

# Računalno istraživanje kompleksa dipeptidil peptidaze III (DPP III)-Kelch u svrhu predviđanja mutanta Kelch domene proteina Keap1 s povećanim afinitetom ZA DPP III

---

Zeman, Karlo

Master's thesis / Diplomski rad

2024

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:048271>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-15**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2024.

Karlo Zeman

**RAČUNALNO ISTRAŽIVANJE KOMPLEKSA  
DIPEPTIDIL PEPTIDAZE III (DPP III)–KELCH  
U SVRHU PREDVIĐANJA MUTANTA  
KELCH DOMENE PROTEINA KEAP1 S  
POVEĆANIM AFINITETOM ZA DPP III**

Rad je izrađen pod mentorstvom doc. dr. sc. Filipa Šupljike (Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta), u Laboratoriju za biokemiju proteina i molekularno modeliranje na Institutu Ruđer Bošković pod komentorstvom dr. sc. Antonije Tomić, znan. sur.

Ovaj diplomski rad izrađen je u okviru znanstveno-istraživačkog projekta „Preliminarna studija inhibicije NRF2-ovisne transkripcije sprječavanjem interakcije DPP III – KEAP1 u svrhu učinkovitijeg liječenja karcinoma“ (broj: 01-1320/1-2024), odobrenog u okviru Institucijskih projekata.

## ZAHVALA

*Zahvaljujem se komentorici dr.sc. Antoniji Tomić na prenesenom znanju prilikom izrade diplomskog rada. Hvala Vam na strpljenju, razumijevanju i neprekidnoj podršci koju ste mi pružili.*

*Želim zahvaliti svojim prijateljima i kolegama koji su mi uljepšali godine studiranja i učinili ih nezaboravnima.*

Od srca hvala obitelji na neizmjerneoj ljubavi i razumijevanju. Hvala vam što se uvijek bili uz mene.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za kemiju i biokemiju  
Laboratorij za fizikalnu kemiju i koroziju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

RAČUNALNO ISTRAŽIVANJE KOMPLEKSA DIPEPTIDIL PEPTIDAZE III (DPP III)–KELCH U SVRHU  
PREDVIĐANJA MUTANTA KELCH DOMENE PROTEINA KEAP1 S POVEĆANIM AFINITETOM ZA  
DPP III

Karlo Zeman, univ. bacc. nutr. 0058218570

### Sažetak:

Signalni put Keap1–Nrf2 glavni je regulator staničnog odgovora na oksidativni stres. Transkripcijski faktor Nrf2, nakon prelaska u jezgru, aktivira citoprotektivne gene koji pomažu održavanju stanične redoks homeostaze. Dok aktivacija Nrf2 štiti zdrave stanice, pretjerana aktivacija u tumorskim stanicama dovodi do pojave kemorezistencije i radiorezistencije. Enzim dipeptidil peptidaza III (DPP III) kompetira Nrf2 za vezanje na Kelch domenu proteina Keap1, potičući Nrf2-ovisnu transkripciju. U okviru ovog diplomskog rada metodama računalne kemije istražena je mogućnost dizajna modificirane Kelch domene s većim afinitetom vezanja za DPP III od endogenog proteina Keap1 u svrhu sprječavanja prekomjerne aktivacije Nrf2 u tumorskim stanicama s pojačanom ekspresijom DPP III. Dugačkim simulacijama molekulske dinamike ispitana je struktura kompleksa, a metodom dekompozicije slobodne energije vezanja po aminokiselinama identificirane su aminokiseline iz Kelch domene koje destabiliziraju kompleks. Utjecaj mutacija tih aminokiselina na afinitet vezanja procijenjen je tzv. *alanin scan* metodom.

**Ključne riječi:** Kelch domena, dipeptidil peptidaza III, protein-protein interakcije, proteinski mutanti, simulacije molekulske dinamike

**Rad sadrži:** 43 stranice, 18 slika, 3 tablice, 50 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** doc. dr. sc. Filip Šupljika

**Komentor:** dr. sc. Antonija Tomić, znan. sur., Institut Ruđer Bošković

### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc. dr. sc. Anita Horvatić (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Filip Šupljika (mentor)
3. dr. sc. Antonija Tomić, znan. sur., IRB (član)
4. dr. sc. Mihaela Matovina, v. znan. sur., IRB (zamjenski član)

**Datum obrane:** 18. prosinca 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of chemistry and biochemistry  
Laboratory for physical chemistry and corrosion

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Molecular Biotechnology

COMPUTATIONAL INVESTIGATION OF THE DIPEPTIDYL PEPTIDASE III (DPP III)–KELCH COMPLEX TO PREDICT MUTANTS OF THE KELCH DOMAIN OF THE KEAP1 PROTEIN WITH INCREASED AFFINITY FOR DPP III

Karlo Zeman, univ. bacc. nutr.0058218570

### Abstract:

The Keap1–Nrf2 signaling pathway is the main regulator of the cellular response to oxidative stress. The transcription factor Nrf2, after translocating to the nucleus, activates cytoprotective genes that help maintain cellular redox homeostasis. While Nrf2 activation protects healthy cells, excessive activation in tumor cells lead to chemoresistance and radioresistance. The enzyme dipeptidyl peptidase III (DPP III) competes with Nrf2 for binding to the Kelch domain of Keap1, promoting Nrf2-dependent transcription. In this work, computational chemistry methods were used to explore the possibility of designing a modified Kelch domain with a higher binding affinity for DPP III than endogenous Keap1, in order to prevent excessive Nrf2 activation in tumor cells with increased DPP III expression. Extensive molecular dynamics simulations were performed to examine the structure of the complex, and per-residue binding free energy decomposition analysis was used to identify amino acids from the Kelch domain that destabilize the complex. The effect of mutations in these amino acids on binding affinity was assessed using the alanine scan method.

**Keywords:** Kelch domain, dipeptidyl peptidase III, protein-protein interactions, protein mutants, molecular dynamic simulations (up to 5 words)

**Thesis contains:** 43 pages, 18 figures, 3 tables, 50 references

**Original in:** Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in the Library of the University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** Filip Šupljika, PhD, Assistant professor

**Co-mentor:** Antonija Tomić, PhD, Research Associate, Ruđer Bošković Institute

### Reviewers:

1. Anita Horvatić, PhD, Assistant professor (president)
2. Filip Šupljika, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Antonija Tomić, PhD, Research associate (member)
4. Mihaela Matovina, PhD, Senior research associate (substitute)

**Thesis defended:** December 18<sup>th</sup>, 2024



## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1. SIGNALNI PUT KEAP1-NRF2</b> .....	<b>2</b>
<b>2.2. DIPEPTIDIL PEPTIDAZA III</b> .....	<b>4</b>
<b>2.3. RAČUNALNA KEMIJA</b> .....	<b>6</b>
2.3.1. Metode polja sila .....	7
2.3.2. Simulacije molekulske dinamike.....	8
2.3.3. MM-PBSA i MM-GBSA račun slobodne energije .....	12
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>14</b>
<b>3.1. PRIPREMA SUSTAVA</b> .....	<b>14</b>
<b>3.2. MD SIMULACIJE</b> .....	<b>15</b>
<b>3.3. ANALIZA REZULTATA MD SIMULACIJA</b> .....	<b>16</b>
3.3.1. Korijen srednjeg kvadrata odstupanja .....	16
3.3.2. Korijen srednjeg kvadrata fluktuacija .....	16
3.3.3. Radijus giracije .....	17
3.3.4. Promjena udaljenosti između atoma .....	17
3.3.5. Račun sekundarne strukture proteina .....	17
3.3.6. Račun vodikovih veza .....	18
3.3.7. Analiza nativnih i nenativnih kontakata.....	18
3.3.8. MM-PBSA i MM-GBSA račun slobodne energije vezanja .....	18
3.3.9. Dekompozicija slobodne energije vezanja po aminokiselinama .....	19
<b>3.4. PREDVIĐANJE STRUKTURE KOMPLEKSA ALPHAFOLDOM</b> .....	<b>19</b>
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>20</b>
<b>4.1. STRUKTURA I DINAMIKA KOMPLEKSA TIJEKOM MD SIMULACIJA</b> .....	<b>20</b>
<b>4.2. ODREĐIVANJE ENERGETSKI NAJSTABILNIJE STRUKTURE KOMPLEKSA DPP III–KELCH</b> .....	<b>31</b>
<b>4.3. MEĐUMOLEKULSKE INTERAKCIJE U KOMPLEKSU</b> .....	<b>32</b>
<b>4.4. UTJECAJ MUTACIJE PHE335 I ASP385 U KELCH DOMENI NA AFINITET VEZANJA ZA DPP III</b> .....	<b>37</b>
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>39</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>40</b>

## 1. UVOD

Signalni put Keap1–Nrf2 glavni je regulator staničnog odgovora na oksidativni i elektrofilni stres budući da translacija transkripcijskog faktora Nrf2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) u jezgru potiče ekspresiju niza citoprotektivnih gena, čiji produkti omogućuju stanicama da neutraliziraju reaktivne molekule i ponovno uspostave staničnu redoks homeostazu. Dok aktivacija Nrf2 štiti zdrave stanice od raznih toksičnih tvari i bolesti, pokazalo se da prekomjerna aktivacija Nrf2 u stanicama raka nepovoljno djeluje na tijek bolesti štiteći ih od oksidativnog oštećenja što dovodi do pojave kemorezistencije i radiorezistencije. Nedavna istraživanja pokazala su da je dipeptidil peptidaza III (DPP III) jedan od proteina iz interaktoma proteina Keap1 koji kompetira s Nrf2 za vezanje na Kelch domenu proteina Keap1 (engl. *Kelch like ECH-associated protein 1*) te tako potiče Nrf2-ovisnu transkripciju gena. Stoga je DPP III prepoznat kao multifunkcionalni protein koji, osim svoje katalitičke peptidazne aktivnosti, pokazuje i tzv. *moonlighting* aktivnost u regulaciji staničnog odgovora na oksidativni stres.

Istraživanja na stanicama raka dojke, jajnika i endometrija ukazala su na povezanost između tumorigeneze i pojačane ekspresije gena DPP3. Pretpostavlja se da prekomjerna proizvodnja DPP III izravno doprinosi povećanom antioksidativnom odgovoru putem kompetitivnog vezanja DPP III za Keap1, što dovodi do prekomjerne aktivacije Nrf2 u tumorskim stanicama. Kako bi se spriječila prekomjerna aktivacija Nrf2 u tumorskim stanicama s pojačanom ekspresijom DPP III te poboljšala osjetljivost malignih stanica na antitumorsku terapiju, cilj ovog diplomskog rada bio je primjenom metoda računalne kemije odrediti stabilnu strukturu kompleksa DPP III–Kelch, koja je potom poslužila kao osnova za dizajn modificirane Kelch domene s višim afinitetom vezanja za DPP III od endogenog proteina Keap1. Ova mutirana Kelch domena mogla bi funkcionirati kao klopka za prekomjerno proizvedenu DPP III, čime bi se potaknulo vezanje Nrf2 za endogeni Keap1 i smanjio intenzitet antioksidativnog odgovora malignih stanica na kemoterapeutike.

Dugačkim, mikrosekundnim simulacijama molekulske dinamike (MD) ispitana je stabilnost strukture kompleksa između domene Kelch i DPP III, a metodom dekompozicije slobodne energije vezanja po pojedinim aminokiselinama identificirane su aminokiseline iz domene Kelch koje sudjeluju u nastanku ovog protein-protein kompleksa. Utjecaj mutacija aminokiselina koje destabiliziraju kompleks DPP III–Kelch na afinitet vezanja, ispitan je tzv. *alanin scan* metodom zamjenom odabranih aminokiselina u alanin. Simulacije i analize rezultata provedene su u programskom paketu AMBER 22 u Linux okruženju.

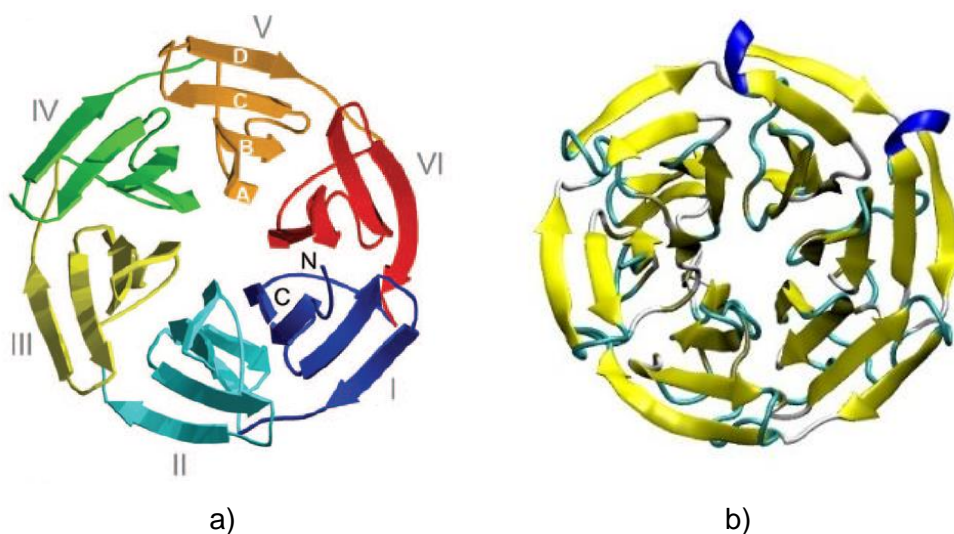
## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. SIGNALNI PUT KEAP1-NRF2

Snažni elektrofili i reaktivne kisikove vrste oštećuju stanične makromolekule i narušavaju njihovu fiziološku funkciju. Njihovo nakupljanje u organizmu uzrokuje starenje te dovodi do razvoja raznih bolesti poput raka, arteroskleroze, neurodegenerativnih i kardiovaskularnih bolesti. Zbog toga su stanice tijekom evolucije razvile različite mehanizme obrane od oksidativnog i elektrofilnog stresa. Važnu ulogu u tome ima protein Nrf2. Nrf2 je član CNC (engl. *cap 'n' collar*) obitelji transkripcijskih faktora koji regulira ekspresiju niza gena koji kodiraju za antioksidativne i detoksikacijske proteine (Motohashi i Yamamoto, 2004). Razina i lokalizacija Nrf2 u pojedinim staničnim odjeljcima regulirana je proteinom Keap1. Stoga se smatra da je Keap1–Nrf2 signalni put glavni regulator staničnog odgovora na oksidativni i elektrofilni stres (Wakabayashi i sur., 2003). U normalnim fiziološkim uvjetima, interakcija Nrf2 s proteinom Keap1, koji je vezan za aktinski citoskelet, zadržava Nrf2 u citoplazmi, onemogućujući njegovu translokaciju u jezgru te potiče njegovu degradaciju u proteasomu (Kensler i sur., 2007; Stewart i sur., 2003). Naime, Keap1 u kompleksu s E3 ubikvitin ligazom koja sadrži Cul3 protein, zajedno sa E2 ubikvitin konjugirajućim enzimom provodi poliubikvitinaciju lizinskih ostataka Nrf2, usmjeravajući Nrf2 na degradaciju putem 26S proteasoma (Cullinan i sur., 2004). U uvjetima oksidativnog stresa dolazi do konformacijske promjene kompleksa Keap1–Nrf2 koja onemogućuje ubikvitinaciju Nrf2. To rezultira akumulacijom nosintetiziranog Nrf2 u citoplazmi te posljedično njegovom translokacijom u jezgru i povećanom transkripcijom citoprotektivnih gena. Protein Keap1 duguje svoj status negativnog regulatora Nrf2 i činjenici da njegov izostanak uzrokuje akumulaciju Nrf2 u jezgri stanice (Wakabayashi i sur., 2003).

Keap1 je dimerni protein, pri čemu se svaki monomer sastoji od BTB domene (engl. *broad complex/tramtrack/bric-a-brac*), koja sudjeluje u dimerizaciji, IVR domene (intervenirajuće domene) te Kelch domene. Izrazito simetrična C-terminalna Kelch domena, mase 32 kDa, ima strukturu  $\beta$ -propelera sa šest  $\beta$ -nabranih ploča (tzv. šest Kelch ponavljajućih motiva) koje tvore 4 antiparalelna  $\beta$ -lanca (A, B, C i D) i zadržava taj oblik čak i kada se eksprimira odvojeno od ostatka proteina Keap1 (slika 1a). Kelch domena svakog monomera proteina Keap1 veže jedan od dva za vezanje Nrf2 karakteristična motiva, ETGE ili DLG, iz Neh2 domene (Kobayashi i sur., 2002). Oba motiva vežu se unutar donjeg dijela šupljine  $\beta$ -propelera, poznate kao pora, koja se nalazi na donjoj strani Kelch domene (dio Kelch domene koji nije u interakciji s IVR domenom). Iako se motivi ETGE i DLG vežu za Kelch domenu proteina Keap1 na sličan način, ETGE motiv ima znatno veći afinitet vezanja i drži Nrf2 čvrsto vezanim za Keap1. S druge strane, DLG motiv služi za optimalno postavljanje lizinskih ostataka Neh2 domene proteina

Nrf2, što je ključno za učinkovitu ubikvitinaciju i razgradnju (Tong i sur., 2006).



**Slika 1.** Struktura Kelch domene proteina Keap1: a) prema Li i sur., 2004 (Kelch ponavljajući motivi, numerirani od I do VI, obojani su različitim bojama) i b) preuzeta iz PDB-a s kodom 2FLU ( $\beta$ -nabrane ploče obojane su žuto, zavoji svijetloplavo, a  $3_{10}$ -zavojnice plavo).

Iako trodimenzionalna struktura cjelokupnog kompleksa Keap1–Nrf2 još nije određena, proteinska baza podataka (engl. *Protein Data Bank*, PDB; <https://www.rcsb.org/>) sadrži više riješenih struktura pojedinih domena proteina Keap1. Npr. rentgenskom difrakcijskom analizom određena je struktura Kelch domene s 16 aminokiselina dugim peptidom Nrf2 proteina, koji uključuje i očuvani ETGE motiv ključan za vezanje Nrf2 za Keap1 (PDB kod 2FLU, slika 1b). Iz strukture ovog kompleksa vidljivo je da aminokiseline iz svih šest  $\beta$ -nabranih ploča Kelch domene ostvaruju interakcije s vezanim peptidom (Lo i sur., 2006). Pri tome najspecifičnije interakcije ostvaruju glutamati iz ETGE motiva. Točnije, bočni lanac prvog glutamata iz ETGE motiva, koji odgovara Glu79 iz Nrf2, tvori vodikove veze s bočnim lancima Arg415, Arg484 i Ser508, dok bočni lanac drugog glutamata iz ETGE motiva, koji odgovara Glu82 iz Nrf2, tvori vodikove veze s bočnim lancima Ser363, Arg380 i Asn382. Osim toga, atomi iz okosnice peptida tvore vodikove veze s bočnim lancima Tyr334, Asn382, Gln530, Ser555 i Ser602. Peptid također ostvaruje van der Waalsove interakcije s bočnim lancima sedam aminokiselina iz Kelch domene: Tyr334, Asn387, Arg415, Ser508, Tyr525, Tyr572 i Phe577.

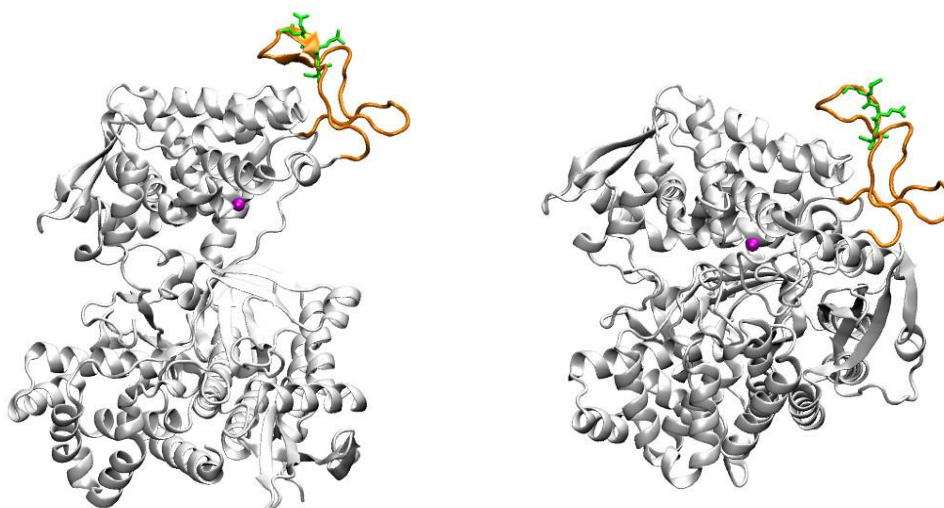
Protein Keap1 naziva se i protein čvorišta jer, zahvaljujući svojoj strukturi, posjeduje sposobnost selektivnog vezanja većeg broja proteina (Cino i sur., 2013). Proteomskom analizom identificirani su vezni partneri koji kompetiraju Nrf2 za vezanje na Keap1. Od 42 potencijalna interaktora proteina Keap1, njih 17 sadrži ETGE ili ESGE motiv. Jedan od njih je i enzim dipeptidil peptidaza III (Hast i sur., 2013).

## 2.2. DIPEPTIDIL PEPTIDAZA III

Dipeptidil peptidaza III (DPP III) je monomerni protein relativne molekulske mase od približno 80 kDa, koji odcjepljuje dipeptide sa N-terminalnog kraja peptida duljine 3-10 aminokiselina (Barrett i Chen, 2013). Na temelju toga pretpostavlja se da ovaj enzim ima ulogu u završnim stupnjevima katabolizma proteina u stanici, iako njegova uloga nije u potpunosti razjašnjena (Prajapati i Chauhan, 2011). Pripada skupini metalo-egzopeptidaza iz obitelji M49 unutar MEROPS baze podataka ([www.merops.ac.uk](http://www.merops.ac.uk)). Prvi put je izoliran iz prednjeg režnja goveđe hipofize, gdje je identificiran zahvaljujući sposobnosti hidrolize sintetskog supstrata arginin-arginin-2-naftilamida (Ellis i Nuenke, 1967). Protein DPP III evolucijski je očuvan u različitim organizmima, od bakterija do biljaka i životinja, uključujući i čovjeka. Široko je rasprostranjen u raznim tkivima sisavaca, uključujući eritrocite, mozak, leđnu moždinu, kožu, leću oka, bubrege, jetru i tanko crijevo (Prajapati i Chauhan, 2011). Također je utvrđeno da je komponenta ljudskog središnjeg proteoma, skupine od 1124 proteina koji su prisutni u svim tipovima ljudskih staničnih linija (Burkard i sur., 2011). Osim toga, ortolozi DPP III identificirani su u nižim eukariotima poput sluzave plijesni *Dictyostelium discoideum* i kvascu *Saccharomyces cerevisiae*. DPP III se uglavnom opisuje kao citosolni protein, ali je uočena i u membrani mozga štakora te u lipidnim splavovima moždane kore kod mišjeg modela Alzheimerove bolesti (Chadwick i sur., 2010; Lee i Snyder, 1982). *In vitro*, DPP III pokazuje visoki afinitet prema opioidnim peptidima poput enkefalina i endomorfinu, što upućuje na njegovu potencijalnu ulogu u regulaciji boli (Barsun i sur., 2007; Chiba i sur., 2003). Naime, ovi opioidni peptidi, zajedno sa svojim receptorima, čine endogeni opioidni sustav i reguliraju niz različitih fizioloških funkcija kod sisavaca, uključujući signalnu transdukciju, endokrinu i imunološku funkciju, gastrointestinalnu pokretljivost, osjetljivost na ovisnost o drogama i, najvažnije, regulaciju boli (nocicepciju) (Bodnar, 2014; Fichna i sur., 2007). Osim uloge u završnim fazama katabolizma proteina u stanici i regulaciji boli, istraživanja ukazuju i na njegovu ulogu u regulaciji krvnog tlaka (Jha i sur., 2020; Cruz-Diaz i sur., 2016). Stoga bi ovaj enzim potencijalno mogao utjecati na veliki broj fizioloških procesa.

Protein DPP III građen je od uglavnom helikalne gornje domene i donje domene koja u središnjem dijelu sadrži dvije paralelne  $\beta$ -nabrane ploče, sastavljene od pet  $\beta$ -vrpca, okružene  $\alpha$ -zavojnica. Domene su odvojene širokim procjepom, a vezno mjesto s katalitičkim ionom  $Zn^{2+}$  nalazi se u gornjoj domeni uz procjep (slika 2a). Atom cinka koordiniran je evolucijski očuvanim heksapeptidnim motivima  $H^{450}EXXGH^{455}$  i  $EE^{508}XR(K)AE(D)$  odgovornima i za katalitičku aktivnost enzima. Dva histidina, His450 i His455, iz prvog te Glu508 iz drugog očuvanog motiva, uz molekulu vode tetraedarski koordiniraju katalitički ion cinka (Tomić i Tomić, 2022). Rentgenskom difrakcijskom analizom do sada je određeno nekoliko trodimenzionalnih struktura ljudske DPP III, kako bez vezanog liganda tako i u kompleksu s

prirodnim peptidima te je potvrđeno da enzim može postojati u dvije konformacije: otvorenoj i zatvorenoj (slika 2). Računalna istraživanja pokazala su da se reakcija hidrolize peptidne veze odvija u aktivnom mjestu zatvorene forme DPP III, koja je, s druge strane, previše kompaktna da bi omogućila ulazak liganada u vezno mjesto enzima (Tomić i sur., 2012). MD simulacijama potvrđeno je da se u otopini ljudska DPP III uglavnom nalazi u tzv. „poluzatvorenoj“ konformaciji (Tomić, 2015). Najduži nestrukturirani dio strukture DPP III je petlja od četrdesetak aminokiselina iz gornje domene DPP III koja sadrži E<sup>480</sup>TGE<sup>483</sup> motiv, tzv. ETGE-petlja (slika 2). Iako je ETGE motiv čvrsto vezan za gornju domenu DPP III jakim vodikovim vezama s obližnjim argininima (Arg623 i Arg624 te rjeđe Arg620), kako u kristalnim strukturama tako i tijekom opsežnih MD simulacija, ETGE-petlja predstavlja najfleksibilniji dio strukture DPP III (Tomić, 2015).



a) b)  
**Slika 2.** Struktura: a) otvorene (PDB kod 3FVY) i zatvorene (PDB kod 5EGY) DPP III bez vezanog liganada. ETGE-petlja (Gln463-Tyr489) obojana je narančastom bojom. Atom cinka prikazan je ljubičastom kuglicom, dok su aminokiselinski ostaci iz ETGE motiva označeni zelenim štapićima.

Hast i sur. (2013) otkrili su da je DPP III jedan od proteina iz Keap1 interaktoma koji kompetira s Nrf2 za vezanje na Kelch domenu proteina Keap1. Svojim ETGE motivom, DPP III se veže za Kelch domenu jednog monomera proteina Keap1, čime sprječava vezanje Nrf2 za oba monomera proteina Keap1, što bi rezultiralo njegovom ubiquitinacijom. Studije su pokazale da je vezanje DPP III za Kelch domenu dvostupanjski proces koji uključuje endergono odvajanje ETGE motiva od gornje domene DPP III, a zatim njegovo egzergono vezanje za Kelch domenu (Matić i sur., 2021). Ova izravna uključenost DPP III u odgovor stanice na oksidativni stres sugerira da je DPP III multifunkcionalni protein, koji osim svoje katalitičke peptidazne aktivnosti posjeduje još i tzv. *moonlighting* aktivnost u signalnom putu Keap1–Nrf2 što potkrepljuju i

rezultati nekoliko studija koji su ukazali na moguću ulogu DPP III u razvoju raka (Ren i sur., 2021; Menale i sur., 2019; Sobočanec i sur., 2016; Hast i sur., 2013; Prajapati i Chauhan, 2011). Općenito, primijećeno je da je tumorigeneza povezana s većom ekspresijom gena DPP III, tj. prekomjernom proizvodnjom proteina DPP III. Studije na raku dojke, debelog crijeva i pluća pružaju najčvršće dokaze o korelaciji ekspresije DPP3 i tumorigeneze (Choy i sur., 2021; Lu i sur., 2017). Prema tim studijama molekularni mehanizam uključenosti DPP III u razvoj raka dojke temelji se na njejoj prekomjernoj proizvodnji koja izravno dovodi do povećanog antioksidativnog odgovora putem kompetitivnog vezanja DPP III za Keap1, ometajući vezanje Nrf2 u kompleks s proteinom Keap1 što podržava rast stanica raka putem povećane zaštite od reaktivnih kisikovih vrsta (Arfin i sur., 2021). S obzirom na dokazanu ulogu Nrf2 u razvoju raka i nepoželjnost njegove povećane aktivnosti tijekom liječenja, opsežna istraživanja usmjerena su na razvoj njegovih inhibitora. Smatra se da bi kontrola aktivnosti Nrf2, samostalno ili u kombinaciji s drugim lijekovima, mogla biti učinkovita strategija za poboljšanje osjetljivosti malignih stanica na terapije protiv raka.

### **2.3. RAČUNALNA KEMIJA**

Računalna kemija, poznata i kao molekularno modeliranje, grana je kemije koja se temelji na teorijskoj kemiji i fizici te omogućuje izračunavanje i predviđanje svojstava molekula, od njihove strukture i elektronskih svojstava do konformacijskih promjena i mehanizama kemijskih reakcija. Eksperimentalne metode omogućuju praćenje biokemijskih procesa na makroskopskoj (molarnoj) razini, no za razumijevanje mehanizama koji upravljaju tim procesima na molekularnoj i submolekularnoj razini potrebno je primijeniti molekularno modeliranje. U tom pristupu simulira se sustav, primjerice određeni protein sa svojom okolinom (najčešće u otapalu s vodom i ionima), korištenjem metoda računalne kemije.

Metode molekulskog modeliranja klasificiraju se prema stupnju teorijske složenosti na kvantno-mehaničke, semiempirijske i metode polja sila. Osim toga mogu se kombinirati metode različitih stupnjeva složenosti, npr. kvantno-mehaničke i molekularno-mehaničke metode. Kvantno-mehaničke (QM) metode koriste visoku razinu teorije kako bi odredile elektronska svojstva molekula, no primjenjive su uglavnom na male molekule. S druge strane, empirijske metode (kao što su molekularna mehanika – MM i molekularna dinamika – MD) i semiempirijske metode, koje su manje točne i uključuju eksperimentalne parametre, prikladne su za opis velikih molekula i (bio)makromolekula. Za razliku od QM metoda, koje prate elektronska svojstva molekula, MM i MD metode uglavnom ne vode računa o subatomske svojstvima sustava, već se oslanjaju na odgovarajuća polja sila koja objedinuju parametre za opis elementarnih čestica i njihovih međudjelovanja te izraz za potencijalnu energiju sustava. Najraširenija su atomska

polja sila u kojim se atomi modeliraju kao kuglice određene mase i svojstava, a potencijalna energija sustava opisuje se isključivo kao funkcija položaja atomskih jezgara. Molekule se opisuju sustavima kuglica povezanim oprugama, čija se svojstva analiziraju primjenom zakona klasične mehanike. Molekulska mehanika koristi se isključivo za proračun potencijalne energije biomakromolekula i identifikaciju najbližih lokalnih minimuma, dok molekulska dinamika prati ponašanje molekule pri određenoj temperaturi i tlaku te omogućuje proučavanje dinamike sustava.

### 2.3.1. Metode polja sila

Matematičke funkcije i parametri koji definiraju ukupnu potencijalnu energiju sustava nazivaju se poljem sila. Oblik funkcija i pripadajući parametri u određenom polju sila mogu se odrediti eksperimentalnim metodama ili izvesti iz QM izračuna za manje molekule. Polje sila sastoji se od tzv. veznih i neveznih članova. Vezni članovi opisuju interakcije između kovalentno vezanih atoma, dok nevezni članovi opisuju elektrostatske i van der Waalsove interakcije među atomima. Opći oblik polja sila koji se najčešće koristi u opisu sustava bioloških makromolekula dan je izrazom:

$$U(r) = \sum_{i \in \text{veze}} k_{d,i} (d_i - d_{i,0})^2 + \sum_{i \in \text{kutevi}} k_{\theta,i} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{i \in \text{torzije}} \sum_n \frac{1}{2} V_i^n [1 + \cos(n\omega_i - \gamma_i)] + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad [1]$$

Izraz za potencijalnu energiju sustava [1] od  $N$  atoma uključuje sume po parovima atoma. Prva tri člana opisuju vezne doprinose potencijalnoj energiji sustava, koji predstavljaju odstupanja unutarnjih koordinata (duljina kovalentnih veza, valentnih kuteva i torzijskih kuteva) od njihovih ravnotežnih vrijednosti. Preostala dva člana, poznata kao nevezni doprinosi, opisuju van der Waalsove i elektrostatske interakcije između atoma koji nisu povezani kovalentnim vezama. Prva dva vezna doprinosa modeliraju se funkcijom harmonijskog oscilatora, dok se torzijski doprinosi (prave i tzv. neprave torzije koje opisuju izvan-ravninske deformacije) opisuju periodičkom funkcijom. Konstante sile veza  $k_{d,i}$  obično su vrlo visoke, što znači da je potrebno mnogo energije za značajno produljenje ili skraćivanje kemijske veze. Referentna duljina veze (ravnotežna udaljenost) označena je kao  $d_{i,0}$ , dok  $d$  predstavlja trenutnu duljinu veze. Konstante sile za valentne kutove  $k_{i,\theta}$  su manje, pa je potrebna manja količina energije za odstupanje valentnih kutova  $\theta_i$  od referentnih (ravnotežnih) vrijednosti  $\theta_{i,0}$ . Konstante sile  $V_i^n$  (gdje je  $n$  periodičnost) koje se odnose na promjenu potencijalne energije zbog promjena torzijskog kuta



$\omega_i$ , obično su vrlo niske, osobito kada se radi o rotaciji oko jednostrukih veza.  $\gamma_i$  je fazni kut koji pomiče funkciju duž osi trozijskog kuta  $\omega_i$ . Torzijski kut definiran je položajem četiri uzastopna atoma povezana s tri kovalentne veze. Neprave torzije se uvode kako bi se očuvala planarnost skupina s takvom geometrijom, a ponekad i kiralnost određenih skupina. Van der Waalsove interakcije izražavaju se preko Lennard-Jonesovog potencijala. Lennard-Jonesov potencijal je funkcija udaljenosti  $r_{ij}$  između dva atoma, pri čemu  $\sigma_{ij}$  predstavlja udaljenosti na kojoj funkcija siječe os x (vrijednost funkcije je nula) i povezan je s ravnotežnom udaljenošću  $r_{ij}^0$  relacijom  $\sigma_{ij} = r_{ij}^0 / (2)^{1/6}$ , a parametar  $\epsilon_{ij}$  definira apsolutnu vrijednost potencijalne energije pri ravnotežnoj udaljenosti,  $|E_{vdw}|$  za  $r_{ij} = r_{ij}^0$ . Elektrostatski član potencijalne energije dan je kao suma svih kulonskih interakcija između parcijalnih atomskih naboja  $q_i$  i  $q_j$  pri čemu je  $r_{ij}$  udaljenost između središta atoma, a  $\epsilon_0$  dielektrična konstanta. Parametri u funkciji potencijalne energije izvedeni su iz eksperimentalno dostupnih podataka ili iz QM računa.

Najčešće korištena metoda za optimizaciju geometrije molekule je metoda najstrmijeg spusta (engl. *steepest descent*) koja se temelji na iterativnom smanjivanju energije sustava pomicanjem atoma u smjeru negativnog gradijenta funkcije potencijalne energije. Metoda konjugiranih gradijenata (engl. *conjugated gradient*) također se koristi za optimizaciju, a bazira se na kombinaciji trenutnog gradijenta i prethodnih smjerova, čime se postiže brža konvergencija prema minimumu potencijalne energije (Christopher J., 2004).

### 2.3.2. Simulacije molekulske dinamike

Iako određivanje energijski najpovoljnijih geometrija makromolekule doprinosi razumijevanju strukture biološkog sustava, u stvarnim uvjetima u laboratoriju najčešće radimo sa ravnotežnom smjesom molekula različitih struktura. Izmjerene vrijednosti u takvim sustavima predstavljaju statistički prosjek na određenoj temperaturi i tlaku, koji uključuje kombinaciju više stereoizomera, tautomera i konformacijskih izomera. Te strukture mogu značajno odstupati od idealiziranog modela koji odgovara minimum funkcije potencijalne energije. Kako bi se postigla bolja usklađenost teorijskih i eksperimentalnih rezultata potrebno je razmatrati širi skup struktura koje odgovaraju istoj kemijskoj formuli.

Za to je ključno što preciznije istražiti plohu potencijalne energije kako bi se generirao reprezentativni ansambl struktura pri određenoj temperaturi i tlaku. Pretpostavlja se da računalno izračunat prosjek stanja sustava odgovara statističkom prosjeku ansambla (tzv. ergotska hipoteza), što omogućuje izračunavanje makroskopskih svojstava usklađenih s eksperimentalnim rezultatima. Generiranje ovakvih ravnotežnih ansambala obično se provodi metodama Monte Carlo (MC) simulacija ili simulacijama molekulske dinamike (MD).

MD simulacije u mnogim su aspektima slične stvarnim eksperimentima. Kada provodimo stvarni

eksperiment, postupak započinjemo pripremom uzorka koji želimo proučavati. Uzorak se zatim povezuje s mjernim instrumentom (npr. termometrom, manometrom ili viskozimetrom), a svojstvo koje nas zanima mjeri se tijekom određenog vremenskog intervala. Ako su mjerenja podložna statističkom šumu (što je čest slučaj), dulje uprosječivanje rezultata povećava točnost mjerenja. Isti pristup primjenjuje se i u MD simulacijama. Naime, u MD simulacijama prvo pripremimo uzorak koji odgovara trodimenzionalnom modelu sustava sastavljenom od  $N$  čestica, a zatim rješavamo Newtonove jednadžbe gibanja za taj sustav. Taj proces traje dok sustav ne postigne ravnotežu, odnosno dok se svojstva sustava ne prestanu značajno mijenjati s vremenom. Nakon postizanja ravnoteže, prelazi se na samo mjerenje. Da bismo odredili neku promatranu veličinu iz MD simulacija, potrebno je izraziti tu veličinu kao funkciju položaja i impulsa čestica u sustavu. Pogreške u računalnim eksperimentima često su slične onima u stvarnim eksperimentima, poput nepravilno pripremljenog uzorka, prekratkog trajanja mjerenja, nepovratnih promjena u sustavu tijekom eksperimenta ili pogrešnog mjerenja onoga što mislimo da mjerimo.

Stoga, za pokretanje MD simulacija potrebno je odabrati početne položaje i brzine atoma u sustavu. Početni položaji atoma definiraju se odabirom trodimenzionalne strukture molekule (npr. određenom kristalografskim metodama), dok se početne brzine osnovnim česticama u sustavu (atomima, ako se radi o atomskom polju sila) pridružuju nasumično poštujući Maxwell-Boltzmannovu raspodjelu za određenu temperaturu (Haile, 1992). Tada je vjerojatnost da će atom mase  $m_i$  imati brzinu  $v_i$  pri temperaturi  $T$  dana izrazom:

$$P(v_i) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi k_B T}} e^{-\frac{m_i v_i^2}{2k_B T}} \quad [2]$$

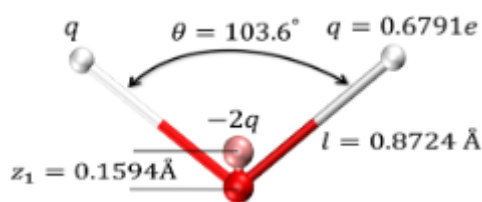
gdje je  $k_B$  Boltzmannova konstanta.

MD simulacije za sustav od  $N$  atoma definiran poljem sila i brzinama  $v_i$  svode se na numeričku integraciju Newtonovih jednadžbi gibanja:

$$m_i a_i = m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} = F_i = -\nabla U_i \quad [3]$$

gdje je  $r_i$  vektor položaja  $i$ -tog atoma,  $m_i$  masa  $i$ -tog atoma, a vrijednost sile  $F_i$  odgovara negativnoj derivaciji funkcije potencijalne energije (jednadžba [1]) koju atom položaja  $r_i$  ima u sustavu  $N$  čestica sa specifičnom geometrijom. Rješenje te jednadžbe predstavlja vremensku evoluciju koordinata i brzina čestica, a naziva se trajektorija.

Sila koja djeluje na pojedini atom mijenja se kako se mijenja njegov položaj. Zato se u vrlo kratkim vremenskim razmacima ( $\Delta t$ ) za svaki atom sustava iznova računa sila  $F_i$  koja u tom trenutku djeluje na taj atom i brzina kojim se on giba. U MD simulacijama obično se koristi vremenski korak od 1 fs jer je za red veličine manji od trajanja najbrže vibracije u sustavu, a to je istežanje C-H veze. Ako je potrebno, vremenski interval se može povećati uvođenjem restrikcija na vibracije C-H veza pomoću tzv. SHAKE algoritma (Miyamoto i Kollman, 1992). Kako bi simulirani sustav što bolje odražavao fiziološke uvjete, simulacije se obično provode u otapalu, pri čemu je najčešće korišteno otapalo voda, osobito u slučaju bioloških makromolekula. U MD simulacijama otapalo može biti opisano na nekoliko načina. Može se koristiti implicitni model otapala, poznat kao model kontinuuma, eksplicitni model ili kombinacija oba pristupa. Npr. prema OPC (engl. *optimal point charge*) eksplicitnom modelu vode, molekula vode opisana je s tri atoma (dva vodika i jedan kisik), pri čemu se za opisivanje interakcija između tih atoma i ostatka sustava koriste četiri točkasta naboja (slika 3 i tablica 1). Duljine veza između atoma i kutevi između njih su fiksni (Izadi i sur., 2014).

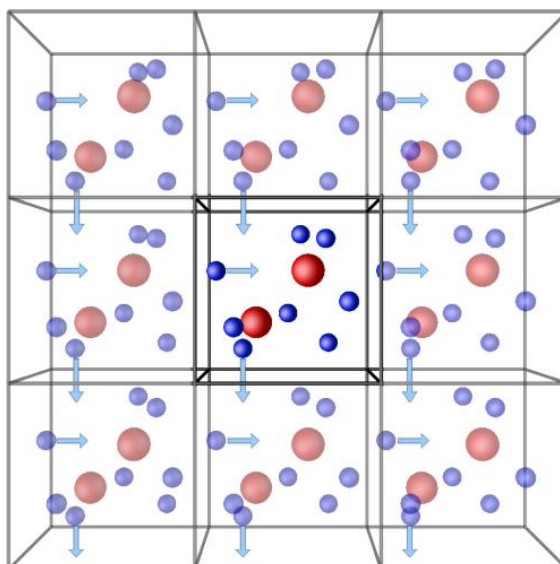


**Slika 3.** OPC model molekule vode korišten u simulacijama s eksplicitnim otapalom (prema Izadi i sur., 2014).

**Tablica 1.** Parametri za OPC model molekule vode (prema Izadi i sur., 2014)

Model	$\sigma^*/\text{Å}$	$\epsilon^*/\text{kJ mol}$	$l/\text{Å}$	$\theta/^\circ$	$q/e$	$z_1/\text{Å}$
OPC	3.16655	0.89036	0.8724	103.6	0.6791	0.1594

Prije početka MD simulacija, molekula koja se proučava smješta se u kutiju koja je ispunjena molekulama vode, što simulira otapanje molekule u vodi. Budući da su dimenzije te kutije konačne, te kako bi se izbjegli neželjeni rubni efekti na granici kutije, tijekom simulacija najčešće se primjenjuju periodični rubni uvjeti (engl. *periodic boundary condition*, PBC) (Bekker, 1996). Korištenjem periodičnih rubnih uvjeta, osnovna simulacijska kutija ponavlja se u svim smjerovima u prostoru uvođenjem mnoštva istovjetnih virtualnih kutija (slika 4). Položaji atoma simulirane molekule preslikavaju su u okolne kutije. Ako tijekom simulacije atom izađe iz osnovne kutije, njegova periodička preslika s istim dinamičkim svojstvima će je zamijeniti u točki koja se nalazi zrcalno simetrično s obzirom na mjesto izlaska (slika 4). Po potrebi, sustav se još može i neutralizirati dodavanjem protuiona (obično iona  $\text{Na}^+$  ili  $\text{Cl}^-$ ).



**Slika 4.** Pojednostavljeni prikaz sustava s periodičnim rubnim uvjetima. Osnovna simulacijska kutija ima oštro prikazane kuglice i stijenke. Kada čestica izađe iz središnje kutije, zamijeniti (naznačeno strelicom) će ju njezina periodička (tzv. „imaginarna“ čestica) slika iz susjedne kutije. Tako broj čestica u početnoj kutiji ostaje očuvan (preuzeto s <https://isaacs.sourceforge.io/phys/psc.html#fpsc>).

Većina eksperimenata provodi se pri konstantnom tlaku i/ili temperaturi. Korištenjem termostata i/ili barostata tijekom MD simulacije omogućuje se oponašanje realnih uvjeta održavanjem konstantne temperature (tzv.  $NVT$  ili kanonski ansambl) i/ili konstantnog tlaka i temperature (tzv.  $NpT$  ili izobarno-izotermni ansambl). Jedan od najčešće korištenih barostata je tzv. Berendsenov barostat, koji funkcionira na principu skaliranja koordinata čestica i vektora koji definiraju veličinu kutije na svakom koraku (Berendsen i sur., 1984). Skaliranje se postiže sprežanjem s vanjskom tlačnom kupelji prema sljedećoj jednadžbi:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{P_0 - P}{\tau_P} \quad [4]$$

gdje je  $\tau_P$  vremenska konstanta relaksacije barostata, a  $P$  i  $P_0$  su trenutni i referentni tlak. Modificirana jednadžba gibanja tada glasi:

$$\frac{d\mathbf{q}}{dt} = \mathbf{v} + \frac{\beta_T(P_0 - P)}{3\tau_P} \mathbf{q}, \quad [5]$$

gdje su  $\mathbf{q}$  i  $\mathbf{v}$  vektori položaja i brzina svih čestica, a  $\beta_T$  izotermna kompresibilnost.

Langevinov termostat često se koristi za regulaciju temperature sustava tijekom MD simulacija primjenom Langevinove jednadžbe gibanja:

$$\frac{d\mathbf{p}_i}{dt} = -\frac{\partial U(\mathbf{q})}{\partial \mathbf{q}_i} - \Gamma \mathbf{p}_i + \mathbf{W}_i \quad [6]$$

Prema toj jednadžbi, na brzine svih čestica osim sile koja proizlazi iz polja sila djeluju još dvije dodatne sile: sila trenja,  $\Gamma \mathbf{p}_i$  (gdje je  $\Gamma$  masom skalirajući koeficijent trenja), koja je proporcionalna brzini čestica momenta  $\mathbf{p}_i$ , i nasumična sila koje je rezultat slučajnih sudara,  $\mathbf{W}_i$ , i realizira se dodavanjem kinetičke energije česticama. Kombinacija trenja (koja smanjuje temperaturu budući da je  $\Gamma$  pozitivan broj) i nasumičnih sudara održava temperaturu sustava na željenoj vrijednosti  $T_0$  (Loncharich i sur., 1992).

Korištenje periodičnih rubnih uvjeta tijekom MD simulacije omogućuje primjenu Ewaldove tehnike sumiranja, odnosno njezine modifikacije, tzv. PME (engl. *particel-mash Ewald*, PME) metode, za izračun elektrostatskih interakcija u sustavu (Essmann i sur., 1995; Darden i sur., 1993). Naime, dok izračun veznih članova u polju sila ima vrlo povoljno skaliranje,  $3N-6$ , gdje je  $N$  broj atoma, nevezne intrakcije računaju se za sve parove atoma, zbog čega skaliraju kao  $N^2$ , što je računalno vrlo zahtjevno. Računalno vrijeme može se uštedjeti primjenom trećeg Newtonova zakona, prema kojem je  $F_{ij} = -F_{ji}$ , čime se račun neveznih interakcija smanjuje za faktor dva računanjem samo članova gdje je  $i < j$ . Također, račun se može pojednostaviti primjenom tzv. „isključivača“ (engl. *cutt-off*) ili funkcija tmjenja (engl. *switching function*). Primjenom *cut-off* funkcija definira se tzv. *cut-off* vrijednost (obično oko 10 Å) koja odgovara maksimalnoj udaljenosti između dva atoma unutar koje se interakcije računaju. Još bolji rezultati postižu se upotrebom *switching* funkcija, koje skaliraju iznos energije neveznih interakcija ovisno o udaljenosti, tako da na određenoj *cut-off* udaljenosti energija postaje jednaka nuli. Energije elektrostatskih interakcija opadaju mnogo sporije s povećanjem udaljenosti ( $r^{-1}$  za točkaste naboje) u usporedbi s van der Waalsovima interakcijama (privlačna komponenta opada s  $r^{-6}$ , a odbojna s  $r^{-12}$ ). Zbog toga su elektrostatske interakcije znatno složenije za računanje. Stoga se za adekvatan opis elektrostatskih interakcija u sustavu koriste ili znatno veće *cut-off* vrijednosti, ili PME metoda, koja u beskonačno periodičnim sustavima primjenjuje tehniku sumiranja u recipročnom prostoru za procjenu interakcija dalekog doseg. PME metoda smanjuje računalnu zahtjevnost na  $N \times \log N$  interakcija.

### 2.3.3. MM-PBSA i MM-GBSA račun slobodne energije

MM-PBSA (engl. *Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area*) metoda koristi se za određivanje slobodne energija vezanja liganda za protein ili proteina za drugi protein (Wang i sur., 2019). Metoda se temelji na naknadnoj obradi trajektorija dobivenih MD simulacijama. Već iz samog naziva metode na engleskom jeziku može se razumjeti način izračuna pojedinih komponenti slobodne energije. Slobodna Gibbsova energija vezanja molekule A (npr. ligand ili

protein) za molekulu B (npr. protein), računa se kao suma Gibbsove energije vezanja u vakuumu i razlike slobodnih energija solvatacije:

$$\Delta_r G^\circ_{vezanja,sol} = G^\circ_{kompleks} - G^\circ_{molekula A} - G^\circ_{molekula B} \quad [7]$$

$$\Delta_r G^\circ_{vezanja,sol} = \Delta_r G^\circ_{vezanja,vakuum} + (\Delta_{sol} G^\circ_{kompleks} - \Delta_{sol} G^\circ_{molekula A} - \Delta_{sol} G^\circ_{molekula B}) \quad [8]$$

Entalpijski doprinos Gibbsovoj energiji, pri konstantnom tlaku i volumenu, jednak je potencijalnoj energiji sustava ( $\Delta H = \Delta U$ ) te se računa na temelju jednadžbe polja sila kao suma svih vezanih i nevezanih interakcija. Slobodna energija kompleksiranja u vakuumu se računa iz usrednjenih razlika potencijalnih energija sustava nakon i prije kompleksiranja, pri čemu se usrednjavanje provodi na ansamblu konformera uzorkovanih tijekom nekog vremena MD simulacija. Slobodna energija solvatacije svakog pojedinog člana kompleksa sadrži polarni i nepolarni doprinos energiji solvatacije. Nepolarni doprinos energiji solvatacije najčešće se računa iz promjene površine dostupne otapalu (engl. *solvent accessible surface area*, SASA). Polarni (elektrostatski) doprinos slobodnoj energiji solvatacije određuje se numeričkim rješavanjem linearne Poisson-Boltzmanove jednadžbe, što se naziva MM-PBSA metodom, ili poopćene Bornove jednadžbe (engl. *Generalized Born*), što se naziva MM-GBSA metodom. Entalpijski doprinos slobodnoj energiji solvatacije računa se u kontinuiranom (implicitnom) otapalu.

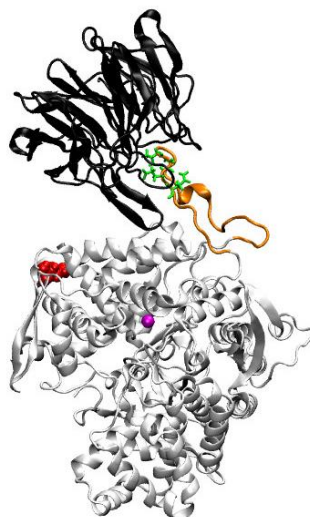
Entropijski doprinos Gibbsovoj energiji vezanja računalno je najzahtjevniji. Pretpostavka je da se ovaj doprinos može zanemariti kada nas zanimaju relativne energije vezanja više sličnih liganda ili proteina za isti receptor.

Dekompozicijom slobodne energije vezanje po pojedinim aminokiselinama, izračunate MM-GBSA metodom, mogu se izračunati doprinosi svake aminokiseline u kompleksu energiji vezanja.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. PRIPREMA SUSTAVA

Izgradnja kompleksa između DPP III i Kelch domene temeljila se na strukturi DPP III koju su članovi Laboratorija za biokemiju proteina i molekulsko modeliranja s Instituta Ruđer Bošković prethodno pripremili koristeći usmjerene (engl. *steered*) MD simulacije. Polazišna točka za te simulacije bila je struktura enzima bez vezanog liganda, pohranjena u PDB-u pod kodom 5EGY. U strukturi dobivenoj usmjerenim MD simulacijama, ETGE motiv je odmaknut od ostatka proteina te s njim ne ostvaruje vodikove veze, što je preduvjet za specifično vezanje ovog enzima s proteinom Keap1. Kako bi se istražila mogućnost smanjenja antioksidativnog odgovora u stanicama raka dojke, gdje je povišena ekspresija DPP III povezana s pojačanom aktivacijom Nrf2, u strukturu DPP III uvedena je mutacija Gly585 u glutamat. Ova mutacija odabrana je na temelju podataka iz baze cBioPortal za genomiku raka (<https://www.cbioportal.org/>), gdje je identificirana kao jedna od učestalijih mutacija u stanicama raka dojke. Dodatno, Gly585 se u strukturi DPP III nalazi na gornjoj strani gornje domene, u blizini ETGE-petlje, što sugerira da bi mogao utjecati na interakciju između DPP III i Kelch domene (slika 5). Struktura Kelch domene proteina Keap1 korištena za izgradnju kompleksa također je preuzeta iz PDB-a, gdje je pohranjena pod kodom 2FLU. Riječ je o kompleksu Kelch domene s vezanim 16 aminokiselina dugačkim peptidom iz Nrf2, koji sadrži očuvani ETGE motiv. Kompleks DPP III–Kelch izgrađen je sravnjivanjem ETGE motiva iz navedenog peptida s onim iz DPP III u programu VMD (<https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>). S obzirom na to da su strukture preuzete iz PDB-a određene rentgenskom difrakcijom, one ne sadrže informacije o položaju vodikovih atoma. Stoga je prije dodavanja vodikovih atoma bilo potrebno pažljivo definirati protonacijska stanja svih aminokiselina, a u slučaju neutralnog histidina i odgovarajući tautomer pri pH 7. Tijekom MD simulacije provedenih u okviru ovog diplomskog rada, svi glutamati i aspartati su bili negativno nabijeni, dok su svi arginini i lizini bili pozitivno nabijeni, kao što se i očekuje pri fiziološkim uvjetima. Protonacijska stanja i tautomeri (imidazolni proton na N $\epsilon$  ili N $\delta$  atomu) histidina pri pH 7 određeni su pomoću programa H++ (<http://newbiophysics.cs.vt.edu/H++/>) te na temelju dosadašnjih rezultata molekuskog modeliranja. Svi histidini bili su u neutralnom obliku, osim H568 koji je bio pozitivno nabijen (Tomić i sur., 2016). Osim H436, H432, H450 i H455 koji su imali imidazolni proton na N $\delta$  atomu u strukturi DPP III, svi ostali histidini imali su imidazolni proton na N $\epsilon$  atomu.



**Slika 5.** Početna struktura kompleksa DPP III–Kelch korištena za MD simulacije. DPP III je obojan sivom bojom (pri čemu je ETGE-petlja, Gln463-Tyr489, obojana narančasto), a Kelch domena crnom bojom. Aminokiseline iz ETGE motiva prikazane su zelenim štapićima, a mutirana aminokiselina (G585) crvenim kuglicama. Cink je prikazan ružičastom kuglicom.

Kompleks DPP III–Kelch smješten je u kutiju oblika krnjeg oktaedra pri čemu je rub kutije od bilo kojeg atoma proteina bio udaljen najmanja 11 Å. Kutija je potom ispunjena OPC molekulama vode, a kompleks neutraliziran dodavanjem natrijevih iona blizinu negativno nabijenih iona na površini proteina. Proteini su opisani ff19SB poljem sila, dok su za cinkov ion unutar aktivnog mjesta enzima korišteni već unaprijed razvijeni hibridni vezno/nevezni parametri (Tomić i sur., 2019). Parametrizacija, otapanje i neutralizacija sustava provedena je pomoću programa *tLeap* koji se nalazi unutar programskog paketa AMBER 22 (Case i sur., 2023; Case i sur., 2022; Salomon- Ferrer i sur., 2013; Case i sur., 2005). Dobiveni sustav, simuliran je korištenjem periodičnih rubnih uvjeta. Elektrostatske interakcije računane su korištenjem PME metode.

### 3.2. MD SIMULACIJE

Neposredno prije MD simulacija provedena je minimizacija energije sustava pomoću programa *sander* koji se nalazi unutar programskog paketa AMBER 22. Sustav je minimiziran u tri ciklusa uz različita ograničenja. Prvi ciklus minimizacije (2500 koraka) proveden je tako da su položaji atoma kompleksa i cinka ograničeni korištenjem harmonijskog potencijala s konstantom sile  $133,89 \text{ J mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ , dok je dopušteno pomicanje molekulama vode. U drugom ciklusu (2500 koraka), osim molekulama vode, dopušteno je pomicanje i atomima bočnih ogranaka aminokiselina, dok su položaji atoma okosnice kompleksa i cinkovog iona ograničeni



korištenjem harmonijskog potencija s konstantom sile  $50,21 \text{ J mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ . U trećem ciklusu (5000 koraka) nije bilo nikakvih ograničenja. Tijekom sva tri ciklusa minimizacije za prvih 470 koraka koristila se metoda najstrmijeg spusta (eng. *steepest descent*), a za preostale korake metoda konjugiranog gradijenta (engl. *conjugate gradient*). Nakon toga, sustav je zagrijan od 0 do 300 K tijekom 250 ps korištenjem *NVT* ansambla, uz vremenski korak od 1 fs. Temperatura je regulirana upotrebom Langevinovog termostata, s frekvencijom sudara  $1 \text{ ps}^{-1}$  (Loncharich i sur., 1992). Tijekom sljedećih 250 ps simulacije, uz vremenski korak od 2 fs, podešena je gustoća vode pri konstantnoj temperaturi i tlaku (1 atm i 300 K) korištenjem *NpT* ansambla. Konstantni tlak osiguran je Berendsovim barostatom (Berendsen i sur., 1984). Upotreba SHAKE algoritma omogućila je ograničavanje vibracija veza koje sadrže vodikove atome (Miyamoto i Kollman, 1992). Slijedećih ~3500 ns produkcijske faze kompleksa DPP III–Kelch provedene su korištenjem *NpT* ansambla uz vremenski korak od 2 fs.

### 3.3. ANALIZA REZULTATA MD SIMULACIJA

Analiza trajektorija prikupljenih MD simulacijama obuhvaća izračun promjene geometrijskih parametara, sekundarne strukture proteina, vodikovih veza te nativnih i nenativnih kontakata tijekom simulacija. Također, uključuje izračun relativnih afiniteta vezanja protein-protein kompleksa i dekompozicijsku analizu slobodne energije vezanja po pojedinim aminokiselinama kompleksa. Analize su provedene korištenjem programa *cptraj* i *MMPBSA.py* dostupnih unutar programskog paketa AMBER 22.

#### 3.3.1. Korijen srednjeg kvadrata odstupanja

Korijen srednjeg kvadrata odstupanja (engl. *root mean square deviation, RMSD*) je pokazatelj stabilnosti strukture proteina tijekom MD simulacije, a računa se prema jednadžbi:

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum_i^N (r_{A,i} - r_{B,i})^2}{N}} \quad [9]$$

gdje je  $N$  broj atoma,  $r_{A,i}$  označava položaj  $i$ -tog atoma u strukturi A, a  $r_{B,i}$  označava položaj  $i$ -tog atoma u strukturi B. RMSD vrijednost pokazuje koliko strukture dobivene tijekom MD simulacija odstupaju od referentne strukture. Referentna struktura je najčešće prva početna struktura produkcijske faze.

#### 3.3.2. Korijen srednjeg kvadrata fluktuacija

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

$$\text{RMSF} = \sqrt{\frac{\sum_{t_j}^T (x_i(t_j) - \tilde{x}_i)^2}{T}}. \quad [10]$$

RMSF opisuje oscilacije jednog ili grupe atoma od srednjeg položaja. Što je neki dio proteina fleksibilniji njihovi RMSF su veći. Obično se računa samo RMSF C $\alpha$  atoma okosnice kako bi se odredile fleksibilnije (pokretnije) regije proteina.

Razlika između RMSD i RMSF računa je ta što se kod RMSD računa prosjek preko svih čestica, dajući vrijednosti kao funkcije vremena, dok se kod RMSF računa vremenski prosjek za  $i$ -tu česticu.

### 3.3.3. Radijus giracije

Korijen iz srednjeg kvadrata udaljenosti atoma od centra mase, radijus giracije ( $R_g$ ), najčešće je korištena mjera promjene globularnosti proteina tijekom MD simulacija, a računa se prema jednadžbi:

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum (R_i - R_{CM})^2}{N}} \quad [11]$$

gdje  $R_i$  označava položaj  $i$ -tog atoma,  $R_{CM}$  označava položaj centra mase  $N$  atoma za koje se  $R_g$  računa.

### 3.3.4. Promjena udaljenosti između atoma

Približavanje ili udaljšavanje ETGE-petlje od gornje domene DPP III praćeno je mjerenjem promjene udaljenosti između centra mase C $\alpha$  atoma ETGE motiva i centra mase C $\alpha$  atoma segmenta  $\alpha$ -zavojnice (Leu622-Ser630) smještenog na vrhu gornje domene DPP III. Promjena međusobnog položaja Kelch domene i DPP III tijekom MD simulacija opisana je analizom udaljenosti između specifičnih parova C $\alpha$  atoma aminokiselina: a) Ala635 iz DPP III i Pro384 iz Kelch domene te b) Gly467 iz DPP III i Pro384 iz Kelch domene.

### 3.3.5. Račun sekundarne strukture proteina

Stabilnost sekundarnih struktura koje formiraju pojedini aminokiselinski ostaci unutar DPP III i domene Kelch tijekom MD simulacija ispitana je primjenom DSSP metode unutar programa *cpptraj*. DSSP metoda (engl. *define secondary structure of proteins*) koristi se za određivanje sekundarne strukture proteina na temelju pozicija atoma amidne i karbonilne skupine u okosnici polipeptida (Kabsch i Sander, 1983).

### 3.3.6. Račun vodikovih veza

Ukupan broj vodikovih veza između DPP III i domene Kelch tijekom čitave trajektorije dobivene MD simulacijama izračunat je programom *cpptraj*. Vodikova veza smatra se prisutnom ako je udaljenost između heteroatoma koji formiraju vodikovu vezu (donora i akceptora vodikove veze) manja ili jednaka 3,5 Å te ako je kut između njih veći ili jednak od 120°.

### 3.3.7. Analiza nativnih i nenativnih kontakata

Budući da na stabilnost protein-protein kompleksa, osim vodikovih veza, utječe i čitav niz neveznih interakcija, uvid u njihov ukupan broj tijekom MD simulacija postignut je analizom nativnih i nenativnih kontakata. Nativni kontakt tijekom MD simulacije predstavlja par atoma koji su u strukturi kompleksa DPP III–Kelch, dobivenoj na samom početku produkcijske faze, na međusobnoj udaljenosti manjoj od 4 Å. S druge strane, nenativni kontakti su svi parovi atoma iz tog kompleksa koji zadovoljavaju isti kriterij udaljenosti u svim kasnijim strukturama generiranim tijekom MD simulacija. Programom *cpptraj* određeni je ukupan broj svih nativnih i nenativnih kontakata između Kelch domene i DPP III tijekom produkcijske faze.

### 3.3.8. MM-PBSA i MM-GBSA račun slobodne energije vezanja

Slobodne energije vezanja između Kelch domene i DPP III tijekom MD simulacija izračunate su MM-PBSA metodom, koristeći program MMPBSA.py dostupan unutar programskog paketa AMBER 22. Entalpijski doprinos slobodnoj energiji vezanja izračunat je za ansamble struktura generiranih u intervalima od 400 ns (s posljednjim intervalom od 274 ns) tijekom čitave produkcijske faze MD simulacija, počevši od 400. ns. Unutar intervala strukture su uzorkovane svakih 400 ps. Ionska jakost iznosila je 0,1 mM dok je dielektrična konstanta proteina bila 2,0, a otapala 80,0 (voda). Polarni doprinos entalpiji solvatacije računat je rješavanjem linearne Poisson-Boltzmannove jednadžbe, dok je nepolarni doprinos određen na temelju površine dostupne otapalu, pri čemu su korištene standardne vrijednosti konstanti (površinska napetost  $\gamma = 0,1583 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ ,  $\beta = -2,3831 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). S obzirom na to da je fokus bio na izračunu relativne promjene energije vezanja tijekom MD simulacija istog sustava, entropijski doprinos

je zanemaren u procjeni slobodne energije.

Utjecaj mutacije određenih aminokiselina Kelch domene na afinitet vezanja za DPP III ispitan je primjenom tzv. *alanin-scan* metode. Ova metoda omogućuje zamjenu pojedinih aminokiselina u proteinskoj strukturi alaninom kako bi se utvrdio njihov doprinos stabilizaciji kompleksa. Za MM-PBSA račun slobodne energije vezanja mutirane Kelch domene i DPP III korištena je postojeća trajektorija kompleksa s divljim tipom domene Kelch (strukture uzorkovane svakih 400 ps, počevši od 400. ns MD simulacija) te *MMPBSA.py* program. Svi ostali parametri bili su identični onima korištenima u računu za kompleks s divljim tipom Kelch domene. MM-PBSA pristupom izračunat je entalpijski doprinos slobodnoj energiji vezanja kompleksa DPP III–Kelch nakon jednostruke supstitucije fenilalanina 335 i aspartata 385 alaninom unutar Kelch domene.

### 3.3.9. Dekompozicija slobodne energije vezanja po aminokiselinama

Kako bi se identificirali aminokiselinski ostaci koji sudjeluju u nastanku protein-protein kompleksa između DPP III i Kelch domene, provedena je dekompozicijska analiza slobodne energije vezanja po pojedinim aminokiselinama kompleksa korištenjem MM-GBSA metode također preko *MMPBSA.py* programa. Ovom analizom određeni su doprinosi pojedinih aminokiselina stabilizaciji kompleksa. Račun je proveden na čitavoj trajektoriji iz produkcijske faze, počevši od 400. ns, pri čemu su uzete u obzir strukture uzorkovane svakih 400 ps. Ionska jakost iznosila je 0,1 M dok je dielektrična konstanta proteina bila 1,0, a otapala 80,0. Polarni doprinos entalpiji solvatacije računat je rješavanjem poopćene Bornove jednadžbe, a nepolarni korištenjem LCPO (engl. *Linear Combination of Pairwise Overlaps*) modela uz standardne vrijednosti konstanti.

## 3.4. PREDVIĐANJE STRUKTURE KOMPELKSA ALPHAFOLDOM

Razvoj modela AlphaFold3 (<https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>) donio je revoluciju u predikciji kompleksa koji uključuju proteine, nukelinske kiseline, male molekule, ione i modificirane aminokisline, pružajući znatno veću točnost u usporedbi s mnogim ranijim specijaliziranim alatima. Stoga je AlphaFold3 server (<https://deepmind.google/technologies/alphafold/alphafold-server/>) korišten za predikciju najvjerojatnijih struktura kompleksa DPP III–Kelch. Za predviđanje strukture ovog protein-protein kompleksa korištene su primarne sekvence proteina pohranjene u PDB bazi pod kodovima 5EGY i 2FLU.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Povećana otpornost stanica raka na oksidativni stres, uzrokovana prekomjernom aktivacijom proteina Nrf2, jedan je od glavnih razloga neuspjeha antitumorskih terapija. Kod određenih vrsta raka, poput raka dojke, debelog crijeva i pluća, pojačana aktivacija Nrf2 povezuje se s povećanom razinom proteina DPP III, koji se natječe s Nrf2 za vezanje na Keap1. Budući da je interakcija između Nrf2 i Keap1 ključna za regulaciju ekspresije citoprotektivnih gena u stanicama raka, sprječavanje vezanja DPP III na Keap1 u uvjetima njegove prekomjerne ekspresije mogao bi imati terapijski učinak.

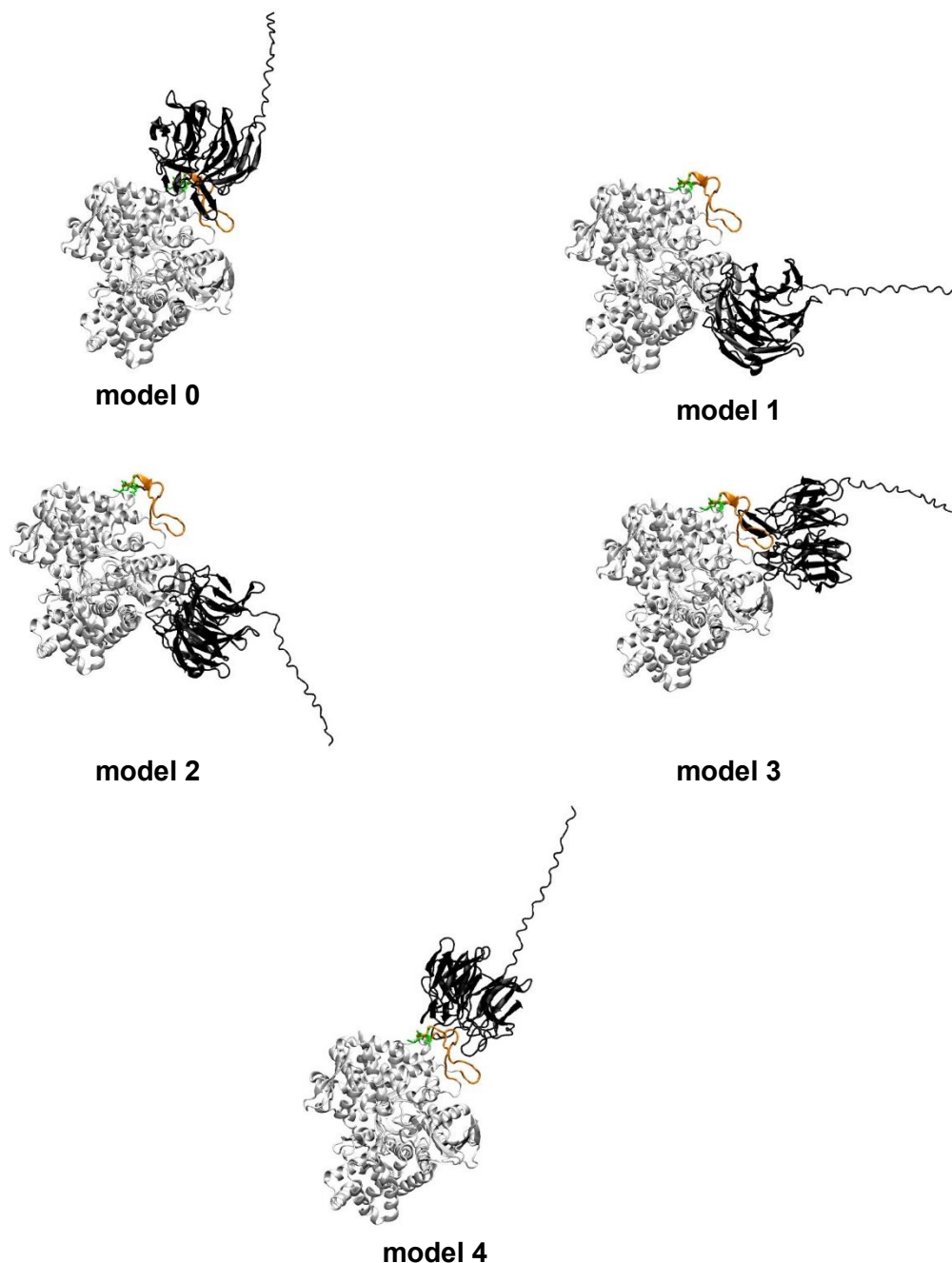
Pomoću molekuskog modeliranja izgrađen je kompleks između mutiranog proteina DPP III (G585E), pronađenog u stanicama raka dojke, i Kelch domene. Dugačkim MD simulacijama ispitana je stabilnost ovog kompleksa, dok su detaljnim analizama MD trajektorija identificirane aminokiseline uključene u međusobne interakcije ovih proteina, pri čemu su prepoznate one koje pridonose i ne pridonose vezanju. Na temelju provedenih analiza, pomoću *alanin scan* metode ispitano je kako zamjena aminokiselina iz Kelch domene, koje ne pridonose stabilizaciji kompleksa s DPP III, alaninom, utječe na afinitet vezanja mutiranog Kelcha za DPP III u usporedbi s divljim tipom Kelcha. Cilj ovog istraživanja bio je identificirati mutaciju u Kelch domeni koja bi omogućila snažnije vezanje za DPP III u odnosu na endogeni protein Keap1. Takva mutirana Kelch domena mogla bi djelovati kao klopka za prekomjerno proizvedenu DPP III, potencijalno smanjujući aktivaciju Nrf2 i poboljšavajući učinkovitost antitumorske terapije.

### 4.1. STRUKTURA I DINAMIKA KOMPLEKSA TIJEKOM MD SIMULACIJA

Od kad su Hast i sur. (2013) otkrili da DPP III interagira s proteinom Keap1, provedeno je nekoliko računalnih istraživanja s ciljem razumijevanja strukture ovog protein-protein kompleksa. Hast i sur. (2013) su pokazali da DPP III kompetira Nrf2 za vezanje na Keap1, što ukazuje na to da DPP III ostvaruje interakciju putem svog ETGE motiva, vežući se za Kelch domenu proteina Keap1 na sličan način kao i Nrf2. Gundić i sur. (2016) su primjenom molekuskog modeliranja, točnije molekuskog uklapanja (engl. *docking*), pokušali predvidjeti strukturu kompleksa DPP III–Kelch. Dobivene modele kompleksa podvrgnuli su MD simulacijama (sveukupno gotovo 600 ns) te su primijetili da se u najstabilnijim strukturama kompleksa ETGE motiv iz fleksibilne petlje DPP III veže u unutrašnjost pore s donje strane Kelch domene. Matić i sur. (2021) odredili su da je vezanje DPP III za Kelch domenu dvostupanjski proces koji uključuju prvo endergono odvajanje ETGE-petlje od tijela protein, a potom egzergono vezanje DPP III za Kelch domenu.

Korištenjem AlphaFold3 servera (<https://deepmind.google/technologies/alphafold/alphafold-server/>; pretraživanje napravljeno 25.10.2024.) za predviđanje strukture kompleksa između

DPP III i Kelch domene dobiven je niz različitih modela vezanja (slika 6). U modelima u kojima DPP III interagira s Kelch domenom putem ETGE-petlje, uočeno je da ETGE-petlja DPP III ostaje vezana za gornju domenu DPP III (slika 6, modeli 0, 3 i 4). Zbog toga ETGE motiv ne uspijeva ostvariti interakcije karakteristične za ETGE motiv iz 16 aminokiselina dugačkog peptida iz Nrf2, kada je vezan za Kelch domenu u strukturi s PDB kodom 2FLU.

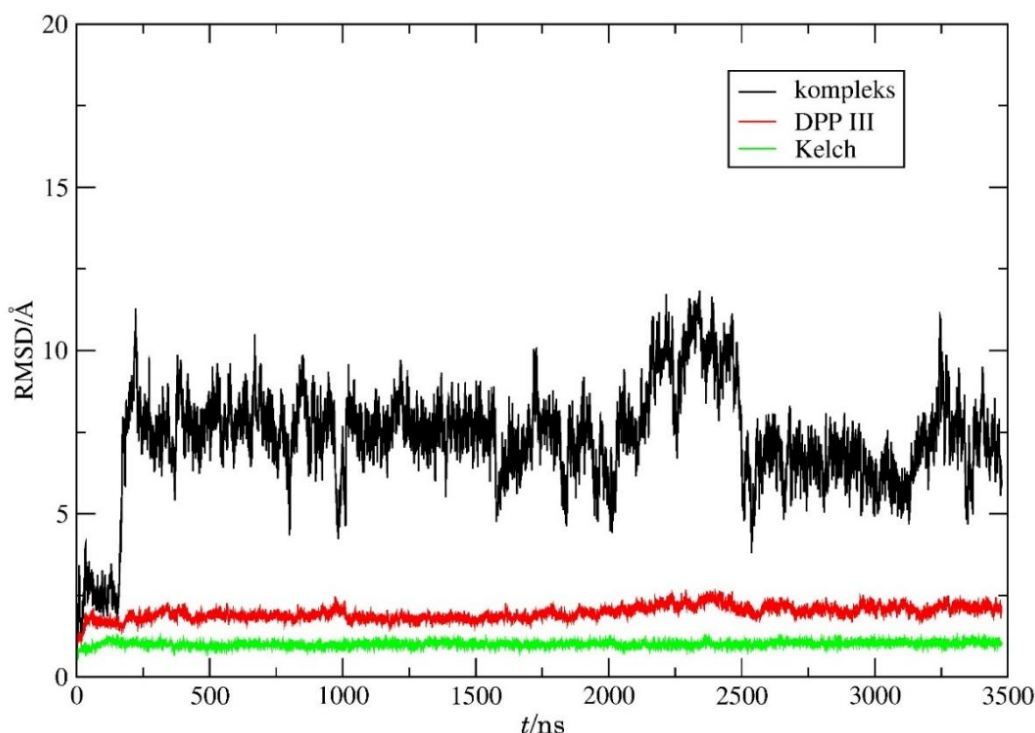


**Slika 6.** Modeli kompleksa DPP III–Kelch generirani pomoću AlphaFold3 servera. U predviđanju modela korištene su FASTA sekvence proteina DPP III i Kelch domene, preuzete iz PDB struktura s oznakama 5EGY i 2FLU. Protein DPP III prikazan je sivom bojom, s ETGE-petljom (Gln463-Tyr489) označenom narančastom bojom, dok je Kelch domena prikazana crnom bojom. ETGE-motiv unutar petlje dodatno je istaknut zelenim štapićima.

Budući da trodimenzionalna struktura ovog protein-protein kompleksa još uvijek nije eksperimentalno određena, a razvoj računalne tehnologije omogućuje izvođenje MD simulacijama na sve duljim vremenskim skalama, prvi cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti konformacijski prostor kompleksa DPP III–Kelch na mikrosekundnoj vremenskoj skali. Pretpostavka je da bi dulje simulacije omogućile pouzdanije određivanje stvarne strukture kompleksa, jer bi sustav imao više vremena za istraživanje svog konformacijskog prostora. Precizno određivanje strukture ovog kompleksa preduvjet je za predviđanje mutacija u Kelch domeni koje bi omogućile snažnije vezanje mutantu Kelcha za DPP III u usporedbi s endogenim proteinom Keap1.

Kao što je opisano u trećem poglavlju, početna struktura kompleksa izgrađena je na temelju zatvorene forme DPP III u kojoj je ETGE motiv odmaknut 21.5 Å od gornje domene (udaljenost između centara mase C $\alpha$  atoma ETGE motiva i dijela  $\alpha$ -zavojnice iz gornje domene DPP III, točnije Leu622-Ser630). To je trebalo omogućiti da, nakon poravnjanja ETGE motiva iz DPP III s ETGE motivom peptida vezanog za Kelch domenu (PDB kod 2FLU), Kelch domena ima dovoljno prostora da tijekom MD simulacija zauzme najpovoljniju orijentaciju u odnosu na DPP III. U ovom diplomskom radu provedene su MD simulacije kompleksa DPP III–Kelch u izobarno-izotermnim uvjetima u eksplicitnom otapalu, pri čemu je generirana trajektorija duljine 3474 ns (~3,5  $\mu$ s). Stabilnost struktura pojedinačnih proteina i kompleksa ispitana je analizom različitih geometrijskih parametara tijekom MD simulacija.

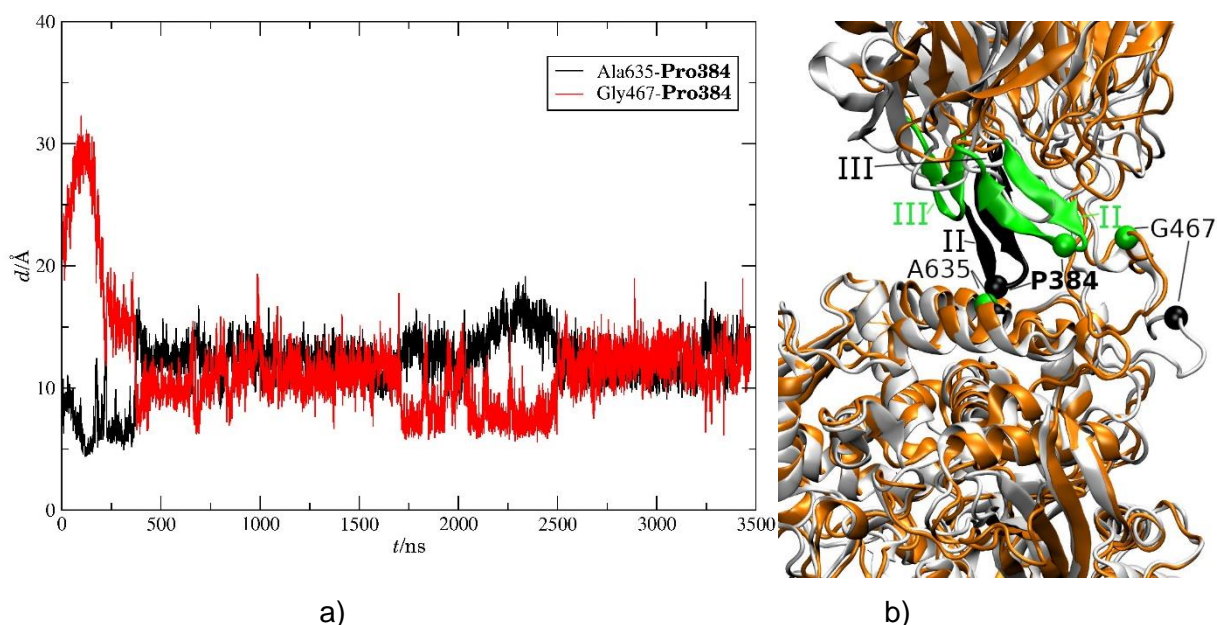
Iz RMSD profila pojedinačnih proteina u kompleksu, prikazanih crvenom (DPP III) i zelenom (Kelch domena) krivuljom na slici 7, može se uočiti da je trodimenzionalna struktura proteina u kompleksu očuvana tijekom MD simulacija, s RMSD vrijednostima nižim od 2,5 Å. To ukazuje na značajnu stabilnost struktura pojedinačnih proteina u kompleksu. S druge strane, znatno više RMSD vrijednosti izračunate za kompleks (crna krivulja na slici 7) ukazuju na promjenu njegove trodimenzionalne strukture u odnosu na početnu strukturu tijekom MD simulacije. Najveći porast u RMSD vrijednostima događa se nakon otprilike 200 ns MD simulacije, nakon čega se RMSD vrijednosti kompleksa kreću u rasponu između 5 i 10 Å.



**Slika 7.** RMSD profil kompleksa DPP III–Kelch te pojedinačnih proteina u kompleksu tijekom MD simulacija uzimajući u obzir samo teške atome iz okosnice (C, C $\alpha$ , N i O) proteina.

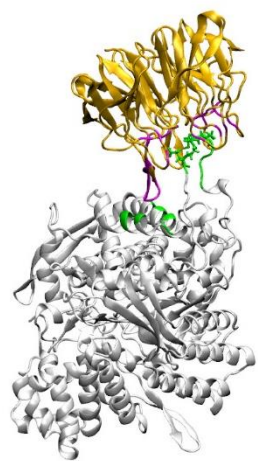
Tijekom prvih 200 ns MD simulacija,  $\beta$ -ploča smještena između B i C lanaca u drugom (II.) Kelch ponavljajućem motivu, koja predstavlja najizbočeniji dio strukture s donje strane Kelch domene, dodatno se približava  $\alpha$ -zavojnici (Asp633-Ala645) u gornjoj domeni DPP III. To se očituje dodatnim smanjenjem udaljenosti između Pro384, smještenog na vrhu te  $\beta$ -ploče iz Kelch domene i Ala635, smještenog na  $\alpha$ -zavojnici DPP III (slika 8). Istovremeno dolazi i do smanjenja udaljenosti između Pro384 i Gly467 koji se nalazi na N-kraju ETGE-petlje DPP III. Ove promjene upućuju na dodatno približavanja dviju proteinskih podjedinica u kompleksu. Nakon približno 500 ns, udaljenost između Ala635 i Pro384 blago se povećava, što upućuje na postupno udaljavanje proteinskih podjedinica i ta udaljenost ostaje stabilna do kraja simulacije. S druge strane, daljnje smanjenje udaljenosti između Gly467 i Pro384 u razdoblju od 1750. do 2500. ns sugerira dodatno približavanje  $\beta$ -ploče iz drugog Kelch ponavljajućeg motiva, N-kraju ETGE-petlje iz DPP III omogućujući direktan kontakt između ova dva dijela tih struktura.



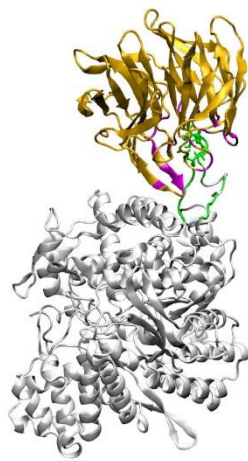


**Slika 8.** a) Udaljenost između parova C $\alpha$  atoma aminokiselina iz DPP III i Kelch domene tijekom MD simulacija, pri čemu su nazivi aminokiselina iz Kelch domene podebljani. b) Položaji C $\alpha$  atoma (prikazani kao kuglice), za koje su izračunate udaljenosti, prikazani su na strukturi kompleksa na početku MD simulacije (obojana bijelom bojom) i nakon 2250 ns simulacije (obojana narančastom bojom). Dvije  $\beta$ -ploče s donje strane Kelch domene, smještene između B i C lanaca u II. (aminokiseline 359-409) i III. (aminokiseline 410-456) Kelch ponavljajućem motivu (slika 1), označene su crnom bojom na početku simulacije, a zelenom bojom nakon 2250 ns simulacije.

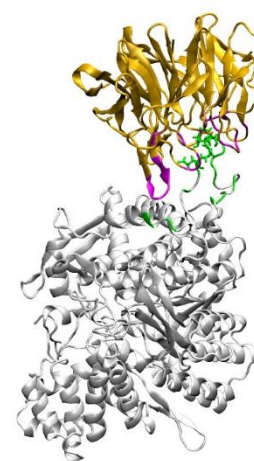
Aminokiseline iz  $\alpha$ -zavojnica na vrhu gornje domene DPP III (Val613-Thr631 i Asp633-Ala645) povremeno ostvaruju interakcije s aminokiselinama iz  $\beta$ -ploče koja se nalazi između B i C lanaca u II. Kelch ponavljajućem motivu tijekom cijele produkcijske faze simulacije, što je prikazano na strukturama uzorkovanim nakon 0, 800, 1600, 2000 i 3474 ns MD simulacije na slici 9. Međutim, većinu vremena, kontakti između DPP III i Kelch domene ograničeni su na aminokiseline iz fleksibilne ETGE-petlje DPP III i aminokiseline koje se nalaze unutar pore na donjoj strani Kelch domene. Ovi kontakti su prikazani na strukturama uzorkovanim nakon 400, 1200, 2400, 2800 i 3200 ns MD simulacije na slici 9.



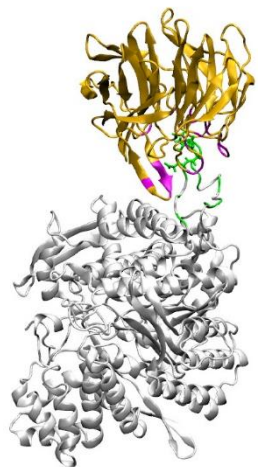
0 ns



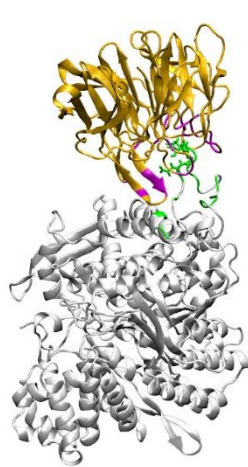
400 ns



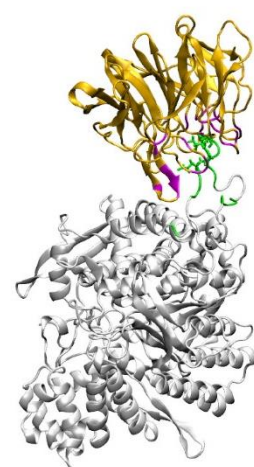
800 ns



1200 ns

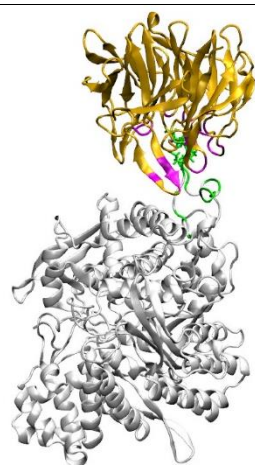


1600 ns

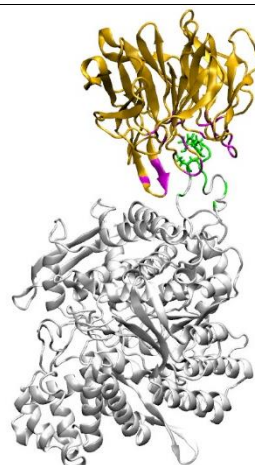


2000 ns

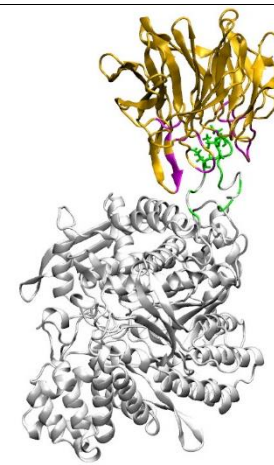
---



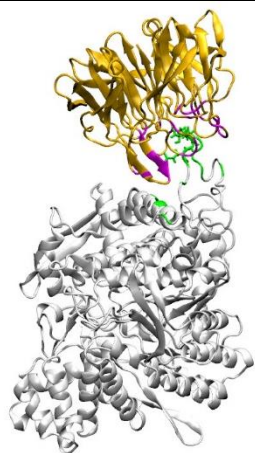
2400 ns



2800 ns



3200 ns

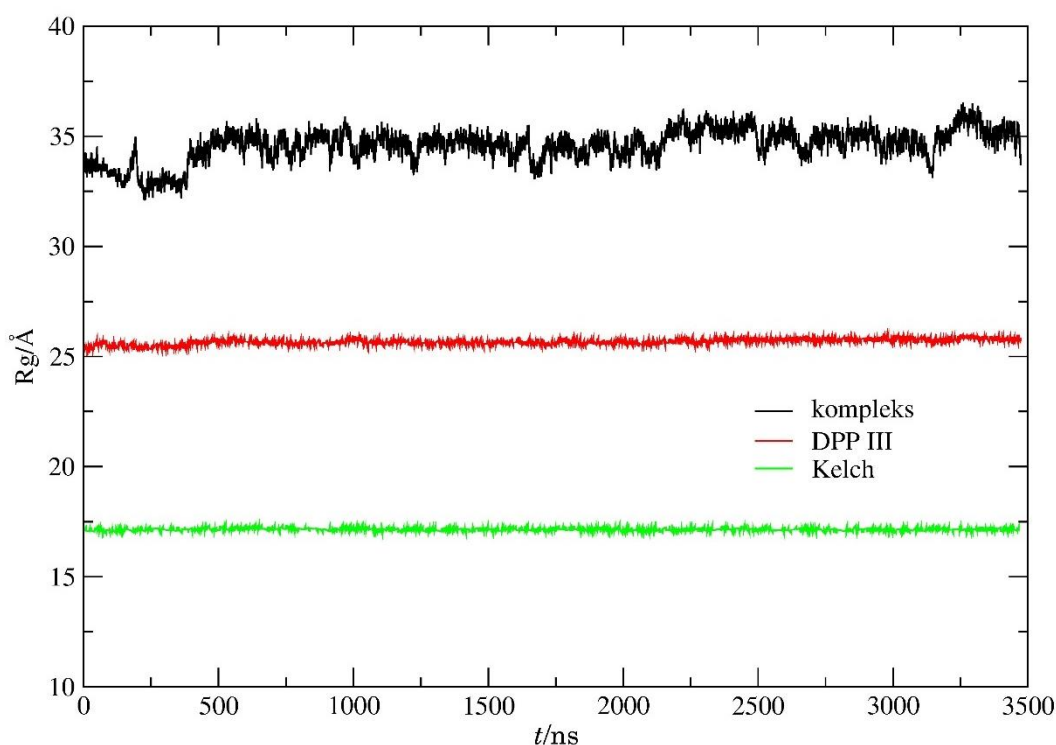


3474 ns

---

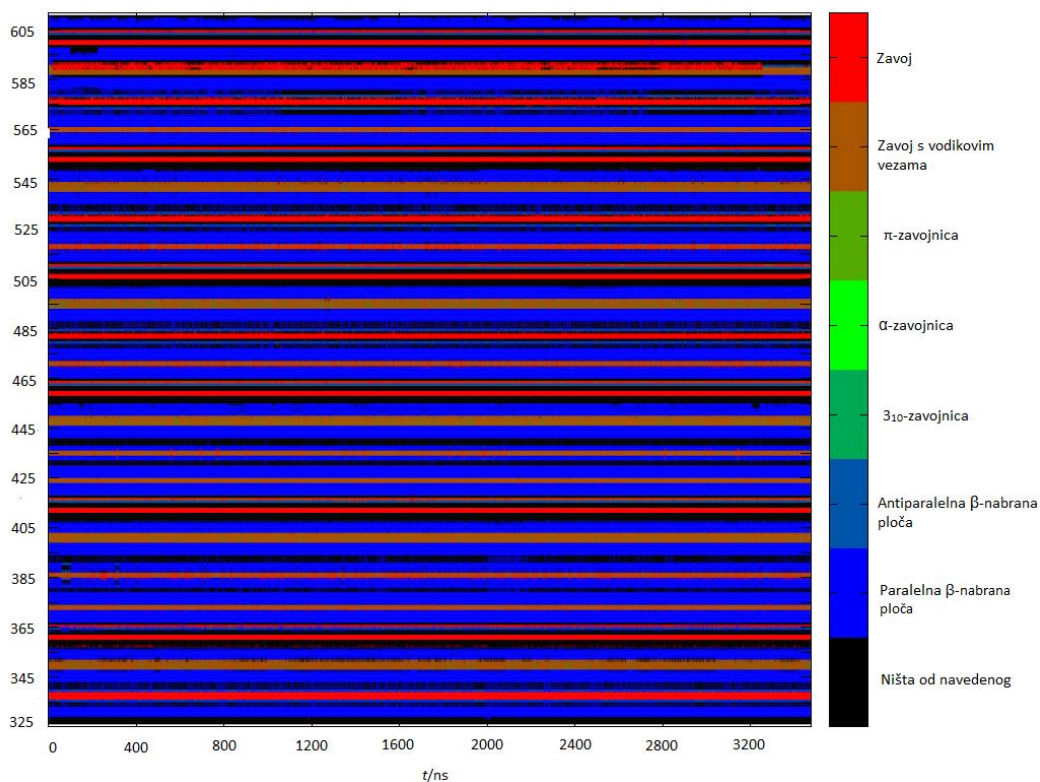
**Slika 9.** Strukture kompleksa DPP III–Kelch iz MD simulacija. Ispod svake strukture označeno je vrijeme iz simulacije kojem ta struktura odgovara. DPP III je obojana bijelom bojom, dok je Kelch domena obojana zlatnom bojom. Dio DPP III koji se u strukturi kompleksa nalazi na udaljenosti do 4 Å od Kelch domene obojen je zelenom bojom, dok je dio Kelch domene unutar iste udaljenosti od DPP III obojen ružičastom bojom. Aminokiseline iz ETGE motiva DPP III prikazane su štapićima.

Dodatnu potvrdu očuvanosti trodimenzionalnih struktura proteina DPP III i Kelch domene u kompleksu tijekom MD simulacija pružaju profili promjena radijusa giracije (crvena i zelena krivulja na slici 10). Iz njih se vidi da nije došlo do značajnih promjena u globularnosti (obliku) pojedinačnih proteina tijekom produkcijske faze simulacija. Radijus giracije kompleksa (crna krivulja na slici 10) pokazuje blago povećanje  $R_g$  vrijednosti nakon 500. ns simulacije, što upućuje na lagano povećanje globularnosti kompleksa. Ovo se slaže s postupnim udaljavanjem proteinskih podjedinica opaženim nakon 500. ns na slici 8.

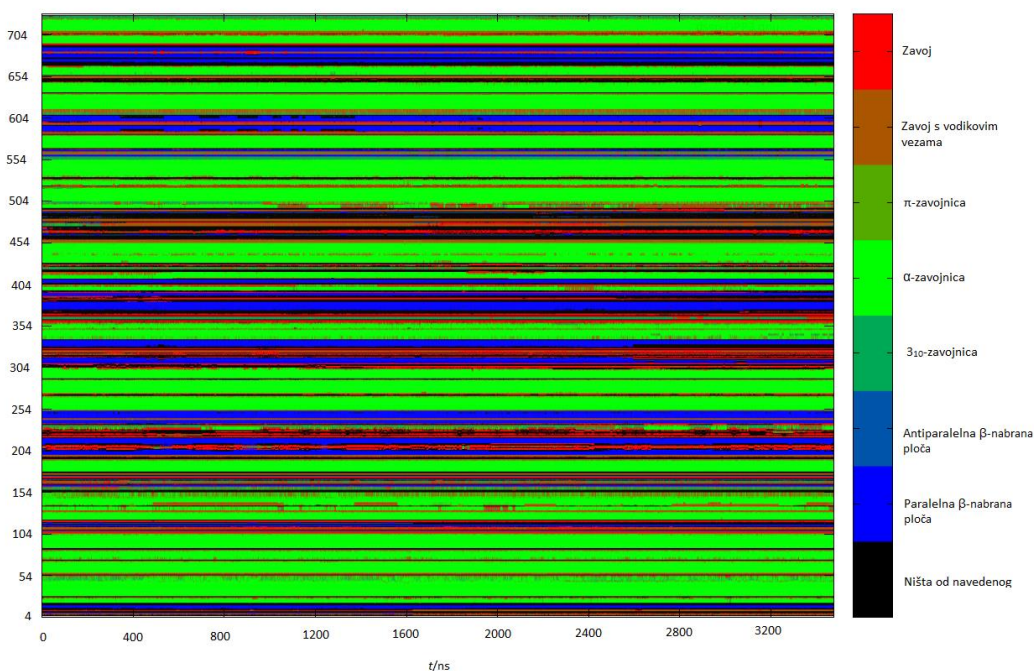


**Slika 10.** Promjena radijusa giracije ( $R_g$ ) kompleksa DPP III–Kelch te pojedinačnih proteina u kompleksu tijekom MD simulacija. U obzir su uzeti samo teški atomi iz okosnice proteina (C, C $\alpha$ , N i O).

Osim trodimenzionalne strukture proteina, sekundarna struktura DPP III (slika 11a) i Kelch domene (slika 11b) uglavnom ostaje očuvana tijekom MD simulacija. Najizraženije promjene u sekundarnoj strukturi Kelch domene zabilježene su u regiji Pro586–Asp589, koja odgovara zavoju između C i D lanaca u VI. Kelch ponavljajućem motivu na gornjoj strani Kelch domene. Kod DPP III, promjene u sekundarnoj strukturi uočene su na N-kraju  $\alpha$ -zavojnice iz gornje domene (aminokiseline Thr501–Leu520) te u zavojima i fleksibilnoj petlji koji povezuju  $\beta$ -lance u  $\beta$ -nabranu ploču u donjoj domeni, aminokiseline Tyr211–Tyr251.



a)

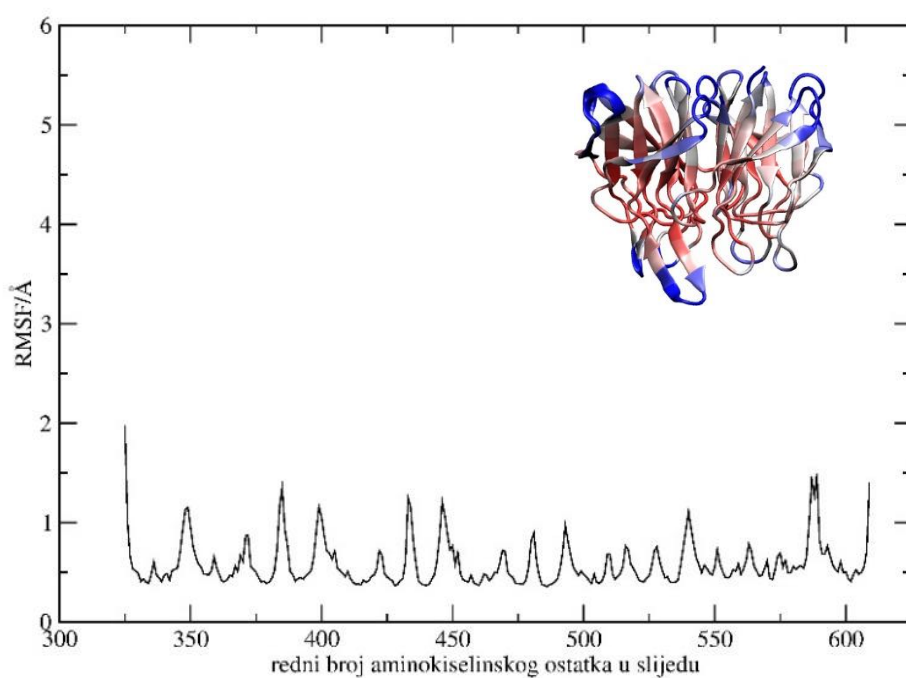


b)

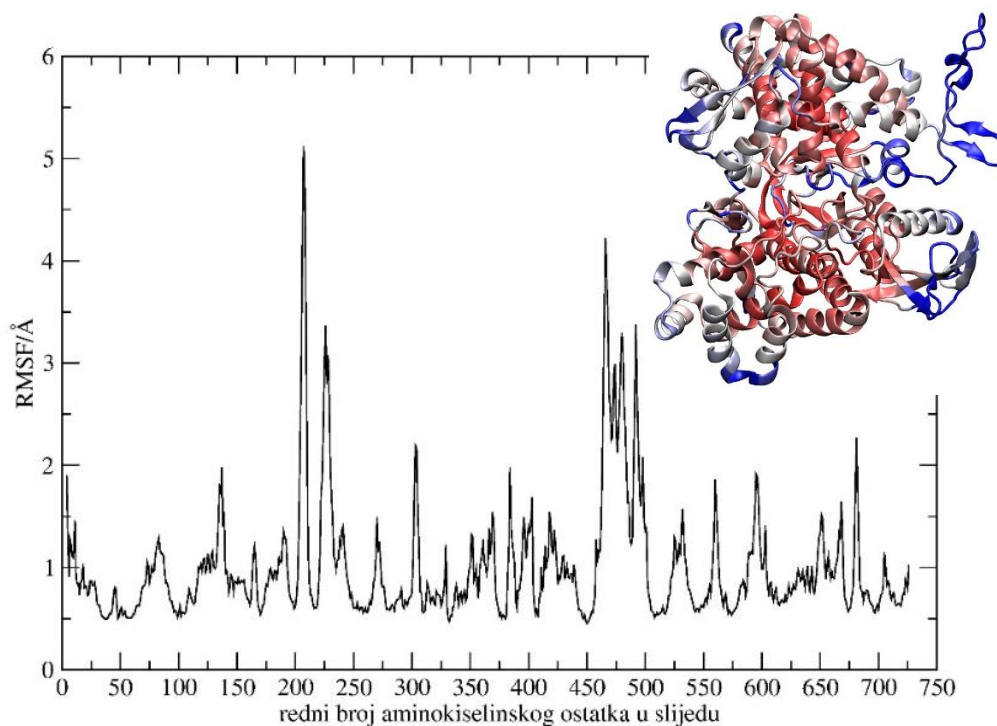
**Slika 11.** Sekundarne strukture koje formiraju aminokiseline u: a) Kelch domeni i b) DPP III tijekom MD simulacija kompleksa DPP III–Kelch.

RMSF analizom ispitana je fleksibilnost aminokiselina u kompleksu tijekom MD simulacija. Kao što se i očekuje, najfleksibilnije aminokiseline, one s najvećim RMSF vrijednostima na slici 12, uglavnom se nalaze u neuređenim dijelovima strukture, poput petlji i zavoja, ili u blizini tih

dijelova u polipeptidnom lancu (dijelovi struktura proteina obojeni plavom bojom na slici 12). Zanimljivo je da, unatoč čvrstom vezanju ETGE-petlje (Gln463-Tyr489) za Kelch domenu, analiza pokazuje kako ova petlja ostaje vrlo fleksibilna tijekom simulacija. Osim ETGE-petlje, značajnu fleksibilnost pokazuju i aminokiseline u regijama u kojima dolazi do promjenama sekundarne strukture proteina (slike 11), poput Pro586–Asp589 iz Kelch domene te Tyr211–Tyr251 i Thr501–Leu520 iz DPP III. S druge strane, najmanju fleksibilnost, s najnižim RMSF vrijednostima, imaju aminokiseline koje čine stabilne elemente strukture:  $\alpha$ -zavojnice u središnjem dijelu DPP III i šest  $\beta$ -nabranih ploča koje čine stabilnu strukturu  $\beta$ -propelera u Kelch domeni (prikazani crvenom bojom na slici 12).



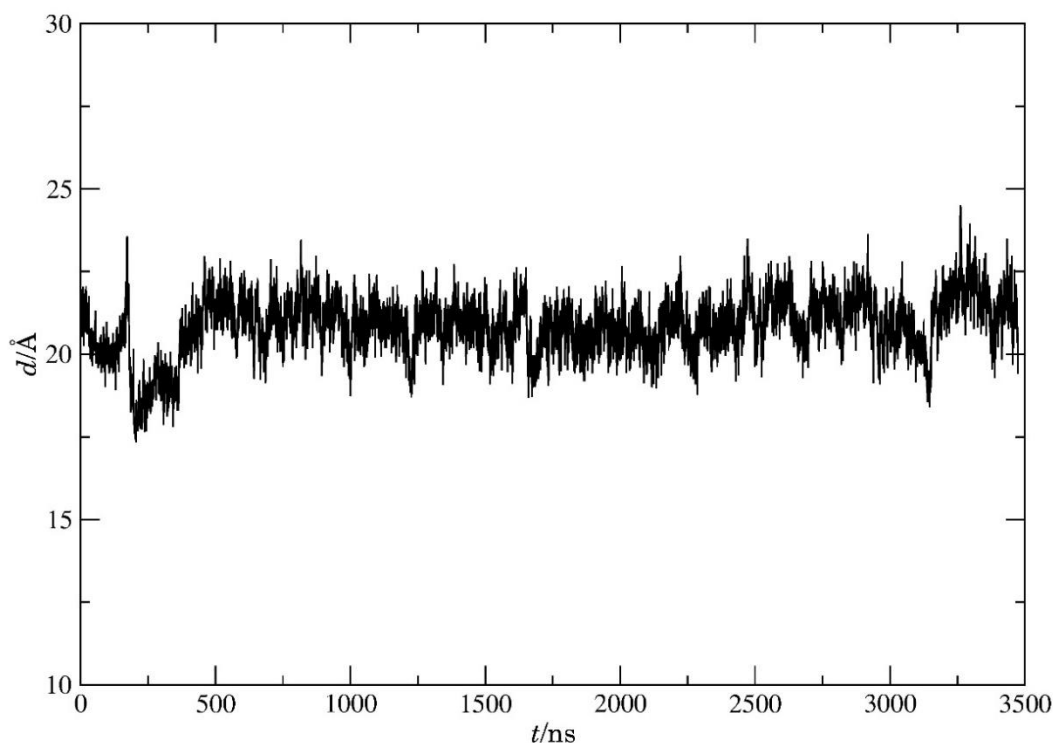
a)



b)

**Slika 12.** RMSF vrijednosti aminokiselina iz: a) Kelch domene i b) DPP III, izračunate iz MD simulacija kompleksa DPP III–Kelch. U računu su uzeti u obzir samo teški atomi iz okosnice proteina. Aminokiseline (X) čiji se RMSF vrijednosti razlikuju za jednu standardnu devijaciju (SD) od srednje vrijednosti RMSF-a svih aminokiselina ( $\langle \text{RMSF} \rangle$ ) obojeni su crveno ( $\langle \text{RMSF} \rangle + \text{SD}$ ) i plavo ( $\langle \text{RMSF} \rangle - \text{SD}$ ), dok su one unutar  $\pm \text{SD}$  ( $(\langle \text{RMSF} \rangle - \text{SD}) \leq (\text{RMSF})_X \leq (\langle \text{RMSF} \rangle + \text{SD})$ ) obojane bijelo.

Iako ETGE-petlja i dalje spada među najfleksibilnije dijelove u strukturi DPP III, njezina udaljenost od gornje domene DPP III nije se značajno mijenjala tijekom MD simulacije u odnosu na početnih 21.5 Å (slika 13). Ta udaljenost uglavnom fluktuirala između 20 i 22,5 Å, pri čemu je kratkotrajno smanjenje udaljenosti opaženo u periodu između 200. i 300. ns, kada prema RMSD profilu (slika 8) dolazi do prve značajnije promjene u strukturi kompleksa.

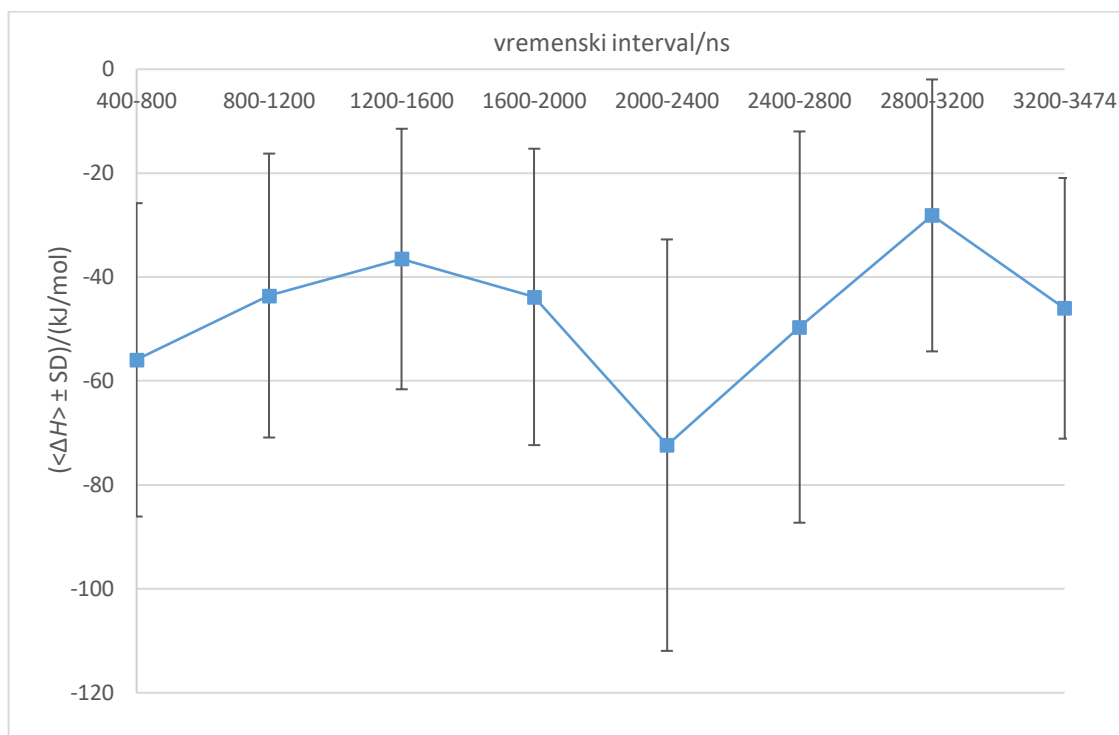


**Slika 13.** Udaljenost ETGE motiva od površine tijela DPP III tijekom MD simulacija kompleksa DPP III–Kelch određena mjerenjem udaljenost između centara mase C $\alpha$  atoma ETGE motiva i dijela  $\alpha$ -zavojnice iz gornje domene DPP III (Leu622–Ser630).

#### 4.2. ODREĐIVANJE ENERGETSKI NAJSTABILNIJE STRUKTURE KOMPLEKSA DPP III–KELCH

Pomoću MM-PBSA metode izračunat je entalpijski doprinos slobodnoj Gibbsovoj energiji vezanja kompleksa DPP III–Kelch tijekom MD simulacija. U tu svrhu, iz MD trajektorije odabrano je osam vremenskih intervala, svaki duljine 400 ns, počevši od 400. ns produkcijske faze. Ovakav pristup omogućio je praćenje promjena energije vezanja kroz simulaciju i identifikaciju energijski najpovoljnijih struktura. Kao što se vidi iz slike 14 srednja vrijednost entalpijskog doprinosa energiji vezanja uglavnom fluktuiraju između  $-40$  i  $-60$  kJ/mol, pri čemu su strukture s najnižom energijom vezanja (entalpijski najstabilnije strukture) uzorkovane u intervalu od 2000. do 2400. ns, a s najvišom energijom vezanja (entalpijski najmanje stabilne strukture) u intervalu od 2800. do 3200. ns. Međutim, s obzirom na to da su sve izračunate srednje vrijednosti entalpija vezanja unutar granica standardne devijacije, može se zaključiti da nijedan skup struktura ne pokazuje značajno veću stabilnost, niti je vjerojatniji od ostalih.



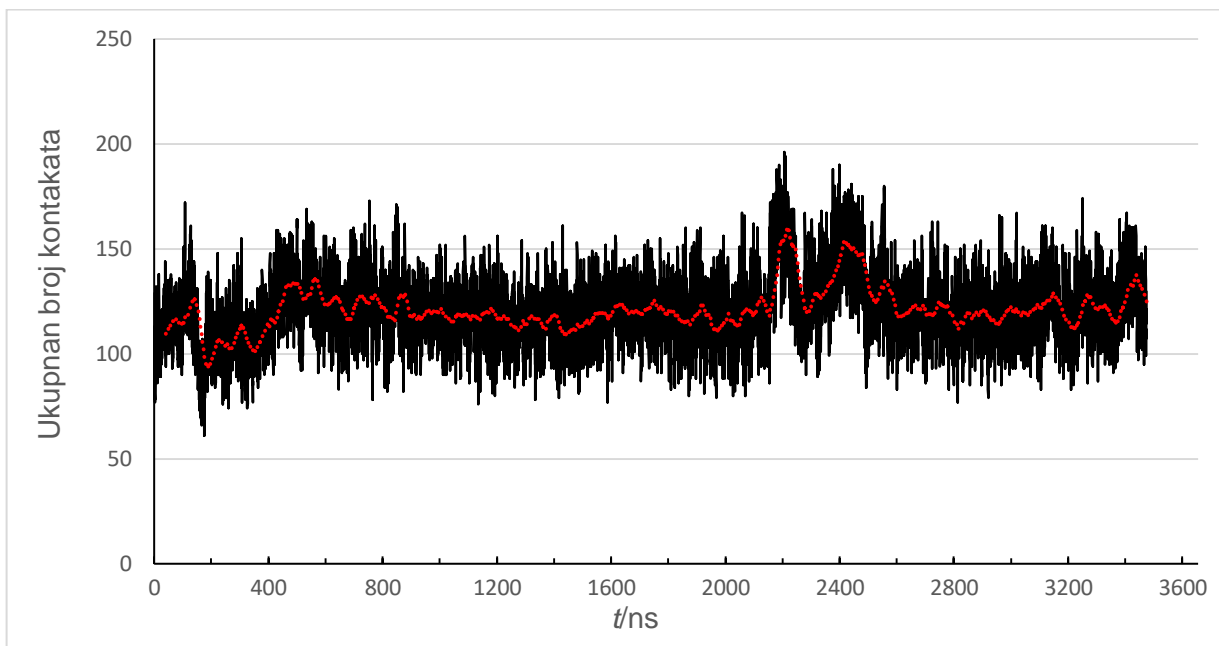


**Slika 14.** Promjena entalpijskog doprinosa Gibbsovoj slobodnoj energiji vezanja kompleksa DPP III–Kelch tijekom MD simulacija. Izračunate su prosječne vrijednosti (i pripadajuće standardne devijacije) za osam vremenskih intervala, svaki duljine 400 ns, počevši od 400. ns produkcijske faze.

### 4.3. MEĐUMOLEKULSKE INTERAKCIJE U KOMPLEKSU

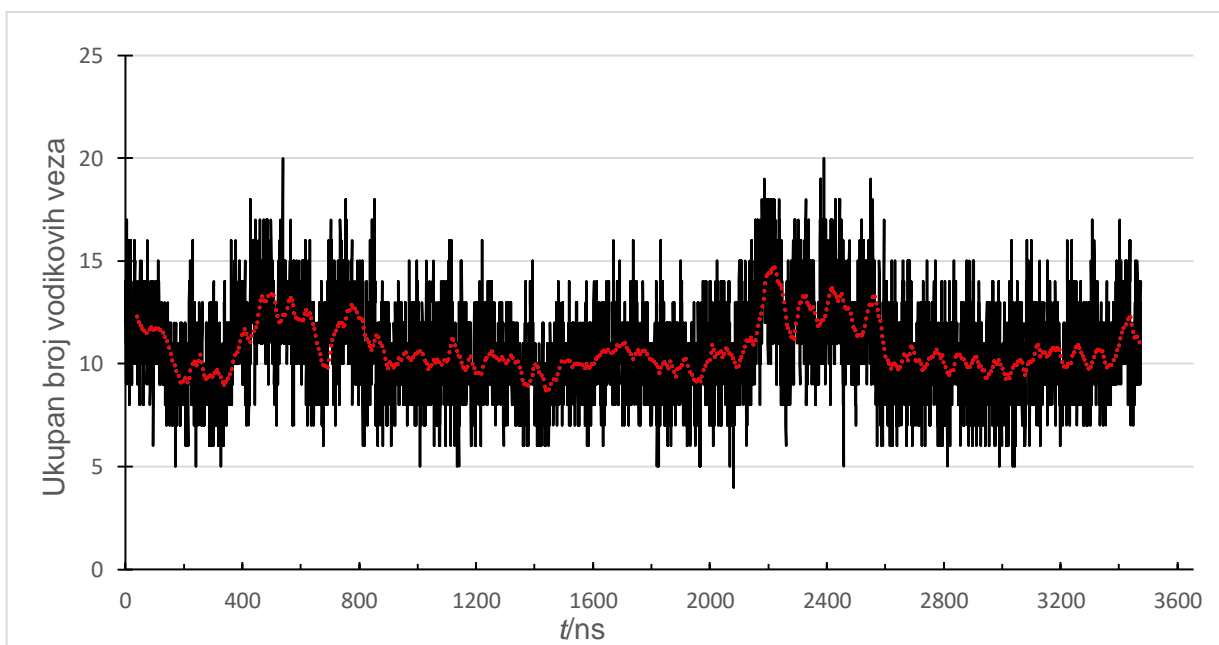
U svrhu identifikacije aminokiseline u Kelch domeni čijom bi se mutacijom mogao prirediti mutant koji će snažnije vezati DPP III nego endogeni protein Keap1, detaljno su ispitane međumolekulske interakcije između ova dva proteina u kompleksu tijekom MD simulacija.

Analiza ukupnog broja nativnih i nenativnih kontakata između DPP III i Kelch domene tijekom MD simulacija pokazala je da je najveći broj tih kontakata ostvareni između 2200. i 2500. ns (slika 15), što se slaže s razdobljem simulacije u kojem su zabilježene strukture s najnižim entalpijskim doprinosom energiji vezanja (slika 14). U tom vremenskom periodu primijećeno je približavanje  $\beta$ -ploče, koja se nalazi između B i C lanaca drugog Kelch ponavljajućeg motiva, aminokiselinama na N-kraju ETGE-petlje DPP III, što je prikazano na slici 8. U preostalom dijelu simulacije ukupan broj kontakata većinom fluktuirao oko slične srednje vrijednosti (crvene točke na slici 15), a ovi kontakti najčešće nastaju između ETGE-petlje DPP III i aminokiselina smještenih s unutarnje strane pore na donjem dijelu Kelch domene.



**Slika 15.** Ukupnan broj nativnih i nenativnih intermolekulskih kontakata između Kelch domene i DPP III tijekom MD simulacija. Crvenom bojom je označen klizni prosjek za interval od 50 ns.

Tijekom tog istog vremenskog (od 2,2 do 2,5  $\mu$ s MD simulacije), zabilježen je porast broja vodikovih veza između DPP III i Kelch domene (slika 16). U preostalom dijelu simulacije, broj vodikovih veza uglavnom fluktuiraju oko slične srednje vrijednosti (crvene točke na slici 16), uz manji porast zabilježen u razdoblju između 400. i 800. ns MD simulacije.



**Slika 16.** Ukupnan broj intermolekulskih vodikovih veza između Kelch domene i DPP III tijekom MD simulacija. Crvenom bojom je označen klizni prosjek za interval od 50 ns.

Intermolekulske vodikove veze između DPP III i Kelch domene (tablica 2) najčešće se formiraju između aminokiselina iz ETGE motiva DPP III (Glu480, Thr481, Glu483), kao i aminokiselina neposredno prije ili poslije tog motiva (Pro479, Gln484 i Gln486), i aminokiselina smještenih unutar pore na donjoj strani Kelch domene (Ser555, Arg415, Gln530, Ser508, Ser602, Tyr334, Arg483, Arg380 i Asn382). Vodikova veza između Arg336, koji je dio fleksibilne petlje koja se nalazi između B i C lanaca prvog (I.) Kelch ponavljajućeg motiva, i Asn470, koji se nalazi na N-kraju ETGE-petlje DPP III, prisutna je samo ~16 % ukupnog simulacijskog vremena. Formiranje ove interakcije povezano je s razdobljem simulacije između 1800. i 2500. ns (slika 8), kada je uočeno dodatno približavanje proteina DPP III i Kelch domene. U istom razdoblju zabilježen je i najveći ukupan broj vodikovih veza tijekom cijele simulacije (slika 16).

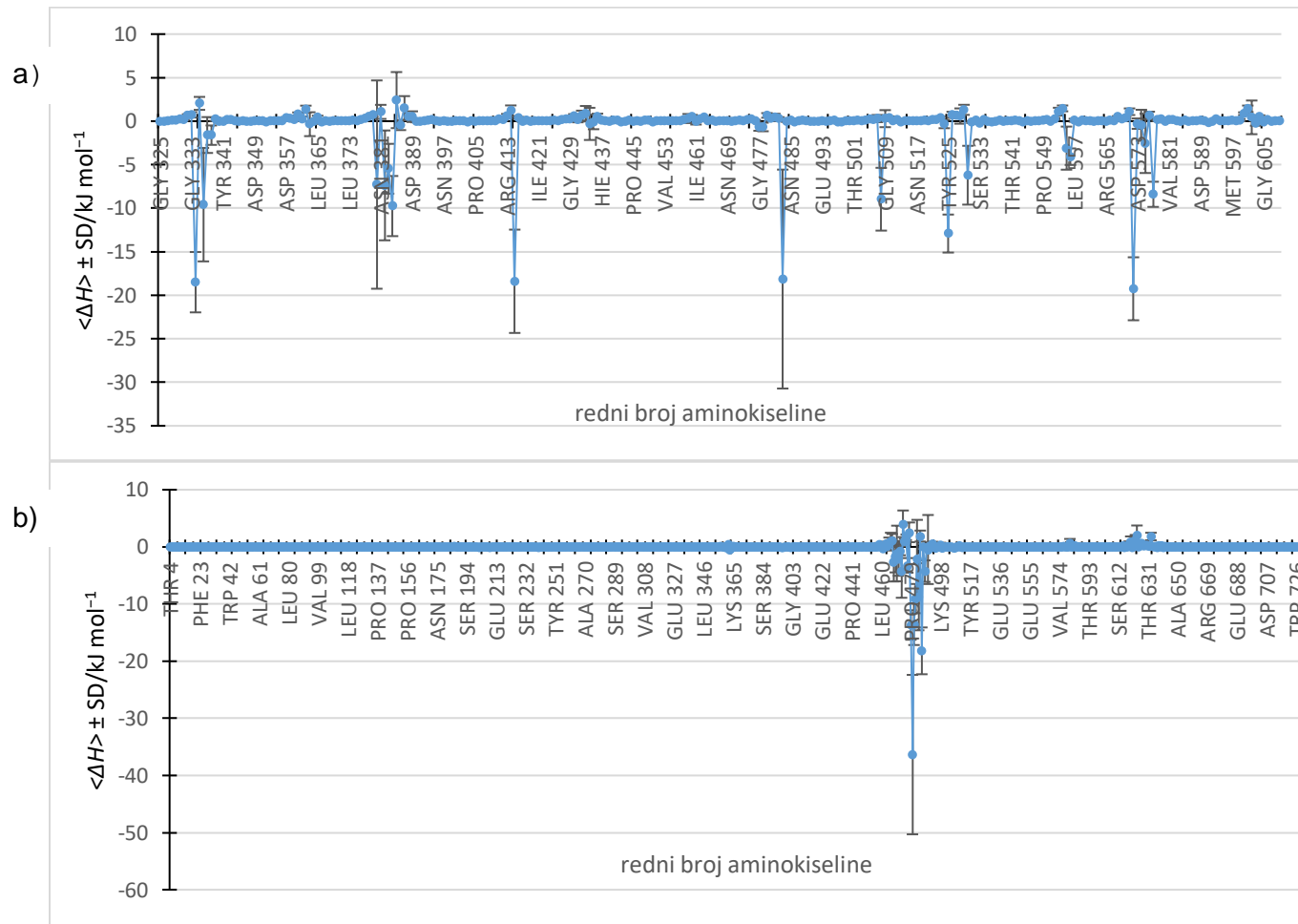
**Tablica 2.** Udio intermolekulskih vodikovih veza između Kelch domene i DPP III tijekom MD simulacija. Aminokiseline iz Kelch domene označene su podebljano, dok preostale pripadaju DPP III. Oznaka O označava atome iz okosnice, a B atome iz bočnih lanaca. Prikazani su podaci za parove koji su ostvarili vodikove veze tijekom najmanje 10% vremena simulacije.

donor	akceptor	udio vremena/%
<b>SER555-B</b>	GLU480-O	97,42
<b>ARG415-B</b>	GLU480-B	96,21
<b>GLN530-B</b>	PRO479-O	96,01
<b>SER508-B</b>	GLU480-B	92,90
<b>SER602-B</b>	THR481-O	90,49
GLN484-O	<b>TYR334-B</b>	87,07
GLN486-B	<b>ARG336-O</b>	84,73
<b>ARG483-B</b>	GLU480-B	70,30
<b>ARG380-B</b>	GLU483-B	42,63
GLN486-B	<b>ASN382-B</b>	27,78
<b>ARG336-B</b>	GLN484-B	16,36
<b>ARG336-B</b>	ASN470-B	16,14

Dekompozicijom slobodne energije vezanja po aminokiselinama (slika 17) identificirane su sve aminokiseline koje sudjeluju u formiranju kompleksa DPP III–Kelch. Osim aminokiselina koje sudjeluju u intermolekulskim vodikovim vezama, ovom analizom prepoznate su i one koje ostvaruju druge vrste međumolekulskih interakcija, poput van der Waalsovih i elektrostatskih interakcija. Aminokiseline koje doprinose stabilnosti kompleksa, s entalpijskim doprinosom većim od  $-4,184$  kJ/mol, izdvojene su u tablicama na slici 17. Kao što je i za očekivati, značajan entalpijski doprinos energiji vezanja imaju aminokiselina iz Kelch domene (Tyr334, Arg336, Arg415, Arg483 i Ser508) i DPP III (Pro479, Glu480, Thr481, Gln484 i Gln486) koje sudjeluju u intermolekulskim vodikovim vezama (navedenim u tablici 2). Osim spomenutih, aminokiseline Pro384, Tyr525, Tyr572 i Phe577 iz Kelch domene doprinose stabilizaciji kompleksa, kao i Gly482, Gln473 i Trp488 iz DPP III. Od svih navedenih aminokiselina iz Kelch domene, jedino

Arg336 i Pro384 nisu smještene unutar donje pore Kelch domene. Umjesto toga, nalaze se na zavojima između B i C lanaca prvog i drugog Kelch ponavljajućeg motiva, što im omogućava povremene interakcije s  $\alpha$ -zavojnica na vrhu DPP III, kao i s aminokiselinama na N-kraju ETGE-petlje DPP III. Sve aminokiseline iz DPP III koje doprinose vezanju dio su ETGE-petlje. Dekompozicijskom analizom identificirane su i aminokiseline koje destabiliziraju kompleks. U slučaju DPP III to su Glu474 ( $\Delta H = 4.04 \pm 2.33 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), Asn478 ( $\Delta H = 2.55 \pm 1.73 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) i Arg624 ( $\Delta H = 2.02 \pm 1.73 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), a u slučaju Kelch domene Asp385 ( $\Delta H = 2.42 \pm 3.22 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) i Phe335 ( $\Delta H = 2.04 \pm 0.74 \text{ kJ mol}^{-1}$ ).

Zanimljivo je da nijedna od provedenih analiza međumolekulskih interakcija nije ukazala na sudjelovanje mutirane aminokiseline G585E iz DPP III u formiranju kompleksa. Stoga, na temelju provedenih MD simulacija, nije moguće pretpostaviti ulogu ove mutacije u stanicama raka dojke.



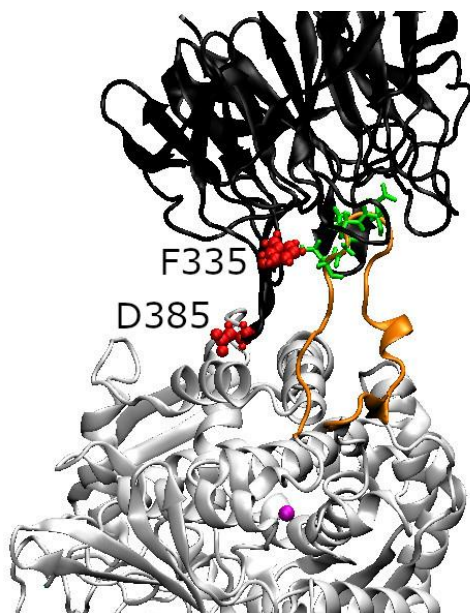
Aminokiseline iz Kelcha	$\langle \Delta H \rangle \pm SD/ \text{kJ mol}^{-1}$
TYR 572	$-19,3 \pm 3,6$
TYR 334	$-18,5 \pm 3,5$
ARG 415	$-18,4 \pm 5,9$
ARG 483	$-18,1 \pm 12,6$
TYR 525	$-12,9 \pm 2,2$
PRO 384	$-9,8 \pm 3,5$
ARG 336	$-9,6 \pm 6,5$
SER 508	$-9,0 \pm 3,6$
PHE 577	$-8,4 \pm 1,4$

Aminokiselina iz DPP III	$\langle \Delta H \rangle \pm SD/ \text{kJ mol}^{-1}$
GLU 480	$-36,4 \pm 13,9$
GLN 486	$-18,2 \pm 4,1$
PRO 479	$-13,7 \pm 2,6$
THR 481	$-13,6 \pm 3,6$
GLY 482	$-9,0 \pm 2,6$
GLN 484	$-8,7 \pm 6,0$
GLN 473	$-4,3 \pm 4,6$
TRP 488	$-4,3 \pm 1,9$

**Slika 17.** Dekompozicija entalpijskog doprinosa slobodnoj energiji vezanja kompleksa DPP III–Kelch po aminokiselinama: a) Kelch domene i b) DPP III. Prosječne energije i standardne devijacije izračunate su MM-GBSA pristupom. Aminokiseline s negativnim vrijednostima entalpije doprinose stabilnosti kompleksa, dok one s pozitivnim vrijednostima entalpije destabiliziraju kompleks. U tablicama su izdvojene one aminokiseline čiji je doprinos energiji vezanja veći od 1 kcal/mol (4,18 kJ/mol).

#### 4.4. UTJECAJ MUTACIJE PHE335 I ASP385 U KELCH DOMENI NA AFINITET VEZANJA ZA DPP III

Prema rezultatima dekompozicijske analize, aminokiseline Phe335 i Asp385 u Kelch domeni spadaju među one koje najviše oslabljuju vezanje DPP III i Kelch u kompleksu, odnosno imaju najizraženiji destabilizirajući učinak. Utjecaj njihove mutacije u alanine na energiju vezanja ispitan je *alanin scan* metodom. Zamjena ovih aminokiselina alaninom, koji ima jednostavnu metilnu bočnu skupinu, smanjuje steričke smetnje u slučaju Phe335, dok u slučaju Asp385 smanjuje elektrostatske interakcije. Zanimljivo je da se obje aminokiseline ne nalaze unutar donje pore Kelch domene, već na vanjskoj površini Kelcha (slika 18). Konkretno, smještene su na zavojima između B i C lanaca prvog i drugog Kelch ponavljajućeg motiva. Tijekom simulacija, ti dijelovi strukture povremeno ostvaruju interakcije s  $\alpha$ -zavojnicama na vrhu DPP III, kao i s aminokiselinama na N-kraju ETGE-petlje DPP III.



**Slika 18.** Položaj mutiranih aminokiselina u početnoj strukturi kompleksa DPP III–Kelch. DPP III je obojan sivom bojom (pri čemu je ETGE-petlja, Gln463-Tyr489, obojana narančasto), a Kelch domena crnom bojom. Aminokiseline iz ETGE motiva prikazane su zelenim štapićima, a mutirane aminokiseline crvenim kuglicama. Cink je prikazan ružičastom kuglicom.

Umjesto izvođenja novih MD simulacija, slobodna energija vezanja izračunata je MM-PBSA metodom koristeći postojeću trajektoriju kompleksa, pri čemu su koordinate mutiranih aminokiselina zamijenjene alaninom. Rezultati analize, prikazani u tablici 3, pokazuju da zamjena odabranih aminokiselina alaninom dovodi do blagog smanjenja energije vezanja, s izraženijim učinkom kod mutacije D385A. Međutim, promjene u energijama vezanja ostaju unutar granica standardne devijacije. Drugim riječima, ove mutacije imaju samo blagi utjecaj na

afinitet vezanja, pri čemu zamjena negativno nabijenog aspartata nepolarnim alaninom ima nešto povoljniji učinak od zamjene hidrofobnog fenilalanina manjim alaninom.

**Tablica 3.** Entalpijski doprinosi slobodnoj energiji vezanja DPP III za divlji tip Kelch domene te njena dva mutanata izračunati *alanin scan* metodom i MM-PBSA pristupom. Izračunata je srednja vrijednosti entalpije za cijeli period simulacije počevši od 400. ns.

	divlji tip Kelch domene	F335A Kelch	D385A Kelch
$\langle \Delta H \rangle \pm SD / \text{kJ mol}^{-1}$	$-45.91 \pm 33.45$	$-46.38 \pm 33.53$	$-55.95 \pm 32.38$

Prednost *alanin scan* metode leži u njenoj računalnoj učinkovitosti, koja omogućuje brzo procjenjivanje utjecaja odabranih mutacija aminokiselina na afinitet vezanja. Kako bi se detaljnije istražio učinak ovih mutacija na stabilnost i afinitet vezanja, sljedeći korak bio bi provođenje MD simulacija kompleksa DPP III s odabranim mutantima. Takve simulacije omogućile bi kompleksima da se prilagode na uvedene mutacije, pružajući precizniji uvid u promjene međumolekulskih interakcija, uključujući van der Waalove sile, elektrostatske interakcije i vodikove veze, ne samo u blizini mutiranih aminokiselina, već i u cijelom kompleksu.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog molekuskog modeliranja kompleksa DPP III–Kelch mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Modeli dobiveni uz pomoć Alphafolda ne predviđaju vezanje ETGE-petlje DPP III na način na koji se veže peptid iz Nrf2 u kompleksu s Kelch domenom. Umjesto toga, ETGE-petlja u modelima ostaje vezana za gornju domenu DPP III.
2. Sekundarna i tercijarna struktura pojedinačnih proteina unutar kompleksa je očuvana tijekom dugih (mikrosekundnih) MD simulacija, što upućuje na visoku stabilnost tih proteina. Međutim, uočene su značajne promjene u trodimenzionalnoj strukturi kompleksa (RMSD i Rg analize) tijekom simulacija u usporedbi s početnom strukturom. Unatoč promjenama konformacije kompleksa tijekom produkcijske faze, izračunate srednje vrijednosti entalpijskog doprinosa slobodnoj energiji vezanja kompleksa tijekom različitih intervala simulacija ne pokazuju značajno nižu energiju vezanja za bilo koji skup struktura.
3. Tijekom simulacija, međumolekulske interakcije između DPP III i Kelch domene uglavnom su ograničene na aminokiseline iz fleksibilne ETGE-petlje DPP III i aminokiseline smještene unutar pore na donjoj strani Kelch domene. Većina identificiranih intermolekulskih vodikovih veza uključuje te regije. Povremeno je zabilježeno približavanje aminokiselina koje se nalaze između B i C lanaca u I. i II. Kelch ponavljajućem motivu te  $\alpha$ -zavojnica na vrhu gornje domene DPP III, što rezultira s povećanjem ukupnog broja nativnih i nenativnih kontakata, kao i intermolekulskih vodikovih veza u tom dijelu simulacije.
4. Iako je ETGE-petlja čvrsto vezana unutar pore s donje strane Kelch domene i dalje predstavlja jedan od najfleksibilnijih dijelova strukture DPP III.
5. Analize međumolekulskih interakcija nisu pokazale da mutacija aminokiseline G585E u DPP III doprinosi formiranju kompleksa s Kelch domenom. Stoga, na temelju provedenih simulacija nije moguće pretpostaviti ulogu mutacije ove aminokiseline u stanicama raka dojke.
6. Dekompozicijom slobodne energije vezanja po aminokiselinama identificirano je da Phe335 i Asp385 iz Kelch domene najviše oslabljuju vezanje DPP III i Kelch u kompleksu. Njihova zamjena alaninom dovodi do blagog smanjenja energije vezanja (povećanja afiniteta), pri čemu je učinak izraženiji kod mutacije Asp385 u alanin (D385A).



## 6. LITERATURA

- Arfin S, Jha NK, Jha SK, Kesari KK, Ruokolainen J, Roychoudhury S, i sur. (2021) Oxidative Stress in Cancer Cell Metabolism. *Antioxidants* **10**, 642.  
<https://doi.org/10.3390/antiox10050642>
- Barrett AJ, Chen J-M (2013) Dipeptidyl peptidase III. In: Handbook of Proteolytic Enzymes. Elsevier, 1285–1289.
- Barsun M, Jajcanin N, Vukelić B, Spoljarić J, Abramić M (2007) Human dipeptidyl peptidase III acts as a post-proline-cleaving enzyme on endomorphins. *Biol Chem* **388**, 343–348.  
<https://doi.org/10.1515/BC.2007.039>
- Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, DiNola A, Haak JR (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* **81**, 3684–3690.  
<https://doi.org/10.1063/1.448118>
- Bodnar RJ (2014) Endogenous opiates and behavior: 2013. *Peptides (NY)* **62**, 67–136.  
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.09.013>
- Burkard TR, Planyavsky M, Kaupe I, Breitwieser FP, Bürckstümmer T, Bennett KL, i sur. (2011) Initial characterization of the human central proteome. *BMC Syst Biol* **5**, 17.  
<https://doi.org/10.1186/1752-0509-5-17>
- Case DA, Aktulga HM, Belfon K, Cerutti DS, Cisneros GA, Cruzeiro VWD, i sur. (2023) AmberTools. *J Chem Inf Model* **63**, 6183–6191. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.3c01153>
- Case DA, Cheatham TE, Darden T, Gohlke H, Luo R, Merz KM, i sur. (2005) The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem* **26**, 1668–1688.  
<https://doi.org/10.1002/jcc.20290>
- Case DA, Aktulga H, Belton K, Ben-Shalom IY, Berryman JT, Brozell SR, i sur. (2022) Amber 2022
- Chadwick W, Brenneman R, Martin B, Maudsley S (2010) Complex and multidimensional lipid raft alterations in a murine model of Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis* **2010**, 604792. <https://doi.org/10.4061/2010/604792>
- Chiba T, Li Y-H, Yamane T, Ogikubo O, Fukuoka M, Arai R, i sur. (2003) Inhibition of recombinant dipeptidyl peptidase III by synthetic hemorphin-like peptides. *Peptides (NY)* **24**, 773–778. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(03\)00119-0](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(03)00119-0)
- Choy T-K, Wang C-Y, Phan NN, Khoa Ta HD, Anuraga G, Liu Y-H, i sur. (2021) Identification of Dipeptidyl Peptidase (DPP) Family Genes in Clinical Breast Cancer Patients via an Integrated Bioinformatics Approach. *Diagnostics* **11**, 1204.  
<https://doi.org/10.3390/diagnostics11071204>
- Christopher J. C (2004) Essentials of Computational Chemistry

- Cino EA, Killoran RC, Karttunen M, Choy W-Y (2013) Binding of disordered proteins to a protein hub. *Sci Rep* **3**, 2305. <https://doi.org/10.1038/srep02305>
- Cruz-Diaz N, Wilson BA, Pirro NT, Brosnihan KB, Marshall AC, Chappell MC (2016) Identification of dipeptidyl peptidase 3 as the Angiotensin-(1–7) degrading peptidase in human HK-2 renal epithelial cells. *Peptides (NY)* **83**, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.06.005>
- Cullinan SB, Gordan JD, Jin J, Harper JW, Diehl JA (2004) The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol Cell Biol* **24**, 8477–8486. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.19.8477-8486.2004>
- Darden T, York D, Pedersen L (1993) Particle mesh Ewald: An  $N \cdot \log(N)$  method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys* **98**, 10089–10092. <https://doi.org/10.1063/1.464397>
- Ellis S, Nuenke JM (1967) Dipeptidyl arylamidase III of the pituitary. Purification and characterization. *J Biol Chem* **242**, 4623–4629
- Essmann U, Perera L, Berkowitz ML, Darden T, Lee H, Pedersen LG (1995) A smooth particle mesh Ewald method. *J Chem Phys* **103**, 8577–8593. <https://doi.org/10.1063/1.470117>
- Fichna J, Janecka A, Costentin J, Rego J-C Do (2007) The endomorphin system and its evolving neurophysiological role. *Pharmacol Rev* **59**, 88–123. <https://doi.org/10.1124/pr.59.1.3>
- Gundić M, Tomić A, Wade RC, Matovina M, Karačić Z, Kazazić S, i sur. (2016) Human DPP III – Keap1 Interactions: A Combined Experimental And Computational Study. *Croatica Chemica Acta* **89**. <https://doi.org/10.5562/cca2916>
- Hast BE, Goldfarb D, Mulvaney KM, Hast MA, Siesser PF, Yan F, i sur. (2013a) Proteomic Analysis of Ubiquitin Ligase KEAP1 Reveals Associated Proteins That Inhibit NRF2 Ubiquitination. *Cancer Res* **73**, 2199–2210. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4400>
- Izadi S, Anandakrishnan R, Onufriev A V. (2014) Building Water Models: A Different Approach. *J Phys Chem Lett* **5**, 3863–3871. <https://doi.org/10.1021/jz501780a>
- J. M. Haile WC (1992) Molecular dynamics simulation, elementary methods
- Jha S, Taschler U, Domenig O, Poglitsch M, Bourgeois B, Pollheimer M, i sur. (2020) Dipeptidyl peptidase 3 modulates the renin–angiotensin system in mice. *Journal of Biological Chemistry* **295**, 13711–13723. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014183>
- Kabsch W, Sander C (1983) Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577–2637. <https://doi.org/10.1002/bip.360221211>

- Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S (2007) Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway
- Kobayashi M, Itoh K, Suzuki T, Osanai H, Nishikawa K, Katoh Y, et al. (2002) Identification of the interactive interface and phylogenetic conservation of the Nrf2-Keap1 system. *Genes to Cells* **7**. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2002.00561.x>
- Lee CM, Snyder SH (1982) Dipeptidyl-aminopeptidase III of rat brain. Selective affinity for enkephalin and angiotensin. *J Biol Chem* **257**, 12043–12050
- Li X, Zhang D, Hannink M, Beamer LJ (2004) Crystal Structure of the Kelch Domain of Human Keap1. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 54750–54758. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410073200>
- Lo S-C, Li X, Henzl MT, Beamer LJ, Hannink M (2006) Structure of the Keap1:Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling. *EMBO J* **25**, 3605–3617. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601243>
- Loncharich RJ, Brooks BR, Pastor RW (1992) Langevin dynamics of peptides: The frictional dependence of isomerization rates of *N*-acetylalanyl-*N*'-methylamide. *Biopolymers* **32**, 523–535. <https://doi.org/10.1002/bip.360320508>
- Lu K, Alcivar AL, Ma J, Foo TK, Zywea S, Mahdi A, et al. (2017) NRF2 Induction Supporting Breast Cancer Cell Survival Is Enabled by Oxidative Stress–Induced DPP3–KEAP1 Interaction. *Cancer Res* **77**, 2881–2892. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2204>
- Matić S, Kekez I, Tomin M, Bogár F, Šupljika F, Kazazić S, et al. (2020) Binding of dipeptidyl peptidase III to the oxidative stress cell sensor Kelch-like ECH-associated protein 1 is a two-step process. *J Biomol Struct Dyn* **39**, 6870–6881. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1804455>
- Menale C, Robinson LJ, Palagano E, Rigoni R, Erreni M, Almarza AJ, et al. (2019) Absence of Dipeptidyl Peptidase 3 Increases Oxidative Stress and Causes Bone Loss. *Journal of Bone and Mineral Research* **34**, 2133–2148. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3829>
- Miyamoto S, Kollman PA (1992) Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J Comput Chem* **13**, 952–962. <https://doi.org/10.1002/jcc.540130805>
- Motohashi H, Yamamoto M (2004) Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism
- Prajapati SC, Chauhan SS (2011a) Dipeptidyl peptidase III: a multifaceted oligopeptide N-end cutter. *FEBS J* **278**, 3256–3276. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08275.x>
- Ren X, Yu J, Guo L, Ma H (2021) Dipeptidyl-peptidase 3 protects oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-injured hippocampal neurons by suppressing apoptosis, oxidative stress and inflammation via modulation of Keap1/Nrf2 signaling. *Int*

- Immunopharmacol* **96**, 107595. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107595>
- Salomon-Ferrer R, Case DA, Walker RC (2013) An overview of the Amber biomolecular simulation package. *WIREs Computational Molecular Science* **3**, 198–210. <https://doi.org/10.1002/wcms.1121>
- Sobočanec S, Filić V, Matovina M, Majhen D, Šafranko ŽM, Hadžija MP, i sur. (2016) Prominent role of exopeptidase DPP III in estrogen-mediated protection against hyperoxia in vivo. *Redox Biol* **8**, 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.01.003>
- Stewart D, Killeen E, Naquin R, Alam S, Alam J (2003) Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J Biol Chem* **278**, 2396–2402. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209195200>
- Tomić A (2015) Primjena raunalnih pristupa različitih stupnjeva sloenosti u svrhu razumijevanja strukture, dinamike i aktivnosti ljudske dipeptidil-peptidaze III
- Tomić A, González M, Tomić S (2012) The Large Scale Conformational Change of the Human DPP III–Substrate Prefers the “Closed” Form. *J Chem Inf Model* **52**, 1583–1594. <https://doi.org/10.1021/ci300141k>
- Tomić A, Horvat G, Ramek M, Agić D, Brkić H, Tomić S (2019) New Zinc Ion Parameters Suitable for Classical MD Simulations of Zinc Metallopeptidases. *J Chem Inf Model* **59**, 3437–3453. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00235>
- Tomić A, Kovačević B, Tomić S (2016) Concerted nitrogen inversion and hydrogen bonding to Glu451 are responsible for protein-controlled suppression of the reverse reaction in human DPP III. *Physical Chemistry Chemical Physics* **18**, 27245–27256. <https://doi.org/10.1039/C6CP04580D>
- Tomić A, Tomić S (2022) Demystifying DPP III Catalyzed Peptide Hydrolysis—Computational Study of the Complete Catalytic Cycle of Human DPP III Catalyzed Tynorphin Hydrolysis. *Int J Mol Sci* **23**, 1858. <https://doi.org/10.3390/ijms23031858>
- Tong KI, Katoh Y, Kusunoki H, Itoh K, Tanaka T, Yamamoto M (2006) Keap1 Recruits Neh2 through Binding to ETGE and DLG Motifs: Characterization of the Two-Site Molecular Recognition Model. *Mol Cell Biol* **26**, 2887–2900. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.8.2887-2900.2006>
- Wakabayashi N, Itoh K, Wakabayashi J, Motohashi H, Noda S, Takahashi S, i sur. (2003) Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nat Genet* **35**, 238–245. <https://doi.org/10.1038/ng1248>
- Wang E, Sun H, Wang J, Wang Z, Liu H, Zhang JZH, i sur. (2019) End-Point Binding Free Energy Calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: Strategies and Applications in Drug Design. *Chem Rev* **119**, 9478–9508. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00055>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Karlo Zeman izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis