simulacija kompleksa yDPP III-HS1 i yDPP III-HS2.

Sustav	Trajektorija	$G_{\text{MM-PBSA}} / \text{kcal mol}^{-1}$
yDPP III-HS1	4-6 ns	- 23,15 $\pm$ 3,31
yDPP III-HS2	4-6 ns	- 10,12 $\pm$ 3,03
yDPP III-HS1	10-12 ns	- 21,27 $\pm$ 3,05
yDPP III-HS2	10-12 ns	- 8,23 $\pm$ 3,49
yDPP III-HS1	28-30 ns	- 22,98 $\pm$ 3,36
yDPP III-HS2	28-30 ns	- 14,13 $\pm$ 3,51

5. RASPRAVA

Pročišćavanje DPP III i PSA iz ljudskih eritrocita

Kako je glavni cilj ove doktorske radnje bio pronalaženje novih inhibitora metalopeptidaza porodice M49 te ispitivanje mehanizama njihova inhibitornog djelovanja, prvi dio rada bio je usmjeren na pročišćavanje i dobivanje dovoljne količine čistoga enzimskog preparata DPP III iz ljudskih eritrocita potrebnog za daljnja ispitivanja. Usporedo s pročišćavanjem ove peptidaze, a u svrhu proučavanja specifičnosti djelovanja novih inhibitora prema drugim egzo-peptidazama, iz istog je izvora pročišćena aminopeptidaza osjetljiva na puromicin (PSA).

Pročišćavanje je provedeno djelomičnom modifikacijom objavljenih postupaka za izolaciju ljudske DPP III iz istog izvora^{95,100}. S obzirom na to da je dobiveni enzimski prepat nakon rekromatografije na DEAE-celulozi još uvijek sadržavao DPP III i PSA, primijenjena je kromatografija na hidroksilapatitu i postignuto razdvajanje ova dva proteina. DPP III je u završnom koraku pročišćena sustavom brze tekućinske kromatografije proteina (FPLC) na stupcu ionskog izmjenjivača Mono Q. Enzimski preparat PSA dobiven nakon kromatografije na hidroksilapatitu dalje je pročišćen na način kako su to opisali Abramić i sur.², kombinacijom gel-filtracije na stupcu Sephacryla S-200 Superfine i brze tekućinske kromatografije proteina.

Specifična aktivnost pročišćene DPP III iznosila je $95,9 \text{ j mg}^{-1}$ i bila je veća od ranije objavljenih podataka za specifičnu aktivnost enzima iz istog izvora (oko 21 j mg^{-1})⁹⁵, a vrlo slična specifičnoj aktivnosti enzima izoliranog iz sjemene tekućine čovjeka ($84,9 \text{ j mg}^{-1}$)¹⁰⁸. Za usporedbu, rekombinantna ljudska DPP III pročišćena je do specifične aktivnosti od $20,1 \text{ j mg}^{-1}$ ¹⁴. Razlike u specifičnoj aktivnosti mogle bi potjecati od nejednakih uvjeta (sastav i pH pufera) pri njenom određivanju.

Elektroforezom preparata DPP III u nativnim i denaturirajućim uvjetima uočeno je postojanje jedne proteinske vrpce, što je potvrdilo njegovu čistoću.

Pročišćeni enzimski preparat PSA imao je specifičnu aktivnost od oko $5,2 \text{ j mg}^{-1}$ što je oko 3 puta niža vrijednost od ranije objavljene⁸⁴. Molekulska masa pročišćene eritrocitne PSA vrlo je slična molekulskoj masi membranske PSA iz mozga štakora ($\sim 99 \text{ kDa}$)⁸¹.

Hidrolitička aktivnost pročišćene DPP III prema supstratu Arg-Arg-AMC

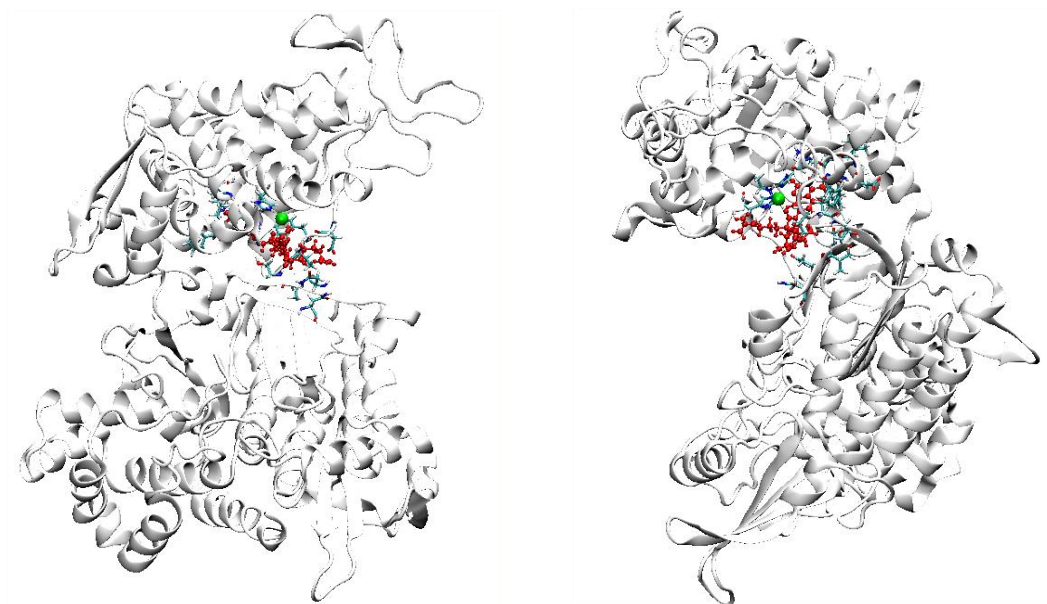
DPP III je prepoznata u ekstraktu goveđe hipofize kao zaseban tip dipeptidil-peptidaze koji među različitim dipeptidil-arilamidnim supstratima preferira Arg-Arg-2NA⁹³. Osim diarginil-2-naftilamida, kao specifični sintetski supstrat DPP III korišten je i Arg-Arg-AMC, npr. pri određivanju aktivnosti DPP III pročišćene iz mozga zamorca⁸, iz štakorske jetre^{99,174} te bedrenog mišića svinje¹⁷⁵. Međutim, hidrolitičko djelovanje DPP III iz ljudskih tkiva i organa prema Arg-Arg-AMC dosad nije bilo ispitano. Zato je, u okviru ovog doktorskog rada po prvi put izvršeno određivanje uvjeta djelovanja DPP III izolirane iz ljudskih eritrocita prema ovom supstratu te je provedena i kinetička karakterizacija. Optimalno pH područje za hidrolizu Arg-Arg-AMC s DPP III iz ljudskih eritrocita (bez dodatka iona kobalta, Co^{2+}) nalazi se oko pH 9,0 što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima DPP III sisavaca koja su pokazala da je hidroliza uz Arg-Arg-AMC^{8,99,174} kao i uz Arg-Arg-2NA^{95,96,108} veća u blago lužnatom mediju. Značajna aktivacija enzima postignuta je dodatkom iona kobalta koji je pri koncentraciji od $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ uzrokovao do 2 puta veću aktivnost u odnosu na aktivnost bez kobalta. Osim za DPP III iz ljudskih eritrocita, aktivacija ionom kobalta zabilježena je i kod DPP III iz drugih izvora^{8,101,110,128}. Usporedbom kinetičkih parametara, K_m i k_{cat} za hidrolizu Arg-Arg-AMC primjetili smo kako je K_m vrijednost DPP III iz ljudskih eritrocita ($13,50 \pm 1,52 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) pri pH 7,4 manja oko 4 puta u odnosu na enzim iz mozga zamorca ($55 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$)⁸, a u odnosu na enzim iz štakorske jetre ta vrijednost je manja čak ~ 22 puta ($290 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$)⁹⁹. Dobivena K_m za DPP III iz ljudskih eritrocita uz Arg-Arg-AMC vrlo je slična ranije objavljenim vrijednostima uz naftilamidni supstrat Arg-Arg-2NA za pročišćenu rekombinantnu ljudsku ($11,6 \pm 1,4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$)¹⁴ i kvaščevu DPP III ($10,42 \pm 1,06 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$)¹⁰⁹ te za DPP III iz ljudske leće K_m ($11,4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$)¹⁷⁶. Abramić i sur.⁹⁵ navode malo nižu vrijednost K_m za eritrocitni enzim ($7,7 \pm 0,53 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), dok je veća vrijednost K_m uz Arg-Arg-2NA, objavljena za DPP III pročišćenu iz ljudske placente (oko $38 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$)⁹⁶ i za DPP III iz štakorske jetre ($371 \pm 56 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$)⁷. Zadnja navedena vrijednost je u dobrom slaganju s K_m vrijednosti dobivenu za enzim iz istog izvora (štakorska jetra) korištenjem Arg-Arg-AMC⁹⁹. Katalitička konstanta, k_{cat} enzima iz ljudskih eritrocita, određena u ovom doktorskog radu za Arg-Arg-AMC iznosila je $3,86 \text{ s}^{-1}$, što je ~ 4 puta manja (uz isti supstrat) od vrijednosti k_{cat} za DPP III iz štakorske jetre (18 s^{-1})⁹⁹. Dobivena k_{cat} bila je znatno manja i u

odnosu na izmjerenu k_{cat} uz Arg-Arg-2NA za enzim iz ljudskih eritrocita (28 s^{-1})⁹⁵, rekombinantnu DPP III čovjeka ($21,8 \text{ s}^{-1}$)¹⁴ i štakora ($16,6 \text{ s}^{-1}$)⁷.

Nedavno rješenje kristalne strukture ljudske DPP III (PDB kod: 3fvy) omogućilo nam je korištenje trodimenzionalnih koordinata proteina za računalno predviđanje optimalne orijentacije Arg-Arg-AMC prema enzimu pri njihovu vezanju u kompleks, dok smo simulacijama molekulske dinamike kao što ćemo to prikazati u narednom poglavlju pratili utjecaj vezanja supstrata na strukturu i fleksibilnost DPP III, te interakcije supstrata i inhibitora s aktivnim mjestom enzima.

Molekulske dinamičke simulacije ljudske DPP III u kompleksu sa supstratom Arg-Arg-AMC

Početna struktura kompleksa za MD simulacije sadržavala je enzim u „otvorenom“ obliku kao što je utvrđeno kristalografski (PDB kod: 3fvy), dok je supstrat bio smješten u području aktivnog mjesta okružen ostacima Thr374, Asn391, Asn406, Val407, Ser408 i Leu413 donje te ostacima Asp372, Phe373, Phe443, Asp444, Val445, Gln446, Val447, His450, Ala567, His568 i Arg572 gornje domene (slika 5.1).



Slika 5.1. Pogled sprijeda i sa strane na početnu strukturu ljudske DPP III u kompleksu sa supstratom, Arg-Arg-AMC. Molekula supstrata prikazana je modelom kuglica i štapića crvene boje, položaji aminokiselina u njegovom okružju modelom štapića, dok je ion cinka označen zelenom kuglicom.

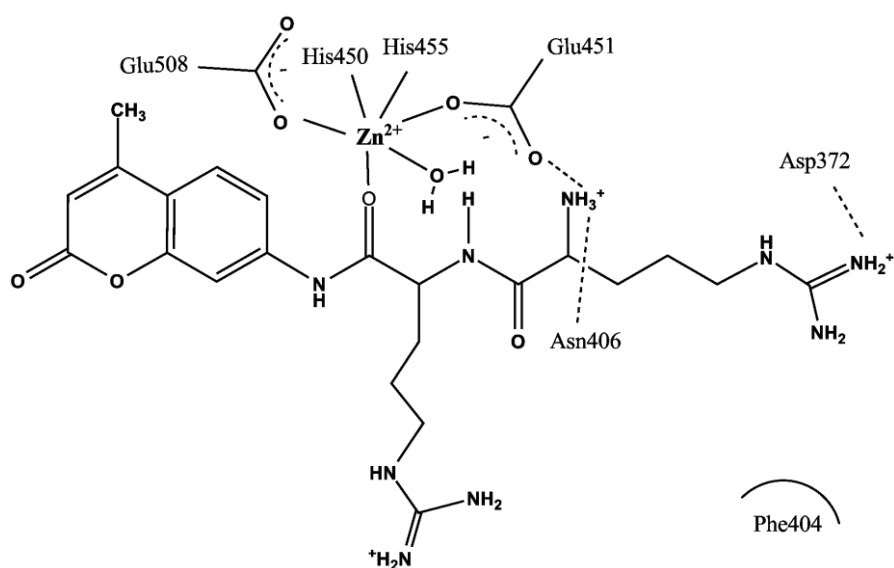
Tijekom 40,8 ns MD simulacija uočili smo (slika 4.13) međusobno pomicanje proteinskih domena, što je potvrđeno smanjenjem kuta Asp186-Leu409-Glu619 kao i udaljenosti Ser500-Asp186 i Ser500-Gln400 (slike 4.15A-C). Ovi rezultati u skladu su s nedavno objavljenim podacima utjecaja vezanja liganda (supstrata Arg-Arg-2NA) na djelimično približavanje domena ljudske DPP III¹¹⁴. Pomicanje proteinskih domena tijekom MD simulacija nije bitno utjecalo na prostorni oblik domena (slika 4.16) niti na sekundarnu strukturu proteina (tablica 4.6). Uspoređujući rmsd slobodne DPP III tijekom simulacije duge 30 ns¹¹⁶ s DPP III u kompleksu s Arg-Arg-AMC opažamo kako vezanje ovoga supstrata uzrokuje stabilizaciju proteina već u prvoj ns simulacije te kako struktura uglavnom ostaje stabilna u preostalom razdoblju simulacije. Iako globularnost proteina u kompleksu s Arg-Arg-AMC tijekom MD simulacije postupno opada (slika 4.18), radijus giracije sličan je ljudskoj DPP III u kompleksu sa supstratom Arg-Arg-2NA te je nešto veći u odnosu na slobodni enzim¹¹⁴ što ukazuje na to da vezanje Arg-Arg-AMC za DPP III uzrokuje blago istezanje proteina. Nadalje, usporedbom analiza $\Delta rmsf$ koje su proveli Tomić i sur.¹¹⁴ u 29. i 30. ns simulacije slobodnog enzima s $\Delta rmsf$ kompleksa ljudske DPP III s Arg-Arg-AMC u posljednje dvije ns možemo zaključiti da vezanje supstrata mijenja profil fleksibilnosti proteina (slika 4.20). Fleksibilnost manjeg dijela gornje domene (ostaci 460-491) kao i velikog dijela donje domene (ostaci 164-305) čiji se jedan dio (ostaci 293-308) nalazi neposredno ispod antiparalelne β -ploče koja gradi središnji rascjep relativno se povećava u odnosu na ostatak proteina, dok se fleksibilnost dijela donje domene (ostaci 33-163) koja čini vanjski dio proteina smanjuje (slika 4.21).

Uvidom u strukturu aktivnog mjesta enzima otkrili smo da je katalitički ion cinka kroz čitavo razdoblje simulacije heksa-koordiniran ostacima His450, His455, Glu451, Glu508 te karbonilnim kisikom druge peptidne veze od N kraja supstrata i molekulom vode. Primjećene razlike u koordinaciji Zn^{2+} od strane karboksilnog kisika OE2/OE1 Glu508 kod simulacija pri stalnoj temperaturi odnosno uz zagrijavanje mogu se objasniti stvaranjem vodikove veze između gvanidino skupine supstrata na položaju P1 s kisikom OE1 čime se kisik OE2 pomiče i ulazi u koordinacijsku sferu cinka, odnosno stvaranjem elektrostatskih interakcija OE2 s His455 i argininom na položaju P1, uz pomicanje kisika OE1 koordinacijskoj sferi cinka. Oktaedarska geometrija koordinacije cinka aktivnog mjesta ljudske DPP III u kompleksu s Arg-Arg-AMC koju smo dobili našim MD simulacijama slična je koordinaciji cinka aktivnog mjesta dobivenoj MD simulacijama DPP III bez liganda i ligandima (Arg-Arg-2NA i Tyr-Phe-NHOH)¹¹⁶, a razlikuje se od koordinacije cinka u strukturi enzima određenoj

kristalografski (PDB kod: 3fvy) gdje je ovaj katalitički metal tetra-koordiniran ostacima His450, His455, Glu508 i jednom molekulom vode.

Vizualizacija strukture kompleksa (slika 4.24 i 4.25) u posljednjoj ns MD simulacija omogućuje prepoznavanje interakcija supstrata Arg-Arg-AMC s podmjestima enzima S2, S1 i S1'. U strukturi dobivenoj simulacijom pri stalnoj temperaturi bočni ostatak supstrata u poziciji P2 ne ostvaruje interakcije, dok se u S1 podmjestu enzima zapaža samo Glu508. Najveći broj interakcija ostvaren je u podmjestu S1', putem ostataka Tyr417, Phe443, Gln446, Val447, Glu512, His568 i Arg572 koji pripadaju gornjoj domeni proteina te putem Glu451 i Asn406 koji interagiraju s N-krajem supstrata (tablica 4.7). Zagrijavanjem i daljnjim simuliranjem sustava supstrat ostvaruje dodatne interakcije (tablica 4.8) i s ostacima iz S2 podmjesta: Asp372, His455 i Glu507 gornje te Phe404 donje domene. Podmjesto S1' zauzimaju Leu413 donje i Phe443 gornje domene dok Asp372 gornje domene sudjeluje u vezanju N-kraja supstrata. Prisutnost hidrofobnih aminokiselina Leu413, Phe443 i Val447 pokazana je i u strukturi kompleksa DPP III s Arg-Arg-2NA, što upućuje na značaj ovih ostataka u formiranju hidrofobnog „džepa“ u podmjestu S1'. Na važnost interakcija His568 za katalizu ljudske DPP III ukazuju rezultati studija usmjerene mutageneze¹¹⁶, a sličan je značaj ovog visoko očuvanog ostatka pokazan za ekvivalentni His578 kvaščeve DPP III¹⁰⁹ te His231 termolizina¹⁸⁰. Važnost uloge Glu451 u katalizi pokazana je za ljudsku¹¹⁶ i štakorsku¹¹ DPPIII, kao i ekvivalenta, Glu461, kvaščeve ortologa¹². Bezerra i sur.¹¹⁵ su nedavno riješili strukturu kompleksa ljudske DPP III s pentapeptidom tinorfinom i pokazali da podmjesto S1' pored hidrofobnih (Phe443, Val447) i bazičnih ostataka (His568, Arg572) gradi i kiseli ostatak Glu451.

Na temelju postojećih literaturnih podataka te rezultata provedenih MD simulacija i dobivene strukture aktivnog mjesta predložen je katalitički mehanizam DPP III koji se odvija djelovanjem Glu451 koji kao proton akceptor aktivira molekulu vode, a nastali hidroksilni anion vrši nukleofilni napad na karbonilni ugljik veze koja se cijepa. Istraživanja u ovom doktorskom radu ukazuju na važnost evolucijski očuvanog ostatka Glu451 u vezanju supstrata metalopeptidaza porodice M49, kao i sudjelovanje visoko očuvanih ostataka Asp372, Asn406 i Phe404 u interakcijama pri vezanju liganda i zatvaranju proteina¹¹⁴. Pokazano je da bi navedeni ostaci mogli imati bitnu ulogu u reorganizaciji aktivnog mjesta enzima i stabilizaciji položaja supstrata (shema 5.1).



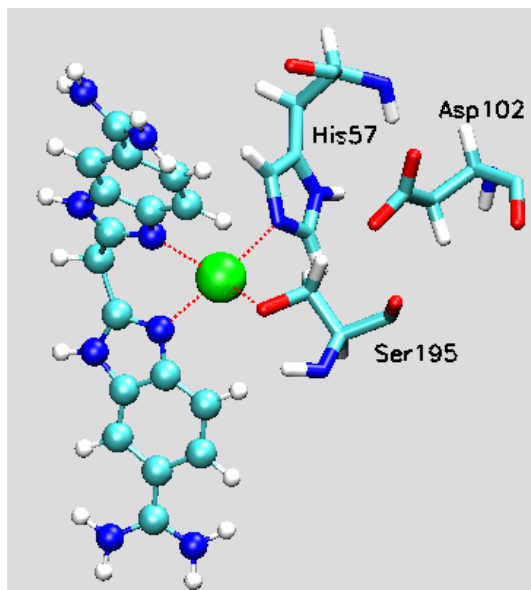
Shema 5.1. Prikaz aktivnog mjesta ljudske DPP III u kompleksu sa supstratom, Arg-Arg-AMC. Prikazane su samo interakcije enzima sa supstratom koje su ostvarene vodikovim vezama.

Derivati benzimidazola - novi inhibitori ljudske DPP III

Iz literature je poznata važnost inhibitora pri određivanju mehanizama djelovanja i fiziološke uloge metalopeptidaza sisavaca^{13,177}. Premda neki ispitani peptidni spojevi iskazuju snažnu inhibiciju DPP III, njihovu potencijalnu primjenu umanjuje spoznaja da su osjetljivi na hidrolitičko djelovanje DPP III i drugih tkivnih peptidaza^{112,134,178}. Temeljem navedenoga, bilo je opravdano istraživati nove nepeptidne inhibitore metalopeptidaza porodice M49 i razjasniti mehanizam njihova inhibitornog djelovanja.

Početak istraživanja novih inhibitora ljudske DPP III u ovom doktorskom radu temeljio se na dotadašnjem znanju o inhibitornom učinku kelirajućih agenasa na aktivnost ljudske i štakorske DPP III te o postojanju hidrofobnog „džepa“ u mjestu za vezanje supstrata ljudskog enzima^{5,95,100}. Odabir nepeptidnih spojeva koji bi s velikim afinitetom kompleksirali atom cinka i/ili ostvarivali uglavnom hidrofobne interakcije s aminokiselinskim ostacima aktivnog mjesta kao i posjedovali dovoljno dobru topljivost pri fiziološkom pH predstavljalo je relevantan znanstveni izazov pri izradi ovog rada. Nadalje, potraga za potencijalnim inhibitorima temeljila se na spoznaji da je benzimidazolna jezgra sastavni dio nekih inhibitora metalo- i serinskih peptidaza^{170,171} te je stoga ova struktura izabrana za pripremu novih potencijalnih inhibitora metalopeptidaza porodice M49. Izbor benzimidazolne jezgre kao polazne strukture od osobitog je značaja i obzirom da ova heterociklična struktura ulazi u sastav mnogih terapijskih agenasa sa širokim spektrom bioloških aktivnosti¹⁷⁹.

Preliminarno ispitivanje inhibitornog učinka heterocikličkih spojeva na ljudsku DPP III (8 derivata bezimidazola; tablica 4.2) pokazalo je da spojevi koji u svojoj strukturi nisu sadržavali bazične (amidino) skupine, ne inhibiraju. Važnost amidino skupine za inhibitorno djelovanje benzimidazolnih spojeva utvrdili smo usporedbom učinka spojeva **5** i **6** gdje prisustvo amidino skupine u spoju **6** povećava inhibiciju > 10 puta, dok se usporedbom djelovanja spojeva **7** i **8** moglo zaključiti kako ciklizacija amidino skupine uzrokuje pojačano inhibitorno djelovanje. Zbog izražene inhibicije DPP III spojevima **6** i **8** kao i izvješća Katza i sur.¹⁷² o jakom afinitetnom vezanju inhibitora bis(5-amidino-2-benzimidazolil)metana (BABIM), posredovanog cinkom, u području aktivnog mjesta tripsina (slika 5.2), pretpostavili smo da bi spoj sa dva amidino-supstituirana benzimidazolna prstena u molekuli mogao imati jači inhibitorni učinak na ljudsku DPP III.



Slika 5.2. Vezanje bis(5-amidino-2-benzimidazolil)metana posredstvom cinka u području aktivnog mjesta tripsina (pdb kod: 1xug). Inhibitor je prikazan modelom kuglica i štapića, aminokiselinski ostaci katalitičke trijade (His57, Asp102 i Ser195) modelom štapića, a ion cinka zelenom kuglicom.

Radi provjere ove pretpostavke, ispitano je 16 novih ciklobutanskih derivata benzimidazola, sintetiziranih fotokemijskom cikloadicijom u vodi, kojima su zbog boljeg uvida u odnos inhibitorne aktivnosti i strukture varirani supstituenti, a radi lakše topljivosti bili su priređeni u obliku soli hidroklorida (tablica 4.3). Aktivnost ovih spojeva potvrdila je pretpostavku.

Među njima, najpotentnije inhibitorno djelovanje imali su spojevi **5'** ($IC_{50} = 1,7 \mu\text{mol L}^{-1}$) i **1'** ($IC_{50} = 2,8 \mu\text{mol L}^{-1}$) oba s identičnim amidino-supstituiranim benzimidazolnim skupinama na položaju 1 i 3, te *o*-klor fenilnim, odnosno fenilnim skupinama na položaju 2 i 4. Usporedbom inhibicije enzima spojevima **1'** i **2'**, i **5'** i **6'** potvrdili smo da ciklizacija amidino skupine ima utjecaj na pojačano inhibitorno djelovanje ovih spojeva. Manji inhibitorni učinak spojeva kojima je na amidino grupu vezana izopropilna, morfolinska i cikloheksilna skupina mogao bi se objasniti nemogućnošću prijanjanja ovih spojeva u područje aktivnog mjesta enzima zbog povećanja veličine inhibitora navedenim skupinama.

Inhibicija ljudske DPP III spojem **1'** detaljnije je ispitivana i utvrđeno je da uzrokuje vremenski ovisnu inaktivaciju enzima kao i da se produljenjem vremena inkubacije toga spoja s enzimom povećava ireverzibilni karakter inhibicije.

Pri ispitivanju utjecaja vremenskog tijeka inaktivacije ljudske DPP III spojem **1'** utvrdili smo kako inaktivacija enzima pri zadanim uvjetima (veliki molarni suvišak spoja **1'**) slijedi kinetiku pseudo-prvog reda. Određena je konstanta brzine reakcije drugog reda za inaktivaciju enzima ovim spojem od $6924 \pm 549 \text{ mol}^{-1} \text{ L min}^{-1}$, vrlo slična konstanti reakcije drugog reda za inaktivaciju ljudske DPP III sulfhidrilnim reagensom *p*-hidroksimerkuribenzoatom ($3523 \text{ mol}^{-1} \text{ L min}^{-1}$)¹¹⁸.

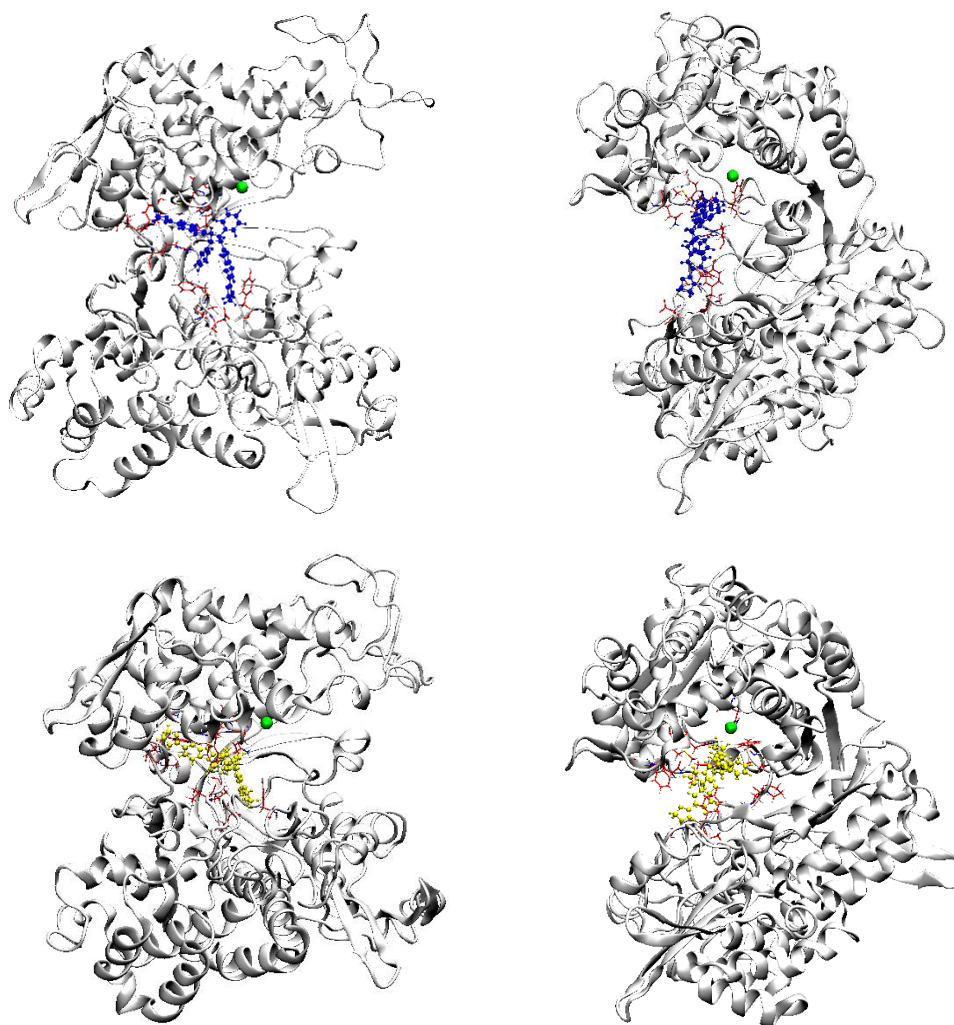
Dodatna ispitivanja zaštitnog učinka peptidnih supstrata valorfina i endomorfina-1 ukazivala su na kompetitivnu prirodu inhibicije ljudske DPP III spojem **1'**, a zbog nešto slabijeg inhibitornog učinka spoja **1'** u mediju s $0,15 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$ (nije pokazano u Rezultatima) čini se kako vezanje inhibitora za enzim vjerojatno uključuje elektrostatske interakcije. Iako smo početno pretpostavili da bi za inaktivaciju enzima mogao biti važan kelirajući učinak benzimidazolnih spojeva na cink aktivnog mjesta, dodatak iona cinka te kobalta inkubacijskoj smjesi nije imao značajnijeg utjecaja na povrat aktivnosti što je upućivalo kako se mehanizam inhibicije spojem **1'** ne ostvaruje nespecifičnim keliranjem Zn^{2+} aktivnog mjesta.

U pogledu objašnjenja mehanizma inhibicije DPP III spojem **1'**, **dobiveni biokemijski rezultati** upućuju na to da taj spoj ostvaruje višestruka međudjelovanja s enzimom od kojih bi elektrostatske interakcije između supstituiranih amidino (imidazolinskih) skupina s aminokiselinskim ostacima aktivnog mjesta DPP III kao i hidrofobne interakcije fenilnih skupina s hidrofobnim „džepom“ enzima mogle imati važnu ulogu za mehanizam inaktivacije.

Radi detaljnijeg ispitivanja utjecaja spoja **1'** na ljudsku DPP III koristili smo se metodama molekulskog modeliranja. U tu svrhu priredili smo model ljudske DPP III u kompleksu s ovim spojem i proveli molekulsko dinamičke simulacije u ukupnom trajanju od 40,8 ns. Tijekom navedenog razdoblja simulacije prikupljeno je $\sim 30\,000$ struktura kompleksa koje su nam omogućile razumijevanje utjecaja ovog derivata benzimidazola na strukturu i fleksibilnost enzima te bolje shvaćanje mehanizma njegovog inhibitornog djelovanja.

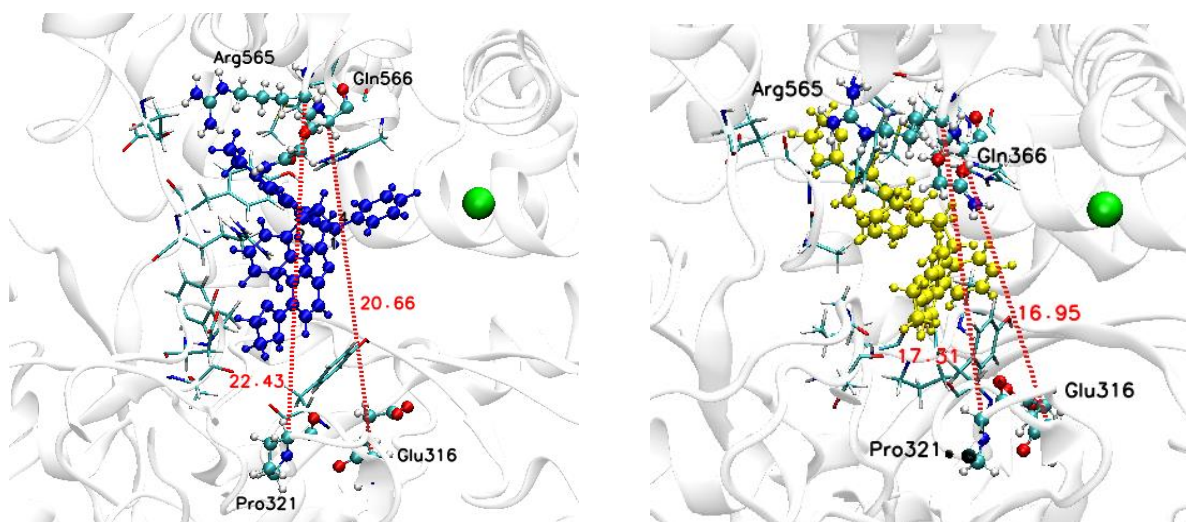
Molekulske dinamičke simulacije ljudske DPP III u kompleksu sa spojem 1'

Spoj 1' je tijekom čitavog razdoblja simulacije „ukopan“ u područje središnjeg rascijepa i međudjeluje s ostacima donje i gornje domene proteina (slika 5.3). Simulacijom pri stalnoj temperaturi od 300 K uočili smo (slika 4.26) da dolazi do međusobnog udaljavanja ovih domena, dok se simulacijom uz zagrijavanje ona međusobno približava. Navedena opažanja potvrdili smo praćenjem udaljenosti odabranih aminokiselina gornje i donje domene (slika 4.27A-C).



Slika 5.3. Pogled sprijeda i sa strane na strukturu ljudske DPP III u kompleksu sa spojem 1' u posljednjoj ns MD simulacija, pri stalnoj temperaturi od 300 K (gore) i uz povećanje temperature (dolje). Spoj 1' prikazan je modelom kuglica i štapića plave odnosno žute boje, položaji aminokiselina u međudjelovanju sa spojem 1' modelom štapića, dok je ion cinka označen zelenom kuglicom.

Simulacijom pri stalnoj temperaturi dolazi do povećanja udaljenosti Gln566-Glu316 i Arg565-Pro321 za koje je pokazano¹¹⁴ da imaju ulogu pri zatvaranju domena, dok se u sustavu simuliranom uz zagrijavanje udaljenost navedenih aminokiselina konstantno smanjuje (slika 5.4). Ove promjene povezujemo s različitim položajem spoja **1'** i orijentacijom supstituenata ciklobutanskog prstena između domena pri čemu je spoj **1'** dublje „ukopan“ u područje središnjeg rascjepa enzima kod zagrijavanog sustava što uz stvaranje većeg broja interakcija s aminokiselinama ostacima gornje i donje domene pridonosi njihovom daljnjem približavanju. Orijentacija i interakcije supstituenata spoja **1'** ukazuje na njegovo snažno vezanje za DPP III čime bi se mogla objasniti eksperimentalno opažena ireverzibilna inhibicija enzima ovim spojem.



Slika 5.4. Položaj spoja 1' u kompleksu s ljudskom DPP III u odnosu na Gln566 i Arg565 donje, te Glu316 i Pro321 gornje domene u posljednjoj ns MD simulacija pri stalnoj temperaturi (gore) i uz promjenu temperature (dolje). Spoj 1' prikazan je modelom kuglica i štapića plave odnosno žute boje, aminokiseline u okružju modelom štapića, a ion cinka zelenom kuglicom. Udaljenosti između ostataka Gln566-Glu316 i Arg565-Pro321 prikazane su crvenim isprekidanim linijama te brojčano u angstromima.

Analizirajući rezultate rmsd i radijusa giracije (slika 4.29, 4.30 i tablica 4.10) promjena oblika proteina značajnija je tijekom prvih 18 ns simulacije uz istovremeno opadanje globularnosti sustava. U preostalom razdoblju simulacije dolazi do znatnije stabilizacije proteina u oba sustava, međutim značajnije povećanje globularnosti javlja se tijekom simulacije uz zagrijavanje. Unatoč opisanim promjenama, pri navedenim MD

simulacijama nije došlo do značajnijih promjena prostornog oblika donje i gornje domene proteina. (slika 4.28).

Prema našim rezultatima $\Delta rmsf$ (slika 4.32) i usporedbi s DPP III bez liganda¹¹⁶ utvrdili smo da vezanje spoja **1'** pridonosi relativnom povećanju fleksibilnosti velikog dijela gornje domene koji grade „vanjski“ dio proteina u oba sustava, dok je zagrijavanje utjecalo na relativno povećanje pokretljivost dijelova donje domene. Relativno smanjenje fleksibilnosti u odnosu na srednju vrijednost za promatrani protein i simulaciju javlja se u dijelovima donje domene među kojima se ostaci 380-397 i 103-114 nalaze u blizini spoja **1'** kod sustava simuliranog pri stalnoj temperaturi odnosno uz zagrijavanje što upućuje kako spoj **1'** utječe na povećanje rigidnosti ovih domena. Pored promjena u tercijarnoj strukturi, analizom elemenata sekundarne strukture oba sustava vidljivo je (tablica 4.11) opadanje udjela zavojnica za $\sim 8\%$, dok se elementi β -ploče nisu bitno mijenjali. Slične promjene sekundarne strukture uočene su tijekom duljih simulacija (101 ns) ljudske DPP III bez liganda¹¹⁴.

Vizualizacijom strukture aktivnog mjesta enzima (slika 4.34) utvrdili smo da je ion cinka u oba sustava heksa-koordiniran ostacima dva histidina (His450 i His455), dva glutamata (Glu451 i Glu508) i dvije molekule vode kao što je to utvrđeno i u slučaju slobodne DPP III¹¹⁶. Stvaranje/kidanje vodikovih veza karboksilnog kisika OE1 glutamata 508 s His568 odnosno OE2 s His455 korelirano je s fluktuacijama u koordinaciji iona cinka tijekom simulacija u oba sustava. Ovi rezultati upućuju kako vezanje spoja **1'** nema značajnijeg utjecaja na koordinacijsku geometriju katalitičkog iona cinka.

Uvidom u strukturu veznog mjesta optimiziranih kompleksa u posljednjoj ns MD simulacija uočili smo (slika 4.36 i 4.37) da spoj **1'** najviše interakcija ostvaruje međudjelovanjem imidazolinskih skupina s ostacima Ser108, Gly110, Asp111, Tyr318 i Ala416 donje te s ostacima Tyr417, Asn545, Met569 i Glu667 gornje domene. Uključenost benzimidazolnih skupina pri vezanju spoja **1'** nešto je manja, a ostvaruje se interakcijama s ostatkom Tyr318 donje te s ostacima Tyr417, Gln566, His568, i Arg669 gornje domene, dok fenilne skupine međudjeluju s Phe109 donje te s ostacima Ile386, Pro387, Ala388, Phe556, Gln566, Met569 i Arg669 iz gornje domene. Zbog prisutnosti interakcija spoja **1'** s ostacima Ser108, Tyr318, Tyr417, Gln566, His568 i Glu667 u oba promatrana sustava kao i neznatnih razlika u slobodnoj energiji vezanja čini se da ovi ostaci imaju važnu ulogu pri vezanju i stabilizaciji spoja **1'** u blizini aktivnog mjesta DPP III.

Specifičnost djelovanja

Specifičnost djelovanja derivata benzimidazola koji su pokazali najjači inhibitorni učinak na ljudsku DPP III (**1'**, **2'**, **5'**, **6'** i **8'**) provjerili smo na izoliranoj cink-aminopeptidazi PSA. Navedeni spojevi inhibirali su enzim uz IC_{50} koji je bio malo niži od onih izmjerenih za ljudsku DPP III što je ukazivalo kako izabrani spojevi imaju nešto potentnije inhibitorno djelovanje na PSA. Kao i u slučaju ljudskog enzima najjači inhibitorni učinak imao je spoj **5'** ($IC_{50} = 0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$). Detaljnije ispitivanje tipa inhibicije proveli smo sa spojem **1'** te utvrdili da je inaktivacija enzima ovim spojem kao i u slučaju ljudske DPP III vremenski ovisna. Međutim, veliki povrat enzimske aktivnosti ($\sim 90\%$) primijećen je razrjeđenjem (50 puta) inkubacijske smjese potpuno inaktiviranog enzima s $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ otopinom spoja **1'** što je ukazivalo na reverzibilni, a time i drugačiji kataktera inhibicije PSA izabranim derivatom benzimidazola u odnosu na pokazani ireverzibilni karakter inhibicije ljudske DPP III istim spojem.

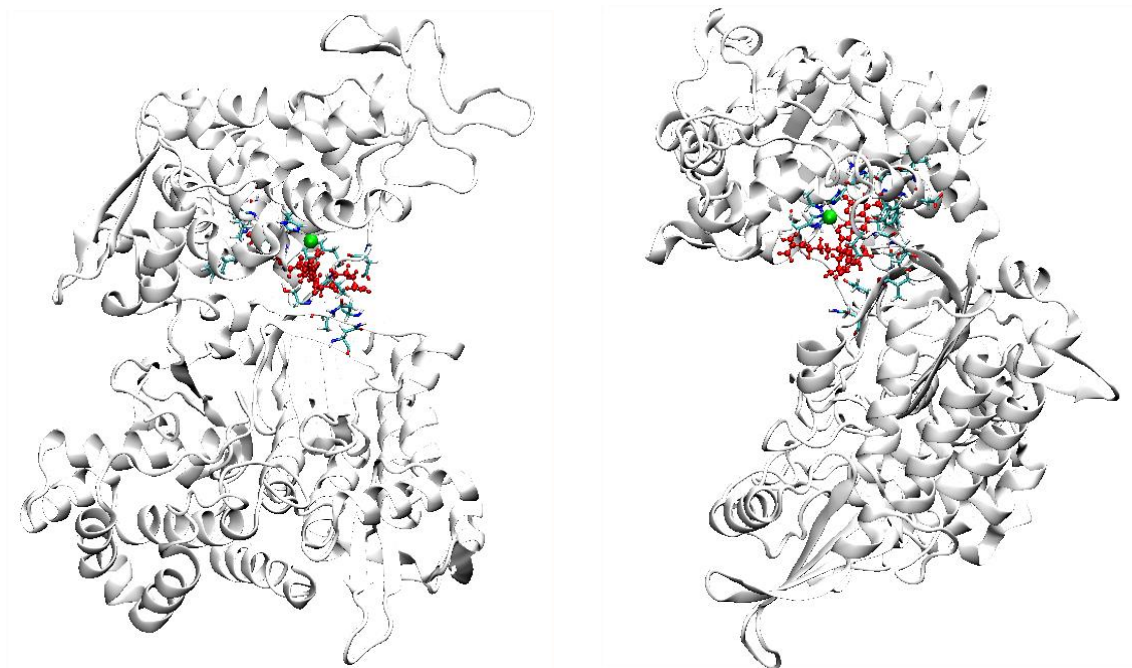
Izostanak inhibitornog djelovanja spojevima **1'**, **2'**, **5'**, **6'** i **8'** pri koncentraciji od $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ primijećen je za serinsku peptidazu DPP IV¹⁸¹. Aminopeptidaza N iz svinjskog bubrega inhibirana je ovim spojevima uz IC_{50} sličan onima za ljudsku DPP III uz pokazan reverzibilni karakter inhibicije spojem **1'**, dok je pročišćena rekombinantna DPP III kvasca inhibirana spojem **1'** uz IC_{50} od $3 \mu\text{mol L}^{-1}$ (neobjavljeni podaci N. Jajčanin Jozić).

U svrhu dobivanja detaljnijih podataka o načinu vezanja spoja **1'** s kvašćevom DPP III proveli smo MD simulacije njihovog kompleksa, dok smo usporedbom dobivenih struktura sa strukturama simulirane kvaščeve DPP III bez liganda utvrdili utjecaja ovog spoja na strukturu i fleksibilnost enzima kako je to navedeno u sljedećem poglavlju.

Simulacije molekulskom dinamikom kvaščeve DPP III u kompleksu sa spojem **1'**

Uvidom u strukture kvaščeve DPP III u kompleksu sa spojem **1'** kao i slobodnog enzima tijekom 30 ns MD simulacija uočili smo pomak gornje i donje proteinske domene jedne prema drugoj (slika 4.47 i 4.38) pri čemu nije došlo do bitnih promjena u njihovom prostornom obliku (slika 4.49). Kod simulacija kompleksa značajnije smanjenje udaljenosti Gly509-Val189 i kuta što ga čine Val189-Leu418-Lys628 javlja se nakon prvih 8 ns simulacije kompleksa (slika 4.48), dok su kod slobodnog enzima navedene promjene izražene

u posljednjih 6 ns MD simulacija (slika 4.40) što bi upućivalo da vezanje spoja **1'** pridonosi bržem približavanju domena. Opisane promjene vjerojatno su uzrokovane položajem (slika 5.5) i međudjelovanjem imidazolinskih skupina spoja **1'** uglavnom s ostacima Asn400, Phe413 i Asn415 donje te Leu422, His460 i Val457 gornje domene (slika 4.55) što pridonosi bržoj konformacijskoj promjeni proteina.



Slika 5.5. Pogled sprijeda i sa strane na strukturu kvaščeve DPP III u kompleksu sa spojem **1' u posljednjoj ns MD simulacija.** Spoj **1'** prikazan je modelom kuglica i štapića crvene boje, položaji aminokiselina u međudjelovanju sa spojem **1'** modelom štapića, dok je ion cinka označen zelenom kuglicom.

Usporedna analiza rmsd i radijusa giracije enzima tijekom navedenih simulacija kompleksa (slika 4.50 i 4.51) upućuje na utjecaj spoja **1'** na brzinu konformacijskih promjena proteina, naime kod enzima u kompleksu povećanje globularnosti opaženo je nakon 10 ns, dok se kod slobodnog enzima ove promjene javljaju tek u završnoj fazi simulacije.

Vezanje spoja **1'** utjecalo je i na smanjenje relativne fleksibilnosti dijelova donje (ostaci 322-341 i 390-403) i gornje domene (449-464, 514-519) koji grade veći dio rascjepa i okružuju spoj **1'**. Vezanje spoja **1'** utjecalo na promjenu oblika proteina, no ne i na njegovu strukturu (tablica 4.17).

Katalitički ion cinka je tijekom MD simulacija pretežno heksa-koordiniran s ostacima His460, His465, Glu461, Glu517 i s dvije molekule vode. Ovakva oktaedarska koordinacija cinka (slika 4.53) razlikuje se od one u kristalnoj strukturi kvaščeve enzima (PDB kod: 3csk)

u kojoj je cink koordiniran s His460, His465 i Glu461 te jednom molekulom vode koja popunjava tetraedarsku koordinacijsku geometriju metala. Uzrok bidentatne koordinacije cinka koja se ostvaruje s ostatkom Glu517 tijekom duljeg razdoblja simulacije kvašćeve DPP III je stvaranja vodikove veze između kisika OE1 glutamata 517 i bočnog lanca His578 čime se kisik OE1 pomiče i ulazi u koordinacijsku sferu cinka. U odnosu na slobodan enzim, kod kompleksa se koordinacija cinka s Glu517 ostvaruje uglavnom monodentatno s kisikom OE1/OE2. Ovakva koordinacija uzrok je stvaranja elektrostatskih interakcija His578 s benzimidazolnim prstenom spoja **1'** što pridonosi njegovom udaljavanju od Glu517 i onemogućava stvaranje vodikove veze između njihovih bočnih lanaca.

Analizu interakcija spoja **1'** s kvašćevom DPP III proveli smo na strukturi dobivenoj u posljednjoj ns MD simulacija. Uočili smo (slika 4.55) kako spoj **1'** s enzimom ostvaruje niz privlačnih elektrostatskih i van der Waalsovih interakcija (tablica 4.18). Najviše interakcija ostvaruje se preko imidazolinskih i benzimidazolnih skupina spoja **1'** na položajima 1 i 3 s ostacima Arg408 i Asn400 donje odnosno ostacima Ile399, Phe413, Ser418, Leu422, Val457, His460 i His578 gornje domene. Elektrostatske interakcije fenilnih skupina na položaju 2 i 4 s ostacima Asn415 i Glu461 gornje odnosno Glu325 kao i međudjelovanje ciklobutanskog prstena s Gly398 i Ile399 dodatno doprinosi vezanju spoja **1'** u područje aktivnog mjesta enzima. Smanjenje slobodne energije vezanja od $\sim 6 \text{ kcal/mol}^{-1}$ između početne i završne faze simulacije (tablica 4.19) upućuje na postupno jačanje protein-ligand interakcija.

Molekulske dinamičke simulacije kvašćeve DPP III u kompleksu s hidroksamnim spojem Tyr-Phe-NHOH

Derivati hidroksamske kiseline koji predstavljaju analoge supstrata pokazali su se kao snažni inhibitori metalopeptidaza porodice M49^{2,14,109}. U cilju razjašnjavanja i otkrivanja razlika ponešto drugačijeg inhibitornog potencijala hidroksamata Tyr-Phe-NHOH prema kvašćevom i ljudskom ortologu, za kvašćev enzim $K_i \sim 0,04 \mu\text{mol L}^{-1}$ ¹⁰⁹, a za ljudski ortolog $K_i \sim 0,15 \mu\text{mol L}^{-1}$ ⁵⁴, proveli smo molekulske dinamičke studije. Simulacije kompleksa ljudske DPP III s Tyr-Phe-NHOH ranije su provedene (Tomić i sur, 2011)¹¹⁶, a tijekom ovog rada simulirana su dva kompleksa kvašćeve DPP III s različito orijentiranim Tyr-Phe-NHOH (oba po 30 ns). U prvom kompleksu (yDPP III-HS1) karbonilni kisik prve peptidne veze s N-kraja inhibitora koordinirao je katalitički ion cinka dok je u drugom kompleksu (yDPP III-HS2) ta veza ostvarena putem karbonilnog kisika druge peptidne veze s N-kraja.

Uspoređujući strukture kompleksa tijekom MD simulacija s početnom strukturom (slika 4.56) uočili smo međusobno približavanje domena, pri čemu je pomak bio nešto izraženiji kod kompleksa yDPPIII-HS2, međutim prostorni oblik proteinskih domena kod oba kompleksa nije se značajnije mijenjao (slika 4.58). Zanimljivo je kako se udaljenosti Gly509-Val189 (slika 4.57A) nisu bitno mijenjale tijekom simulacija kompleksa, a kako je u posljednjim fazama simulacije slobodnog enzima (slika 4.40A) primijećeno smanjenje ove udaljenosti, što upućuje da vezanje inhibitora na neki način ometa međusobno približavanje domena. Nadalje, tijekom simulacija udaljenost Gly509-Leu409 se kod kompleksa yDPP III-HS2 povećala dok se u kompleksu yDPP III-HS1 nije bitno mijenjala (slika 4.57B). Mogući uzrok ovoj razlici je veći broj interakcija koje inhibitor u kompleksu yDPP III-HS1 (slika 4.64), u odnosu na kompleks yDPP III-HS2 (slika 4.65), ostvaruje s ostacima gornje i donje domene. Čvršće vezanje inhibitora u kompleksu yDPP III-HS1 rezultira jačom stabilizacijom konformacije enzima u odnosu na kompleks yDPP III-HS2. Utjecaj Tyr-Phe-NHOH na stabilizaciju strukture enzima u slučaju kada je interakcija s ionom cinka ostvarena putem prve peptidne veze potvrđen je i praćenjem promjena kuta Val189-Leu418-Lys628 (slika 4.57 C) tijekom MD simulacija. Naime, u odnosu na kompleks yDPP III-HS2 i slobodnu kvašćevu DPP III, gdje je u posljednjih 6 ns primijećeno značajnije zatvaranje ovog kuta, (slika 4.40C) on se u kompleksu yDPP III-HS1 nije bitno mijenjao. Tome u prilog idu i usporedni rezultati rmsd navedenih kompleksa sa slobodnom kvašćevom DPP III koji upućuju da vezanje inhibitora uzrokuje stabilizaciju proteina kod kompleksa yDPP III-HS1. Stvaranje većeg broja interakcija kompleksa yDPP III-HS1 u odnosu na yDPP III-HS2 u skladu je s izračunatom slobodnom energijom vezanja koja je $\sim 9 \text{ kcal mol}^{-1}$ niža za kompleks yDPP III-HS1 što ukazuju kako je vezanje inhibitora za enzim jače u odnosu na yDPP III-HS2.

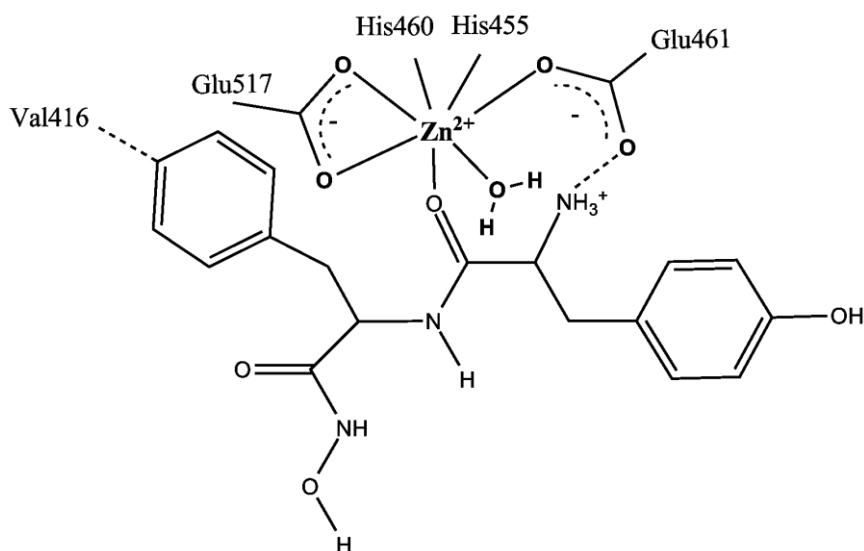
Iako je globularnost proteina (slika 4.60 i tablica 4.20) u oba kompleksa bila nešto veća u konačnim strukturama u odnosu na početne, tijekom simulacija njezine promjene u slučaju kompleksa yDPP III-HS1 su neznatne, dok su promjene kod kompleksa yDPP III-HS2 značajne. Usporedbom analiza Δrmsf slobodnog enzima (slika 4.44) s Δrmsf kompleksa yDPP III-HS1 (slika 4.62) u posljednje dvije ns možemo zaključiti da vezanje inhibitora utječe na povećanje relativne fleksibilnosti manjeg dijela donje domene (ostaci 232-254, 272-292 i 681-692) koji grade „vanjski dio“ proteina udaljen od rascjapa te smanjenje relativne fleksibilnosti velikog dijela gornje domene (ostaci 448-464, 512-531, 547-567 i 574-590). Vezanje inhibitora u kompleksu yDPP III-HS2 imalo je utjecaja na povećanje relativne fleksibilnosti dijelova donje domene (ostaci 16-49, 136-151, i 215-317) te smanjenje

relativne fleksibilnosti većeg dijela gornje domene (ostaci 349-664) u odnosu na Δ rmsf slobodne DPP III. Povećana je relativna fleksibilnost dijela gornje domene (ostaci 547-567 i 574-590) u kompleksu yDPP III-HS2 u odnosu na relativnu fleksibilnost ovih ostataka kod kompleksa yDPP III-HS1.

Analizom koordinacijske sfere cinka utvrdili smo kako je tijekom čitavog razdoblja simulacije metalni ion uglavnom heksa-koordiniran ostacima His465, His460, Glu461, Glu517, i karbonilnim kisikom prve (kod yDPP III-HS1) odnosno druge (kod yDPP III-HS2) peptidne veze s N-kraja inhibitora i jednom molekulom vode (slika 4.63). Premda Marmion i sur.¹⁸² navode mogućnost bidentatnog kompleksiranja metalnih iona hidroksamatnim inhibitorima, naše simulacije pokazuju kako je ono monodentatno u oba sustava što je u skladu s objavljenim rezultatima MD simulacija kompleksa ljudske DPP III s Tyr-Phe-NHOH gdje je koordinacija supstrata s ionom cinka ostvarena putem karbonilnog kisika druge peptidne veze od njegova N-kraja¹¹⁶. Stabilna monodentatna koordinacija cinka kisikom OE1 Glu517 u kompleksu yDPP III-HS2 posljedica je stabilne vodikove veze između kisika OE2 ovog ostatka i hidroksamskog ostatka inhibitora što u kompleksu yDPP III-HS1 nije slučaj.

Vizualizacijom veznog mjesta inhibitora u optimiziranim strukturama kompleksa (slika 4.64 i 4.65) dobivenim MD simulacijama uočili smo različit broj i vrste interakcija (tablica 4.22 i 4.23) koje Tyr-Phe-NHOH ostvaruje pri vezanju u područje aktivnog mjesta. Tako je u kompleksu yDPP III-HS1, N-kraj inhibitora stabiliziran vodikovom vezom putem karboksilnog kisika OE1 Glu461 te elektrostatski s His465, dok u kompleksu yDPP III-HS2 N-kraj inhibitora nema direktnih interakcija s enzimom. Hidrofobno okruženje Phe413 omogućuje „face to face“ - „stacking“ međudjelovanje s aromatskim ostatom tirozina na položaju P1 u kompleksu yDPP III-HS1. Položaj P1 dodatno je stabiliziran elektrostatskom vezom i van der Waalsovima privlačnim silama s Asp381. Pored interakcija fenilalanina na položaju P1' s Asn415, Ser417 i His578 koje su uglavnom elektrostatske prirode, stabilizaciji ovog podmjesta pridonosi i vodikova veza s Val416. Hidroksamska skupina inhibitora uglavnom je stabilizirana elektrostatski bočnim lancem Pro577 i s kisikom okosnice Gly513. U kompleksu yDPP III-HS2, Arg403 na podmjestu S2 stabilizira inhibitor putem vodikove veze, daljnjoj stabilizaciji doprinose Asn400 i Arg408. Najviše interakcija s inhibitorom u tom se kompleksu ostvaruje u podmjestu S1 i to uglavnom elektrostatskih, preko Ile399, Asn415, Val 416 i Ser417, a karboksilni kisik OE1 glutamata 517 na podmjestu S1 stabilizira hidroksamsku skupinu putem vodikove veze.

Prema dobivenim rezultatima te dosad objavljenim podacima utjecaja ovoga peptidnog hidroksamata na ljudsku i kvašćevu DPP III možemo pretpostaviti kako je pokazani jači inhibitorski učinak Tyr-Phe-NHOH na kvašćevu DPP III u odnosu na ljudski ortolog vrlo vjerojatno uzrokovan različitom orijentacijom inhibitora u ortolozima (shema 5.2).



Shema 5.2. Prikaz orijentacije i vezanja inhibitora Tyr-Phe-NHOH u aktivno mjesto kvašćeve DPP III kod kompleksa yDPP III-HS1 u 30. ns MD simulacije. Prikazane su samo interakcije enzima s inhibitorom koje su ostvarene vodikovim vezama.

6. ZAKLJUČCI

Primjenom klasičnih biokemijskih metoda iz ljudskih je eritrocita do homogenosti pročišćena dipeptidil-peptidaza III (DPP III) i aminopeptidaza osjetljiva na puromicin (PSA).

Ispitan je inhibitorni učinak 24 nova derivata benzimidazola na ljudsku DPP III i utvrđeno je da spojevi s prisutnom amidino-skupinom inhibiraju ovaj enzim. Ciklizacija ove skupine pojačavala je inhibitorno djelovanje ispitanih spojeva.

Najpotentnije inhibitorno djelovanje na ljudsku DPP III imali su ciklobutanski derivati benzimidazola - spojevi arbitrarno označeni **5'** i **1'**, oba s identičnim amidino-supstituiranim benzimidazolnim skupinama te s *o*-klor fenilnim, odnosno fenilnim skupinama.

Utvrđeno je da inaktivacija ljudske DPP III spojem **1'** pri zadanim uvjetima (veliki molarni suvišak spoja **1'**) slijedi kinetiku pseudo-prvog reda. Izračunata je vrijednost konstante brzine reakcije drugog reda ($6924 \pm 549 \text{ mol}^{-1} \text{ L min}^{-1}$) kao i konstanta disocijacije ($K_i = 0,20 \pm 0.007 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) početnog reverzibilnog kompleksa DPP III i spoja **1'**.

Vizualizacijom struktura kompleksa ljudske DPP III sa spojem **1'** tijekom posljednje, od 40,8 ns molekulsko dinamičkih (MD) simulacija utvrdili smo da spoj **1'** najviše interakcija ostvaruje s ostacima Ser108, Tyr318, Tyr417, Gln566, His568 i Glu667 koji navedeni spoj stabiliziraju u blizini aktivnog mjesta enzima.

Specifičnost inhibitornog djelovanja spoja **1'** provjerili smo na izoliranoj cink-aminopeptidazi PSA te pokazali da ovaj spoj reverzibilno inhibira PSA, za razliku od pokazane ireverzibilne inhibicije ljudske DPP III istim spojem.

Analizom međudjelovanja spoja **1'** i kvaščeve DPP III u strukturi kompleksa dobivenoj u 30. ns MD simulacija ustanovili smo kako spoj **1'** međudjeluje s ostacima Ile399, Asn400, Arg408, Phe413, Asn415, Ser418, Leu422, Val457, His460 i His578. Elektrostatske interakcije s ostacima Glu461, Glu325 i Gly398 dodatno doprinose vezanju spoja **1'** u područje aktivnog mjesta enzima.

Uspoređujući vezno mjesto dvaju kompleksa kvaščeve DPP III s poznatim inhibitorom DPP III, hidroksamatnim spojem Tyr-Phe-NHOH, u strukturama dobivenim MD

simulacijama uočili smo različit broj i vrste interakcija inhibitora u aktivnom mjestu enzima te ustanovili veću stabilnost kompleksa u kojemu je karbonilni kisik prve peptidne veze s N-kraja inhibitora koordinirao katalitički ion cinka.

Izmjerena je kinetika hidrolize sintetskog supstrata arginil-arginil-7-amido-4-metil kumarina (Arg-Arg-AMC) s ljudskom DPP III te su određene kinetičke konstante ($K_m = 13,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ i $k_{\text{cat}} = 3,9 \text{ s}^{-1}$).

Uvid u strukturu kompleksa Arg-Arg-AMC s DPP III u posljednjoj, od 30 ns MD simulacija omogućio je prepoznavanje interakcija supstrata s podmjestima enzima S2, S1 i S1'. Uočena je uloga visoko očuvanih ostataka Asp372, Asn406 i Phe404 u reorganizaciji aktivnog mjesta enzima i stabilizaciji položaja supstrata.

7. POPIS LITERATURE

1. C. López-Otin, and J. S. Bond, Proteases: multifunctional enzymes in life and disease, *J. Biol. Chem.* **283** (2008) 30433-30437.
2. M. Abramić, and Lj. Vitale, Aminopeptidases in the cytosol of mammalian cells, *Acta Pharm.* **44** (1994) 71-85.
3. N. D. Rawlings, A. J. Barrett, and A. Bateman, MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors, *Nucleic Acids Res.* **40** (2012) 343-350.
<http://merops.sanger.ac.uk>
4. M. Abramić, J. Špoljarić, and Š. Šimaga, Prokaryotic homologs help to define consensus sequences in peptidase family M49, *Period. Biol.* **106** (2004) 161-168.
5. J.-M. Chen, and A. J. Barrett, *Dipeptidyl-peptidase III* in: *Handbook of Proteolytic Enzymes*: A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and J. F. Woessner (Eds.) (second edition), Vol. 1, Elsevier, Academic Press, London, 2004, pp. 809-812.
6. T. R. Burkard, M. Planyavsky, I. Kaupe, F. P. Breitwieser, T. Buerckstuemmer, K. L. Bennett, G. Superti-Furga, and J. Colinge, Initial characterization of the human central proteome, *BMC Systems Biology* **5** (2011) 17.
7. K. Fukasawa, K. M. Fukasawa, M. Kanai, S. Fujii, J. Hirose, and M. Harada, Dipeptidyl peptidase III is a zinc metallo-exopeptidase. Molecular cloning and expression, *Biochem. J.* **329** (1998) 275-282.
8. M. Smyth, and G. O'Cuinn, Dipeptidyl aminopeptidase III of guinea-pig brain: Specificity for short oligopeptide sequences, *J. Neurochem.* **63** (1994) 1439-1445.
9. T. Chiba, Y.-H. Li, T. Yamane, O. Ogikubo, M. Fukuoka, R. Arai, S. Takahashi, T. Ohtsuka, I. Ohkubo, and N. Matsui, Inhibition of recombinant dipeptidylpeptidase III by synthetic hemorphin-like peptides *Peptides* **24** (2003) 773-778.
10. M. Baršun, N. Jajčanin, B. Vukelić, J. Špoljarić, and M. Abramić, Human dipeptidyl peptidase III acts as a post-proline-cleaving enzyme on endomorphins, *Biol. Chem.* **388** (2007) 343-348.
11. K. Fukasawa, K. M. Fukasawa, H. Iwamoto, J. Hirose, and 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.
12. P. K. Baral, N. Jajčanin-Jozić, S. Deller, P. Macheroux, M. Abramić, and 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.
13. A. Taylor, Aminopeptidases: structure and function, *FASEB J* **7** (1993) 290-298.
14. J. Špoljarić, B. Salopek-Sondi, J. Makarević, B. Vukelić, D. Agić, Š. Šimaga, N. Jajčanin-Jozić, and M. Abramić, Absolutely conserved tryptophan in M49 family of peptidases contributes to catalysis and binding of competitive inhibitors, *Bioorg. Chem.* **37** (2009) 70-76.

15. A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and J. F. Woessner (Eds.): *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press, London, 2004, pp. XXXIII-XXXV.
16. 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, Calif., (1992).
17. N. D. Rawlings, A. J. Barrett, and A. Bateman, Asparagine peptide lyases. A seventh catalytic type of proteolytic enzymes, *J. Biol.Chem.* 286 (2011) 38321-38328.
18. N. D. Rawlings, and A. J. Barrett, Evolutionary families of peptidases, *Biochem. J.* **290** (1993) 205-218.
19. N. D. Rawlings, D. P. Tolle, and A. J. Barrett: Evolutionary families of peptidase inhibitors, *Biochem. J.* **378** (2004) 705-716.
20. E. Fischer, Einfluss der configuration auf die wirkung der enzyme, *Ber. Dt. Chem. Ges.* **27** (1894) 2985-2993.
21. D. E. Koshland, Application of a theory of enzyme specificity to Protein synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **44** (1958) 98-104.
22. I. Schechter, and A. Berger, On the size of the active site in proteases. I. Papain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27** (1967) 157-162.
23. F. X. Gomis-Rüth, T. O. Botelho, and W. Bode, A standard orientation for metallopeptidases., *Biochim. Biophys. Acta* **1824** (2012) 157-163.
24. H. Neurath, Proteolytic enzymes, past and present, *Fed. Proc.* **44** (1985) 2907-2913.
25. <http://degradome.uniovi.es> (06. 09. 2012.)
26. M. Schenone, B. C. Furie, and B. Furie, The blood coagulation cascade, *Curr. Opin. Hematol.* **11** (2004), 272-277.
27. B. Turk, D. Turk, and V. Turk, Protease signalling: the cutting edge, *The EMBO Journal* **31** (2012) 1630-1643.
28. H. Neurath, Evolution of proteolytic enzymes, *Science*, **224** (1984) 350-357.
29. O. I. Granet, and O. Bertrand, Separation of proteases, old and new approaches, *J Chromatogr. B.* **684** (1996) 239-263.
30. C. López-Otín, and C. M. Overall, Protease degradomics: a new challenge for proteomics, *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **3** (2002) 509-519.
31. W. G. Stetler-Stevenson, L. A. Liotta, and D. E. Kleiner, Extracellular matrix 6: Role of matrix proteinases in tumor invasion and metastasis, *FASEB J.* **7** (1993) 1434-1441.

32. C. Southan, Proteases: Evolution, in: *Encyclopedia of life sciences*, John Wiley & Sons, Ltd. (2008) pp. 1-5.
33. N. D. Rawlings, A. J. Barrett, and A. Bateman, MEROPS: the peptidase database, *Nucleic Acids Res.* **38** (2010) 227-233.
34. A. M. Lambeir, C. Durinx, S. Scharpe, and I. M. De, Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **40** (2003) 209-294.
35. P. Ruiz, S. Mailhot, P. Delgado, A. Amador, A. L. Vician, L. Ferrer, and N. Zacharievich, CD26 expression and dipeptidyl peptidase IV activity in an aggressive hepatosplenic T cell lymphoma, *Cytometry* **34** (1998) 30-35.
36. C. Callebaut, B. Krust, E. Jacotot, and A. G. Hovanessian, T cell activation antigen, CD26, as a cofactor for entry of HIV in CD4⁺ cells, *Science* **262** (1993) 2045-2050.
37. R. Mentlein, Dipeptidyl-peptidase IV (CD26): role in the inactivation of regulatory Peptides, *Regul. Pept.* **85** (1999) 9-24.
38. R. Mentlein, P. Dahms, D. Grandt, and R. Kruger, Proteolytic processing of neuropeptide Y and peptide YY by dipeptidyl peptidase IV, *Regul. Pept.* **85** (1993) 133-144.
39. S. Ahmad, L. Wang, and P. E. Ward, Dipeptidyl(amino)peptidase IV and aminopeptidase M metabolize circulating substance P in vivo, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **260** (1992) 1257-1261.
40. J. Bongers, T. Lambros, M. Ahmad, and E. P. Heimer, Kinetics of dipeptidyl peptidase IV proteolysis of growth hormone-releasing factor and analogs, *Biochim. Biophys. Acta.* **1122** (1992) 147-153.
41. A. E. Weber, Dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of diabetes, *J. Med. Chem.* **47** (2004) 4135-4141.
42. J. White, Dipeptidyl peptidase-IV inhibitors: pharmacological profile and clinical use, *Clinical Diabetes* **26** (2008) 53-57.
43. J. H. Ahn, M. S. Shin, M. A. Jun, S. H. Jung, S. K. Kang, K. R. Kim, S. D. Rhee, N. S. Kang, S. Y. Kim, S. K. Sohn, S. G. Kim, M. S. Jin, J. O. Lee, H. G. Cheon, and S. S. Kim, Synthesis, biological evaluation and structural determination of beta-aminoacyl-containing cyclic hydrazine derivatives as dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17** (2007) 2622-2628.
44. <http://livertox.nlm.nih.gov> (23. 05. 2012.)
45. A. Brik, and C. H. Wong, HIV-1 protease: mechanism and drug discovery, *Org. Biomol. Chem.* **1** (2003) 5-14.

46. N. E. Kohl, E. A. Emini, W. A. Schleif, L. J. Davis, J. C. Heimbach, R. A. Dixon, E. M. Scolnick, and I. S. Sigal, Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85** (1988) 4686-4690.
47. P. J. Piliero, Atazanavir: a novel HIV-1 protease inhibitor, *Expert Opin Investig Drugs* **11** (2002) 1295-1301.
48. N. D. Rawlings and A. J. Barrett, *Introduction: metallopeptidases and their clans in:* A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and J. F. Woessner (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*, (second edition) Vol. 1, Elsevier, Academic Press, London, 2004, pp. 231-268.
49. K. M. Fukasawa, T. Hata, Y. Ono, and J. Hirose, Metal preferences of zinc-binding motif on metalloproteases, *Journal of Amino Acids*, (2011) article ID 574816.
50. W. N. Lipscomb, and N. Sträter, Recent advances in zinc enzymology, *Chem. Rev.* **96** (1996) 2375-2433.
51. N. D. Rawlings, and A. J. Barrett, Evolutionary families of metallopeptidases, *Methods Enzymol.* **248** (1995) 183-228.
52. P. M. Colman, J. N. Jansonius, and B. W. Matthews, The structure of thermolysin: an electron density map at 2,3 Å resolution, *J. Mol. Biol.* **70** (1972) 701-724.
53. W. N. Lipscomb, J. A. Hartscuk, F. A. Quiocho, and G. N. Reeke Jr., The structure of carboxypeptidase A, IX. The X-ray diffraction results in the light of the chemical sequence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **64** (1969) 28-35.
54. B. Salopek-Sondi, B. Vukelić, J. Špoljarić, Š. Šimaga, D. Vujaklija, J. Makarević, N. Jajčanin, and M. Abramić, Functional tyrosine residue in the active center of human dipeptidyl peptidase III, *Biol. Chem.* **389** (2008) 163-167.
55. H. Matsubara, A. Singer, R. Sasaki, and T. H. Jukes, Observations on the specificity of a thermostable bacterial protease "thermolysin", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **21** (1965) 242-247.
56. L. B. Hersh, and K. Morihara, Comparison of the subsite specificity of the mammalian neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) to the bacterial neutral endopeptidase thermolysin, *J. Biol. Chem.* **261** (1986) 6433-6437.
57. D. Grobelny, L. Poncz, and R. E. Galardy, Inhibition of human skin fibroblast collagenase, thermolysin, and *Pseudomonas aeruginosa* elastase by peptide hydroxamic acids, *Biochemistry* **31** (1992) 7152-7154.
58. H. M. Holden, D. E. Tronrud, A. F. Monzingo, L. H. Weaver, and B. W. Matthews, Slow and fast binding transition-state analogues, *Biochemistry* **26** (1987) 8542-8553.
59. O. A. Adekoya, and I. Sylte, The Thermolysin family (M4) of enzymes: Therapeutic and biotechnological potential, *Chem. Biol. Drug* **73** (2009) 7-16.

60. D. A. Auld, *Carboxypeptidase A* in: A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and J. F. Woessner (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*, (second edition) Vol. 1, Elsevier, Academic Press, London, 2004, pp. 812-821.
61. J. Vendrell, E. Querol, and F. X. Avilés. Metallo-carboxypeptidases and their protein inhibitors, Structure, function and biomedical properties, *Biochim. Biophys. Acta* **1477** (2000) 284-298.
62. D. C. Rees, M. Lewis, and W. N. Lipscomb, Refined crystal structure of carboxypeptidase A at 1.54 Å resolution, *J. Mol. Biol.* **168** (1983) 367-387.
63. D. W. Christianson, P. R. David, and W. N. Lipscomb. Mechanism of carboxypeptidase A: hydration of a ketonic substrate analogue, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **84** (1987) 1512-1515.
64. H. Kim, and W. N. Lipscomb, Crystal structure of the complex of carboxypeptidase A with a strongly bound phosphonate in a new crystalline form: comparison with structures of other complexes, *Biochemistry* **29** (1990) 5546-5555.
65. D. W. Christianson, and W. N. Lipscomb, Carboxypeptidase A, *Acc. Chem. Res.* **22** (1989) 62-69.
66. F. X. Avilés, J. Vendrell, A. Guasch, M. Coll, and R. Huber, Advances in metallo-procarboxypeptidases. Emerging details on the inhibition mechanism and on the activation process, *Eur. J. Biochem.* **211** (1993) 381-389.
67. C. K. Brown, K. Madauss, W. Lian, M. R. Beck, W. D. Tolbert, and D.W. Rodgers, Structure of neurolysin reveals a deep channel that limits substrate access. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** (2001) 3127-3132.
68. R. E. Isaac, N. D. Bland, and A. D. Shirras, Neuropeptidases and the metabolic inactivation of insect neuropeptides, *Gen. Comp. Endocr.* **162** (2009) 8-17.
69. C. N. Shrimpton, A. I. Smith, and R. A. Lew, Soluble metalloendopeptidases and neuroendocrine signaling, *Endocr. Rev.* **23** (2002) 647-664.
70. L. T. Skeggs, J. R. Kahn, and N. P. J. Shumway, The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme, *Exp. Med.* **103** (1956) 295-299.
71. A. J. Turner, and N. M. Hooper, The angiotensin-converting enzyme gene family: Genomics and pharmacology, *Trends Pharmacol. Sci.* **23** (2002) 177-183.
72. L. Wei, F. Alhenc-Gelas, P. Corvol, and E. Clauser, The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active, *J. Biol. Chem.* **266** (1991) 9002-9008.
73. F. Soubrier, F. Alhenc-Gelas, C. Hubert, J. Allegrini, M. John, G. Tregear, and P. Corvol, Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **85** (1988) 9386-9390.

74. A. Michaud, T. A. Williams, M. T. Chauvet, and P. Corvol, Substrate dependence of angiotensin I-converting enzyme inhibition: Captopril displays a partial selectivity for inhibition of N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline hydrolysis compared with that of angiotensin I, *Molecular Pharmacology* **51** (1997) 1070-1076.
75. M. A. Kerr, and A. J. Kenny, The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border, *Biochem. J.* **137** (1974) 477-488.
76. C. Oefner, A. D'Arcy, M. Hennig, and F. K. Winkler, Structure of human neutral endopeptidase (Neprilysin) complexed with phosphoramidon, *J. Mol. Biol.* **296** (2000) 341-349.
77. J. A. Carson, and A. J. Turner, β -Amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases?, *J. Neurochem.* **81** (2002) 1-8.
78. A. J. Turner, *Neprilysin* in: A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and J. F. Woessner (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*, (second edition) Vol. 1, Elsevier, Academic Press, London, 2004, pp. 419-426.
79. E. Malito, R. E. Hulse, and W.-J. Tang, Amyloid β -degrading cryptidases: insulin degrading enzyme, presequence peptidase, and neprilysin, *Cell. Mol. Life Sci.* **65** (2008) 2574-2585.
80. M. H. Mohajeri, K. Kuehnle, H. Li, R. Poirier, J. Tracy and R. M. Nitsch, Anti-amyloid activity of neprilysin in plaque-bearing mouse models of Alzheimer's disease, *FEBS Lett.* **562** (2004) 16-21.
81. L. B. Hersh, Solubilization and characterization of two rat brain membrane bound aminopeptidases active on Met-enkephalin, *Biochemistry* **20** (1981) 2345-2350.
82. S. H. Dyer, C. A. Slaughter, K. Orth, C. R. Moomaw, and L. B. Hersh, Comparison of the soluble and membrane-bound forms of the puromycin-sensitive enkephalin-degrading aminopeptidases from rat, *J. Neurochem.* **54** (1990) 547-554.
83. S. McLellan, S. H. Dyer, G. Rodriguez and L. B. Hersh, Studies on the tissue distribution of the puromycin-sensitive enkephalin-degrading aminopeptidases. *J. Neurochem.* **51** (1988) 1552-1559.
84. M. Abramić, and Lj. Vitale, Basic Amino Acids Preferring Broad Specificity Aminopeptidase from Human Erythrocytes, *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **373** (1992) 375-380.
85. Y. Yamamoto, Y. H. Li, K. Huang, I. Ohkubo, and K. Nishi, Isolation and characterization of an alanyl aminopeptidase from rat liver cytosol as a puromycin-sensitive enkephalin-degrading aminopeptidase, *Biol Chem.* **379** (1998) 711-719.
86. P. M. Dando, and A. J. Barrett, *Aminopeptidase PS* in: A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and J. F. Woessner (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*, (second edition) Vol. 1, Elsevier, Academic Press, London, 2004, pp. 313-316.

87. L. Stoltze, M. Schirle, G. Schwarz, C. Schroter, M. W. Thompson, L. B. Hersh, H. Kalbacher, S. Stevanovic, H. G. Rammensee, and H. Schild, Two new proteases in the MHC class I processing pathway, *Nat. Immunol.* **1** (2000) 413-418.
88. C. Schonlein, J. Loffler, and G. Huber, Purification and characterization of a novel metalloprotease from human brain with the ability to cleave substrates derived from the N-terminus of β -amyloid protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201** (1994) 45-53.
89. N. Bhutani, P. Venkatraman, and A. L. Goldberg, Puromycin-sensitive aminopeptidase is the major peptidase responsible for digesting polyglutamine sequences released by proteasomes during protein degradation. *EMBO J.* **26** (2007) 1385-1396.
90. S. L. Karsten, T. K. Sang, L. T. Gehman et al., A genomic screen for modifiers of tauopathy identifies puromycin-sensitive aminopeptidase as an inhibitor of tau-induced neurodegeneration, *Neuron* **51** (2006) 549-560.
91. K. Yanagi, T. Tanaka, K. Kato, G. Sadik, T. Morihara, T. Kudo, and M. Takeda, Involvement of puromycin-sensitive aminopeptidase in proteolysis of tau protein in cultured cells, and attenuated proteolysis of frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17) mutant tau, *Psychogeriatrics* **9** (2009) 157-166.
92. G. Ren, Z. Ma, M. Hui, L. C. Kudo, K. S. Hui, and S. L. Karsten, Cu, Zn-superoxide dismutase 1 (SOD1) is a novel target of Puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA/NPEPPS): PSA/NPEPPS is a possible modifier of amyotrophic lateral sclerosis, *Mol. Neurodegener.* **6** (2011) 29.
93. S. Ellis, and J. M. Nuenke, Dipeptidyl arylamidase III of the pituitary. Purification and characterization, *J. Biol. Chem.* **242** (1967) 4623-4629.
94. C.-M. Lee, and S. H. Snyder, Dipeptidyl-aminopeptidase III of rat brain. Selective affinity for enkephalin and angiotensin, *J. Biol. Chem.* **257** (1982) 12043-12050.
95. M. Abramić, M. Zubanović, and Lj. Vitale, Dipeptidyl peptidase III from human erythrocytes, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **369** (1988) 29-38.
96. Y. Shimamori, Y. Watanabe and Y. Fujimoto, Purification and characterization of dipeptidyl aminopeptidase III from human placenta, *Chem. Pharm. Bull.* **34** (1986) 3333-3340.
97. A. A. Swanson, B. Albers-Jackson, and J. K. McDonalds, Mammalian lens dipeptidyl aminopeptidase III, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **84** (1978) 1151-1159.
98. S. Dhanda, H. Singh, J. Singh, and T. P. Singh, Isolation, purification and characterization of a DPP-III homologue from goat brain, *Protein Expres. Purif.* **52** (2007) 297-305.
99. I. Ohkubo, Y.-H. Li, T. Maeda, Y. Yamamoto, T. Yamane, P.-G. Du, and K. Nishi, Dipeptidyl peptidase III from rat liver cytosol: Purification, molecular cloning and immunohistochemical localization, *Biol. Chem.* **380** (1999) 1421-1430.

100. M. Abramić, D. Schleuder, Lj. Dolovčak, W. Schröder, K. Strupat, D. Šagi, J. Peter-Katalinić, and Lj. Vitale, Human and rat dipeptidyl peptidase III: Biochemical and mass spectrometric arguments for similarities and differences, *Biol. Chem.* **381** (2000) 1233-1243.
101. M. A. Sentandreu, and F. Toldrá, Biochemical properties of dipeptidyl peptidase III purified from porcine skeletal muscle, *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 3977-3984.
102. C. Mazzocco, K. M. Fukasawa, P. Auguste, and J. Puiroux, Characterization of a functionally expressed dipeptidyl aminopeptidase III from *Drosophila melanogaster*, *Eur. J. Biochem.* **270** (2003) 3074-3082.
103. J. Huang, J. Kim, P. Ramamurthy and T. H. D. Jones, The purification, specificity, and role of dipeptidyl peptidase III in *Dictyostelium discoideum*, *Exp. Mycol.* **16** (1992) 102-109.
104. Y. Watanabe, Y. Kumagai, and Y. Fujimoto, Presence of a dipeptidyl aminopeptidase III in *Saccharomyces cerevisiae*, *Chem. Pharm. Bull.* **38** (1990) 246-248.
105. B. Vukelić, B. Salopek-Sondi, J. Špoljarić, I. Sabljic, N. Meštrović, D. Agić, and M. Abramić, Reactive cysteine in the active-site motif of *Bacteroides thetaiotaomicron* dipeptidyl peptidase III is a regulatory residue for enzyme activity, *Biol. Chem.* **393** (2012) 37-46.
106. L. Čičin-Šain, Š. Šimaga, A. Froebe, and M. Abramić, Central aminopeptidase and serotonin system activities: Possible relationship, *Neuropeptides* **42** (2008) 435-440.
107. C. Mazzocco, K. M. Fukasawa, A.-A. Raymond, and J. Puiroux, Purification, partial sequencing and characterization of an insect membrane dipeptidyl aminopeptidase that degrades the insect neuropeptide proctolin, *Eur. J. Biochem.* **268** (2001) 4940-4949.
108. T. Vanha-Perttula, Dipeptidyl peptidase III and alanyl aminopeptidase in the human seminal plasma: origin and biochemical properties, *Clin. Chim. Acta* **177** (1988) 179-195.
109. N. Jajčanin-Jozić, doktorska disertacija, Biokemijska i strukturna karakterizacija dipeptidil-peptidaze III iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, 2011.
110. Y. Shimamori, Y. Watanabe, and Y. Fujimoto, Human placental dipeptidyl aminopeptidase III: hydrolysis of enkephalins and its stimulation by cobaltous ion, *Biochem. Med. Metab. Biol.* **40** (1988) 305-310.
111. E. Dobrovetsky, A. Dong, A. Seitova, B. Duncan, L. Crombet, M. Sundstrom, C. H. Arrowsmith, A. M. Edwards, C. Bountra, A. Bochkarev and D. Cossar, Crystal structure of human dipeptidyl peptidase III, *Structural Genomics Consortium* (2009) to be published.
112. S. C. Prajapati and S. S. Chauhan, Dipeptidyl peptidase III: a multifaceted oligopeptide N-end cutter, *FEBS J.* **278** (2011) 3256-3276.
113. Usporedba provedena metodom blast2seq odnosno jFATCAT rigid putem PDB servera (<http://www.rcsb.org/pdb/workbench/workbench.do>).

114. A. Tomić, M. González and S. Tomić, The large scale conformational change of the human DPP III-substrate prefers the "closed" form, *J Chem. Inf. Model.* **6** (2012) 1583-1594.
115. G. A. Bezerra, E. Dobrovetsky, R. Viertlmayr, A. Dong, A. Binter, M. Abramić, P. Macheroux, S. Dhe-Paganon, and K. Gruber, Entropy-driven binding of opioid peptides induces a large domain motion in human dipeptidyl peptidase III, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109** (2012) 6525-6530.
116. A. Tomić, M. Abramić, J. Špoljarić, D. Agić, D. M. Smith, and S. Tomić, Human dipeptidyl peptidase III: Insights into ligand binding from a combined experimental and computational approach, *J. Mol. Recognit.* **24** (2011) 804-814.
117. S. Dhanda, J. Singh, and H. Singh, Hydrolysis of various bioactive peptides by goat brain dipeptidylpeptidase-III homologue, *Cell Biochem. Funct.* **26** (2008) 339-345.
118. M. Abramić, Š. Šimaga, M. Osmak, L. Čičin-Šain, B. Vukelić, and K. Vlahoviček, Highly reactive cysteine residues are part of the substrate binding site of mammalian dipeptidyl peptidases III, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36** (2004) 434-446.
119. H. Sato, K. Kimura, Y. Yamamoto, and T. Hazato, Activity of DPP III in human cerebrospinal fluid derived from patients with pain, *Jpn. J. Anesthesiol.* **52** (2003) 257-263.
120. M. Allard, G. Simonnet, B. Dupouy, and J. D. Vincent, Angiotensin II inactivation process in cultured mouse spinal cord cells, *J. Neurochem.* **48** (1987) 1553-1559.
121. Š. Šimaga, D. Babić, M. Osmak, J. Ilić-Forko, Lj. Vitale, D. Miličić, and M. Abramić, Dipeptidyl peptidase III in malignant and non-malignant gynaecological tissue, *Eur. J. Cancer* **34** (1998) 399-405.
122. Š. Šimaga, D. Babić, M. Osmak, M. Šprem, and M. Abramić, Tumor cytosol dipeptidyl peptidase III activity is increased with histological aggressiveness of ovarian primary carcinomas, *Gynecol. Oncol.* **91** (2003) 194-200.
123. H. Zhang, Y. Yamamoto, S. Shumiya, M. Kunimatsu, K. Nishi, and I. Ohkubo, Peptidases play an important role in cataractogenesis: An immunohistochemical study on lenses derived from Shumiya cataract rats, *Histochem. J.* **33** (2001) 511-521.
124. Y. Liu, J. T. Kern, J. R. Walker, J. A. Johnson, P. G. Schultz, and H. Luesch, An genomic screen for activators of the antioxidant response element, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104** (2007) 5205-5210.
125. E. Kecorius, D. H. Small, and B. G. Livett, Characterization of a dipeptidyl aminopeptidase from bovine adrenal medulla, *Journal of Neurochemistry*, **50** (1988) 38-44.
126. Y. H. Li, T. Maeda, T. Yamane, and I. Ohkubo, Alteration of rat dipeptidyl peptidase III by site-directed mutagenesis: Cysteine¹⁷⁶ is a regulatory residue for the enzyme activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276** (2000) 553-558.
127. N. Jajčanin-Jozić, S. Deller, T. Pavkov, P. Macheroux, and M. Abramić, Identification of the reactive cyteine residues in yeast dipeptidyl peptidase III, *Biochimie* **92** (2010) 89-96.

128. Y. Inaoka, and H. Tamaoki, Purification and characterization of enkephalinase B from rat brain membrane, *Biochim. Biophys. Acta* **925** (1987) 27-35.
129. T. Nishikiori, F. Kawahara, H. Naganawa, Y. Muraoka, T. Aoyagi, and H. Umezawa, Production of acetyl-Largininal, inhibitor of dipeptidyl aminopeptidase III by bacteria, *J. Antibiot.* **37** (1984) 680-681.
130. T. Akiyama, S. Harada, F. Kojima, Y. Takahashi, C. Imada, Y. Okami, Y. Muraoka, T. Aoyagi, and T. Takeuchi, Fluostatins A and B, new inhibitors of dipeptidyl-dipeptidase III, produced by *Streptomyces* sp. TA-3391. I. Taxonomy of producing strain production, isolation, physico-chemical properties and biological properties, *J. Antibiot.* **51** (1998) 553-559.
131. [http:// www.bikaken.or.jp](http://www.bikaken.or.jp) (09. 10. 2012.)
132. K. Nishimura, and T. Hazato, Isolation and identification of an endogenous inhibitor of enkephalin-degrading enzymes from bovine spinal cord, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194** (1993) 713-719.
133. Y. Yamamoto, H. Kanazawa, M. Shimamura, M. Ueki, and T. Hazato, Inhibitory action of spinorphin, an endogenous regulator of an kephalin-degrading enzyme on carrageenan-induced polymorphonuclear neutrophil accumulation in mouse air-pouches, *Life Sci.* **62** (1998) 1767-1773.
134. Y. Yamamoto, J.-I. Hashimoto, M. Shimamura, T. Yamaguchi, and T. Hazato, Characterization of tynorphin, a potent endogenous inhibitor of dipeptidyl peptidase III, *Peptides* **21** (2000) 503-508.
135. J. Špoljarić, A. Tomić, B. Vukelić, B. Salopek-Sondi, D. Agić, S. Tomić, and M. Abramić, Human Dipeptidyl Peptidase III: the Role of Asn406 in Ligand Binding and Hydrolysis, *Croatica Chemica Acta* **84** (2011) 259-268.
136. J. Nagatsu, T. Nagatsu, T. Yamamoto, G. G. Glenner, and J. W. Mehl, Purification of aminopeptidase A in human serum and degradation of angiotensin II by the purified enzyme, *Biochim. Biophys. Acta.* **198** (1970) 255-270.
137. H. Lineweaver, and D. Burk, "The Determination of Enzyme Dissociation Constants", *Journal of the American Chemical Society* **56** (1934) 658-666.
138. C. S. Hanes, Studies on plant amylases. I. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley, *Biochem. J.* **26** (1932) 1406-1421.
139. E. Hempelmann, and R. Kaminsky, Long term stability of colors after silver staining, *Electrophoresis* **7** (1986) 481.
140. U. K. Laemlli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227** (1970) 680-685.

141. M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72** (1976) 248-254.
142. K. Tornheim, Kinetic applications using high substrate and competitive inhibitor concentrations to determine K_i or K_m , *Anal. Biochem.* **221** (1994) 53-56.
143. M. A. González, Force fields and molecular dynamics simulations. *Collection SFN* **12** (2011) 169-200.
144. P. T. Lang, D. Moustakas, S. Brozell, N. Carrascal, S. Mukherjee, S. Pegg, K. Raha, D. Shivakumar, R. Rizzo, D. Case, B. Shoichet, and I. Kuntz, DOCK 6.1 ed., University of California, San Francisco (2007).
145. G. Morris, D. Goodsell, R. Halliday, R. Huey, W. Hart, R. K. Belew, and A. J. Olson, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *Journal of Computational Chemistry* **19** (1998) 1639-1662.
146. M. L. Verdonk, J. C. Cole, M. J. Hartshorn, C. W. Murray, and R. D. Taylor, Improved protein-ligand docking using GOLD, *Proteins-structure function and genetics* **52** (2003) 609-623.
147. <http://www.rcsb.org> (08.09. 2012.)
148. A. R. Leach, Molecular Modelling: Principles and applications, second ed., Pearson Education EMA, UK, (2001).
149. L. Verlet, Computer experiments on classical fluids. I. Thermodynamic properties of Lennard-Jones molecules. *Phys. Rev* **159** (1967) 98-103.
150. W. C. Swope, H. C. Andersen, P. H. Berens, and K. R. Wilson, A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules: Application to small water clusters. *The Journal of Chemical Physics* **76** (1982) 637-648.
151. L. Noakes, A global algorithm for geodesics. *J. Math. Australian Soc. Series A.* **64** (1999) 37-50.
152. D. Beeman, Some multistep methods for use in molecular dynamics calculations, *Journal of Computational Physics* **20** (1976) 130-139.
153. J. P. Ryckaert, G. Ciccotti, and H. J. C. Berendsen, Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of *n*-alkanes, *Journal of Computational Physics* **23** (1977) 327-341.

154. D. A. Case, T. A. Darden, T. E. III. Cheatham, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R. Luo, M. Crowley, R. C. Walker, W. Zhang, K. M. Merz, B. Wang, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, I. Kolossváry, K. F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, X. Wu, S. R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, L. Yang, C. Tan, J. Mongan, V. Hornak, G. Cui, D. H. Mathews, M. G. Seetin, C. Sagui, V. Babin, and P. A. Kollman, AMBER 10, University of California: San Francisco, CA, (2008).
155. <http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html/index.html> (15. 09. 2012.)
156. Chemdraw Ultra, ver. 10.0, ChemOffice, CambridgeSoft.
157. N. Mills, ChemDraw Ultra 10.0, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 13649-13650.
158. Chem3D Ultra, ver. 10.0, ChemOffice, CambridgeSoft.
159. Y. Duan, C. Wu, S. Chowdhury, M. C. Lee, G. Xiong, W. Zhang, R. Yang, P. Cieplak, R. Luo, T. Lee, J. Caldwell, J. Wang, and P. Kollman, A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J. Comput. Chem.* **24** (2003) 1999-2012.
160. J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, and D. A. Case, "Development and testing of a general AMBER force field". *Journal of Computational Chemistry* **25** (2004) 1157-1174.
161. B. Bertoša, B. Kojić-Prodić, R. C. Wade, and S. Tomić, Mechanism of auxin interaction with auxin binding protein (ABP1): a molecular dynamics simulation study, *Biophys. J.* **94** (2008) 27-37.
162. I. Dokmanić, M. Šikić, and S. Tomić, 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.
163. T. Darden, D. York, and L. Pedersen, Particle mesh Ewald-an Nlog(N) method for Ewald sums in large systems, *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 10089-10092.
164. U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, and L. G. Pedersen, A smooth particle mesh Ewald method, *J. Chem. Phys.* **103** (1995) 8577-8592.
165. J. M. Swanson, R. H. Henchman, and J. A. McCammon, Revisiting free energy calculations: a theoretical connection to MM/PBSA and direct calculation of the association free energy, *Biophys. J.* **86** (2004) 67-74.
166. <http://ambermd.org/tutorials/advanced/tutorial3> (18. 09. 2012.)
167. M. Almlöf, J. Carlsson, and J. Åqvist, Improving the accuracy of the linear interaction energy method for solvation free energies, *J. Chem. Theory Comput.* **3** (2007) 2162-2175
168. M. L. Connolly, Analytical molecular surface calculation. *J. Appl. Cryst.* **16** (1983) 548-558.

169. W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten, VMD - Visual molecular dynamics, *J. Molec. Graphics* **14** (1996) 33-38.
170. S. Sahli, B. Stump, T. Welte, D. Blum-Kaelin, J. D. Aebi, C. Oefner, H. J. Böhm, and F. Diederich, Structure-based design, synthesis, and in vitro evaluation of nonpeptidic neprilysin inhibitors, *Chembiochem.* **5** (2004) 996-1000.
171. J. J. Paul, S. R. Kircus, T. N. Sorrell, P. A. Ropp and H. H. Thorp, Effects of coordinating metal ions on the mediated inhibition of trypsin by bis(benzimidazoles) and related compounds, *Inorg. Chem.* **45** (2006) 5126-5135.
172. B. A. Katz, J. M. Clark, J. S. Finer-Moore, T. E. Jenkins, C. R. Johnson, M. J. Ross, C. Luong, W. R. Moore and R. M. Stroud, Design of potent selective zinc-mediated serine protease inhibitors, *Nature* **391** (1998) 608-612.
173. D. P. Klose, B. A. Wallace, and R. W. Janes: 2Struc: the secondary structure server. *Bioinformatics* **26** (2010) 2624-2625.
174. I. Ohkubo, Y. Li, T. Maeda, Y. Yamamoto, T. Yamane, P.-G. Du and K. Nishi, Molecular cloning and immunohistochemical localization of rat dipeptidyl peptidase III, *Forensic Sci Int* (2000) **113**, 147-151.
175. M. Flores, M. C. Aristoy, T. Antequera, J. M. Barat, F. Toldrá, Effect of prefreezing hams on endogenous enzyme activity during the processing of Iberian dry-cured hams, *Meat Science*, **82** (2009) 241-246.
176. A. A. Swanson, R. M. Davis, and N. C. Meinhardt, Proteases in human lenses and their possible significance, *Curr. Eye Res.* **4** (1985) 43-48.
177. A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and J. F. Woessner (Eds.): *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press, London, 2004.
178. P. Chérot, J. Devin, M.-C. Fournié-Zaluski, and B. P. Roques, Enkephalin-degrading dipeptidylaminopeptidase: characterization of the active site and selective inhibition, *Mol. Pharmacol.* **30** (1986) 338-344.
179. Y. Bansal, and O. Silakari, The therapeutic journey of benzimidazoles: A review, *Bioorg. Med. Chem.* **20** (2012) 6208-6236.
180. B. Van den Burg and V. Eijssink, *Thermolysin and related Bacillus metallopeptidases*. in: *Handbook of Proteolytic Enzymes*: A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and J. F. Woessner (Eds.) (second edition), Vol. 1, Elsevier, Academic Press, London, 2004, pp. 374-387.
181. D. Agić, M. Hranjec, N. Jajčanin, K. Starčević, G. Karminski-Zamola, and M. Abramčić, Novel amidino-substituted benzimidazoles: synthesis of compounds and inhibition of dipeptidyl peptidase III, *Bioorg. Chem.* **35** (2007) 153-169.
182. B.W. Matthew, Structural basis of the action of thermolysin and related zinc peptidases, *Acc. Chem. Res.* **21** (1988) 333-340.

8. POPIS KRATICA I OZNAKA

2-ME	2-merkaptetanol, β -merkaptetanol
2NA	2-naftilamid, β -naftilamid
3,4-DCI	3,4-dikloroizokumarin
AMC	7-amino-4-metil kumarin
CBB R-250	Coomassie Brilliant Blue R-250
DEAE-	dietilaminoetil-
DFP	diizopropilfluorofosfat
DMSO	dimetilsulfoksid
DTE	ditioeritol
DTNB	5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojeva kiselina)
EDTA	etilendiaminotetraoctena kiselina
FBB	“Fast Blue B” sol - tetrazonijev <i>o</i> -dianisidin x ZnCl ₂
FPLC	brza tekućinska kromatografija proteina (eng. “Fast Protein Liquid Chromatography”)
IEF	izoelektrično fokusiranje
NEM	<i>N</i> -etilmaleimid
PAGE	elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (eng. “Polyacrylamide Gel Electrophoresis”)
<i>p</i> CMB	<i>p</i> -kloromerkuribenzoat
<i>p</i> HMB	<i>p</i> -hidroksimerkuribenzoat
pI	izoelektrična točka (eng. “Isoelectric point”)
PSA	aminopeptidaza osjetljiva na puromicin
SDS	natrijev-dodecilsulfat (eng. “Sodium Dodecyl Sulphate”)
TCA	trikloroactena kiselina (eng. “Trichloroacetic acid”)
Tris	tris-(hidroksimetil)-aminometan
Tween 80	polioksietilensorbitan monooleat (eng. “Polysorbate 80 - Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate”)

Aminokiseline i njihove kratice

glicin	Gly	(G)
alanin	Ala	(A)
valin	Val	(V)
leucin	Leu	(L)
izoleucin	Ile	(I)
metionin	Met	(M)
prolin	Pro	(P)
fenilalanin	Phe	(F)
triptofan	Trp	(W)
serin	Ser	(S)
treonin	Thr	(T)
asparagin	Asn	(N)
glutamin	Gln	(Q)
tirozin	Tyr	(Y)
cistein	Cys	(C)
lizin	Lys	(K)
arginin	Arg	(R)
histidin	His	(H)
asparaginska kiselina (aspartat)	Asp	(D)
glutaminska kiselina (glutamat)	Glu	(E)

9. ŽIVOTOPIS

Životopis

Dejan Agić rođen je 12. rujna 1973. godine u Osijeku gdje završava osnovno i srednjoškolsko obrazovanje. Studij biologije i kemije upisao je na Pedagoškom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku školske 1993./1994. godine. Diplomski rad „Sezonske sukcesije fitoplanktona akumulacije Lapovac“ izradio je na Zavodu za ekologiju Pedagoškog fakulteta pod vodstvom doc. dr. sc. Melite Mihaljević te ga obranio 30. lipnja 2000. godine i time stekao stručnu spremu sedmog stupnja (VII./1) i stručni naziv profesora biologije i kemije.

Poslijediplomski studij kemije, smjer Kemija-Biokemija upisao je 2003. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a iste godine zapošljava se na Zavodu za kemiju Poljoprivrednog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku kao znanstveni novak-asistent na projektu „Modeliranje flavonoidnih spojeva“. Kao polaznik poslijediplomskog studija, usavršavao se u Laboratoriju za celularnu biokemiju Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu kada i započinje izradu doktorske radnje pod vodstvom dr. sc. Marije Abramić, znanstvene savjetnice Instituta „Ruđer Bošković“.

Na sveučilišnom diplomskom studiju Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku (stari program) sudjelovao je u nastavi na izvođenju laboratorijskih vježbi iz kolegija „Biokemija“, dok na preddiplomskom i diplomskom sveučilišnom (bolonjskom) studiju sudjeluje na izvođenju vježbi iz modula „Osnove biokemije i mikrobiologije“, „Fiziologija bilja“, „Biokemija“, „Biljna biokemija i fiziologija“, „Biokemija i fiziologija životinja“ i „Tehnologija pčelarskih proizvoda“.

Do sada je objavio sedam znanstvenih radova citiranih u CC/SCI, dva rada u drugim časopisima te sudjelovao na nekoliko domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova.

Popis radova autora

Znanstveni radovi u časopisima:

1. B. Vukelić, B. Salopek-Sondi, J. Špoljarić, I. Sabljic, N. Meštrović, **D. Agić**, and M. Abramić, Reactive cysteine in the active-site motif of *Bacteroides thetaiotaomicron* dipeptidyl peptidase III is a regulatory residue for the enzyme activity. *Biological chemistry* **393** (2012) 37-46.
2. J. Špoljarić A. Tomić, B. Vukelić, B. Salopek-Sondi, **D. Agić**, S. Tomić, and M. Abramić, Human Dipeptidyl Peptidase III : the Role of Asn406 in Ligand Binding and Hydrolysis. *Croatica chemica acta* **84** (2011) 259-268.
3. M. Špoljarević, **D. Agić**, M. Lisjak, A. Gumze, I. D. Wilson, J. T. Hancock, and T. Teklić, The relationship of proline content and metabolism on the productivity of maize plants. *Plant Signaling & Behavior* **6** (2011) 251-257.
4. A. Tomić, M. Abramić, J. Špoljarić, **D. Agić**, D. M. Smith, and S. Tomić, Human Dipeptidyl Peptidase III: Insights into Ligand Binding from a Combined Experimental and Computational Approach. *Journal of molecular recognition* **24** (2011) 804-814.
5. M. Špoljarević, I. Štolfa, M. Lisjak, A. Stanisavljević, T. Vinković, **D. Agić**, N. Parađiković, T. Teklić, M. Engler, and K. Klešić, Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) leaf antioxidative response to biostimulators and reduced fertilization with N and K. *Poljoprivreda* **16** (2010) 50-56.
6. **D. Agić**, G. Bukvić, S. Grljušić, D. Bešlo, J. Horvatić, and D. Novoselović, Effect of pH on α -Amylase Activity and Early Seedling Growth of Red Clover (*Trifolium pratense* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. **37** (2009) 77-80.
7. J. Špoljarić, B. Salopek-Sondi, J. Makarević, B. Vukelić, **D. Agić**, Š. Šimaga, N. Jajčanin-Jozić, and M. Abramić, Absolutely conserved tryptophan in M49 family of peptidases contributes to catalysis and binding of competitive inhibitors. *Bioorganic Chemistry* **37** (2009) 70-76.
8. S. Grljušić, G. Bukvić, I. Rapčan, **D. Agić**, and J. Horvatić. The effects of soil and temperature on early white clover growth. *Cereal Research Communications* **36** (2008) 643-646.
9. **D. Agić**, M. Hranjec, N. Jajčanin, K. Starčević, G. Karminski-Zamola, and M. Abramić, Novel amidino-substituted benzimidazoles: Synthesis of compounds and inhibition of dipeptidyl peptidase III. *Bioorganic Chemistry* **35** (2007) 153-169.

Priopćenja na znanstvenim skupovima:

1. **D. Agić**, S. Grljušić, G. Bukvić, D. Bešlo, Ž. Greger, N. Steiner, Utjecaj egzogene primjene askorbinske kiseline na rani rast crvene djeteline izložene vodnom stresu, **48. hrvatski i 8. međunarodni simpozij agronoma**, Dubrovnik, Hrvatska, 17.-22. veljače 2013. (kratko usmeno priopćenje).
2. S. Grljušić, G. Bukvić, **D. Agić**, M. Antunović, D. Novoselović, Utjecaj genotipa i godine na morfološka svojstva i prinos crvene djeteline, **47. hrvatski i 7. međunarodni simpozija agronoma**, Opatija, Hrvatska, 13.-27. veljače 2012. (kratko usmeno priopćenje).
3. M. Špoljarević, I. Štolfa, R. Vuković, **D. Agić**, M. Lisjak, L. Andrić, T. Teklić, Vigor sjemena soje pod utjecajem abiotskog stresa, **47. hrvatski i 7. međunarodni simpozija agronoma**, Opatija, Hrvatska, 13.-17. veljače 2012. (kratko usmeno priopćenje).
4. **D. Agić**, S. Grljušić, G. Bukvić, D. Bešlo, D. Popović, Procjena tolerantnosti genotipova crvene djeteline na vodni stres primjenom PEG 6000, **46. hrvatski i 6. međunarodni simpozija agronoma**, Opatija, Hrvatska, 14.-18. veljače 2011. (kratko usmeno priopćenje).
5. B. Vukelić, B. Salopek-Sondi, I. Sabljčić, J. Špoljarić, **D. Agić**, M. Abramić, Dipeptidyl peptidase III from human symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron*: isolation and characterization, **The 5th Central European Conference - Chemistry towards Biology**, Primošten, Hrvatska, 8.-11. rujna 2010. (poster).
6. J. Horvatić, G. Bukvić, S. Grljušić, V. Peršić, V. Perković, **D. Agić**, Utjecaj agroekoloških uvjeta na sadržaj fotosintetskih pigmenata genotipova crvene djeteline (*Trifolium pratense* L.), **10. hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem**, Osijek, Hrvatska, 14.-20. rujna 2009. (poster).
7. J. Špoljarić, B. Salopek-Sondi, B. Vukelić, N. Jajčanin Jozić, J. Makarević, **D. Agić**, Š. Šimaga, D. Vujaklija, M. Abramić, Analysis of conserved residues of the human dipeptidyl peptidase III, **VIII European Symposium of The Protein Society**, Zurich, Švicarska, 14.-18. lipnja 2009. (poster).
8. **D. Agić**, G. Bukvić, S. Grljušić, D. Bešlo, J. Horvatić, D. Novoselović, Effect of germination media pH on α -amylase activity and early seedling growth of red clover, **Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology with international participation**, Osijek, Hrvatska, 17.- 20. rujna 2008. (poster).
9. E. Štefanić, S. Rašić, M.-E. Šolić, **D. Agić**, Invasive species *Robinia pseudoaccacia* L. can influence a honey production in Dalmatia-South Croatia, **2nd International Symposium "Intractable Weeds and Plant Invaders"**, Osijek, Hrvatska, 14.-18. rujna 2008. (poster).
10. **D. Agić**, M. Hranjec, N. Jajčanin, K. Starčević, B. Vukelić, G. Karminski-Zamola, M. Abramić, Progressive inhibition of human dipeptidyl peptidase III by new amidino-substituted-benzimidazoles, **Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology on the occasion of the 30th Anniversary with international participation**, Vodice, Hrvatska, 3.-7. listopada 2006. (poster).