

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Milica V. Radibratović

**Teorijsko proučavanje konformacionih promena
albumina prilikom vezivanja bioaktivnih
liganada iz hrane**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Milica V. Radibratović

**Theoretical study of conformational changes in
albumins by binding of bioactive food ligands**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

Komisija za odbranu doktorske disertacije:

dr Tanja Ćirković Veličković, Mentor

Redovni profesor, Univerzitet u Beogradu- Hemijski fakultet

Dopisni član Srpske akademije nauka i umetnosti

dr Miloš Milčić, Mentor

Vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu- Hemijski fakultet

dr Dragana Stanić-Vučinić

Naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu- Hemijski fakultet

dr Milan Nikolić

Docent, Univerzitet u Beogradu- Hemijski fakultet

dr Goran Janjić

Viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu- Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija urađena je na Univerzitetu u Beogradu - Hemijskom fakultetu pod mentorstvom dr Tanje Ćirković Veličković, redovnog profesora Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i dopisnog člana SANU i dr Miloša Milčića, vanrednog profesora Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Želela bih da se zahvalim mentorima, prof. dr Tanji Ćirković Veličković na beskrajnoj pomoći, sugestijama i podršci prilikom odabira teme i izrade ove doktorske disertacije i prof. dr Milošu Milčiću na izuzetno nesebičnoj pomoći pri rešavanju problema u oblasti računarske hemije na koje sam nailazila (a bilo ih je...ne zna im se broj), kao i na kreiranju brojnih programa koji su značajno olakšali prikupljanje i analiziranje rezultata dobijenih u ovoj disertaciji.

Posebnu zahvalnost dugujem naučnom savetniku dr Dragani Stanić-Vučinić na izuzetnoj pomoći prilikom izrade ove disertacije, ali još veću zahvalnost joj dugujem zato što me je naučila da iz svih rezultata može proisteći mnogo zaključaka ako se dovoljno detaljno analiziraju. Veliku zahvalnost dugujem i prof. dr Milanu Nikoliću i višem naučnom saradniku dr Goranu Janjiću na pokazanom interesovanju, stručnim savetima i sugestijama prilikom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se i Institutu za fiziku koji mi je omogućio korišćenje računarskog klastera PARADOX IV bez kojeg izrada ove disertacije ne bi bila moguća.

Zahvaljujem se kolegama Ivani, Katarini, Jeleni M., Maji K., Simeonu, Mariji P., Mirjani, Vesni, Mariji S., Jeleni R, Tamari, Maji M. i Teodori na pomoći i podršci u raznim fazama istraživanja u okviru ove doktorske disertacije. Veliku zahvalnost dugujem dragoj kolegini i drugarici dr Danijeli Apostolović na podršci i savetima tokom izrade ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se mojim omiljenim: prof. dr Jeleni Mutić, Rozaliji Čubrilo-Antić, Ini Rančić, porodici Ninković, Ivici Milovanoviću, Sonji Milić Komić i Ivani Jeremić Lavovoj mami zato što postoje u mom životu i pružaju mi nesebičnu podršku i razumevanje.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici na neizmernoj ljubavi, podršci i razumevanju. Marko, mama, tata, Nebojša i Tamara, hvala vam što me činite srećnom, što ste moja podrška i što ste uvek tu.

Mama i tata, vama posebno hvala što ste mi čuvali decu i omogućili da završim disertaciju.

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem našoj deci, Jovani, Isidori i Ognjenu.

Sažetak

Humani serum albumin (HSA), usled velikog kapaciteta vezivanja različitih liganada, ima primenu u medicini i biotehnologiji. Protein mleka, α -laktalbumin (ALA), takođe pokazuje visok afinitet vezivanja za bioaktivne ligande i privlači veliku pažnju kao model-protein za ispitivanje struktura sličnih konformaciji “stopljene globule”. Bioaktivne komponente hrane su neesencijalni molekuli, koji imaju blagotvorne efekte po zdravlje. Stoga su interakcije albumina sa bioaktivnim molekulima hrane poslednjih godina u fokusu istraživanja.

U ovoj disertaciji teorijskim pristupom su izučavani efekti vezivanja bioaktivnih liganada iz hrane, fikocijanobilina (PCB) iz alge Spiruline i epigalokatehin-3-galata (EGCG), iz zelenog čaja, na konformaciju i stabilnost HSA i ALA. Molekulsko-dinamičkim (MD) simulacijama pokazano je da vezivanje PCB za bilo koje od dva vezujuća mesta na HSA, povećava njegovu stabilnost, čineći strukturu HSA manje fleksibilnom, kao i da vezivanje PCB za HSA utiče i na vezivanje drugih fiziološki relevantnih liganada/lekova.

Molekulskim dokingom je pokazano da se EGCG vezuje za apo ALA na istom mestu kao i za holo formu. MD simulacijom je pokazano da uklanjanje Ca^{2+} -jona smanjuje konformacionu stabilnost ALA. Međutim, vezivanje EGCG povećava stabilnost ALA vraćanjem njene konformacije u konformaciju sličnu kao kod holo forme i na taj način može odložiti prelaz nativnog apo ALA u konformaciju “stopljene globule”. Obe forme ALA mogu služiti kao nosači EGCG.

Temeljnim teorijskim pristupom dobijeni su rezultati od značaja za biodostupnost i transport bioaktivnih liganada, kao i povećanu stabilnost albumina pri vezivanju ovih liganada. Objasnjeni su i mehanizmi bazirani na konformacionim promenama proteina, koji se samo eksperimentalnim pristupom teško mogu uočiti.

Ključne reči: konformacione promene proteina, stabilnost proteina, albumini, humani serum albumin, alfa-laktalbumin, bioaktivni ligandi iz hrane, epigalokatehin-3-galat, fikocijanobilin, molekulski doking, molekulsko-dinamička simulacija

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Primenjena hemija

UKD broj:

Abstract

Human serum albumin (HSA) is widely used in medical applications and biotechnology due to its extraordinary ligand binding properties. Small milk protein α -lactalbumin (ALA), used as a model-protein for the investigation of molten globule-like states, is known to bind bioactive ligands with high affinity. Bioactive food components are nonessential molecules with a variety of benefits for human health. Recently, there is a growing interest in investigating interactions of albumins and bioactive food molecules.

The aim of this thesis was to investigate the effects of bioactive food ligands binding, phycocyanobilin (PCB), from algae *Spirulina* and green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate, on stability and conformation of HSA and ALA, by theoretical methods. Molecular dynamics (MD) simulations revealed that binding of PCB at either subdomain IB or IIA, results in higher HSA stability, making its structure more rigid. Also, the binding of PCB may affect the binding of other physiologically relevant ligands/drugs of HSA.

The docking simulation indicated the same binding site for EGCG to both ALA forms. MD results demonstrated that removal of Ca^{2+} resulted in higher flexibility of ALA. However, EGCG binding improves ALA stability by reverting its conformation similar to that of holoALA and delaying the transition of the native apoALA in molten-globule conformation. These results demonstrate that both ALA forms can be used as a vehicle for the delivery of EGCG.

A thorough theoretical approach provides insight into the bioavailability and transport of bioactive ligands, as well as the influence of PCB and EGCG binding on the higher stability of albumins. The mechanisms based on the protein conformational changes that are difficult to observe only experimentally are explained.

Keywords: conformational changes of proteins, protein stability, albumins, human serum albumin, α -lactalbumin, bioactive food ligands, epigallocatechin-3-gallate, phycocyanobilin, molecular docking, molecular dynamics simulation

Scientific field: Chemistry

Scientific discipline: Applied chemistry

UDK number:

Spisak skraćenica

ALA - α -laktalbumin

APC – alofikocijanin

ATCUN – vezivno mesto na N-terminalu (od eng. amino terminal copper and nickel)

BAMLET – goveđi α -laktalbumin letalan za tumorske ćelije (od eng. Bovine Alpha-lactalbumin Made Lethal to Tumor cells)

BLG - β -laktoglobulin

CGFF – pojednostavljena polja sila (od eng. coarse-grained force field)

C-PC – C-fikocijanin

CSD – Kembrička baza podataka (od eng. Cambridge Structural Database)

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

EA – evolucionarni algoritmi

EC - epikatehin

ECG - epikatehin-3-galat

EGC - epigalokatehin

EGCG – epigalokatehin-3-galat

EM – minimizacija energije (od eng. energy minimization)

FA – masna kiselina (od eng. fatty acid)

FDPB – Puason-Bolcmanova metoda (od eng. finite difference Poisson–Boltzmann continuum electrostatics method)

FF – polje sila (od eng. force field)

GPCR - G protein spregnuti receptori (od eng. G protein-coupled receptor)

HAMLET – humani α -laktalbumin letalan za tumorske ćelije (od eng. Human Alpha-lactalbumin Made Lethal to Tumor cells)

HSA - albumin iz humanog seruma (od eng. Human Serum Albumin)

LP – algoritam preskakanja (od eng. Leap-frog algorithm)

MAPK – mitogen-aktivirana protein kinaza

MC – Monte Karlo metode

MD – molekulska dinamika

MM –molekulska mehanika

μ VT – makrokanonični ansambl

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaza

NMR - nuklearna magnetna rezonanca

NTS - vezivno mesto na N-terminalu (od eng. N-terminal binding site)

NVE – mikrokanonični ansambl

NVT – kanonični ansambl

NVT/NPT – izotermno-izobarski ansambl

PBC – periodični granični uslovi (od eng. Periodic Boundary Conditions)

PCB- fikocijanobilin

PDB – proteinska banka podataka (od eng. Protein Data Bank)

PE – fikoeritrin

QM – kvantna mehanika (od eng. quantum mechanics)

Rg – radijus žiracije (od eng. Radius of gyration)

RMSD – razlika između dve strukture (od eng. Root Mean Square deviation)

RMSF – fluktuacije svakog aminokiselinskog ostatka (od eng. Root Mean Square Fluctuation)

RNK – ribonukleinska kiselina

RNS – reaktivne azotne vrste (od eng. reactive nitrogen species)

ROS – reaktivne kiseonične vrste (od eng. reactive oxygen species)

RTK – receptor protein kinaze

SA – pronalaženje konformacija pri stalnoj promeni temperature (od eng. Simulated Annealing)

SF – funkcija za predviđanje afiniteta vezivanja (od eng. scoring function)

UFF – polje sila sa ujedinenim vodonikovim atomima (od eng. united atom force field)

VV – korigovani Verletov algoritam (od eng. Velocity Verlet)

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Opšti deo.....	3
2.1. Albumini	3
2.1.1. Humani serum albumin.....	4
2.1.1.1. Struktura HSA.....	5
2.1.1.2. Vezivna mesta HSA	6
2.1.1.2.1. Vezivna mesta masnih kiselina	7
2.1.1.2.2. Vezivna mesta hem-Fe(III) kompleksa (FA1 vezivno mesto).....	9
2.1.1.2.3. Sudlovo mesto I (FA7 vezivno mesto).....	12
2.1.1.2.4. Sudlovo mesto II (FA3-FA4 vezivna mesta)	14
2.1.1.2.5. Vezivna mesta metala	16
2.1.1.3. Konformacione promene i alosterija HSA	17
2.1.1.3.1. Uticaj pH vrednosti na alosteriju HSA.....	17
2.1.1.3.2. Uticaj vezivanja masnih kiselina na alosteriju HSA	18
2.1.1.3.3. Uticaj vezivanja hema na alosteriju HSA	18
2.1.1.4. Uloge HSA	20
2.1.2. Protein mleka: α -laktalbumin	21
2.1.2.1. Struktura ALA.....	23
2.1.2.2. Vezivna mesta ALA	25
2.1.2.3. Konformacione promene ALA.....	26
2.1.2.4. Antikancerogena i antimikrobna aktivnost ALA:HAMLET/BAMLET kompleksi	27
2.1.2.5. Primena ALA u prehrambenoj industriji.....	29
2.1.2.6. Interakcije ALA sa malim molekulima.....	29
2.2. Bioaktivnekomponente iz hrane	30
2.2.1.1. Bioaktivne komponente mikroalge Spiruline	30
2.2.1.1.1. Fikobiliproteini.....	33
2.2.1.1.2. Fikocijanobilin-strukturni analog bilirubina	35

2.2.1.2. Bioaktivne komponente zelenog čaja.....	40
2.2.1.2.1. Katehini zelenog čaja i njihova struktura.....	41
2.2.1.2.2. EGCG.....	42
2.2.1.2.3. EGCG i antioksidativna aktivnost.....	42
2.2.1.2.4. EGCG i antikancerogena aktivnost	44
2.2.1.2.5. Pristupi za poboljšanje biodostupnosti EGCG-a.....	45
2.2.1.2.6. Interakcije EGCG-a i makromolekula.....	47
2.3. Metode računarske hemije za proučavanje interakcija između biomolekula	48
2.3.1. Molekulski doking.....	48
2.3.1.1. Pronalaženje vezivnog mesta metodom molekulskog dokinga.....	49
2.3.1.1.1. Algoritmi uzorkovanja molekulskog dokinga.....	50
2.3.1.1.1.1. Algoritam prepoznavanja oblika.....	51
2.3.1.1.1.2. Sistemska pretraga	51
2.3.1.1.1.3. Stohastički algoritmi	52
2.3.1.1.1.4. Deterministički algoritmi	54
2.3.1.1.2. Funkcije predviđanja afiniteta vezivanja	54
2.3.1.1.2.1. Funkcije bazirane na polju sila	55
2.3.1.1.2.2. Empirijske funkcije.....	56
2.3.1.1.2.3. Funkcije bazirane na statističkim posmatranjima poznatih struktura	58
2.3.1.1.3. Protokol molekulskog dokinga	60
2.3.1.1.3.1. Priprema liganda	60
2.3.1.1.3.2. Priprema proteina.....	61
2.3.1.1.3.3. Doking proračun	62
2.3.1.1.3.4. Rangiranje i analiziranje rezultata molekulskog dokinga.....	63
2.3.1.1.4. Molekulska dinamika (MD).....	64
2.3.1.1.4.1. Ansambli.....	66
2.3.1.1.4.2. Polja sila.....	67
2.3.1.1.4.3. Klasična mehanika.....	69
2.3.1.1.4.3.1. Algoritmi integraljenja u MD simulaciji	71
2.3.1.1.4.4. Rastvarač u MD simulaciji	74

2.3.1.1.4.5. Podešavanje i protokol MD simulacije	76
3. Ciljevi	79
4. Eksperimentalni deo	81
4.1. Priprema liganada PCB i EGCG za molekularni doking i MD simulaciju	81
4.2. Priprema struktura HSA, HSA-PCB(IB/IIA) za MD simulaciju.....	82
4.3. MD simulacije HSA, HSA-PCB(IB) i HSA-PCB(IIA).....	82
4.4. Priprema strukture apoALA za molekularni doking	83
4.5. Simulacija molekularnog dokinga EGCG-a i apoALA.....	83
4.6. MD simulacija holo/apoALA i holo/apoALA-EGCG.....	84
5. Rezultati i diskusija	85
5.1. Studija MD simulacije slobodnog i HSA-PCB(IB/IIA) kompleksa.....	86
5.1.1. Poređenje interakcija PCB-a i HSA u mestu IB pre i nakon MD simulacije....	87
5.1.2. Poređenje interakcija PCB-a i HSA u mestu IIA pre i nakon MD simulacije..	91
5.1.3. Stabilnost i konformacione promene HSA i HSA-PCB(IB/IIA) tokom MD simulacije	94
5.1.4. Kompaktnost HSA i HSA-PCB(IB/IIA) tokom MD simulacije.....	96
5.1.5. Lokalna mobilnost HSA i HSA-PCB(IB/IIA) tokom MD simulacije	97
5.1.6. Uticaj PCB-a na vezivanje drugih liganada za HSA.....	102
5.1.7. Promena konformacije PCB-a usled vezivanja za HSA tokom MDS	104
5.2. Vezivanje EGCG-a za holo- i apo-formu ALA	109
5.2.1. Doking analiza vezivanja EGCG-a za apoALA	109
5.3. MD simulacija apoALA-EGCG	112
5.3.1. Stabilnost apoALA i holoALA.....	112
5.3.2. Stabilnost holoALA i holoALA-EGCG	115
5.3.3. Stabilnost apoALA i apoALA-EGCG	117
5.3.4. Detalji strukturnih promena pri vezivanju EGCG-a za apoALA	124
6. Zaključci	131
7. Literatura	134
Biografija autora.....	164

Изјава о ауторству	165
Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада.....	166
Изјава о коришћењу	167

1. Uvod

Poslednjih godina računarske simulacije postale su moćna alatka za proučavanje bioloških sistema i toka hemijskih reakcija. Predominantni jaz između eksperimentalnog i teorijskog pristupa značajno se smanjio. Nekada su računarske simulacije bile korišćene isključivo u cilju imitiranja eksperimentalnih rezultata, kako bi se prikazali mikroskopski detalji koji su nevidljivi u eksperimentu, dok se danas koriste i za predviđanje eksperimentalnih rezultata, što značajno umanjuje utrošeno vreme i novac. Razvoj računara i njihovih programa povećava računarsku snagu iz dana u dan kako bi se proučavali što složeniji sistemi kao što su proteini, DNK, enzim-supstrat interakcije, ćelijske membrane, itd. Jedna od glavnih karakteristika proteina je sposobnost vezivanja malih molekula (liganada). Ovo vezivanje može uticati na funkciju, konformacione promene i stabilnost proteina. Sposobnost vezivanja liganada za proteine široko se koristi u cilju dizajniranja lekova i ispitivanju transporta fizioloških i bioaktivnih jedinjenja.

Albumini su najviše ispitivani proteini koji pripadaju familiji globularnih proteina. Prisutni su u krvnoj, plazmi, mleku, belancetu i orašastim plodovima. Primarna funkcija ovih proteina je transport malih molekula i održavanje osmotskog koloidnog pritiska. Humani serum albumin poznat je po dugačkom poluživotu (19-20 dana) i izuzetnoj sposobnosti da veže i transportuje mnoštvo lekova i bioaktivnih molekula iz hrane, čime reguliše njihovu biodostupnost. Sa druge strane, jedan od glavnih proteina surutke, α -laktalbumin (ALA), se zahvaljujući dobroj rastvorljivost u vodi i niskoj agregaciji prilikom zagrevanja, često se koristi kao dodatak raznim prehrambenim proizvodima i pićima. Pored toga, zbog visokog sadržaja esencijalnih amino kiselina, može se koristiti kao dijetetski suplement za neurološke funkcije i komponentu adaptiranog mleka za odojčad. Zbog sposobnosti da u kiseloj sredini i u apo formi (bez vezanog jona Ca^{2+}) na povišenim temperaturama zauzima stanje klasične “stopljene globule”, koristi se kao model-protein za ispitivanje osobina konformacija proteina sličnih “stopljenoj globuli”.

Poslednjih godina, bioaktivne komponente iz hrane privlače veliku pažnju naučnika. Ove komponente predstavljaju neesencijalne biomolekule iz hrane koje pokazuju razne benefite po zdravlje ljudi. Iako se modro-zelena alga Spirulina od davnina koristi u ishrani, tek poslednjih godina je objavljen veliki broj naučnih radova o antoksidativnim, antiinflamatornim i antikancerogenim efektima C-fikocijanina, fikobiliproteina ove alge, gde je pokazano da je tetrapirolna hromofora ovog proteina, fikocijanobilin (PCB), zapravo odgovorna za blagotvorne efekte po zdravlje ljudi. Takođe, u jednu od najispitivanijih klasa bioaktivnih molekula hrane spadaju i polifenolna jedinjenja. Kako je čaj jedno od najpopularnijih pića širom sveta, brojna istraživanja sprovedena su u cilju opisivanja katehina zelenog čaja, naročito najzastupljenijeg katehina, epigalokatehin-3-galata. Veliki broj studija je pokazao da ovaj molekul ima značajne antioksidativne, antikancerogene, antimikrobne, antiinflamatorne i neuroprotektivne efekte, kao i da ima veliki potencijal u terapiji brojnih oboljenja.

U ovoj doktorskoj disertaciji primenom teorijskih metoda, molekuskog dokinga i molekulsko-dinamičke simulacije, proučavani su efekti vezivanja bioaktivnih liganada iz hrane (PCB-a i EGCG-a) na promenu konformacije i stabilnost albumina (HSA i ALA).

2. Opšti deo

U ovom poglavlju opisana je tematika koja je predmet ove doktorske disertacije. Opisane su strukture, aktivnost, funkcije i medicinska primena albumina (HSA i ALA). Kako je veliki deo istraživanja u ovom radu bio posvećen teorijskom ispitivanju kompleksa navedenih proteina sa PCB-em i EGCG-om, opisane su i teorijske osnove interakcija između liganada i proteina. Takođe, detaljno su opisane računarske metode koje se koriste za pronalaženje najboljeg mesta vezivanja liganda u proteinu, kao i metoda molekulske dinamičke simulacije ovih sistema.

2.1. Albumini

Naziv albumin potiče od stare nemačke reči *albumen*, koja je proizašla iz latinskog naziva *albus* (belo), kojim se nazivalo belance. Ova familija globularnih proteina je jedna od najproučavanijih. Za razliku od globulina, koji takođe pripadaju globularnim proteinima, albumini imaju manju molekulsku masu i rastvorni su u vodi. Takođe, albumini su delimično, a globulini potpuno rastvorni u polu-zasićenim rastvorima amonijum-sulfata. U serumu, albumini (3,5-5,0 g/dL) su zastupljeniji od globulina (2,5-4,5 g/dL). Kod životinja, albumini su prisutni u krvnoj plazmi, belancetu i mleku [2-4], dok se kod biljnih vrsta mogu pronaći u soji, orašastim plodovima i žitaricama [5, 6]. Serum albumin predstavlja jednu od komponenata krvi, α -laktalbumin je protein surutke, a ovalbumin čini oko 50% proteina belanceta u čiji sastav ulazi i konalbumin (ovotransferin). Orašasti plodovi takođe sadrže albumine u veoma maloj količini (0,1-0,5%) koji pripadaju 2S albuminima i pokazuju alergena svojstva. Albumini imaju razne primene. Mogu služiti kao transporteri metala, masnih kiselina, lekova i bioaktivnih liganada [7]. Takođe, mogu se koristiti i u dijagnostifikovanju raznih bolesti [8, 9]. Komercijalno se dobijaju ekstrakcijom iz belanceta (ovalbumin), goveđeg seruma i humanog seruma [9]. Razvijene su i druge metode dobijanja albumina, kao što je rekombinantni HSA koji se dobija genetskim inženjeringom [10]. Najtipičniji predstavnici familije albumina su serum albumini (humani

(HSA) i goveđi serum albumin (BSA)), te je manja pažnja posvećena drugim proteinima koji pripadaju porodici albumina.

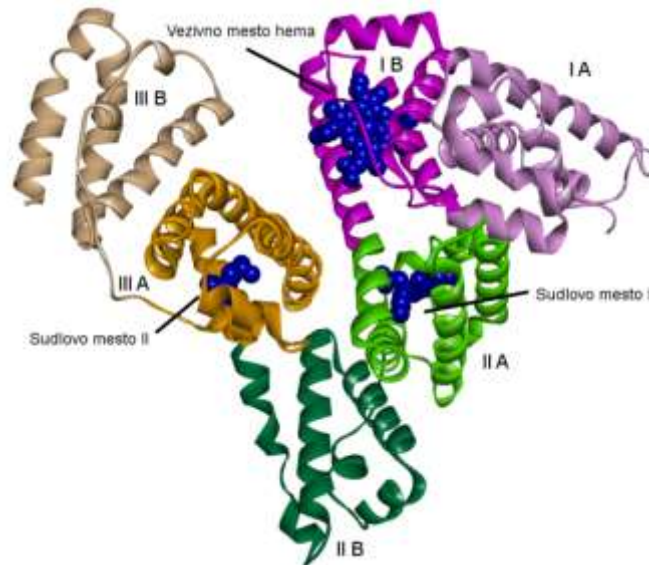
2.1.1. Humani serum albumin

Serum albumini su klasa proteina pronađena u krvi kičmenjaka, te se često nazivaju i albumini krvi. U odnosu na globuline, serum albumini su znatno manje heterogeni, odnosno sadrže mnogo manje različitih proteina. Pripadaju maloj grupi proteina iz seruma koji se mogu dobiti u kristalnoj formi. Za serum albumine se vezuju mnoge boje (kongo crvena i metil-oranž), žuti pigment žuči (bilirubin), masne kiseline, steroidi, hemin i mnogi drugi molekuli. Primarna funkcija im je transport ovih molekula u krvi i održavanje koloidnog osmotskog pritiska u plazmi. Sintetišu se u jetri kao preproalbumin koji u endoplazmatičnom retikulumu prelazi u proalbumin. Potom, od ovog produkta u Goldžijevom aparatu nastaje albumin. Serum albumini u krvi dostižu koncentraciju od oko $7,0 \cdot 10^{-4}$ M.

Glavni vanćelijski i najzastupljeniji proteini krvne plazme, HSA i BSA, pripadaju grupi najproučavanijih proteina. Humani serum albumin poznat je po izuzetnom kapacitetu vezivanja različitih liganada i skladištenja jedinjenja koja mogu biti dostupna u količinama daleko izvan njihove rastvorljivosti u plazmi. HSA ima dugačak poluživot (19-20 dana), što je posledica njegove veličine i interakcije sa neonatalnim Fc receptorom (FcRn) [11]. Suprotno tome, u organizmu dolazi do brze degradacije mnogih lekova čime se umanjuje njihova terapijska moć. HSA se, kao transporter lekova, može iskoristiti za povećanje poluživota peptida i malih molekula koji brzo podležu degradaciji. Na ovaj način, HSA reguliše biodostupnost lekova i bioaktivnih molekula. Zahvaljujući izvanrednom kapacitetu vezivanja različitih liganada koristi se i kao model-sistem za proučavanje interakcija sa bioaktivnim molekulima.

2.1.1.1. Struktura HSA

HSA je negativno naelektrisani, neglikozilovani, monomerni protein molekulske mase od oko 66 kDa. Na osnovu kristalnih struktura utvrđeno je da oko 67% sekundarne strukture HSA čine α -heliksi koji su povezani pomoću 9 petlji (**Slika 1**). Ovaj protein srololikog izgleda sačinjen je od tri domena (I, II i III). Domen I sadrži aminokiselinske ostatke 1-195, domen II 196-383, a domen III 384-585. Svaki domen se sastoji od dva subdomena, A i B, sastavljena od 4 i 6 α -heliksa, redom [12]. HSA sadrži malo metioninskih, glicinskih (Gly) i izoleucinskih (Ile) ostataka, dok poseduje jedan triptofanski (Trp) ostatak na položaju 214, kao i izobilje cisteinskih (Cys), leucinskih [13], lizinskih (Lys) i aminokiselinskih ostataka glutaminske kiseline (Glu). Od ukupno 585 aminokiselinskih ostataka u HSA čak 35 su cisteinski ostaci koji formiraju 17 disulfidnih mostova, dok je Cys34 slobodan. Disulfidni mostovi značajno doprinose stabilnosti HSA osiguravajući dug biološki život proteina [14]. Izračunata prosečna zapremina molekula HSA iznosi $80 \times 80 \times 30 \text{ \AA}$ [15].



Slika 1. 3D struktura HSA sa obeleženim domenima, subdomenima i vezivnim mestima hema (IB), varfarina (Sudlovo mesto I) i ibuprofena (Sudlovo mesto II) (PDB kod: 1BM0).

Uvijanje polipeptidnog lanca i topologija disulfidnih mostova je slična između subdomena HSA. Subdomen IIA povezan je sa dodirnom površinom između subdomena IA i IB hidrofobnim interakcijama i vodoničnim vezama, što dovodi domene I i II u orijentaciju T-oblika, odnosno orijentisani su gotovo ortogonalno jedan na drugi. Domen III, koji se nalazi u produžetku subdomena IIB i interaguje samo sa njim dovodi domene II i III u Y-oblik. Domeni I i III ostvaruju samo par kontakata i odvojeni su velikim rascjepom koji sačinjavaju subdomeni IB, IIIA i IIIB. Terminalni regioni domena doprinose formiranju među-domena koji povezuju domen IB i IIA (ostaci 173-205) i IIB i IIIA (ostaci 336-398). Uprkos strukturnoj sličnosti, orijentacija domena HSA stvara visokoasimetrično okruženje u koje se može smestiti mnoštvo strukturno različitih liganada [16, 17].

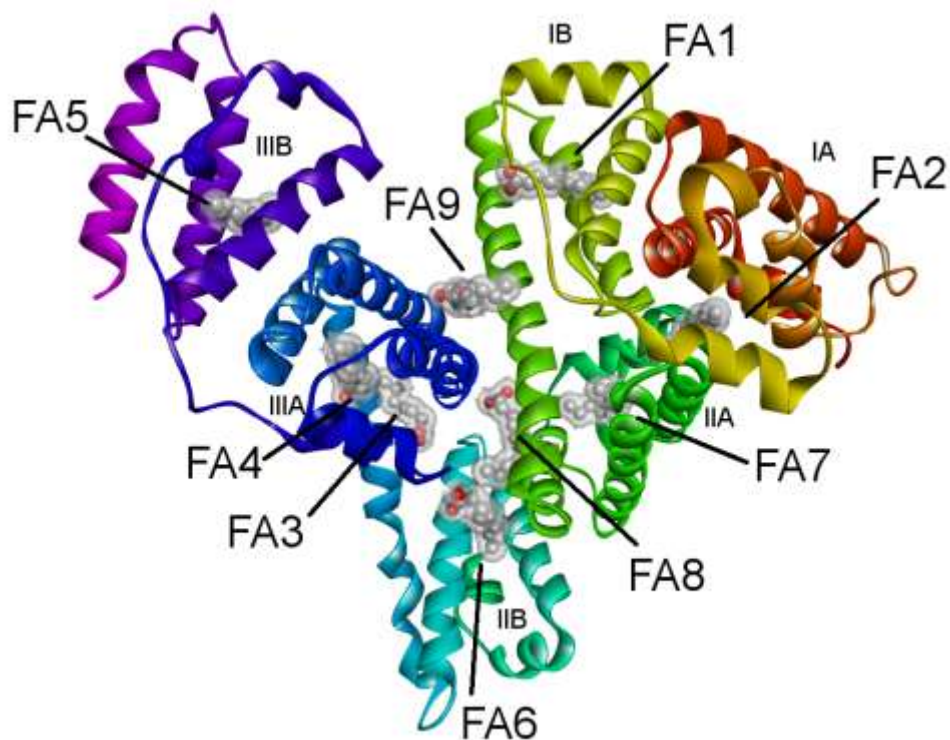
2.1.1.2. Vezivna mesta HSA

HSA, zahvaljujući svojoj fleksibilnoj strukturi i prisustvu tri domena, ima izvanredan kapacitet za vezivanje raznih egzogenih i endogenih liganada. Međutim, iako imaju sličnu strukturu, svaki domen pokazuje drugačiji afinitet za vezivanje liganda. Prema do sada objavljenim kristalnim strukturama HSA, postoje tri glavna vezivna mesta sa jakim afinitetom prema velikom broju različitih liganada. Dva vezivna mesta se nalaze u subdomenima IIA i IIIA i nazvana su Sudlovo mesto I i Sudlovo mesto II (**Slika 1**) [18]. Novija istraživanja pokazala su da HSA sadrži i treće vezivno mesto za koje se vezuje hem, i koje pripada subdomenu IB (**Slika 1**) [19]. Takođe, pronađena su četiri vezivna mesta za metale i 9 vezivnih mesta HSA za koje se vezuju masne kiseline, od kojih se tri preklapaju sa Sudlovim mestom I i II [20, 21].

2.1.1.2.1. Vezivna mesta masnih kiselina

Primarni fiziološki ligandi HSA su masne kiseline (eng. Fatty acid, FA). Ukupno, molekul HSA može vezati do 9 masnih kiselina (FA1-FA9), koje se vezuju na više asimetrično raspoređenih vezivnih mesta, i koja pokazuju različit afinitet prema masnim kiselinama (**Slika 2**) [17, 22, 23]. Vezivna mesta FA1-FA7 spadaju u primarna, a FA8-FA9 u sekundarna vezivna mesta. Postoje tri visokoafinitetna mesta FA2, FA4 i FA5, od kojih FA5 pokazuje najveći afinitet vezivanja za masne kiseline [24]. Mesta FA4 i FA5 pripadaju domenu III, dok se mesto FA2 nalazi između subdomena IA i IIA. U ovim vezivnim mestima okruženje HSA dozvoljava masnim kiselinama da zauzmu gotovo linearnu konformaciju, pri čemu karboksilne grupe masnih kiselina učestvuju u građenju specifičnih sonih mostova sa najmanje jednim aminokiselinskim bočnim lancem [23]. Sve masne kiseline se vezuju za FA1 vezivno mesto sa istom orijentacijom. Karboksilne grupe masnih kiselina formiraju vodoničnu vezu sa Arg117, dok su metilenskim repom okrenute ka heliksima H8 i H9. FA2 vezivno mesto se nalazi u šupljini koju formiraju subdomen IA, IB i IIA gde masne kiseline interaguju sa Tyr150 i Arg257 gradeći vodonične veze, sa nepolarnim delom orijentisanim između IA i IIA subdomena [25]. Nekoliko studija ukazuje da vezivanje masnih kiselina za ovo vezivno mesto stabilizuje B-formu HSA (pH>8). FA3 i FA4 vezivna mesta su smeštena u subdomen IIIA. U mestu FA3 karboksilna grupa masne kiseline ostvaruje vodonične veze sa Arg348 i Arg485, a u FA4 vezivnom mestu sa Arg410, Tyr411 i Ser489. Masne kiseline u ova dva vezivna mesta su orijentisane tako da polarna glava masne kiseline u mestu FA3 interaguje sa nepolarnim repom masne kiseline smeštene u FA4. U hidrofobnom kanalu subdomena IIIB nalazi se vezivno mesto FA5, gde se masne kiseline vezuju u izduženoj konformaciji. Polarni delovi masnih kiselina interaguju sa Tyr401 i Lys525 [25]. FA6 vezivno mesto nalazi se između subdomena IIA i IIB. Interesantno je da je ovo mesto drugačije od FA1-FA5, pošto ne postoji određena grupa aminokiselinskih ostataka koja konstantno stabilizuje masne kiseline u ovom vezivnom mestu, već se smenjuju Arg209, Asp324 i Glu354. Takođe, važno je napomenuti da je ovo mesto sekundarno mesto vezivanja ibuprofena [26]. FA7 vezivno mesto je smešteno u hidrofobnoj šupljini subdomena IIA, gde su masne kiseline stabilizovane

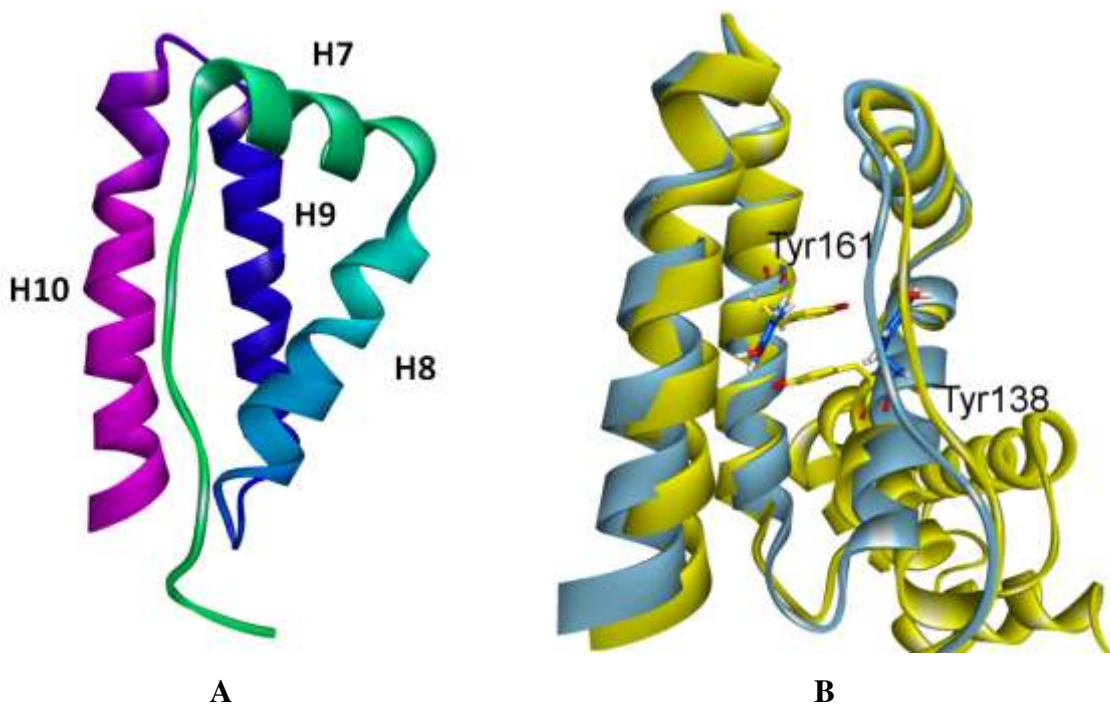
polarnim interakcijama sa Arg257, koji učestvuje i u stabilizaciji FA2 vezivnog mesta. Dodatna, FA8 i FA9 vezivna mesta se nalaze na dnu, odnosno vrhu, šupljine koju formiraju subdomeni IA, IB i IIA sa jedne strane, i subdomeni IIB, IIIA i IIIB sa druge strane, tzv. rasep (eng. cleft). Masne kiseline, isključivo kratkog lanca, u mestu FA8 ostvaruju interakcije sa Lys195, Lys199, Arg218, Asp451 i Ser454. Mesto FA9 se formira pri konformacionom prelazu HSA izazvanom vezivanjem masnih kiselina za neko od pomenutih mesta [25, 27].



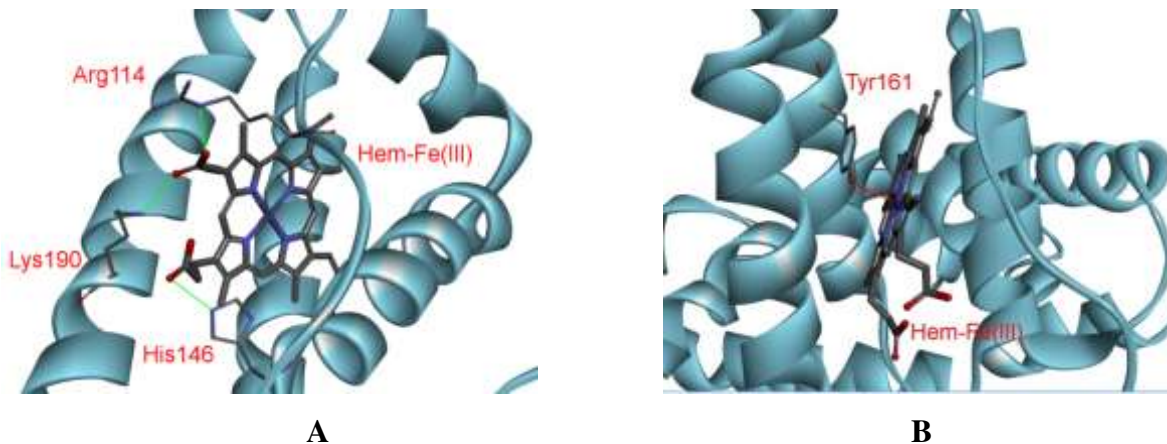
Slika 2. 3D struktura HSA u kompleksu sa dekanskom kiselinom na vezivnim mestima masnih kiselina (FA1-FA9) (PDB kod: 1E7E).

2.1.1.2.2. Vezivno mesto hem-Fe(III) kompleksa (FA1 vezivno mesto)

Prvo vezivno mesto masnih kiselina, FA1, nalazi se u šupljini D-oblika koju formiraju četiri heliksa (H7-H10) subdomena IB (**Slika 3A**). U odmašćenom HSA ovo vezivno mesto je zatvoreno steking (eng. stacking) interakcijom Tyr138 i Tyr161 (**Slika 3B**) [17]. Kada se za ovo mesto veže hem-Fe(III) dolazi do reorijentacije oba tirozinska aminokiselinska ostataka, koji sada učestvuju u π - π interakcijama sa porfirinom iz hema i Tyr161 postaje donor kiseonikovog atoma za koordinaciju sa gvožđem iz hema, dok aminokiselinski ostaci Arg114, His146 i Lys190 stabilizuju propionske grupe hem-Fe(III) stvaranjem sonih mostova(**Slika 4A i 4B**) [28]. Pored hem-Fe(III) kompleksa, HSA vezuje i sintetičke Fe(II)-porfirine i Al(III)-ftalatocijanine [29, 30].

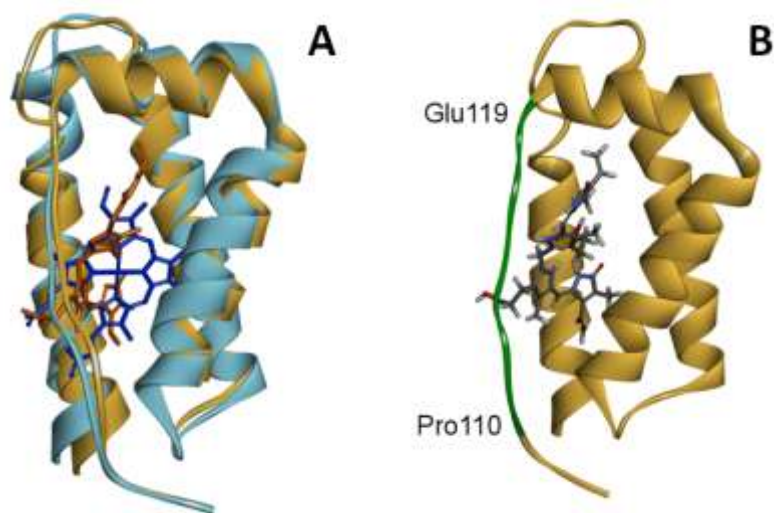


Slika 3. **A** Heliksi koji sačinjavaju D-šupljinu IB subdomena HSA, **B** Interakcije tirozinskih ostataka D-šupljine u odmašćenom HSA bez (žuto) i u prisustvu hema (plavo) (PDB kod: 1N5U i 1BM0).

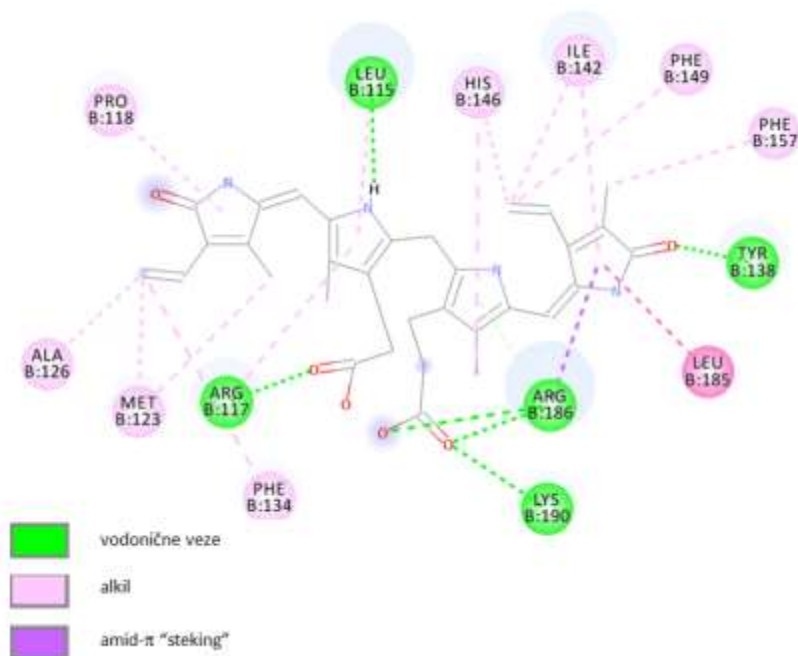


Slika 4. **A** Interakcije Arg114, His146 i Lys190 FA1 vezivnog mesta sa hemom, **B** Interakcija Tyr161 FA1 vezivnog mesta sa hemom (PDB kod: 1N5U).

Još jedan važan molekul koji HSA vezuje u subdomenu IB je 4Z,15E-bilirubin-IX α . Ovaj tetrapirolni, nerastvorni, žuto-narandžasti pigment nastaje u metabolizmu hem-Fe(III) kompleksa. Vezuje se za džep L-oblika koji se nalazi na ulazu FA1 šupljine, a u blizini vezivnog mesta hem-Fe(III) kompleksa (**Slika 5A**) [31]. Tačnije, bilirubin se vezuje u neposrednoj blizini petlje koja sadrži aminokiselinske ostatke Pro110-Glu119 (**Slika 5B**). Na 2D interakcionom dijagramu (**Slika 6**) prikazane su vezivne interakcije bilirubina sa HSA. Propionske karboksilne grupe bilirubina grade vodonične veze/sone mostove sa bočnim ostacima Arg 117, Arg186 i Lys190, dok karbonilna grupa laktamskog prstena gradi vodoničnu vezu sa Tyr138 (**Slika 6**). Vinilne grupe bilirubina stabilizovane su mnoštvom hidrofobnih interakcija sa aminokiselinskim ostacima koje pripadaju heliksima H8-H10 (**Slika 6**). Metodama molekuskog modelovanja pokazano je da se i 4Z,15Z-bilirubinov izomer, najzastupljeniji u krvnoj plazmi, može vezati za ovo vezivno mesto.



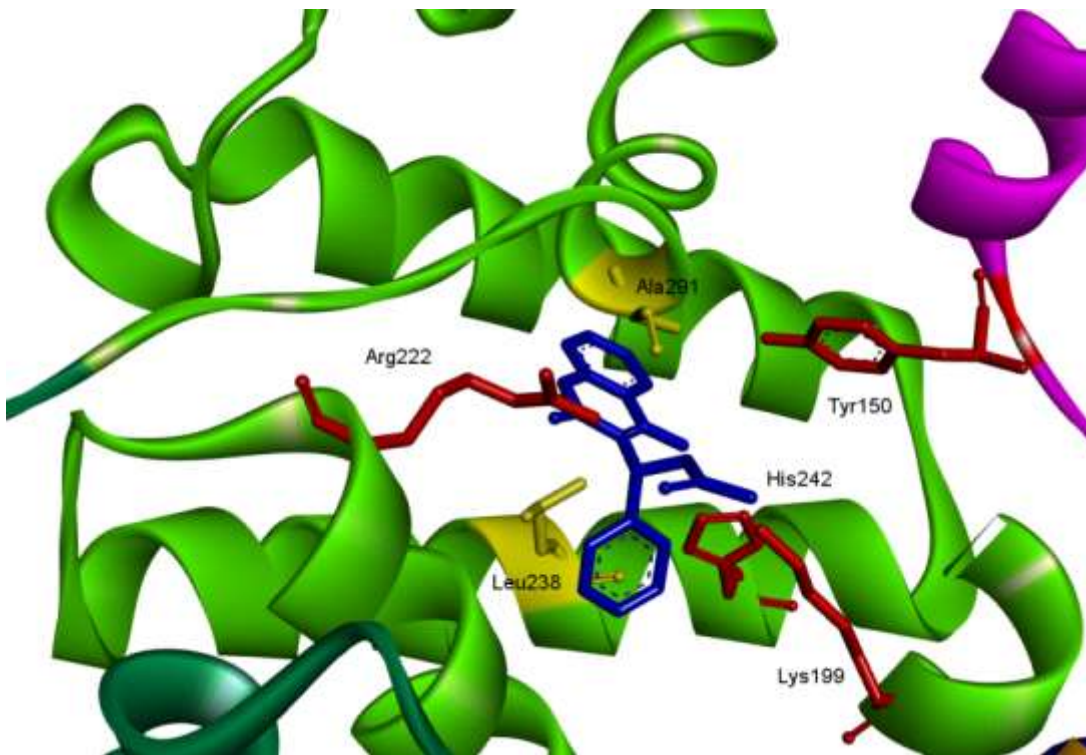
Slika 5. A Preklopljene strukture džepa L-oblika na ulazu FA1 šupljine kada je za njega vezan hem (plavo) i 4Z,15E-bilirubin-IX α (narandžasto), **B** Petlja subdomena IB koja sadrži aminokiselinske ostatke Pro110-Glu119 (zeleno) (PDB kod: 2VUF).



Slika 6. 2D interakcioni dijagram sa prikazanim interakcijama aminokiselinskih ostataka HSA i 4Z,15E-bilirubina-IX α (PDB kod: 2VUF).

2.1.1.2.3. Sudlovo mesto I (FA7 vezivno mesto)

Sudlovo mesto I je veliko (prostrano) vezivno mesto sačinjeno od 6 heliksa koji pripadaju subdomenu IIA (ostaci 195-383) i dela subdomena IB (ostaci 148-154). Iako ovo vezivno mesto uglavnom formiraju nepolarni aminokiselinski ostaci, odmašćen HSA sadrži i dva polarna klastera. Unutrašnji klaster, koji se nalazi na dnu vezivnog mesta i sadrži polarne ostatke Tyr150, His242 i Arg257 i spoljašnji klaster, smešten na ulazu u vezivno mesto, koji sadrži polarne ostatke Lys195, Lys199, Arg218 i Arg222. Prisustvo pretežno baznih aminokiselinskih ostataka definiše specifičnost ovog vezivnog mesta. Primećeno je da molekuli koji pokazuju afinitet za ovo mesto poseduju anjonske ili polarne grupe. Pokazano je da je prisustvo dve polarne i/ili anjonske grupe, koje su razdvojene sa 5 do 6 veza, veoma važno za jako vezivanje liganda za Sudlovo mesto I [32]. Stoga, Sudlovo mesto I je pogodno za vezivanje voluminoznih heterocikličnih anjonskih liganada. Neki lekovi (kao što je varfarin) nagomilavaju se u centru Sudlovog mesta I sa orijentacijom u kojoj je njihova planarna grupa čvrsto usidrena nepolarnim aminokiselinskim ostacima Leu238 i Ala291 (**Slika 7**). Pored varfarina, za Sudlovo mesto I između ostalih, vezuju se i lekovi azapropazon i valproat. Zahvaljujući velikoj zapremini Sudlovog mesta I, različiti molekuli zauzimaju različit prostor u ovom vezivnom mestu, ali su svi smešteni tako da mogu ostvariti vodoničnu vezu sa Tyr 150, za koji se smatra da zauzima centralnu ulogu u interakcijama sa lekovima vezanim za HSA. Pored Tyr150, varfarin ostvaruje i dodatne, dve vodonične veze sa aminokiselinskim ostacima His242 i Lys199 ili Arg222 (**Slika 7**) [26].

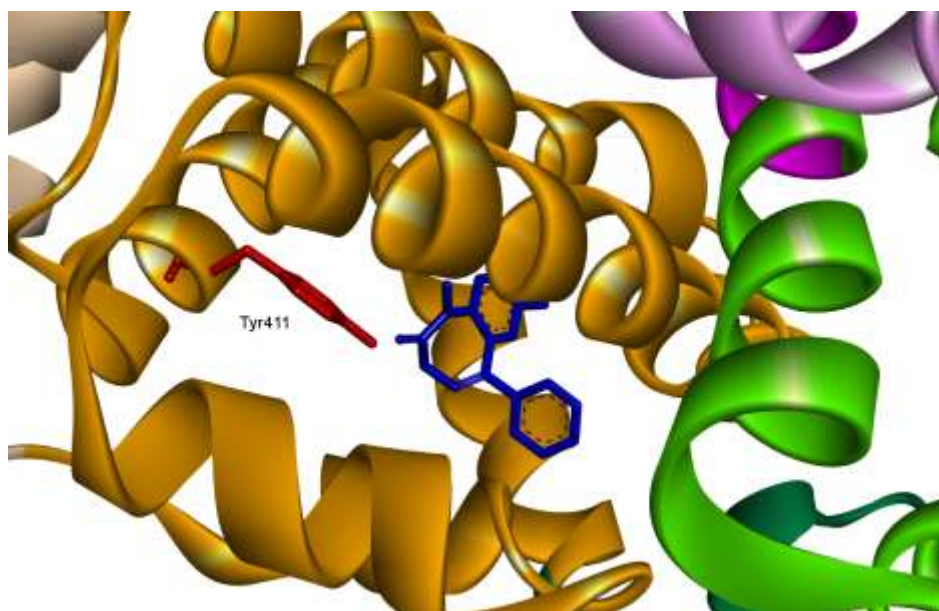


Slika 7. Položaj varfarina (plavo) u Sudlovom mestu I, subdomen IIA. Nepolarni ostaci Ala291 i Leu238 prikazani su žutom bojom, dok su polarni ostaci Tyr150, Lys199 i Arg222 prikazani crvenom bojom. Korišćena kristalna struktura PDB kod: 2BXD.

Kod neodmašćenog HSA, kada su masne kiseline vezane u FA7 mestu, primećeno je da se većina lekova (osim indometacina) takođe vezuje u centralnom delu Sudlovog mesta I (između Leu238 i Ala291) [26]. Ipak, postoje neke značajne promene koje nastaju pri vezivanju masnih kiselina za protein. S obzirom da Tyr150 sada interaguje sa masnim kiselinama, nije više ključni aminokiselinski ostatak u interakcijama sa lekovima, te u interakcijama koje lekovi ostvaruju sa HSA učestvuju Lys199 i Arg222 sa jedne strane, i His242 sa druge strane vezivnog mesta.

2.1.1.2.4. Sudlovo mesto II (FA3-FA4 vezivna mesta)

Sudlovo mesto II je topološki slično Sudlovom mestu I. Takođe je sačinjeno od svih šest heliksa odgovarajućeg subdomena (IIIA), i sadrži hidrofobnu šupljinu sa pojedinim polarnim aminokiselinskim ostacima. Međutim, između ova dva vezivna mesta postoje značajne razlike u veličini, obliku i polarnosti. Sudlovo mesto II je manje zapremine od Sudlovog mesta I. Pored toga, Tyr411 (koji se nalazi na mestu koje odgovara Leu219 u Sudlovom mestu I) je orijentisan ka unutrašnjosti vezivnog mesta što ligandima ograničava prostor u koji bi se mogli smestiti (**Slika 8**).



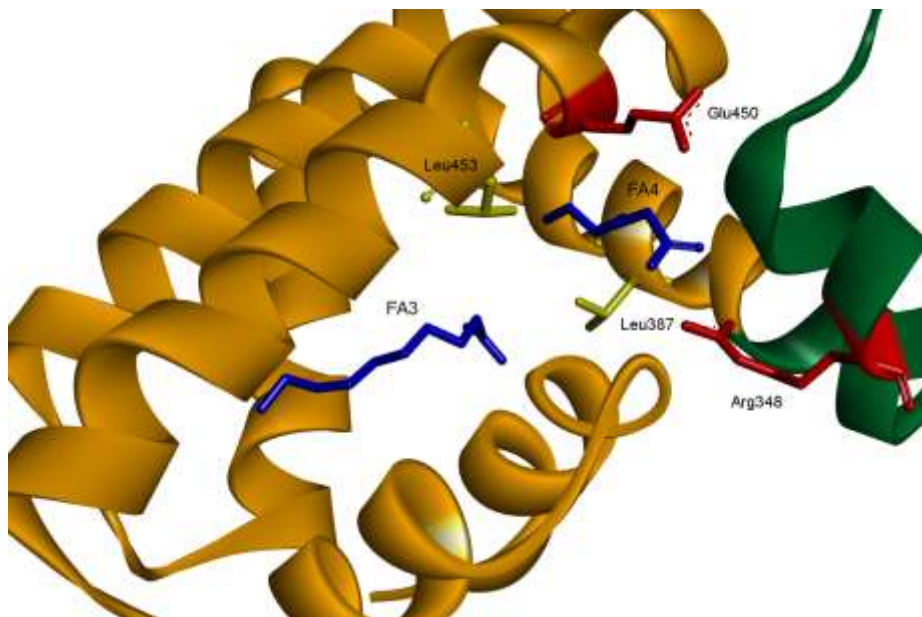
Slika 8. Položaj diazepama (plavo) u Sudlovom mestu 2, subdomen IIIA. Polarni ostatak Tyr411 prikazan je štapičasto crvenom bojom. Korišćena kristalna struktura PDB kod: 2BXF.

Pored toga, bez obzira na strukturnu sličnost, subdomeni IIA i IIIA (Sudlovo mesto I i II) su orijentisani drugačije u odnosu na ostatak proteina. Ulaz u Sudlovo mesto I je okružen subdomenima IIB i IIIA, čiji aminokiselinski ostaci doprinose stabilizaciji vezivnog mesta, dok ovo nije slučaj kod ulaza u Sudlovo mesto II. Iako se subdomen IIIA nastavlja na subdomen IIIB, rotiran je u suprotnom smeru od ulaza u Sudlovo mesto II

ostavljajući ga izloženijem rastvaraču (**Slika 1**). Među malobrojnim polarnim ostacima ovog subdomena najbitniju ulogu ima Tyr411, ali i Arg410, Lys414 i Ser489. Ovo mesto preferiraju ligandi sa aromatičnim grupama.

Pokazano je da se Sudlovo mesto II adaptira prilikom vezivanja liganada [26]. Usled vezivanja manjih liganada (npr. ibuprofen, difunizal, itd.) postoji relativno malo kretanje bočnih lanaca, pri čemu su aminokiselinski ostaci Val433 i Arg410 najviše podložni promenama izazvanim vezivanjem liganada. U slučaju većih molekula (diazepam) dolazi do većih kretanja bočnih ostataka Leu387 i Leu453. Na ovaj način povećava se prostor u koji se može smestiti ligand, te se fenilni prsten diazepamata može smestiti u zadnju, desnu, subkomoru vezivnog džepa. Još jedan dokaz o adaptivnosti Sudlovog mesta II jeste to što, iako je male zapremine, može smestiti dva molekula masnih kiselina (mesta FA3 i FA4). Metilenski rep masnih kiselina smeštenih u vezivnom mestu FA3 okružen je nepolarnim aminokiselinskim ostacima, dok polarna karboksilna grupa masnih kiselina u mestu FA4 interaguje sa polarnim aminokiselinskim ostacima. Masne kiseline u položaju FA3 ne interaguju sa polarnim Tyr411, već se usled rotiranja Leu387 i Leu453 stvaraju vodonični mostovi sa Glu450 i Arg348 koji pripada subdomenu IIB (**Slika 9**) [26].

Endogeni ligandi koji se vezuju za ova tri vezivna mesta su bilirubin, tiroksin i hem, kao i varfarin, aspirin i fenilbutazon koji pripadaju grupi egzogenih liganada [22, 26, 27, 31, 33, 34]. Stereotipični ligandi (markeri) za Sudlovo mesto I i II su varfarin i ibuprofen, dok je marker za vezivno mesto hema bilirubin [7, 19].



Slika 9. Položaj masnih kiselina (plavo) u FA3 i FA4 vezujućim mestima, subdomen IIIA. Napolarni ostaci Leu378 i Leu453 prikazani su žutom bojom, dok su polarni ostaci Arg348 i Glu450 prikazani crvenom bojom. Korišćena kristalna struktura sa dekanskom kiselinom, PDB kod: 1E7E.

2.1.1.2.5. Vezivna mesta metala

HSA može vezati i esencijalne jone metala kao što su: Ca(II), Zn(II), Co(II), Fe(III), kao i toksične metalne jone (Ni(II), Cd(II), Hg(II)). Takođe, za HSA se vezuju i nefiziološki, često toksični, joni metala koji imaju primenu u medicini kao što su: Pt(II), Au(I) i V(IV) [20]. Od ukupno četiri do sada poznata vezivna mesta za metale, prvo se nalazi na N-terminusu (eng. N-terminal binding site, NTS) i poznato je pod nazivom ATCUN (eng. amino terminal copper and nickel) gde se koordinuju Cu(II), Ni(II) i Co(II) [35]. Za drugo vezivno mesto, koje predstavlja jedini slobodan cisteinski ostatak Cys34 (mesto A identifikovano u NMR studijama), vezuju se Au(I), Hg(II), Zn(II) i Pt(II) [36]. Kasnije je pokazano da je mesto A identično sa trećim vezivnim mestom poznatom pod nazivom multi-metal vezivno mesto (eng. multi-metal binding site, MBS), koje je dobilo

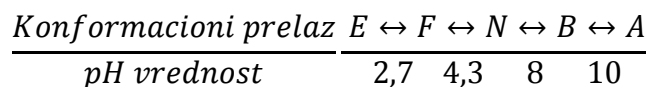
naziv zbog sposobnosti da koordinuje veliki broj različitih metala. Poslednje vezivno mesto, B mesto, za koje se vezuje Mn(II), još uvek nije locirano [37].

2.1.1.3. Konformacione promene i alosterija HSA

2.1.1.3.1. Uticaj pH vrednosti na alosteriju HSA

Humani serum albumin, usled prisustva velikog broja kiselih i baznih aminokiselinskih ostataka, podleže reverzibilnim konformacionim prelazima na različitim pH vrednostima (**šema 1**). Na pH=7,0 HSA zauzima normalnu formu (N) sa emisionim maksimumom na 338 nm. Prilikom smanjenja pH vrednosti na 4,3 HSA naglo prelazi u brzo-migrirajuću (eng. fast-migrating) formu (F), pri čemu se emisioni pik pomera na 332,6 nm. F-forma HSA je okarakterisana povećanjem viskoznosti, mnogo manjom rastvorljivošću i gubitkom α -heliksa u poređenju sa formom pod fiziološkim uslovima (N-formom). Daljem snižavanjem pH vrednosti na 2,7 F-forma prelazi u potpuno izduženu (eng. extended) formu (E), gde dolazi do još jednog plavog pomeranja emisionog spektra na 330 nm.

U baznoj srednini, pri pH vrednosti iznad 8,0 N-forma prelazi u baznu formu (B) sa emisionim pikom na 336 nm, koju karakteriše gubitak α -heliksa i povećan afinitet prema nekim ligandima u odnosu na N-formu. Na pH preko 10 HSA zauzima A-formu (eng. aged) bez daljeg pomeranja u emisionom spektru. Takođe, pokazano je da se struktura E-forme HSA značajno razlikuje od struktura B i A-forme [38].



Šema 1. Konformacije HSA u zavisnosti od pH vrednosti. E-izdužena, F- brzo-migrirajuća, N – normalna , B-bazna i A- zrela forma HSA

2.1.1.3.2. Uticaj vezivanja masnih kiselina na alosteriju HSA

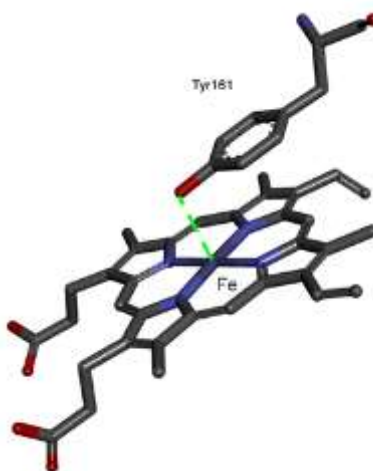
Prilikom vezivanja masnih kiselina za HSA dolazi do značajnih konformacionih promena. Domeni I i III se pomeraju oko njihove dodirne tačke sa domenom II, tako da do najvećih promena dolazi u subdomenima IA i IIIB. Interdomeni koji spajaju domen I sa domenom II, i domen II sa domenom III, se zaokreću za 16° nakon vezivanja masnih kiselina uslovljavajući rotaciju domena I u odnosu na domen III [16]. Iako ne postoji kristalna struktura B-forme HSA, postoje dokazi da konformacioni prelaz koji nastaje usled vezivanja masnih kiselina reprodukuje (barem delimično) konformacioni prelaz N u B-formu, sličan onom koji nastaje pri povećanju pH vrednosti iznad 8,0 [16, 39]. Važno je istaći da je za masne kiseline srednjih i dugih lanaca (npr. miristinska, $C_{14}H_{28}O_2$) poznato da deluju kao modulatori alosterije kod HSA, dok za masne kiseline kratkog lanca (npr. kaprilna, $C_8H_{16}O_2$) nije pokazan takav efekat [7]. Vezivanje miristinske kiseline za FA2 vezivno mesto orijentiše Tyr150, koji je ključni aminokiselinski ostatak pozicioniran u nepolarnoj sredini Sudlovog mesta I, ka karboksilnoj grupi masne kiseline. Na taj način, Phe149 je u mogućnosti da interaguje sa hemom gradeći π - π interakcije. Ovakav efekat nije primećen kod masnih kiselina kratkog lanca [16]. Domeni I i II imaju najveći uticaj u alosternoj modulaciji pri vezivanju liganda i u reaktivnim osobinama HSA, a vezivna mesta masnih kiselina FA1, FA2, FA6 i FA7 su funkcionalno povezana.

2.1.1.3.3. Uticaj vezivanja hema na alosteriju HSA

Alosterna regulacija vezivanja liganda za HSA nije relevantna samo u fiziološkim uslovima, već i u farmakološkim istraživanjima. Vezivanje lekova za proteine plazme je važan faktor za njihovu biološku efikasnost. Sa druge strane, dostupnost lekova se menja prilikom vezivanja i disocijacije od proteinskih komponenata krvi. Prilikom vezivanja hem-Fe(III) kompleksa za HSA dolazi do distorzije heliksa koji spaja domene I i II, što za posledicu ima reorijentaciju aminokiselinskih bočnih lanaca koji učestvuju u vezivanju ligandima u domenima I i II. Stoga, vezivanje hem-Fe(III) kompleksa za HSA je alosterno regulisano ligandima i obrnuto, pri čemu ovi ligandi utiču na formiranje dodatne koordinacione veze jona gvožđa iz hema. Geometrija koordinovanog gvožđa iz hema u

kompleksu sa HSA (koji ne sadrži dodatni ligand) se sastoji od 4 veze sa atomima azota iz porfirinskog prstena, i jednom koordinacionom vezom sa kiseonikom iz aminokiselinskog ostatka Tyr161 što dovodi do 4+1 geometrije (**Slika 10**). Vezivanje liganda za HSA (ibuprofen, varfarin) omogućava formiranje konfiguracije 5+1, zahvaljujući interakciji gvožđa iz hema sa do tada nedostupnim aminokiselinskim ostatkom His146 [27, 40-45].

Lekovi koji se vezuju za Sudlovo mesto I (koje obuhvata FA7) povećavaju konstantu disocijacije hem-Fe(III)-HSA kompleksa ($1,3 \cdot 10^{-8}$ M, pH=7, 25°C) za oko jedan red veličine ($1,5 \cdot 10^{-7}$ M, pH=7, 25°C). Isto tako, afinitet liganada za Sudlovo mesto I je smanjen za oko jedan red veličine prilikom vezivanja hem-Fe(III) kompleksa za HSA [46]. Povećanje nivoa hem-Fe(III) kompleksa u plazmi pri patološkim stanjima (hemolitička anemija, postishemijska reperfuzija) može indukovati disocijaciju lekova vezanih za HSA i tako dovesti do intoksifikacije pacijenta. Očekivano, koncentracija hem-Fe(III) kompleksa u plazmi se može povećati nakon uzimanja leka [16, 41].



Slika 10. Geometrija koordinovanog gvožđa iz hema (4+1) sa HSA (PDB kod: 1N5U).

2.1.1.4. Uloge HSA

Iako humani serum albumin čini oko 50-60% mase proteina plazme, odgovoran za oko 80% koloidnog osmotskog pritiska zahvaljujući njegovoj relativno maloj molekulskoj

masi (67 kDa), u poređenju sa prosečnom molekulskom masom globulina plazme (oko 170 kDa). Usled niske vrednosti izoelektrične tačke HSA je negativno naelektrisan na fiziološkom pH. Negativno naelektrisanje HSA takođe ima ulogu u održavanju koloidnog osmotskog pritiska Gibbs-Donanovim efektom [7].

HSA učestvuje u više od 70% ukupne aktivnosti seruma u hvatanju slobodnih radikala [47]. Zahvaljujući redoks osobinama slobodnog Cys34, HSA može uhvatiti mnoge reaktivne kiseonične vrste (eng. reactive oxygen species, ROS) i reaktivne azotne vrste (eng. reactive nitrogen species, RNS) kao što su: H_2O_2 , $ONOO^-$ i $HClO$. Mnoge antioksidativne aktivnosti HSA potiču usled njegove sposobnosti da veže različite ligande. Tako, $Cu(II)$ i $Fe(II)$ joni, koji nakon reakcije sa H_2O_2 generišu ROS, vezivanjem za HSA bivaju “zarobljeni”, što smanjuje sposobnost učestvovanja u Fentonovoj reakciji. Takođe, HSA vezuje $Fe(III)$ i hem- $Fe(III)$, pri čemu ima važnu ulogu u bolestima izazvanim viškom $Fe(III)$ -jona i hem- $Fe(III)$ kompleksa u krvi [48]. Kao jedan od najzastupljenijih proteina krvne plazme, HSA ima funkciju u transportu različitih endogenih i egzogenih molekula kroz krvotok, kao što su masne kiseline, hormoni, holesterol, hemin i bilirubin. Pored toga, ovaj protein transportuje i peptide i proteine (npr. angiotenzinogen, apolipoproteini, klasterin, hemoglobin i transferin) [49].

2.1.2. Protein mleka: α -laktalbumin (ALA)

Kravlje mleko je odličan izvor esencijalnih nutrienata. Proteini kravljeg mleka (3,0-3,5%) se mogu podeliti u 2 glavne frakcije. Kazeinsku, koja sačinjava oko 80%, i proteine surutke, koji čine oko 20% ukupnog sadržaja proteina mleka (**Tabela 1**). Surutka sadrži heterogenu smešu proteina kojima se pripisuju velika nutritivna svojstva, što ih čini funkcionalnom hranom. Nekada su se proteini surutke smatrali otpadom koji nastaje u proizvodnji sira, da bi se kasnije pokazalo da su bogat izvor biološki aktivnih komponenti. Glavni proteini surutke su mali globularni proteini α -laktalbumin (ALA) i β -laktoglobulin (BLG), čine oko 70-80% ukupnih proteina surutke.

Sadržaj proteina se znatno razlikuje u kravljem i humanom mleku. Humano mleko ima znatno niži sadržaj proteina (0,9%), pri čemu proteini surutke čine 60%, a kazeinski proteini 40% ukupnog sadržaja proteina. Pored toga, u humanom mleku BLG nije prisutan, a ALA čini 36% ukupnih proteina surutke (**Tabela 1**) [50, 51].

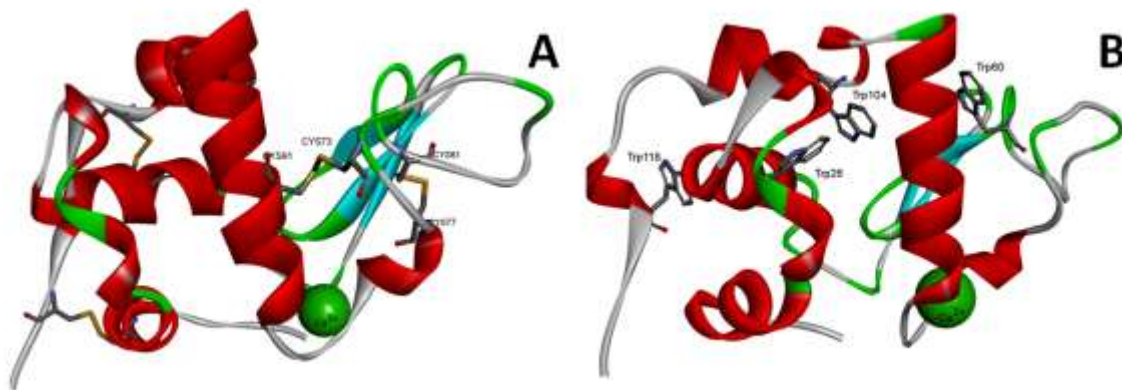
ALA čini oko 20-25 % proteina surutke i oko 3,4 % ukupnih proteina kravljeg mleka, odnosno oko 22% ukupnih proteina humanog mleka. Ovaj protein ima važnu biološku funkciju u sekretornim ćelijama mlečne žlezde, gde kao regulatorna subjedinica laktoza sinteze povećava afinitet i specifičnost galaktozil transferase za glukozu, čime omogućava sintezu laktoze [52]. Zahvaljujući dobroj rastvorljivosti u vodi i veoma niskoj agregaciji prilikom zagrevanja, ALA se u industriji hrane koristi kao suplement u raznim prehrambenim proizvodima i pićima. Pored toga, zbog visokog sadržaja esencijalnih amino kiselina, uključujući triptofan, lizin, cistein i aminokiseline razgranatog lanca (leucin, izoleucin i valin), ovaj protein ima potencijal za komponentu adaptiranog mleka za decu, da se koristi kao suplement koji potpomaže gastrointestinalnu i modulira neurološke funkcije, te da se primenjuje kao terapijski agens [53].

Tabela 1. Koncentracija proteina iz surutke i kazeinske frakcije u govedem i humanom mleku.

<p align="center">GOVEĐE MLEKO</p> <p align="center">Ukupni sadržaj proteina u mleku: 3,3 g/100ml</p>	20% UKUPNIH	PROTEINI SURUTKE	β-laktoglobulin	52%	
			α-laktalbumin	17%	
			imunoglobulini	10%	
			serum albumin	5%	
			laktoferin	1,5%	
			glikomakropeptid	12%	
			drugi	2,5%	
	80% UKUPNIH	KAZEINSI	β-kazein	36%	
			k-kazein	14%	
			α _{s1} -kazein	40%	
			α _{s2} -kazein	10%	
<p align="center">HUMANO MLEKO</p> <p align="center">Ukupni sadržaj proteina u mleku: 0,95 g/100ml</p>	20% UKUPNIH	PROTEINI SURUTKE	β-laktoglobulin	0%	
			α-laktalbumin	36%	
			imunoglobulini	17%	
			serum albumin	6%	
			laktoferin	25%	
			glikomakropeptid	-	
			drugi	10%	
	80% UKUPNIH	KAZEINSI	β-kazein	68%	
			k-kazein	20%	
			α _{s1} -kazein	12%	
			α _{s2} -kazein	0%	

2.1.2.1. Struktura ALA

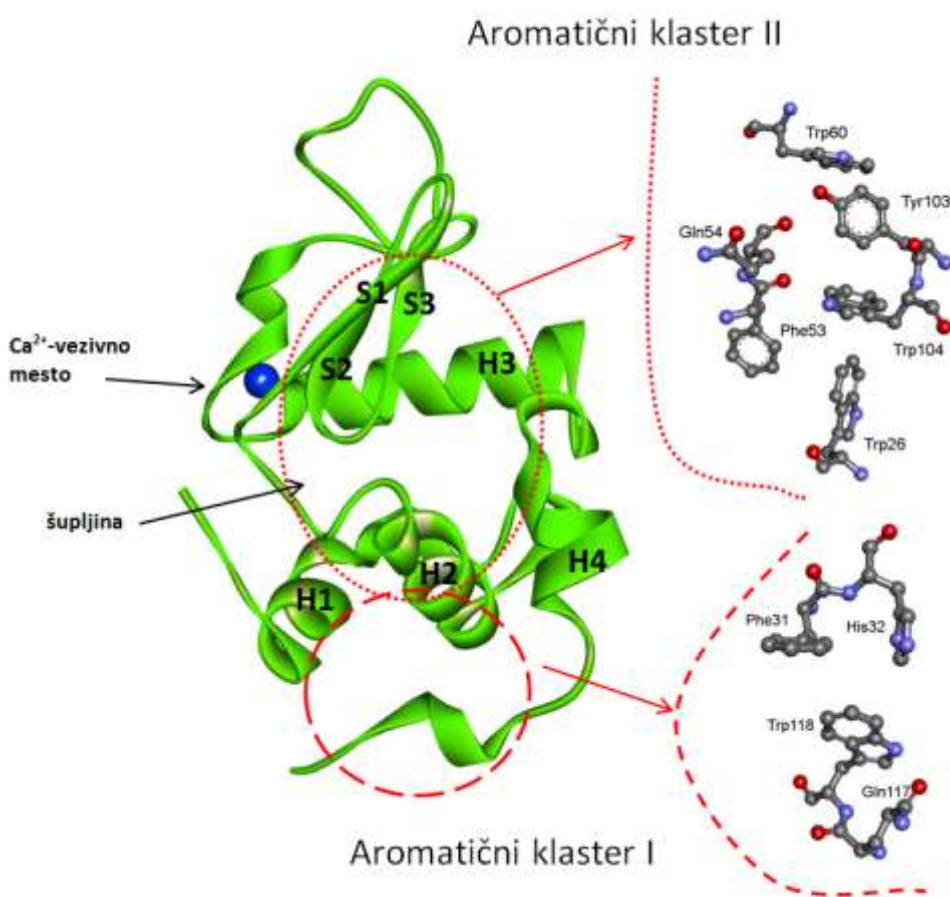
ALA je mali (14,2kD), kiseli (pI 4–5) protein koji je tipičan model protein za ispitivanje stanja stopljene globule (eng. molten globula) [52]. Većina α -laktalbumina se sastoji od 123 aminokiselinska ostatka, sa trodimenzionalnom strukturom veoma sličnoj porodici lizozima [54]. Nativni ALA se sastoji od dva domena: velikog α -helikoidnog domena i malog domena sačinjenog od β -pločica. Ova dva domena podeljena su velikom šupljinom i povezana su petljom za koju se vezuje Ca^{2+} jon. Za formiranje Ca^{2+} -vezivne petlje direktno je zaslužan disulfidni most između Cys73 i Cys91, a potpomognuto je i disulfidnim mostom između Cys61 i Cys77 (**Slika 11A**).



Slika 11. **A** Struktura goveđeg ALA sa naznačenim disulfidnim mostovima 73-91 i 61-77 odgovornim za formiranje Ca^{2+} -vezivne petlje, **B** Struktura goveđeg ALA sa naznačenim triptofanskim ostacima (PDB ID: 1F6S).

Čitavu strukturu ALA stabilizuju ukupno četiri disulfidna mosta između cisteinskih ostataka 6–120, 61–77, 73–91, i 28–111. Veliki α -domen se sastoji iz četiri α -heliksa, od kojih su tri pH-stabilna H1 (5-11), H2 (23-34), H3 (86-98) i jedan pH-zavisan H4 (105-109), kao i tri kratka 3_{10} -heliksa (12-16, 101-104 i 115-119) (**Slika 12**). Fleksibilna petlja 105-110 zauzima helikoidnu konformaciju pri pH vrednosti između 6,5 i 8 [55]. Manji domen, sačinjen uglavnom od β -pločica izgrađen je od segmenata aminokiselinskih

ostataka S1 41-44, S2 47-50, S3 55-56 i kratkog 3_{10} -heliksa (76-82) (**Slika 12**) [56]. Humani ALA sadrži i tri triptofanska ostatka Trp60, Trp104 i Trp118, dok u goveđem ALA postoji i četvrti triptofanski ostatak na položaju 26 (**Slika 11B**). Takođe, utvrđeno je postojanje dva aromatična klastera u strukturi ALA. Aromatični klaster I obuhvata aminokiselinske ostatke Phe31, His32, Gln117 i Trp118, dok je aromatični klaster II definisan aminokiselinskim ostacima Trp26, Phe53, Gln54, Trp60, Tyr103 i Trp104 (**Slika 12**).



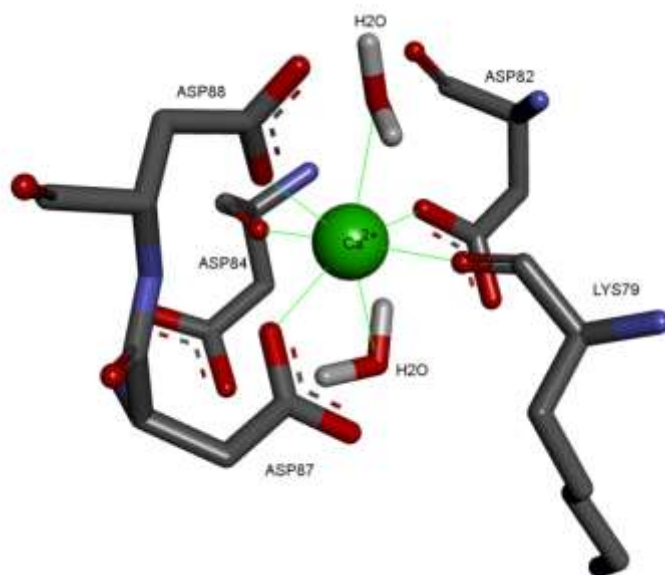
Slika 12. Strukturni prikaz pakovanja aminokiselinskih ostataka koji formiraju aromatični klaster I i II (desno). Obeležena je sekundarna struktura ALA (α -heliksi-H1-H4 i β -pločice-S1-S3), Ca^{2+} -vezivni region i šupljina između α - i β -subdomena (levo).

2.1.2.2. Vezivna mesta ALA

ALA sadrži jedno vezivno mesto visokog afiniteta za svoj prirodni ligand, Ca^{2+} jon (**Slika 11**), za koje se mogu vezati i drugi joni metala poput Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ i K^+ . Takođe, sadrži i nekoliko različitih vezivnih mesta za jon Zn^{2+} , od kojih se jedno nalazi u šupljini između domena [57, 58]. Vezivanje jona za Ca^{2+} vezivno mesto povećava stabilnost proteina, dok vezivanje Zn^{2+} -jona, kada je Ca^{2+} -jon već prisutan, smanjuje stabilnost ALA [52, 57, 59-61].

Zbog posedovanja specifičnog vezivnog mesta za jon Ca^{2+} , ALA se često koristi kao jednostavan model-protein koji vezuje Ca^{2+} -jon [52]. Pogodan je za ispitivanje efekata vezivanja kalcijuma na interakcije sa drugim proteinima, peptidima, membranama, kao i organskim molekulima, koji često imaju fiziološki značaj. Ovo visokoafinitetno vezivno mesto se nalazi na spojnom delu subdomena, pri čemu su za Ca^{2+} -jon koordinovani kiseonikovi atomi karboksilnih grupa Asp82, Asp87, Asp88, karbonilne grupe Lys79, Asp84, kao i dva molekula vode. Sveukupno, kiseonični ligandi formiraju iskrivljenu strukturu pentagonalne bipiramide (**Slika 13**).

Kristalna struktura humanog ALA pokazala je da se jon cinka nalazi u “sendviču” koji formiraju Glu49 i Glu116, pri čemu je to okarakterisano kao najjače vezivno mesto Zn^{2+} jona u humanom ALA [58]. Kasnija istraživanja na mutiranom humanom ALA pokazala su da najjače vezivno mesto Zn^{2+} jona nije u saglasnosti sa onim iz kristalne strukture, i da je zapravo locirano na N-terminalu. Naime, supstitucija Glu1 sa Met rezultirala je nestankom jakog vezivanja Zn^{2+} -jona. Stoga, predloženo najjače vezivno mesto Zn^{2+} -jona uključuje aminokiselinske ostatke Glu 1, Glu 7, Asp 11, i Asp 37, na osnovu njihove blizine mutiranom ostatku Glu1. Pokazano je i da humani ALA, u kome se na mestu Glu1 nalazi Lys1, pokazuje manji afinitet vezivanja za Zn^{2+} -jon u odnosu na goveđi ALA [60].



Slika 13. Mesto vezivanja Ca^{2+} -jona u ALA. Jon Ca^{2+} prikazan je zelenom bojom, dok su aminokiselinski ostaci koji učestvuju u koordinaciji za Ca^{2+} -jon (Lys79, Asp82, Asp84, Asp87 i Asp88) prikazani štapičasto.

2.1.2.3. Konformacione promene ALA

Metodama fluorescencije i cirkularnog dihroizma pokazano je da vezivanje Ca^{2+} -jona za ALA izaziva izražene promene strukture, ali uglavnom tercijarne, a ne sekundarne strukture proteina [59, 62]. Takođe, ispravno uvijanje proteina, kao i sparivanje odgovarajućih disulfidnih mostova zahteva prisustvo Ca^{2+} -jona [63]. Vezivanje kalcijuma za posledicu ima promenu fluorescencije triptofana, pri čemu dolazi do plavog pomeraja emisionog maksimuma i smanjenja fluorescentnog kvantnog prinosa. Pokazano je da do promene fluorescencije, izazvane vezivanjem Ca^{2+} -jona, dolazi usled promena u okruženju svih triptofanskih ostataka [64].

Važno je napomenuti i da ALA poseduje sposobnost da zauzme nekoliko delimično uvijenih prelaznih stanja pri različitim uslovima, te zato privlači veliku pažnju za ispitivanje prelaznih stanja koja su slična stanju stopljene globule [52]. Klasično stanje stopljene globule ALA prilikom denaturacije u kiseljoj sredini (pH=2) opisano je kao

kompaktno stanje sa fluktuirajućom tercijarnom strukturom [52, 65]. Međutim, ALA može zauzeti stanja slična stopljenoj globuli u apo-formi pri povišenim temperaturama, u prisustvu denaturanata, kao i prilikom redukcije disulfidnih mostova [66-69]. Generalno, u konformaciji stopljene globule protein ima narušenu tercijarnu strukturu, dok su sekundarne strukture većinom očuvane [61]. Uklanjanje Ca^{2+} -jona iz proteina povećava njegovu osetljivost na pH i jonsku silu rastvora usled nekompenzovanih negativnih naelektrisanja u vezivnom mestu kalcijuma, što značajno smanjuje sveukupnu stabilnost ALA [70].

2.1.2.4. Antikancerogena i antimikrobna aktivnost ALA: HAMLET/BAMLET kompleksi

Pokazano je da humani ALA u kompleksu sa oleinskom kiselinom može uzrokovati smrt ćelija kancera apoptozom, pri čemu zdrave ćelije u organizmu ostaju očuvane [71-73]. Da bi se formirao ovaj kompleks, nazvan HAMLET (eng. Human Alpha-lactalbumin Made Lethal to Tumor cells), neophodno je da ALA bude u apo-formi. U poređenju sa nativnom, ova konformacija ALA je veoma nestabilna i osetljiva na jonsku silu rastvora [74]. Sa druge strane, usled povećane hidrofobnosti proteina ova konformacija sklonija je vezivanju masnih kiselina, te je stabilizovana vezivanjem specifičnih masnih kiselina [72, 75]. Stoga, da bi doslo do formiranja HAMLET kompleksa, mora prvo doći do delimičnog razvijanja proteina, što je praćeno kompleksiranjem sa oleinskom kiselinom (C18:1:9 cis), pri čemu dolazi do stabilizacije delimično uvijene konformacije ALA [76]. Delimično razvijanje ALA, do kojeg dolazi prilikom uklanjanja Ca^{2+} -jona, rezultuje u destabilizaciji domena sastavljenog od β -pločica, dok α -helikoidni domen ostaje gotovo nepromenjen stvarajući put za vezivanje masnih kiselina i formiranje HAMLET kompleksa [77]. Formiranjem citotoksičnog kompleksa između α -helikoidnog domena ALA i oleinske kiseline pokazano je da je antikancerogena aktivnost kompleksa HAMLET u velikoj meri nezavisna od domena sastavljenog od β -pločica i C-terminusa humanog ALA [78]. Takođe, pokazano je i da rekombinantna varijanta humanog ALA, gde su svi cisteinski ostaci zamenjeni ostacima alanina, ima mogućnost formiranja citotoksičnih analoga kompleksa HAMLET

[79]. Uprkos činjenici da HAMLET kompleks u fiziološkim uslovima ima visok afinitet prema Ca^{2+} -jonu (konstanta vezivanja $5,3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$), mutant ALA, gde je Asp87 zamenjen alaninom koji se ne koordinuje za jon Ca^{2+} , je takođe formirao citotoksični kompleks sa oleinskom kiselinom. Na ovaj način pokazano je da ni funkcionalno Ca^{2+} -vezivno mesto nije neophodno za konverziju ALA u HAMLET kompleks, kao ni da strukturne promene nastale usled vezivanja Ca^{2+} -jona nemaju efekat na citotoksične osobine kompleksa [77, 80]. Interesantno je napomenuti da humani ALA nije jedina varijanta proteina koja može da formira citotoksične komplekse sa oleinskom kiselinom. Pokazano je da goveđi, konjski, kozji, kamilji i svinjski ALA takođe pokazuju sposobnost formiranja kompleksa sa oleinskom kiselinom i aktivnost sličnu kompleksu HAMLET. Poređenje sposobnosti goveđeg (eng. bovine) i humanog ALA da formiraju komplekse sa oleinskom kiselinom pokazalo je da se ova dva proteina ponašaju veoma slično, i da je njihova citotoksična aktivnost uporediva [81]. Aktivni kompleks sa goveđim ALA se u literaturi obeležava kao BAMLET (Bovine Alpha-lactalbumin Made Lethal to Tumor cells).

HAMLET pokazuje i antimikrobnu aktivnost prema *Streptococcus pneumoniae* i *Haemophilus influenzae* [74]. Utvrđeno je da, kod pneumokoka, HAMLET kompleks uzrokuje brzu razgradnju bakterijske membrane, kao posledica ulaska veće količine jona kalcijuma u bakteriju [82].

2.1.2.5. Primena ALA u prehrambenoj industriji

Humano mleko je najbolji izvor hrane za bebe do 6 meseci starosti. U periodu laktacije mlečne žlezde proizvode ALA i β -1,4- galaktozil transferazu (GT-1), koji formiraju enzimski kompleks (laktoza sintaza), koji je katalizator u sintezi laktoze iz glukoze i galaktoze. S obzirom da je formiranje laktoze neophodno za proizvodnju mleka, uloga α -laktalbumina je veoma značajna i u proizvodnji humanog mleka.

U poslednje vreme, često se za ishranu odojčadi kao alternativa koristi adaptirano mleko. Dodavanje specifičnih proteina, kao što je α -laktalbumin koji sadrži esencijalne aminokiseline, adaptiranom mleku može dovesti do poboljšanja imunog odgovora i rasta kao i povećane apsorpcije esencijalnih mikroelemenata kao što su gvožđe i cink, i na taj način pružiti benefite slične majčinom mleku [83].

Osnovni razlog dodavanja ALA adaptiranom mleku je visok sadržaj triptofana, lizina i cisteina [84]. Triptofan, pored toga što je esencijalna aminokiselina, prekursor je neurotransmitera serotonina, koji može regulisati ritam buđenja i spavanja, odgovor na stres i druge fiziološke procese [85].

2.1.2.6. Interakcije ALA sa malim molekulima

Jedna od uloga proteina mleka je transport lekova i bioaktivnih jedinjenja i omogućavanje njihove funkcionalnosti u organizmu. Postoji veliki broj istraživanja u kojima su ispitivane interakcije native, holo-forme ALA sa malim molekulima iz hrane, gde je opisana uloga ALA kao nosača bioaktivnih molekula.

Eksperimentalnim metodama je pokazano da ALA interaguje sa fenolnim jedinjenjima iz hrane. Utvrđeno je da prilikom vezivanja fenolnih kiselina kao što su: hlorogena, kofeinska i ferulinska kiselina dolazi do promene konformacije proteina [86]. Takođe, ALA interaguje sa procijanidinima koji pokazuju srednji i visoki afinitet vezivanja za protein [87]. Prilikom vezivanja genisteina i kempferola za ALA, veći afinitet vezivanja pokazao je kempferol, što se pripisuje većem broju hidroksilnih grupa preko kojih ostvaruje

vodonične veze sa ALA [88]. Konstanta afiniteta vezivanja resveratrola i kurkumina za ALA uporediva je sa konstantom vezivanja jona metala za holoALA, pri čemu kurkumin pokazuje manji afinitet vezivanja, najverovatnije usled znatno veće prostorne strukture ovog molekula [89]. Takođe, vezivanje ekstrakta antocijanina iz grožđa za proteine surutke uglavnom uključuje ALA, za koji se snažno vezuje malvidin-3-glukozid [90]. Glavni ekstrakt zelenog čaja, epigalokatehin-3-galat, se takođe vezuje za ALA i to na dva načina: kovalentno [91] i nekovalentno [92].

2.2. Bioaktivne komponente iz hrane

Poslednjih godina, veliki broj naučnih istraživanja usmeren je ka ispitivanju uticaja hrane na poboljšanje zdravlja [93, 94]. Potrošači su postali zdravstveno osvešćeni, i više nego ikad zainteresovani za funkcionalnu hranu, odnosno hranu koja sadrži jedno ili više bioaktivnih komponenti.

Bioaktivne komponente hrane podrazumevaju neesencijalne biomolekule koji su prisutni u hrani, i koji modulacijom jednog ili više metaboličkih procesa imaju blagotvorne efekte po zdravlje. Pored toga, bioaktivne komponente hrane takođe imaju i pozitivne efekte u prevenciji i tretmanu mnogih hroničnih bolesti, kao i na opšte opšte blagostanje.

2.2.1. Bioaktivne komponente mikroalge Spiruline

Iako se godinama koriste u ishrani, u poslednje vreme se posvećuje velika pažnja algama kao potencijalnoj funkcionalnoj hrani, od kojih su najpoznatije vrste jednoćelijska zelena alga *Chlorella* i filamentozna cijanobakterija *Arthrospira platensis* (Spirulina). Ove alge sadrže i do 70% proteina, kao i sve esencijalne aminokiseline koje ljudi moraju unostiti putem hrane. Od 1970-tih godina Spirulina privlači pažnju istraživača i proizvodnja ove alge se vremenom povećavala, što odražava njene davno uočene izuzetna nutritivna svojstva. Danas se Spirulina naziva i super hranom [95] i pokazano je da ima više bioloških efekata koji su ispitivani u nekim kliničkim istraživanjima raznih bolesti, uključujući HIV, hronični hepatitis C, alergijski rinitis i trovanje toksičnim metalima [96-98].

Sredina pogodna za rast spiruline su alkalna i topla mora i vode. Ima visok sadržaj proteina (do 70%), što je znatno više od ostalih biljnih izvora koji se često koriste u ishrani, kao što su soja (35%), kikiriki (25%) ili žitarice (8-10%). Sastav komercijalnog praha Spiruline je oko 60% proteina, 20% ugljenih hidrata, 5% masti, 10% minerala i 3-6% vlage, što je čini niskomasnim i niskokaloričnim izvorom proteina (**Tabela 2**) [1].

Tabela 2. Rezultati analize sastava Spiruline (% suve materije)

Komponenta	FOI	SAC	IPGSR	BAU
	Francuska	Tajland	Malezija	Bangladeš
Sirovi proteini	65	55-70	61	60
Rastvorni ugljeni hidrati	19		14	
Sirovi lipidi	4	5-7	6	7
Sirova vlakna	3	5-7		
Pepeo	3	3-6	9	11
Vlaga		4-6	4	17
NFE*				

FOI-French Oil Institute, SAC-Siam Algae Co. Ltd, IPGSR-Institute of post-Graduate Studies and Research laboratory, University of Malaya, BAU-Bangladesh Agricultural University.

*NFE-nitrogen-free extract, frakcija koja sadrži šećere i skrob plus male količine drugih materijala.

Takođe, Spirulina je bogata vitaminima, masnim kiselinama, makro- i mikro-elementima (**Tabela 3**) i sadrži veliki broj obojenih komponenti kao što su karotenoidi, hlorofil i fikobiliproteini [99].

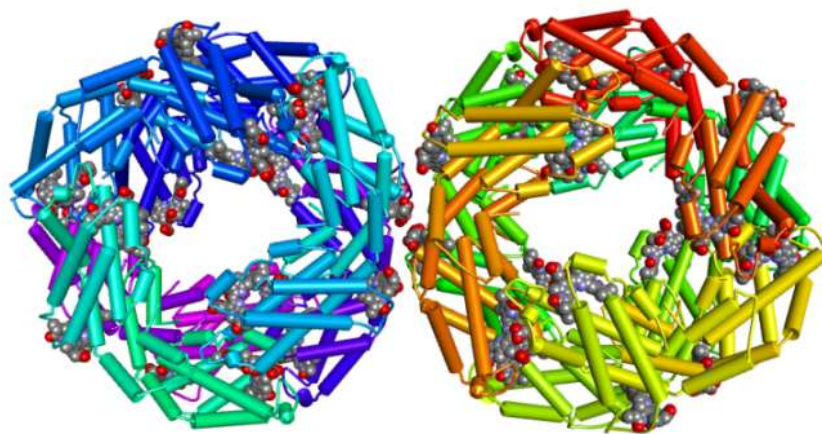
Tabela 3. Nutricioni profil komercijalnog praha spiruline (Nutrex, Havaji, SAD)

Supstanca	Količina/aktivnost po porciji (3g*)
Ukupni ugljeni hidrati	<1g
Proteini	2 g
Vitamin A (β-karoten)	11250 IU
Vitamin K	75 μg
Vitamin B₁₂	9 μg
Gvožđe	7 mg
Magnezijum	15 mg
Mangan	0,4 mg
Hrom	50 μg
Natrijum	35 mg
Kalijum	60 mg
C-fikocijanin	240 mg
GLA	32 mg
Hlorofil a	30 mg
Ukupni karotenoidi	15 mg
Superoksid dizmutaza	2500 U

* Preporučena dnevna doza praha spiruline

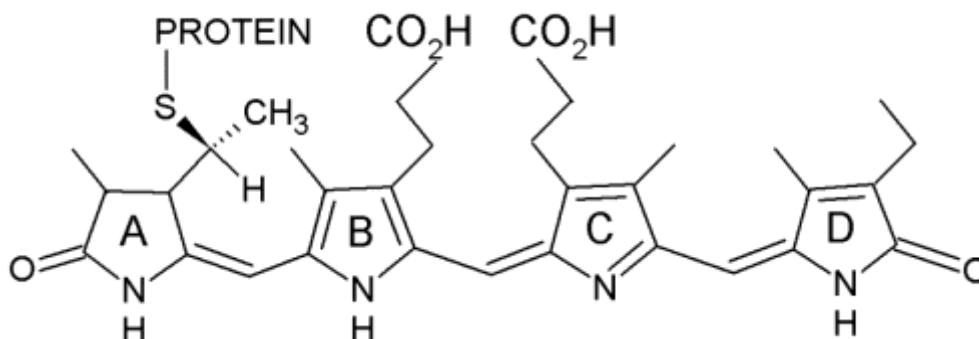
2.2.1.1. Fikobiliproteini

U proteine kojima je Spirulina izuzetno bogata spadaju i fikobiliproteini. Fikobiliproteini su grupa fotosintetičkih pigmenata rastvornih u vodi. U cijanobakteriji mogu sačinjavati i oko 40% ukupnog rastvornog sadržaja proteina. Po strukturi su višelančani holo-proteini sastavljeni od apo-proteina i kovalentno vezanih tetrapirolnih hromofora, fikobilina, zahvaljujući kojima su obojeni [100]. Postoje tri glavne klase fikobiliproteina: zeleno-plavi pigment alofikocijanin (APC), plavo-ljubičasti pigment C-fikocijanin (C-PC) i crveni pigment fikoeritrin (PE). Apsorpcioni maksimumi APC, C-PC i PE su (redom) na 620nm, 650nm i 565nm. Fikobiliproteini su kiseli proteini sa izoelektričnom tačkom na $\text{pH} \approx 4.5$. Organizovani su u supramolekulske strukture koji se nazivaju fikobilizomi i nalaze se zakačeni za tilakoidne membrane cijanobakterija. Monomer C-PC-a formira se od α - i β -lanca ($\alpha\beta$) i u toj formi agregira do trimera ($\alpha_3\beta_3$) u obliku diska ili do heksamera ($\alpha_6\beta_6$) (**Slika 14**) koji su deo fikobilizoma, sakupljača svetlosti u procesu fotosinteze. Molekulska masa α -lanca iznosi oko 16-17 kDa, a β -lanca 18-19 kDa i oni međusobno nisu povezani disulfidnim mostovima. Ova dva lanca su homologna (oko 25-30%) sa konzerviranim aminokiselinskim ostacima koji se nalaze u blizini cisteina za koji je vezana hromofora.



Slika 14. Heksamer fikobilizoma sa vezanom hromoforom fikocijanobilinom. Kristalna struktura PDB kod: 1GH0.

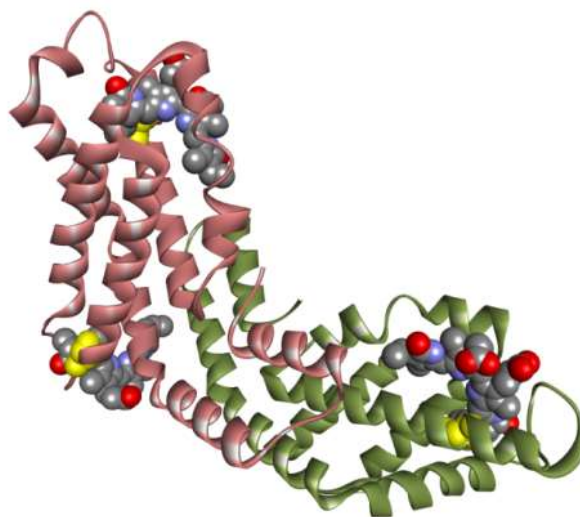
Fikobilini su pronađeni kod bakterija, vaskularnih biljaka i životinja. Kod kičmenjaka (bilirubin i biliverdin IX α) se nalaze u žuči i nastaju kao proizvodi metabolizma hema. Strukturno, to su neciklični tetrapirolni molekuli sa 4 pirolna prstena povezana α , β i γ ugljeničnim mostovima. Prstenovi su obeleženi slovima A, B, C i D, gde je A prsten pripisan jednom od spoljašnjih prstenova. Oba spoljašnja prstena (A i D) sadrže atom kiseonika, a za unutrašnje prstenove (B i C) vezane su propionske grupe (**Slika 15**).



Slika 15. Hemijska struktura hromofore fikocijanobilina.

Fikobiliproteini se koriste kao fluorescentni agensi i priznati su kao farmakološki i analitički važne supstance. Takođe, kako su netoksični i nekancerogeni, koriste se i kao prirodne boje za hranu i kozmetiku [101, 102].

C-PC je glavna komponenta odgovorna za snažnu antioksidativnu i antiinflamatornu aktivnost Spiruline [103-105]. Za C-PC, kovalentnim, tioetarskim vezama, sa cisteinskim ostacima vezana je tetrapirolna hromofora, fikocijanobilin (PCB) (**Slika 16**) [106]. PCB je preko Cys84 vezan za α -lanac, dok su za β -lanac vezana dva molekula PCB-a preko Cys82 i Cys153 (**Slika 16**) [107].



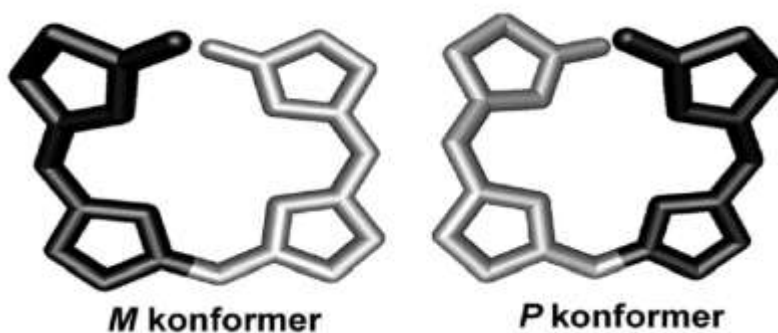
Slika 16. Strukturni prikaz fikocijanobilina vezanog za C-fikocijanin (α -lanac zelena, β -lanac crvena), PDB kod: 1GH0.

2.2.1.1.1. Fikocijanobilin-strukturni analog bilirubina

Prema hemijskoj strukturi, hromofore fikobiliproteina su slične pigmentima žuči (bilinima), kao što je bilirubin, te su stoga nazvani fikobilini. S obzirom na veliku hemijsku sličnost između bilirubina i fikobilina, očekuje se da i fikobilini pokazuju antioksidativne sposobnosti poput bilirubina i biliverdina.

Nativni bilirubin, može postojati u nekoliko izomernih oblika [108]. Glavni izomer, nekonjugovani bilirubin 4Z,15Z-IX α , formira intramolekulske vodonične veze između dipirolnih prstenova, te je u takvoj, rigidnoj formi slabo rastvoran u vodi na neutralnom pH, usled čega može formirati agregate [109, 110]. Nativna, hidrofobna forma nekonjugovanog bilirubina može lako da prodre kroz fosfolipidne dvosloje biomembrana, uključujući i krvno-moždanu barijeru, kao i neuronske ćelijske membrane, te se za ovu formu smatra da je neurotoksična [111]. Srećom, nativni bilirubin, koji u telu nastaje u procesu degradacije hemoglobina, u krvi je uglavnom vezan za albumin, koji ga sprečava da prodre kroz krvno-moždanu barijeru. Albumin zapravo služi kao sredstvo za transport bilirubina do jetre, gde bilirubin disosuje i konjugacijom prelazi u u hidrofilniji glukuronid.

Nativni bilirubin ima dva enantiomerna konformera, *M* i *P* (**Slika 17**), koji mogu prelaziti iz jednog oblika u drugi [112]. Bilirubin pokazuje afinitet za više vezivnih mesta u HSA, pri čemu je jedno visokoafinitetno (sa konstantom vezivanja od 10^7 - 10^8 M⁻¹) [113]. Lokalizacija ovog visokoafinitetnog mesta nije usaglašena, ali se smatra da se bilirubin vezuje ili za subdomen IB, blizu vezivnog mesta hema, ili za subdomen IIA, odnosno Sudlovo mesto I. Naime, studije cirkularnog dihroizma [31] pokazale su da bilirubin 4Z,15Z-IX α pri vezivanju za HSA zauzima *P* formu [114], dok se prema kristalografskim podacima, fotoizomer bilirubina 4Z,15E-IX α vezuje za subdomen IB u *M* formi [31]. Ipak, na osnovu većeg broja rezultata studija, mesto IIA je favorizovano u odnosu na mesto IB.

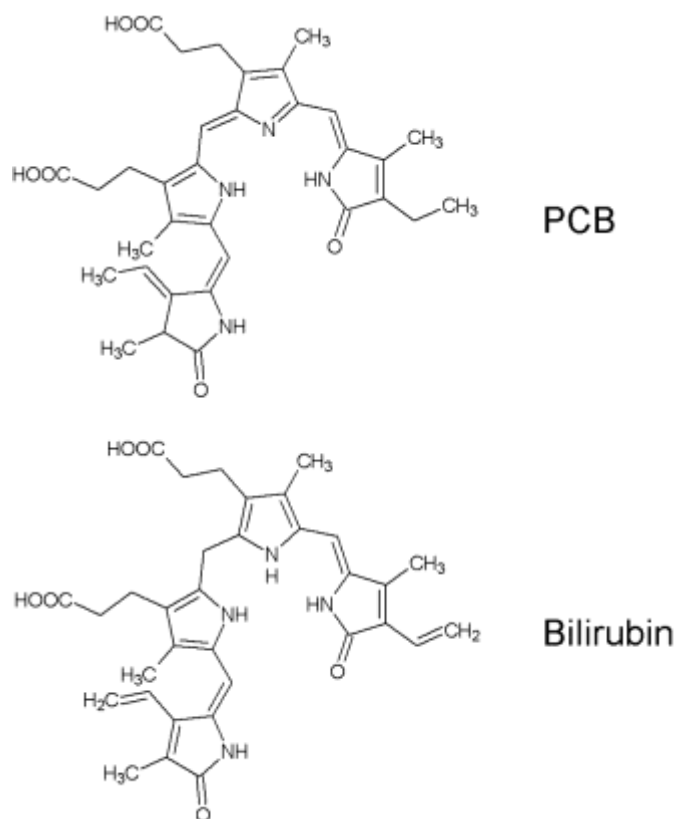


Slika 17. Šematski prikaz *M* i *P* konformacija bilirubina. Crnom bojom je označen deo molekula koji je iznad ravni papira.

Uprkos neurotoksičnosti bilirubina, potrebno je istaći da je ovaj molekul i moćan antioksidans. Nažalost, ne postoje prirodni izvori bogati ovim jedinjenjima. Sa druge strane, PCB, koji je derivat biliverdina konvertuje se *in vivo* u fikocijanorubin, strukturni analog bilirubina (**Slika 18**). Slično bilirubinu, PCB unet oralnim putem učestvuje u inhibiciji nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze koja je povezana sa određenim bolestima [115-117]. Stoga, suplementi PCB-a imaju veliki potencijal u zdravstvenoj zaštiti.

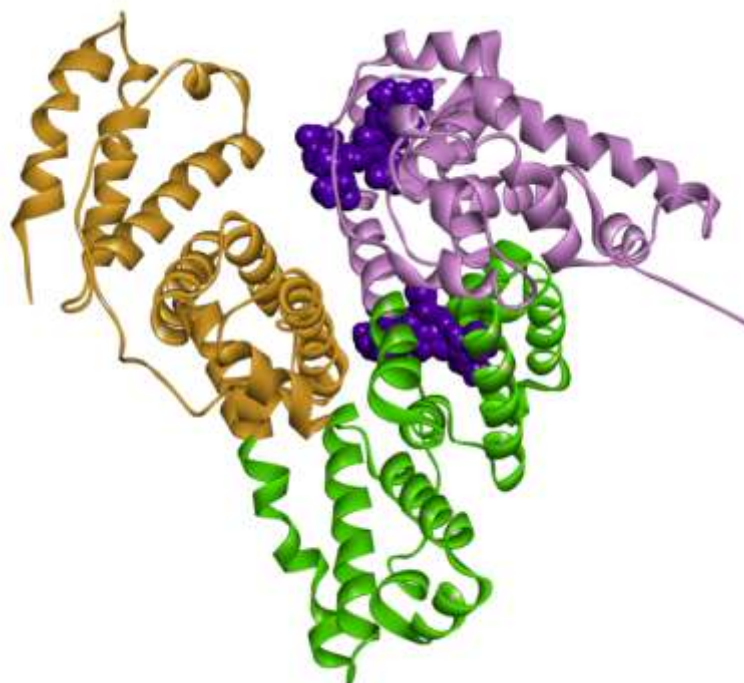
PCB je “hvatač” mnogih slobodnih radikala kao što su ONOO, HClO, \cdot OH i ROO \cdot [104, 118, 119], što ga čini odgovornim i za antioksidativnu aktivnost C-PC-a, a time i

Spiruline. Zapravo, najznačajnija bioaktivnost C-PC-a je antioksidativna funkcija, pored koje, pokazuje i antiinflamatornu, imunomodulatornu, antikancerogenu i antihipertenzivnu aktivnost [116, 120-125].



Slika 18. Hemijska struktura fikocijanobilina i bilirubina.

Pokazano je da PCB pokazuje visok afinitet vezivanja za HSA [126]. PCB se vezuje za HSA na dva vezivna mesta (u subdomenu IB i IIA) analogno bilirubinu, što omogućava njegovu distribuciju *in vivo*, i na taj način doprinosi razumevanju njegovih brojnih korisnih efekata (**Slika 19**) [126]. Kvantno-hemiskim proračunima pronađeno je da je najstabilnija forma fikocijanobilina u vodenim rastvorima monoanjonska. Nešto više vrednosti vezivnih energija pronađene su prilikom vezivanja bilirubina za serum albumin (**Tabela 4**), pri čemu su kod PCB-a favorizovanije anjonske forme (**Slika 20**) [126].



Slika 19. Molekulsko modelovanje vezivanja PCB-a za HSA. Domeni HSA su obojeni na sledeći način: domen I svetlo ljubičasto , domen II zeleno, domen III narandžasto. Strukturni modeli prikazuju dva moguća vezivna mesta monoanjonske forme fikocijanobilina (tamno ljubičasto) u HSA (PDB kod: 1BM0).



Slika 20. Konformacije neutralne, monoanjonske i dianjonske forme PCB-a

Tabela 4. Najbolji afiniteti vezivanja liganada (PCB i bilirubin) za HSA (kcal mol^{-1}).

Subdomen	PCB			BILIRUBINSKA		
	FORMA			FORMA		
	neutralna	monoanjonska	dianjonska	neutralna	monoanjonska	dianjonska
IB	10,8	10,9	11,3	11,1	11,1	11,3
IIA	10,7	10,8	11,1	11,0	11,1	11,2

Teorijskim ispitivanjem uticaja ostalih liganada na vezivanje fikocijanobilina za HSA, u našem radu pokazano je da je prilikom vezivanja drugih liganada za mesto IB, kao što su miristinska kiselina, hemin, fusidinska kiselina ili 4Z,15E bilirubin IX α , vezivanje fikocijanobilina onemogućeno [126]. U slučaju vezivanja za mesto IIA različiti ligandi različito utiču na vezivanje fikocijanobilina. U većini slučajeva prisutnost liganada u mestu IIA sprečava vezivanje fikocijanobilina, ali kako je mesto IIA znatno veće od mesta IB prisustvo miristinske kiseline, kao i nekih drugih liganada (azapropazona, indometacina ili lizofosfatidiletanolamina), ipak dozvoljava vezivanje fikocijanobilina za mesto IIA [126].

S obzirom na činjenicu da vezivanje liganada može uticati na promenu konformacije proteina, tako i na HSA [7], simulirano je vezivanje fikocijanobilina za 16 različitih konformacija HSA [126]. Dokazano je da su mesta IB i IIA favorizovana vezivna mesta u svih 16 simulacija, pri čemu se apsolutna vrednost vezivne energije kreće u opsegu 8,4-10,8 kcal/mol za mesto IB i 8,5-10,5 kcal/mol za mesto IIA [126].

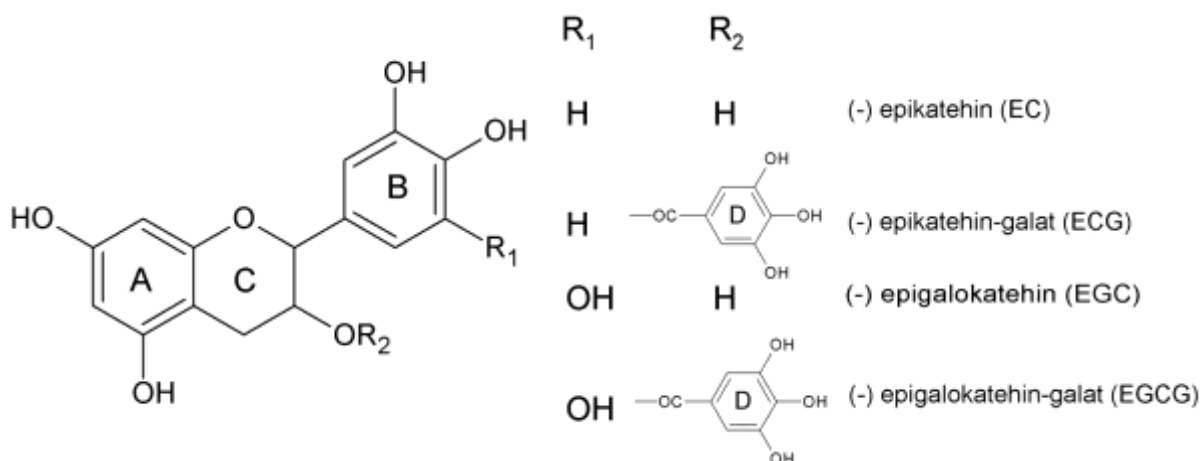
Takođe, urađena je i studija molekuskog dokinga PCB-a u prisustvu masnih kiselina na 6 različitih kristalnih struktura HSA, gde je ustanovljeno da prisustvo miristinske kiseline u mestu FA1 (IB) onemogućava vezivanje PCB-a za isto vezivno mesto, dok je u slučaju prisustva miristinske kiseline u mestu FA7 (IIA) vezivanje PCB-a omogućeno usled veće zapremine ovog vezivnog mesta [126].

2.2.2. Bioaktivne komponente zelenog čaja

Čaj je jedno od najpopularnijih pića širom sveta. Zeleni, crni i oolong čaj se prave od iste biljke, *Camellia sinensis*, pri čemu najveće efekte po ljudsko zdravlje pokazuje zeleni čaj [127, 128]. Da bi se proizveo zeleni čaj, sveže ubrani listovi se odmah zagrevaju na pari i na taj način se sprečava fermentacija. Ovim procesom se inhibiraju enzimi (polifenol oksidaze) odgovorni za formiranje obojenih pigmenata u listovima, što omogućava da čaj zadrži zelenu boju u narednim procesima obrade i sušenja. Na ovaj način po zdravlje bitni prirodni polifenoli ostaju znatno više očuvani u zelenom čaju nego u slučaju crnog i oolong čaja.

Pored polifenola, zeleni čaj sadrži proteine (15-20% suve mase), aminokiseline (1-4%) kao što su 5-N-etilglutamin, Trp, Thr, Ser, Tyr, Lys, Arg, Gly, Val, Leu, Glu i Asp, ugljene hidrate (5-7%) celulozu, pektine, fruktozu, glukozu i saharozu, minerale i elemente u tragovima (5%) u koje spadaju magnezijum, gvožđe, natrijum, kalcijum, bakar, cink, mangan, selen, nikl, fosfor, molibden hrom, kobalt, stroncijum, aluminijum i fluor, kao i vrlo malu količinu masti (linoleinska kiselina), stigmasterol, vitamine B, C i E, kofein, pigmente (hlorofil i karotenoidi) i isparljive komponente (aldehidi, estri, alkoholi, ugljovodonici) [129].

Polifenoli čine i do 30% suve mase zelenog čaja i uključuju četiri grupe jedinjenja: flavanole, flavonoide, flavandiole i fenolne kiseline. Najzastupljeniji polifenoli zelenog čaja su flavonoli, poznati i kao katehini. Četiri vrste katehina pronađene su u zelenom čaju: epikatehin (EC), epigalokatehin (EGC), epikatehin-3-galat (ECG) i epigalokatehin-3-galat (EGCG) (**Slika 21**) [130].



Slika 21. Hemijske strukture glavnih katehina zelenog čaja.

2.2.2.1. Katehini zelenog čaja i njihova struktura

Najzastupljeniji bioaktivni katehini ekstrakta zelenog čaja mogu se prema koncentraciji katehina i galne kiseline poredati na sledeći način: EGC>EGCG>ECG>EC. Iako su EGC i EGCG najzastupljeniji katehini ekstrakta zelenog čaja, postoji nedoumica koji od njih je zastupljeniji. Prema jednim izvorima najzastupljeniji je EGC [13], dok je prema drugim EGCG [131]. Zapravo, Khokhar *i sar.* sugerišu da sadržaj najzastupljenijeg katehina iz zelenog čaja zavisi od podneblja na kome je uzgajan [132]. Tako, u zelenom čaju Jeonča iz Južne Koreje najdominantniji katehin je EGC (213 mg/L), dok je u zelenom čaju iz Šri Lanke najdominantniji EGCG (139 mg/100 mL) [132].

Katehini zelenog čaja sadrže dva aromatična prstena (A i B), kao i heterociklični prsten pirana (C prsten). Sadrže dve ili tri hidroksilne grupe na prstenu B i meta-5,7-dihidroksi grupe na prstenu A. Prsten C poseduje hidroksilnu grupu na položaju 3 koja može biti supstituisana galnom kiselinom, čime se u strukturu katehina uvodi i treći aromatični prsten D. Funkcionalne i strukturne razlike katehina zelenog čaja potiču od razlike u supstituciji B prstena hidroksilnim grupama, kao i od prisustva D prstena (**Slika 21**) [133, 134].

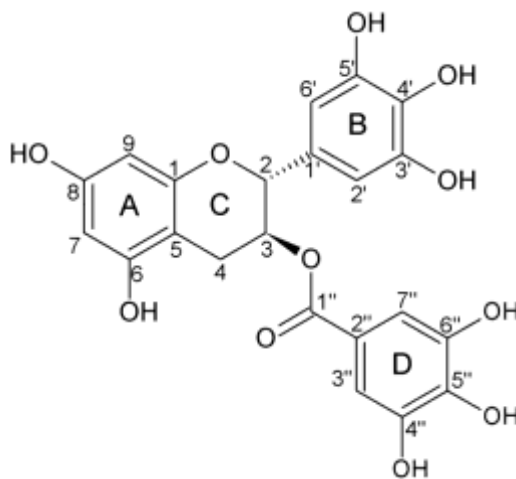
2.2.2.1.1. EGCG

EGCG je najzastupljenija i najaktivnija bioaktivna komponenta zelenog čaja, Veliki broj studija je pokazao da ovaj molekul ima značajne antioksidantne, antikancerogene, antimikrobne, antiinflamatorne i neuroprotektivne efekte, kao i da ima veliki potencijal u terapiji brojnih oboljenja, kao što su kancer, bolesti srca, diabetes i neurodegenerativne bolesti [135, 136].

2.2.2.1.1.1. EGCG i antioksidativna aktivnost

Glavna biološka aktivnost flavonoida je antioksidativno delovanje. Pokazano je da je ova aktivnost povezana sa strukturom flavonoida, te da su sledeći kriterijumi neophodni kako bi se ispoljila: prisustvo orto-hidroksilne grupe na B prstenu, prisustvo barem jedne slobodne hidroksilne grupe, dvostruke veze na položaju C2-C3 ili prisustvo 3-hidroksi grupe na C prstenu [137, 138].

Struktura katehina obezbeđuje jaku antioksidativnu aktivnost koja je dodatno povećana prisustvom tri hidroksilne grupe koje se nalaze na aromatičnom prstenu D (galat) kod katehina EGCG i ECG [139]. EGCG, sa ukupno 8 hidroksilnih grupa (pet na katehinskim položajima 6, 7, 3', 4' i 5' i tri na galatnom prstenu) (**Slika 22**) je bolji donor elektrona od ostalih katehina i stoga i najbolji sakupljač slobodnih radikala.



Slika 22. Struktura EGCG-a sa numerisanim C-atomima.

Poznato je da ekstrakti čaja reaguju sa reaktivnim kiseoničnim vrstama kao što su hidroksi, peroksi i superoksid radikal, singletni kiseonik, NO, NO₂ i ONOO⁻, pri čemu EGCG pokazuje najveću reaktivnost [140]. Pokazano je i da je B prsten katehina glavno mesto antioksidativnih reakcija [141]. Usled delokalizacije elektrona u strukturi polifenola omogućeno je gašenje (eng. quenching) slobodnih radikala, pri čemu nastaje nekoliko oksidacionih proizvoda [33]. U reakciji EGCG-a sa peroksi radikalima nastaju jedinjenja slična antocijaninu [142], dolazi do formiranja anhidridnih dimera sedmočlanog B prstena, kao i do nastajanja jedinjenja sa otvorenim prstenovima [141]. Elektronskom paramagnetnom rezonancijom pokazano je da EGCG reaguje sa O₂⁻, pri čemu dolazi do oksidacije D prstena [143]. Takođe, pokazano je da svi polifenoli zelenog čaja podležu auto-oksidaciji na pH=13, što dovodi do oksidacije B prstena [143]. Slične reakcije su primećene i na fiziološkom pH=7,4 [144]. U reakciji EGCG-a sa H₂O₂ prsten A se oksiduje i formira dva oksidaciona proizvoda EGCG-a [145]. Kako se na ovaj način stvara hidroksi-radikal u prisustvu gvožđa i bakra (Fentonova reakcija) EGCG-u se može pripisati i pro-oksidativni efekat. Prstenovi B i D EGCG-a mogu biti oksidovani i u prisustvu O₂⁻. Glavno oksidaciono mesto tokom auto-oksidacije EGCG-a je B prsten, ali preferirano mesto praćeno strukturnom degradacijom je D prsten. Auto-oksidacija EGCG-a vodi formiranju reaktivnih kiseoničnih vrsta kao što su EGCG hinoni i slične komponente koje su uključene u razne biološke aktivnosti [33, 144].

Drugi mehanizam za efektivnu antioksidativnu aktivnost EGCG-a ispoljava se prilikom heliranja jona metala. Problemi koji nastaju u homeostazi metala mogu dovesti do oksidativnog stresa koji se pojavljuje kod hroničnih bolesti poput dijabetesa, ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti [146]. Pokazano je da EGCG heliranjem može inhibirati formiranje slobodnih radikala katalizovano prelaznim metalima, uključujući gvožđe i bakar [147]. Za ovu aktivnost odgovorne su dve hidroksilne grupe B prstena na položajima 3' i 4', preko kojih se EGCG koordinuje za prelazne metale i neutrališe njihovu aktivnost [148].

2.2.2.1.1.2. EGCG i antikancerogena aktivnost

Zahvaljujući antioksidativnoj aktivnosti EGCG je intenzivno proučavan u lečenju raznih tipova karcinoma [149-151]. Pokazano je da EGCG ne pokazuje neželjene efekte protiv zdravih ćelija i tkiva, a istovremeno ima anti-proliferativne, anti-invazivne i hemoprotektivne efekte protiv raznih ćelija raka [152, 153]. Postoji nekoliko mehanizama putem kojih EGCG i ekstrakti zelenog čaja ispoljavaju svoju antikancerogenu aktivnost, kao što su stimulacija anti-oksidacione aktivnosti i aktivacija sistema za detoksikaciju, izmene ćelijskog ciklusa, supresija puteva mitogen-aktivirane protein kinaze (MAPK) i receptor protein kinaze (RTK) i stvaranje epigenetskih promena u ekspresiji [133, 154-156]. Ovi mehanizmi anti-kancerogenog delovanja EGCG-a još uvek nisu u potpunosti objašnjeni. Smatra se da katehini zelenog čaja funkcionišu na oba načina: kao moćni hvatači slobodnih radikala, naročito u uslovima povećanog oksidativnog stresa, i kao generatori reaktivnih kiseoničnih vrsta što dovodi do inhibicije ćelija raka mehanizmom apoptoze [133, 157]. Takođe, kod nekoliko tipova kancerogenih ćelija pokazano je da EGCG deluje sinergički sa drugim prirodnim (npr. kurkumin, askorbinska kiselina, kvercetin), kao i hemoterapeutskim supstancama (npr. doksorubicin, cisplatina) [158, 159].

2.2.2.1.1.3. Pristupi za poboljšanje biodostupnosti EGCG-a

Uprkos značajnim pozitivnim efektima po zdravlje, EGCG pokazuje slabu biodostupnost, uglavnom zbog loše rastvorljivosti u gastrointestinalnoj tečnosti, slabe i spore apsorpcije, brzog metabolizma i eliminacije iz organizma [160]. Predkliničke farmakokinetičke studije na pacovima pokazale su da EGCG ima slabu oralnu biodostupnost od svega 2-13% [161]. Neusklađenost između snažne biološke aktivnosti katehina *in vitro* i male apsorpcije *in vivo* može se pripisati njihovoj niskoj stabilnosti, usled čega dolazi do formiranja degradacionih proizvoda i pro-oksidativnih molekula [162]. Potrebne su visoke koncentracije EGCG-a kako bi uticao na ćelijske procese povezane sa bolestima [163, 164]. Veruje se da 8-16 šolja zelenog čaja dnevno može ublažiti slabu biodostupnost EGCG-a [165].

Iako je EGCG biološki najaktivnija komponenta zelenog čaja, zbog slabe stabilnosti u vodenim rastvorima, kao i slabe rastvorljivosti u mastima i uljima njegova upotreba kao dodatka u proizvodima hrane je ograničena [166, 167]. U cilju poboljšanja lipofilnosti, struktura EGCG je modifikovana [168] i razvijeno je nekoliko sistema koji štite EGCG od degradacije [159, 166, 169, 170]. Do sada, acilovanje se pokazalo kao najpraktičniji način modifikacije EGCG-a. Naime, većina alifatičnih acil-derivata od acetila, pa do masnih kiselina dugog lanca, mogu se koristiti u ishrani, a EGCG derivati dobijeni na ovaj način ne pokazuju toksičnost [167]. Stoga, acil-derivati EGCG-a (AcEGCG) pokazuju bolju oksidativnu stabilnost od samog EGCG-a [167, 171, 172].

Još jedan način za transportovanje EGCG-a kroz organizam, kako bi se postigao terapijski efekat, jesu nano-strukture. Mnoge studije su pokazale da nano-nosači koji sadrže EGCG imaju produženo oslobađanje i poboljšanu biodostupnost čak i pri znatno manjim dozama od konvencionalnih preparata. Materijali koji se koriste za enkapsuliranje bioaktivnih molekula mogu biti lipidi, proteini i ugljeni hidrati [173-175], i mogu se koristiti kao nosioci katehina, uključujući i EGCG, pri čemu se poboljšava njihova biodostupnost poboljšanjem rastvorljivosti i sprečavanjem razgradnje u intestinalnom traktu, što dovodi do povećanja koncentracije EGCG-a u krvotoku [176]. Za enkapsuliranje mnogih polifenola koriste se i proteini kao što su natrijum-kazeinat, želatin, surutka i proteini kukuruza. Proteinska enkapsulacija obično počinje emulgiranjem, pri čemu su proteini mleka (kazeini i surutka) efikasni materijali za enkapsuliranje, odlični nosioci molekula katehina, i obično se koriste u kombinaciji sa polisaharidima i lipidima. Natrijum-kazeinat (0,5%) i sojino ulje (10%) se koriste za formiranje emulzije veličine od 230 do 250 nm sa EGCG-om u koncentracijama do 6 mg/ml. Natrijum-kazeinat adsorbovan na dodirnoj površini ulje-voda može vezati visoke koncentracije EGCG-a [177]. Usled prisustva velikog broja hidroksilnih grupa EGCG pokazuje visoku afinitet vezivanja za protein. Iako prilikom njegovog vezivanja dolazi do narušavanja strukture proteina i delimično se smanjuje njegova antioksidativna aktivnost, protein štiti EGCG od degradacije [178, 179]. Kazeinske micelle mogu da se koriste kao zaštitni nosači za EGCG u hrani. Pokazano je da se enkapsulacijom EGCG-a u kazeinske micelle ne umanjuje njegova

antiproliferativna aktivnost na ćelije raka debelog creva u poređenju sa slobodnom formom EGCG-a [180]. Shodno tome, kazeinska micela se smatra idealnom platformom za isporuku katehina, pri čemu vezivanje EGCG-a za kazein ne utiče na njegovu biodostupnost. Pored mleka, i za druge proteine kao što su proteini soje, proteini zaštitnog omotača pirinča i kukuruzni proteini, potvrđeno je da utiču na poboljšanje stabilnosti, biodostupnosti i propustljivosti katehina, kao i da se mogu upotrebiti kao pogodni nosači [169, 181, 182].

2.2.2.1.1.4. Interakcije EGCG-a i makromolekula

Interakcije koje EGCG ostvaruje sa proteinima i enzimima su uglavnom nekovalentnog tipa. Pokazano je da EGCG interaguje sa albuminima, kao što je HSA gde se vezuje za Sudlovo mesto I i II [183], kao i za ALA koji takođe može služiti kao transporter EGCG-a u organizmu [92]. Pokazano je da i albumini koji pripadaju alergenima vezuju EGCG. Tako, ovalbumin, glavni alergen belanceta, vezuje EGCG na mestu koje se delimično poklapa sa IgE vezivnim regionom ovalbumina i može uticati na imuni odgovor [184]. Iz grupe 2S albumna EGCG pokazuje visok afinitet vezivanja za alergen kikirikija, Ara h 2, koje se poklapa sa predloženim vezivnim mestom u Ara h 6 [185]. Pored ALA, EGCG pokazuje afinitet za vezivanje i drugih proteina mleka, kao što su β -laktoglobulin (BLG), α -kazein i β -kazein [186].

Pored proteina, EGCG se vezuje i za enzime i interaguje sa antimikrobnim enzimom lizozimom [187], tripsinom i α -himotripsinom, pri čemu ima veći uticaj na promenu konformacije α -himotripsina [188], lipazom, gde je pokazano da EGCG analozi nekompetitivno inhibiraju aktivnost lipaze i ne vezuju se za njeno katalitičko mesto [189], kao i katalazom gde su katehini sa galatnim prstenom (EGCG i ECG) pokazali veće vrednosti konstante vezivanja i efikasniju inhibiciju, pri čemu se EGCG pokazao kao najjači inhibitor katalaze u odnosu na ostale katehine zelenog čaja [190].

2.3. Metode računarske hemije za proučavanje interakcija između biomolekula

Teorijska hemija je disciplina koja koristi kvantnu, klasičnu i statističku mehaniku kako bi objasnila strukture i dinamiku hemijskih sistema. Bazirana je na primeni matematičkih jednačina u cilju opisivanja odnosa hemijske strukture sa energijom, koja u kombinaciji sa statističkom mehanikom može omogućiti da se izračunaju mnoge karakteristike sistema. Računarska hemija primenjuje jednačine i algoritme teorijske hemije u cilju izračunavanja strukture i svojstava molekula.

U svim biološkim sistemima interakcije između biomolekula, kao što su proteini, DNK i ligandi, su od velikog značaja. Ove interakcije uključene su u gotovo sve ćelijske procese i kontrolisane su kompleksnim nizom međumolekulskih interakcija, koje uključuju specifične interakcije u samom vezivnom mestu, ali i nespecifične interakcije u ostatku biomolekula (npr. proteina). Mera kompleksnosti ovih interakcija zavisi od fleksibilnosti vezivnog mesta u proteinu, kao i promene konformacije proteina prilikom vezivanja određenog liganda. Računarska hemija je moćan pristup za predviđanje vezivnih mesta u proteinu, kao i za predviđanje konformacionih promena proteina i liganda nakon formiranja protein-ligand kompleksa. Na ovaj način mogu se dobiti podaci o strukturi molekula, raspodeli naelektrisanja, relativnoj energiji, dipolnom momentu, reaktivnosti, konformacionim promenama, interakcijama između molekula itd.

2.3.1. Molekulski doking

Molekulski doking je računarska metoda koja se koristi za simulaciju vezivanja, odnosno predviđanje konformacije i modelovanje interakcija receptor-ligand kompleksa. Receptor je protein ili nukleinska kiselina (DNK ili RNK), dok ligand može biti mali bioaktivni molekul ili drugi protein. Ovaj pristup se može koristiti za ispitivanje interakcija između liganda i makromolekula na atomskom nivou, koje omogućavaju karakterizaciju ponašanja liganada u vezivnom mestu ciljnih proteina, kao i tumačenje osnovnih

biohemijskih procesa [191]. Takođe, molekularni doking se mnogo primenjuje i u dizajnu lekova.

Procedura molekularnog dokinga se sastoji iz dve međusobno povezane komponente: (I) pronalaženja vezivnog mesta u proteinu i seta mogućih poza i konformacija liganda u predloženom vezivnom mestu i (II) proceni afiniteta vezivanja. Ukoliko je poznato vezivno mesto za neki ligand u proteinu može se značajno povećati efikasnost molekularnog dokinga. Postoje dva načina izvođenja molekularnog dokinga. Prvi, u kome su strukture proteina i liganda rigidne, najčešće se koristi za brza ispitivanja smeštanjem već definisanih konformacija liganada u aktivno mesto makromolekula. Drugi način modelovanja može se podeliti u dve grupe: fleksibilan ligand-rigidan makromolekul i fleksibilan ligand-fleksibilan makromolekul, kod koga su obe strukture (i atomi liganda i atomi pretpostavljenog vezivnog mesta makromolekula) fleksibilne. Modelovanje poznato kao fleksibilni doking koristi fleksibilnu strukturu liganda i rigidnu strukturu receptora. Molekularni doking sa fleksibilnim ligandom-fleksibilnim makromolekulom je poznat i pod nazivom indukovano uklapanje (eng. induced fit) i svakako daje najbolje rezultate, ali je i vremenski zahtevniji. Ukoliko nakon molekularnog dokinga sledi molekularna dinamička simulacija, što je neretko slučaj, fleksibilna doking metoda za pronalaženja vezivnog mesta je i više nego zadovoljavajuća.

2.3.1.1. Pronalaženje vezivnog mesta u proteinu metodom molekularnog dokinga

Upotreba računarske hemije za detektovanje vezivnih mesta određenog proteina omogućava otkrivanje njegove aktivnosti i funkcije, kao i uloge pojedinačnih aminokiselinskih ostataka u ovim procesima. Poznavanje oblika, polarnosti i ključnih aminokiselinskih ostataka u vezivnom mestu u značajnoj meri olakšava postupak dizajniranja lekova, odnosno liganada koji će se sa odgovarajućim afinitetom vezati za to mesto [192].

Postoji više načina za pronalaženje vezivnog mesta u proteinu. Proteinska banka podataka (PDB) skladišti sve rešene kristalografske i strukture dobijene NMR studijama. Strukture proteina koje se nalaze u ovoj banci mogu biti slobodne ili za njih može biti vezan odgovarajući ligand. Ukoliko je struktura proteina rešena sa ligandom, vezivno mesto proteina je poznato, te se studijom molekuskog dokinga može ispitivati vezivanje drugih liganada za isto vezivno mesto. Međutim, kod proteina kod kojih vezivno mesto za dati ligand nije poznato, potrebno je prvo pronaći moguća mesta vezivanja, a nakon toga odrediti konformacije liganda i afinitete vezivanja za sva potencijalna vezivna mesta. U takvim situacijama pribegava se tzv. slepom dokingu gde se detaljno ispituje čitava zapremina proteina u cilju pronalaženja svih mogućih vezivnih mesta za ligand od interesa. Najkompleksiniji slučaj je kada se struktura proteina ne nalazi u PDB. Tada se prvo predviđa terciarna struktura proteina na osnovu sekvence, korišćenjem metoda računarske hemije, od kojih su najvažnije homologno modelovanje [193] i *ab-initio* modelovanje [194]. Na tako modelovanu terciarnu strukturu proteina se primenjuje metoda slepog dokinga za pronalaženje potencijalnih vezivnih mesta liganada.

Razvijen je veliki broj programa za molekulski doking koji koriste različite algoritme, parametre i jednačine za određivanje afiniteta vezivanja [195-197]. Neki od programa su komercijalni, na primer Glide, GOLD i MOE Dock [198-200], dok su drugi akademski, poput AutoDock, AutoDock Vina i rDock [201-203].

2.3.1.1.1. Algoritmi uzorkovanja molekuskog dokinga

Simulacija molekuskog dokinga uključuje dve komponente: postupak efikasnog pretraživanja (algoritam uzorkovanja) i dobru matematičku funkciju koja se koristi za približno predviđanje afiniteta vezivanja dva molekula nakon molekuskog dokinga (eng. scoring function, SF). Dva kritična elementa u postupku pretraživanja su brzina i efektivnost pokrivanja konformacionog prostora od interesa. Kao što je već rečeno, simulacija molekuskog dokinga se najčešće izvodi na dva načina: rigidni i fleksibilni. Rigidni molekulski doking koristi algoritam prepoznavanja oblika, dok se algoritmi

uzorkovanja koji se koriste u fleksibilnom molekulskom dokingu mogu se podeliti u tri grupe: sistemske, stokastičke i determinističke pretrage [204].

2.3.1.1.1.1. Algoritam prepoznavanja oblika

Algoritam prepoznavanja oblika se bazira na komplementarnosti molekulskih površina liganda i proteina (sistem ključ-brava), i to je najstariji korišćen algoritam. Prednost ovog algoritma je brzina proračuna, ali je mana činjenica da rigidnost liganda ne dozvoljava istraživanje različitih konformacija tokom same simulacije. Danas se ovi algoritmi u protein-ligand sistemima gotovo i ne koriste.

2.3.1.1.1.2. Sistemska pretraga

Druga grupa algoritama, koja koristi sistemsku pretragu, primenjuje se u fleksibilnoj doking metodi, pri čemu se generišu sve moguće konformacije (poze) koje ligand može zauzeti u ispitivanom vezivnom mestu proteina. Postoje tri tipa ovog algoritma: iscrpna pretraga, fragmentacija i konformacioni ansambl.

Najjednostavniji algoritam sistemske pretrage jeste algoritam iscrpne pretrage. Ova metoda sa fleksibilnim ligandom izvodi se tako da se sistematski rotiraju sve rotabilne veze liganda u datim intervalima. Od broja rotabilnih veza zavisi i broj kombinacija, te se često, kako bi se doking učinio jednostavnijim, primenjuju geometrijska i hemijska ograničenja pri početnom razmatranju mogućih konformacija liganda. Konformacije liganda dobijene na ovaj način se potom podvrgavaju preciznijim metodama filtriranja i optimizacije.

Kod algoritma fragmentacije, ligand se najpre podeli u nekoliko rigidnih grupa (fragmenata) gde se bazni fragment smešta u vezivno mesto, ili se uklapaju svi fragmenti u vezivno mesto, a potom se pojedinačni fragmenti povežu kovalentnim vezama. Ukoliko se prvo smešta bazni fragment, ligand se konstruiše kovalentnim vezivanjem ostalih fragmenata za ovaj fragment. Ovaj pristup se često koristi za *de novo* dizajn liganda u cilju konstruisanja novih liganada koji pokazuju visok afinitet za vezivno mesto receptora [205].

Kod algoritma konformacionog ansambla, prvo se generišu sve moguće konformacije liganda, a zatim se rigidnom doking metodom svaka od tih konformacija smešta u vezivno mesto i izračunava se afinitet vezivanja. Potom se rezultati dobijeni iz pojedinačnih proračuna za svaku konformaciju prikupljaju i rangiraju prema izračunatim afinitetima vezivanja.

2.3.1.1.1.3. Stohastički algoritmi

Kod stohastičkog algoritma orijentacije i konformacije liganda su odabrane nasumičnim promenama liganda u svakom koraku, i uključuju promenu svih stepeni slobode liganda (konformacioni prostor i translacioni/rotacioni prostor). Nasumične promene će biti ili prihvaćene, ili odbačene, kriterijumom verovatnoće. Glavna mana ovih algoritama je neophodnost mnogobrojnih nezavisnih proračuna kako bi se uvećala verovatnoća pronalaženja energetskog globalnog minimuma, pri čemu dostizanje optimalnog rešenja nije zagantovano. Postoje četiri tipa stohastičkog algoritma: Monte Karlo metode, evolucionarni algoritmi, metode Tabu pretrage i metode optimizacije grupe [206].

Monte Karlo (MC) metodama prave se nasumične promene po svim stepenima slobode liganda i minimizacija energije se izvodi za svaku generisanu konformaciju. Potom, koristi se Bolcmanova funkcija verovatnoće za prihvatanje ili odbacivanje nađene konformacije, a koja se izračunava prema sledećoj formuli:

$$P \sim \exp \left[\frac{-(E_1 - E_0)}{k_B T} \right] \quad (1)$$

gde su E_0 i E_1 energije liganda pre i nakon nasumične promene, k_B je Bolcmanova konstanta, a T apsolutna temperatura sistema. Ukoliko je verovatnoća (P) veća od neke unapred zadate vrednosti, konformacija se zadržava i uključuje u rangiranje prema afinitetu vezivanja.

Važna varijacija ove metode je pronalaženje konformacija pri stalnoj promeni temperature (eng. Simulated Annealing, SA), gde se usled temperaturnih promena povećava verovatnoća pronalaženja globalnog minimuma, zbog mogućnosti prevazilaženja nekih energetskih barijera na višim temperaturama [207].

Evolucionarni algoritmi (EA) su metode optimizacije koje se zasnivaju na imitiranju evolucije bioloških populacija, u smislu mutacije i prirodne selekcije, kako bi se dobilo optimalno rešenje datog problema [208]. Mogu se podeliti u tri klase: genetski algoritmi, evolucionarno programiranje i evolucionarne strategije. Glavne prednosti ovih metoda su uzorkovanje većeg dela površine potencijalne energije, što za posledicu ima lako izlaženje iz lokalnog minimuma i povećanu verovatnoću pronalaženja raznovrsnih rešenja.

Tabu algoritmima se takođe pretražuje ispitivani prostor sa nasumičnim promenama stepeni slobode liganda. Pored toga što omogućava pronalaženje strukture sa najnižom energijom, ova metoda analizira sličnost generisanih poza (koje nemaju najnižu vrednost energije) kreirajući tabu listu sačinjenu od prethodno pronađenih struktura sa najnižom energijom [209]. Na ovaj način, poza se zadržava samo ukoliko se razlikuje od svih prethodnih poza sačuvanih u listi i sprečava algoritam da ispituje ponovo već ispitane regione.

Prema algoritmima optimizacije grupe (eng. swarm optimization, SO), promene izvršene u trenutnom rešenju su usmerene da prate najbolju pozu populacije. Prema tome, kretanje liganda kroz konformacioni prostor vođeno je informacijama o najboljim pozicijama njegovih suseda.

2.3.1.1.4. Deterministički algoritmi

U determinističkim algoritimima, trenutno stanje sistema određuje izmene koje treba da budu napravljene, što vodi formiranju novog stanja sistema. Krajnji rezultat veoma zavisi od početne strukture. Ukoliko se sistemu zada ista početna konfiguracija i određen set parametara rezultat će uvek biti isti. Primeri determinističkih algoritama su metoda minimizacije energije (EM) i molekulska-dinamička simulacija (MD).

EM ima za cilj da istraži površinu potencijalne energije koristeći pravac povezan sa gradijentom opadanja potencijalne energije, tako što dovodi sistem u najbliži lokalni minimum. Glavna mana ove strategije je nemogućnost da se prevaziđu energetske barijere kako bi se dostigli i drugi minimumi. EM se često koristi, kao lokalni algoritam pretrage, zajedno sa drugim strategijama pretraživanja, kao što su metode fragmentacije.

MD metode simuliraju pokrete sistema tokom vremena uključivanjem nekih termodinamičkih parametara, kao što su temperatura i pritisak. Glavne prednosti ove strategije su prirodnije uključivanje eksplicitnog rastvarača u simulaciju i uzimanje u obzir svih stepeni slobode oba molekula (liganda i proteina) tokom simulacije. Glavni nedostaci ove metode su dugačko vreme izvođenja proračuna i sklonost sistema da se zaglavi u lokalnom minimumu.

2.3.1.1.2. Funkcije predviđanja afiniteta vezivanja

Tokom simulacije molekuskog dokinga, algoritmi pretraživanja istraže veliki broj mogućih načina vezivanja, a koji se sastoje od konformacije liganda i njegove orijentacije u vezivnom mestu proteina. Za svaki pronađeni način vezivanja potrebno je što tačnije odrediti afinitet vezivanja. U ove svrhe se koriste funkcije predviđanja afiniteta vezivanja. Ove funkcije računaju jačinu protein-ligand interakcija, koja se najčešće izražava u kcal/mol i naziva energijom vezivanja. Tačnost izračunate vezivne energije će u mnogome zavisiti od nivoa teorije korišćene za njeno računanje. U standardnoj doking simulaciji potrebno je nekoliko miliona puta izračunati vezivnu energiju. Pošto su precizne metode za

računanje energije (*ab initio*, discrete Fourier transform, DFT) računarski veoma zahtevne i dugo traju, moraju se koristiti brže empirijske metode manje tačnosti. Ipak, svaka funkcija procenjivanja afiniteta vezivanja mora ispuniti određene kriterijume da bi bila prihvaćena i implementirana u programe molekuskog dokinga.

Najbolji način za proveru funkcije procene afiniteta vezivanja je upoređivanjem sa eksperimentalnim rezultatima. Dobra funkcija mora biti u stanju da potpuno reprodukuje način vezivanja za neki već poznati protein-ligand kompleks. Tom načinu vezivanja mora biti dodeljena najviša vrednost energije vezivanja u odnosu na sve druge načine vezivanja pronađene algoritmima pretrage. Takođe, ukoliko postoje eksperimentalni podaci da se za jedno vezivno mesto u proteinu može vezati više različitih liganada sa različitim afinitetima, dobra funkcija predviđanja afiniteta vezivanja mora reprodukovati taj trend. Apsolutna vrednost izračunate energije vezivanja često se razlikuje od eksperimentalno određene, pa je zato bolje koristiti izraz procenjena energija vezivanja.

Prema načinu na koji su izvedene, funkcije predviđanja afiniteta vezivanja se mogu podeliti u tri glavne klase: funkcije bazirane na polju sila, empirijske funkcije i funkcije bazirane na statističkom posmatranju poznatih struktura [206, 210].

2.3.1.1.2.1. Funkcije bazirane na polju sila

Funkcije bazirane na polju sila (eng. force field, FF) izvedene su iz klasičnih molekulske mehaničkih polja sila i sastoje se od zbira energetske termova. Primeri programa koji koriste ove funkcije uključuju AutoDock [211] i GOLD [212]. Zapravo, ove funkcije su bazirane na sumi van der Valsovih i elektrostatičkih interakcija između parova atoma koji sačinjavaju protein-ligand kompleks, pri čemu se uzima u obzir samo entalpijski doprinos [210]:

$$E_{vezivanja} = \sum_{i=1}^L \sum_{j=1}^R \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} \right) \quad (2)$$

Pošto ove funkcije zanemaruju entropiju i efekat rastvarača nisu se pokazale kao dovoljno dobre [206], te su poboljšane uvođenjem torzione entropije liganda (Kramer, 1999 #221) i efektom solvatacije/desolvatacije, opisanih [213, 214] ili implicitnim modelom, jednačina 4 [120, 215].

$$E_{vezivanja} = E_{vdw} + E_{elektrostat} \quad (3)$$

$$E_{vezivanja} = E_{vdw} + E_{elektrostat} + \Delta G_{solv} \quad (4)$$

$$E_{vezivanja} = E_{QM/MM} + \Delta G_{solv} \quad (5)$$

Preciznost predviđanja vezivne energije značajno zavisi od forme funkcionala potencijalne energije i empirijskih parametara, s obzirom da je ovaj tip funkcije zasnovan na polju sila. Stoga, u novije vreme, razvijene su nove funkcije bazirane na kvantnoj mehanici (QM) kako bi se rešili izazovi koji potiču od kovalentnog vezivanja, polarizacije i prenosa naelektrisanja [216]. Iako su daleko tačnije, funkcije bazirane na kvantno-mehaničkim izračunavanjima su i daleko računarski zahtevnije, i izračunavanja traju neuporedivo duže. Stoga, razvijen je hibridni kvantno-mehanički/molekulska mehanički pristup (QM/MM) kako bi našao kompromis između trajanja proračuna i tačnosti izračunatog rezultata, jednačina 5 [217, 218].

Uopšteno, funkcije bazirane na polju sila mogu direktno da računaju interakcije između atoma liganda i proteina uzimajući u obzir entalpijski i entropijski doprinos vezivinoj energiji, kao i solvataciju sistema.

2.3.1.1.2.2. Empirijske funkcije

Empirijske funkcije izračunavaju jačinu protein-ligand vezivanja sumiranjem slobodnih energija pojedinačnih doprinosa svih interakcija između proteina i liganda, kao što su vodonične veze, hidrofobne interakcije, jonska (elektrostatička) privlačenja i odbijanja i broj rotabilnih veza liganda [210, 219, 220]. Svaka od ovih komponenti predstavlja važan faktor pri vezivanju liganda, i njihova vrednost se ne izračunava, već se

određuje na osnovu eksperimentalnih rezultata. Zatim se, koristeći set poznatih vezivnih energija za eksperimentalno određene protein ligand komplekse, linearnom regresijom optimizuju svi energijski doprinosi (množenjem sa odgovarajućim koeficijentom udela, (w), tako da na najbolji mogući način funkcija predviđanja afiniteta vezivanja reprodukuje eksperimentalne rezultate, jednačina 6. [221, 222].

$$E_{vezivanja} = w_0 + w_1\Delta G_{Hveza} + w_2\Delta G_{hidrofobne} + w_3\Delta G_{elekt.} + w_4\Delta G_{rot} \quad (6)$$

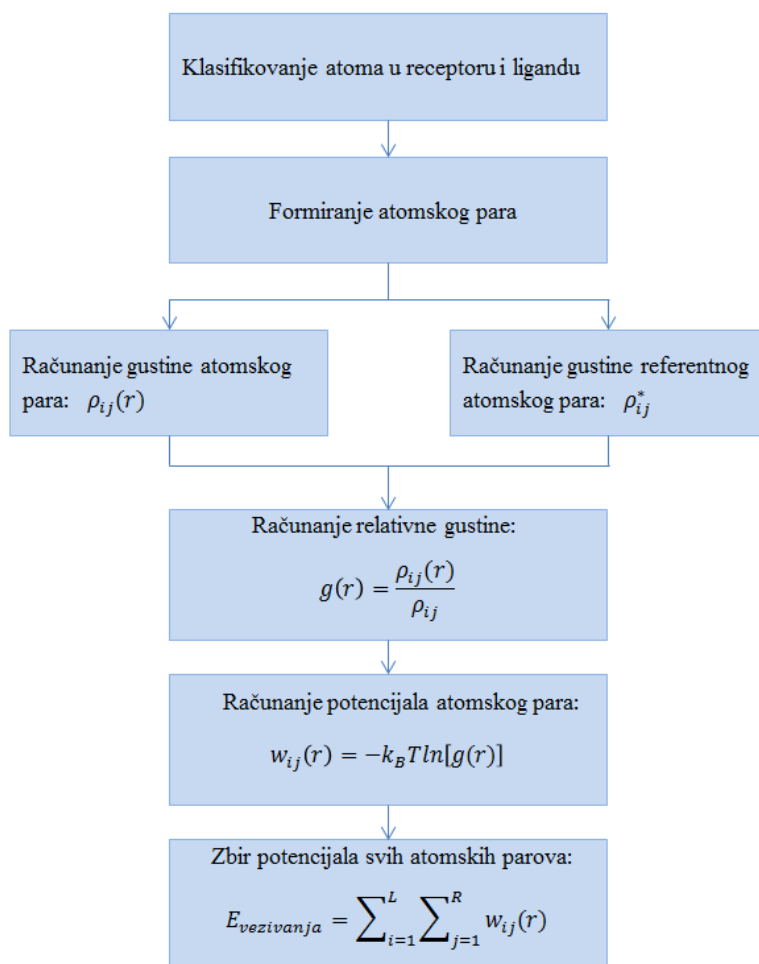
Empirijske funkcije se razvijaju u dva pravca. Prvi pravac se odnosi na pokušaje dobijanja generalne forme empirijske funkcije uvrštavanjem sve većeg broja visokokvalitetnih eksperimentalnih podataka o geometriji i vezivnoj energiji protein-ligand kompleksa kao trening seta. Drugi pravac se odnosi na odabir najpogodnijih energijskih termova u odnosu na ciljni protein [222, 223]. Danas se empirijske funkcije mnogo primenjuju u doking programima protein-ligand kompleksa, koji uključuju i programe ID-Score [224], GlideScore [199] i AutoDock Vina [203].

Glavna prednost empirijskih funkcija, u odnosu na ostale funkcije predviđanja afiniteta vezivanja, je izuzetna brzina izračunavanja, pošto se vrednosti pojedinačnih interakcija ne računaju direktno, već se koriste empirijski podaci. Zbog toga se ove funkcije koriste kada je potrebno brzo odrediti afinitet vezivanja velikog broja malih molekula za ciljani protein. Ova vrsta doking metoda se zove virtuelno pretraživanje (eng. virtual screening) [225]. Cilj ovih metoda je da se iz ogromnih biblioteka sa strukturama malih molekula (više desetina miliona struktura) brzo pronađu kandidati koji pokazuju visok afinitet vezivanja za dati protein.

2.3.1.1.2.3. Funkcije bazirane na statističkim posmatranjima poznatih struktura

Ove funkcije (eng. knowledge-based functions) baziraju se na posmatranju bliskih međumolekulskih kontakata u velikim 3D bazama podataka, kao što je Kembrička baza podataka (eng. Cambridge Structural Database, CSD) ili PDB. Zapravo, ove funkcije direktno izvide potencijale parova atoma na osnovu učestalosti pojavljivanja u velikom broju trodimenzionalnih struktura korišćenjem inverzne Bolcmanove relacije [226, 227]. Potom se dobijeni podaci prevode u pseudopotencijal (eng. mean-force potential, MFP), koji opisuje preferirane geometrije atoma u protein-ligand kompleksu. **Slika 23** opisuje protokol funkcija baziranih na statističkim posmatranjima poznatih struktura.

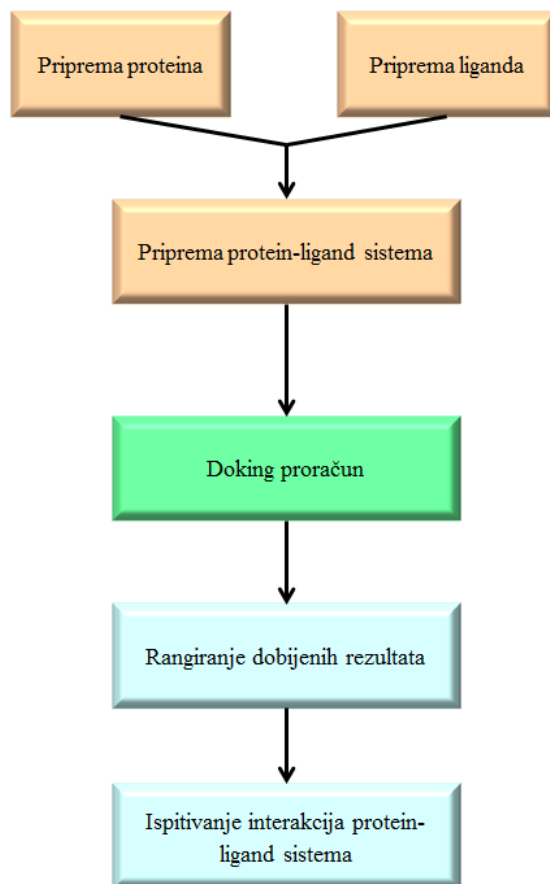
Najveća prednost ovih funkcija je manja kompjuterska zahtevnost, kao i prediktivna preciznost, u poređenju sa empirijskim i funkcijama polja sila. Sa druge strane, njihova mana je otežano lociranje referentnog stanja. Trenutno, postoje dva klasična načina koja se koriste za određivanje referentnog stanja. Jedan je aproksimiranje referentnog stanja nasumičnom raspodelom parova atoma [228], a druga uvodi korekcije, u koje se ubrajaju metoda korekcije faktora zapremine [229] i iterativne metode bazirane na fizici [230], kako bi se poboljšala tačnost ovih funkcija.



Slika 23. Algoritam funkcije bazirane na statističkim posmatranjima poznatih struktura; $\rho_{ij}(r)$ predstavlja gustinu atomskog para $i-j$ protein-ligand kompleksa na rastojanju r , ρ_{ij}^* je gustina para referentnog stanja i i j i $g(r)$ je relativni broj gustine atomskog para $i-j$ na rastojanju r , k_B je Bolcmanova konstanta, T je apsolutna temperatura.

2.3.1.1.3. Protokol molekuskog dokinga

Procedura molekuskog dokinga prikazana je na **šemi 2**.



Šema 2. Procedura izvođenja simulacije molekuskog dokinga.

2.3.1.1.3.1. Priprema liganda

Različiti programi zahtevaju različiti način pripreme ulaznih datoteka za simulaciju molekuskog dokinga. Ovde je ukratko opisana samo priprema liganda i proteina za simulacije koje su prikazane u ovoj disertaciji.

Ligand, obično mali molekul, se pre simulacije molekuskog dokinga mora pravilno pripremiti. Ta priprema obuhvata pronalaženje već poznate 3D strukture, ili crtanje

željenog liganda korišćenjem za tu svrhu predviđenih programa. Nakon toga, neophodno je izvršiti minimizaciju energije (optimizaciju geometrije) liganda kvantno-hemijskim proračunima [231]. Nakon izvršene optimizacije geometrije liganda, potrebno je napraviti datoteku koja sadrži sve podatke o koordinatama, naelektrisanjima i tipovima atoma (osim nepolarnih vodonikovih atoma) korišćenjem Autodock Tools programa [201]. Ukoliko ligand sadrži atome ili jone metala, za koje ne postoje parametri u biblioteci Autodock Tools programa, potrebno je uraditi parametrizaciju tih atoma ili jona. Takođe, potrebno je odabrati rotabilne veze liganda, koje će služiti za ispitivanje konformacionog prostora liganda tokom doking simulacije. Na ovaj način spremljena je ulazna datoteka liganda za simulaciju molekuskog dokinga.

2.3.1.1.3.2. Priprema proteina

Struktura proteina se obezbeđuje pretragom PDB. Kako bi se odabrala najbolja struktura proteina potrebno je proveriti rezoluciju na kojoj je rešena struktura, eksperimentalne uslove, kao i da li neki aminokiselinski ostaci nedostaju. Dešava da se usled velike pokretljivosti nekih delova proteina, kao što su petlje, aminokiselinski ostaci koji sačinjavaju ove segmente ne nalaze u 3D strukturi proteina. Ukoliko nedostaju samo pojedini atomi, oni se jednostavno mogu dodati, ali ukoliko nedostaju čitavi segmenti situacija je znatno komplikovanija. Stoga, ukoliko struktura proteina nije potpuna, ili ne postoji skladištena u PDB, pribegava se kompleksnoj proceduri molekuskog modelovanja. Nakon pronalaženja/konstruisanja 3D strukture proteina neophodno je izbrisati sve nepotrebne molekule, odnosno ligand (ukoliko postoji) i molekule vode. Potom, potrebno je dodati atome vodonika i odrediti protonovanost aminokiselinskih ostataka. Većinom su 3D strukture proteina iz PDB banke loše rezolucije, odnosno ne uočavaju se pojedini atomi vodonika. S obzirom da se neki aminokiselinski ostaci (Ser, Thr, Tyr, Asp, Glu, Lys, Arg i His) mogu naći u dva (odnosno tri za His) različito protonovana stanja, moraju se izračunati njihove pKa vrednosti korišćenjem nekog od programa kao što su H++ [232] i pKD [233], a koji se zasnivaju na rešavanju Puason-Bolcmanove jednačine. Sledeći korak je minimizacija geometrije proteina, kako bi se otklonile eventualne sterne smetnje i greške nastale pri rešavanju kristalne strukture ili modelovanja proteina. Nakon toga, potrebno je

napraviti datoteku koja sadrži podatke o koordinatama, naelektrisanjima i tipovima atoma (pdbqt datoteka) korišćenjem Autodock Tools programa.

2.3.1.1.3.3. Doking proračun

Kada su pravilno pripremljene datoteke liganda i proteina, neophodno je odrediti vezivno mesto na proteinu, odnosno zadati potencijalno vezivno mesto u proteinu gde će biti ispitivane interakcije sa ligandom. Ukoliko ovo mesto nije poznato mora se ispitati cela zapremina proteina. Nakon izbora potencijalnog vezivnog mesta pravi se tzv. kutija (eng. box), odnosno mreža pravilno raspoređenih tačaka u prostoru (eng. grid) koja obuhvata to vezivno mesto. Broj tačaka u kutiji, odnosno gustina mreže, određuje i kvalitet cele doking simulacije. Takođe, kutija mora biti dovoljno velika da u nju može da stane ceo ligand, i to u svim mogućim konformacijama. Ligand se smešta u odabranu kutiju u kojoj menja položaj i konformacije, pri čemu se odgovarajućim algoritmom uzorkovanja traže najpovoljnije konformacije liganda i, gore pomenutim funkcijama, procenjuje afinitet vezivanja za protein. Ovaj pristup se naziva i grid doking. Kada se odabere vezivno mesto i odredi veličina i položaj kutije, generiše se ulazna datoteka koja sadrži podatke lokaciji pdbqt datoteka proteina i liganda, veličini kutije (size_x, y, z), centru kutije (center_x, y, z) i razmaku (Å) između pravilno raspoređenih tačaka kutije (eng. spacing) (**Slika 24**).

```
receptor = naziv_proteina.pdbqt
ligand = naziv_liganda.pdbqt
center_x = 30.19
center_y = 77.67
center_z = 55.96
size_x = 50
size_y = 50
size_z = 50
spacing = 1.000
```

Slika 24. Primer ulazne datoteke.

Ulazna datoteka može sadržavati i dodatne, opcione, parametre kao što su: naziv fleksibilne strukture proteina ukoliko se radi indukovano uklapanje (pdbqt datoteka sa naznačenim fleksibilnim aminokiselinama), broj procesora koje program koristi za proračun (cpu), iscrpnost pretrage (eng. exhaustiveness), broj poza vezivanja liganda (eng. num_modes) i razlika u energiji između najboljeg i najlošijeg prihvaćenog načina vezivanja (eng. energy_range).

2.3.1.1.3.4. Rangiranje i analiziranje rezultata molekuskog dokinga

Nakon završene procedure doking program generiše izveštaj o obavljenoj pretrazi i rang listu prihvaćenih načina vezivanja liganada prema RMSD vrednosti i procenjenom afinitetu vezivanja, najčešće u kcal/mol (**Slika 25**).

```

mode | affinity | dist from best mode
   | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.
-----+-----+-----+-----
  1   -7.7   0.000   0.000
  2   -7.5  23.672  29.965
  3   -7.4   5.133  14.997
  4   -7.4  26.002  33.579
  5   -7.3  21.865  28.922
  6   -7.3  26.852  33.995
  7   -7.2  24.709  30.945
  8   -7.1  20.347  26.073
  9   -7.1  27.107  33.930
Writing output ... done.

```

Slika 25. Primer izlaznog fajla programa AutoDock Vina.

Obično se prvi prihvaćeni način vezivanja smatra najboljim, pošto pokazuje i najveći afinitet vezivanja. Međutim, potrebno je i vizualizovati, nekim od programa kao što su Pymol i Discovery studio Viewer [234, 235], i sve ostale prihvaćene načine vezivanja, kako bi se izvršio detaljan uvid u orijentaciju i interakcije između liganda i proteina, što je često vrlo značajan faktor u odabiru najbolje strukture. Zbog velikog broja načina vezivanja koji se dobijaju u simulaciji molekuskog dokinga, neophodno je izvršiti klasterovanje dobijenih rezultata. Jedna od korisnih veličina za klasterovanje je RMSD vrednost u

kombinaciji sa procenjenom energijom vezivanja. Veličina klastera nam može dati korisne informacije o entropiji vezivanja, gde brojnost struktura u klasteru ukazuje na verovatnoću vezivanja liganda na to vezivno mesto. Na ovaj način moguće je pronaći najbolji način vezivanja (sa najvećom energijom vezivanja), najverovatniji način vezivanja (struktura sa najvećom energijom vezivanja u klasteru najveće populacije), kao i najbolje uklopljen način vezivanja (struktura sa najnižom RMSD vrednošću u odnosu na eksperimentalno određenu strukturu protein ligand kompleksa, ukoliko je poznata). S obzirom da različiti programi koriste različite algoritme pretrage i funkcije procenjivanja afiniteta vezivanja, manualni proces pronalaženja najbolje poze je otežan, te su nedavno razvijene automatizovane alatke kao što su Clusterizer i DockAccess [236].

2.3.1.1.4. Molekulska dinamika (MD)

Molekulska dinamika (MD) jednostavnih gasova je razvijena 1950-tih godina [237, 238], dok je prva MD simulacija proteina izvedena 1970-tih godina [239]. MD simulacije su potom počele sve češće da se pojavljuju u eksperimentalnim radovima iz oblasti strukturne biologije, gde se koriste i kao pomoć u tumačenju eksperimentalnih rezultata, kao i da usmere dalji eksperimentalni rad. Sve veća pažnja se posvećuje MD simulacijama iz najmanje dva razloga. Jedan je da je poslednjih godina došlo do “eksplozije” u sintezi struktura određene klase molekula koji su veoma važni u biološkim istraživanjima, kao što su istraživanja nervnog sistema [240, 241]. Mnoge od ovih struktura, jonski kanali, neurotransmiterski transporteri i G protein spregnuti receptori (eng. G protein-coupled receptor, GPCR), pripadaju membranskim proteinima. Određivanje strukture (integralnih) membranskih proteina kristalografijom je otežano, ali zahvaljujući nedavnim pomacima u kristalografiji obezbeđeno je na desetine takvih struktura i proces je dodatno ubrzan korišćenjem krioelektronske mikroskopije (Nobelova nagrada za hemiju 2017. godine). Ove eksperimentalno određene strukture predstavljaju početnu tačku za izvođenje MD simulacije. Drugi uzrok povećane pažnje MD simulacijama jeste činjenica da su postale mnogo moćnije i dostupnije. Do nedavno, za MD simulacije je bio potreban super-računar. Sada, novije računarske komponente, naročito grafička karta, omogućavaju

da se ovakvi proračuni izvode i na lokalnim računarima [242, 243]. MD simulacije su znatno unapredovale, od simuliranja više stotina atoma do sistema od biološkog značaja, uključujući čitave proteine u eksplicitnom rastvaraču [244], membranske proteine [245] i velike makromolekulske komplekse poput ribozoma i nukleozoma [246, 247]. MD simulacije sistema koji sadrže i 100,000 atoma su sada rutinski, a simulacije od približno 500,000 atoma su uobičajene kada su dostupni odgovarajući računarski resursi. Ovo značajno poboljšanje je u velikoj meri posledica korišćenja visokih performansi računara i jednostavnosti MD algoritama.

Računarska metoda molekulske-dinamičke simulacije izračunava ponašanje molekuskog sistema u zavisnosti od vremena. MD simulacije obezbeđuju detaljne informacije o fluktuacijama i promenama konformacija proteina i nukleinskih kiselina. Ove metode su evoluirale u potpuno usavršene tehnike, koje se danas rutinski koriste za istraživanje strukture, dinamike i termodinamike bioloških molekula i njihovih kompleksa. Sadašnje dužine trajanja simulacija su blizu biološki relevantnih. Informacije koje se ovim putem prikupljaju o dinamičkim svojstvima makromolekula su dovoljno bogate da prevaziđu uobičajeni pristup proučavanja pojedinačnih struktura čitavog ansambla konformacija koja se koristi u strukturnoj bioinformatici. MD simulacijama može se proučiti širok spektar važnih biomolekulskih procesa, uključujući konformacione promene, vezivanje liganda i uvijanje proteina, otkrivajući položaje svih atoma u femtosekundskoj rezoluciji. Još značajnije, ovakve simulacije mogu predvideti kako će biomolekuli, na atomskom nivou, odreagovati na promene kao što su mutacija, fosforilacija, protonovanje ili dodavanje/uklanjanje liganda.

Prema Ergodičkoj hipotezi, srednja vrednost po vremenu, bilo koje fizičke veličine sistema, jednaka je srednjoj vrednosti iste fizičke veličine po ansamblu.

2.3.1.1.4.1. Ansambli

Ansambl je velika grupa mikroskopski opisanih stanja sistema sa određenim konstantnim makroskopskim karakteristikama. Postoji nekoliko vrsta ansambala koji se koriste u MD simulacijama.

U mikrokanoničnom ansamblu (NVE) sistem se sa konstantnom zapreminom (V), energijom (E) i brojem čestica (N) ponaša kao potpuno izolovan sistem. Ovakav sistem veoma je sličan adijabatskom procesu bez razmene toplote.

Kanonični ansambl (NVT) predstavlja skup svih sistema čije je termodinamičko stanje okarakterisano konstantim brojem atoma (N), konstantnom zapreminom (V) i konstantnom temperaturom (T). Ovaj sistem je povezan sa “toplotnim kupatilom”, odnosno termostatom. Stoga se naziva i molekulsko-dinamičkom simulacijom pri konstantnoj temperaturi (eng. Constant Temperature Molecular Dynamics, CTMD).

Izotermno-izobarski ansambl (NVT/NPT) okarakterisan je konstantnim brojem atoma (N), konstantnom temperaturom (T), kao i konstantnim pritiskom (P) ili konstantnom zapreminom (V). Kako se hemijske reakcije često izvode pod konstantnim pritiskom, NPT ansambl ima važnu ulogu u hemiji.

Termodinamičko stanje velikog kanoničnog ansambla (μVT), poznatog i kao makrokanonični ansambl, karakteriše konstantan broj atoma (N), konstantna temperatura (T) i konstantan hemijski potencijal.

Temperatura je statistička veličina koja mora biti izražena kao funkcija položaja i impulsa svih atoma u sistemu. Za sistem koji sadrži dovoljno veliki broj atoma temperatura se može proceniti na osnovu kinetičke energije:

$$\langle \frac{1}{2} m v^2 \rangle = \frac{1}{2} N_f k_B T \quad (7)$$

gde je N_f je broj stepeni slobode u sistemu sa N atoma, m je masa atoma, v brzina atoma i k_B je Bolcmanova konstanta. Kako položaji i brzine atoma zavise od vremena, i temperatura sistema će zavisiti od vremena:

$$T(t) = \sum_{i=1}^N \frac{m_i v_i^2(t)}{k_B N_f} \quad (8)$$

Termostati su algoritmi koji se koriste za skaliranje brzina kretanja atoma kako bi se kontrolisala temperatura sistema u MD simulaciji. U simulacijama se trenutna (kinetička) temperatura obično izračunava iz ukupne kinetičke energije sistema. Cilj termostata nije da zadrži temperaturu konstantnom, što bi za posledicu imalo fiksiranje ukupne kinetičke energije, već da osigura tačnost prosečne temperature sistema. Najviše korišćeni termostati su Berendsenov termostat, koji je vrlo jednostavan algoritam ali nije mnogo precizan, i Landževin dinamika, koja je naprednija i veoma precizna, te je implementirana u gotovo sve programske pakete koji se koriste u MD simulacijama.

2.3.1.1.4.2. Polja sila

U molekularnoj dinamici molekul je opisan kao niz parcijalno naelektrisanih tačaka (atoma) koje su povezane oprugama (vezama). Kako bi se opisale dužine veza, uglovi veza, torzioni uglovi, kao i van der Valsove i elektrostatičke interakcije koje deluju između atoma, koriste se polja sila. Polja sila su skup matematičkih funkcija (funkcije potencijalne energije), i njima odgovarajućih parametara (parametri polja sila), dizajniran tako da reprodukuju geometriju molekula i karakteristika ispitivanih struktura. U kontekstu molekularnog modelovanja, polja sila se koriste za opisivanje potencijalne energije sistema sačinjenog od čestica (atoma). Parametri polja sila se generišu na osnovu ekperimentalnih podataka i/ili veoma preciznih kvantno-mehaničkih proračuna. Parametri mogu biti definisani za svaki atom (eng. all atom), za sve atome osim nepolarnih vodonikovih atoma koji su ujedinjeni sa ugljenikovim atomom za koji su vezani (eng. united atom, UFF), i pojednostavljena (eng. coarse-grained, CGFF) polja sila. U CGFF molekuli su predstavljeni kao skup pseudo-atoma, koji aproksimiraju karakteristične grupe u tom molekulu. Na primer, svaki aminokiselinski ostatak u proteinu može biti predstavljen samo jednim

pseudo-atomom. Time se znatno smanjuje zahtevnost proračuna, te se ta polja sila mogu koristiti za simuliranje velikih proteinskih sistema duži vremenski period.

Polja sila izvode potencijalnu energiju iz strukture molekula [248-251]. Funkcije potencijalne energije su složene matematičke funkcije koje se mogu lako programirati i brzo izračunati. Jednostavnost kojim polja sila predstavljaju svojstva molekula kao što su: opruge za dužine veza i valencione uglove, periodične funkcije za rotacije oko prostih veza i Lenard-Džonsov potencijal, kao i Kulonov zakon za Van der Valsove i elektrostatičke interakcije, osigurava veoma brzo računanje energija i sila čak i za velike sisteme.

Polja sila, koja se trenutno koriste u molekulskim simulacijama, se razlikuju po načinu na koji su parametrizovana i po funkcijama potencijalne energije koje koriste. Funkcije potencijalne energije koje koriste MD programi CHARMM i NAMD za računanje ukupne energije napona (U) prikazane su u jednačini (9).

$$U = \sum_{veze} \frac{1}{2} k_b (r - r_0)^2 + \sum_{uglovi} \frac{1}{2} k_a (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{torzije} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \delta)] + \sum_{improper} V_{imp} + \sum_{LJ} 4\epsilon_{ij} \left(\frac{\sigma_{ij}^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\sigma_{ij}^6}{r_{ij}^6} \right) + \sum_{elekt.} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (9)$$

Prvo polje sila napravljeno je 1960-tih godina, i osnovni cilj je bio predviđanje najpovoljnijih geometrija, vibracionih spektara i entalpije izolovanih molekula. Kako su se vremenom istraživanja usmerila ka daleko kompleksnijim sistemima, razvijala su se i polja sila za široku primenu. Danas se kao veoma popularna polja sila koriste CHARMM [249], AMBER [252], GROMOS [253], OPLS [254], i COMPASS [255]. Sva ova polja sila uglavnom imaju opštu primenu, ali prva tri se često koriste u simulacijama biomolekula. Trebalo bi napomenuti da se mnoga od ovih polja sila stalno razvijaju i da su istraživačima na raspolaganju različite verzije.

2.3.1.1.4.3. Klasična mehanika

Ulazni parametri za MD simulaciju moraju sadržavati podatke o pozicijama, brzinama, masama i parcijalnim naelektrisanjima svih atoma. Simulacija je podeljena u više vremenskih koraka, obično reda veličine femtosekunde. Za svaki vremenski korak izračunavaju se sile koje deluju između svih atoma, koje se potom integrale kako bi se dobile nove brzine i položaji tih atoma. Ovo procedura se ponavlja do kraja simulacije. Potom se karakteristike sistema mogu izračunati iz položaja, brzina i sila koje deluju na atome.

Osnovna ideja MD simulacije je jednostavna, i bazira se na drugom Njutnovom zakonu (jednačina 10), gde je $r_i(t)=(x_i(t), y_i(t), z_i(t))$, pozicioni vektor (koordinate) i -te čestice, a F_i je sila koja deluje na česticu mase m_i u vremenu t . Čestice uglavnom predstavljaju atome, ali mogu predstavljati i neke specifične hemijske grupe.

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

Kako bi se integralile diferencijalne jednačine drugog reda moraju se definisati trenutne sile koje deluju na čestice i njihove početne pozicije i brzine. MD trajektorije su definisane vektorima pozicije i brzine, i opisuju vremensku evoluciju sistema u faznom prostoru. Sila može biti izražena i preko gradijenta potencijalne energije (jednačina 11), gde je V potencijalna energija sistema.

$$F_i = -\nabla_i V \quad (11)$$

Kombinacijom jednačina 10 i 11 dobijamo jednačinu 12:

$$\frac{-dV}{dr_i} = m_i \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} \quad (12)$$

Na ovaj način, Njutnova jednačina kretanja povezuje izvod potencijalne energije sa promenama položaja u funkciji vremena.

Jednostavna primena Njutnove jednačine kretanja prikazana je jednačinom 13:

$$F = m \cdot a = m \cdot \frac{dv}{dt} = m \cdot \frac{d^2x}{dt^2} \quad (13)$$

Ukoliko razmatramo najjednostavniji slučaj, gde je ubrzanje konstantno ($a = \frac{dv}{dt}$), nakon integraljenja dobijamo izraz za brzinu (jednačina 14).

$$v = at + v_0 \quad (14)$$

S obzirom da je $v = \frac{dx}{dt}$, možemo dobiti jednačinu:

$$x = v \cdot t + x_0 \quad (15)$$

Kombinovanjem jednačine 6 sa izrazom za brzinu dobija se relacija (jednačina 7) koja daje vrednost položaja čestice x u vremenu t kao funkcija ubrzanja a , početnog položaja x_0 i početne brzine v_0 :

$$x = \frac{1}{2}at^2 + v_0t + x_0 \quad (16)$$

Prema tome, da bismo izračunali putanju čestice potrebni su početni položaji atoma, početna raspodela brzina i ubrzanje, što je određeno gradijentom potencijalne energije. Jednačine kretanja su determinističke, odnosno, položaji i brzine u vremenu t_0 određuju položaje i brzine u vremenu t . Početni položaji čestica dobijaju se iz eksperimentalno određenih 3D struktura.

Početna raspodela brzina je uglavnom određena nasumičnom raspodelom usaglašenom sa željenom temperaturom, i korigovana tako da ne postoji ukupni moment sile (P) (jednačina 17) kako bi je sprečila rotacija i translacija molekula u prostoru.

$$P = \sum_{i=1}^N m_i v_i = 0 \quad (17)$$

Brzine su često nasumično dodeljene prema Maksvel-Bolcmanovoj ili Gausovoj raspodeli za datu temperaturu, pri čemu postoji verovatnoća da atom i ima brzinu v_x u smeru x na temperaturi T (jedančina 18).

$$p(v_{ix}) = \left(\frac{m_i}{2\pi k_B T}\right)^{1/2} \exp\left[-\frac{1}{2} \frac{m_i v_{ix}^2}{k_B T}\right] \quad (18)$$

Temperatura se može izračunati iz brzina koristeći jednačinu 19, gde je N broj atoma u sistemu [256].

$$T = \frac{1}{(3N)} \sum_{i=1}^N \frac{|p_i|^2}{2m_i} \quad (19)$$

2.3.1.1.4.3.1. Algoritmi integraljenja u MD simulaciji

Kako bi se izračunali položaji i brzine svih atoma u sistemu za integraljenje jednačina kretanja koriste se različiti algoritmi. U biomolekulskim sistemima, atomske pozicije svih atoma su funkcija potencijalne energije, gde se jednačine kretanja rešavaju numerički. Mnogi numerički algoritmi su razvijeni za integraljenje jednačina kretanja, kao što su Bimanov algoritam, Verletov algoritam, algoritam preskakanja (eng. Leap-frog) i korigovani Verletov algoritam [257, 258]. Pri izboru algoritma koji će se koristiti treba uzeti u obzir da mora održavati ukupnu energiju i moment konstantnim, i da dozvoljava što duže korake za integraljenje. Svi algoritmi mogu biti aproksimirani Tejlorovim razvijenim nizom koordinata atoma po vremenu:

$$r(t + dt) = r(t) + \frac{dr(t)}{dt} dt + \frac{1}{2} \frac{d^2 r(t)}{dt^2} dt^2 + \frac{1}{3!} \frac{d^3 r(t)}{dt^3} dt^3 + O(dt^4) \quad (20)$$

$$r(t - dt) = r(t) - \frac{dr(t)}{dt} dt + \frac{1}{2} \frac{d^2 r(t)}{dt^2} dt^2 - \frac{1}{3!} \frac{d^3 r(t)}{dt^3} dt^3 + O(dt^4) \quad (21)$$

Što je pojednostavljeno prikazano jednačinom 22:

$$r(t + dt) = 2r(t) - r(t - dt) + \frac{d^2 r(t)}{dt^2} dt^2 + O(dt^4) \quad (22)$$

Ova jednačina je osnova Verletovog algoritma. Kako se Njutnove jednačine kretanja integrale, $a(t)$ je količnik sile i mase, gde je sila funkcija položaja $r(t)$, jednačina 23.

$$a(t) = -\left(\frac{1}{m} \nabla V(r(t))\right) \quad (23)$$

Vektor položaja na $(t+dt)$ zahteva pozicije prethodna dva koraka, odnosno Verletov algoritam koristi položaje i ubrzanja za vreme t i položaje vremena $(t-dt)$ kako bi izračunao nove položaje u vremenu $(t+dt)$, gde je greška $O(dt^4)$. Prednost Verletovog algoritma je jednostavnost, zadovoljavajuća stabilnost i preciznost, zbog čega se mnogo primenjuje u MD simulacijama.

Problem sa Verletovim algoritmom je indirektno generisanje brzina neophodnih za izračunavanje kinetičke energije, čije vrednosti su neophodne za računanje ukupne energije $E=K+V$. Održanje ukupne energije konstantnom je jedan od najvažnijih testova koji potvrđuje da je MD simulacija izvršena ispravno. Brzine se mogu izračunati iz diferencijala prvog reda (jednačina 24) gde je greška reda veličine dt^2 .

$$v(t) = \frac{r(t+dt)-r(t-dt)}{2dt} \quad (24)$$

Kako bi se ovo prevazišlo razvijeno je nekoliko varijanti Verletovog algoritma, koje se razlikuju u tome koje promenljive se računaju i u kom vremenu.

Algoritam preskakanja (eng. Leap-frog, LP), poznat i kao Verletov algoritam preskakanja, jedna je od varijanti Verletovog algoritma. Ovaj algoritam računa brzine na polovini vremena $(t + \frac{1}{2} dt)$, jednačina 25, koje potom koristi za izračunavanje položaja r u vremenu $(t+dt)$, jednačina 26. Na ovaj način brzine preskaču položaje atoma, a potom položaji preskaču brzine atoma.

$$r(t + dt) = r(t) + v\left(t + \frac{1}{2} dt\right) dt \quad (25)$$

$$v\left(t + \frac{1}{2} dt\right) = v\left(t - \frac{1}{2} dt\right) + a(t)dt \quad (26)$$

Prednost ovog algoritma je eksplicitno izračunavanje brzina i veća preciznost, dok je mana računanje na polovini vremena. Brzine u vremenu t mogu biti aproksimirane vezom prikazanom u jednačini 27.

$$v(t) = \frac{1}{2} \left[v \left(t - \frac{1}{2} dt \right) + v \left(t + \frac{1}{2} dt \right) \right] \quad (27)$$

Kako bi se prevazišli problemi prisutni u ovim algoritmima razvijen je i korigovani Verletov algoritam (eng. Velocity Verlet, VV). Ovaj algoritam je analogan algoritmu preskakanja, sa tom razlikom da se brzine i položaji računaju u istom vremenu. Različite forme korigovanog Verletovog algoritma se mogu dobiti iz originalnog Verletovog algoritma sa položajima r_i , brzinama v_i i ubrzanjima a_i u vremenu $(t+dt)$, jednačine 28-31.

$$r_i(t + dt) = r_i(t) + v_i(t) dt + \frac{1}{2} a_i(t) dt^2 \quad (28)$$

$$v_i \left(t - \frac{dt}{2} \right) = r_i(t) + \frac{1}{2} a_i(t) dt \quad (29)$$

$$a_i(t + dt) = -\frac{1}{m_i} \nabla V(r_i(t + dt)) \quad (30)$$

$$v_i(t + dt) = v_i \left(t + \frac{dt}{2} \right) + \frac{1}{2} a_i(t + dt) dt \quad (31)$$

Prednost korigovanog Verletovog algoritma je izračunavanje pozicija, brzina i ubrzanja u vremenu t sa izuzetnom preciznošću.

Bimanov algoritam je takođe blisko povezan sa Verletovim algoritmom:

$$r_i(t + dt) = r_i(t) + v(t) dt + \frac{1}{6} (4a_i - a_i(t - dt)) dt^2 + O(dt^4) \quad (32)$$

$$v_i(t + dt) dt = r_i(t + dt) - r_i(t) + \frac{1}{6} (2a_i(t + dt) + a_i(t)) dt^2 + O(dt^4) \quad (33)$$

Prednost ovog algoritma je da daje precizniji izraz za brzinu i bolje očuvanje energije, a nedostatak je što složeniji izrazi čine proračun vremenski zahtevnijim.

Iako korigovani Verletov algoritam generiše identične putanje kao i originalni Verletov algoritam [259], njegova prednost u tome da se i pozicije i brzine atoma definišu u istom vremenu. Zbog ove poslednje osobine, korigovani Verletov algoritam se najčešće koristi u molekulsko-dinamičkim simulacijama.

2.3.1.1.4.4. Rastvarač u MD simulaciji

Najčešće korišćeni rastvarač u MD simulaciji je voda, koja ima fundamentalni značaj na strukturu, dinamiku i termodinamiku biomolekula. Jedan od najvažnijih efekata rastvarača je uticaj na elektrostatičke interakcije, koje su opisane Kulonovim zakonom, gde su q_i i q_j parcijalna naelektrisanja atoma, ϵ_{ef} efektivna dielektrična konstanta i r_{ij} relativno rastojanje između čestica:

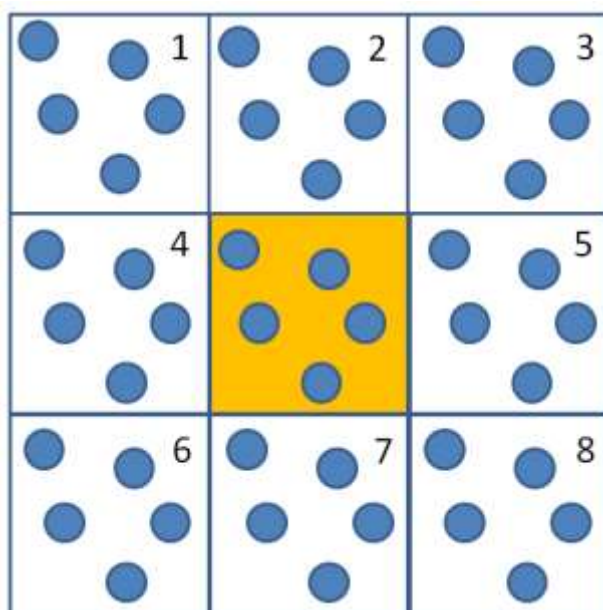
$$V_{elekt.} = \frac{q_i q_j}{\epsilon_{ef} r_{ij}} \quad (34)$$

Uključivanje rastvarača u MD simulaciju se može izvršiti na nekoliko načina, od kojih je najjednostavniji uključivanje dielektrične konstante u jednačinu potencijalne energije. Na ovaj, implicitni, način molekuli vode nisu zapravo uključeni u simulaciju, ali se koristi efektivna dielektrična konstanta. Često se koristi gruba aproksimacija da efektivna dielektrična konstanta zavisi od udaljenosti ($\epsilon_{ef} = r_{ij}\epsilon$), gde ϵ ima vrednosti od 4 do 20. Razvijeni su i drugi modeli implicitnog rastvarača, ali model gde dielektrična konstanta zavisi od udaljenosti se pokazalo kao najjednostavniji način za implicitno uključivanje rastvarača u MD simulaciju.

Ukoliko se voda eksplicitno uključuje u MD simulaciju ($\epsilon = 1$), molekuli vode omogućavaju elektrostatičko zaklanjanje. S obzirom da je ovo mnogo složeniji način uvođenja vode u MD simulaciju, jer se dodaje veliki broj atoma koje je potrebno direktno simulirati, moraju se uključiti i granični uslovi sistema, kako bi se sprečilo rasipanje molekule vode daleko od proteina tokom simulacije, i kako bi se omogućila simulacija i izračunavanje makroskopskih karakteristika koristeći što manji broj molekula rastvarača. Postoji nekoliko načina za postavljanje granica sistema, kao što su solvatacione ljuske,

solvatacija aktivnog mesta i, najčešće korišćeni, periodični granični uslovi (eng. periodic boundary condition, PBC).

PBC omogućavaju da se simulacija izvede sa relativno malim brojem čestica, na takav način da na čestice deluju sile kao da su okružene znatno većim brojem molekula vode. Ako posmatramo centralnu dvodimenzionalnu kutiju (**Slika 26**) može se uočiti da je okružena sa osam susednih identičnih kutija (likova). Koordinate čestica likova, koje se nalaze u susednim kutijama, povezane su sa česticama u centralnoj kutiji translacijom. Sile koje deluju na primarne čestice izračunavaju se iz čestica koje se nalaze u istoj kutiji, kao i u susednim kutijama. Veličina kutije, odnosno debljina vodenog sloja oko proteina, odabrana je tako da čestice u primarnoj kutiji ne vide svoj lik u susednim kutijama.



Slika 26. Pojednostavljeni prikaz periodičnih graničnih uslova za izvođenje MD simulacije.

2.3.1.1.4.5. Podešavanje i protokol MD simulacije

Na **šemi 3** prikazan je protokol MD simulacije.



Šema 3. Faze MD simulacije.

Početne koordinate za MD simulaciju pribavljaju se iz PDB, ili modelovanjem 3D strukture proteina. Nakon toga, potrebno je dodati vodonike koji nedostaju, solvatisati protein, definisati periodične granične uslove i minimizovati strukturu, tako što su teški atomi proteina fiksirani, a vodonici i atomi molekula vode mogu slobodno da se kreću. Na ovaj način uklanjaju se nepovoljne van der Valsove interakcije ukoliko postoje, koje bi mogle dovesti do lokalne strukturne distorzije, što bi rezultovalo nestabilnom simulacijom.

U fazi zagrevanja dodeljuju se početne brzine svakom atomu u sistemu, pri čemu su opet su atomi proteina fiksirani, dok se molekuli vode slobodno kreću kako bi se prilagodili proteinu. Kada su molekuli vode ekvilibrisani, uklanja se ograničenje kretanja atomima proteina i ceo sistem (protein+voda) se zagreva. Tokom faze zagrevanja, periodično se dodeljuju nove brzine, tako da se temperatura postepeno povećava, i simulacija se nastavlja. Proces se ponavlja dok se ne postigne željena temperatura na kojoj će se raditi simulacija u fazi produkcije.

Tokom faze ekvibracije nastavlja se simulacija čitavog sistema tokom koje se prati nekoliko veličina: pritisak, temperatura i energija. Ukoliko se neka od veličina menja tokom ove faze, radi se skaliranje atomskih brzina, i postupak se ponavlja sve dok praćene veličine sistema ne postanu stabilne tokom vremena.

Nakon što se sistem ekvilibriše započinje faza produkcije. Ova faza ima promenljivu dužinu trajanja, od par desetina ns do reda veličine μ s. Što duže traje, MD simulacija bolje oponaša realan sistem. Tokom ove faze izračunavaju se termodinamički parametri, te se simulacija mora podestiti prema odabranom ansamblu.

Kada se MD simulacija završi, ponašanje sistema se analizira iz dobijenih rezultata. Čitava simulacija se može vizualizovati nekim od softvera (npr. VMD), vremenski zavisne veličine se mogu predstaviti grafički, konformacije kroz koje protein prolazi tokom simulacije se mogu klasterovati, i može se izračunati prosečna struktura proteina. Neke od glavnih veličina koje se računaju nakon MD simulacije su prosečna energija, RMSD, RMSF i Rg (jednačine 35-38).

$$1) \text{ Prosečna energija} \quad \langle E \rangle = \frac{1}{N_i} \sum_{i=1}^N E_i \quad (35)$$

$$2) \text{ RMSD vrednost} \quad RMSD = \left(\left(r_i^\alpha - r_i^\beta \right)^2 \right)^{\frac{1}{2}} = \sqrt{\frac{1}{N_i} \sum_i \left(r_i^\alpha - r_i^\beta \right)^2} \quad (36)$$

koja predstavlja razliku između dve strukture;

3) RMSF vrednost
$$RMSF_i = \sqrt{\frac{1}{N_f} \sum_f (r_i^f - r_i^{prosečno})^2}$$
 (37)

koja predstavlja fluktuaciju svakog aminokiselinskog ostatka i povezana je sa kristalografskim B faktorom;

4) Rg vrednost
$$Rg = \sqrt{\frac{1}{N_i} \sum_i (r_i - r_{cm})^2}$$
 (38)

gde je $r_i - r_{cm}$ rastojanje između atoma i i centra mase molekula.

3. Ciljevi

Mnogi proteini su mete važnih bioaktivnih molekula iz hrane, koji se koriste u prevenciji i za lečenje raznih bolesti. Vezivanje biološki relevantnih malih molekula (liganada) za proteine može imati veliki uticaj na funkciju, konformacione promene i stabilnost proteina. Takođe, vezivanje određenih liganada može uticati i na afinitet vezivanja drugih liganada za ispitivani protein. Iako je poznat veliki broj liganada koji interaguju sa proteinima, razjašnjavanje strukturnih detalja ovih interakcija zahteva razrađene i dugotrajne kristalografske ili NMR studije. Zbog toga, računarske metode predstavljaju veoma važan pristup u proučavanju bioloških sistema na atomskom nivou i omogućavaju uvid u mehanizme koji se baziraju na konformacionim promenama proteina prilikom vezivanja liganada. U ovoj disertaciji ispitan je uticaj vezivanja bioaktivnih molekula iz hrane (PCB i EGCG) na proteine albuminskog tipa (HSA i ALA).

Kako je u našoj prethodnoj studiji pokazano da PCB pokazuje visok afinitet vezivanja za HSA prvi deo ove doktorske disertacije imao je za cilj da se:

- A. Ispita stabilnost PCB-HSA kompleksa korišćenjem MD simulacije:
 - a) Kada je PCB vezan u vezivnom mestu hema (IB)
 - b) Kada je PCB vezan u Sudlovom mestu I (IIA)
- B. Prate konformacione promene HSA korišćenjem MD simulacije:
 - a) Slobodnog HSA
 - b) HSA-PCB(IB) kompleksa
 - c) HSA-PCB(IIA) kompleksa
- C. Ispitaju konformacione promene samog PCB korišćenjem MD simulacije:
 - a) Prilikom vezivanja za vezivno mesto hema (IB)
 - b) Prilikom vezivanja za Sudlovo mesto I (IIA)
- D. Metodom molekuskog dokinga ispita uticaj vezivanja PCB za HSA na vezivanje drugih liganda, i to:
 - a) Endogenih (bilirubina, tiroksina, hemina, miristinske kiseline)

- b) Egzogenih (varfarina, indometacina, fuzidinske kiseline, diazepama, ibuprofena, diklofenaka, azapropazona, PCB)

Sa druge strane, kako je u našoj prethodnoj studiji pokazano da EGCG pokazuje visok afinitet vezivanja za holo formu ALA (sa kalcijumom), drugi deo ove doktorske disertacije imao je za cilj da se:

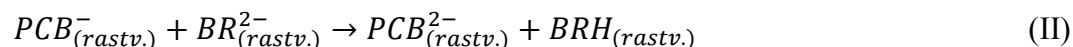
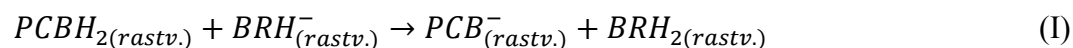
- A. MD simulacijom ispita stabilnost apo forme ALA prilikom uklanjanja jona kalcijuma iz holoALA
- B. Metodom molekuskog dokinga predloži mesto vezivanja EGCG-a za apoALA
- C. MD simulacijom ispita vezivanje EGCG-a za:
 - a) apoALA
 - b) holoALA
- D. MD simulacijom ispita uticaj EGCG-a na stabilnost:
 - a) apoALA
 - b) holoALA
- E. Prate konformacione promene ALA tokom MD simulacije:
 - a) holoALA
 - b) apoALA
 - c) holoALA-EGCG kompleksa
 - d) apoALA-EGCG kompleksa

4. Eksperimentalni deo

4.1. Priprema liganada PCB i EGCG za molekularni doking i MD simulaciju

Kako bi se dobila najstabilnija struktura liganada koja sadrži precizne dužine veza i valencione uglove, struktura EGCG-a je optimizovana kvantno-hemijskom MP2 metodom sa standardnim 6-31G(d,p) baznim setom.

Strukturu liganada PCB smo u našem prethodnom istraživanju optimizovali na sledeći način. pKa vrednosti PCB-a procenjene su korišćenjem izodezmičkog reakcionog pristupa (proračun slobodne energije u reakciji razmene protona u vodenom rastvoru (reakcione šeme (I) i (II) sa bilirubinom kao referentnim molekulom).



Struktura neutralnog PCB-a (u najstabilnijoj, ZZZ, SSS konformaciji) i odgovarajućih anjona optimizovane su B3LYP metodom sa baznim setom 6-311++G(d,p) i okarakterisane su energetske minimumom bez imaginarnih frekvencija. Efekat rastvarača prilikom optimizacije geometrije i izračunavanja energije uzet je u obzir SMD modelom.

Svi kvantno-hemijski proračuni urađeni su u programu Gaussian09.

Molekularno dinamičke simulacije u programu NAMD koriste CHARMM27 polje sila. Kako ovo polje sila ne sadrži parametre koji su potrebni za opisivanje strukture liganada, napravili smo novo polje sila za PCB i EGCG. Nevezivni parametri i parcijalna naelektrisanja su atomima PCB-a i EGCG-a pripisana iz polja sila CGenFF, dok su ostali parametri dobijeni iz Hesijana, odnosno izračunati nakon optimizacije liganada sa 6-31G* baznim setom u programu Gaussian09.

4.2. Priprema strukture HSA, HSA-PCB (IB/IIA) za MD simulaciju

Početna struktura humanog seruma albumina odabrana je na osnovu zadovoljavajuće rezolucije i sa što manje aminokiselinskih ostataka koji nedostaju, pretragom PDB (PDB kod 1BM0). Protonovano stanje svakog aminokiselinskog ostatka HSA procenjeno je korišćenjem Poisson-Boltzmanove metode (eng. finite difference Poisson-Boltzmann (FDPB) continuum electrostatics method) koja je implementirana u program H++. Strukture HSA u kompleksu sa ligandom dobili smo iz naše prethodne studije molekuskog dokinga. Parametri polja sila liganda koji su neophodni za izvođenje molekulske dinamičke simulacije generisani su u programu VMD 1.9.1.

4.3. MD simulacije HSA, HSA-PCB (IB) i HSA-PCB (IIA)

Metodom molekulske dinamike ispitivali smo ukupno tri sistema: slobodan HSA, HSA sa vezanim ligandom u mestu IB (HSA-PCB(IB)) i HSA sa vezanim ligandom u mestu IIA (HSA-PCB(IIA)). Sve tri molekulske dinamičke simulacije su izvedene u programu NAMD 2.9. Početne strukture solvatisane su molekulima vode TIP3 i neutralisane dodatkom NaCl (150 mM) kako bi se simulirali fiziološki uslovi. Potom su ovi sistemi kaskadno minimizovani u 10000 koraka simulacije na temperaturi od 310K. Nakon minimizacije, sistemi su ekvilibrisani u NVE ansamblu tokom 250 ps sa korakom od 1fs. U fazi produkcije korišćen je NPT ansambl sa Landževin dinamikom kontrole temperature na 310 K u kombinaciji sa održavanjem pritiska na 101.325 kPa. Korekcija temperatura je bila podešena na 1 ps^{-1} , a pritiska na 10 fs. Periodični granični uslovi i Evaldovo sumiranje (eng. Particle-mesh Ewald method) implementirani su za kompletanu elektrostatiku. Granična vrednosti za nevezivne interakcije podešena je na 9 Å, sa funkcijom prebacivanja (eng. switching function) na 8 Å. Korak produkcione faze podešen je na 2 fs, a korak zapisivanja trajektorije na 1 ps. Sve tri molekulske dinamičke simulacije izvedene su u trajanju od 0,3 μs .

Trajektorija dobijena iz MD simulacije analizirana je u programu VMD (verzija 1.9.2.) korišćenjem Tcl skripti za računanje RMSD, RMSF i Rg vrednosti, kao i u programu MDTRA koji smo koristili za izračunavanje 2D RMSD dijagrama.

4.4. Priprema strukture apoALA za molekularni doking

U cilju poređenja rezultata sa rezultatima molekularnog dokinga iz našeg prethodnog rada, gde je ispitivano vezivanje EGCG-a za holo-formu α -laktalbumina, i poređenja stabilnosti apoALA i holoALA, iz PDB odabrana je ista kristalna struktura α -laktalbumina (PDB kod: 1F6S). Svi molekuli vode koji su kristalografski pronađeni izbrisani su iz strukture proteina. Takođe, kako ispitujeemo apo-formu α -laktalbumina, izbrisan je i jon kalcijuma. Protonovano stanje svakog aminokiselinskog ostatka apoALA i holoALA procenjeno je programom H++ sa implementiranom Puason-Bolcmanovom metodom. Nakon uklanjanja Ca^{2+} -jona iz holoALA urađeno je 20 ns MD simulacije strukture proteina bez Ca^{2+} -jona, kako bi se obezbedila relaksirana struktura apoALA za simulaciju molekularnog dokinga.

4.5. Simulacija molekularnog dokinga EGCG-a i apoALA

Pripremljene strukture EGCG-a i apoALA unete su u program Autodock Tools kako bi se napravile ulazne datoteke (pdbqt datoteke) za simulaciju molekularnog dokinga. Odabrane su rotabilne veze liganda (sve jednostruke veze), i svakom atomu iz ove dve strukture dodeljene su koordinate, naelektrisanja i tipovi atoma. Za pronalaženje najboljeg mesta vezivanja liganda koristili smo fleksibilnu grid doking simulaciju. Kako smo, sa jedne strane, želeli da pretražimo sva moguća najbolja mesta vezivanja, a sa druge, da dobijemo što tačnije rezultate, nismo koristili (ranije opisanu) metodu kutije koja bi obuhvatala čitav protein. Tačnije, napravili smo manju kutiju dimenzija $24 \times 24 \times 24 \text{ \AA}$, u koju se mogao smestiti ligand, a zatim je pomerali za 8 \AA duž svake ose po zamišljenoj velikoj kutiji koja bi sadržavala ceo protein. Na ovaj način, umesto jedne simulacije molekularnog dokinga, koja bi usled korišćenja velike kutije bila manje tačna, uradili smo

150 simulacija molekuskog dokinga, pri čemu smo dobili dosta tačnije rezultate. Parametar iscrpnosti pretrage (exhaustiveness) bio je podešen na maksimalnu vrednost (100). Za simulaciju molekuskog dokinga korišćen je program Autodock Vina.

Svi rezultati molekuskog dokinga su klasterovani prema procenjenoj vrednosti afiniteta vezivanja i RMSD vrednosti. Nakon toga, iz najbrojnijih klastera odabrane su strukture sa najvećom vezivnom energijom, koje su dalje analizirane vizualizacijom u programu Discovery Studio Viewer 3.5. Detaljnim ispitivanjem interakcija koje EGCG ostvaruje sa aminokiselinim ostacima apoALA odabrana je najreprezentativnija struktura apoALA-EGCG kompleksa.

4.6. MD simulacije holo/apoALA i holo/apoALA-EGCG

MD simulacijama ispitivali smo četiri sistema: holoALA, apoALA, holoALA-EGCG, apoALA-EGCG. Za sve simulacije koristili smo program NAMD 2.9. Strukture bez liganda, kao i one koje su dobijene molekulskim dokingom (apoALA-EGCG u ovoj disertaciji i holoALA-EGCG u našem prethodnom istraživanju) solvatisane su molekulima vode TIP3 i neutralisane dodatkom NaCl (150 mM) u cilju simuliranja fizioloških uslova. Potom su ovi sistemi minimizovani kako bi se uklonile svi bliski kontakti između atoma. U sledećem koraku, NVE ansambl sistema su ekvilibrisani u trajanju od 250 ps. Produkciona faza je trajala 40 ns za svaki sistem, pri čemu je korišćen je NPT ansambl. Landževin dinamika kontrole temperature (310 K) i održavanje pritiska na 101.325 kPa bilo je uključeno u čitavu simulaciju. Periodični granični uslovi i Evaldovo sumiranje (eng. Particle-mesh Ewald method) implementirani su za kompletnu elektrostatičku.

Trajektorija dobijena iz MD simulacije analizirana je u programu VMD (verzija 1.9.2.) korišćenjem Tcl skripti za računanje RMSD, RMSF i Rg vrednosti, kao i u programu MDTRA koji smo koristili za izračunavanje 2D RMSD dijagrama. Trajektorije sva četiri sistema bile su klasterovane u programu UCSF Chimera i za svaku trajektoriju je izračunata prosečna konformacija iz najbrojnijeg klastera, koja je dalje analizirana.

Kako bi se analizirala kretanja aminokiselinskih ostataka koji grade Ca^{2+} -vezivnu petlju, u apoALA i apoALA-EGCG sistemima, dodat je Ca^{2+} -jon, poravnanjem ovih struktura sa holoALA strukturom.

5. Rezultati i diskusija

5.1. Studija MD simulacije slobodnog i HSA-PCB(IIA) kompleksa

Zahvaljujući visokoj fleksibilnosti svoje strukture nakon vezivanja liganda, kao i izuzetnom kapacitetu da akomodira strukturno različite ligande na različitim vezujućim mestima, HSA neuniformno vezuje ligande, i ima sposobnost promene konformacije vezujućih mesta. Sa druge strane, obilnost ovog proteina u plazmi čini ga veoma važnim faktorom farmakokinetičkog ponašanja velikog broja lekova, determinišući njihovu efikasnost i brzinu distribucije. Stoga je od esencijalne važnosti razumevanje mehanizama kojim, ovaj glavni nosački protein plazme, vezuje ligande na različitim mestima, i menja svoju konformaciju i stabilnost nakon vezivanja određenog liganda. Za neke od bioaktivnih liganada iz hrane, kao što su vitamin B12 [260], masne kiseline [21], lupeol [261] i florentin [262], je pokazano da mogu stabilisati konformaciju HSA. Međutim, do sad nije opisana ni jedna sveobuhvatna teorijska studija koja pokazuje stabilizaciju strukture HSA usled vezivanja biološki aktivne komponente hrane. Shodno tome, a polazeći od rezultata dobijenih molekulskim dokingom [126], u ovom delu doktorske disertacije obimna MD studija sprovedena je u cilju ispitivanja stabilnosti i strukturnih promena HSA i njegovih kompleksa sa PCB-em. Kako bi se dobio uvid u strukturne promene HSA i PCB-a, kad je ligand vezan za dva različita vezujuća mesta na HSA (IB i IIA), molekulskom dinamikom, u trajanju od 0,3 μ s, su analizirana 3 sistema: slobodan HSA, HSA sa vezanim PCB-em na hem-vezujućem mestu (HSA-PCB(IIA)) i HSA sa vezanim PCB-em na Sudlovom mestu I (HSA-PCB(IB)). Procenjujane su RMSD, RMSF i Rg vrednosti proteina sa i bez liganda, koje su izračunate u odnosu na početne strukture nakon globalnog poravnjanja glavnog peptidnog lanca do 0,3 μ s trajektorije za sve sisteme. Pored toga, 2D RMSD dijagrami, koji predstavljaju RMSD vrednosti između svakog koraka simulacije, analizirani su radi posmatranja konformacionih promena HSA tokom simulacije, kako slobodnog tako i njegovih kompleksa sa PCB-em. Da bi se ispitala vrste i broj različitih interakcija koje su uključene u stabilizaciju HSA-PCB kompleksa, simulirani sistemi su detaljno ispitani.

Štaviše, MD simulacije su nam omogućile dodatno prilagođavanje liganda u prethodno predloženim vezivnim mestima HSA [126], bolje definisanje interakcija između liganda i proteina, kao i uvid u konformaciju samog liganda pri vezivanju za HSA.

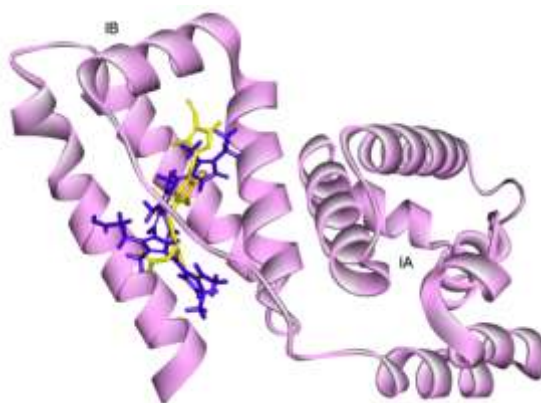
5.1.1. Poređenje interakcija PCB-a i HSA u mestu IB pre i nakon MD simulacije

Kako bi smo došli do uvida u promene u vezivanju PCB-a za HSA nakon MD simulacije, upoređene su interakcije PCB-a sa HSA posle MD simulacije sa interakcijama pre MD simulacije, tj. sa interakcijama pronađenim molekulskim dokingom.

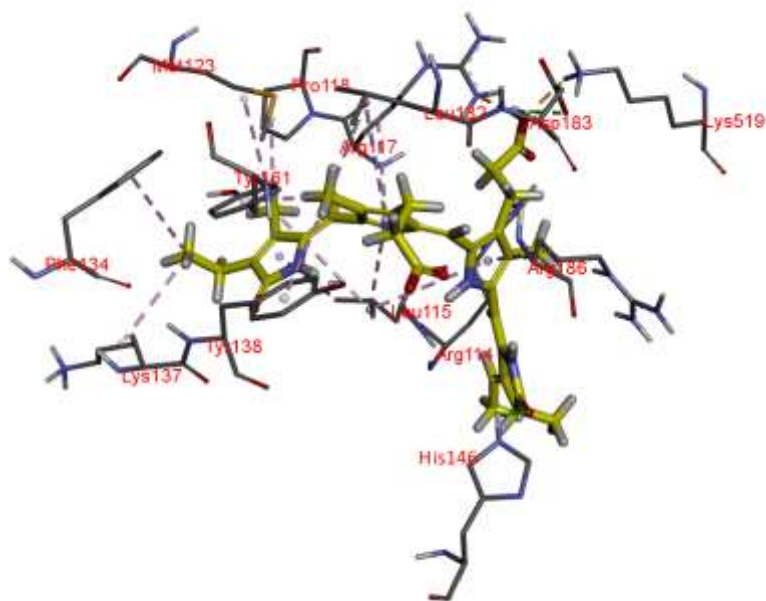
Prvo visoko-afinitetno mesto PCB-a u monoanjonskoj formi (-10,9 kcal/mol), pronađeno molekulskim dokingom na HSA, nalazi se u subdomenu IB (vezivno mesto hema), i poklapa se sa vezivnim mestom za 4Z,15E-bilirubin-IX α utvrđenim snimanjem kristalne strukture ovog molekula sa HSA (**Slika 27**) [31, 126]. Ovo vezivno mesto obuhvata aminokiselinske ostatke petlje koja spaja subdomene IB i IA (ostaci 110-117), kao i helikse H8, H9 i H10 (**Slika 28**). PCB koji je pokazao najjače vezivanje zauzima *M* konformaciju. Pored tri pozitivno naelektrisana aminokiselinska ostatka Arg114, Arg117 i Arg186, ostatak vezivnog mesta sačinjen je od uglavnom hidrofobnih ostataka, kao što su Leu115, Pro118, Met123, Ile142, Phe157 i Leu182. Sva tri pozitivno naelektrisana argininska ostatka grade vodonične veze/sonne mostove sa ligandom i to Arg114 i Arg117 sa propionskim grupama, Arg186 sa laktamskim prstenom karbonilnog kiseonika, a His146 sa karbonilnom grupom pirolovog prstena (**Slika 28**). Ostale prisutne polarne grupe aminokiselinskih ostataka kao što su: Tyr138, Glu141, Arg145, Tyr161 i Asp183 nalaze se na dovoljnoj udaljenosti od odgovarajućih grupa PCB-a, te mogu nagraditi vodonične veze sa ligandom. Takođe, aromatični aminokiselinski ostaci Phe134 i Tyr138 orijentisani su tako da mogu da nagrade π - π steking interakcije sa pirolovim prstenovima PCB-a (**Slika 28**).

Nakon 0,3 μ s MD simulacije, PCB vezan u mestu IB (**Tabela 5 i Slika 29**) je uglavnom stabilizovan vodoničnim vezama. Ostatak Arg117 formira bifurkovanu

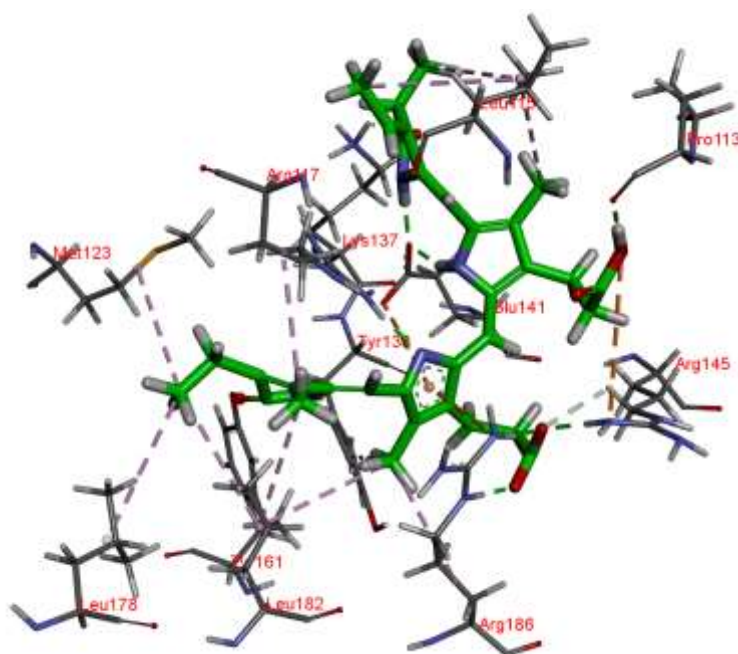
vodoničnu vezu sa protonovanim pirolnim prstenom PCB-a, ostaci Glu141 i Tyr161 interaguju sa laktamskim prstenom, Glu141 je dodatno uključen u formiranje vodonične veze sa protonovanim pirolnim prstenom, a Pro113 gradi vodoničnu vezu sa protonovanom karboksilnom grupom liganda. Karboksilna grupa liganda formira sone mostove sa amino grupama ostataka Arg145 i Arg186 na rastojanjima od 1.65 Å i 1.64 Å, redom. Lys 137 formira soni most sa laktamskim prstenom liganda na rastojanju od 2.01 Å. Pirollov prsten može učestvovati i u π -interakcijama sa ostacima Tyr138 i Tyr161, dok hidrofobni doprinos daju ostaci Leu115, Pro118, Phe165, Leu178 i Leu182.



Slika 27. Preklapanje strukture PCB-a pronađene molekulskim dokingom (ljubičasto) i 4Z,15E-bilirubin-IX α (žuto) vezanog u subdomenu IB kristalne strukture HSA (PDB kod 1N5U). Atomi vodonika su izostavljeni zbog jasnoće prikaza.



Slika 28. Glavne interakcije HSA i PCB-a u vezivnom mestu IB pre MD simulacije, pronađene molekulskim dokingom.



Slika 29. Glavne interakcije HSA i PCB-a u vezivnom mestu IB nakon 0,3 μ s MD simulacije.

Tabela 5. Ostaci koji učestvuju u interakcijama HSA i PCB-a u vezivnom mestu IB pre i nakon 0.3 μ s MD simulacije.

Vezivno mesto IB		
Tip interakcije	Pre MDS	Nakon MDS
Vodonične veze	His146, Asp183, Arg186	Pro113, Arg 117, Glu141, Tyr161
Soni mostovi	Arg117, Lys519	Lys137, Arg145, Arg186
Steking/CH-π	Phe134 , Tyr138	Tyr138, Tyr161
Hidrofobne interakcije	Leu115, Pro118, Met123, Lys137, Tyr161, Leu182	Leu115, Met123, Leu178, Leu182

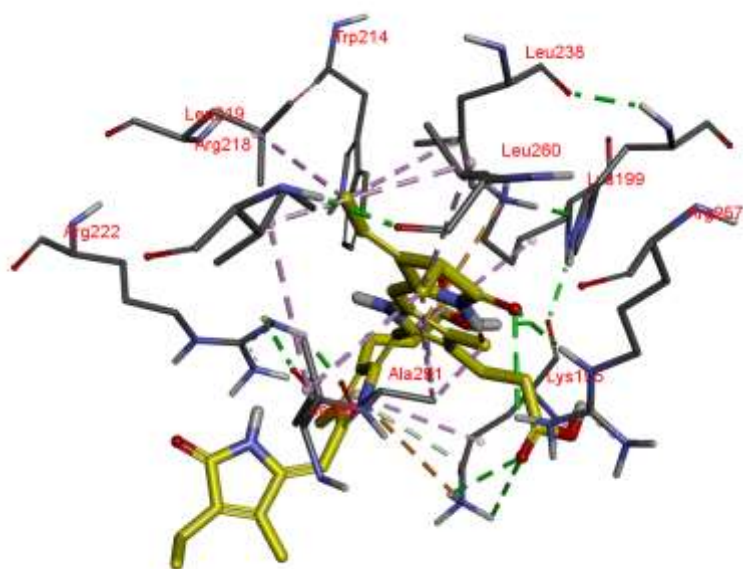
Iz dobijenih rezultata se može videti da se vezivno mesto PCB-a za subdomen IB na HSA, nađena molekulskim dokingom, zadržava i nakon MD simulacije u trajanju od 0,3 μ s. Ipak, usled prilagođavanja vezivnog mesta IB tokom simulacije, PCB nakon simulacije ostvaruje drugačije interakcije u odnosu na one dobijene molekulskim dokingom. Naime, PCB gubi vodonične veze sa sa tri aminokiselinska ostatka, His146, Asp183 i Arg186, ali ostvaruje četiri nove vodonične veze sa Pro113, Arg117, Glu141 i Tyr161 (**Tabela 5**). Aminokiselinski ostatak koji je učestvovao u formiranju vodonične veze sa PCB, Arg186, nakon simulacije gradi soni most sa HSA, dok Arg117 koji je gradio soni most sada učestvuje u vodoničnom vezivanju PCB-a i HSA (**Tabela 5**). Strukturi HSA-PCB(IB) sada doprinose ukupno tri sona mosta, dok su je pre MD simulacije stabilizovala dva. Hidrofobno okruženje je u velikoj meri ostalo isto. Najznačajnija razlika u aminokiselinskim ostacima koji učestvuju u stabilizaciji HSA-PCB(IB) kompleksa nakon simulacije je odsutnost sonog mosta PCB-a sa Lys510 koji pripada domenu III. Ipak, kao dokaz da je vezivno mesto očuvano tokom čitave molekulsko-dinamičke simulacije služi i činjenica da se aminokiselinski ostaci HSA koji učestvuju u interakcijama, dobijeni molekulskim dokingom, nisu značajno promenili, već se samo promenio tip interakcije u kojima učestvuju. Odnosno, ili su zadržani ili su njihovi susedi postali vezivni partneri PCB-a. Takođe, nakon MD simulacije, zadržane su ključne interakcije sa Arg117, Tyr138 i

Arg186, koje su pronađene i u kristalnoj strukturi HSA sa bilirubinom, markerom vezivnog mesta hema [28].

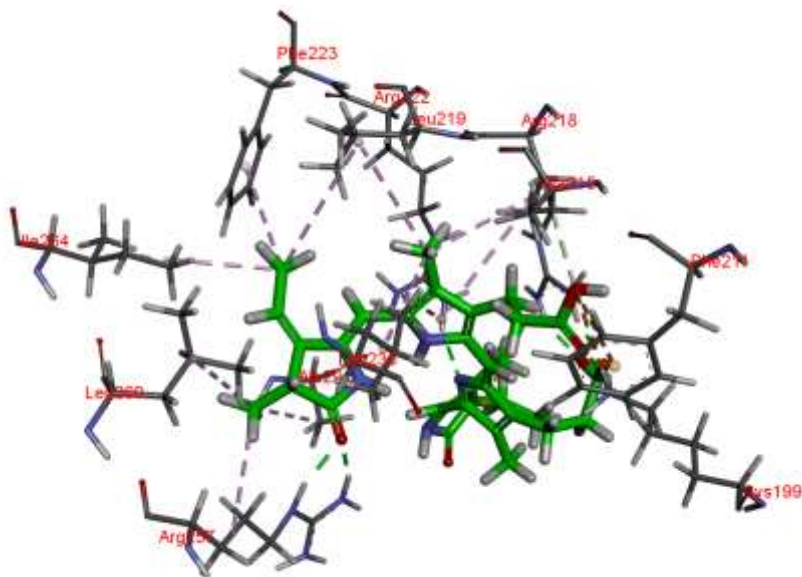
5.1.2. Poređenje interakcija PCB-a i HSA u mestu IIA pre i nakon MD simulacije

Drugo vezivno mesto PCB-a za HSA visokog afiniteta (-10,8 kcal/mol), pronađeno molekulskim dokingom, nalazi se u hidrofobnom džepu subdomena IIA, i poznato je pod nazivom Sudlovo mesto I [18]. Ovo vezivno mesto formiraju aminokiselinski ostaci Trp214, Leu219, Leu238, Leu260, Ile264, Ile290 i Ala291 koji pripadaju heliksima H1-H5 (**Slika 30**), pri čemu se PCB nalazi u istoj konformaciji (*M* konformaciji) kao i prilikom vezivanja za mesto IB. Izrazito polarne ili anjonske grupe liganda orijentisane su ka subdomenu IB, odnosno helixu H10 (ostaci 194-206) gde pozitivno naelektrisane aminokiseline Lys195 i Lys199 učestvuju u formiranju sonih mostova sa PCB-em. Argininski ostaci Arg218, Arg222 i Arg257 učestvuju u vodoničnom vezivanju sa karbonilnom ili NH-grupom laktamskog prstena, dok His242 formira sone mostove/vodonične veze sa propionskim grupama liganda. Dodatno, aromatični Trp214 može nagraditi π - π steking interakcije sa pirolovim prstenom liganda (**Slika 30**).

Nakon MD simulacije, PCB u mestu IIA je ostao vezan u sličnom okruženju koji je zauzeo prilikom studije molekulskog dokinga (**Tabela 6 i Slika 31**). U ovom vezivnom mestu aminokiselinski ostatak Lys199 formira dva sona mosta sa karbonilnom i karboksilnom grupom liganda na rastojanjima od 1.78 Å i 1.64 Å, respektivno. Dodatnoj stabilizaciji liganda u mestu IIA doprinose i brojne vodonične veze. Arg222 gradi vodoničnu vezu sa deprotonovanim pirolovim prstenom. Laktamski kiseonik PCB-a stabilizovan je bifurkovanom interakcijom sa amino grupama Arg257 i hidroksilnom grupom Tyr150, dok je karboksilna grupa liganda stabilizovana vodoničnom vezom sa Arg218. U dodatnu stabilizaciju vezivanja PCB-a za mesto IIA uključeni su aromatični ostaci Trp214 i Phe211 koji učestvuju u π -interakcijama, dok hidrofobni doprinos potiče od ostataka Leu238, Ile290 and Ala291.



Slika 30. Glavne interakcije HSA i PCB-a u vezivnom mestu IIA pre MD simulacije, pronađene molekulskim dokingom.



Slika 31. Glavne interakcije HSA i PCB-a u vezivnom mestu IIA nakon 0,3 μ s MD simulacije.

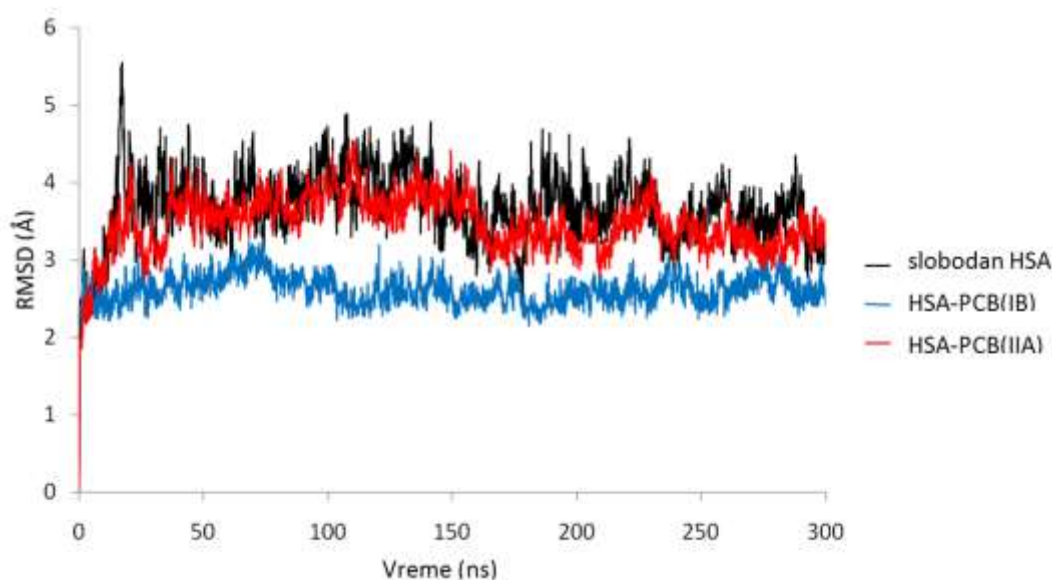
Tabela 6. Ostaci koji učestvuju u interakcijama HSA i PCB-a u vezivnom mestu IIA pre i nakon 0,3 μ s MD simulacije.

Vezivno mesto IIA		
Tip interakcije	Pre MDS	Nakon MDS
Vodonične veze	Arg218, Arg222, Arg257	Arg218, Arg222, Arg257, Tyr150
Soni mostovi	Lys195, Lys199, His242	Lys199
Steking/CH-π	Trp214	Trp214, Phe211
Hidrofobne interakcije	Trp214, Leu219, Leu238, Leu260, Ile264, Ile290, Ala291	Leu219, Phe223, Leu238, Ile290, Ala291

Ovi rezultati jasno pokazuju da se, slično vezivnom mestu za subdomen IB, vezivno mesto PCB-a za subdoman IIA takođe zadržava i nakon MD simulacije od 0,3 μ s. Usled promene konformacije HSA tokom MD simulacije radi boljeg prilagođavanja PCB-a i HSA, i u mestu IIA došlo je do manjih promena aminokiselinskih ostataka koji učestvuju u vezivanju PCB-a. Kao ključni aminokiselinski ostatak koji učestvuje u interakcijama Sudlovog mesta I sa raznim ligandima, zadržan je soni most sa Lys199. Broj vodoničnih veza između PCB-a i HSA je nakon simulacije porastao, i sada PCB ostvaruje tri vodonične veze od kojih je ona sa Arg257 zadržana iz strukture dobijene molekulskim dokingom. Prilikom adaptacije liganda i proteina izgubljena je vodonična veza sa Lys195, ali je ostvarena nova sa Arg222, dok je hidrofobno okruženje ostalo veoma slično. Kao i u slučaju vezivanja PCB-a za mesto IB, pokazano je da nakon MD simulacije aminokiselinski ostaci subdomena IIA koji učestvuju u interakcijama nisu se značajno promenili u odnosu na one dobijene molekulskim dokingom, kao i da su zadržani aminokiselinski ostaci koji učestvuju u interakcijama sa markerom Sudlovog mesta I, varfarinom (Tyr150, Lys199, Arg218, Arg222 i Arg257) [22].

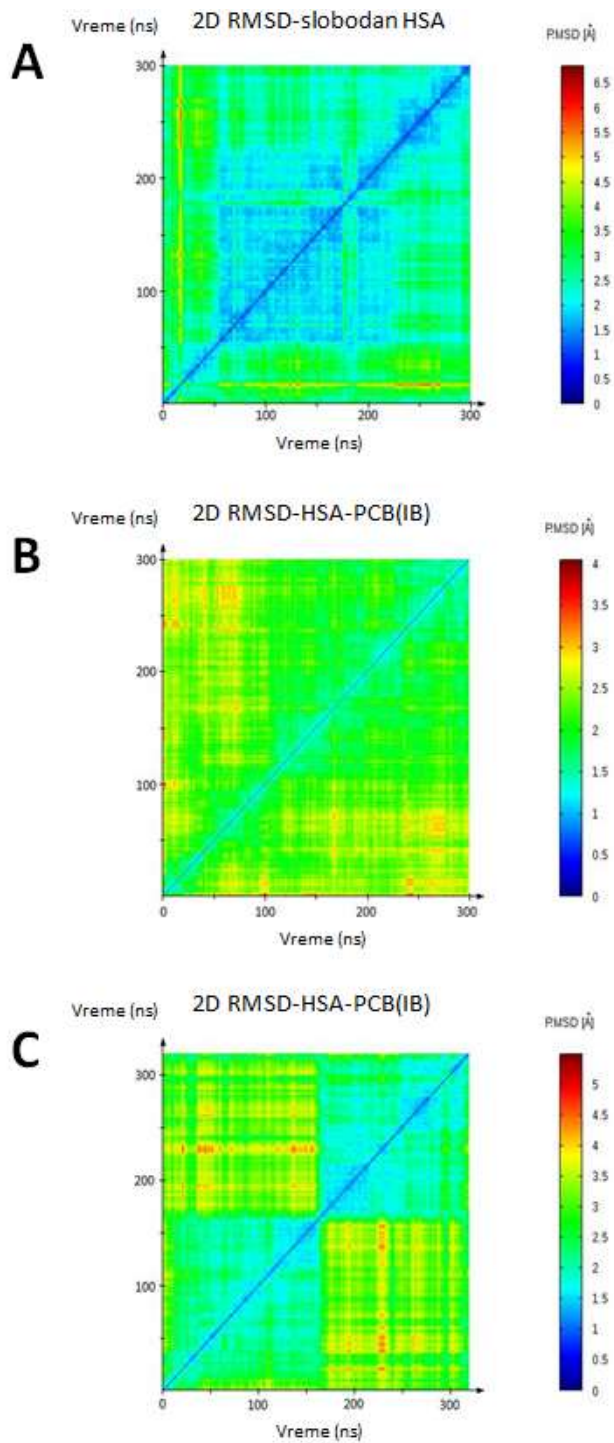
5.1.3. Stabilnost i konformacione promene HSA i HSA-PCB(IIA) tokom MD simulacije

U cilju ispitivanja stabilnosti ispitivanih sistema izračunate su RMSD vrednosti C α -atoma HSA i oba HSA-PCB kompleksa. Ove vrednosti pokazuju da su svi sistemi dostigli ravnotežu, osciluju oko prosečne vrednosti, i ostaju stabilni do kraja MD simulacije (**Grafik 1**).



Grafik 1. RMSD vrednosti (Å) slobodnog HSA i HSA vezanog za PCB tokom 300 ns MD simulacije.

Tumačenjem 2D RMSD dijagrama dobijeni su podaci o konformacionim promenama sva tri sistema. Prema 2D RMSD dijagramu, slobodan HSA prolazi kroz nekoliko različitih konformacija (**Slika 32A**). Kvadrati duž dijagonale na 2D RMSD dijagramu pokazuju intervale sličnih konformacija. Od početka MD simulacije HSA ostaje u početnoj konformaciji oko 50 ns, a potom dolazi do promene konformacije. Ovu prelaznu konformaciju (ili vrlo sličnu) zadržava do 230 ns, a potom prelazi u finalnu konformaciju.

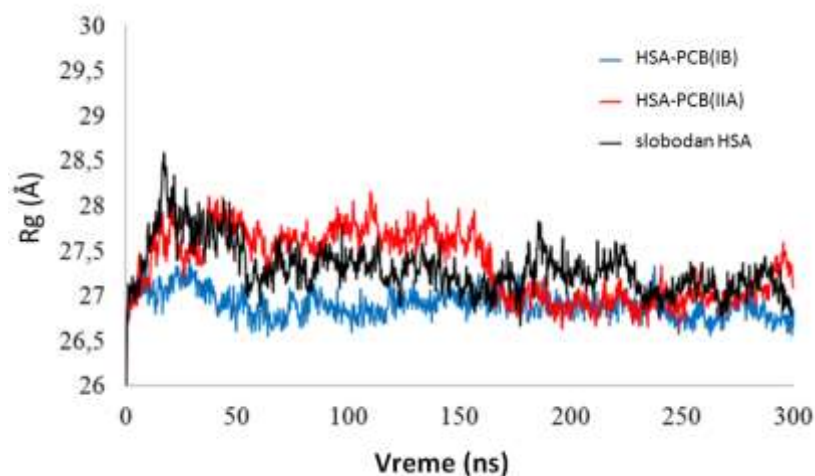


Slika 32. 2D RMSD grafici slobodnog HSA (A), HSA-PCB(IB) (B), i HSA-PCB(IIA) (C) tokom 0,3 μ s MD simulacije.

Svetlo plave oblasti na 2D RMSD dijagramu predstavljaju lokalizovane RMSD pikove, i ukazuju na to da finalna konformacija ima strukturnih sličnosti sa prelaznom konformacijom, ali ne i sa početnom. Analiziranjem 2D RMSD dijagrama lako se uočava da, kada je PCB vezan za mesto IB, HSA zadržava početnu konformaciju tokom čitave MD simulacije (**Slika 32B**), dok u slučaju vezivanja za mesto IIA, HSA prolazi kroz dve jasno definisane različite konformacije (**Slika 32C**), pri čemu su strukturne sličnosti između konformacija veoma male. Stoga, tokom 0,3 μ s MD simulacije, slobodan HSA prolazi kroz tri različite konformacije (početnu, prelaznu i završnu). Nakon vezivanja PCB-a za mesto IB, HSA pokazuje samo blage konformacione promene, što ukazuje na rigidifikaciju HSA, dok su konformaciona prilagođavanja HSA prilikom vezivanja PCB-a za mesto IIA izraženija. Nakon 170 ns konformaciono prilagođavanje je završeno, i od tog trenutka HSA struktura sa PCB-em vezanim za mesto IIA je rigidifikovana, iako u manjoj meri nego pri vezivanju liganda u mestu IB.

5.1.4. Kompaktnost HSA i HSA-PCB(IB/IIA) tokom MD simulacije

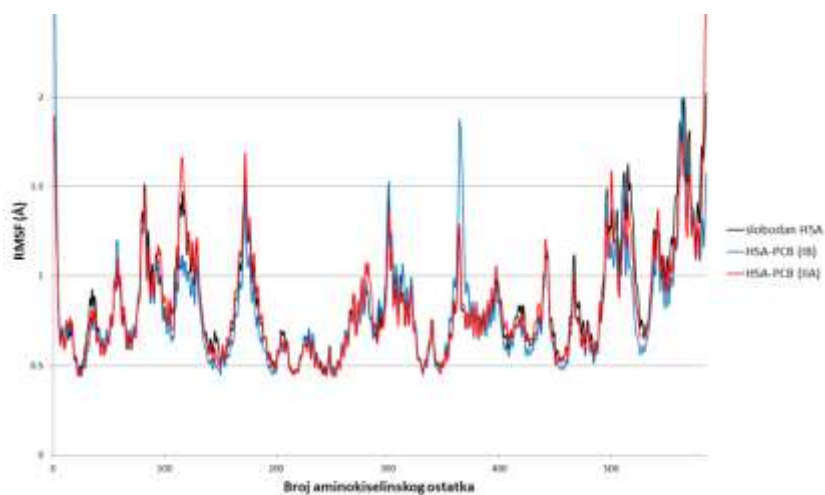
Vrednost radijusa žiracije (R_g) je mera kompaktnosti sistema tokom MD simulacije. Suprotno slobodnom HSA, koji pokazuje fluktuacije u R_g vrednostima tokom čitave simulacije (**Grafik 2**), HSA sa PCB-em vezanim za mesto IIA jasno dostiže ravnotežu nakon 170 ns, gde zadobijasvoju finalnu konformaciju, a što je u skladu sa 2D RMSD analizom (**Slika 32**) U slučaju HSA-PCB(IB), niže vrednosti radijusa žiracije tokom čitave MD simulacije ukazuju na to da ovaj kompleks ima značajno kompaktniju konformaciju u poređenju sa slobodnim HSA i HSA-PCB(IIA). Mada je kompleks HSA-PCB (IIA) manje kompaktan od HSA-PCB(IB), on ipak ima kompaktniju konformaciju od slobodnog HSA. Stoga, paralelno sa RMSD, R_g analiza ukazuje na to da je HSA sa vezanim ligandom stabilniji nego njegova slobodna forma, i da vezivanje PCB-a za mesto IB stabilizuje HSA od početka simulacije, dok vezivanje PCB-a za mesto IIA brže dovodi HSA u ravnotežno stanje u poređenju sa slobodnom formom.



Grafik 2. Radijus žiracije (R_g) slobodnog HSA, HSA-PCB(IB) i HSA-PCB(IIA) tokom 0,3 μ s MD simulacije.

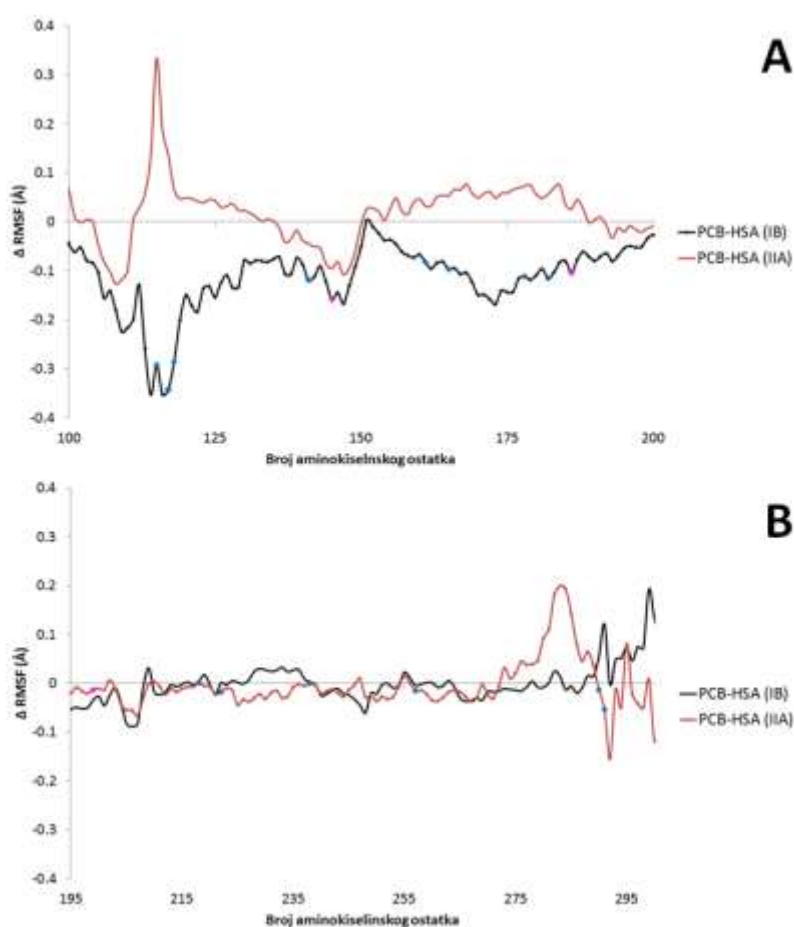
5.1.5. Lokalna mobilnost HSA i HSA-PCB(IB/IIA) tokom MD simulacije

Lokalna mobilnost slobodnog HSA i oba HSA-PCB kompleksa analizirana je računanjem RMSF vrednosti uprosečenih po vremenu. Generalno, pronađeno je da su fluktuacije atoma u slobodnom HSA i oba HSA-PCB kompleksa vrlo slične (**Grafik 3**).



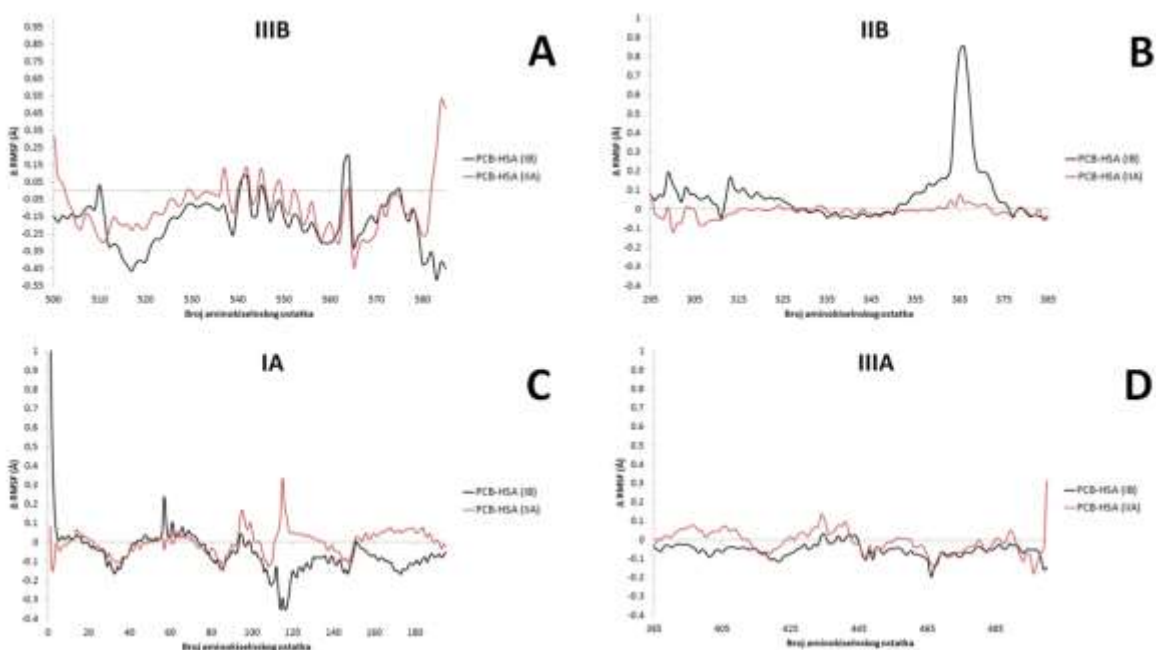
Grafik 3. RMSF vrednosti čitave proteinske sekvence slobodnog HSA, HSA-PCB(IB) i HSA-PCB(IIA) tokom 0,3 μ s MD simulacije.

Međutim, lokalne promene prilikom vezivanja liganda javljaju se ne samo u vezivnim mestima, već i u udaljenim regionima proteina, što može ukazati na sveukupnu promenu konformacije proteina. Vezivanje PCB-a za IB vezivno mesto uzrokuje smanjenje RMSF vrednosti ostataka koji pripadaju subdomenu IB (**Slika 33A**). Aminokiselinski ostaci 115–186, koji učestvuju u vezivanju PCB-a za mesto IB, sinergički rigidifikuju čitav IB subdomen. Iako vezivanje PCB-a za mesto IIA ne rigidifikuje značajno subdomen IIA, ono utiče na povećanje fleksibilnosti regiona (aminokiselinski ostaci 270–285) koji ne učestvuje u vezivanju (**Slika 33B**).



Slika 33. Razlika RMSF vrednosti između PCB-HSA kompleksa i slobodnog HSA sa obeleženim aminokiselinskim ostacima (plave i pink tačke) koji učestvuju u vezivanju PCB-a za mesto IB (A) i mesto IIA (B).

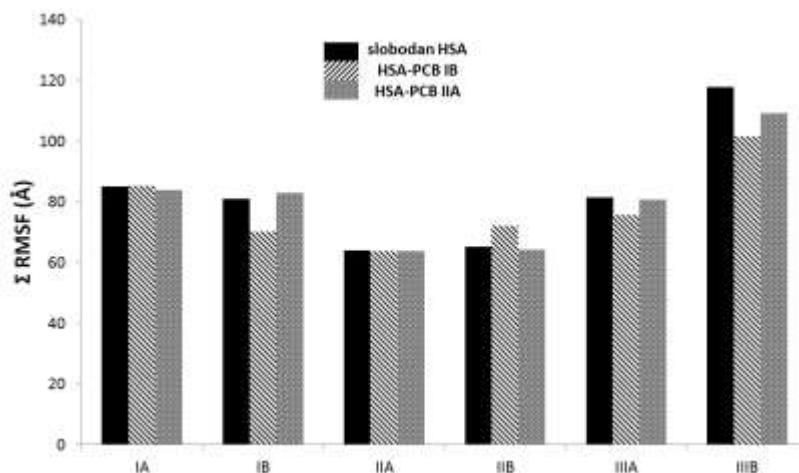
Najznačajniji uticaj vezivanja liganda na smanjenje mobilnosti HSA primećen je u subdomenu IIIB u oba ispitivana HSA-PCB sistema, pri čemu naglašeniji efekat ima vezivanje PCB-a za mesto IB (Slika 34A). Vezivanje PCB-a za mesto u subdomenu IB uzrokuje izražen porast RMSF vrednosti ostataka koji pripadaju subdomenu IIB (aminokiselinski ostaci 350–375) (Slika 34B), dok vezivanje PCB-a za mesto IIA dovodi do blago povećane mobilnosti subdomena IB (aminokiselinski ostaci 100–120) (Slika 34C).



Slika 34. Razlika RMSF vrednosti između PCB-HSA kompleksa i slobodnog HSA u subdomenima IIIB (A), IIB (B), IA (C) i IIIA (D).

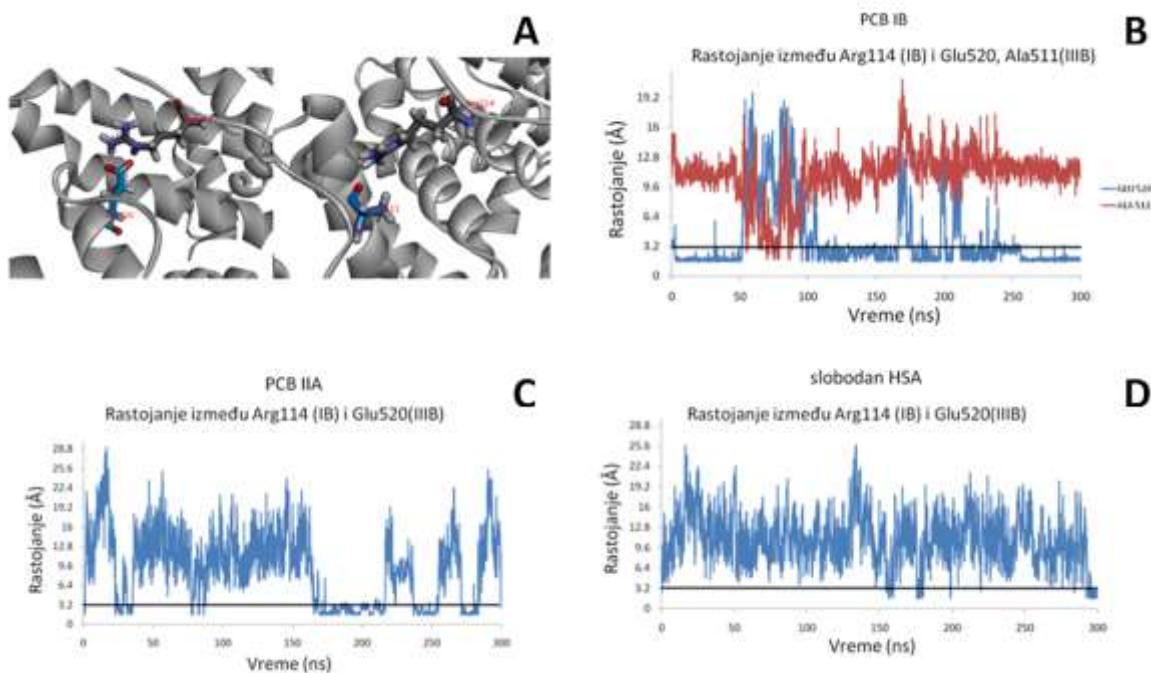
Kako vezivanje PCB-a smanjuje mobilnost nekih HSA regiona i povećava mobilnost drugih, da bi se dobio kvantitativni uvid u fleksibilnost individualnih domena u sva tri sistema izračunali smo sumu RMSF vrednosti svih aminokiselinskih ostataka za

svaki domen (**Grafik 4**). Tokom MD simulacije slobodnog HSA subdomen IIIB pokazuje najveću fleksibilnost, čak duplo veću od subdomena IIA i IIB. Vezivanje PCB-a za mesto IB indukuje povećanje rigidnosti subdomena IB i IIIB od 13% i 14%, respektivno, kao i povećanje fleksibilnosti subdomena IIB za 10%. Prilikom vezivanja PCB-a za mesto IIA dolazi do povećanja rigidnosti subdomena IIIB za 7%.



Grafik 4. Suma RMSF vrednosti svakog od subdomena slobodnog HSA, HSA-PCB(IIA) i HSA-PCB(IB).

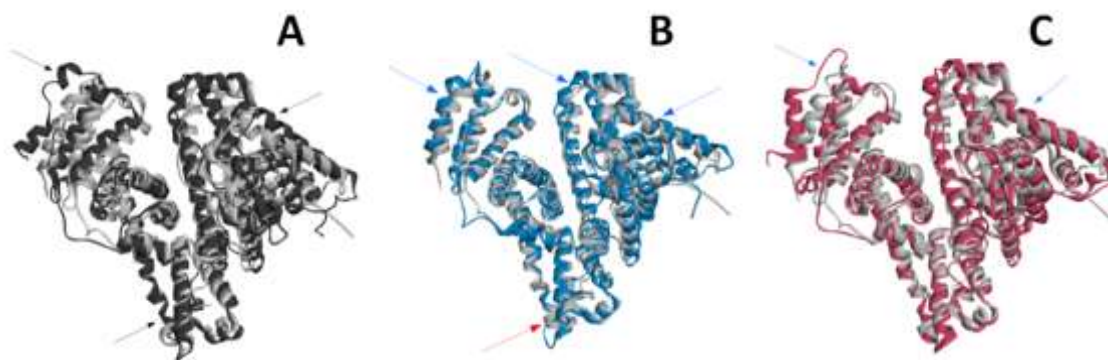
Interesantno je pomenuti da je rigidnost subdomena IIIB i IB, kada je PCB vezan za mesto IB, posledica interakcija između petlje koja pripada subdomenu IB i α -heliksa iz subdomena IIIB (**Slika 35A**). Pozicija PCB-a u mestu IB dozvoljava formiranje naizmeničnih vodoničnih veza Arg114 (IB) sa Glu520 i Ala511 (IIIB), što rezultuje stabilizacijom oba subdomena: IB i IIIB (**Slika 35B**). Kod slobodnog HSA nisu pronađene interakcije između ova dva subdomena (**Slika 35D**). Kada je PCB vezan za mesto IIA postoji delimična (oko 100 ns) interakcija (**Slika 35C**), koja dovodi do manje stabilizacije nego u slučaju HSA-PCB(IB).



Slika 35. Interakcija između Arg114, koji pripada petlji subdomena IB, i Glu520, koji pripada α -heliksi subdomena IIIB (**levo, A**). Interakcija između Arg114, koji pripada petlji subdomena IB, i Ala511, koji pripada petlji subdomena IIIB (**desno, A**); Rastojanje između atoma koji učestvuju u formiranju vodoničnih veza kod HSA-PCB(IIIB) (**B**), HSA-PCB(IIA) (**C**), i slobodnog HSA (**D**) tokom MD simulacije.

Razmatrajući RMSF vrednosti svih aminokiselinskih ostataka HSA nađeno je da vezivanje PCB-a za mesto IB i IIA dovodi do povećanja ukupne rigidnosti HSA za 5.4% i 2.1%, respektivno. Ovaj podatak sugerise na činjenicu da vezivanje PCB-a za bilo koje od ova dva mesta stabilizuje strukturu proteina. Ove promene u RMSF vrednostima odražavaju se i na kretanje subdomena HSA, kao što je prikazano na **slici 36A-C**.

Sveukupno, rezultati dobijeni MD simulacijom ukazuju na konformacione promene HSA prilikom vezivanja PCB-a, što može uticati na vezivna mesta drugih liganada (pogotovo na vezivno mesto hema). Takođe, vezivanje PCB-a uzrokuje veću kompaktnost proteina i smanjuje njegovu konformacionu mobilnost, sugerišući da je HSA u kompleksu sa PCB-em stabilniji od slobodnog proteina.



Slika 36. Konformacione promene slobodnog HSA (A), HSA-PCB(IB) (B) i HSA-PCB(IIA) (C) tokom MD simulacije. Početne strukture (0 ns) su prikazane sivom bojom, a finalne strukture (300 ns) crnom (slobodan HSA), plavom (HSA-PCB(IB)) i crvenom bojom (HSA-PCB(IIA)). Crvene strelice pokazuju regione HSA-PCB kompleksa sa povećanom mobilnošću, a plave sa smanjenom mobilnošću u poređenju sa slobodnim HSA (crne strelice).

5.1.6. Uticaj PCB-a na vezivanje drugih liganada za HSA

Studija konformacionih promena tokom MD simulacije, koje nastaju prilikom vezivanja PCB-a za bilo koje od dva moguća vezivna mesta na HSA, omogućila nam je teorijsko ispitivanje efekta vezivanja više liganada za HSA ili za HSA u kompleksu sa PCB-em. Proučavali smo nekoliko relevantnih fizioloških liganada, kao što su bilirubin, varfarin, indometacin, fuzidinska kiselina, tiroksin, diazepam, ibuprofen, diklofenak, hemin, azapropazon, miristinska kiselina i PCB. Korišćeni pristup uključivao je doking liganada na početnu konformaciju i analizu konformacije koju protein zauzima nakon MD simulacije (**Slika 36A-C**).

Tokom MD simulacije HSA menja svoju konformaciju, uzrokujući smanjenje vezivne energije za gotovo sve ligande nakon simulacije, u odnosu na početnu kristalnu strukturu (**Tabela 7**). Nakon MD simulacije HSA sa PCB-em vezanim za mesto IIA, došlo je mahom do smanjenja vrednosti vezivne energije liganada u mestima IA, IB, IIIA i IIIB. Međutim, nakon MD simulacije HSA sa PCB-em vezanim za mesto IB, vezivne energije su

bile ili smanjene ili povećane. Interesantno je pomenuti da su vezivne energije liganada vezanih za mesto IIB bile povećane, bilo da je PCB vezan za mesto IB, ili IIA. Stoga, se može zaključiti da konformaciona promena izazvana vezivanjem PCB-a za mesto IIA generalno negativno utiče na vezivanje različitih liganada u mestima IA, IB, IIIA, i IIIB. Suprotno tome, konformacija koju HSA zauzima kada je PCB vezan za bilo koje od dva visoko-afinitetna mesta favorizuje vezivanje liganada koji se specifično vezuju za mesto IIB. Naši podaci ukazuju da stabilizacija strukture HSA prilikom vezivanja PCB-a uz promenu konformacije proteina može uticati na vezivanje drugih liganada (uključujući PCB) za ostala vezivna mesta.

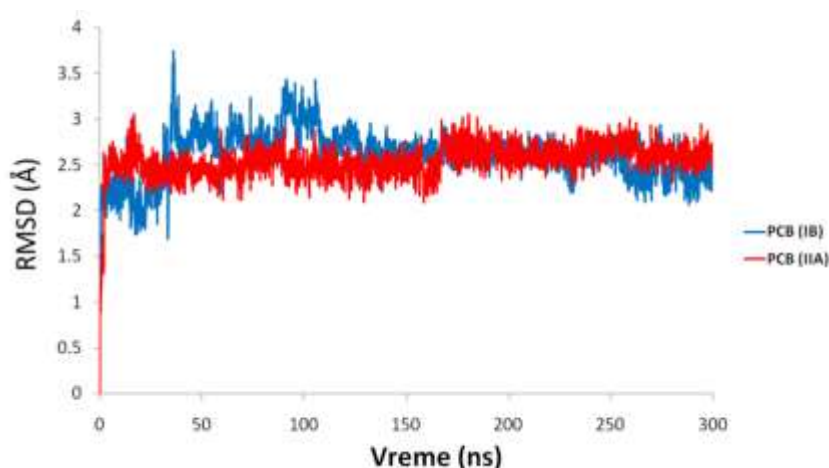
Tabela 7. Vezivne energije (kcal/mol) različitih liganada udokovanih na slobodan i HSA-PCB kompleks (na mestu IB ili IIA) pre i nakon 300 ns MD simulacije. Δ - razlika u vezivnoj energiji odgovarajućeg liganada za slobodan HSA nakon MD simulacije i za HSA-PCB kompleks nakon MD simulacije.

Ligand	Vezivno mesto	HSA pre MD	HSA posle MD	HSA-PCB (IB) posle MD	HSA-PCB (IIA) posle MD	Δ HSA - HSA-PCB (IB) posle MD	Δ HSA - HSA-PCB (IIA) posle MD
Varfarin	IIA	-8,8	-7,5	-7,0	-----	-0,5	-----
Indometacin	IB	-8,4	-7,4	-----	-6,7	-----	-0,7
	IIA	-8,2	-6,9	-6,9	-----	0,0	-----
Bilirubin	IB	-9,8	-7,5	-----	-8,3	-----	0,8
	IIA	-8,3	-7,6	-6,1	-----	-1,5	-----
Fusidic acid	IB	-8,8	-7,4	-----	-6,8	-----	-0,6
	IIIB	-6,5	-5,3	-4,7	-5,3	-0,6	0,0
	IIA	-6,4	-6,0	-5,7	-----	-0,3	-----
Tiroksin	IIIA	n/a	-6,4	-5,3	-4,4	-1,1	-2,0
	IIIB	-5,3	-5,4	-3,6	-5,0	-1,8	-0,4
	IB	-8,2	-7,8	-----	-6,6	-----	-1,2
Diazepam	IIIA	n/a	-6,9	-7,2	-6,3	0,3	-0,6
Ibuprofen	IIIB	-6,8	-6,2	-6,8	-6,8	0,6	0,6
	IIIA	-5,9	-6,1	-6,5	-6,4	0,4	0,3
Azapropazon	IB	-8,1	-7,3	-----	-6,8	-----	-0,5
	IIA	-8,1	-7,2	-6,3	-----	-0,9	-----
Diklofenak	IB	-7,3	-7,0	-----	-6,1	-----	-0,9
	IIA	-8,1	-6,2	-6,4	-----	0,2	-----
	IIIB	-7,2	-6,6	-7,1	-6,9	0,5	0,3
Mnistijska kiselina	IIA	-5,9	-5,3	-5,3	-----	0,0	-----
	IB	-6,0	-5,6	-----	-4,4	-----	-1,2
	IA	-4,4	-4,2	-4,3	-4,6	0,1	0,4
	IIIB	-5,6	-4,9	-5,2	-5,8	0,3	0,9
	IIIA	-6,0	-5,4	-5,6	-5,1	0,2	-0,3
	IIIB	-3,8	-4,4	-4,8	-4,5	0,4	0,1
	IB	-10,2	-8,9	-----	-8,7	-----	-0,2
PCB	IIA	-10,0	-8,5	-8,1	-----	-0,4	-----

5.1.7. Promena konformacije PCB-a vezanog za HSA tokom MD simulacije

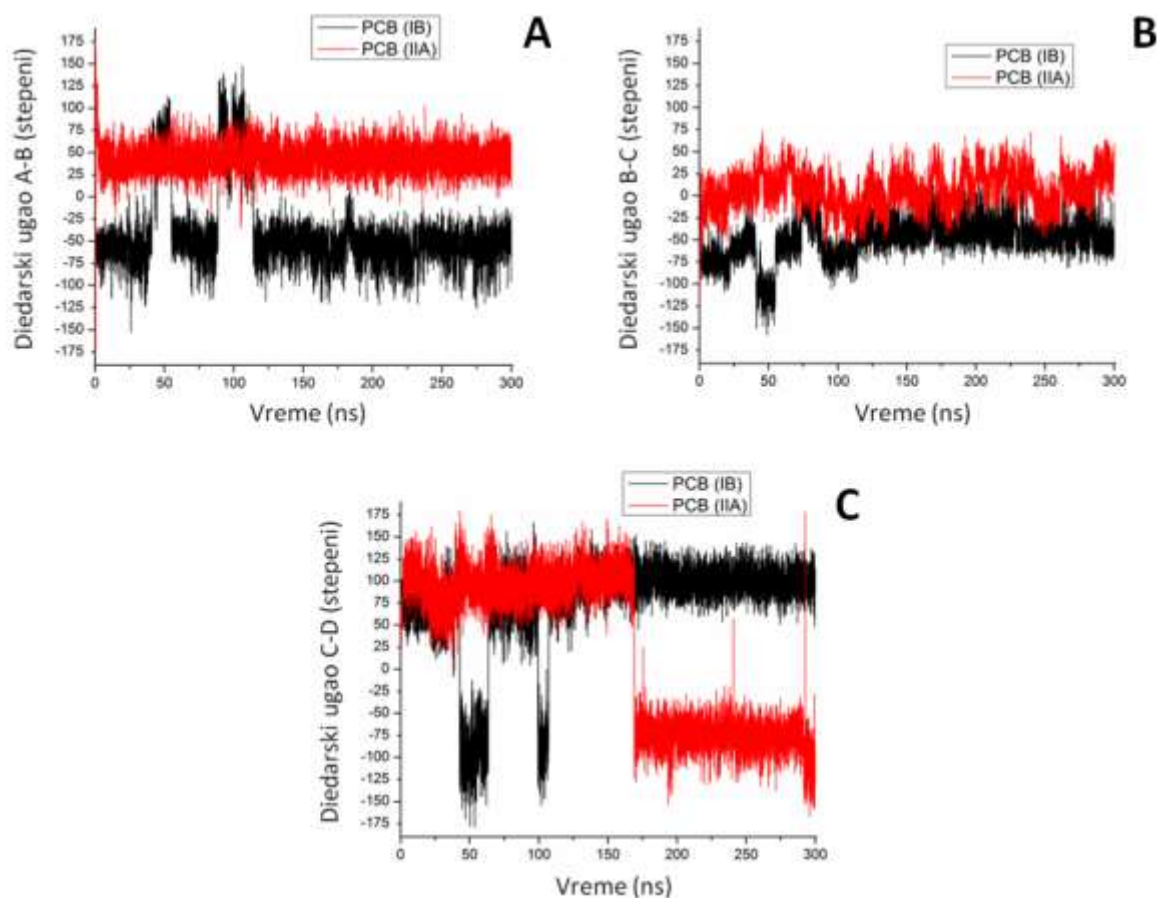
U vodenim rastvorima se PCB nalazi u monoanjonskoj helikoidnoj konformaciji sa jonizovanom prvom karboksilnom grupom [126]. Rotacija oko egzocikličnih jednostrukih veza metilenskih mostova i protonovano stanje propionskih grupa omogućava postojanje različitih konformera PCB-a. Iako ovaj ligand poseduje veliku konformacionu fleksibilnost, ciklična helikoidna SSS konformacija je najstabilnija [38].

Kako bismo ispitali konformaciju liganda tokom MD simulacije proučavali smo RMSD i RMSF vrednosti, kao i diedarske uglove između pirolovih prstenova PCB-a. RMSD vrednost liganda dostiže ravnotežno stanje nakon 110 ns i 170 ns kada je vezan za mesto IB odnosno IIA, respektivno (**Grafik 5**). U poređenju sa vrednostima proteinske kičme, koji se kreću u opsegu 2.5–4.5 Å (**Grafik 1**), RMSD vrednosti vezanog liganda nalazi se u opsegu 1.7–3.5 Å, što ukazuje da struktura proteina više fluktuiira od strukture liganda. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa činjenicom da ligand pokazuje visoki afinitet vezivanja za HSA i sugerise na to da je udokovana struktura HSA-PCB kompleksa stabilna tokom čitave MD simulacije.



Grafik 5. RMSD vrednosti molekula PCB vezanog u mestu IB (plavo) i IIA (crveno) tokom 0,3 μ s MD simulacije.

Prilikom proučavanja konformacije PCB-a ispitivani su i diedarski uglovi između prstenova A i B, B i C, kao i C i D (**Tabela 8**). Kada se PCB nalazi u mestu IIA, diedarski ugao između prstena A i B je stabilan tokom simulacije (**Slika 37A**), kao i ugao između prstenova B i C (**Slika 37B**). Međutim, diedarski ugao između prstenova C i D (**Slika 37C**) se dramatično menja na 169 ns, u isto vreme kada se menja i konformacija HSA (**Grafik 1 i Slika 32C**), ukazujući na simultanu promenu konformacije proteina i liganda.



Slika 37. Diedralski uglovi PCB-a vezanog za HSA u mestu IB (crno) i IIA (crveno) tokom 300 ns MD simulacije. Diedralski uglovi između prstenova A i B (**A**), prstenova B i C (**B**) i prstenova C and D (**C**).

Sa druge strane, kada je PCB vezan za mesto IB svi diedarski uglovi postaju stabilni nakon 107 ns (**Slika 37A-C**). U oba slučaja, kada je PCB vezan i za mesto IB i za IIA,

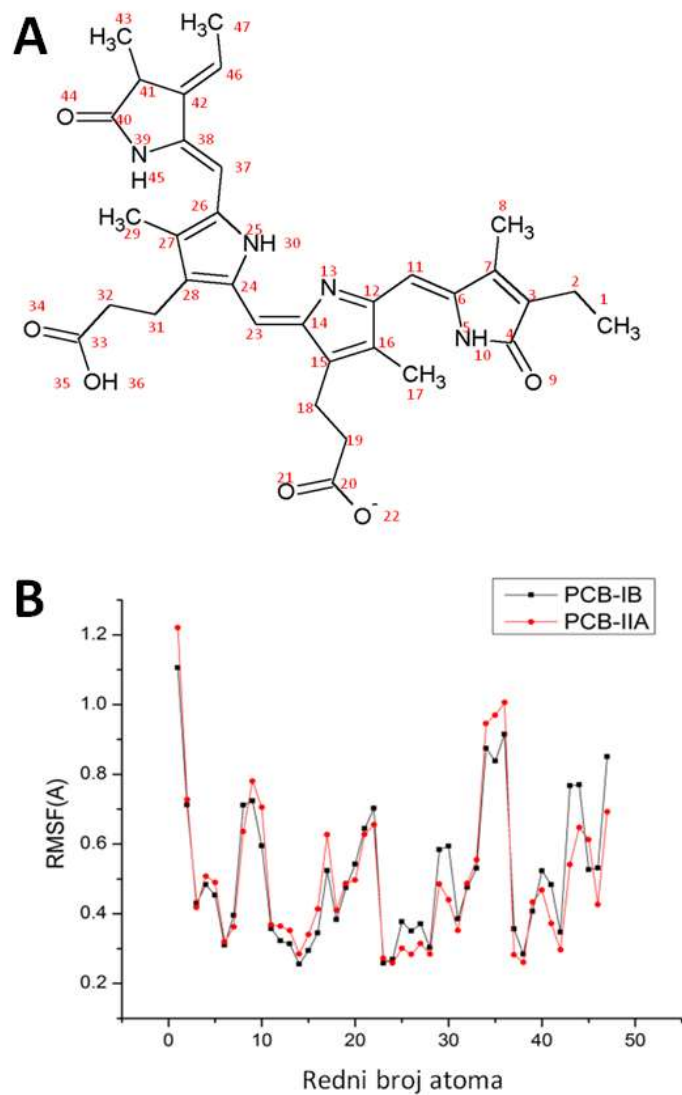
uglovi između prstenova B i C su najstabilniji (**Slika 37B**). RMSF vrednosti svih teških atoma PCB-a (**Slika 38A**) su slične kada je PCB vezan bilo za mesto IB ili IIA (**Slika 38B**), gde atomi pirolskih prstenova pokazuju najmanju fleksibilnost. Atomi unutrašnjih prstenova (B i C) su rigidniji od spoljašnjih prstenova (A i D), pri čemu centralni mostni atomi pokazuju daleko najniže fluktuacije, što je u saglasnosti sa primećenom najvišom stabilnošću diedarskih uglova između prstenova B i C. Ovi rezultati sugerišu da je PCB stabilan u kompleksu sa HSA tokom čitavog vremena simulacije, kao i da podleže konformacionoj promeni u svom vezivnom mestu tokom MD simulacije.

Tabela 8. Apsolutne vrednosti diedarskih uglova početne strukture PCB-a i prosečne vrednosti diedarskih uglova izračunatih pre i nakon konformacione promene liganda (na 107 ns za PCB-IB i na 169 ns za PCB-IIA).

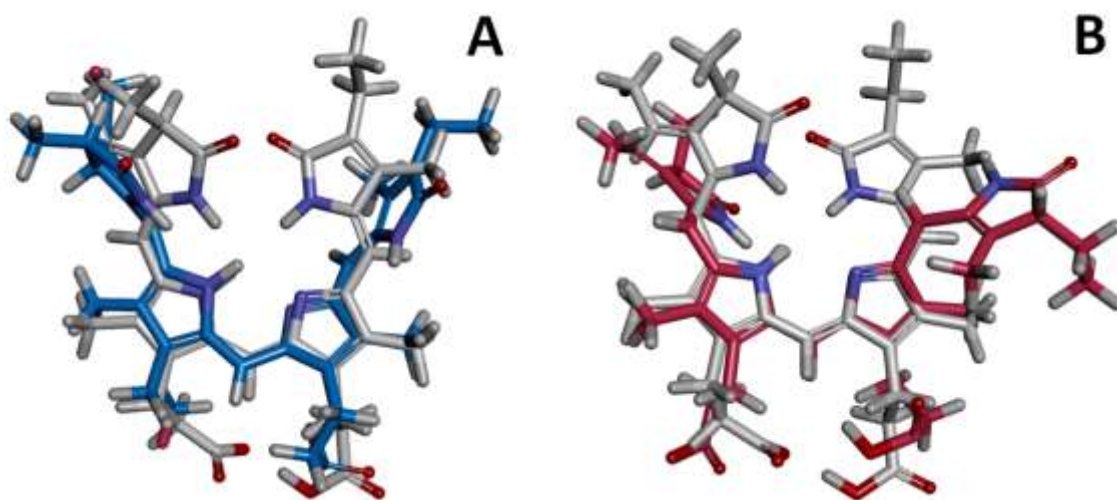
Pirolski prstenovi	Slobodan PCB	Apsolutne vrednosti prosečnih diedarskih uglova			
		IB mesto		IIA mesto	
		0-107 ns	107-300 ns	0-169 ns	169-300 ns
A-B	21,28	59,41	55,52	44,45	43,43
B-C	1,06	63,56	40,60	16,57	20,03
C-D	7,42	76,40	98,41	96,75	77,25

U cilju određivanja konformacija PCB-a vezanog za HSA, izračunati su diedarski uglovi između pirolskih prstenova PCB-a dobijeni MD simulacijom. Prosečne apsolutne vrednosti diedarskih uglova tokom 0,3 μ s MD simulacije, pre i nakon konformacione promene PCB-a (na 107 ns za HSA-PCB(IB) i na 169 ns za HSA-PCB(IIA)), prikazane su u **tabeli 8**. Diedarski uglovi od 0°-90° mogu se pripisati sin (S) konformerima, dok uglovi koji imaju vrednosti od 90°-180° predstavljaju anti (A) konformere. Uzimajući u obzir činjenicu da slobodan PCB ima SSS, cikličnu, helikoidnu konformaciju [38], vrednosti prikazane u **tabeli 8** ukazuju da PCB u kompleksu sa HSA, u oba vezivna mesta ima opruženiju konformaciju, u poređenju sa slobodnom formom. Konformer u subdomenu IIA zauzima SSA konformaciju do konformacione promene u 169 ns, dok konformer u subdomenu IB prelazi u opruženiju SSA konformaciju nakon promene njegove

konformacije na 107 ns, i tako postaje više izdužen na kraju simulacije. Preklopljene strukture vezanog PCB-a, pre i nakon MD simulacije, prikazane su na **slici 39A i B**.



Slika 38. (A) Struktura PCB-a sa obeleženim brojevima atoma; (B) RMSF vrednosti (Å) teških i polarnih vodonikovih atoma PCB-a u kompleksu sa HSA (u vezivnom mestu IB ili IIA) tokom 300 ns MD simulacije.



Slika 39. Konformacione promene PCB-a vezanog za mesto IB (A) i mesto IIA (B) nakon MD simulacije. Početne strukture (0 ns) su prikazane sivom bojom, a finalne strukture (300 ns) plavom (PCB-IB) i crvenom bojom (PCB-IIA).

5.2. Vezivanje EGCG-a za holo i apo formu ALA

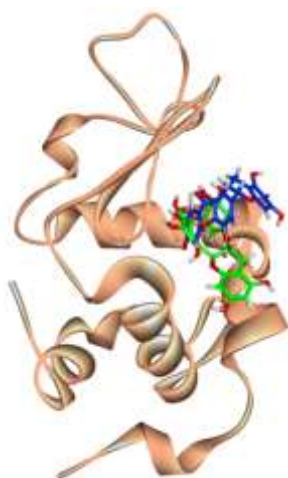
Kako se čaj vrlo često konzumira sa mlekom, biodostupnost glavnog katehina zelenog čaja, EGCG-a, uglavnom je određena brojem i vrstom interakcija koje stvara sa proteinima mleka. U našoj predhodnoj studiji smo pokazali sa se EGCG vezuje za holoformu ALA pri fiziološkim uslovima. U ovoj doktorskoj disertaciji cilj je bio da ispitamo kako EGCG vezivanjem utiče na stabilnost kako holoALA (sa vezanim Ca^{2+} -jonom), tako i apoALA (bez vezanog Ca^{2+} -jona), i da ih zatim uporedimo. Pored toga, naročita pažnja je posvećena proučavanju uticaja vezivanja EGCG-a na Ca^{2+} - vezujuće mesto obe ALA forme. Stoga je u studiji molekuskog dokinga i MD studiji korišćena je ista kristalna struktura (PDB kod: 1F6S), pri čemu je za ispitivanje vezivanja EGCG-a za apoALA uklonjen jon Ca^{2+} .

5.2.1. Doking analiza vezivanja EGCG-a za apoALA

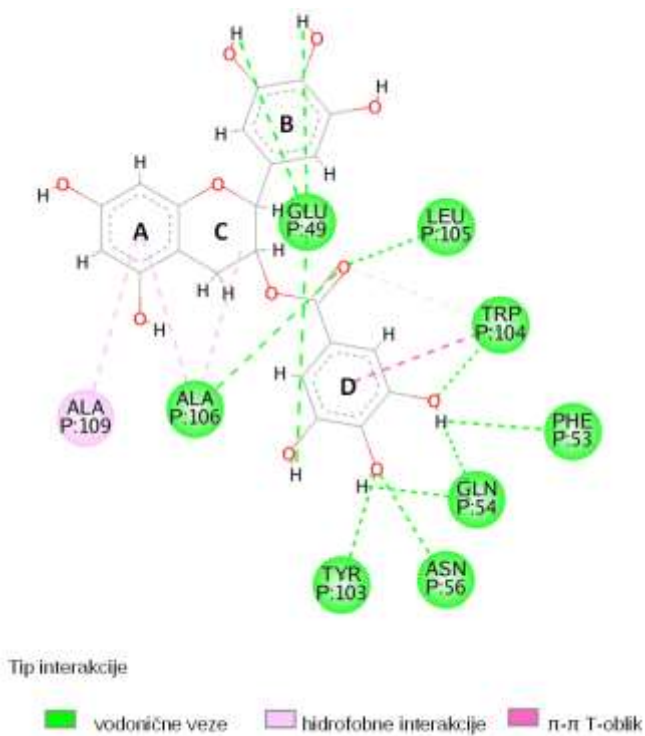
U našoj prethodnoj studiji, molekuskim dokingom smo pokazali da se EGCG vezuje u hidrofobnom džepu holoALA, koji se nalazi između subdomena sačinjenih od α -heliksa i β -pločica i uključuje ostatke aromatičnog klastera II (**Slika 40**) [92]. U ovoj disertaciji, molekulski doking je pokazao da se EGCG vezuje i za apo formu ALA vezan na neutralnom pH, i da je pozicionirane na sličnom mestu kao i kod holoALA, i interagujućisa sličnim setom aminokiselinskih ostataka kao i kada je vezan za holoALA (**Tabela 9, Slika 40**). Prilikom vezivanja za apoALA dve hidroksilne grupe B prstena EGCG-a formiraju vodonične veze sa bočnim lancem Glu49, dok hidroksilne grupe D prstena stvaraju vodonične veze sa glavnim lancem Phe53, Gln54, kao i bočnim lancima Glu49, Asn56, Tyr103 i Trp104. Trp104 je uključen i u π - π interakcije T-oblika sa D prstenom EGCG-a, dok karboksilatna grupa gradi vodonične veze sa Leu105 i Ala106. U hidrofobnim interakcijama učestvuju Ala106 i Ala109 sa prstenovima A i C (**Slika 41**).

Tabela 9. Aminokiselinski ostaci koji interaguju sa EGCG-om (*), pronađeni dokingom na apoALA i holoALA, kao i aminokiselinski ostaci koji interaguju sa EGCG-om u reprezentativnim strukturama tri glavna klastera apoALA i holoALA nakon MD simulacije. Interakcije vitamina D udokovanog za holoALA prikazane su radi poređenja [263]. EGCG-interagujuće hidrofobne interakcije aminokiselinskih ostataka osenčene su žuto (aromatični klaster I) i zeleno (aromatični klaster II). Za oba kompleksa, apoALA i holoALA, sve konformacije tokom 40 ns MD simulacije su klasterovane i za najreprezentativnije strukture tri glavna klastera su ispitivane interakcije sa EGCG-om.

	apoALA-EGCG*	apoALA-EGCG CL. 1	apoALA-EGCG CL. 2	apoALA-EGCG CL. 3	holoALA-EGCG*	holoALA-EGCG CL. 1	holoALA-EGCG CL. 2	holoALA-EGCG CL. 3	holoALA-Vit D*
His32			•	•	•				•
Thr33			•	•	•				•
Val42				•					
Asn44				•	•				•
Glu49	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Phe 53	•			•	•	•	•	•	
Gln54	•	•		•	•	•	•	•	•
Asn56	•							•	•
Lys58									•
Asn102						•	•	•	
Tyr103	•	•		•	•	•	•	•	•
Trp104	•		•	•	•	•	•	•	•
Leu105	•	•	•	•	•				•
Ala106	•	•	•	•	•				•
Ala109	•			•					•
Leu110		•	•	•					•



Slika 40. Poređenje viisokoafinitetnih mesta vezivanja EGCG-a za apoALA i holo ALA, dobijenih simulacijom molekuskog dokinga (PDB ID 1F6S). EGCG je prikazan zelenom bojom prilikom vezivanja za apoALA i plavom bojom prilikom vezivanja za holoALA.



Slika 41. 2D dijagram interakcija koje ostvaruje EGCG sa apoALA dobijene studijom molekuskog dokinga.

5.3. MD simulacija apoALA-EGCG

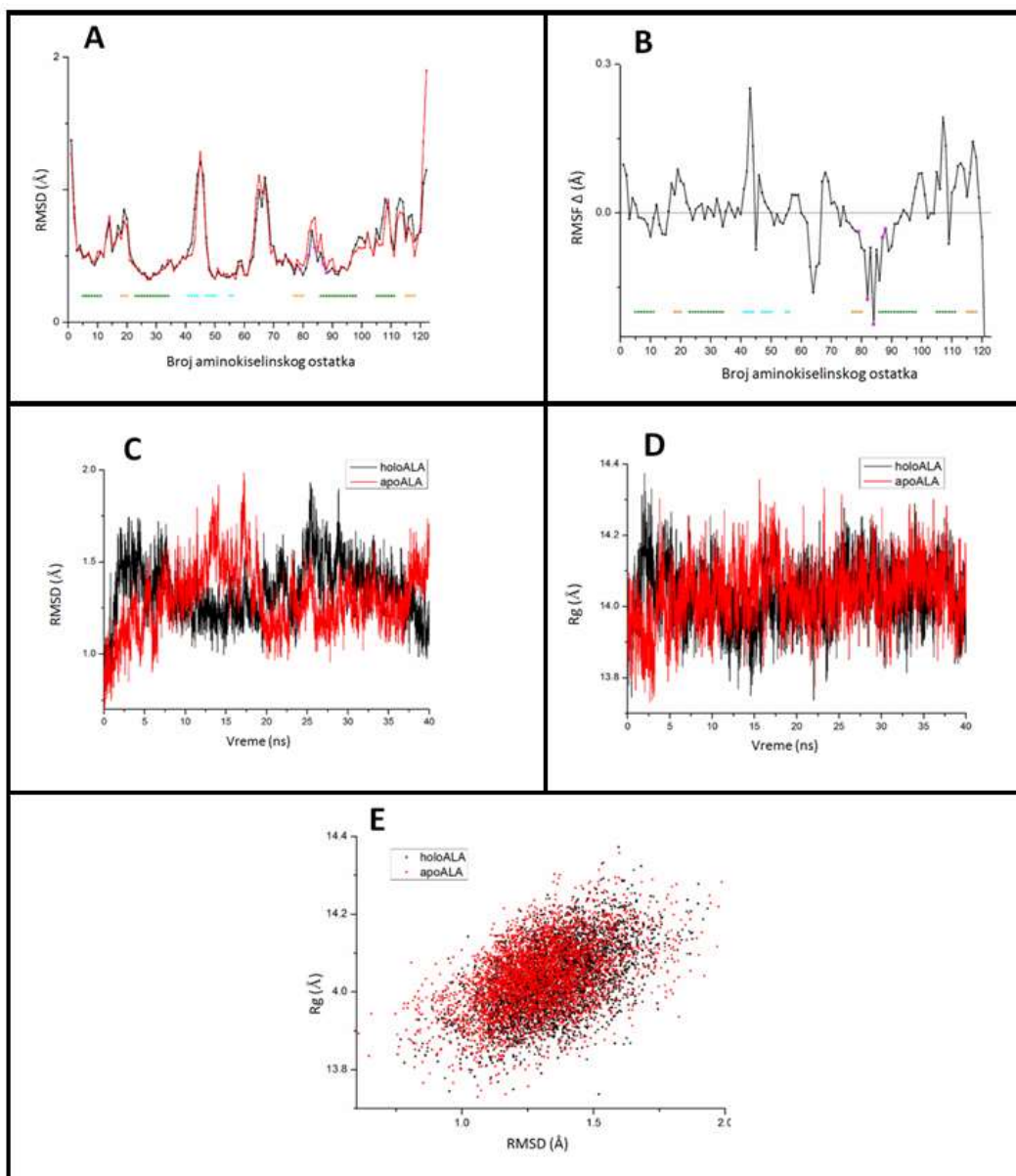
U cilju ispitivanja konformacione stabilnosti apoALA u kompleksu sa EGCG-om izvedene su četiri MD studije koje su uključivale sledeće sisteme: holoALA, apoALA, holoALA-EGCG kompleks i apoALA-EGCG kompleks. Nakon 40ns MD simulacije, strukture su klasterovane i tri glavna klastera su potom ispitana. EGCG-apoALA interakcije pronađene dokingom potvrđene su u sva tri glavna klastera dobijena MD simulacijom, sugerišući da EGCG ostaje vezan za predloženo mesto tokom čitave simulacije. Pored interakcija pronađenih molekulskim dokingom, pokazano je da je još nekoliko novih aminokiselinskih ostataka uključeno u interakcije EGCG-a sa apoALA (His32, Thr33, Val42, Asn44 i Leu110). Interesantno je da su svi ostaci holoALA i apoALA koji učestvuju u interakcijama sa EGCG-om učestvuju u interakcijama vitamina D dokovanog za ALA [263], dodatno ukazujući na isto vezivno mesto (**Tabela 9**).

5.3.1. Stabilnost apoALA i holoALA

Kako bi smo ispitili stabilnost samog proteina obe forme ALA, analizirane su RMSF vrednosti slobodnih holoALA i apo ALA nakon 40 ns MD simulacije. Poređenjem RMSF vrednosti proteinske kičme holoALA i apo ALA (**Slika 42A**) pokazano je da uklanjanje Ca^{2+} -jona utiče na veću fleksibilnost Ca^{2+} -vezivnog regiona (uključujući H3-heliks, 75–96 ak), C-terminal i petlju 2 (60–66 ak), uz blago povećanje rigidnosti drugih regiona proteina. Dobijeni RMSF profili su u skladu sa prethodno dobijenim B-faktorima kristalnih struktura holoALA i apoALA [56], koji takođe pokazuju da odsustvo Ca^{2+} -jona utiče na blago povećanje mobilnosti Ca^{2+} -vezivnog regiona i C-terminala, a smanjenje mobilnosti β -subdomena. Pored toga, NMR spektroskopija, u studiji Wijesinha-Bettoni *i sar.* je pokazala da u odsustvu Ca^{2+} dolazi do značajnog povećanja dinamike ALA u Ca^{2+} -vezujućem regionu i H3 heliksu. [264]. Štaviše, NMR spektroskopija u realnom vremenu iz iste studije je pokazala da konverzija holoALA u apoALA uključuje lokalne reorganizacije strukture u blizini Ca^{2+} -vezivnog mesta. I kristalna struktura i NMR studija apoALA urađene su pri visokoj koncentraciji NaCl, i predstavljaju nativnu formu apoALA. Takođe,

obe studije potvrđuju da stabilizacija native forme apoALA pri višoj koncentraciji monovalentnih katjona zapravo proizilazi iz zasenjenja odbojnih negativnih naelektrisanja u Ca^{2+} -vezivnom regionu, a ne usled njihovog specifičnog vezivanja kako bi se zamenio Ca^{2+} -jon.

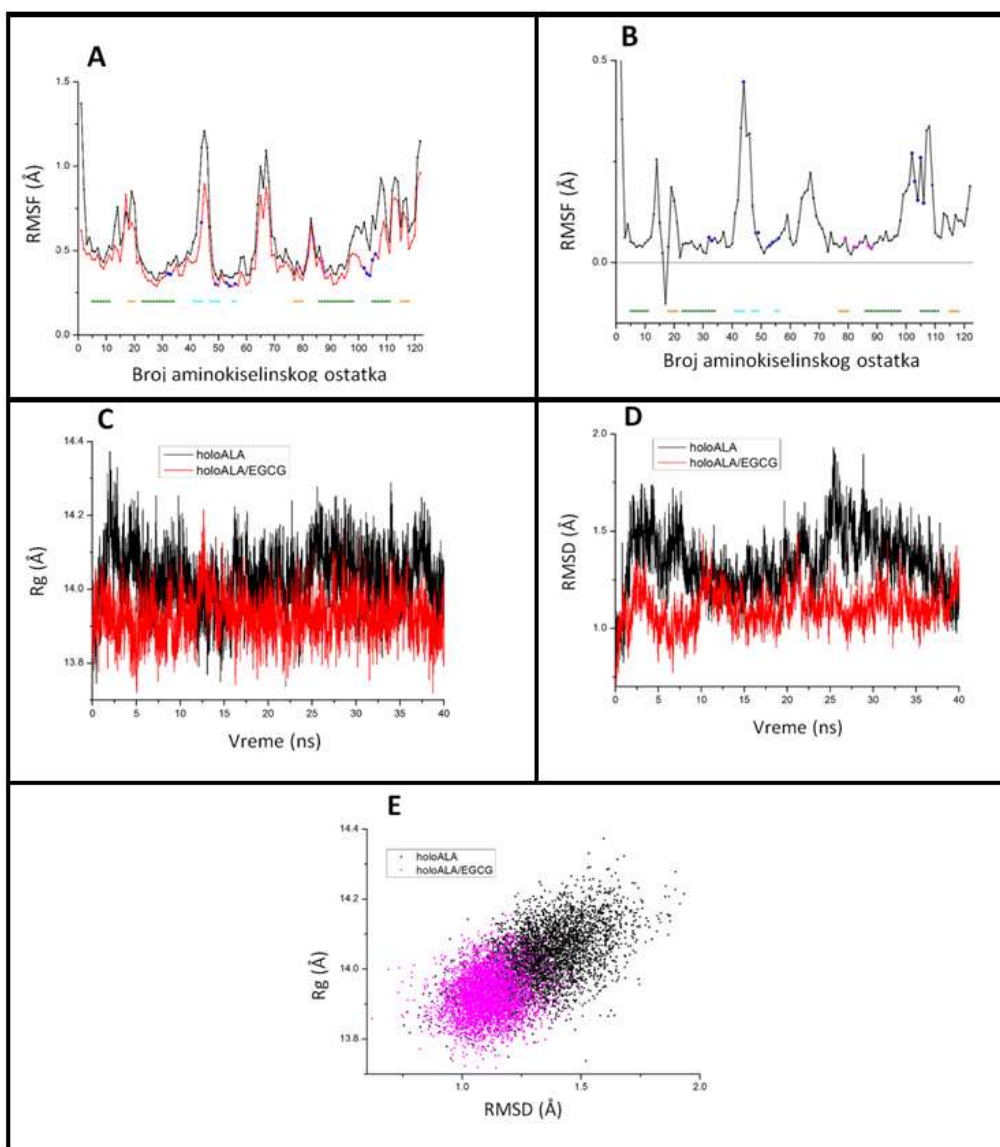
U našoj MD simulaciji početne strukture bile su solvatisane sa dodatkom Na^+ i Cl^- jona (150 mM) kako bi se neutralisalo ukupno naelektrisanje proteina. Sve navedeno ukazuje na to da uklanjanje Ca^{2+} -jona iz kristalne strukture holoALA (PDB kod: 1F6S) nastaje struktura koja se ponaša kao native struktura apoALA, i da se i tokom MD simulacije naš tako dobijeni apoALA ponaša zapravo kao native apoALA. Tokom MD simulacije vrednosti radijusa žiracije (R_g) obe ALA forme pokazuju slične vrednosti, dok konformacije kroz koje prolazi apoALA pokazuju nešto niže RMSD vrednosti nego holoALA, sugerišući da ove dve strukture imaju sličnu kompaktnost. Takođe, prikaz odnosa R_g i RMSD vrednosti pokazuje da je konformacioni prostor koji zauzimaju holoALA i apoALA strukture veoma sličan.



Slika 42. **A** Izračunate RMSF vrednosti holoALA (crno) i apoALA (crveno) **B** Razlika RMSF vrednosti između holoALA i apoALA. Na obe slike obeleženi aminokiselinski ostaci koji učestvuju u vezivanju Ca^{2+} jona (roze tačke), EGCG-a (plavo) i regioni sa sekundarnom strukturom: α -heliks (zeleno), 3_{10} -heliks (narandžasto) i β -pločice (tirkizno). **C** Izračunate RMSD vrednosti holoALA i apoALA, **D** Izračunate Rg vrednosti holoALA i apoALA, **E** Prikaz zavisnosti Rg i RMSD vrednosti kao reprezentacija konformacionog prostora koji zauzimaju holoALA i apoALA tokom MD simulacije.

5.3.2. Stabilnost holoALA i holoALA-EGCG

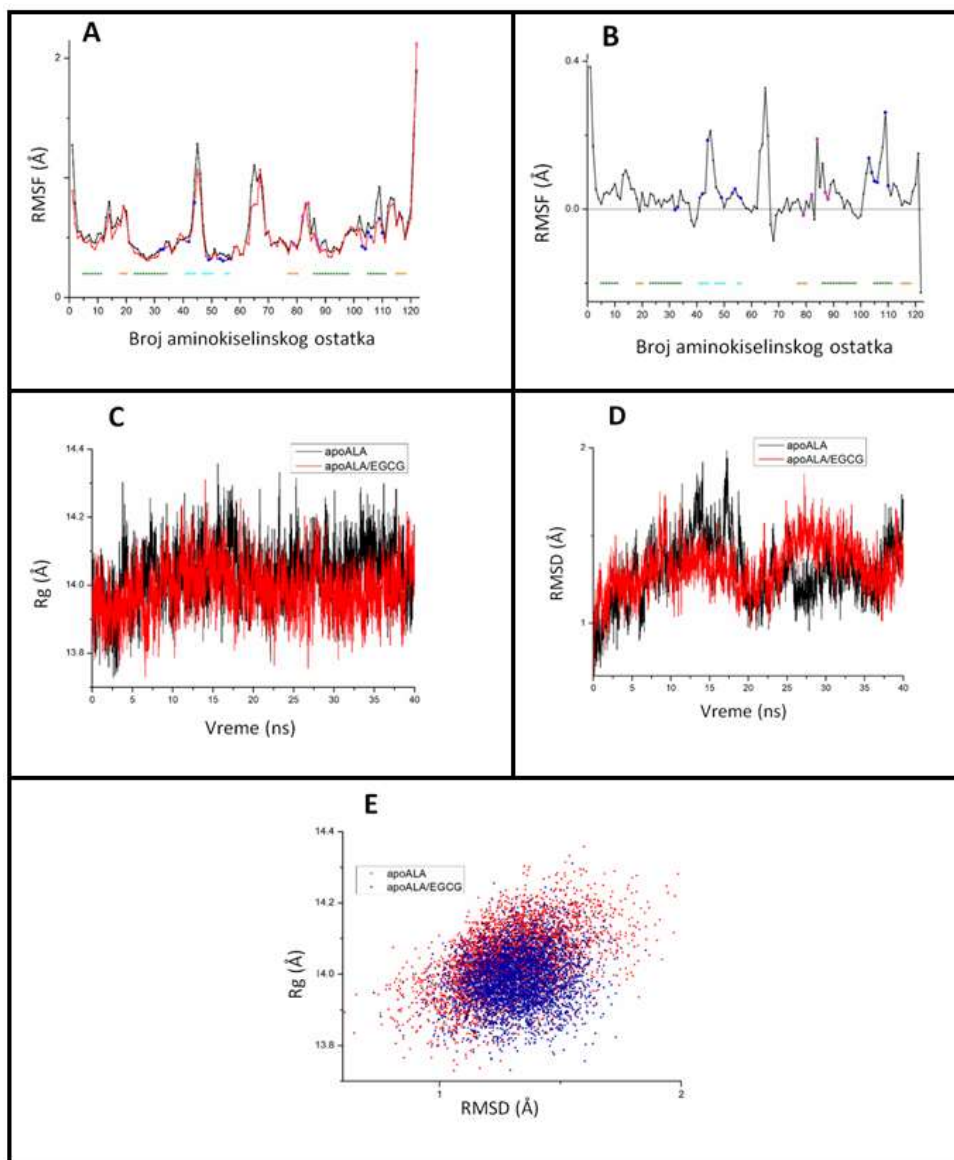
Poređenjem RMSF profila holoALA i holoALA-EGCG može se uočiti da je čitava sekvenca holoALA stabilizovana vezivanjem EGCG-a (**Slika 43A**), pri čemu su petlje koje pripadaju β -lobu i 97–110 ak regioni najviše stabilizovani (**Slika 430B**). Stabilizacija regiona 100–110 ak i petlje 1 (43–47 ak), koja pripada β -subdomenu, je direktna posledica interakcija aminokiselinskih ostataka koji se tu nalaze sa EGCG-om (**Slika 43B**). Vezivanje EGCG-a indukuje veću stabilnost i kompaktnost holoALA, što se reflektuje u odgovarajućim nižim Rg i RMSD vrednostima u kompleksu holoALA-EGCG, u odnosu na slobodan holoALA (**Slika 43C-D**). Prikaz odnosa zavisnosti Rg i RMSD vrednosti pokazuje da je konformacioni prostor koji zauzima holoALA-EGCG znatno kompaktniji u odnosu na onaj koji zauzima slobodan holoALA. Naime, koncentrovana populacija holoALA-EGCG konformacija, u odnosu na dosta difuzniju holoALA populaciju, ukazuje na su konformacione promene holoALA-EGCG tokom MD simulacije mnogo suptilnije nego one kod holoALA. Svi ovi rezultati pokazuju da prisustvo EGCG-a kao liganda značajno stabilizuje strukturu holoALA.



Slika 43. **A** Izračunate RMSF vrednosti holoALA i holoALA-EGCG, **B** Razlika RMSF vrednosti između holoALA i holoALA-EGCG Na obe slike su obeleženi aminokiselinski ostaci koji učestvuju u vezivanju Ca^{2+} -jona (roze tačke), EGCG-a (plave tačke) i regioni sa sekundarnom strukturom: α -heliks (zeleno), 3_{10} -heliks (narandžasto) i β -pločice (tirkizno). **C** Izračunate Rg vrednosti holoALA i holoALA-EGCG, **D** Izračunate RMSD vrednosti holoALA i holoALA-EGCG, **E** Prikaz zavisnosti Rg i RMSD vrednosti kao reprezentacija konformacionog prostora koji zauzimaju holoALA i holoALA-EGCG tokom MD simulacije.

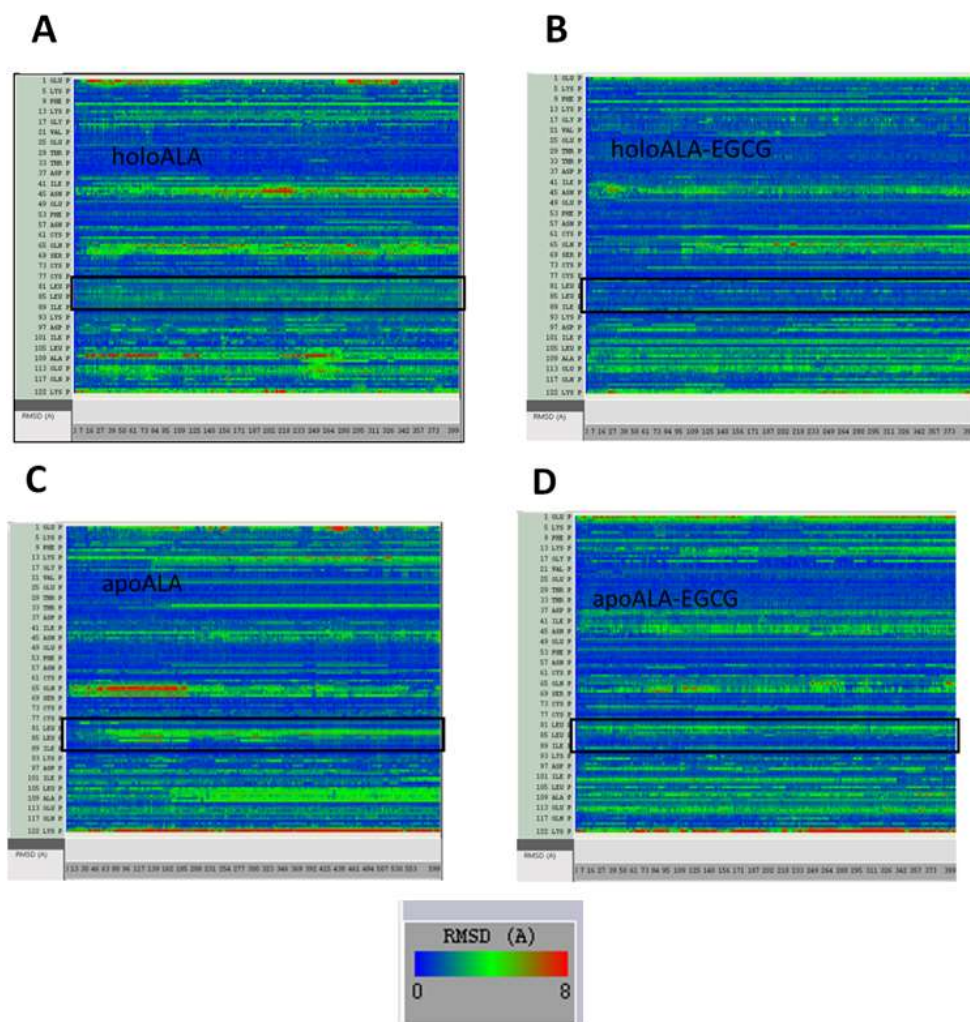
5.3.3. Stabilnost apoALA i apoALA-EGCG

Poređenje RMSF profila apoALA i apoALA-EGCG pokazuje da vezivanje EGCG-a za apoALA takođe smanjuje fleksibilnost proteina, uglavnom u petljama β -subdomena i u 97–110 ak regionu (**Slika 44A i B**). Detaljnijim razmatranjem RMSF vrednosti utvrđeno je da vezivanje EGCG-a za apoALA dodatno stabilizuje i Ca^{2+} -vezivnu petlju, pogotovo H3 heliks (84–98 ak), koji se sadrži Ca^{2+} -vezujuće ostatke Asp84, Asp87 and Asp88. Kao što je prethodno pomenuto, ovo je glavni region koji je destabilizovan prilikom uklanjanja Ca^{2+} -jona iz holoALA (**Slika 43A i B**). Ovo ukazuje na činjenicu da vezivanje EGCG-a može povratiti stabilnost Ca^{2+} -vezivnog regiona u nativnoj formi apoALA. Dodatno, stabilizacija pri vezivanju EGCG-a se može potvrditi i iz nižih Rg i RMSD vrednosti apoALA kompleksiranog sa EGCG-om u odnosu na slobodan apoALA (**Slika 44C i D**), kao i kompaktnije strukture apoALA-EGCG (**Slika 44E**). Nešto manje difuzna populacija konformacija apoALA-EGCG, u odnosu na apoALA, ukazuje na užu opseg konformacionih promena u prisustvu EGCG-a, dodatno potvrđujući EGCG-stabilišući efekat.



Slika 44. **A** Izračunate RMSF vrednosti apoALA i apoALA-EGCG, **B** Razlika RMSF vrednosti između apoALA i apoALA-EGCG. Na obe slike su obeleženi aminokiselinski ostaci koji učestvuju u vezivanju Ca^{2+} jona (roze tačke), EGCG-a (plave tačke) i regioni sa sekundarnom strukturom: α -heliks (zeleno), 3_{10} -heliks (narandžasto) i β -pločice (tirkizno). **C** Izračunate Rg vrednosti apoALA i apoALA-EGCG, **D** Izračunate RMSD vrednosti apoALA i apoALA-EGCG, **E** Prikaz zavisnosti Rg i RMSD vrednosti kao reprezentacija konformacionog prostora koji zauzimaju apoALA i apoALA-EGCG tokom MD simulacije.

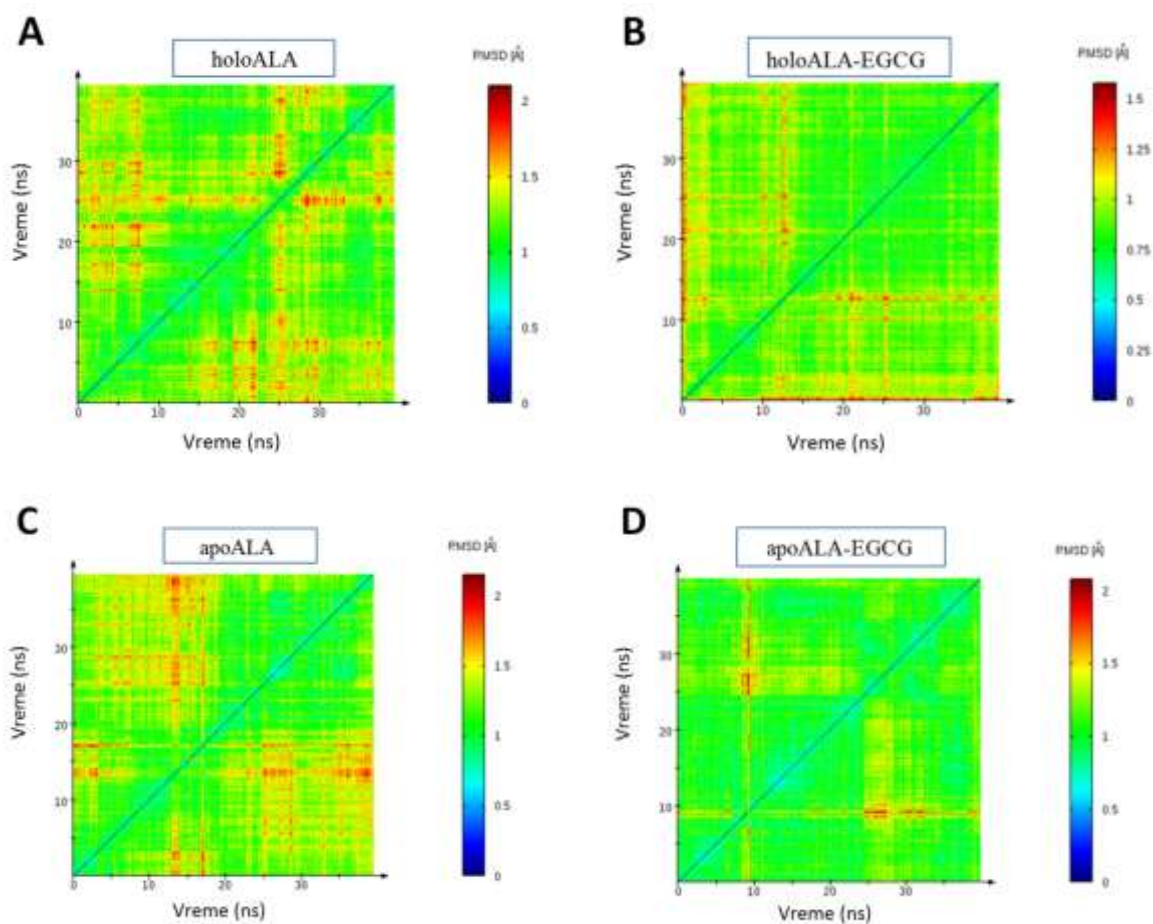
Iako je stabilizacija apoALA vezivanjem EGCG-a manje izražena nego u slučaju holoALA, ovom ligandu se može pripisati efekat vraćanja nativne strukture apoALA. Poređenjem RMSD profila prikazanih u vremenu (RMSD vrednosti prikazane za svaki korak MD simulacije) za sva četiri ispitivana sistema prikazano je vraćanje stabilnosti Ca²⁺-vezivne petlje prilikom vezivanja liganda (**Slika 45A-D**).



Slika 45. RMSD vremenski profili specifičnih aminokiselinskih ostataka dobijeni MD simulacijom holoALA (A), holoALA-EGCG (B), apoALA (C) i apoALA-EGCG (D). Aminokiselinski ostaci koji pripadaju Ca²⁺-vezujućoj petlji oivičeni su crnom bojom.

U slobodnom apoALA nestabilnost Ca^{2+} -vezujuće petlje se ogleda u povećanju RMSD vrednosti ovog regiona (region je obojen manje plavo, odnosno više crvenkasto i zeleno) (**Slika 45C**). Vezivanje EGCG-a za apoALA stabilizuje ovaj region i na taj način snižava RMSD vrednosti (region gubi crvenu boju i količina zelene boje se smanjuje). RMSD vrednosti Ca^{2+} -vezujuće petlje apoALA-EGCG kompleksa postaju uporedive sa holoALA (**Slika 45A**), što potvrđuje činjenicu da vezivanje EGCG-a stabilizuje strukturu apoALA.

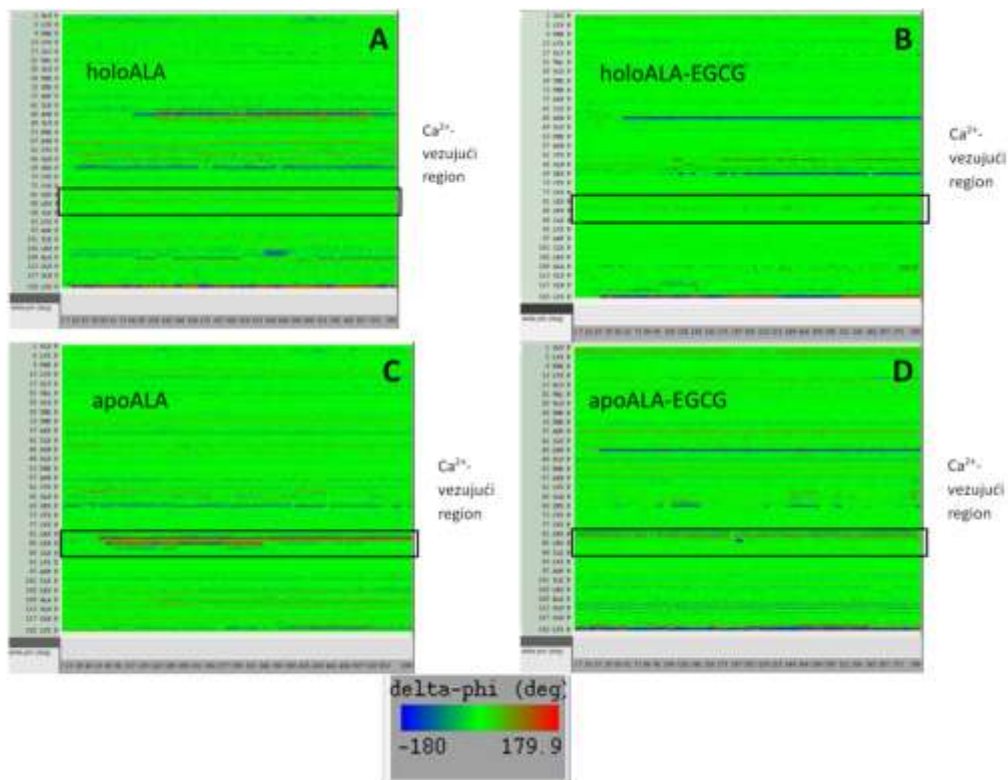
Dalje, analizom 2D RMSD grafika (**Slika 46**) može se zaključiti da vezivanje EGCG-a za apoALA utiče na veću konformacionu stabilnost apoALA, odnosno, protein prolazi kroz manji broj konformacija nego kada je u slobodnoj formi (**Slika 46C i D**). Vezivanje EGCG-a za apoALA stabilizuje strukturu što čini da 2D RMSD grafik pokazuje mnogo veću površinu sa nižim RMSD vrednostima (zeleni region sa RMSD vrednostima u opsegu 0.75-1.25) i manju površinu sa višim RMSD vrednostima (žuti region sa RMSD vrednostima u opsegu 1.3-1.7 i crveni region sa RMSD vrednostima u opsegu 1.7-2.1). Prikazane 2D RMSD vrednosti sugerišu da apoALA prolazi kroz više sličnih konformacija tokom simulacionog vremena, kao i da su te konformacione promene manje izražene kada je EGCG prisutan.



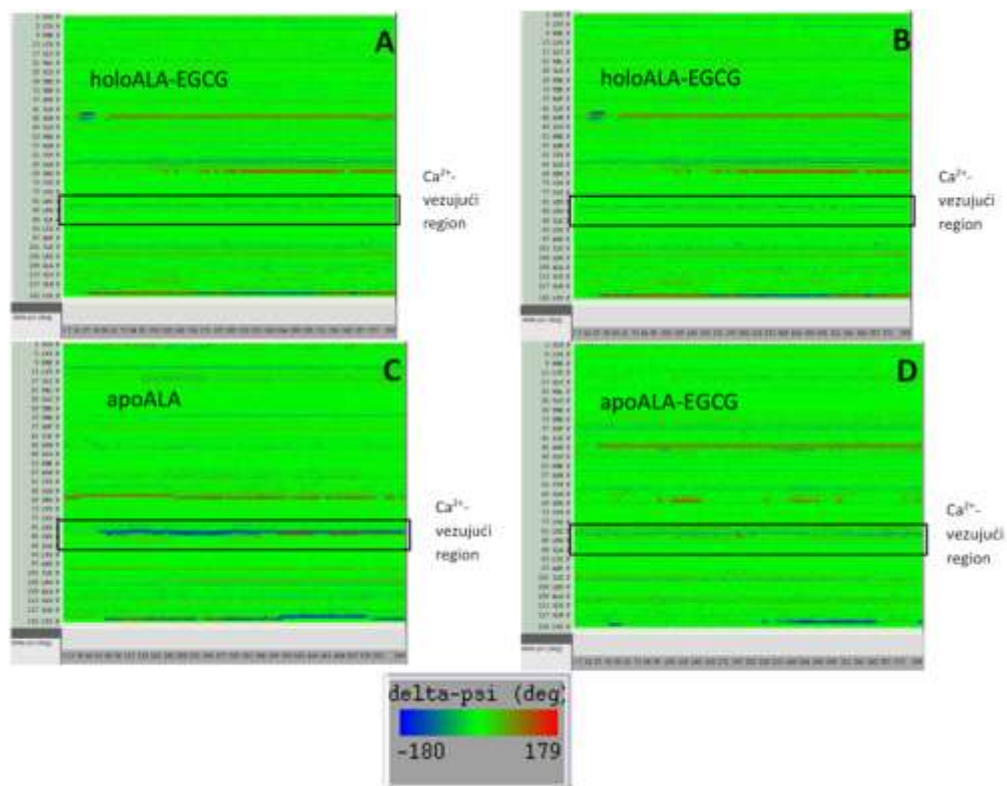
Slika 46. 2D RMSD grafici dobijeni MD simulacijom holoALA (A), holoALA-EGCG (B), apoALA (C) i apoALA-EGCG (D).

Stabilizacija apoALA usled vezivanja EGCG-a može se uočiti i posmatranjem didralnih ϕ i ψ uglova proteinske kičme tokom MD simulacije (slika 47 i slika 48). Φ uglovi Ca^{2+} -vezujućeg regiona su stabilni kod holoALA, dok nakon uklanjanja Ca^{2+} -jona, u apoALA znatno variraju (Slika 47). Naime, kod apoALA nestabilnost Ca^{2+} -vezujućeg regiona se reflektuje u povećanju ϕ uglova u ovom regionu: od 0 stepeni (zeleno) do -180 stepeni (plavo) i +180 stepeni (crveno). Vezivanje EGCG-a za apoALA stabilizuje ovaj region, rezultujući u smanjenju ϕ uglova ka 0 stepeni (Slika 47). Iz ovog se vidi da vezivanje EGCG-a mahom vraća stabilnost ϕ uglova Ca^{2+} -vezujućeg regiona u apoALA. Slično tome, ψ uglovi Ca^{2+} -vezujućeg regiona su stabilni kod holoALA (zeleni region, oko

0 stepeni), ali nakon uklanjanja Ca^{2+} u apoALA znatno variraju (do -180° -plavi region i do $+180^\circ$ -mestimično crveni regioni) (**Slika 48**). Slično ponašanju ϕ uglova, i u slučaju ψ uglova može se primetiti da vezivanje EGCG-a za apoALA gotovo potpuno vraća stabilnost Ca^{2+} -vezujućeg regiona apoALA, što se reflektuje u nestajanju plavih i crvenih regiona.



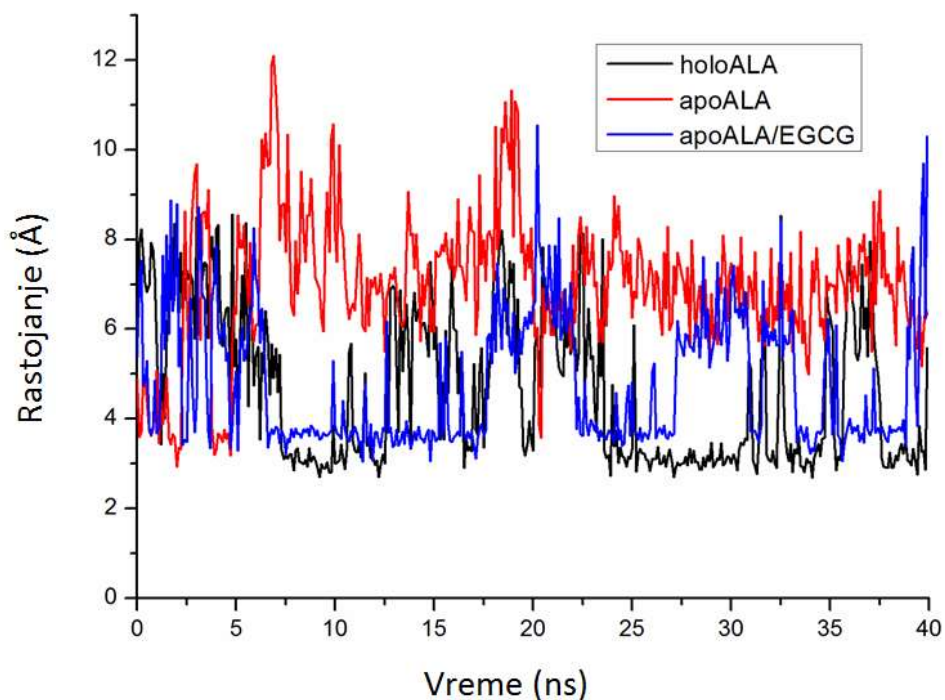
Slika 47. Diedarski ϕ uglovi proteinske kičme dobijeni nakon 40ns MD simulacije holoALA (**A**), holoALA-EGCG (**B**), apoALA (**C**), apoALA-EGCG (**D**). Na slici je oivičen region Ca^{2+} vezujuće petlje.



Slika 48. Diedarski ψ uglovi proteinske kičme dobijeni nakon 40ns MD simulacije holoALA (A), holoALA-EGCG (B), apoALA (C), apoALA-EGCG (D). Na slici je oivičen region Ca^{2+} vezujuće petlje.

Takođe, vezivanje EGCG-a obnavlja soni most između Lys79-Asp82 koji se nalazi unutar Ca^{2+} -vezivne petlje (**Grafik 6**). Unutar Ca^{2+} -vezujuće petlje, relativno dugoživeći soni most formiran između Lys79 i Asp82 (oko 60% vremena MD simulacije) kod holoALA smanjuje postojanost na oko ukupno 5% vremenskih intervala u apoALA. Međutim, prilikom vezivanja EGCG-a za apoALA dolazi do obnavljanja ovog sonog mosta, koji postoji tokom čak 45% vremena MD simulacije, čime značajno doprinosi stabilnosti Ca^{2+} -vezivnog regiona.

Svi opisani rezultati jasno ukazuju na to da vezivanje EGCG-a stabilizuje strukturu apoALA u najvećoj meri vraćanjem stabilnosti Ca^{2+} -vezivnog regiona.

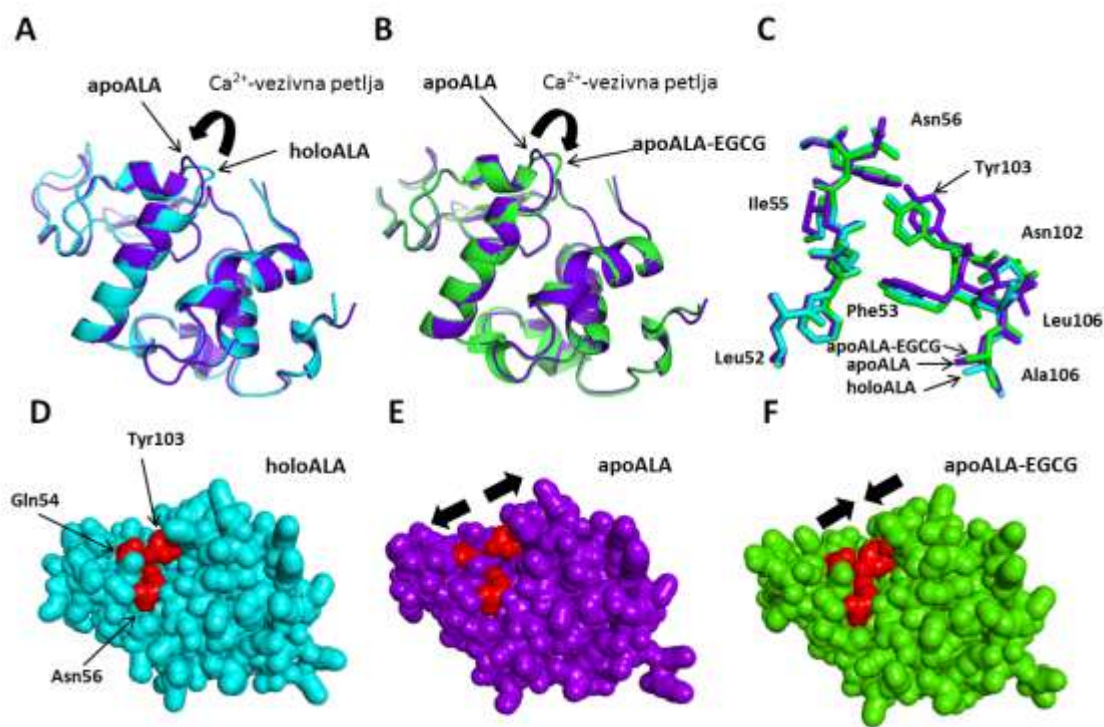


Grafik 6. Rastojanje između atoma koji formiraju soni most i pripadaju ostacima Lys79 i Asp82 tokom 40 ns MD simulacije holoALA, apoALA i apoALA/EGCG.

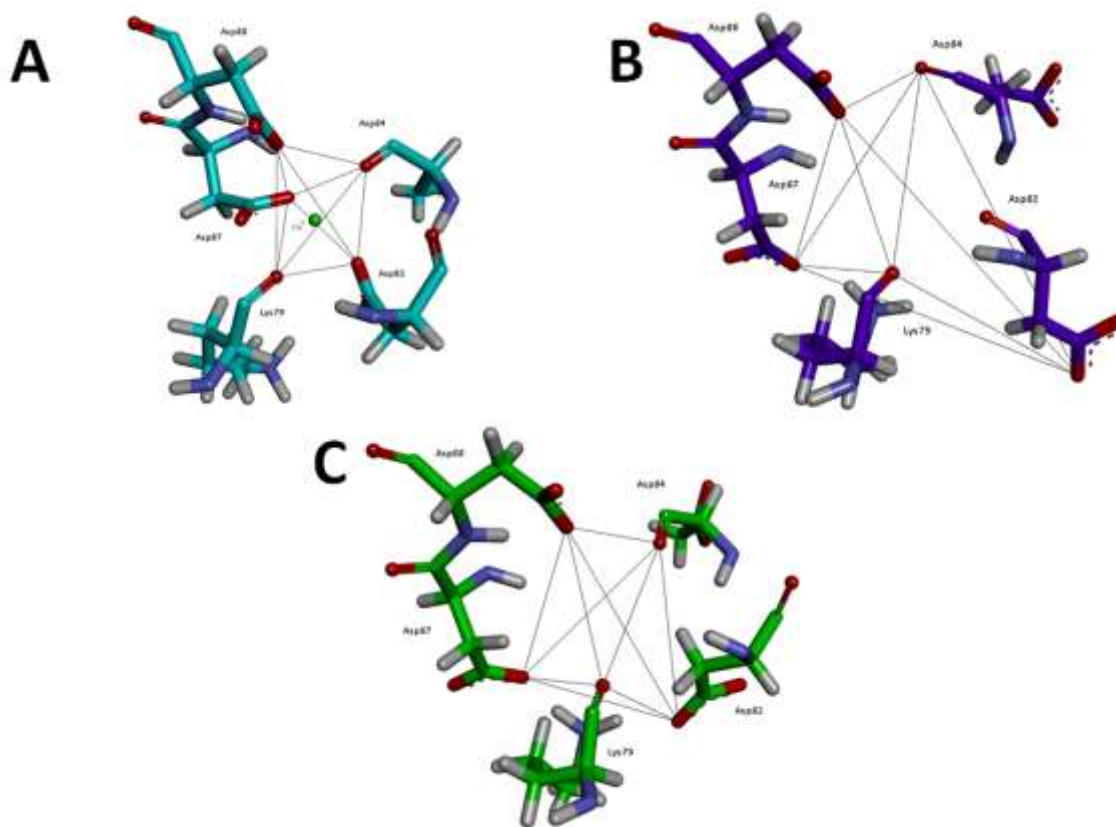
5.3.4. Detalji strukturnih promena pri vezivanju EGCG-a za apoALA

U daljem radu smo analizirali detalje strukturnih promena na proteinu pri vezivanju EGCG-a, a sa ciljem da dođemo do strukturnog mehanizma kojim EGCG vraća stabilnost apoALA. Kao što je već rečeno, tokom MD simulacije pokazano je da je najnestabilniji region apoALA Ca^{2+} -vezivna petlja. Na grafičkom prikazu preklopljenih konformacija holoALA i apoALA nakon MD simulacije vidi se da uklanjanje Ca^{2+} -jona utiče na značajno savijanje Ca^{2+} -vezivne petlje (**Slika 49A**). Vezivanje EGCG-a vraća Ca^{2+} -vezivnu petlju u konformaciju sličnu onoj koju zauzima u holoALA (**Slika 49B**). Zaista, u odsustvu Ca^{2+} -jona prosečna međusobna rastojanja između Ca^{2+} -vezivnih ostataka se povećavaju kod apoALA u odnosu na holoALA, usled odsustva Ca^{2+} -jona koji ih svojim vezivanjem drži blizu jedne drugima. Vezivanje EGCG-a uglavnom skraćuje ova rastojanja, što rezultuje

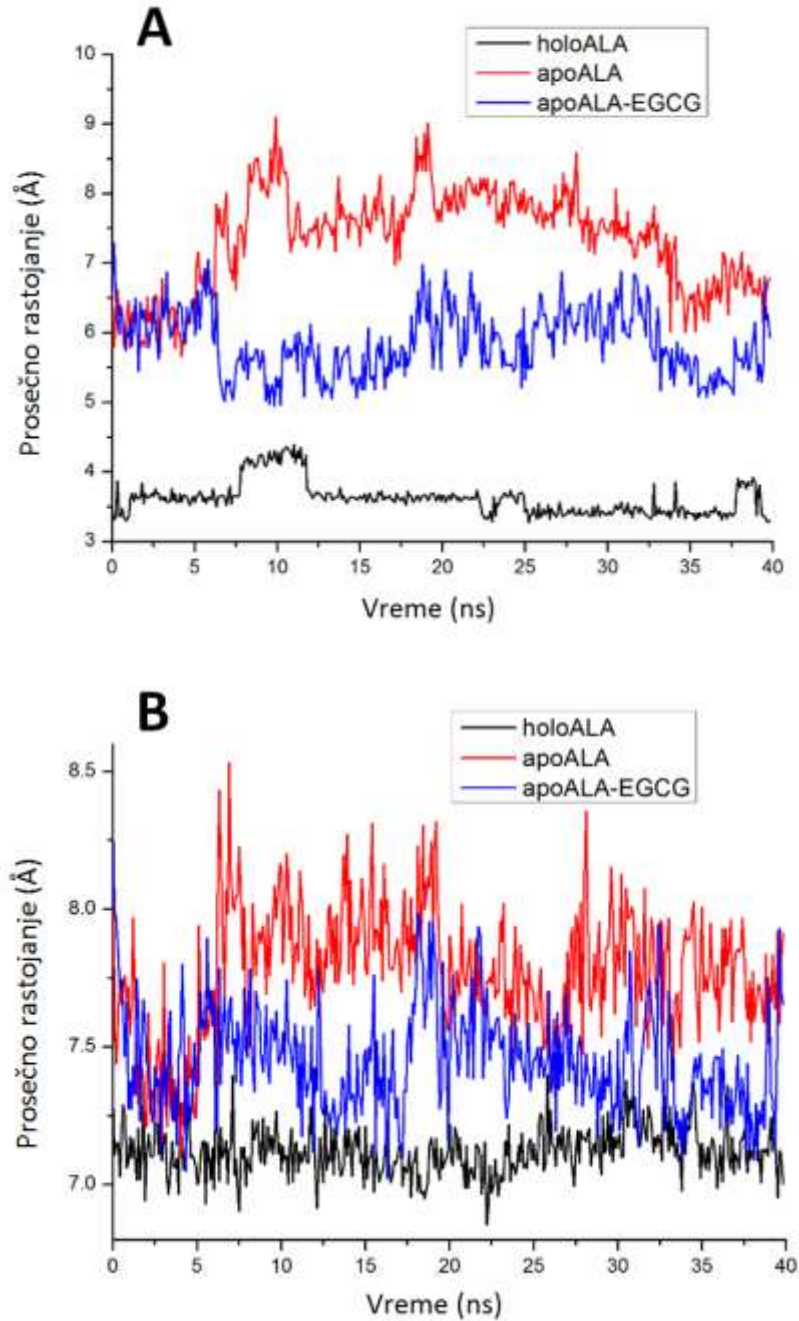
stabilizacijom Ca^{2+} -vezivnog regiona (**Slika 50**). Ovaj fenomen se može videti i tokom celokupnog vremena MD simulacije, praćenjem posebnih međusobnih rastojanja između Ca^{2+} -vezujućih ostataka, Lys79, Asp82, Asp84, Asp87 and Asp88 (**Slika 51**), tokom vremena. Prosečna rastojanja između Ca^{2+} -ligirajućih atoma, kao i C α -atoma, su u slučaju apoALA tokom cele simulacije dramatično veće nego kod holoALA. Vezivanje EGCG-a u znatnoj meri skraćuje ove distance, i to većinom vremena simulacije.



Slika 49. Preklopljene konformacije holoALA i apoALA (A) i apoALA i apoALA-EGCG (B) nakon MD simulacije. Crne strelice pokazuju region na koji je najviše uticalo ukljanjanje Ca^{2+} -jona, kao i njegovo vraćanje u prisustvu EGCG-a. Superpozicija ostataka na ulasku u procep holoALA, apoALA i apoALA-EGCG pokazuju pomeranje Tyr103 prilikom ukljanjanja Ca^{2+} -jona i njegovo vraćanje gotovo u prvobitni položaj prilikom vezivanja EGCG-a (C). Molekulske površine holoALA (D), apoALA (E) i apoALA-EGCG (F) sa pogledom na ulaz u procep nakon MD simulacije. HoloALA struktura je prikazana tirkiznom bojom, apoALA ljubičastom i apoALA-EGCG zelenom. Sve strukture su dobijene nakon klasterovanja konformacija iz MD simulacije.



Slika 50. Međusobna rastojanja između Ca^{2+} -jona i atoma aminokiselinskih ostataka Lys79, Asp82, Asp84, Asp87 i Asp88, koji učestvuju u vezivanju tokom MD simulacije holoALA (A), apoALA (B) i apoALA-EGCG (C).

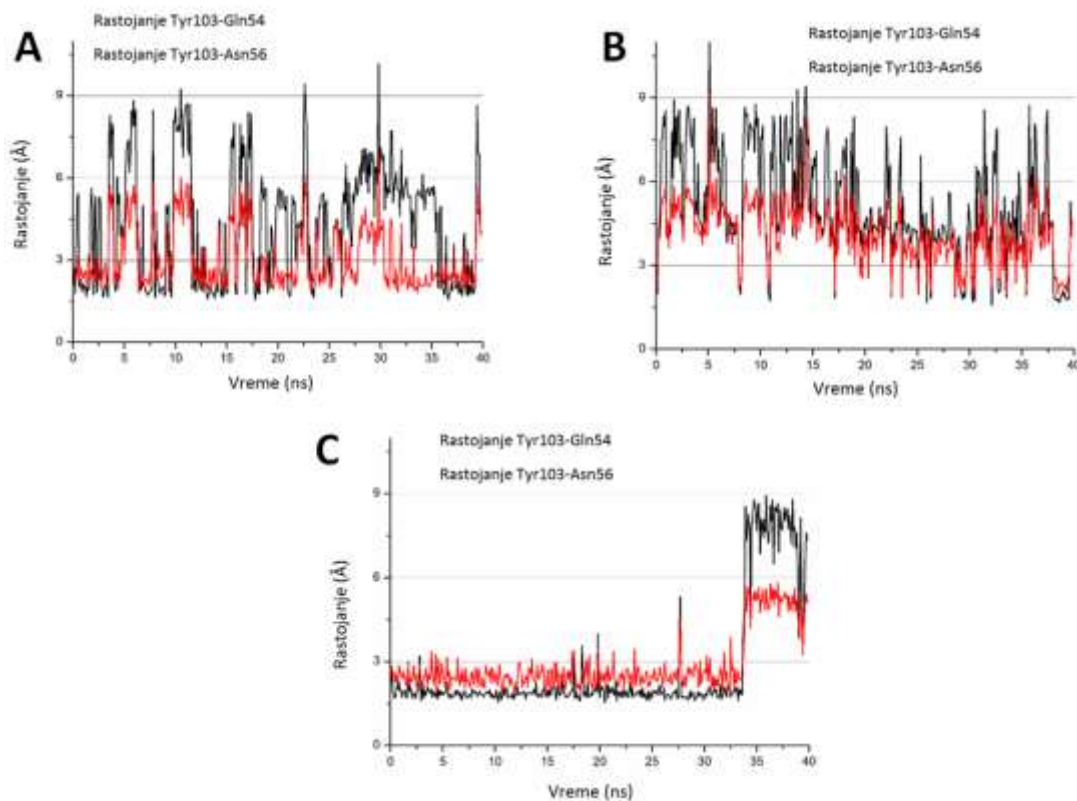


Slika 51. Prosečna medusobna rastojanja između Ca^{2+} -vezujućih aminokiselinskih ostataka Lys79, Asp82, Asp84, Asp87 i Asp88 tokom MD simulacije. **A** Prosečna medusobna rastojanja Ca^{2+} -vezujućih aminokiselinskih ostataka; **B** Prosečna medusobna rastojanja Ca -atoma navedenih aminokiselinskih ostataka holoALA, apoALA i apoALA-EGCG.

Proučavanje kristalnih struktura holoALA i apoALA pokazalo je da uklanjanje Ca^{2+} -jona u vrlo maloj meri utiče na strukturu ALA, gde su najveće strukturne promene uočene u šupljini između dva domena, šireći se od Ca^{2+} -vezujuće petlje. Na tom mestu ključni aminokiselinski ostatak na kome se mogu prikazati promene je Tyr103. Prilikom uklanjanja Ca^{2+} -jona Tyr103 menja svoju orijentaciju, pa tako i interakcije sa okolinom. Na ovaj način, vodom posredovane interakcije Tyr103 sa Gln54 i Asn56 bivaju zamenjene direktnim vodoničnim vezama, što za posledicu ima razdvajanje α i β subdomena, odnosno otvoreniju šupljinu u apoALA [56]. Zaista, i tokom MD simulacije, na ulasku u šupljinu efekat uklanjanja Ca^{2+} -jona se može primetiti takođe u perturbaciji ostatka Tyr103, kao i vraćanjem istog u orijentaciju sličnu onoj u holoALA u prisustvu EGCG-a (**Slika 49C**). Pored toga, vezivanje EGCG-a vraća kratka rastojanja između Tyr103-Gln54 i Tyr103-Asn56, čime dozvoljava obnavljanje direktnih vodoničnih veza (**Slika 52**). Tyr103-Gln54 i Tyr103-Asn56 rastojanja su niža od 2.5 Å u holoALA tokom većeg dela MD simulacije, što je u suprotnosti sa apoALA, gde su ova rastojanja niža od 2.5 Å samo u nekoliko veoma kratkih vremenskih intervala, čime nisu dozvoljene direktne vodonične veze. Vezivanje EGCG-a vraća kratka rastojanja između Tyr103-Gln54 i Tyr103-Asn56 tokom većine simulacionog perioda. Dodatno, nakon MD simulacije, perturbacija Tyr103 u apoALA rezultuje otvaranjem šupljine usled blagog razdvajanja α i β subdomena (**Slika 49D i E**). Prilikom vezivanja EGCG-a za apoALA α i β subdomeni se ponovo približavaju jedan drugom vraćanjem orijentacije Tyr103 (**Slika 49F**). Stoga, EGCG-a vezivanje za apoALA uglavnom vraća stabilnost i konformaciju Ca^{2+} -vezivne petlje, što se prenosi na šupljinu i rezultuje ponovnim udruživanjem subdomena i zatvaranjem šupljine istim mehanizmom.

Na osnovu kristalnih struktura holoALA i apoALA, smatra se da, kod apoALA pri niskoj jonskoj sili, odbijanje šarži još više proširuje Ca^{2+} -vezujući region, što dovodi do daljeg odvajanja subdomena, kao i narušavanja interakcija u hidrofobnom regionu, dovoljnog da rezultira gubitkom stabilnosti native strukture [56]. Na osnovu dobijenih rezultata, čini se da bi i na niskoj jonskoj sili EGCG bar delimično stabilisao apoALA, tako što bi odložio ekspanziju Ca^{2+} -vezujuće petlje. Na taj način EGCG bi posledično odložio razdvajanje

subdomena, i sprečio narušavanje interakcija u hidrofobnom subdomenu, zato što se EGCG zapravo i vezuje za ostatke hidrofobnog regiona (**Tabela 9**).



Slika 52. Rastojanje između Tyr103 koji pripada α -subdomenu i Gln54 i Asn56 koji pripadaju β -subdomenu tokom 40 ns MD simulacije holoALA (**A**), apoALA (**B**) i apoALA-EGCG (**C**).

Kako se nativna apoALA konformacija smatra inicijalnim korakom u prelasku ka konformaciji "stopljene globule" [56], vezivanje EGCG-a verovatno može odložiti prelaz nativne konformacije apoALA u "stopljenu globulu". Drugim rečima, u uslovima koji favorizuju konformaciju "stopljene globule", EGCG vezivanjem najverovatnije može povećati stabilnost nativne apoALA u odnosu na "stopljenu globulu".

6. Zaključci

U ovoj doktorskoj disertaciji teorijskim pristupom su proučavani efekti vezivanja biološki aktivnih liganada iz hrane na konformaciju i stabilnost proteina albuminskog tipa. Primenom molekuskog dokinga i MD simulacije ispitani su efekti vezivanja fikocijanobilina, tetrapirolnog pigmenta iz Spiruline, za HSA, kao i efekti vezivanja epigalokatehin-3-galata (EGCG), glavnog katehina zelenog čaja, za ALA.

U ovoj disertaciji, teorijskim metodama je pokazano da kada se PCB, koji je strukturni analog bilirubina, veže za HSA stabilizuje njegovu strukturu. Rezultati MD simulacije su pokazali da je HSA u kompleksu sa PCB-em, vezanim na bilo kom od dva vezujuća mesta, rigidniji u odnosu na slobodan protein, i ima manju kako sveukupnu fleksibilnost, tako i fleksibilnost individualnih domena. Pored toga, tokom MD simulacije i sam ligand, PCB, takođe menja svoju konformaciju u izduženiju, i to na oba vezujuća mesta. Takođe, pokazano je da vezivanje PCB-a za HSA utiče na vezivanje drugih liganada, uglavnom smanjujući njihovo vezivanje.

Uloga HSA je da transportuje veliki broj različitih molekula malih masa, uključujući i lekove, te stoga njihova efektivna koncentracija zavisi od njihove sposobnosti da se vežu za HSA i/ili druge transportne proteine plazme. HSA je poznat po tome da vezuje širok dijapazon strukturno različitih liganada, zahvaljujući svojoj fleksibilnoj strukturi i znatnoj relativnoj pokretljivosti sva tri domena. Stoga, vezani PCB smanjenjem fleksibilnosti HSA zapravo ograničava ovaj protein da zadobije konformacije neophodne za vezivanje drugih liganada. Dobijeni rezultati ukazali su na to da, i kod drugih proteina koji poseduju više vezivnih mesta za ligande, vezivanje tetrapirolnih liganada može značajno uticati na vezivanje drugih fiziološki relevantnih liganada ili lekova.

Molekulskim dokingom pokazano je da se najzastupljeniji katehin zelenog čaja, EGCG, vezuje za apo formu ALA (bez Ca^{2+} -jona) na istom vezivnom mestu za koje je prethodno utvrđeno vezivanje EGCG-a za holoALA, na ulasku u pukotinu između α i β domena.

Molekulska dinamička simulacija je potvrdila vezivno mesto EGCG-a u apoALA, pokazavši da EGCG ostaje vezan tokom čitavog vremena simulacije. Molekulska dinamičkom simulacijom je pokazano i da uklanjanje Ca^{2+} -jona dovodi do smanjene konformacione stabilnosti α -laktalbumina, gde narušavanje strukture Ca^{2+} -vezivne petlje rezultuje u razdvajanju α i β subdomena apoALA i otvaranja pukotine između njih. Sa druge strane, pokazano je da vezivanje EGCG-a povećava stabilnost apoALA vraćanjem stabilnosti Ca^{2+} -vezivne petlje, usled čega se subdomeni približavaju jedan drugom i dolazi do zatvaranja pukotine, odnosno, vraća apoALA konformaciju u stanje sličnoj konformaciji holoALA. Ovo smanjenje nestabilnosti usled vezivanja EGCG-a za apoALA ukazalo je na činjenicu da vezivanje EGCG-a može stabilizovati strukturu apoALA i pri niskoj jonskoj jačini, kao i da može odložiti transformaciju native apoALA konformacije u konformaciju “stopljene globule” pri uslovima koji upravo takvo stanje favorizuju.

Ovi rezultati pokazuju da, slično holoALA formi, i ALA u svojoj apo formi može da služi kao nosač za EGCG. Pored toga, nakon uzimanja čaja sa mlekom, ili hrane obogaćene EGCG-om enkapsuliranim u nano-nosače na bazi holoALA, u želudačnom prostoru EGCG i dalje može biti vezan za ALA, uprkos tome što je u apo formi.

Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju da teorijsko proučavanje vezivanja malih bioaktivnih molekula za proteine, ne samo da može da podrži eksperimentalno dobijene rezultate, već i da ih bliže objasni. Naime, rezultati ove disertacije su na molekularnom nivou objasnili eksperimentalno dobijene rezultate kao što su: promena apsorpcionog spektra PCB nakon dodatka HSA, povećanje sadržaja sekundarnih struktura na HSA nakon dodatka PCB, veća termostabilnost i otpornost HSA-PCB kompleksa na proteolizu tripsinom u odnosu na slobodan HSA, kao i nekovalentno vezivanje EGCG-a kako za holo, tako i za native apo formu ALA, i promene u sekundarnim strukturama apoALA nakon vezivanja EGCG-a. Pored toga, ovakav temeljan teorijski pristup može da omogući i uvid u mehanizme bazirane na suptilnim konformacionim promenama, kao što je ovde opisan mehanizam stabilizacije apoALA pri vezivanju EGCG-a.

7. Literatura

1. Habib, M.A.B., *A review on culture, production and use of Spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish / M. Ahsan B. Habib, Tim C. Huntington, Mohammad R. Hasan*. FAO fisheries and aquaculture circular ; no. 1034., ed. T. Huntington, et al. 2008, Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
2. Abeyrathne, E.D.N.S., H.Y. Lee, and D.U. Ahn, *Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents—A review*. Poultry Science, 2013. **92**(12): p. 3292-3299.
3. Indyk, H.E., B.D. Gill, and D.C. Woollard, *An optical biosensor-based immunoassay for the determination of bovine serum albumin in milk and milk products*. International Dairy Journal, 2015. **47**: p. 72-78.
4. Kalra, H., et al., *Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma*. PROTEOMICS, 2013. **13**(22): p. 3354-3364.
5. Moreno, F.J. and A. Clemente, *2S Albumin Storage Proteins: What Makes them Food Allergens?* The Open Biochemistry Journal, 2008. **2**: p. 16-28.
6. Zilic, S., et al., *Characterization of proteins from grain of different bread and durum wheat genotypes*. International Journal of Molecular Sciences, 2011. **12**(9): p. 5878-5894.
7. Fanali, G., et al., *Human serum albumin: From bench to bedside*. Molecular Aspects of Medicine, 2012a. **33**(3): p. 209-290.
8. Elsadek, B. and F. Kratz, *Impact of albumin on drug delivery — New applications on the horizon*. Journal of Controlled Release, 2012. **157**(1): p. 4-28.

9. Elzoghby, A.O., W.M. Samy, and N.A. Elgindy, *Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems*. Journal of Controlled Release, 2012. **157**(2): p. 168-182.
10. Kobayashi, K., *Summary of recombinant human serum albumin development*. Biologicals, 2006. **34**(1): p. 55-59.
11. Andersen, J.T., et al., *Structure-based mutagenesis reveals the albumin-binding site of the neonatal Fc receptor*. Nature Communications, 2012. **3**(1): p. 610.
12. Carter, D.C. and J.X. Ho, *Structure of Serum Albumin*, in *Advances in Protein Chemistry*, C.B. Anfinsen, et al., Editors. 1994, Academic Press. p. 153-203.
13. Lin, E.-H. Liu, and J.-L. Mau, *Effect of different brewing methods on antioxidant properties of steaming green tea*. LWT - Food Science and Technology, 2008. **41**(9): p. 1616-1623.
14. Peters, T., 2 - *The Albumin Molecule: Its Structure and Chemical Properties*, in *All About Albumin*, T. Peters, Editor. 1995, Academic Press: San Diego. p. 9-II.
15. Sugio, S., et al., *Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution*. Protein Engineering, 1999. **12**(6): p. 439-46.
16. Ascenzi and M. Fasano, *Allostery in a monomeric protein: The case of human serum albumin*. Biophysical Chemistry, 2010. **148**(1): p. 16-22.
17. Curry, S., et al., *Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites*. Nature Structural Biology, 1998. **5**(9): p. 827-835.
18. Sudlow, G., D.J. Birkett, and D.N. Wade, *The Characterization of Two Specific Drug Binding Sites on Human Serum Albumin*. Molecular Pharmacology, 1975. **11**(6): p. 824.

19. Zsila, F., *Subdomain IB Is the Third Major Drug Binding Region of Human Serum Albumin: Toward the Three-Sites Model*. *Molecular Pharmaceutics*, 2013. **10**(5): p. 1668-1682.
20. Bal, W., et al., *Binding of transition metal ions to albumin: Sites, affinities and rates*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2013. **1830**(12): p. 5444-5455.
21. Fujiwara, S.-i. and T. Amisaki, *Fatty acid binding to serum albumin: Molecular simulation approaches*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2013. **1830**(12): p. 5427-5434.
22. Petitpas, I., et al., *Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin: anatomy of drug site I*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(25): p. 22804-9.
23. Simard, J.R., et al., *Location of High and Low Affinity Fatty Acid Binding Sites on Human Serum Albumin Revealed by NMR Drug-competition Analysis*. *Journal of Molecular Biology*, 2006. **361**(2): p. 336-351.
24. Fujiwara and T. Amisaki, *Identification of high affinity fatty acid binding sites on human serum albumin by MM-PBSA method*. *Biophysical journal*, 2008. **94**(1): p. 95-103.
25. Bhattacharya, A.A., T. Grüne, and S. Curry, *Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin* | Edited by R. Huber. *Journal of Molecular Biology*, 2000. **303**(5): p. 721-732.
26. Ghuman, J., et al., *Structural Basis of the Drug-binding Specificity of Human Serum Albumin*. *Journal of Molecular Biology*, 2005. **353**(1): p. 38-52.

27. Petitpas, I., et al., *Structural basis of albumin–thyroxine interactions and familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(11): p. 6440.
28. Zunszain, P.A., et al., *Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid*. BMC Structural Biology, 2003. **3**(1): p. 6.
29. Gantchev, T.G., R. Ouellet, and J.E. van Lier, *Binding Interactions and Conformational Changes Induced by Sulfonated Aluminum Phthalocyanines in Human Serum Albumin*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1999. **366**(1): p. 21-30.
30. Tsuchida, E., et al., *Artificial Oxygen Carriers, Hemoglobin Vesicles and Albumin–Hemes, Based on Bioconjugate Chemistry*. Bioconjugate Chemistry, 2009. **20**(8): p. 1419-1440.
31. Zunszain, P.A., et al., *Crystallographic analysis of human serum albumin complexed with 4Z,15E-bilirubin-IXalpha*. Journal of Molecular Biology, 2008. **381**(2): p. 394-406.
32. Kratochwil, N.A., et al., *Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach*. Biochemical Pharmacology, 2002. **64**(9): p. 1355-1374.
33. Sang, S., et al., *Autoxidative quinone formation in vitro and metabolite formation in vivo from tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: Studied by real-time mass spectrometry combined with tandem mass ion mapping*. Free Radical Biology and Medicine, 2007. **43**(3): p. 362-371.
34. Wardell, M., et al., *The atomic structure of human methemalbumin at 1.9 Å*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002. **291**(4): p. 813-9.
35. Kozłowski, H., et al., *Specific structure–stability relations in metallopeptides*. Coordination Chemistry Reviews, 1999. **184**(1): p. 319-346.

36. Stewart, A.J., et al., *Interdomain zinc site on human albumin*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(7): p. 3701.
37. Fanali, et al., *Mn(II) binding to human serum albumin: A 1H-NMR relaxometric study*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2012b. **117**: p. 198-203.
38. Amiri, M., K. Jankeje, and J.R. Albani, *Characterization of human serum albumin forms with pH. Fluorescence lifetime studies*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010. **51**(5): p. 1097-1102.
39. van der Vusse, G.J., *Albumin as Fatty Acid Transporter*. Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 2009. **24**(4): p. 300-307.
40. Ahalawat, N. and R.K. Murarka, *Conformational changes and allosteric communications in human serum albumin due to ligand binding*. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2015. **33**(10): p. 2192-2204.
41. Ascenzi, P., et al., *Allosteric modulation of drug binding to human serum albumin*. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2006. **6**(4): p. 1389-5575.
42. Bocedi, A., et al., *Allosteric modulation of anti-HIV drug and ferric heme binding to human serum albumin*. The FEBS Journal, 2005. **272**(24): p. 6287-6296.
43. di Masi, A., et al., *Ibuprofen binding to secondary sites allosterically modulates the spectroscopic and catalytic properties of human serum heme–albumin*. The FEBS Journal, 2011. **278**(4): p. 654-662.
44. Fanali, G., et al., *Modulation of heme and myristate binding to human serum albumin by anti-HIV drugs*. The FEBS Journal, 2007. **274**(17): p. 4491-4502.
45. Nicoletti, F.P., et al., *Ibuprofen Induces an Allosteric Conformational Transition in the Heme Complex of Human Serum Albumin with Significant Effects on Heme Ligation*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(35): p. 11677-11688.

46. Baroni, S., et al., *Effect of ibuprofen and warfarin on the allosteric properties of haem-human serum albumin*. European Journal of Biochemistry, 2001. **268**(23): p. 6214-6220.
47. Bourdon, E. and D. Blache, *The importance of proteins in defense against oxidation*. Antioxid Radox Signal., 2001. **3**(2): p. 293-311.
48. Walter, P.B., et al., *Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with beta-thalassaemia or sickle cell disease*. British Journal of Haematology, 2006. **135**(2): p. 265-63.
49. Gundry, R.L., et al., *Investigation of an albumin-enriched fraction of human serum and its albuminome*. Proteomics. Clinical applications, 2007. **1**(1): p. 73-88.
50. Heine, W.E., P.D. Klein, and P.J. Reeds, *The Importance of α -Lactalbumin in Infant Nutrition*. The Journal of Nutrition, 1991. **121**(3): p. 277-283.
51. Kunz, C. and B. Lönnerdal, *Re-evaluation of the whey protein/casein ratio of human milk*. Acta Paediatrica, 1992. **81**(2): p. 107-112.
52. Permyakov and L.J. Berliner, *α -Lactalbumin: structure and function*. FEBS Letters, 2000a. **473**(3): p. 269-274.
53. Layman, D.K., B. Lönnerdal, and J.D. Fernstrom, *Applications for α -lactalbumin in human nutrition*. Nutrition Reviews, 2018. **76**(6): p. 444-460.
54. Acharya, K.R., et al., *Models of the three-dimensional structures of echidna, horse, and pigeon lysozymes: Calcium-binding lysozymes and their relationship with α -lactalbumins*. Journal of Protein Chemistry, 1994. **13**(6): p. 569-584.
55. Pike, A.C.W., K. Brew, and K.R. Acharya, *Crystal structures of guinea-pig, goat and bovine α -lactalbumin highlight the enhanced conformational flexibility of regions that are significant for its action in lactose synthase*. Structure, 1996. **4**(6): p. 691-703.

56. Chrysina, E.D., K.R. Brew K Fau - Acharya, and K.R. Acharya, *Crystal structures of apo- and holo-bovine alpha-lactalbumin at 2. 2-A resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(47): p. 37021-9.
57. Permyakov, et al., *Binding of Zn(II) ions to alpha-lactalbumin*. Journal of Protein Chemistry, 1991. **10**(6): p. 577-584.
58. Ren, J., D.I. Stuart, and K.R. Acharya, *alpha-lactalbumin possesses a distinct zinc binding site*. Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(26): p. 19292-19298.
59. Permyakov, et al., *alpha-Lactalbumin binds magnesium ions: Study by means of intrinsic fluorescence technique*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1981. **102**(1): p. 1-7.
60. Permyakov, et al., *Zinc binding in bovine alpha-lactalbumin: sequence homology may not be a predictor of subtle functional features*. Proteins, 2000b. **40**(1): p. 106-11.
61. Veprintsev, D.B., et al., *Cooperative thermal transitions of bovine and human apo-alpha-lactalbumins: Evidence for a new intermediate state*. FEBS Letters, 1997. **412**(3): p. 625-628.
62. Anderson, P.J., C.L. Brooks, and L.J. Berliner, *Functional identification of calcium binding residues in bovine alpha-lactalbumin*. Biochemistry, 1997. **36**(39): p. 11648-11654.
63. Farkas, V., et al., *Cyclic peptide models of the Ca²⁺-binding loop of alpha-lactalbumin*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2005. **13**(17): p. 5310-5320.
64. Ostrovsky, A.V., et al., *Environment of tryptophan residues in various conformational states of alpha-lactalbumin studied by time-resolved and steady-state fluorescence spectrosc*. Biophysical Chemistry, 1988. **30**(2): p. 105-112.

65. Dolgikh, D.A., et al., *α -lactalbumin: compact state with fluctuating tertiary structure?* FEBS Letters, 1981. **136**(2): p. 311-315.
66. Kuwajima, K., *The molten globule state of alpha-lactalbumin.* The FASEB Journal, 1996. **10**(1): p. 102-109.
67. Pfeil, W., *Is thermally denatured protein unfolded? The example of α -lactalbumin.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1987. **911**(1): p. 114-116.
68. Redfield, C., et al., *α -Lactalbumin forms a compact molten globule in the absence of disulfide bonds.* Nature Structural Biology, 1999. **6**(10): p. 948-952.
69. Wu, et al., *Disulfide determinants of calcium-induced packing in alpha-lactalbumin.* Biochemistry, 1996. **35**(3): p. 859-63.
70. Griko, Y.V. and D.P. Remeta, *Energetics of solvent and ligand-induced conformational changes in α -lactalbumin.* Protein Science, 1999. **8**(3): p. 554-561.
71. Casbarra, A., et al., *Conformational analysis of HAMLET, the folding variant of human α -lactalbumin associated with apoptosis.* Protein Science, 2009. **13**(5): p. 1322-1330.
72. Svanborg, C., et al., *HAMLET kills tumor cells by an apoptosis-like mechanism—cellular, molecular, and therapeutic aspects,* in *Advances in Cancer Research.* 2003, Academic Press. p. 1-29.
73. Svensson, M., et al., *Molecular characterization of alpha-lactalbumin folding variants that induce apoptosis in tumor cells.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(10): p. 6388-96.
74. Håkansson, A., et al., *A folding variant of α -lactalbumin with bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae*.* Molecular Microbiology, 2000. **35**(3): p. 589-600.

75. Svensson, M., et al., *Lipids as cofactors in protein folding: stereo-specific lipid-protein interactions are required to form HAMLET (human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells)*. Protein Science, 2003a. **12**(12): p. 2805-14.
76. Fang, B., et al., *Bovine lactoferrin binds oleic acid to form an anti-tumor complex similar to HAMLET*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2014. **1841**(4): p. 535-543.
77. Svensson, M., et al., *α -Lactalbumin unfolding is not sufficient to cause apoptosis, but is required for the conversion to HAMLET (human α -lactalbumin made lethal to tumor cells)*. Protein Science, 2003b. **12**(12): p. 2794-2804.
78. Mercer, N., et al., *Applications of Site-Specific Labeling to Study HAMLET, a Tumoricidal Complex of α -Lactalbumin and Oleic Acid*. PLOS ONE, 2011. **6**(10): p. e26093.
79. Pettersson-Kastberg, J., et al., *α -Lactalbumin, Engineered to be Nonnative and Inactive, Kills Tumor Cells when in Complex with Oleic Acid: A New Biological Function Resulting from Partial Unfolding*. Journal of Molecular Biology, 2009. **394**(5): p. 994-1010.
80. Knyazeva, E.L., et al., *Who Is Mr. HAMLET? Interaction of Human α -Lactalbumin with Monomeric Oleic Acid*. Biochemistry, 2008. **47**(49): p. 13127-13137.
81. Brinkmann, C.R., et al., *Preparation and comparison of cytotoxic complexes formed between oleic acid and either bovine or human α -lactalbumin*. Journal of Dairy Science, 2011. **94**(5): p. 2159-2170.
82. Clementi, E.A., et al., *A novel initiation mechanism of death in Streptococcus pneumoniae induced by the human milk protein-lipid complex HAMLET and activated during physiological death*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(32): p. 27168-27182.

83. Lien, E.L., *Infant formulas with increased concentrations of α -lactalbumin*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2003. **77**(6): p. 1555S-1558S.
84. Lönnerdal, B. and E.L. Lien, *Nutritional and Physiologic Significance of α -Lactalbumin in Infants*. Nutrition Reviews, 2003. **61**(9): p. 295-305.
85. Yogman Mw Fau - Zeisel, S.H., C. Zeisel Sh Fau - Roberts, and C. Roberts, *Assessing effects of serotonin precursors on newborn behavior*. HJournal of Psychiatric Research, 1982. **17**(2): p. 123-33.
86. Zhang, et al., *Interaction of milk whey protein with common phenolic acids*. Journal of Molecular Structure, 2014. **1058**: p. 228-233.
87. Prigent, S.V.E., et al., *Interactions between globular proteins and procyanidins of different degrees of polymerization*. Journal of Dairy Science, 2009. **92**(12): p. 5843-5853.
88. Mohammadi, F. and M. Moeeni, *Analysis of binding interaction of genistein and kaempferol with bovine α -lactalbumin*. Journal of Functional Foods, 2015a. **12**: p. 458-467.
89. Mohammadi, F. and M. Moeeni, *Study on the interactions of trans-resveratrol and curcumin with bovine α -lactalbumin by spectroscopic analysis and molecular docking*. Materials Science and Engineering: C, 2015b. **50**: p. 358-366.
90. Stănciuc, N., et al., *Microencapsulation of Anthocyanins from Grape Skins by Whey Protein Isolates and Different Polymers*. Food and Bioprocess Technology, 2017. **10**(9): p. 1715-1726.
91. Wang, X., et al., *Covalent complexation and functional evaluation of (-)-epigallocatechin gallate and α -lactalbumin*. Food Chemistry, 2014. **150**: p. 341-347.
92. Al-Hanish, A., et al., *Noncovalent interactions of bovine α -lactalbumin with green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate*. Food Hydrocolloids, 2016. **61**: p. 241-250.

93. Avila-Nava, A., et al., *Extract of cactus (Opuntia ficus indica) cladodes scavenges reactive oxygen species in vitro and enhances plasma antioxidant capacity in humans*. Journal of Functional Foods, 2014. **10**: p. 13-24.
94. Tahergorabi, R., K.E. Matak, and J. Jaczynski, *Fish protein isolate: Development of functional foods with nutraceutical ingredients*. Journal of Functional Foods, 2015. **18**: p. 746-756.
95. M. E. Gershwin, A.B., *Spirulina in Human Nutrition and Health*. 2007.
96. Misbahuddin, M., et al., *Efficacy of spirulina extract plus zinc in patients of chronic arsenic poisoning: a randomized placebo-controlled study*. Clinical Toxicology (Philadelphia, Pa.), 2006. **44**(2): p. 135-41.
97. Ngo-Matip, M.-E., et al., *Impact of daily supplementation of Spirulina platensis on the immune system of naïve HIV-1 patients in Cameroon: a 12-months single blind, randomized, multicenter trial*. Nutrition Journal, 2015. **14**(1): p. 70.
98. Yakoot, M. and A. Salem, *Spirulina platensis versus silymarin in the treatment of chronic hepatitis C virus infection. A pilot randomized, comparative clinical trial*. BMC Gastroenterology, 2012. **12**(1): p. 32.
99. Dragana Stanic-Vucinic, S.M., Milan R. Nikolic and Tanja Cirkovic Velickovic, *Spirulina Phycobiliproteins as Food Components and Complements*, in *Microalgal Biotechnology*. 2018.
100. Li, S., et al., *Promising fluorescent probes from phycobiliproteins*. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 2003. **9**(2): p. 177-188.
101. Manirafasha, E., et al., *Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent*. Biochemical Engineering Journal, 2016. **109**: p. 282-296.
102. V.D. Pandey, A.P., V. Sharma, *Biotechnological applications of cyanobacterial phycobiliproteins*. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci., 2013. **2**: p. 89-97.

103. Reddy, C.M., et al., *Selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 by C-Phycocyanin, a Biliprotein from Spirulina platensis*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **277**(3): p. 599-603.
104. Bhat, V.B. and K.M. Madyastha, *Scavenging of Peroxynitrite by Phycocyanin and Phycocyanobilin from Spirulina platensis: Protection against Oxidative Damage to DNA*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. **285**(2): p. 262-266.
105. Piñero Estrada, J.E., P. Bermejo Bescós, and A.M. Villar del Fresno, *Antioxidant activity of different fractions of Spirulina platensis protean extract*. Il Farmaco, 2001. **56**(5): p. 497-500.
106. Scheer, H. and K.H. Zhao, *Biliprotein maturation: the chromophore attachment*. Molecular microbiology, 2008. **68**(2): p. 263-276.
107. Wang, X.-Q., et al., *Structure of C-phycocyanin from Spirulina platensis at 2.2 Å resolution: a novel monoclinic crystal form for phycobiliproteins in phycobilisomes*. Acta Crystallographica Section D, 2001. **57**(6): p. 784-792.
108. Brodersen, R. and L. Stern, *Binding of Bilirubin to Albumin*. CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 1980. **11**(4): p. 307-399.
109. Brodersen, R., *Bilirubin. Solubility and interaction with albumin and phospholipid*. J Biol Chem., 1979. **254**(7): p. 2364-9.
110. Ostrow, J.D., C. Mukerjee P Fau - Tiribelli, and C. Tiribelli, *Structure and binding of unconjugated bilirubin: relevance for physiological and pathophysiological function*. Journal of Lipid Research, 1994. **35**(10): p. 1715-37.
111. Bratlid, D., *How bilirubin gets into the brain*. Clin Perinatol, 1990. **17**(2): p. 449-65.

112. Nogales, D. and D.A. Lightner, *On the structure of bilirubin in solution. $^{13}\text{C}[^1\text{H}]$ heteronuclear Overhauser effect NMR analyses in aqueous buffer and organic solvents*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(1): p. 73-77.
113. Minomo, A., et al., *Biological characteristics of two lysines on human serum albumin in the high-affinity binding of 4Z,15Z-bilirubin-IX α revealed by phage display*. The FEBS Journal, 2011. **278**(21): p. 4100-4111.
114. Lightner, D.A., M.H. Wijekoon Wm Fau - Zhang, and M.H. Zhang, *Understanding bilirubin conformation and binding. Circular dichroism of human serum albumin complexes with bilirubin and its esters*. Journal of Biological Chemistry, 1988. **263**(32): p. 16669-76.
115. McCarty, F.M., *Supplementation with Phycocyanobilin, Citrulline, Taurine, and Supranutritional Doses of Folic Acid and Biotin—Potential for Preventing or Slowing the Progression of Diabetic Complications*. Healthcare, 2017. **5**(1).
116. McCarty, M.F., *Clinical Potential of Spirulina as a Source of Phycocyanobilin*. Journal of Medicinal Food, 2007a. **10**(4): p. 566-570.
117. McCarty, M.F., *“Iatrogenic Gilbert syndrome”—A strategy for reducing vascular and cancer risk by increasing plasma unconjugated bilirubin*. Medical Hypotheses, 2007b. **69**(5): p. 974-994.
118. Huang, Z., et al., *Characterization and antioxidant activity of selenium-containing phycocyanin isolated from Spirulina platensis*. Food Chemistry, 2007. **100**(3): p. 1137-1143.
119. Pleonsil, P., S. Soogarun, and Y. Suwanwong, *Anti-oxidant activity of holo- and apo-c-phycocyanin and their protective effects on human erythrocytes*. International Journal of Biological Macromolecules, 2013. **60**: p. 393-398.

120. Chen, F., et al., *Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 6. Capability to predict protein–protein binding free energies and re-rank binding poses generated by protein–protein docking*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2016. **18**(32): p. 22129-22139.
121. Fernández-Rojas, B., J. Hernández-Juárez, and J. Pedraza-Chaverri, *Nutraceutical properties of phycocyanin*. *Journal of Functional Foods*, 2014. **11**: p. 375-392.
122. Martínez-Sámano, J., et al., *Spirulina maxima Decreases Endothelial Damage and Oxidative Stress Indicators in Patients with Systemic Arterial Hypertension: Results from Exploratory Controlled Clinical Trial*. *Marine Drugs*, 2018. **16**(12).
123. Riss, J., et al., *Phycobiliprotein C-Phycocyanin from Spirulina platensis Is Powerfully Responsible for Reducing Oxidative Stress and NADPH Oxidase Expression Induced by an Atherogenic Diet in Hamsters*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007. **55**(19): p. 7962-7967.
124. Romay, C., et al., *C-phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects*. *Curr Protein Pept Sci*, 2003. **4**(3): p. 207-16.
125. Zhang, H., et al., *Selenium-containing allophycocyanin purified from selenium-enriched Spirulina platensis attenuates AAPH-induced oxidative stress in human erythrocytes through inhibition of ROS generation*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011. **59**(16): p. 8683-90.
126. Minic, S.L., et al., *Phycocyanobilin, a bioactive tetrapyrrolic compound of blue-green alga Spirulina, binds with high affinity and competes with bilirubin for binding on human serum albumin*. *RSC Advances*, 2015. **5**(76): p. 61787-61798.
127. Cabrera, C., R. Artacho R Fau - Gimenez, and R. Gimenez, *Beneficial effects of green tea--a review*. *Journal of the American College of Nutrition*, 2006. **25**(2): p. 79-99.

128. Sato, T. and G. Miyata, *The nutraceutical benefit, part I: green tea*. 2000(0899-9007 (Print)).
129. Graham, H.N., *Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry*. Preventive Medicine, 1992. **21**(3): p. 334-350.
130. Sano, M., et al., *Simultaneous determination of twelve tea catechins by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection*. Analyst, 2001. **126**(6): p. 816-820.
131. Perva-Uzunalić, A., et al., *Extraction of active ingredients from green tea (Camellia sinensis): Extraction efficiency of major catechins and caffeine*. Food Chemistry, 2006. **96**(4): p. 597-605.
132. Khokhar, S. and S.G.M. Magnusdottir, *Total Phenol, Catechin, and Caffeine Contents of Teas Commonly Consumed in the United Kingdom*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(3): p. 565-570.
133. Lambert, J.D. and R.J. Elias, *The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2010. **501**(1): p. 65-72.
134. Steinmann, J., et al., *Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea*. British Journal of Pharmacology, 2013. **168**(5): p. 1059-1073.
135. Chu, C., et al., *Green Tea Extracts Epigallocatechin-3-gallate for Different Treatments*. BioMed research international, 2017. **2017**: p. 5615647-5615647.
136. Legeay, S., et al., *Epigallocatechin Gallate: A Review of Its Beneficial Properties to Prevent Metabolic Syndrome*. Nutrients, 2015. **7**(7): p. 5443-5468.
137. Burda, S. and W. Oleszek, *Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(6): p. 2774-2779.

138. Heim, K.E., A.R. Tagliaferro, and D.J. Bobilya, *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2002. **13**(10): p. 572-584.
139. Wiseman, S.A., B. Balentine Da Fau - Frei, and B. Frei, *Antioxidants in tea*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1997. **37**(8): p. 705-18.
140. Shi, X., et al., *Antioxidant properties of (-)-epicatechin-3-gallate and its inhibition of Cr(VI)-induced DNA damage and Cr(IV)- or TPA-stimulated NF-kappaB activation*. Molecular and Cellular Biochemistry, 2000. **206**(1-2): p. 125-32.
141. Valcic, S., et al., *Antioxidant chemistry of green tea catechins. New oxidation products of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epigallocatechin from their reactions with peroxy radicals*. Chemical Research in Toxicology, 2000. **13**(9): p. 801-10.
142. Kondo, K., et al., *Scavenging mechanisms of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epicatechin gallate on peroxy radicals and formation of superoxide during the inhibitory action*. Free Radical Biology and Medicine, 1999. **27**(7): p. 855-863.
143. Severino, J.F., et al., *Free radicals generated during oxidation of green tea polyphenols: Electron paramagnetic resonance spectroscopy combined with density functional theory calculations*. Free Radical Biology and Medicine, 2009. **46**(8): p. 1076-1088.
144. Hou, Z., et al., *Mechanism of Action of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate: Auto-oxidation-Dependent Inactivation of Epidermal Growth Factor Receptor and Direct Effects on Growth Inhibition in Human Esophageal Cancer KYSE 150 Cells*. Cancer Research, 2005. **65**(17): p. 8049.
145. Zhu, N., et al., *Identification of Oxidation Products of (-)-Epigallocatechin Gallate and (-)-Epigallocatechin with H₂O₂*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000a. **48**(4): p. 979-981.

146. Jomova, K. and M. Valko, *Advances in metal-induced oxidative stress and human disease*. Toxicology, 2011. **283**(2): p. 65-87.
147. Kumamoto, M., et al., *Effects of pH and Metal Ions on Antioxidative Activities of Catechins*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2001. **65**(1): p. 126-132.
148. Grinberg, L.N., et al., *Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells*. Biochemical Pharmacology, 1997. **54**(9): p. 973-978.
149. Das, A., N.L. Banik, and S.K. Ray, *Flavonoids activated caspases for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells but not in human normal astrocytes*. Cancer, 2010. **116**(1): p. 164-176.
150. Philips, B.J., et al., *Induction of apoptosis in human bladder cancer cells by green tea catechins*. Biomedical Research, 2009. **30**(4): p. 207-215.
151. Shankar, S., R.K. Ganapathy S Fau - Srivastava, and R.K. Srivastava, *Green tea polyphenols: biology and therapeutic implications in cancer*. Frontiers in bioscience: a journal and virtual library, 2007. **12**: p. 4881-99.
152. Min, N.Y., et al., *Selective death of cancer cells by preferential induction of reactive oxygen species in response to (-)-epigallocatechin-3-gallate*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012. **421**(1): p. 91-97.
153. Senggunprai, L., et al., *Quercetin and EGCG Exhibit Chemopreventive Effects in Cholangiocarcinoma Cells via Suppression of JAK/STAT Signaling Pathway*. Phytotherapy Research, 2014. **28**(6): p. 841-848.
154. Gupta, S., et al., *Essential role of caspases in epigallocatechin-3-gallate-mediated inhibition of nuclear factor kappaB and induction of apoptosis*. Oncogene, 2004. **23**(14): p. 2507-2522.

155. Lee, W.J., J.-Y. Shim, and B.T. Zhu, *Mechanisms for the Inhibition of DNA Methyltransferases by Tea Catechins and Bioflavonoids*. *Molecular Pharmacology*, 2005. **68**(4): p. 1018.
156. Lin, C.-H., et al., *Epigallocatechin gallate, polyphenol present in green tea, inhibits stem-like characteristics and epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal cancer cell lines*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2012. **12**(1): p. 201.
157. Ellinger, S., et al., *Consumption of green tea or green tea products: Is there an evidence for antioxidant effects from controlled interventional studies?* *Phytomedicine*, 2011. **18**(11): p. 903-915.
158. Jin, G., et al., *Combination curcumin and (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits colorectal carcinoma microenvironment-induced angiogenesis by JAK/STAT3/IL-8 pathway*. *Oncogenesis*, 2017. **6**(10): p. e384-e384.
159. Wang, W., D. Chen, and K. Zhu, *SOX2OT variant 7 contributes to the synergistic interaction between EGCG and Doxorubicin to kill osteosarcoma via autophagy and stemness inhibition*. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2018. **37**(1): p. 37.
160. Roowi, S., et al., *Green Tea Flavan-3-ols: Colonic Degradation and Urinary Excretion of Catabolites by Humans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010. **58**(2): p. 1296-1304.
161. Zhu, M., R.C. Chen Y Fau - Li, and R.C. Li, *Oral absorption and bioavailability of tea catechins*. *Planta Medica*, 2000b. **66**(5): p. 444-7.
162. Krupkova, O., S.J. Ferguson, and K. Wuertz-Kozak, *Stability of (-)-epigallocatechin gallate and its activity in liquid formulations and delivery systems*. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2016. **37**: p. 1-12.

163. Lambert, J.D., et al., *Dose-Dependent Levels Of Epigallocatechin-3-Gallate In Human Colon Cancer Cells And Mouse Plasma And Tissues*. Drug Metabolism and Disposition, 2006a. **34**(1): p. 8.
164. Yang, C.S., et al., *Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance*. Nature Reviews Cancer, 2009. **9**(6): p. 429-39.
165. Chow, H.H.S., et al., *Pharmacokinetics and Safety of Green Tea Polyphenols after Multiple-Dose Administration of Epigallocatechin Gallate and Polyphenon E in Healthy Individuals*. Clinical Cancer Research, 2003. **9**(9): p. 3312.
166. Puligundla, P., et al., *Nanotechnological approaches to enhance the bioavailability and therapeutic efficacy of green tea polyphenols*. Journal of Functional Foods, 2017. **34**: p. 139-151.
167. Zhong, Y., C.-M. Ma, and F. Shahidi, *Antioxidant and antiviral activities of lipophilic epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives*. Journal of Functional Foods, 2012. **4**(1): p. 87-93.
168. Zhu, S., et al., *Lipase-catalyzed synthesis of acetylated EGCG and antioxidant properties of the acetylated derivatives*. Food Research International, 2014. **56**: p. 279-286.
169. Bhushani, J.A., P. Karthik, and C. Anandharamakrishnan, *Nanoemulsion based delivery system for improved bioaccessibility and Caco-2 cell monolayer permeability of green tea catechins*. Food Hydrocolloids, 2016. **56**: p. 372-382.
170. Paximada, P., et al., *Encapsulation of hydrophilic and lipophilized catechin into nanoparticles through emulsion electrospraying*. Food Hydrocolloids, 2017. **64**: p. 123-132.

171. Lambert, J.D., et al., *Peracetylation as a Means of Enhancing in Vitro Bioactivity and Bioavailability of Epigallocatechin-3-Gallate*. *Drug Metabolism and Disposition*, 2006b. **34**(12): p. 2111.
172. Zhong, Y. and F. Shahidi, *Lipophilized Epigallocatechin Gallate (EGCG) Derivatives as Novel Antioxidants*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011. **59**(12): p. 6526-6533.
173. Dag, D. and M.H. Oztop, *Formation and Characterization of Green Tea Extract Loaded Liposomes*. *Journal of Food Science*, 2017. **82**(2): p. 463-470.
174. Dube, A., J.A. Nicolazzo, and I. Larson, *Chitosan nanoparticles enhance the plasma exposure of (-)-epigallocatechin gallate in mice through an enhancement in intestinal stability*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011. **44**(3): p. 422-426.
175. Shi, M., et al., *Food-grade Encapsulation Systems for (-)-Epigallocatechin Gallate*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2018. **23**(2): p. 445.
176. Ye, J.-H. and M.A. Augustin, *Nano- and micro-particles for delivery of catechins: Physical and biological performance*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019. **59**(10): p. 1563-1579.
177. Sabouri, S., J. Geng, and M. Corredig, *Tea polyphenols association to caseinate-stabilized oil–water interfaces*. *Food Hydrocolloids*, 2015. **51**: p. 95-100.
178. Hasni, I., et al., *Interaction of milk α - and β -caseins with tea polyphenols*. *Food Chemistry*, 2011. **126**(2): p. 630-639.
179. Zorilla, R., et al., *Interaction of epigallocatechin-3-gallate with β -lactoglobulin: molecular characterization and biological implication*. *Dairy Science & Technology*, 2011. **91**(5): p. 629.

180. Haratifar, S., K.A. Meckling, and M. Corredig, *Antiproliferative activity of tea catechins associated with casein micelles, using HT29 colon cancer cells*. Journal of Dairy Science, 2014. **97**(2): p. 672-678.
181. Li, Y., L.T. Lim, and Y. Kakuda, *Electrospun Zein Fibers as Carriers to Stabilize (-)-Epigallocatechin Gallate*. Journal of Food Science, 2009. **74**(3): p. C233-C240.
182. Shi, M., et al., *Binding of tea catechins to rice bran protein isolate: Interaction and protective effect during in vitro digestion*. Food Research International, 2017. **93**: p. 1-7.
183. Maiti, T.K., K.S. Ghosh, and S. Dasgupta, *Interaction of (-)-epigallocatechin-3-gallate with human serum albumin: Fluorescence, fourier transform infrared, circular dichroism, and docking studies*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2006. **64**(2): p. 355-362.
184. Ognjenović, J., et al., *Interactions of epigallo-catechin 3-gallate and ovalbumin, the major allergen of egg white*. Food Chemistry, 2014. **164**: p. 36-43.
185. Vesic, J., et al., *Complexes of green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, and 2S albumins of peanut*. Food Chemistry, 2015. **185**: p. 309-317.
186. Bandyopadhyay, P., A.K. Ghosh, and C. Ghosh, *Recent developments on polyphenol-protein interactions: effects on tea and coffee taste, antioxidant properties and the digestive system*. Food & Function, 2012. **3**(6): p. 592-605.
187. Ghosh, K.S., B.K. Sahoo, and S. Dasgupta, *Spectrophotometric studies on the interaction between (-)-epigallocatechin gallate and lysozyme*. Chemical Physics Letters, 2008. **452**(1): p. 193-197.
188. Wu, X., et al., *Investigation of the interaction between (-)-epigallocatechin-3-gallate with trypsin and α -chymotrypsin*. International Journal of Food Science & Technology, 2013. **48**(11): p. 2340-2347.

189. Wang, S., et al., *Molecular Interactions between (-)-Epigallocatechin Gallate Analogs and Pancreatic Lipase*. PLOS ONE, 2014. **9**(11): p. e111143.
190. Pal, S., S.K. Dey, and C. Saha, *Inhibition of Catalase by Tea Catechins in Free and Cellular State: A Biophysical Approach*. PLOS ONE, 2014. **9**(7): p. e102460.
191. McConkey, B.J., V. Sobolev, and M. Edelman, *The performance of current methods in ligand-protein docking*. Current Science, 2002. **83**(7): p. 845-856.
192. Campbell, S.J., et al., *Ligand binding: functional site location, similarity and docking*. Current Opinion in Structural Biology, 2003. **13**(3): p. 389-395.
193. Webb, B. and A. Sali, *Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER*. Current protocols in bioinformatics, 2016. **54**: p. 5.6.1-5.6.37.
194. Alford, R.F., et al., *The Rosetta All-Atom Energy Function for Macromolecular Modeling and Design*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2017. **13**(6): p. 3031-3048.
195. Capra, J.A., et al., *Predicting Protein Ligand Binding Sites by Combining Evolutionary Sequence Conservation and 3D Structure*. PLOS Computational Biology, 2009. **5**(12): p. e1000585.
196. Heo, L., et al., *GalaxySite: ligand-binding-site prediction by using molecular docking*. Nucleic acids research, 2014. **42**(Web Server issue): p. W210-W214.
197. Roy, A., J. Yang, and Y. Zhang, *COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation*. Nucleic acids research, 2012. **40**(Web Server issue): p. W471-W477.
198. Corbeil, C.R., C.I. Williams, and P. Labute, *Variability in docking success rates due to dataset preparation*. Journal of computer-aided molecular design, 2012. **26**(6): p. 775-786.

199. Friesner, R.A., et al., *Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy*. Journal of Medicinal Chemistry, 2004. **47**(7): p. 1739-1749.
200. Jones, G., et al., *Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking*¹¹ Edited by F. E. Cohen. Journal of Molecular Biology, 1997. **267**(3): p. 727-748.
201. Morris, G.M., et al., *AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility*. Journal of computational chemistry, 2009. **30**(16): p. 2785-2791.
202. Ruiz-Carmona, S., et al., *rDock: a fast, versatile and open source program for docking ligands to proteins and nucleic acids*. PLoS computational biology, 2014. **10**(4): p. e1003571-e1003571.
203. Trott, O. and A.J. Olson, *AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading*. Journal of computational chemistry, 2010. **31**(2): p. 455-461.
204. Brooijmans, N. and I.D. Kuntz, *Molecular Recognition and Docking Algorithms*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 2003. **32**(1): p. 335-373.
205. Pearce, B.C., et al., *E-Novo: An Automated Workflow for Efficient Structure-Based Lead Optimization*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2009. **49**(7): p. 1797-1809.
206. Huang, S.-Y., S.Z. Grinter, and X. Zou, *Scoring functions and their evaluation methods for protein–ligand docking: recent advances and future directions*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2010. **12**(40): p. 12899-12908.

207. Goodsell, D.S. and A.J. Olson, *Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 1990. **8**(3): p. 195-202.
208. Clark, D.E. and D.R. Westhead, *Evolutionary algorithms in computer-aided molecular design*. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 1996. **10**(4): p. 337-358.
209. Baxter, C.A., et al., *Flexible docking using Tabu search and an empirical estimate of binding affinity*. *Proteins*, 1998. **33**(3): p. 367-82.
210. Li, J., A. Fu, and L. Zhang, *An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular Docking*. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 2019. **11**(2): p. 320-328.
211. Morris, G.M., et al., *Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function*. *Journal of Computational Chemistry*, 1998. **19**(14): p. 1639-1662.
212. Verdonk, M.L., et al., *Improved protein-ligand docking using GOLD*. *Proteins*, 2003. **52**(4): p. 609-23.
213. Michel, J., J. Tirado-Rives, and W.L. Jorgensen, *Prediction of the water content in protein binding sites*. *The journal of physical chemistry. B*, 2009. **113**(40): p. 13337-13346.
214. Ross, G.A., G.M. Morris, and P.C. Biggin, *Rapid and accurate prediction and scoring of water molecules in protein binding sites*. *PloS one*, 2012. **7**(3): p. e32036-e32036.
215. Sun, H., et al., *Insight into Crizotinib Resistance Mechanisms Caused by Three Mutations in ALK Tyrosine Kinase using Free Energy Calculation Approaches*. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2013. **53**(9): p. 2376-2389.

216. Kulik, H.J., *Large-scale QM/MM free energy simulations of enzyme catalysis reveal the influence of charge transfer*. Physical chemistry chemical physics : PCCP, 2018. **20**(31): p. 20650-20660.
217. Chaskar, P., V. Zoete, and U.F. Röhrig, *Toward On-The-Fly Quantum Mechanical/Molecular Mechanical (QM/MM) Docking: Development and Benchmark of a Scoring Function*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2014. **54**(11): p. 3137-3152.
218. Senn, H.M. and W. Thiel, *QM/MM Methods for Biomolecular Systems*. Angewandte Chemie International Edition, 2009. **48**(7): p. 1198-1229.
219. Eldridge, M.D., et al., *Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes*. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 1997. **11**(5): p. 425-445.
220. Friesner, R.A., et al., *Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes*. Journal of Medicinal Chemistry, 2006. **49**(21): p. 6177-6196.
221. Kadukova, M. and S. Grudinin, *Convex-PL: a novel knowledge-based potential for protein-ligand interactions deduced from structural databases using convex optimization*. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 2017. **31**(10): p. 943-958.
222. Sotriffer, C.A., et al., *SFCscore: Scoring functions for affinity prediction of protein-ligand complexes*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2008. **73**(2): p. 395-419.
223. Fornabaio, M., et al., *Simple, Intuitive Calculations of Free Energy of Binding for Protein-Ligand Complexes. 3. The Free Energy Contribution of Structural Water Molecules in HIV-1 Protease Complexes*. Journal of Medicinal Chemistry, 2004. **47**(18): p. 4507-4516.

224. Li, G.-B., et al., *ID-Score: A New Empirical Scoring Function Based on a Comprehensive Set of Descriptors Related to Protein–Ligand Interactions*. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2013. **53**(3): p. 592-600.
225. Li, Y., et al., *Comparative Assessment of Scoring Functions on an Updated Benchmark: I. Compilation of the Test Set*. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2014. **54**(6): p. 1700-1716.
226. Gohlke, H., M. Hendlich, and G. Klebe, *Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions* | Edited by R. Huber. *Journal of Molecular Biology*, 2000. **295**(2): p. 337-356.
227. Muegge, I. and Y.C. Martin, *A General and Fast Scoring Function for Protein–Ligand Interactions: A Simplified Potential Approach*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1999. **42**(5): p. 791-804.
228. Neudert, G. and G. Klebe, *DSX: A Knowledge-Based Scoring Function for the Assessment of Protein–Ligand Complexes*. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2011. **51**(10): p. 2731-2745.
229. Huang, S.-Y. and X. Zou, *An iterative knowledge-based scoring function to predict protein–ligand interactions: I. Derivation of interaction potentials*. *Journal of Computational Chemistry*, 2006. **27**(15): p. 1866-1875.
230. Huang, S.-Y. and X. Zou, *A knowledge-based scoring function for protein-RNA interactions derived from a statistical mechanics-based iterative method*. *Nucleic acids research*, 2014. **42**(7): p. e55-e55.
231. M. J. Frisch, G.W.T., H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M.

- Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, *Gaussian 09*. 2009.
232. Gordon, J.C., et al., *H++: a server for estimating pKas and adding missing hydrogens to macromolecules*. *Nucleic acids research*, 2005. **33**(Web Server issue): p. W368-W371.
233. Tynan-Connolly, B.M. and J.E. Nielsen, *Redesigning protein pKa values*. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 2007. **16**(2): p. 239-249.
234. DeLano, W.L., *Pymol: An open-source molecular graphics tool*. *Newsletter On Protein Crystallography*, 2002. **40**: p. 82-92.
235. DiscoveryStudio, *Discovery Studio Viewer 3.5*. 2007, Accelrys Software Inc. .
236. Ballante, F. and G.R. Marshall, *An Automated Strategy for Binding-Pose Selection and Docking Assessment in Structure-Based Drug Design*. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2016. **56**(1): p. 54-72.
237. Alder, B.J. and T.E. Wainwright, *Phase Transition for a Hard Sphere System*. *The Journal of Chemical Physics*, 1957. **27**(5): p. 1208-1209.
238. Alder, B.J. and T.E. Wainwright, *Studies in Molecular Dynamics. I. General Method*. *The Journal of Chemical Physics*, 1959. **31**(2): p. 459-466.
239. McCammon, J.A., B.R. Gelin, and M. Karplus, *Dynamics of folded proteins*. *Nature*, 1977. **267**(5612): p. 585-590.

240. Coleman, J.A., E.M. Green, and E. Gouaux, *X-ray structures and mechanism of the human serotonin transporter*. *Nature*, 2016. **532**: p. 334.
241. Hilger, D., M. Masureel, and B.K. Kobilka, *Structure and dynamics of GPCR signaling complexes*. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2018. **25**(1): p. 4-12.
242. Salomon-Ferrer, R., et al., *Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit Solvent Particle Mesh Ewald*. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2013. **9**(9): p. 3878-3888.
243. Stone, J.E., et al. *Evaluation of Emerging Energy-Efficient Heterogeneous Computing Platforms for Biomolecular and Cellular Simulation Workloads*. in *2016 IEEE International Parallel and Distributed Processing Symposium Workshops (IPDPSW)*. 2016.
244. Narwal, M., et al., *Molecular dynamics simulation as a tool for assessment of drug binding property of human serum albumin*. *Molecular Biology Reports*, 2018. **45**(6): p. 1647-1652.
245. Kling, R.C., et al., *Active-State Model of a Dopamine D2 Receptor - Gai Complex Stabilized by Aripiprazole-Type Partial Agonists*. *PLOS ONE*, 2014. **9**(6): p. e100069.
246. Brandman, R., Y. Brandman, and V.S. Pande, *A-Site Residues Move Independently from P-Site Residues in all-Atom Molecular Dynamics Simulations of the 70S Bacterial Ribosome*. *PLOS ONE*, 2012. **7**(1): p. e29377.
247. Roccatano, D., A. Barthel, and M. Zacharias, *Structural flexibility of the nucleosome core particle at atomic resolution studied by molecular dynamics simulation*. *Biopolymers*, 2007. **85**(5-6): p. 407-421.
248. Kaminski, G.A., et al., *Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2001. **105**(28): p. 6474-6487.

249. MacKerell, A.D., et al., *All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins*. The Journal of Physical Chemistry B, 1998. **102**(18): p. 3586-3616.
250. MacKerell, A.D., J. Wiorkiewicz-Kuczera, and M. Karplus, *An all-atom empirical energy function for the simulation of nucleic acids*. Journal of the American Chemical Society, 1995. **117**(48): p. 11946-11975.
251. Ott, K.-H. and B. Meyer, *Parametrization of GROMOS force field for oligosaccharides and assessment of efficiency of molecular dynamics simulations*. Journal of Computational Chemistry, 1996. **17**(8): p. 1068-1084.
252. Cornell, W.D., et al., *A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules*. Journal of the American Chemical Society, 1995. **117**(19): p. 5179-5197.
253. Oostenbrink, C., et al., *A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6*. Journal of Computational Chemistry, 2004. **25**(13): p. 1656-1676.
254. Jorgensen, W.L., D.S. Maxwell, and J. Tirado-Rives, *Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids*. Journal of the American Chemical Society, 1996. **118**(45): p. 11225-11236.
255. Sun, H., *COMPASS: An ab Initio Force-Field Optimized for Condensed-Phase Applications Overview with Details on Alkane and Benzene Compounds*. The Journal of Physical Chemistry B, 1998. **102**(38): p. 7338-7364.
256. Hentschke, R., *Integrating the Equations of Motion, in Classical Mechanics: Including an Introduction to the Theory of Elasticity*, R. Hentschke, Editor. 2017, Springer International Publishing: Cham. p. 123-153.

257. Cuendet, M.A. and W.F. van Gunsteren, *On the calculation of velocity-dependent properties in molecular dynamics simulations using the leapfrog integration algorithm*. The Journal of Chemical Physics, 2007. **127**(18): p. 184102.
258. Verlet, L., *Computer "Experiments" on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules*. Physical Review, 1967. **159**(1): p. 98-103.
259. Frenkel, D. and B. Smit, *Appendix E - Integration Schemes*, in *Understanding Molecular Simulation (Second Edition)*, D. Frenkel and B. Smit, Editors. 2002, Academic Press: San Diego. p. 533-544.
260. Hou, H.-N., et al., *Studies on interaction between Vitamin B12 and human serum albumin*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008. **47**(1): p. 134-139.
261. Kallubai, M., et al., *Comparative binding mechanism of lupeol compounds with plasma proteins and its pharmacological importance*. Molecular BioSystems, 2015. **11**(4): p. 1172-1183.
262. Barreca, D., et al., *The interaction and binding of flavonoids to human serum albumin modify its conformation, stability and resistance against aggregation and oxidative injuries*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2017. **1861**(1, Part B): p. 3531-3539.
263. Delavari, B., et al., *Alpha-lactalbumin: A new carrier for vitamin D3 food enrichment*. Food Hydrocolloids, 2015. **45**: p. 124-131.
264. Wijesinha-Bettoni, R., C. Dobson Cm Fau - Redfield, and C. Redfield, *Comparison of the structural and dynamical properties of holo and apo bovine alpha-lactalbumin by NMR spectroscopy*. Journal of Molecular Biology, 2001. **307**(3): p. 885-98.

Biografija autora

Milica Radibratović (devojačko Bukorović) rođena je 29.11.1982. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Osnovne i master studije je završila na Univerzitetu u Beogradu - Hemijskom fakultetu, smer Hemija. Doktorske studije je upisala 2010. godine na programu Doktor hemijskih nauka na Univerzitetu u Beogradu – Hemijskom fakultetu.

Od februara 2011. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik, nakon čega je iste godine izabrana u zvanje istraživač saradnik na Univerzitetu u Beogradu - Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju. Učestvovala je u izvođenju nastave na Univerzitetu u Beogradu i to na Hemijskom, Poljoprivrednom i Fizičkom fakultetu, kao i na Gent Univerzitetu u Južnoj Koreji.

Tokom poslediplomskih studija, kao dobitnik DAAD stipendije, u julu 2009. godine boravila je na stručnom usavršavanju na Max Planck Institutu u Drezdenu, Nemačka. Takođe, bila je angažovana kao gostujući istraživač od septembra do decembra (tri meseca) 2017. godine na Gent Univerzitetu (Ghent University Global Campus), Inčon, Južna Koreja, ispostavi Gent Univerziteta, Gent, Belgija.

Do sada, Milica Radibratović je koautor 9 naučnih radova, publikovanih u časopisima kategorija M21a (5), M21 (3) i M22 (1), kao i 13 saopštenja prezentovanih na međunarodnim i nacionalnim naučnim skupovima.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Милица В. Радибратовић (рођена Букоровић)

Број индекса ДХ 31/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Теоријско проучавање конформационих промена албумина током везивања биоактивних лиганада из хране

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање

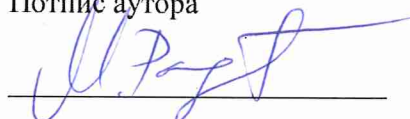
друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;

- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користла интелектуалну својину

других лица.

У Београду, 23. 12. 2019.

Потпис аутора



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милица В. Радибратовић (рођена Букоровић)

Број индекса ДХ 31/2010

Студијски програм Доктор хемијских наука

Наслов рада

Теоријско проучавање конформационих промена албумина током везивања биоактивних лигананда из хране

Ментори: Тања Ћирковић Величковић, Милош Милчић

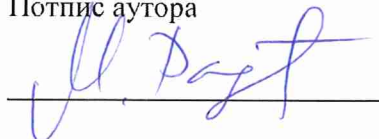
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 23.12.2019.

Потпис аутора



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Теоријско проучавање конформационих промена албумина током везивања биоактивних лиганата из хране

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

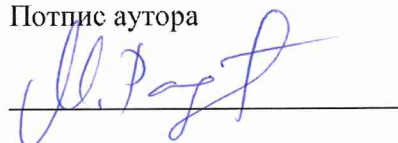
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Београду, 23. 12. 2019.

Потпис аутора



1. Ауторство. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прерада. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.