

# Termodinamika molekuskog prepoznavanja

---

Jurković, Mia

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:132808>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Mia Jurković

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **TERMODINAMIKA MOLEKULSKOG PREPOZNAVANJA**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za fizikalnu kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Zagreb, 2021. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

7. rujna 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

10. rujna 2021.

Mentor rada: prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Potpis:



---

# Sadržaj

|  |           |
|--|-----------|
| <b>§ SAŽETAK.....</b>  | <b>VI</b> |
| <b>§ 1. UVOD.....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>1.1. Molekularno prepoznavanje .....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>1.2. Termodinamika molekularnog prepoznavanja .....</b>   | <b>10</b> |
| <b>§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME .....</b>   | <b>12</b> |
| <i>2.1.1. Pojam liganda .....</i>  | <i>12</i> |
| <i>2.1.2. Proteini kao receptori za ligande – sastav i struktura .....</i>                                   | <i>12</i> |
| <i>2.1.3. Princip ključ – brava i model induciranog pristajanja.....</i>                                     | <i>14</i> |
| <b>2.2. Entalpijska i entropijska komponenta slobodne energije vezanja .....</b>                             | <b>16</b> |
| <b>2.3. Konstanta disocijacije – afinitet i specifičnost molekularnih interakcija .....</b>                  | <b>18</b> |
| <i>2.3.1. Frakcijska zasićenost i izoterma vezanja .....</i>   | <i>20</i> |
| <i>2.3.2. Entalpijsko – entropijska kompenzacija, kooperativnost vezanja i proteinska fleksibilnost.....</i> | <i>28</i> |
| <i>2.3.3. Scatchardova analiza .....</i>   | <i>30</i> |
| <b>2.4. Utjecaj vode na specifičnost protein – ligand interakcija.....</b>                                   | <b>32</b> |
| <b>2.5. Klasični i neklasični hidrofobni efekt .....</b>   | <b>35</b> |
| <b>2.6. Specifične međumolekularne interakcije .....</b>   | <b>37</b> |
| <i>2.6.1. Elektrostatske interakcije .....</i>   | <i>38</i> |
| <i>2.6.2. Van der Waalsove interakcije .....</i>   | <i>40</i> |
| <i>2.6.3. Hidrofobne interakcije .....</i>   | <i>41</i> |
| <i>2.6.4. Aromatske interakcije .....</i>  | <i>43</i> |
| <i>2.6.5. Vodikove veze .....</i>  | <i>45</i> |
| <i>2.6.6. Halogenske veze i ortogonalne multipolarne interakcije.....</i>                                    | <i>47</i> |
| <b>2.7. Određivanje termodinamičkih parametara .....</b>   | <b>49</b> |
| <i>2.7.1. Izotermalna titracijska kalorimetrija .....</i>  | <i>49</i> |
| <b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>  | <b>51</b> |



## § Sažetak

Molekulsko prepoznavanje je temelj većine značajnih bioloških procesa kao što su vezanja supstrata u aktivno mjesto enzima, prienos staničnih signala, međusobno prepoznavanje stanica te kontrola transkripcije i translacije. Interakcija biomolekula i njihovo međusobno prepoznavanje zasnivaju se na stvaranju nekovalentnog kompleksa putem nekovalentnih interakcija. U ovom radu, naglasak je stavljen na nekovalentne interakcije između proteina i njihovih liganada koji se reverzibilno vežu u proteinsko vezno mjesto. Komplementarnost između proteina i liganda ostvaruje se kroz mnoštvo nekovalentnih interakcija, poput elektrostatskih, van der Waalsovih, hidrofobnih i aromatskih interakcija te vodikovih i halogenskih veza. Glavne karakteristike većine protein – ligand interakcija su iznimno visok stupanj specifičnosti i odgovarajući afinitet, a jedna od osnovnih uloga tih interakcija je regulacija funkcije i aktivnosti proteina.

U uvjetima konstantnog tlaka i konstantne temperature pri kojima se zbiva većina biokemijskih procesa, promjena slobodne energije, odnosno Gibbsove energije, predstavlja termodinamički kriterij za spontanost procesa. Promjena Gibbsove energije vezanja sastoji se od entalpijskog i entropijskog člana te vezanje može biti entalpijski ili entropijski potaknuto pri čemu je bitno naglasiti da su entalpijski i entropijski doprinosi usko povezani. Ovaj rad ukazuje na to kako je za potpun opis i razumijevanje molekulskog prepoznavanja potrebno povezati termodinamičke podatke sa strukturama interagirajućih partnera. Promjena Gibbsove energije vezanja povezana je s konstantom disocijacije ( $K_D$ ) kojom se izražava afinitet liganda prema proteinu (ili obrnuto). Konstanta disocijacije je vrlo bitna jer odgovara koncentraciji liganda pri kojoj polovina proteinskih molekula u sustavu ima vezan ligand. Parametar koji je važan u određivanju konstante disocijacije jest frakcijska zasićenost definirana kao udio proteinskih veznih mjesta popunjenih ligandom. Shvaćanje i interpretacija pojedinačnih komponenata promjene slobodne energije zahtijeva razmatranje protein – ligand kompleksa kao fleksibilnih više nego statičnih struktura te razmatranje uloge solvatacijskih efekata. U ovom radu opisana je i važnost hidrofobnog efekta te razlika između klasičnog i neklasičnog hidrofobnog efekta koji proizlaze iz specifičnih svojstava vode. Termodinamička analiza molekulskog prepoznavanja najčešće se provodi izotermalnom titracijskom kalorimetrijom; metodom koja direktno mjeri toplinu oslobođenu tijekom vezanja.





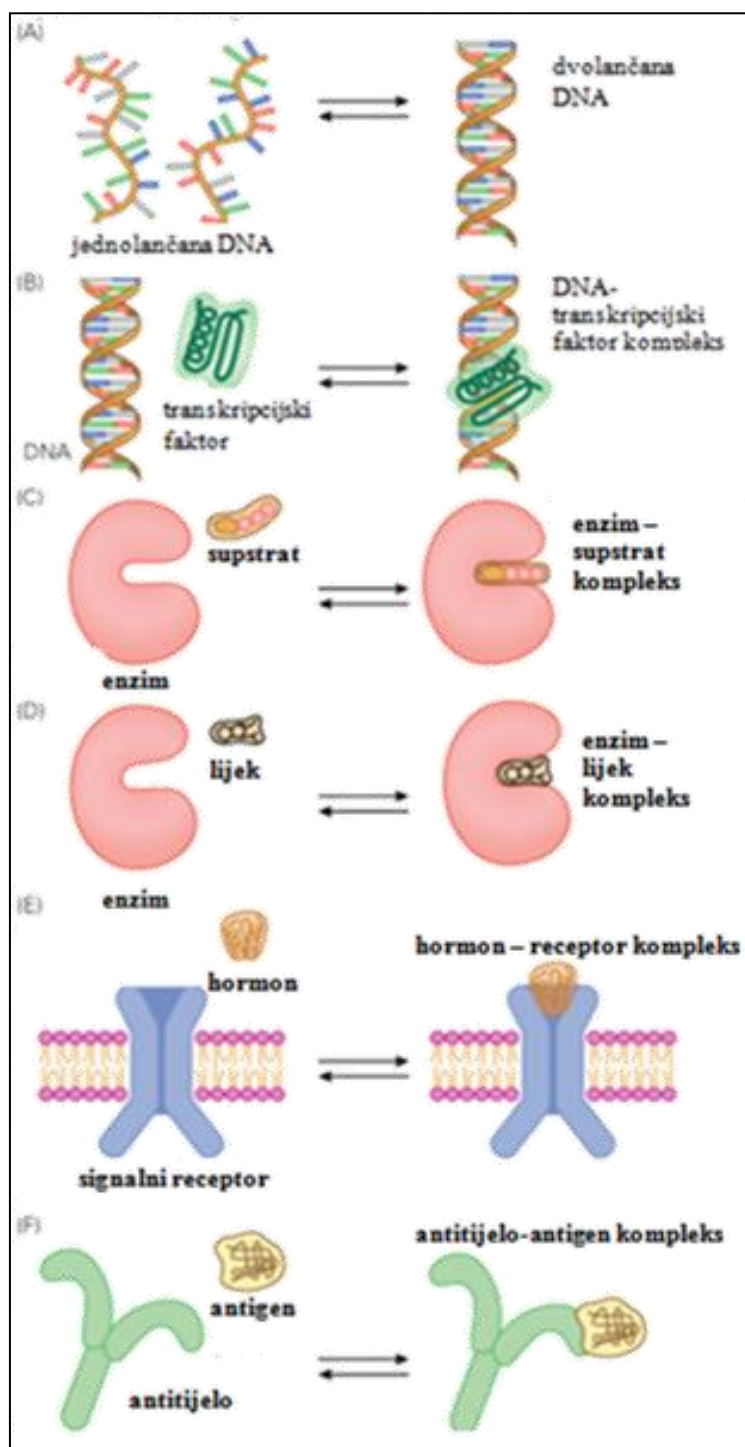
## § 1. UVOD

### 1.1. Molekulsko prepoznavanje

Molekulsko prepoznavanje predstavlja iznimno važno svojstvo bioloških makromolekula da selektivno vežu neku drugu makromolekulu ili malu molekulu (slika 1). Komplementarnost dviju ili više molekula ostvaruje se specifičnim nekovalentnim interakcijama. Međumolekulske interakcije međusobno se razlikuju u geometriji, jakosti i specifičnosti te su ključne za određivanje odnosa strukture i funkcije proteina. Tako primjerice enzimi specifično prepoznaju svoje supstrate, imunoglobulini (protutijela) određeni antigen, lanci nukleinskih kiselina sebi komplementarne lance itd. U ovom radu naglasak je stavljen na specifične interakcije između liganada i proteina koji predstavljaju njihove receptore. Kako bi došlo do interakcije između receptora i liganda, receptor mora posjedovati odgovarajuća vezna mjesta u koja će se ligand vezati. Vezno mjesto predstavlja regiju molekule koja ima potrebnu veličinu, geometriju i ulogu za prihvaćanje i vezanje druge molekule putem nekovalentnih interakcija. Primjerice, ukoliko receptor sadrži veliki broj donora vodikovih veza (poput primarnih i sekundarnih amina), tada bi ligand u idealnom slučaju trebao sadržavati jednak broj akceptora vodikovih veza (poput karboksilata), pozicioniranih na način pogodan za višestruko ostvarenje vodikovih veza. Uz spomenuto selektivno vezanje molekula koje se naziva specifičnošću vezanja, druga bitna komponenta molekulskog prepoznavanja je afinitet vezanja koji određuje tendenciju vezanja liganda. Nadalje, ideja prema kojoj se molekulsko prepoznavanje temelji na komplementarnosti površina rigidnih interagirajućih molekula nazvana je modelom ključa i brave, a ime joj je dodijelio njemački kemičara Emil Fischer. Međutim, modernizirani model nazvan „inducirano pristajanje“ podrazumijeva fleksibilnost interagirajućih molekula i mogućnost promjene oblika tijekom procesa prepoznavanja, što je naknadno detaljnije objašnjeno.<sup>1-4</sup>

Razumijevanje procesa molekulskog prepoznavanja zahtijeva potpunu karakterizaciju termodinamike vezanja te korelaciju između termodinamičkih podataka i struktura interagirajućih vrsta. Za kvantitativni opis sila koje pokreću vezanje molekula potrebno je određivanje promjena svih termodinamičkih parametara uključujući promjene slobodne energije vezanja ( $\Delta G^\circ$ ), entalpije vezanja ( $\Delta H^\circ$ ), entropije vezanja ( $\Delta S^\circ$ ) te toplinskog kapaciteta ( $\Delta C_p$ ). Molekulsko prepoznavanje osim što je temelj većine esencijalnih bioloških procesa

(enzimske reakcije, stanična signalizacija, kontrola transkripcije i translacije i dr.), od velikog je značaja i zato što omogućuje sintezu i analizu novih lijekova. Primjenu pronalazi i u dizajnu materijala, postupcima odjeljivanja, katalizi te mnogim drugim područjima.<sup>5,6</sup>



Slika 1. Molekularno prepoznavanje, primjeri nekovalentnih interakcija. Preuzeto iz literaturnog izvora Kuriyan et al.<sup>6</sup>

## 1.2. Termodinamika molekuskog prepoznavanja

Ponašanje biokemijskih sustava podliježe zakonima termodinamike. Ti zakoni su općeniti principi koji se primjenjuju na sve fizikalne i biološke procese. Od velikog su značaja jer određuju uvjete pri kojima se pojedini procesi mogu ili ne mogu zbivati. Također, zakoni termodinamike razlikuju sustav i njegovu okolinu. Sustav podrazumijeva dio svijeta koji se promatra (primjerice: reakcijska posuda, tikvica ili epruveta), a okolina je sve što okružuje sustav. Prvi zakon termodinamike kaže da je ukupna energija sustava i okoline konstantna. Drugi zakon termodinamike kaže da se ukupna entropija sustava i okoline uvijek povećava (entropija – mjera neuređenosti).<sup>7</sup>

Promjena entropije u okolini proporcionalna je količini topline prenesene iz sustava i obrnuto proporcionalna temperaturi  $T$  okoline u slučaju sustava s konstantnom temperaturom i konstantnim tlakom, a dana je izrazom:

$$\Delta S_{\text{okolina}} = -\Delta H_{\text{sustav}} / T \quad (1.1)$$

Ukupna promjena entropije dana je pak izrazom:

$$\Delta S_{\text{ukupno}} = \Delta S_{\text{sustav}} + \Delta S_{\text{okolina}} \quad (1.2)$$

Uvrštavajući jednadžbu (1.1) u jednadžbu (1.2), dobiva se:

$$\Delta S_{\text{ukupno}} = \Delta S_{\text{sustav}} - \Delta H_{\text{sustav}} / T \quad (1.3)$$

Množenje s  $-T$  daje:

$$-T\Delta S_{\text{ukupno}} = \Delta H_{\text{sustav}} - T\Delta S_{\text{sustav}} \quad (1.4)$$

Funkcija  $-T\Delta S$  ima jedinicu energije i naziva se Gibbsovom slobodnom energijom, po Josiahu Willardu Gibbsu koji je 1878. godine uveo tu funkciju:

$$\Delta G = \Delta H_{\text{sustav}} - T\Delta S_{\text{sustav}} \quad (1.5)$$

Promjena Gibbsove slobodne energije upotrebljava se za opisivanje energetike biokemijskih reakcija. Nadalje, drugi zakon termodinamike kaže da se entropija svemira mora povećavati kako bi se neki proces mogao zbivati. Stoga, ukupna entropija će se povećavati samo ako je

$$\Delta S_{\text{sustav}} > \Delta H_{\text{sustav}} / T. \quad (1.6)$$

Preslagivanjem se dobije  $T\Delta S_{\text{sustav}} > \Delta H$ , odnosno entropija se povećava samo ako je:

$$\Delta G = \Delta H_{\text{sustav}} - T\Delta S_{\text{sustav}} < 0. \quad (1.7)$$

Dakle, pri konstantnom tlaku i konstantnoj temperaturi, promjena slobodne energije mora biti negativna da bi proces teкао spontano. Do negativne promjene slobodne energije dolazi samo kada se ukupna entropija svemira povećava.<sup>7</sup> Nekovalentno vezanje proteina i liganda regulirano je osnovama termodinamike te kao i bilo koji drugi spontani proces, javlja se jedino kada je povezano s negativnom promjenom Gibbsove energije vezanja pri konstantnom tlaku i temperaturi sustava (jednadžba 1.5). Budući da promjena Gibbsove energije vezanja sastoji od entalpijskog ( $\Delta H$ ) i entropijskog ( $-T\Delta S$ ) člana, to može imati različita termodinamička značenja, varirajući od entalpijski do entropijski potaknutog vezanja. U ovom radu nastoje se interpretirati pojedinačne komponente slobodne energije te specifičnosti sustava koje na njih utječu.

## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1.1. Pojam liganda

Ligand je naziv za molekulu koja se reverzibilno veže na protein, točnije u vezno mjesto proteina. Najčešće se radi o maloj molekuli u odnosu na protein, ali generalno ligand može biti i drugi protein ili bilo koja makromolekula poput DNA ili RNA. Bitno je spomenuti i kako se ligand na protein može vezati alosterički i nealosterički, no o tome će kasnije biti govora. U ovom radu opisuje se termodinamika najjednostavnijih interakcija koje uključuju jedan receptor i jedan ligand.<sup>6</sup>

### 2.1.2. Proteini kao receptori za ligande – sastav i struktura

Proteini su najsvestranije molekule u živim sustavima koje obavljaju bitne funkcije u svim biološkim procesima. Oni djeluju kao katalizatori, prenose i pohranjuju ostale molekule (npr. kisik), osiguravaju mehaničku potporu i imunosnu zaštitu, provode gibanje, prenose živčane impulse te kontroliraju rast i diferencijaciju.<sup>7</sup> Obavljanje tog širokog raspona funkcija proteinima omogućuju neka njihova ključna svojstva:

1. Proteini su polimeri građeni od monomernih jedinica (aminokiselina) koje su vezane jedna za drugu. Značajno je da se proteini spontano smataju u trodimenzionalne strukture određene redoslijedom aminokiselina. Funkcija proteina izravno ovisi o trodimenzionalnoj strukturi.
2. Proteini sadrže različite, većinom kemijski reaktivne, funkcijske skupine. Kombiniranje tih skupina na različite načine omogućuje proteinima širok spektar djelovanja. Reaktivna svojstva funkcionalnih skupina posebno su bitna za djelovanje enzima, proteina koji kataliziraju specifične kemijske reakcije u biološkim sustavima.
3. Proteini mogu djelovati međusobno ili s drugim biološkim makromolekulama tvoreći složene nakupine.

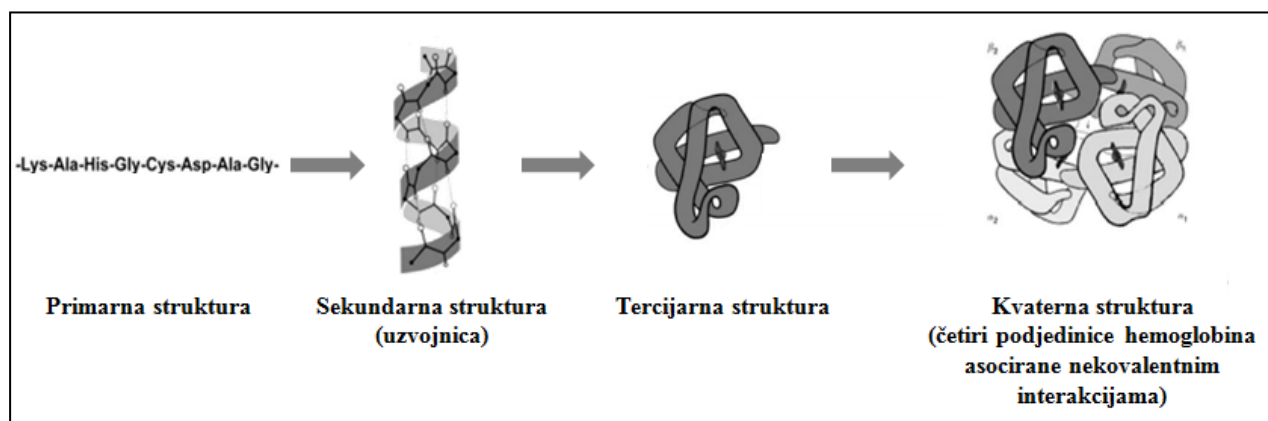
4. Postoje prilično kruti, ali i vrlo fleksibilni proteini. Čvrste jedinice mogu funkcionirati kao strukturni elementi u citoskeletu ili vezivnome tkivu, a djelomično fleksibilni proteini mogu djelovati kao šarke, opruge ili poluge bitne za funkciju, udruživanje i prijenos informacija.

Proteini su izgrađeni od dvadeset različitih aminokiselina. Svaka aminokiselina se sastoji od središnjeg ugljikovog atoma na koji je vezana amino skupina, karboksilna skupina, karakteristični bočni ogranak te vodikov atom. S iznimkom glicina, ta tetraedarska središta su stereogeni centri, a u prirodnim proteinima prisutan je samo L izomer. Dvadeset različitih bočnih ogranaka koji se mogu naći u proteinima, međusobno se razlikuju oblikom, nabojem, sposobnošću za stvaranje vodikovih veza, hidrofobnošću i kemijskom reaktivnošću. Jedna od mogućih grupacija bočnih ogranaka je sljedeća:

1. Alifatski bočni ogranci – glicin, alanin, valin, leucin, izoleucin, metionin i prolin
2. Aromatski bočni ogranci – fenilalanin, tirozin i triptofan
3. Bočni ogranci s hidroksilnom skupinom – serin i treonin
4. Cistein sa sulfhidrilnom (tiolnom) skupinom
5. Ogranci s amidnom skupinom – asparagin i glutamin
6. Bazični bočni ogranci – lizin, arginin i histidin
7. Kiseli bočni ogranci – asparaginska i glutaminska kiselina

Struktura proteina dijeli se na četiri razine:

- Primarna struktura – linearan slijed aminokiselina (potpun opis kovalentnih veza proteina) u polipeptidnom lancu
- Sekundarna struktura – geometrijski pravilne ponavljajuće prostorne strukture, stabilizirane vodikovim vezama između karbonilnih i amino skupina na polipeptidnoj okosnici, koje zauzimaju dijelovi polipeptidnog lanca proteina (primjeri:  $\alpha$  – uzvojnica,  $\beta$  – nabrani list)
- Tercijarna struktura – ukupna trodimenzijska struktura / konformacija koju zauzima jedan polipeptidni lanac
- Kvaterna struktura – više polipeptidnih lanaca međusono asociranih nekovalentnim interakcijama

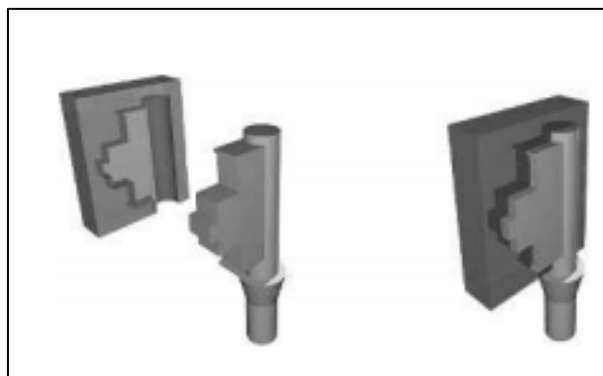


Slika 2. Razine strukture proteina na primjeru tetramernog proteina hemoglobina.<sup>8</sup>

Već spomenuto vezno mjesto proteina nastaje tijekom smatanja proteina (nastanka tercijarne strukture) kada se različite funkcionalne skupine (karboksilna, amino, sulfhidrilna, hidroksilna, imidazolna) različitih bočnih ogranaka nađu u prostornoj blizini. Ono svojim oblikom (geometrijska komplementarnost) i rasporedom bočnih ogranaka (elektronska komplementarnost) specifično prepoznaje ligande te ih veže u neposrednoj blizini i povoljnoj orijentaciji.<sup>8</sup> Poznavanje struktura veznih mjesta u proteinima i prepoznavanje specifičnih molekula koje se na njih vežu bitno je za razumijevanje funkcije proteina te sintezu novih lijekova.

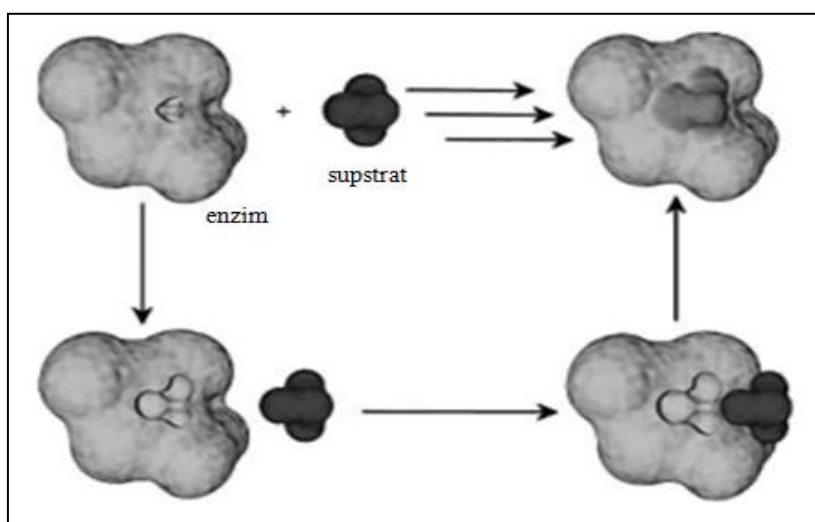
### 2.1.3. Princip ključ – brava i model inducirano pristajanja

Kod enzima, ligandi se nazivaju reakcijskim supstratima, a mjesto vezanja supstrata na enzim naziva se katalitičkim ili aktivnim mjestom. Emil Fischer razvio je 1894. godine koncept ključ – brava, na temelju svog rada o vezanju supstrata na enzime, u kojem enzim opisuje kao bravu, a supstrat kao ključ. To znači da supstrat, odnosno u širem kontekstu ligand, ima veličinu i oblik komplementarne veznom mjestu enzima, tj. receptora za ligand. Međutim, koncept ključ – brava predstavlja vrlo pojednostavljenu reprezentaciju biološkog sustava zato što enzimi ne samo da se ne uklapaju u koncept rigidne brave, već su i iznimno fleksibilni i konformacijski dinamični u otopini. Ta mobilnost enzima u mnogočemu je bitna, a posebice kada je riječ o vezanju supstrata na enzime i enzimskoj katalizi.<sup>3</sup>



Slika 3. Princip ključ – brava. Brava predstavlja receptor čiji žljebovi su komplementarni supstratu, opisanom ključem.<sup>3</sup>

Unaprjeđenje navedenog koncepta uveo je Daniel Koshland postulirajući kako je mehanizam vezanja supstrata na enzim interaktivni proces u kojem dolazi do promjene oblika i modifikacije veznog mjesta enzima uslijed vezanja supstrata, čime supstrat bolje prijanja u vezno mjesto. Takav model naziva se model induciranog pristajanja. Općenito govoreći, model induciranog pristajanja opisuje promjenu okosnice receptora za ligand ili veznog mjesta uslijed vezanja liganda, što rezultira povećanjem komplementarnosti receptora i liganda te boljim prijanjanjem liganda u vezno mjesto receptora (u našem slučaju proteina). Upravo na modelu induciranog pristajanja temelji se vezanje lijekova na ciljne proteine tijekom kojeg dolazi do konformacijske promjene unutar samog proteina.<sup>3</sup>



Slika 4. Vezanje supstrata u aktivno mjesto enzima, prikazano modelom induciranog pristajanja. Približavanjem enzima i supstrata aktivno mjesto enzima mijenja oblik rezultirajući preciznijim prijanjanjem i vezanjem supstrata.<sup>3</sup>



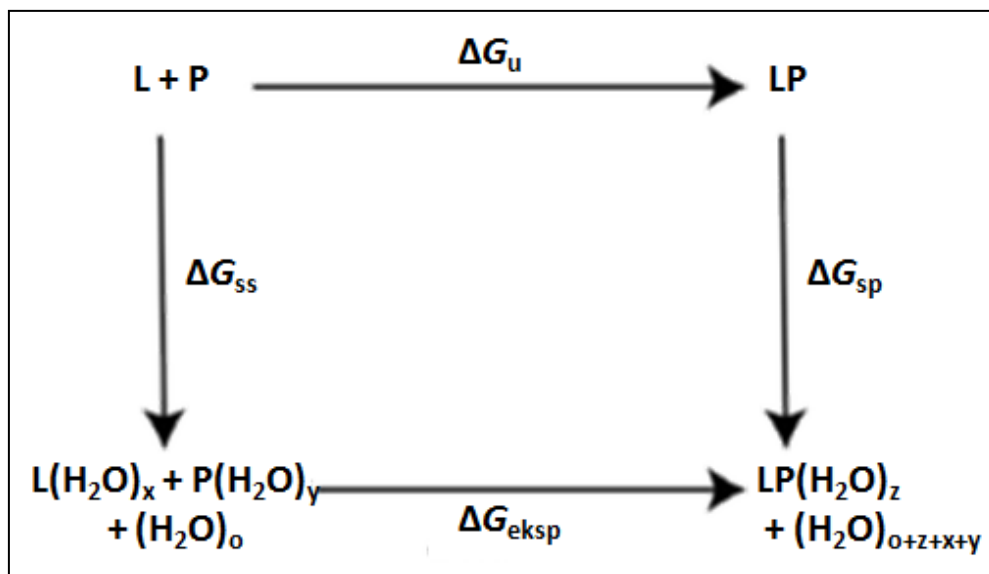
## 2.2. Entalpijska i entropijska komponenta slobodne energije vezanja

Kao što je već spomenuto, nekovalentno vezanje proteina i liganda javlja se jedino kada je povezano s negativnom promjenom Gibbsove energije vezanja koja se sastoji od entalpijske ( $\Delta H$ ) i entropijske ( $-T\Delta S$ ) komponente. Entalpijski doprinos slobodnoj energiji vezanja odražava specifičnost i jakost interakcije između interagirajućih partnera, dok entropijski doprinos, najjednostavnije rečeno, predstavlja mjeru dinamičnosti cijelog sustava. Promjene u entropiji vezanja upućuju na smanjenje pokretljivosti uzrokovane gubitkom translacijskih i rotacijskih stupnjeva slobode interagirajućih partnera. S druge strane, promjene u konformacijskoj entropiji mogu biti i povoljne te u nekim slučajevima reducirati entropijsku cijenu vezanja. Solvacijski utjecaji, poput reorganizacije otapala ili otpuštanja čvrsto vezanih molekula otapala uslijed vezanja liganda, mogu znatno pridonijeti entropijskom elementu slobodne energije vezanja.<sup>9</sup>

Gibbsova jednačba može se pisati i kao jednačba (1.8):

$$\Delta G = -RT \ln K_D \quad (1.8)$$

gdje je  $R$  opća plinska konstanta,  $T$  termodinamička temperatura i  $K_D$  konstanta vezanja. Takva formulacija naglašava poveznicu između Gibbsove energije i afiniteta vezanja. Proces vezanja proteina i liganda može biti prezentiran Born-Haberovim ciklusom. Tipični ciklus prikazan je na slici 5. Unutrašnja slobodna energija vezanja između liganda L i proteina P označena je s  $\Delta G_u$ , dok je eksperimentalno opažena slobodna energija vezanja označena s  $\Delta G_{\text{eksp}}$ .<sup>9</sup>



Slika 5. Primjer Born – Haberovog ciklusa za vezanje liganda i proteina (LP). Na taj način je eksperimentalno opažena slobodna energija vezanja ( $\Delta G_{eksp}$ ) povezana s unutrašnjom slobodnom energijom vezanja ( $\Delta G_u$ ) između liganda (L) i proteina (P), te sa slobodnim energijama solvatacije slobodnih reaktanata ( $\Delta G_{ss}$ ) i rezultirajućeg kompleksa ( $\Delta G_{sp}$ ). Oznake o, x, y i z odnose se na broj molekula vode uključenih u solvataciju nevezanog liganda (x), nevezanog proteina (y), ligand – protein kompleksa (z) i cjelokupnog otapala (o). (Preuzeto i prilagođeno prema literaturnom izvoru broj 9.)

Mogu se definirati dva dodatna procesa: promjena slobodne energije solvatacije slobodnih (nevezanih) interagirajućih partnera ( $\Delta G_{ss}$ ) i promjena slobodne energije solvatacije ligand – protein kompleksa ( $\Delta G_{sp}$ ). S obzirom da je slobodna energija funkcija stanja, neovisna je o putu kojim sustav prelazi iz jednog stanja u drugo. Stoga se opažena promjena slobodne energije vezanja može napisati:

$$\Delta G_{eksp} = \Delta G_u + \Delta G_{sp} - \Delta G_{ss}. \quad (1.9)$$

Navedena jednadžba pokazuje kako eksperimentalno opažena energija vezanja može biti rastavljena na „unutrašnji” doprinos i solvatacijske doprinose ligand – protein kompleksa i nevezanih partnera. Slična raščlamba može se napraviti za entalpijski i entropijski dio pojedinačno zato što su ti dijelovi također funkcije stanja.<sup>9</sup>

Budući da su entalpijske i entropijske komponente vezanja ovisne o mnogim specifičnostima sustava (kao što su protonacijska stanja, vezanje metalnih kationa, promjena konformacijske entropije od jednog do drugog liganda na teško predvidiv način, itd.), dolazi se do zaključka da je optimizacija ukupne promjene slobodne energije i dalje jedini uspješan pristup strukturno baziranom molekulskom dizajnu. Pokušaj shvaćanja i interpretacije pojedinačnih komponenata slobodne energije zahtijevao bi ponovnu analizu cijelog koncepta ligand – protein vezanja te razmišljanje o dvjema fundamentalnim temama do u najsitnije detalje, a to su prikaz protein – ligand kompleksa kao fleksibilnih više nego statičnih struktura te uloga solvatacijskih efekata.<sup>10</sup> Poseban doprinos specifičnih interakcija i fleksibilnosti, kao i solvatacijski utjecaji razrađeni su u jednom od narednih poglavlja.

### 2.3. Konstanta disocijacije – afinitet i specifičnost molekularskih interakcija

Pri sobnoj temperaturi, kod nekovalentnih kompleksa dolazi do nastanka ravnotežne smjese vezanih i nevezanih molekula. Mjerenjem koncentracija slobodne i vezane vrste u ravnoteži može se izračunati jakost molekularske interakcije. Veličina koja stavlja u omjer koncentracije reaktanata i produkata u reakciji koja je dostigla ravnotežno stanje naziva se konstanta disocijacije ( $K_D$ ).<sup>6</sup>

Osnovna ravnoteža vezanja za interakciju proteina P s ligandom L može se prikazati na sljedeći način:



U navedenoj jednadžbi, PL označava nekovalentni protein – ligand kompleks. Koncentracijska konstanta ravnoteže,  $K$ , za navedenu reakciju glasi:

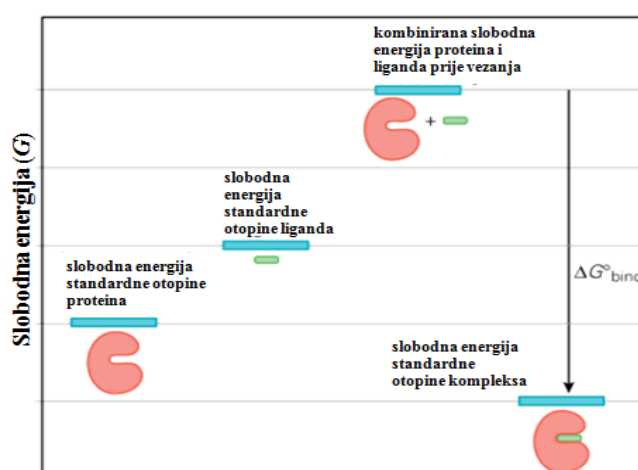
$$K = \frac{[PL]}{[P][L]} \quad (1.11)$$

gdje je [PL] ravnotežna koncentracija protein – ligand kompleksa, [P] je ravnotežna koncentracija slobodnog proteina, a [L] ravnotežna koncentracija slobodnog liganda. Budući

da je reakcija vezanja (1.10) čitana s lijeva na desno u smjeru asocijacije, ravnotežna konstanta definirana u jednadžbi (1.11) definira se kao ravnoteža kompleksiranja/asocijacije,  $K_A$ . Tada je promjena standardne slobodne energije,  $\Delta G^\circ$ , za reakciju vezanja dana je jednadžbom:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_A \quad (1.12)$$

Poznato je da je  $\Delta G^\circ$  promjena slobodne energije tijekom pretvorbe jednog mola reaktanta u stehiometrijski ekvivalent produkta (slika 6). U ovom slučaju,  $\Delta G^\circ$  predstavlja promjenu slobodne energije kada se jedan mol proteina veže na jedan mol liganda u standardnim uvjetima ( $c = 1 \text{ M}$ ). Promjena standardne slobodne energije prilikom kompleksiranja naziva se promjena slobodne energije vezanja ili samo slobodna energija vezanja,  $\Delta G^\circ_{\text{bind}}$ .<sup>6</sup>



Slika 6. Shematski dijagram koji prikazuje promjene slobodne energije uslijed vezanja liganda. (Preuzeto i prilagođeno prema literaturnom izvoru broj 6.)

Molekulsko prepoznavanje podrazumijeva kombinaciju afiniteta i specifičnosti. Afinitet molekulske interakcije odnosi se na njezinu jakost. Što je smanjenje slobodne energije prilikom vezanja veće, to je i afinitet veći. Zatim, specifičnost interakcije referira se na relativnu jakost interakcija između jednog proteina i alternativnih liganada. U visoko specifičnoj interakciji, promjena slobodne energije pri vezanju na favorizirani ligand puno je veća nego za ostale ligande. Biološki važne interakcije obično su visokospecifične. Jakost vezanja, odnosno afinitet liganda prema receptoru (ili obrnuto) obično se kvantitativno izražava ravnotežnom konstantom disocijacije,  $K_D$ . Reakcija disocijacije je samo obrnuta reakcija reakciji asocijacije:



Sukladno tome, konstanta disocijacije,  $K_D$ , predstavlja inverz konstante asocijacije:

$$K_D = \frac{[P][L]}{[PL]} = 1 / K_A \quad (1.14)$$

Iz jednažbi (1.12) i (1.14) dobiva se jednažba (1.15):

$$\Delta G^{\circ}_{\text{bind}} = + RT \ln K_D \quad (1.15)$$

Iako je konstanta disocijacije bezdimenzionalna veličina kada je izražena preko aktiviteta, često se izražava preko koncentracija te joj se pridaje jedinica koncentracije. Naime, u izrazu za konstantu disocijacije ne koriste se aktiviteti vrsta, već koncentracije zbog razrijeđenosti biokemijskih sustava te malih koncentracija proteina i liganada. Biološki važne nekovalentne interakcije imaju disocijacijske konstante koje se sežu od pikomolarnih do nanomolarnih veličina za najjače interakcije te od pikomolarnih do milimolarnih za najslabije. To se slaže s promjenama standardne slobodne energije vezanja od otprilike  $-50 \text{ kJ mol}^{-1}$  za jake interakcije te oko  $-17 \text{ kJ mol}^{-1}$  za slabije. Molekule lijekova obično se vežu vrlo čvrsto na svoje ciljane proteine, s konstantama disocijacije u rasponu nM – pM.<sup>6</sup>

### 2.3.1. Frakcijska zasićenost i izoterma vezanja

Konstanta disocijacije ( $K_D$ ) odgovara koncentraciji liganda pri kojoj polovina proteinskih molekula u sustavu ima vezan ligand. Upravo je to razlog zbog kojeg je  $K_D$  češće korištena od  $K_A$ . Vrijednost  $K_D$  je lako određiva ukoliko postoji način mjerenja udjela proteinskih molekula vezanih na ligand.<sup>6</sup>

U svrhu detaljnijeg pojašnjenja navedenih tvrdnji, definiran je parametar  $f$ , tzv. frakcijska zasićenost ili frakcijska okupiranost veznih mjesta za ligand na proteinu. Dakle, frakcijska zasićenost predstavlja udio popunjenih veznih mjesta proteina. Prepostavi li se da svaka

molekula proteina može vezati po jednu molekulu liganda, tada je frakcijska zasićenost dana kao omjer koncentracije proteinskih molekula koje su vezale ligand i ukupne koncentracije proteina:

$$f = \frac{[PL]}{[P]+[PL]} \quad (1.15)$$

Ako se upotrijebi jednadžba (1.14), [PL] može se povezati s konstantom disocijacije na sljedeći način:

$$[PL] = \frac{[P][L]}{K_D} \quad (1.16)$$

Zamjenom izraza [PL] u jednadžbi (1.16) izrazom za [PL] iz jednadžbe (1.15), dobiva se:

$$f = \frac{[P][L]}{K_D([P] + \frac{[P][L]}{K_D})} = \frac{[L]}{K_D(1 + \frac{[L]}{K_D})} = \frac{[L]}{K_D + [L]} \quad (1.17)$$

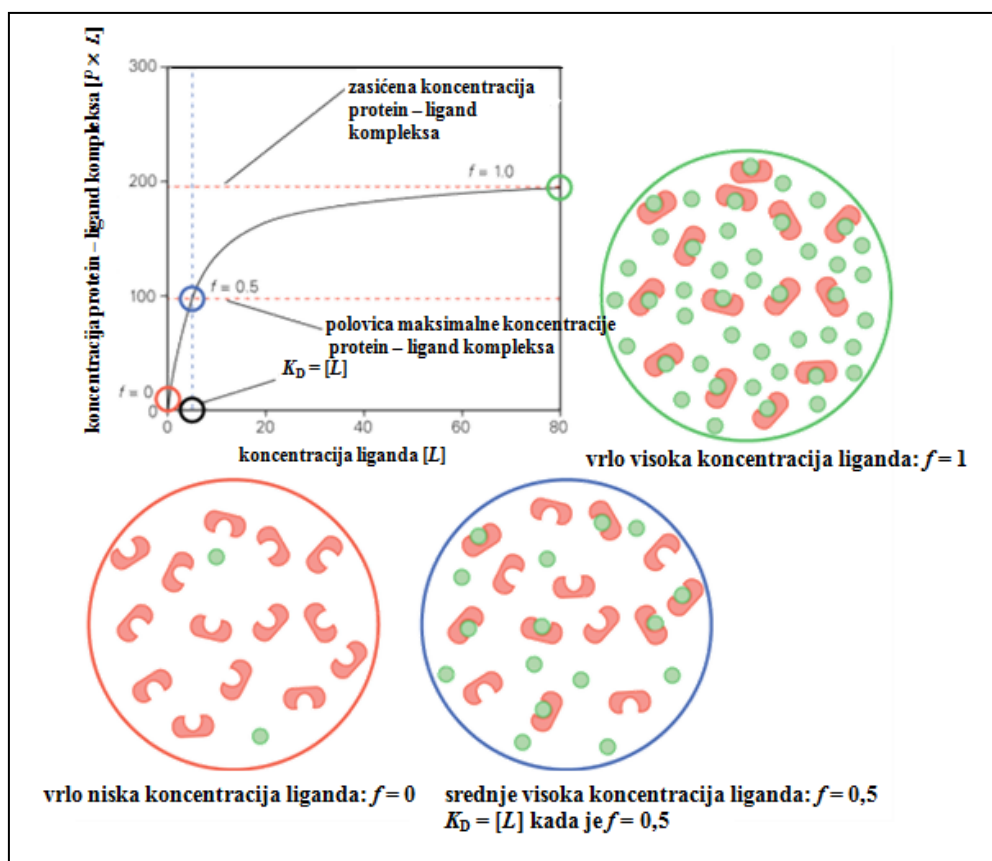
Koristeći jednadžbu (1.17) može se izračunati vrijednost frakcijske zasićenosti,  $f$ , kada je koncentracija liganda jednaka u redu veličine vrijednosti konstante disocijacije:

$$[L] = K_D ; f = \frac{[L]}{K_D + [L]} = \frac{K_D}{K_D + K_D} = \frac{1}{2} \quad (1.18)$$

Jednadžba (1.18) govori kada je protein poluzasićen, odnosno kada je polovina molekula proteina u otopini vezana na ligand.

Grafički prikaz frakcijske zasićenosti, kao funkcije koncentracije liganda mjerene pri konstantnoj temperaturi, poznat je pod nazivom izoterma vezanja ili krivulja vezanja. Iz te krivulje može se dobiti konstanta disocijacije jedino ako su mjerenja izvođena pri istim temperaturama, otkuda i dolazi izotermni dio u nazivu. Za izvođenje takvih eksperimenata koriste se različite metode kojima se prati koncentracija slobodnog liganda u otopini pri čemu

je bitno da metoda razlučuje koncentraciju slobodne vrste (liganda) od koncentracije vrste u kompleksu. Najčešće su korištene spektroskopske metode (UV, fluorescencija, NMR) i mikrokalorimetrija (ITC). Oblik izoterme vezanja, za jednostavno nealosteričko vezanje liganda na protein, prikazan na slici 7, naziva se hiperbolom. Odstupanja od takvog hiperbolnog vezanja ukazuju na kompliciranije fenomene poput alosterije ili višestrukih veznih mjesta s različitim afinitetima.<sup>6</sup>



Slika 7. Frakcijska zasićenost,  $f$ , kao funkcija koncentracije liganda  $[L]$ , prikazano izotermom vezanja u obliku hiperbole. Vrijednost frakcijskog zasićenja varira od 0 (nema vezanja) do 1 (sve proteinske molekule vezane na ligand). (Preuzeto i prilagođeno prema literaturnom izvoru broj 6.)

Raspon koncentracija pri kojem se  $f$  mijenja od niske do visoke relativno je uzak (slika 8A) te se najviše informacija može iščitati s lijeve strane grafa. Stoga se radi preglednijeg prikaza i preciznijeg određivanja konstante disocijacije,  $K_D$ , puno češće koriste logaritamski prikazi izoterma vezanja. Također, takav način grafičkog prikaza ispostavio se kao vrlo koristan

prilikom analize alosterije u vezanju. Primjer logaritamskog grafa prikazan je na slici 8B. Detaljniji uvid u prirodu logaritamskog grafa započinje izrazom za frakcijsku zasićenost proteina vezanih na ligand:

$$f = \frac{[L]}{K_D + [L]} \quad (1.19)$$

Udio proteina koji nisu vezani na ligand dan je kao  $1-f$  jednačbom (1.20):

$$1-f = 1 - \frac{[L]}{K_D + [L]} = \frac{[L] + K_D - [L]}{[L] + K_D} = \frac{K_D}{[L] + K_D} \quad (1.20)$$

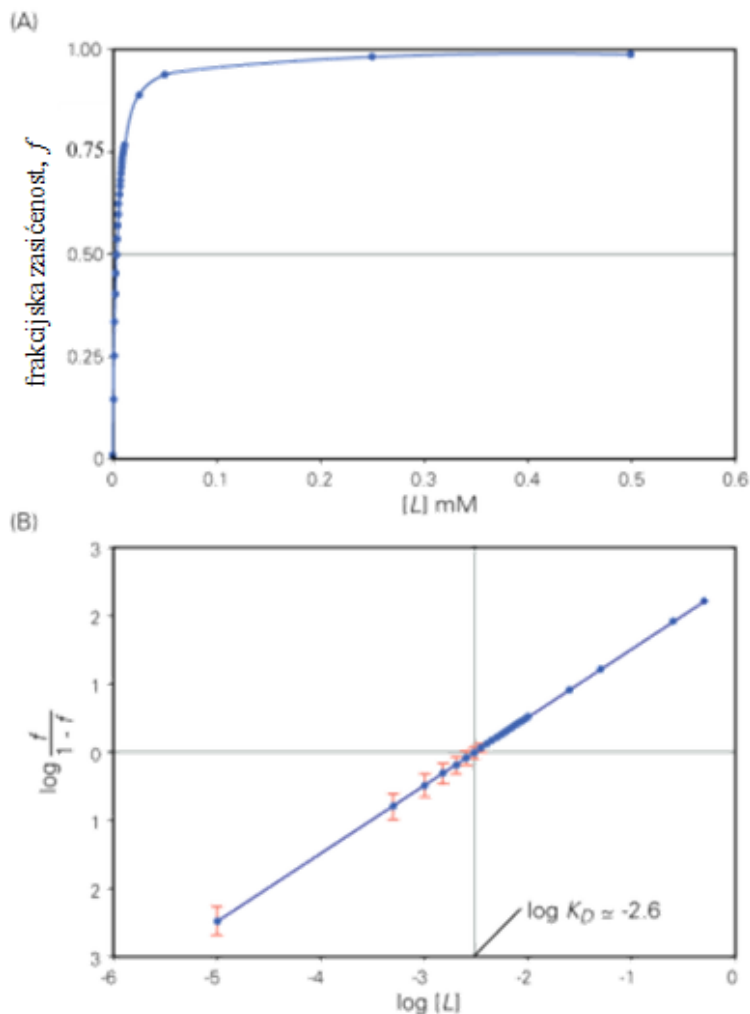
Pomoću jednačbi (1.19) i (1.20) može se izračunati omjer udjela vezanih proteina i udjela nevezanih proteina:

$$\frac{f}{1-f} = \frac{[L]}{[L] + K_D} \times \frac{[L] + K_D}{K_D} = \frac{[L]}{K_D} \quad (1.21)$$

Logaritmiranjem objiju strana jednačbe (1.21) dobije se:

$$\log \left( \frac{f}{1-f} \right) = \log \left( \frac{[L]}{K_D} \right) = \log [L] - \log K_D \quad (1.22)$$





Slika 8. Prikaz A) izoterme vezanja i B) logaritamske izoterme vezanja.

(Preuzeto i prilagođeno prema literaturnom izvoru broj 6.)

Kao što je vidljivo na slici 8B, ovisnost  $\log\left(\frac{f}{1-f}\right)$  o  $\log [L]$  je linearna. Kada je protein poluzasićen, odnosno kada je  $\left(\frac{f}{1-f}\right) = 1$ , tada je  $\log\left(\frac{f}{1-f}\right) = 0$ . Odsječak na osi apscisa jednak je  $\log K_D$ . Dakle, u ovom slučaju, ako graf nije linearan, to je indikacija da se radi o kompleksnijem procesu vezanja koji možebitno uključuje faktore poput alosterije.<sup>6</sup>

Bitno pitanje koje se često postavlja u biokemiji i farmakologiji jest do koje mjere se određeni protein veže na ligand pri nekoj specifičnoj koncentraciji liganda. Primjerice, koja bi trebala biti koncentracija inhibitora za enzim u krvi pacijenta kako bi se većina enzima vezala za inhibitor, ako postoji lijek koji dovodi inhibitor do enzima. Većina liganada veže se na više od jednog proteina u stanici. Pitanje je možemo li izabrati ligand čija će koncentracija omogućiti

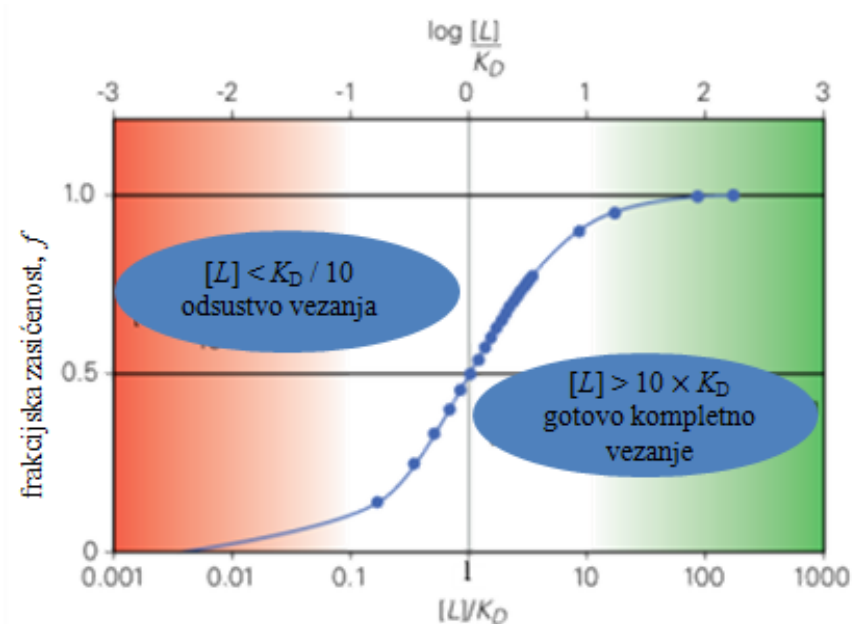
vezanje jednog proteina na ligand, a drugog ne. Za jednostavno vezanje koje uključuje jedan ligand i jedan protein, vrlo je jednostavno procijeniti koncentraciju liganda pri kojoj će se protein zasititi. Naime, protein unutar koncentracijskog raspona od  $0,1 K_D$  do  $10 K_D$  prolazi kroz stanje s vrlo malo vezanog liganda do stanja približno zasićenog proteina. Ako je primjerice koncentracija slobodnog liganda dana kao  $10K_D$ , tada vrijednost frakcijske zasićenosti iznosi:

$$f = \frac{[L]}{K_D + [L]} = \frac{10 \times K_D}{10 \times K_D + K_D} = \frac{10}{11} = 0,91 \quad (1.23)$$

Iz navedenog računa se vidi da je protein 91% zasićen kada je koncentracija liganda  $10K_D$ . Isto tako, kada je koncentracija liganda  $0,1K_D$ , frakcijska zasićenost iznosi:

$$f = \frac{[L]}{K_D + [L]} = \frac{0,1 \times K_D}{0,1 \times K_D + K_D} = \frac{0,1}{1,1} = 0,09 \quad (1.24)$$

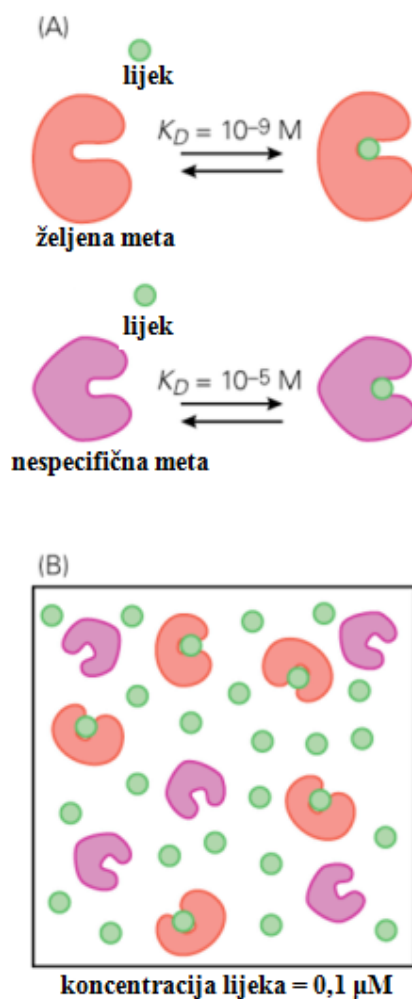
Pri toj nižoj koncentraciji, samo je 9% proteina vezano za ligand. Dakle, vrijednost  $K_D$  definira raspon koncentracija liganda unutar kojeg se protein mijenja iz nevezane do gotovo potpuno vezane forme. Grafičkim prikazom frakcijske zasićenosti kao funkcije  $\log \left\{ \frac{[L]}{K_D} \right\}$ , odnosno izražavanjem koncentracije liganda pomoću konstante disocijacije, dobiva se univerzalna krivulja vezanja koja se može primijeniti na bilo koju ravnotežu vezanja (slika 9).<sup>6</sup>



Slika 9. Univerzalna izoterma vezanja.

(Preuzeto i prilagođeno prema literaturnom izvoru broj 6.)

Želimo li da se lijek čvrsto veže za željeni protein, a neznatno za neželjeni protein kako bi se izbjegle nepoželjne nuspojave, lijek treba unijeti u određenoj koncentraciji. Upravo se korištenjem univerzalne krivulje vezanja sa slike 9 određuje raspon koncentracija u kojem je vezanje lijeka za ciljani protein maksimalno, a za neželjeni protein minimalno. Dakle, cilj je maksimalno ojačati interakcije lijeka s ciljanim proteinom ( $K_D$  mora biti što manja) kako bi se izbjegle nuspojave prilikom djelovanja lijeka.<sup>6</sup>



Slika 10. Afinitet i specifičnost vezanja lijeka. (A) Čvrsto vezanje lijeka za željeni protein i slabo vezanje za neželjeni protein. (B) Lijek dostavljen na koncentraciji nižoj od  $K_D$  neželjenog proteina. Vrlo slabo vezanje lijeka za neželjeni protein. (Preuzeto i prilagođeno prema literaturnom izvoru broj 6.)

Iz slika 9 i 10 vidljivo je da ukoliko koncentracija unesenog lijeka iznosi 0,1  $\mu\text{M}$ , vrijednost  $\frac{[L]}{K_D}$  za protein A iznosi 100 ( $f \approx 1$ ) te protein A ( $K_D = 1 \text{ nM}$ ) biva u potpunosti zasićen čime se ostvaruje ciljane biološka aktivnost. S druge strane, pri toj koncentraciji lijeka, vrijednost  $\frac{[L]}{K_D}$  za protein B iznosi 0,01 ( $f \approx 0$ ), što znači da je vezanje za protein B zanemarivo (uz pretpostavku da oba proteina imaju istu koncentraciju u otopini) te da su izbjegnute neželjene nuspojave. Iz navedenog primjera je jasno zbog čega je za lijekove važan nanomolarni ili veći afinitet te da

postoji poveznica između afiniteta i specifičnosti (supstanca visokog afiniteta za receptor, u većini slučajeva, ima i visoku specifičnost).<sup>6</sup>

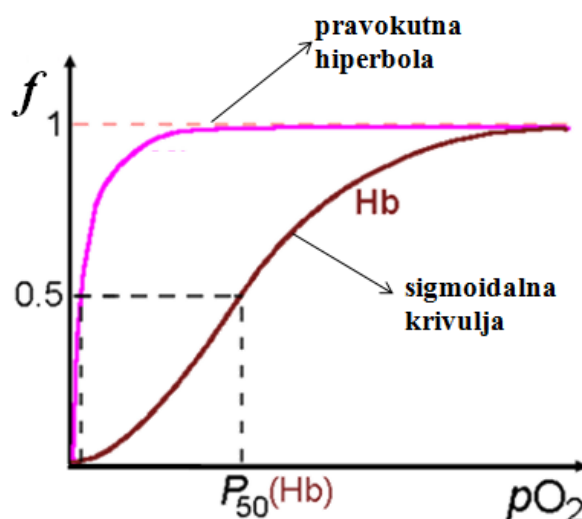
### 2.3.2. *Entalpijsko – entropijska kompenzacija, kooperativnost vezanja i proteinska fleksibilnost*

Kada je riječ o termodinamici vezanja liganda treba napomenuti da su entalpijski i entropijski doprinosi usko povezani. Porast entalpije urokovano jačim vezanjem proteina i liganda, može direktno utjecati na entropiju zbog restrikcije mobilnosti interagirajućih molekula. Drugim riječima, što je interakcija čvršća i usmjerenija, to je manje entropijski favorizirana. Ta vrlo česta pojava, čije porijeklo još uvijek nije posve jasno, naziva se entalpijsko – entropijska kompenzacija. Iako često uočavana, entalpijsko – entropijska kompenzacija ne predstavlja termodinamički zahtjev, jer da predstavlja, to bi značilo da su promjene  $\Delta H$  uvijek kompenzirane suprotnim promjenama  $-T\Delta S$  te da je optimizacija afiniteta vezanja rijetko kad moguća, što očito nije slučaj. Također, takve velike i međusobno kompenzirajuće promjene entalpije i entropije često su prikrivene malim promjenama Gibbsove energije. Odnosno, unatoč pojavi velikih varijacija entalpijskog i entropijskog člana, njihov zbroj (reakcijska Gibbsova energija) je gotovo uvijek konstantan.<sup>9,10</sup>

Govoreći o entalpijsko – entropijskoj kompenzaciji važno je spomenuti da ligand – protein interakcije mogu biti kooperativne. To znači da se energija vezanja asocirana s njima razlikuje od sume pojedinačnih doprinosa slobodnim energijama vezanja. Kooperativnost omogućuje prijenos informacija, jačanje ili ublažavanje odgovora na lokalnu promjenu koncentracije te regulaciju cijelog signalizacijskog / reakcijskog puta. Postoji pozitivna i negativna kooperativnost, ovisno o tome da li vezanje prvog liganda povećava ili smanjuje afinitet vezanja preostalih liganada za receptor. Za razliku od toga, nekooperativno (aditivno) vezanje liganda na receptor ne utječe na afinitet preostalih liganada te su vezna mjesta međusobno neovisna. Kooperativnost je često povezana s izraženim konformacijskim promjenama u strukturi proteina. U nekim slučajevima može biti uzrokovana strukturnim stezanjem kroz prisutnost dodatnih interakcija, odnosno međuatomske udaljenosti se smanjuju i interakcija postaje entalpijski povoljnija. Takva pojava uočena je kod mnogih protein – ligand kompleksa, a biotin – streptavidin je jedan od najviše proučavanih. S druge strane, kooperativnost se može pojaviti i uz odsustvo konformacijskih promjena proteina te biti uzrokovana isključivo promjenom

dinamike proteina. Stoga je prikladnije kooperativnost razmatrati u termodinamičkom kontekstu, a ne samo u okviru konformacijskih promjena, budući da je u suštini termodinamičke prirode. Spomenuti primjeri ukazuju na važnost dinamike proteina prilikom vezanja molekula. Proteini upravo povećanjem dinamičnosti u regijama udaljenim od veznog mjesta za ligand nastoje kompenzirati nepovoljne entropijske doprinose. Fleksibilna vezna mjesta zahtijevaju fleksibilne ligande više nego one rigidne. Tradicionalni fokus na entalpijsku komponentu (direktne i specifične interakcije) i model induciranog pristajanja doveli su do zanemarivanja proteinske fleksibilnosti i kooperativnosti, kao i utjecaja solvatacije koji isto tako snažno utječu na termodinamički profil molekulskog prepoznavanja. Iako snažnije interakcije znače i povoljnije vezanje, pogrešno je vezanje proteina i liganda promatrati isključivo s entalpijskog stajališta.<sup>9,10</sup>

Jedan od najpoznatijih primjera pozitivne kooperativnosti je vezanje molekula kisika na hemoglobin. Naime, hemoglobin se sastoji od četiri nekovalentno asocirane podjedinice od kojih svaka sadrži prostetičku skupinu hem koja veže molekularni kisik. Dakle, hemoglobin veže ukupno četiri molekule kisika pri čemu do vezanja tih molekula ne dolazi na jednak način. Vezanje jedne molekule kisika povećava afinitet preostalih veznih mjesta za kisik. Proteini poput hemoglobina, koji pokazuju kooperativnost (bilo pozitivnu ili negativnu) pri vezanju malih molekula (liganada), nazivaju se alosteričkim proteinima. Ligand koji utječe na vezanje drugog liganda, na različito mjesto na proteinu, naziva se alosteričkim modulatorom, a može biti inhibitor ili aktivator. Ukoliko su modulator i ligand jednake molekule, radi se o homotropnom efektu, a u suprotnom o heterotropnom efektu. Alosterička svojstva hemoglobina proizlaze iz njegove strukture. Vezanjem kisika na jednu njegovu podjedinicu mijenja se njezina konformacija, a kako su sve četiri podjedinice u međusobnom kontaktu, promjena konformacije jedne od podjedinica dovodi do promjene konformacije ostalih podjedinica. Budući da je kisik i ligand i modulator, naziva se homotropnim modulatorom, dok su primjerice CO<sub>2</sub>, H<sup>+</sup>, bisfosfoglicerat i Cl<sup>-</sup> primjeri negativnih, heterotropnih modulatora hemoglobina. Da je riječ o kooperativnom vezanju kisika na hemoglobin može se vidjeti i iz oblika krivulje ovisnosti frakcijskog zasićenja o koncentraciji liganda u otopini (slika 11). Ta krivulja vezanja odstupa od već spomenutog oblika hiperbole karakterističnog za nekooperativno vezanje i poprima sigmoidalni oblik što je karakteristika pozitivno kooperativnog vezanja.<sup>8,11</sup>



Slika 11. Usporedba nekooperativnog vezanja (pravokutna hiperbola) i pozitivno kooperativnog vezanja (sigmoidalna krivulja) na grafičkom prikazu ovisnosti frakcijske zasićenosti o parcijalnom tlaku kisika (liganda) koji se veže na hemoglobin.<sup>8</sup>

### 2.3.3. Scatchardova analiza

Kod već spomenutih analiza veznih izoterma glavna pretpostavka je bila da su koncentracije liganda i proteina poznate. No, što u slučajevima kada točna koncentracija receptora nije poznata? Koncentracija receptora je ključna za izračun frakcijske zasićenosti te u konačnici određivanje konstante disocijacije. Mnogo je slučajeva u biologiji kada je vrlo jasno kako odrediti koncentraciju vezanog i nevezanog liganda, ali koncentracija proteina nije direktno mjerljiva. Primjer je vezanje liganda na stanične proteine bez frakcioniranja ili pročišćavanja. Kada je pretpostavka postojanja jednog veznog mjesta smisljena, metoda koja omogućuje određivanje konstante disocijacije ( $K_D$ ), kao i ukupne koncentracije proteina, naziva se Scatchardova analiza. Ta analiza uključuje preslagivanje osnovne jednadžbe vezanja u tzv. Scatchardovu jednadžbu koja pokazuje povezanost koncentracije vezanog liganda i ukupne koncentracije proteina.<sup>6</sup> Ako se pogleda definicija konstante disocijacije (jednadžba (1.14)), može se zaključiti kako je ravnotežna koncentracija kompleksa [PL] jednaka ravnotežnoj koncentraciji vezanog liganda  $[L]_{\text{vezano}}$ , pod pretpostavkom da se ligand ne veže ni na što drugo. Stoga se ravnotežna koncentracija slobodnog proteina može izraziti kao:

$$[P] = [P]_{\text{ukupno}} - [PL] = [P]_{\text{ukupno}} - [L]_{\text{vezano}} \quad (1.25)$$

Iz toga slijedi:

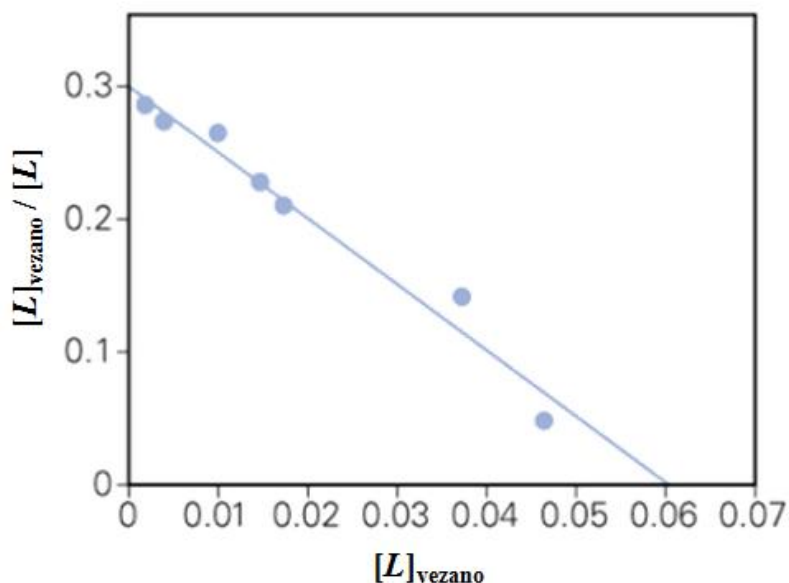
$$K_D = \frac{[P] \times [L]}{[PL]} = \frac{([P]_{ukupno} - [L]_{vezano}) \times [L]}{[L]_{vezano}} \quad (1.26)$$

Preuređenjem jednačbe (1.26) dobije se:

$$\frac{[L]_{vezano}}{[L]} = -\frac{1}{K_D} [L]_{vezano} + \frac{[P]_{ukupno}}{K_D} \quad (1.27)$$

Jednačba (1.27) poznata je kao Scatchardova jednačba. Ona govori da je za jednostavnu ravnotežu vezanja, omjer ravnotežne koncentracije vezanog i slobodnog liganda linearno povezan s ravnotežnom koncentracijom vezanog liganda. Primjer Scatchardovog prikaza dan je na slici 12 gdje je nagib pravca jednak  $-\frac{1}{K_D}$ , a odsječak na ordinati  $\frac{[P]_{ukupno}}{K_D}$ . Dakle, poznavanje koncentracije proteina nije potrebno za određivanje vrijednosti konstante disocijacije.<sup>6</sup>





Slika 12. Primjer Scatchardovog grafičkog prikaza prema jednadžbi (1.27).

(Preuzeto i prilagođeno prema literaturnom izvoru broj 6.)

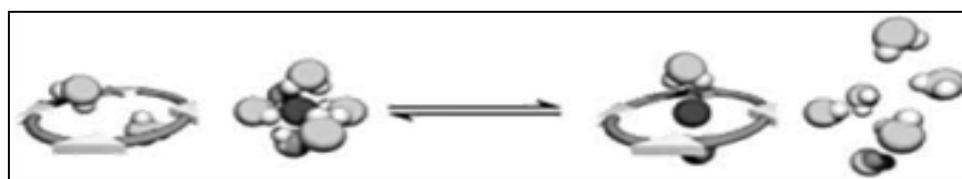
Osim takvog grafičkog prikaza gdje se prikazuje ovisnost omjera koncentracija vezanog i nevezanog liganda prema koncentraciji vezanog liganda, postoji i inačica Scatchardove jednadžbe koja se izvodi pomoću frakcije zauzetih mjesta ( $v$ ). Naime, frakcija zauzetih mjesta ( $v$ ) je omjer koncentracije vezanog liganda na proteinu i ukupne koncentracije proteina. Pomoću takve inačice Scatchardove jednadžbe može se odrediti broj veznih mjesta. Postoje različiti modeli koji opisuju vezanje liganda i proteina zato što na proteinu može postojati više veznih mjesta različitog afiniteta, ligand se može vezati i na više proteina ili se dva liganda mogu kompetitivno vezati na isto mjesto na proteinu. Grafički prikaz omjera koncentracija vezanog i nevezanog liganda prema koncentraciji vezanog liganda govori o tome dolazi li do specifičnog vezanja te postoji li nespecifično ili kooperativno vezanje.<sup>12</sup>

## 2.4. Utjecaj vode na specifičnost protein – ligand interakcija

Voda je otapalo u kojem se zbiva većina biokemijskih reakcija te su njezina svojstva bitna za oblikovanje struktura makromolekula i napredovanje kemijskih reakcija. Dva osnovna svojstva vode su njezina polarnost i visoka kohezivnost. Molekula vode je nelinearna zbog čega ima

asimetričnu raspodjelu naboja. Jezgra kisika privlači elektrone s dviju vodikovih jezgara što neposrednu blizinu vodikovih jezgara čini pozitivno nabijenom i upravo zbog toga je molekula vode električki polarna struktura. Polarna priroda vode je odgovorna za visoku dielektričnu konstantu vode ( $D = 80$ ). Molekule vode su međusobno povezane vodikovim vezama te međudjeluju s ostalim molekulama u vodenoj otopini stvarajući vodikove veze te dipol – dipol i ion – dipol interakcije. Te interakcije čine vodu svestranim otapalom koje otapa različite spojeve, posebice one polarne i nabijene, koji mogu sudjelovati u tim interakcijama.<sup>7</sup>

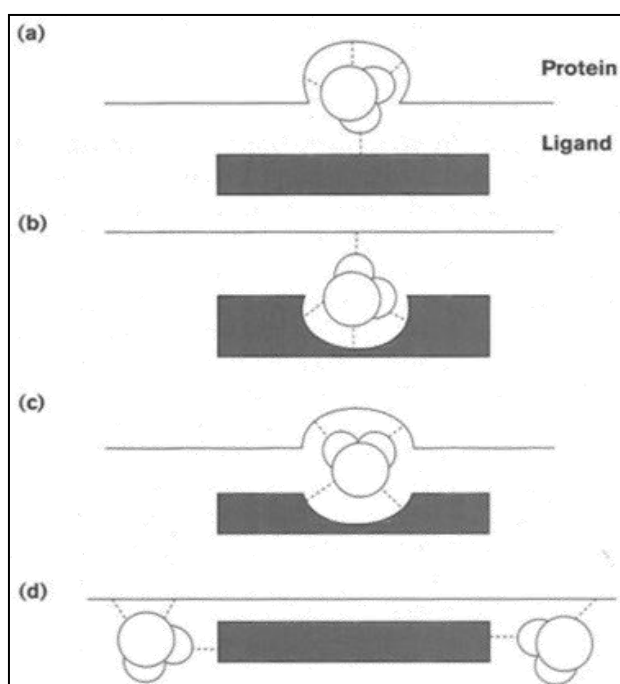
Do sada su razmatrane isključivo protein – ligand interakcije, bez govora o bilo kakvim utjecajima otapala ili drugih prisutnih molekula. Međutim, u realnim sustavima su prisutne i kompetitivne interakcije ostalih potencijalnih liganada, kao i okolnih molekula vode. Budući da molekule vode uvelike nadmašuju broj molekula proteina i liganada, mogu imati izrazit utjecaj na termodinamiku vezanja. Dakle, molekule proteina, kao i ligandi, interagiraju s molekulama vode u vodenoj otopini. Kako bi došlo do vezanja proteina i liganada, većina tih interakcija mora se prekinuti, što povlači entalpijske i entropijske posljedice. Takav proces desolvatacije prikazan je na slici 13 u pojednostavljenom obliku.<sup>3</sup>



Slika 13. Pojednostavljeni prikaz desolvatacije proteina i liganada neposredno prije vezanja. Konačni kompleks je i dalje solvatiziran, no prisutan je veći broj slobodnih molekula vode što povećava entropiju sustava.<sup>3</sup>

Entalpijski gledano, kidanje protein – voda i ligand – voda interakcija zahtijeva određeni utrošak energije. Istiskivanje molekula vode na taj način rezultira većom slobodom molekula vode u otopini, a sukladno tome povećava se entropija sustava i stvaraju se vodikove veze između molekula vode. Procjena gornje granice entropijskog dobitka za prijelaz molekule vode s proteina u čisto otapalo iznosi  $2 \text{ kcal mol}^{-1}$  na sobnoj temperaturi. S obzirom da bi takav dobitak entropije (uzrokovan otpuštanjem jedne molekule vode s proteina u otapalo) trebao biti kompenziran entalpijskim gubitkom, procjena ukupnog doprinosa slobodnoj energiji vrlo je zahtjevna. Štoviše, kako bi se postigao limit od  $2 \text{ kcal mol}^{-1}$ , molekula vode morala bi biti vrlo čvrsto pozicionirana prilikom vezanja na protein. To većinom nije slučaj i nerijetko je

potvrđeno kako čak i iznimno čvrsto vezane molekule vode mogu zadržati određeni stupanj pokretljivosti. Te čvrsto vezane molekule vode, obično su konzervirane kroz više kristalnih struktura protein – ligand kompleksa te imaju veliku ulogu u formiranju aktivnosti proteina, posebice određenih enzima. Mogu se smatrati dijelom proteinske strukture, a nazivaju se „strukturnim vodama“. „Strukturne vode“, osim direktnim interakcijama (poput mreže vodikovih veza), na svoju okolinu utječu i djelovanjem na dinamiku iste. Zabilježeni su mnogi slučajevi u kojima vezanje strukturne vode utječe na proteinsku fleksibilnost. Takav utjecaj je teško točno predvidjeti jer ovisi o detaljima veznog mjesta pa tako neki proteini postanu fleksibilniji uslijed vezanja molekula vode, dok drugi postanu rigidniji. Voda se u vezno mjesto proteina može ugraditi na različite načine, a to je prikazano na slici 14. Svi slučajevi su međusobno strukturno različiti i svaki od njih zahtijeva zaseban pristup u dizajnu lijekova.<sup>3,9,13</sup>



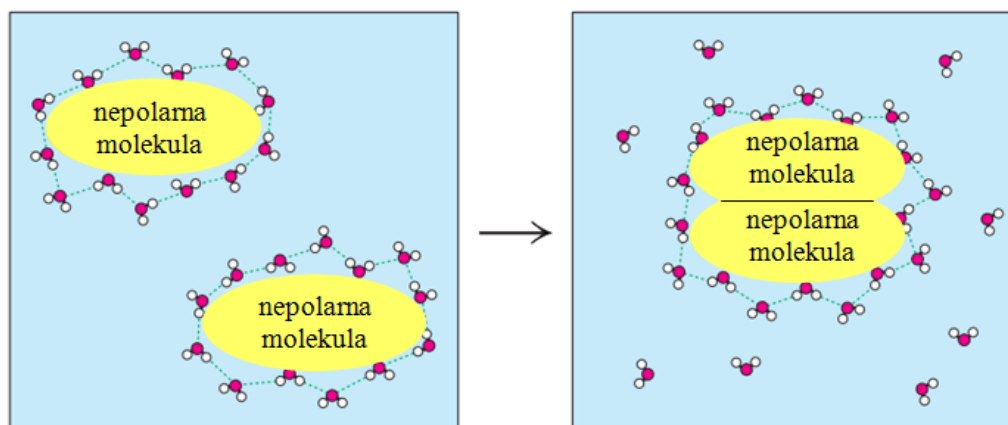
Slika 14. Shematski prikaz načina ugradnje vode u vezno mjesto proteina. Molekule vode i pripadne vodikove veze (isprekidane linije) proizvoljno su postavljene. Voda se može vezati na nekoliko različitih načina: može biti većinski vezana na protein (a), većinski vezana na ligand (b), podjednako vezana na protein i ligand u veznom mjestu (c) ili podjednako vezana na protein i ligand, ali na periferiji veznog mjesta (d).<sup>13</sup>

Uvjeti ostvareni pri procesu vezanja molekula ključni su za sami proces. Zanemarivanje utjecaja molekula vode zasigurno dovodi do značajnih pogrešaka u predviđanju slobodne

energije vezanja. Proučavanje hidratacijskog stanja nevezanog proteinskog veznog džepa trebalo bi biti neizostavna procedura u procesu dizajniranja lijekova. Jedan od razloga je taj što su troškovi solvatacije često uzrok zakazivanja nekih liganada tijekom eksperimentalnih provjera inhibicije, usprkos dobrom prijanjanju u vezno mjesto. Također, desolvatacija liganda katkad može kontrolirati slobodnu energiju vezanja. Troškovi solvatacije za izrazito hidrofilne ligande mogu biti vrlo visoki te nepovoljno utjecati na vezanje.

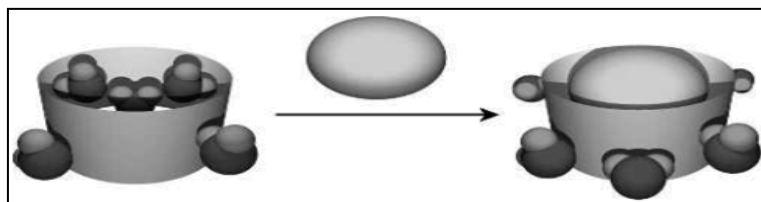
## 2.5. Klasični i neklasični hidrofobni efekt

Koncept klasičnog hidrofobnog efekta, kao direktne posljedice svojstava vode, temelji se na činjenici da hidrofobne molekule narušavaju uređenu strukturu čiste vode (molekule vode povezane mrežom vodikovih veza). Takve nepolarne molekule ne mogu sudjelovati u vodikovim vezama ili polarnim interakcijama pa njihove interakcije s vodom nisu povoljne, za razliku od interakcija među samim molekulama vode. Molekule vode, kada se nađu u kontaktu s nepolarnim molekulama, stvaraju oko njih „kaveze“ te postaju uređenije od molekula vode slobodnih u otopini. Posljedica takve pojave je smanjenje entropije. No, takva nepovoljna pojava može biti minimizirana kad se dvije nepolarne molekule približe pri čemu se smanjuje broj molekula vode uključenih u njihovu solvataciju te se povećava broj molekula vode koje slobodno stvaraju interakcije s molekulama u preostaloj količini vode (slika 15). Uslijed takve agregacije nepolarnih molekula, molekule vode formiraju jedan veći „kavez“ koji okružuje hidrofobni agregat. Površina solvatacijske sfere oko takvog hidrofobnog agregata je manja nego suma površina oko pojedinačnih, neagregiranih, nepolarnih molekula. Kao rezultat, entropija postaje manje nepovoljna, a sukladno tome i slobodna energija postaje povoljnija. Dakle, tendencija združivanja nepolarnih molekula u vodi, više nego u manje polarnim otapalima, naziva se hidrofobnim efektom, a interakcije koje uključuju spomenuto združivanje nazivaju se hidrofobnim interakcijama.<sup>7,9</sup>



Slika 15. Klasični (entropijski) hidrofobni efekt. Združivanje nepolarnih skupina u vodi ima za posljedicu otpuštanje molekula vode, koje su prije stvarale interakcije s nepolarnom površinom, u preostalu količinu vode.<sup>7</sup>

Kada bi opisani mehanizam bio jedina pokretačka sila protein – ligand interakcija, tada bi sve interakcije vezanja (uključujući vezanje hidrofobnih liganada) bile entropijski potaknute. No, to nije slučaj. Kao primjer se može iskoristiti provedeno proučavanje termodinamičkog profila vezanja liganada na MUP („major urinary protein“). Glavna karakteristika tog proteina je izrazito hidrofoban vezni džep, zbog čega veže pregršt različitih, hidrofobnih liganada poput dugolančanih alkohola i derivata pirazina. Iznenađujuće saznanje, dobiveno iz ITC podataka, jest da se radi o entalpijski potaknutom vezanju. S tim u kombinaciji došla je i negativna promjena toplinskog kapaciteta, što je karakteristika hidrofobnog efekta. U svrhu razjašnjavanja podrijetla takve neobične karakteristike vezanja, korištene su različite računalne metode poput simulacija molekulske dinamike. Podaci pokazuju da je ključ povoljne entalpije vezanja liganada na MUP solvatacija veznog džepa u nevezanom stanju. Voda u takvim sustavima nije čvrsto vezana u veznom džepu proteina i energija sustava je visoka. Istiskivanjem molekula vode ligandom dolazi do snižavanja energije sustava kao posljedica interakcije istisnutih molekula vode s vodom izvan veznog džepa (slika 16). Dakle, povoljna entalpijska komponenta je većinski određena desolvatacijom liganada uz neznatan doprinos desolvatacije proteina. Takva termodinamika kompleksiranja, temeljena na entalpijskom doprinosu, naziva se neklasičnim hidrofobnim efektom.<sup>3,9</sup>



Slika 16. Neklasični (entalpijski) hidrofobni efekt. Istiskivanje molekula vode ligandom iz hidrofobnog, veznog džepa proteina.<sup>3</sup>

## 2.6. Specifične međumolekulske interakcije

Međumolekulske interakcije, odnosno nekovalentne interakcije, iako znatno slabije od kovalentnih veza, od ključne su važnosti za biokemijske procese i molekulsko prepoznavanje. One određuju odnos strukture i funkcije molekula. Raspon energija kovalentnih veza seže od  $150 \text{ kJ mol}^{-1}$  do  $450 \text{ kJ mol}^{-1}$ , dok je za nekovalentne interakcije taj raspon od  $2 \text{ kJ mol}^{-1}$  (disperzijske interakcije) pa do  $300 \text{ kJ mol}^{-1}$  („ion – ion“ interakcije). Pojam „nekovalentan“ uključuje širok raspon privlačnih i odbojnih interakcija (tablica 1) koje se međusobno razlikuju u geometriji, jakosti i specifičnosti. U nastavku su opisane neke od najčešćih međumolekulskih interakcija, ključnih pri nastanku protein – ligand kompleksa.<sup>3</sup>

Tablica 1. Specifične međumolekulske interakcije s pripadnim energijama<sup>3</sup>

| Vrsta interakcije | Energija interakcije / $\text{kJ mol}^{-1}$                   |
|-------------------|---|
| Ion – ion         | 200 – 300   |
| Ion – dipol       | 50 – 200  |
| Dipol – dipol     | 5 – 50  |
| Van der Waalsova  | < 5 (promjenjivo, ovisno o površini interagirajućih molekula) |
| Hidrofobna        | Ovisno o energiji otapalo – otapalo interakcije               |
| Aromatska         | 0 – 50  |

|                 |         |
|-----------------|---------|
| Kation – $\pi$  | 5 – 80  |
| Vodikova veza   | 4 – 120 |
| Halogenska veza | 5 – 180 |

### 2.6.1. Elektrostatske interakcije

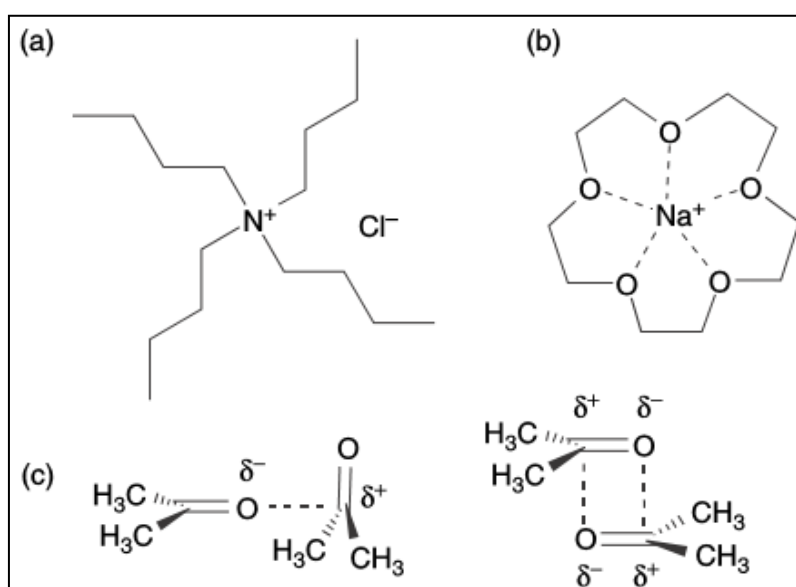
Elektrostatske interakcije objašnjavaju se Coulombovim zakonom koji govori da nabijena skupina jedne molekule može privlačiti suprotno nabijenu skupinu druge molekule. Coulombov zakon glasi:

$$E = k \frac{q_1 q_2}{D r^2}, \quad (1.28)$$

gdje su  $E$  energija,  $q_1$  i  $q_2$  naboji dvaju atoma (u jedinicama za elektronski naboj),  $r$  je udaljenost između dvaju atoma,  $D$  je dielektrična konstanta koja odražava utjecaj medija,  $k$  je konstanta proporcionalnosti ( $k = 1\,389$ , za energije izražene u  $\text{kJ mol}^{-1}$ , odnosno  $k = 332$  za energije u  $\text{kcal mol}^{-1}$ ). Prema dogovoru, privlačne interakcije imaju negativne energije. Elektrostatska interakcija između dvaju iona s jednostrukim suprotnim nabojem udaljenim  $3 \text{ \AA}$  u vodi ( $D = 80$ ) ima energiju od  $-5,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Za iste ione udaljene  $3 \text{ \AA}$  u nepolarnom otapalu poput heksana ( $D = 2$ ), energija interakcije je  $-231 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Iz tog primjera je vidljivo koliku važnost ima dielektrična konstanta medija.<sup>7</sup>

Elektrostatske interakcije imaju važnu ulogu u razumijevanju čimbenika koji utječu na visoke afinitete vezanja, posebice u biološkim sustavima s velikim brojem procesa prepoznavanja koji uključuju interakcije između naboja. Štoviše, te interakcije se vrlo često prve uspostavljaju između proteina i liganda. Mogu se podijeliti u tri kategorije: a) ion – ion interakcije, b) ion – dipol interakcije i c) dipol – dipol interakcije. Najsnažnije od tih interakcija su ion – ion interakcije, čija energija je usporediva s energijom kovalentnih veza. No, za razliku od kovalentnih veza, ion – ion interakcije su neusmjeravajuće, što znači da interakcija može biti bilo koje orijentacije te da se oko jednog iona se može vezati onoliko suprotno nabijenih

iona koliko dozvoljavaju njihove veličine. S druge strane, ion – dipol i dipol – dipol interakcije su usmjeravajuće interakcije koje zahtijevaju određeno pozicionirane vrste kako bi interakcija bila optimalne orijentacije. S obzirom na relativnu rigidnost usmjeravajućih interakcija, jedino međusobno komplementarne vrste mogu tvoriti komplekse, dok neusmjeravajuće interakcije stabiliziraju širok raspon interagirajućih partnera. Nadalje, kada je riječ o vezanju između proteina i liganda, najveći entalpijski doprinos proizlazi od ion – dipol interakcija, koje se javljaju između iona i polarnih molekula, točnije ioniziranog ogranka aminokiseline i molekule liganada ili molekule vode. Iz tablice 1 je vidljivo kako su ion – dipol interakcije jače od dipol – dipol interakcija, a razlog tome je veća gustoća naboja prisutna kod iona.<sup>3</sup>



Slika 17. Primjeri elektrostatskih interakcija: (a) ion – ion interakcija u tetrametilamonijevom kloridu; (b) ion – dipol interakcija natrijevog kationa s [15] – kruna – 5 eterom; (c) dipol – dipol interakcije u acetonu.<sup>3</sup>

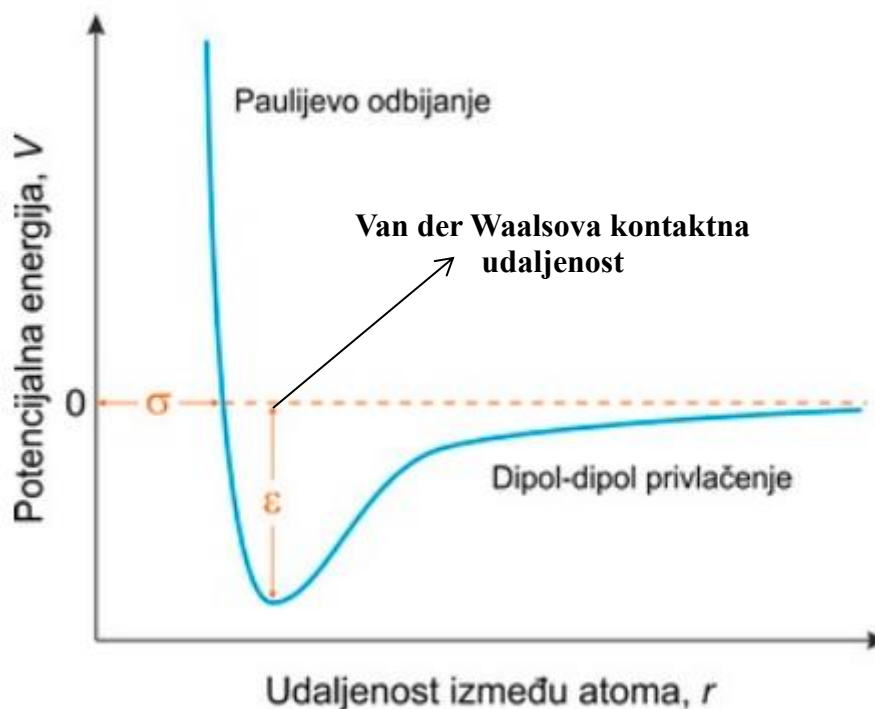


### 2.6.2. Van der Waalsove interakcije

Osnova van der Waalsovih interakcija jest raspodjela elektronskog naboja oko atoma, koja se mijenja u vremenu. Ta raspodjela naboja niti u jednom trenutku nije savršeno simetrična. Prolazna asimetrija elektronskog naboja oko atoma djeluje putem elektrostatske interakcije inducirajući komplementarnu asimetriju u raspodjeli elektrona na susjednim atomima. Atom i njegovi susjedi se tada privlače. Približavanjem atoma, privlačenje se povećava sve do razmaka koji odgovara van der Waalsovoj kontaktnoj udaljenosti (slika 18). Pri udaljenosti kraćoj od van der Waalsove kontaktne udaljenosti počinju prevladavati jake odbojne sile jer dolazi do preklapanja vanjskih elektronskih oblaka dvaju elektrona. Iako su energije van der Waalsovih interakcija vrlo male (tablica 1), kada se površine dviju velikih molekula približe, veliki broj atoma je u van der Waalsovom kontaktu i ukupan utjecaj zbroja mnogih parova atoma je značajan. Van der Waalsove interakcije najčešće se opisuju jednostavnim matematičkim modelom, Lennard – Jonesovim potencijalom:

$$V_{LJ}(r) = 4\varepsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r} \right)^6 \right], \quad (1.29)$$

gdje je  $V_{LJ}$  potencijalna energija između dva atoma ili dvije molekule,  $\varepsilon$  je mjera za jačinu privlačenja između jedinki,  $\sigma$  je udaljenost na kojoj je potencijalna energija između čestica jednaka nuli i  $r$  je udaljenost između čestica (mjerena od središta jedne do središta druge čestice).<sup>7,14</sup>

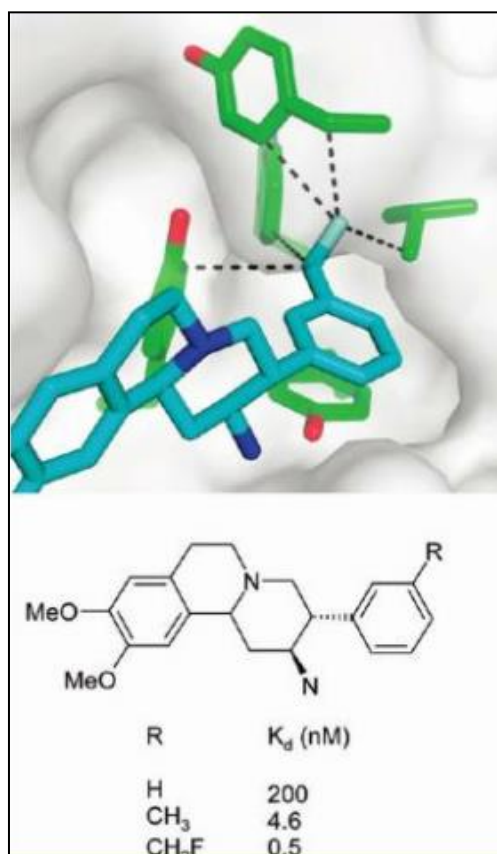


Slika 18. Interakcija dvaju nevezanih, neutralnih atoma (van der Waalsova interakcija) prikazana Lennard – Jonesovim potencijalom. Prvi dio jednadžbe (1.29),  $(\sigma / r)^{12}$  opisuje odbojnu interakciju između atoma, dok drugi dio,  $(\sigma / r)^6$  opisuje privlačenje između atoma. Van der Waalsova energija je najpovoljnija na van der Waalsovoj kontaktnoj udaljenosti, odnosno udaljenosti jednakoj zbroju van der Waalsovih radijusa dvaju susjednih atoma. (Preuzeto i prilagođeno prema <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=Lennard-Jonesov+potencijal>)

### 2.6.3. Hidrofobne interakcije

Hidrofobne interakcije podrazumijevaju interakcije između hidrofobnih ogranaka proteina i nepolarnih skupina liganada. Analizom liganada iz PDB (“Protein Data Bank”) baze podataka zaključeno je da su upravo hidrofobne interakcije daleko najčešće interakcije u protein – ligand kompleksima. Najviše zastupljena hidrofobna interakcija jest ona između alifatskog ugljika receptora i aromatskog ugljika liganada, što je ujedno indicacija da su aromatski prstenovi dominantni u malim molekulama inhibitora. Leucinski, valinski, izoleucinski i alaninski bočni ogranci najčešće ostvaruju hidrofobne interakcije.<sup>10,16</sup>

Hidrofobne interakcije znatno doprinose slobodnoj energiji vezanja, a najbolji strukturni parametar koji korelira s afinitetom vezanja je upravo količina hidrofobne površine zakopane uslijed vezanja liganda. Empirijski je dokazano da se u protein – ligand kompleksima optimalno vezanje postiže kada ligand zauzme 55% volumena unutarnje šupljine proteina.<sup>10</sup> Ta činjenica je potvrđena istraživanjem serije plazmepsin II inhibitora sa širokim rasponom fleksibilnih alkilnih lanaca koji se vežu u lipofilne tunele. Posebno veliki dobitci u slobodnoj energiji vezanja mogu se postići vezanjem nepolarnih atoma liganda u lipofilni proteinski džep. Instrukivan primjer predstavljaju interakcije u S1 veznom džepu serinske proteaze DPP – IV, građene od nekoliko hidrofobnih (Val, Trp, Tyr) bočnih lanaca. Zamjena metafenilnog vodikovog atoma skupinom –CH<sub>2</sub>F rezultira 400 puta jačim vezanjem aminobenzokvinonskih inhibitora (slika 19).<sup>10</sup>



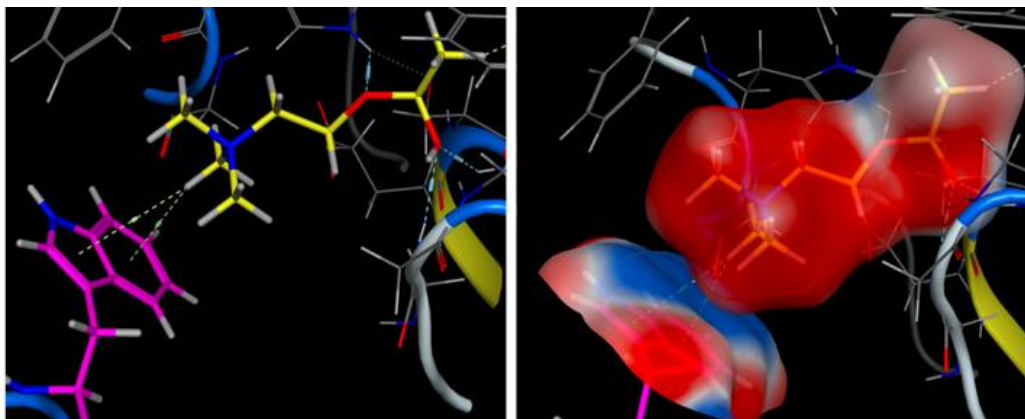
Slika 19. Prikaz ljudskog DPP – IV enzima (dipeptil peptidaza) i aminobenzokvinona kao inhibitora (R = CH<sub>2</sub>F). Prikazana je i usporedba afiniteta vezanja za tri derivata.<sup>10</sup>

Na slici 19 vidljivo je odlično pristajanje supstituenta  $-\text{CH}_2\text{F}$  u asimetrični S1 vezni džep s ostvarenih 5 kratkih, hidrofobnih kontakata s okolnim atomima bočnih lanaca proteaze DPP – IV. Nadalje, deveterostruka razlika u konstantama disocijacije između metilne i fluorometilne skupine posljedica je većeg volumena  $-\text{CH}_2\text{F}$  skupine koja stoga bolje prijanja u vezni džep, kao i jačih interakcija fluora s dijelovima DPP-a. Ovaj primjer ističe važnost ugađanja komplementarnosti hidrofobnih površina radi ostvarivanja povoljnih energijskih doprinosa.<sup>10</sup>

#### 2.6.4. Aromatske interakcije

Aromatski spojevi su nezasićene, cikličke i planarne molekule, stabilizirane  $\pi$  – elektronima koji se nalaze ispod i iznad ravnine aromatskog prstena čineći tako oblak delokaliziranih elektrona koji snižavaju energiju sustava. Dakle takvi aromatski spojevi, poput benzena, imaju vrlo veliku energiju rezonancije. Interakcije koje uključuju aromatske prstenove su sveprisutne u kemijskim i biološkim sustavima i mogu se smatrati posebnom vrstom hidrofobnih interakcija. Postoje dvije osnovne vrste aromatskih interakcija prisutnih pri vezanju proteina i liganada, a to su: a) kation –  $\pi$  interakcije i b)  $\pi$  –  $\pi$  interakcije.<sup>17</sup>

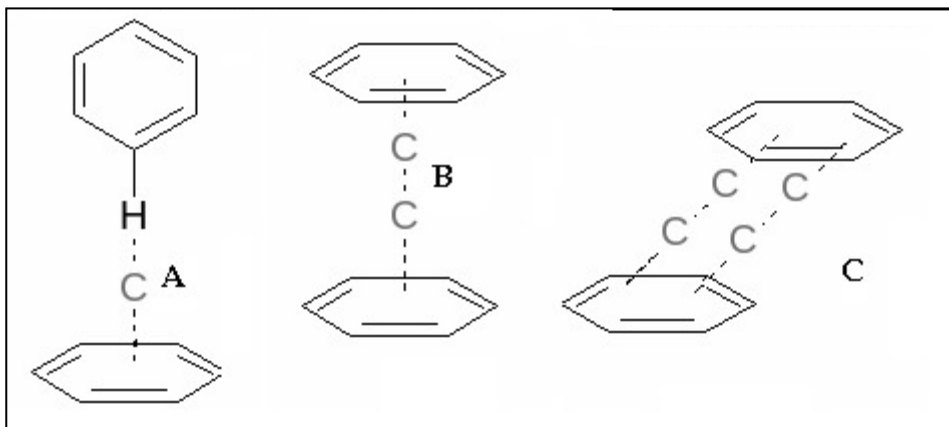
**Kation –  $\pi$  interakcije.** Kationi imaju tendenciju interagirati s parcijalnim negativnim nabojem aromatskih sustava kao što su benzen, triptofan, fenilalanin ili tirozin. Najstabilniji raspored je onaj u kojem se kation nalazi direktno iznad aromatskog sustava tvoreći s njim povoljnu elektrostatsku interakciju. Mali ioni velike gustoće naboja stvaraju jače kation –  $\pi$  interakcije od velikih iona. Elektron – odvlačeće skupine na prstenu čine kation –  $\pi$  interakcije slabijima, dok ih elektron – donirajuće skupine jačaju. Gvanidijska skupina arginina i  $\epsilon$  –  $\text{NH}_3^+$  skupina lizina sudjeluju u kation –  $\pi$  interakcijama s aromatskim ograncima proteina. Najviše zastupljen aromatski sustav jest triptofan, dok je arginin najviše zastupljen kation. Također, metilne skupine mogu interagirati s aromatskim prstenovima kada su vezane na elektronegativni atom. Pozitivno nabijen atom dušika predstavlja elektronegativan supstituent zbog čega je direktna interakcija alkilirane skupine amonijaka s aromatskim prstenom jaka privlačna interakcija na udaljenosti 3,4 – 4,0 Å. Primjerice, očekivalo bi se da će vezanje acetilkolina na acetilkolinesterazu biti stabilizirano interakcijom kvarternog amonijaka s karboksilatom aspartata ili glutamata, no zapravo je stabilizirano interakcijom s triptofanom (slika 20)<sup>18,19</sup>



Slika 20. Prikaz acetilkolina vezanog na acetilkolinesterazu čiji je kvarterni amonijak (žuto i plavo) stabiliziran kation –  $\pi$  interakcijom s triptofanom (ljubičasto). Na drugoj slici jasnije su prikazani elektrostatski naboji pri čemu crvena boja označava pozitivan elektrostatski naboj, a plava negativan.<sup>19</sup>

$\pi - \pi$  interakcije javljaju se između aromatskih prstenova, najčešće između negativno nabijenog  $\pi$  – elektronskog oblaka jednog konjugiranog sustava i pozitivno nabijene  $\sigma$  – okosnice susjedne molekule. Drugim riječima, interakcije se ostvaruju između prstena bogatog elektronima i drugog prstena siromašnog elektronima pri čemu se doprinos ostvaruje prijenosom naboja. Te interakcije mogu se podijeliti u tri skupine (slika 21): a) „licem u lice“ interakcije, b) interakcije T – oblika i c) paralelno posmaknute interakcije. Utvrđeno je kako je većina interakcija T – oblika zato što je u tom slučaju  $\pi - \pi$  odbijanje nadjačano  $\sigma - \pi$  privlačenjem što je energetski vrlo povoljno. Orijentacija „licem u lice“ rjeđe je zastupljena s obzirom da uzrokuje nepovoljno elektrostatsko odbijanje između dvaju planarnih lica aromatskih prstenova. U slučaju paralelno posmaknutih interakcija, prstenovi su paralelni, okrenuti jedan prema drugom na približnoj udaljenosti od oko 3,5 Å te se interakcija ostvaruje između središta jednog prstena i rubnog dijela drugog prstena.<sup>17</sup>

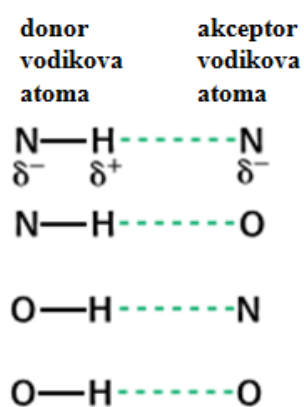
### T - oblik “Licem u lice” Paralelno posmaknuta



Slika 21. Prikaz vrsta  $\pi - \pi$  interakcija na primjeru benzenskih prstenova.<sup>17</sup>

#### 2.6.5. Vodikove veze

U vodikovim vezama je vodikov atom podijeljen između dvaju elektronegativnih atoma. Donor vodika za vodikovu vezu je skupina koja ima kovalentno vezan atom vodika, dok je akceptor elektronegativni atom koji se nalazi u blizini (slika 22). Elektronegativni atom za koji je vodikov atom kovalentno vezan jače privlači elektronski oblak vodikova atoma zbog čega se na vodikovu atomu stvara parcijalni pozitivni naboj ( $\delta^+$ ). Zbog toga vodikov atom može stvarati elektrostatsku interakciju s atomom koji ima parcijalni negativni naboj ( $\delta^-$ ).<sup>7</sup> Međutim, osim elektrostatske interakcije, vodikova veza ima i parcijalno kovalentni karakter.



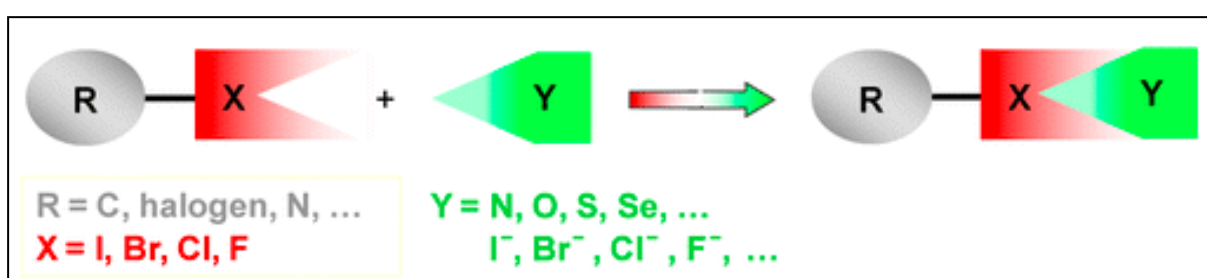
Slika 22. Vodikove veze prikazane crtkanim zelenim linijama uz naznačene parcijalne naboje atoma. (Preuzeto i prilagođeno prema literaturnom izvoru broj 7.)

Vodikove veze se mogu interpretirati kao elektrostatske dipol – dipol interakcije, ali imaju i neka svojstva kovalentnih veza: specifične su i usmjeravajuće, tvore međuatomske udaljenosti kraće od sume van der Waalsovih radijusa i obično uključuju ograničen broj interagirajućih partnera što se može interpretirati kao tip valencije. S druge strane, vodikove veze su mnogo slabije i dulje od kovalentnih veza. Njihova duljina veze (mjerena od vodikova atoma) iznosi 1,5 – 2,6 Å, što znači da duljina 2,4 – 3,5 Å odvaja dva nevodikova atoma u vodikovoj vezi. Najjače vodikove veze teže tome da budu približno pravocrtne, tako da donor vodika, vodik i akceptor vodika leže u ravnoj liniji. Upravo zbog relativne slabosti vodikovih veza, mogu se formirati i pucati vrlo brzo tijekom vezanja, konformacijskih promjena ili smatanja proteina. Time je omogućeno stvaranje i kidanje vodikovih veza energijama koje su u rasponu toplinskih promjena i to zapravo predstavlja jedan od glavnih faktora koji pojednostavljaju vezanje makromolekula i biološku aktivnost. Specifičnost vodikovih veza određena je njihovom orijentacijom, duljinom i kutem zbog čega su vodikove veze ključne u molekulskom prepoznavanju. Slobodna energija stvaranja vodikove veze najčešće varira između  $-6,3 \text{ kJ mol}^{-1}$  i  $-19,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ .<sup>20</sup> No, doprinos vodikovih veza energiji vezanja može biti vrlo mali, pa čak i nepovoljan, ako formirana interakcija ne nadoknađuje desolvacijski gubitak uslijed vezanja liganda. Također, doprinos vodikove veze ovisi o okolnim uvjetima: otapalu izložena vodikova veza značajno manje doprinosi interakcijskoj energiji nego ista vodikova veza ukopana u hidrofobni vezni džep. U dizajnu lijekova, vodikove veze se koriste za postizanje specifičnosti zahvaljujući njihovoj striktnoj duljini i geometrijskim ograničenjima.<sup>7,9,20</sup>

Kada je riječ o slabim vodikovim vezama, kao najznačajniji donor javlja se CH skupina. Te interakcije, unatoč njihovoj slabosti, imaju važnu ulogu u stabilizaciji određenih konformacija protein – ligand kompleksa kao što su kompleksi proteinskih kinaza i njihovih inhibitora.

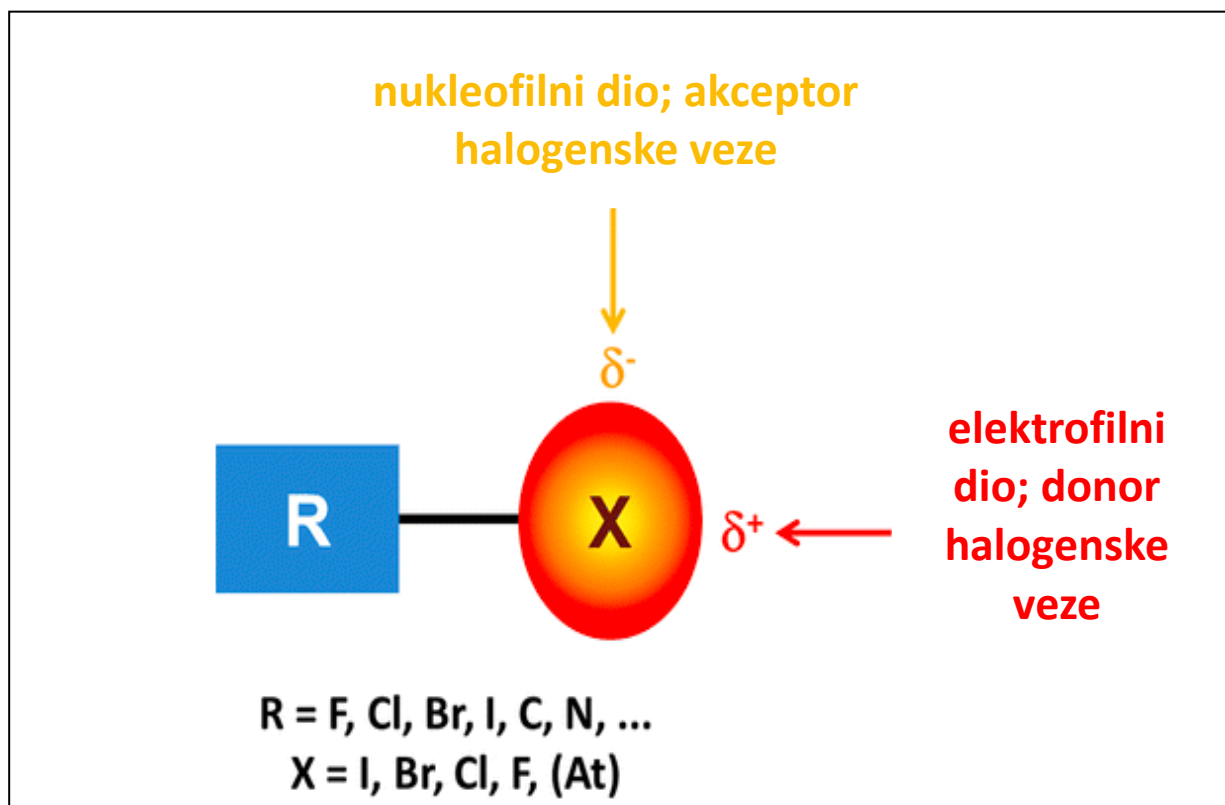
## 2.6.6. Halogenske veze i ortogonalne multipolarne interakcije

**Halogenske veze** su međumolekulske interakcije između Lewisove baze i parcijalno pozitivnog nabijenog dijela atoma halogena vezanog za elektron – odvlačeću skupinu (slika 23). Jakost halogenske veze jako ovisi o kemijskom okruženju unutar molekule za koju je atom halogena vezan. Iako su halogenske veze pretežito slabe interakcije, u nekim slučajevima mogu kompetirati s vodikovim vezama te imaju vrlo važnu ulogu u kompleksima proteina i malih molekula inhibitora koje često sadrže atome halogena u svojoj strukturi.<sup>9</sup>

Slika 23. Shematski prikaz halogenske veze.<sup>21</sup>

Halogeni koji sudjeluju u halogenskim vezama su fluor (vrlo rijetko), klor, brom i jod, pri čemu tendencija stvaranja halogenske veze raste u nizu  $F \ll Cl < Br < I$ . Halogenska veza je usmjerena u prostoru, a zbog anizotropne raspodjele elektronske gustoće je usmjerenija od vodikove veze. Rezultat anizotropne raspodjele elektronske gustoće je parcijalni negativni naboj na središnjem dijelu veze te područje pozitivnog elektrostatskog potencijala u produžetku kovalentno vezanog halogena koje se naziva  $\sigma$  – šupljina (slika 24). Dakle,  $\sigma$  – šupljina predstavlja područje niže elektronske gustoće.





Slika 24. Prikaz anizotropne raspodjele elektronske gustoće oko kovalentno vezanog atoma halogena. (Preuzeto i prilagođeno prema literaturnom izvoru broj 21.)

Halogenske veze imaju jak utjecaj na afinitet vezanja. U medicinskoj kemiji često se provodi zamjena vodikova atoma halogenom u cilju povećanja afiniteta.

Atomi halogena mogu interagirati s kisikovim i ugljikovim atomima karbonilnih skupina. Prvi slučaj se pripisuje stvaranju halogenske veze, a drugi je obilježje **ortogonalnih multipolarnih interakcija**. Te interakcije nastaju između dviju dipolarnih funkcionalnih skupina koje su na maloj udaljenosti jedna od druge. Bitne su za stabilizaciju ligand – protein kompleksa te naročito u kontekstu halogenskih veza. Treba napomenuti kako je u ortogonalnoj orijentaciji dvaju dipola dipolni doprinos interakcijskoj energiji jednak nuli pa elektrostatski i dispeznj članovi višeg reda moraju biti odgovorni za privlačnost interakcije. Nestanak dipolnog člana može odbojnu elektrostatsku interakciju pretvoriti u privlačnu. U kontekstu halogenskih veza važno je istaknuti kako je sklonost fluora da tvori dipolarne interakcije ( $C-F \cdots C=O$ ) izraženija je nego kod ostalih halogena zbog njegove visoke elektronske gustoće i niske polarizabilnosti.<sup>9,21</sup>

## 2.7. Određivanje termodinamičkih parametara

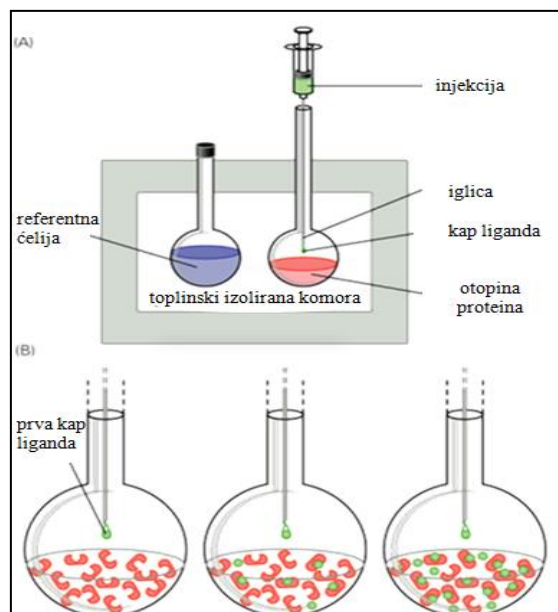
### 2.7.1. Izotermalna titracijska kalorimetrija

Izotermalna titracijska kalorimetrija je izrazito korisna metoda za analizu termodinamike interakcija vezanja zato što omogućuje određivanje entropijske i entalpijske komponente slobodne energije vezanja ( $\Delta H^\circ$  i  $\Delta S^\circ$ ). Budući da i promjena entalpije i promjena entropije predstavljaju svojevrsnu ravnotežu između interakcija ostvarenih s vodom i interakcija ostvarenih s proteinom, poznavanje entalpijske i entropijske komponente prilikom vezanja nužno je za potpuno razumijevanje afiniteta između male molekule i proteina. Za razliku od ostalih metoda koje se pri proučavanju vezanja koncentriraju na promjene svojstava proteina / liganda, izotermalna titracijska kalorimetrija (ITC) temelji se na direktnom mjerenju topline oslobođene tijekom vezanja. Sam naziv metode govori o načinu na koji se provodi – na konstantnoj temperaturi (*izotermalna*), ligand se dodaje (*titracijska*) u otopinu proteina, ili obrnuto, pri čemu se mjeri oslobođena toplina (*kalorimetrija*).<sup>6</sup>

ITC pruža direktnu vrijednost promjene entalpije reakcije vezanja. Vrijednost konstante disocijacije ( $K_D$ ) određuje se indirektno, analizom načina na koji se količina oslobođene topline tijekom titracije mijenja s koncentracijom liganda. To daje i promjenu standardne slobodne energije vezanja,  $\Delta G^\circ$ . Promjena standardne entropije vezanja tada se može dobiti iz jednadžbe:

$$\Delta S^\circ = - \frac{\Delta G^\circ - \Delta H^\circ}{T} \quad (1.30)$$

Instrument koji se koristi za provođenje ove metode je izotermalni titracijski kalorimetar koji se sastoji od toplinski izolirane komore unutar koje su dvije ćelije s otopinama (slika 25).<sup>6</sup>



Slika 25. Shematski prikaz kalorimetra za izotermalnu titracijsku kalorimetriju. (Preuzeto i prilagođeno prema literaturnom izvoru broj 6.)

Jedna ćelija reakcijskog kalorimetra je referentna ćelija koja sadrži sve osim liganda, a druga je reakcijska ćelija u kojoj se događa reakcija vezanja i na koju je postavljena injekcija koja dokapava otopinu liganda u proteinsku otopinu. Tijekom eksperimenta ćelije se nalaze na istoj, konstantnoj temperaturi. Količina oslobođene topline uslijed dodatka otopine liganda mjeri se uklanjanjem ili dodavanjem poznate količine topline u referentnu ćeliju tako da se temperatura održi stalnom. Za svaku količinu liganda dodanu otopini proteina, reakcijska ćelija ili otpušta ili uzima toplinu, ovisno o tome je li reakcija egzotermna ili endotermna. Količina topline se svakim dodatkom liganda smanjuje dok ne dosegne nulu kada je protein zasićen ligandom. Integriranjem površine ispod krivulje prijenosa topline u vremenu za svaku injekciju može se dobiti količina topline prenesena svakim dodatkom liganda. U bilo kojem trenutku titracije, ukupna količina do tada otpuštene topline,  $q$ , izravno je povezana s frakcijom proteina vezanom na ligand,  $f$ , prema jednadžbi:

$$q = (f \times [P]_{\text{uk.}} \times V_0) \times \Delta H^\circ, \quad (1.31)$$

gdje  $\Delta H^\circ$  označava standardnu entalpiju vezanja jednaku oslobođenoj toplini kada je jedan mol proteina vezan na jedan mol liganda. Nadalje,  $q$  je toplina oslobođena do tog trenutka titracije, a  $V_0$  je volumen ćelije.

### § 3. LITERATURNI IZVORI

1. <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/molecular-recognition> (datum pristupa 02.08.2020.)
2. <https://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=32244> (datum pristupa 02.08.2020.)
3. J. W. Steed, D. R. Turner, K. J. Wallace, *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*, J. Wiley, England, 2007, str. 3–25.
4. <https://people.chem.ucsb.edu/kahn/kalju/recognition.html> (datum pristupa 02.08.2020.)
5. R. Perozzo, G. Folkers, L. Scapozza, Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. *J Recept Signal Transduct Res.* 2004; 24 (1-2):1-52. doi:10.1081/rrs-120037896 (datum pristupa 02.08.2020.)
6. J. Kuriyan, B. Konforti, D. Wemmer, *The Molecules of Life: Physical and Chemical Principles*, Vol. 12, Garland Science, Taylor & Francis, New York, 2013, str. 531–580.
7. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 7-65.
8. Praktikum iz biokemije (skripta za internu upotrebu), Zagreb, 2020.
9. A. K. Bronowska, *Thermodynamics od Ligand – Protein Interactions: Implications for Molecular Design*, Germany, 2011, <https://www.intechopen.com/books/thermodynamics-interaction-studies-solids-liquids-and-gases/thermodynamics-of-ligand-protein-interactions-implications-for-molecular-design> (datum pristupa 04.08.2020.)
10. C. Bissantz, B. Kuhn and M. Stahl, *J. Med. Chem.* **53** (2010) 5061–5084.
11. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2012, str. 157–168.
12. <http://what-when-how.com/molecular-biology/scatchard-plot-molecular-biology/> (datum pristupa 07.08.2020.)
13. J. E. Ladbury, *The effect of water on the specificity of protein – ligand binding sites and its potential application to drug design*, Vol. 3, London, 1996, str. 973–980, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074552196901647> (datum pristupa 08.08.2020.)
14. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Physical Property](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Physical_Property)

- [ies of Matter/Atomic and Molecular Properties/Intermolecular Forces/Specific Interactions/Lennard-Jones Potential](#) (datum pristupa 12.08.2020.)
15. <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=Lennard-Jonesov+potencijal> (datum pristupa 12.08.2020.)
  16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5708362/> (datum pristupa 13.08.2020.)
  17. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3530875/> (datum pristupa 15.08.2020.)
  18. [https://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/structure/molecular\\_interactions/mol\\_int.html](https://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/structure/molecular_interactions/mol_int.html) (datum pristupa 15.08.2020.)
  19. [https://www.cambridgemedchemconsulting.com/resources/molecular\\_interactions.html](https://www.cambridgemedchemconsulting.com/resources/molecular_interactions.html) (datum pristupa 15.08.2020.)
  20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5708362/> (datum pristupa 18.08.2020.)
  21. *Chem. Rev.* 2016, 116, 4, 2478–2601,  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrev.5b00484> (datum pristupa 18.08.2020.)