

# Mehanizmi interakcija ljudskog albumina i kaprilne kiseline in silico

---

**Srezović Bijelić, Bruno**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*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:217:387658>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-26**



*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Bruno Srezović Bijelić  
Mehanizmi interakcija ljudskog albumina i  
kaprilne kiseline *in silico*  
Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za fizikalnu kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Branimira Bertoše. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, radi stjecanje zvanja magistra molekularne biologije.

## **Zahvale**

Zahvaljujem svom mentoru, izv. prof. dr. sc. Branimiru Bertoši, na ukazanom povjerenju i prilici da samostalno provedem uistinu zanimljivo istraživanje.

Zahvaljujem Andrei Hloušek-Kasun i Martini Manenici na svim odgovorima na moje mnogobrojne mailove. Bez njihovih savjeta bi puno sporije pokrenuo svoje prve simulacije.

Hvala majci Mili na potpori kroz moje cijelo dosadašnje školovanje. Hvala mojoj djevojci Emimi na strpljenju i potpori koju mi je pružala kroz duge mjesece postavljanja simulacije i pisanja ovog rada.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

## **Mehanizmi interakcija ljudskog albumina i kaprilne kiseline *in silico***

Bruno Srezović Bijelić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Taloženje kaprilnom kiselinom jedna je od metoda za uklanjanje nečistoća iz serumskih otopina. Naime, primijećeno je svojstvo kaprilne kiseline da pri određenim koncentracijama taloži albumin, dok imunoglobulini ostaju u otopini. Dosadašnja istraživanja ukazuju da dolazi do izravne interakcije između albumina i kaprilne kiseline u otopini, no mehanizam interakcije nije razjašnjen. Postojeći eksperimentalni podaci pokazuju da ova interakcija ima izraženu ovisnost o pH vrijednosti otopine. Cilj ovog diplomskog rada jest razjasniti mehanizam interakcije između kaprilne kiseline i ljudskog albumina koristeći računalne simulacije, u prvom redu simulacije molekularne dinamike. Korištenjem dostupnih kristalnih struktura ljudskog albumina izgrađeni su *in silico* modeli albumina i kaprilne kiseline na kojima su provedene simulacije molekularne dinamike. Simulacije su provedene na dvije pH vrijednosti, s protoniranim i deprotoniranim oblikom kaprilne kiseline, kako bi se razjasnili eksperimentalni podaci koji ukazuju na različite interakcije albumina i kaprilne kiseline pri različitim pH vrijednostima. Analizom rezultata simulacija istražene su nekovalentne interakcije u sustavima pri različitim pH vrijednostima otopine i njihov utjecaj na stabilnost albumina u prisutnosti kaprilne kiseline.

(39 stranice, 19 slika, 2 tablice, 32 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: ljudski serumski albumin, kaprilna kiselina, molekularna dinamika, hidrofobne interakcije, vodikove veze

Voditelj: Dr. sc. Branimir Bertoša, izv. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Branimir Bertoša, izv. prof.

Dr. sc. Martina Šeruga Musić, izv. prof.

Dr. sc. Kristian Vlahoviček, red. prof.

Rad prihvaćen:

# BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

## ***In silico* mechanisms of interaction between human serum albumin and caprylic acid**

Bruno Srezović Bijelić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Protein precipitation mediated by caprylic acid is one of the methods used for removing impurities from serum. It was observed that certain concentrations of caprylic acid can cause precipitation of albumin while immunoglobulins remain dissolved. Although previous research points towards direct interactions occurring between albumin and caprylic acid in solution, the interaction mechanism has not been clarified. Existing experimental data indicate that this interaction has a pronounced pH dependence. The goal of this graduate thesis is to elucidate the molecular mechanism of interaction between caprylic acid and human albumin using computational simulations, particularly molecular dynamics simulations. Starting from the crystal structures of human albumin, *in silico* models of albumin and caprylic acid were prepared and subjected to molecular dynamics simulations. Simulations were conducted at two pH, using both protonated and deprotonated forms of caprylic acid. Analysis of simulations provided insight into dominant non-covalent interactions between the species in the systems at different pH values of the solution and their effect on the stability of albumin.

(39 pages, 19 figures, 2 tables, 32 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: Human serum albumin, caprylic acid, molecular dynamics, hydrophobic interactions, hydrogen bonds

Supervisor: Dr. sc. Branimir Bertoša, Associate professor

Reviewers: Dr. sc. Branimir Bertoša, Associate professor

Dr. sc. Martina Šeruga Musić, Associate professor

Dr. sc. Kristian Vlahoviček, Prof.

Thesis accepted:

# Sadržaj

1	Uvod .....	1
1.1	Ljudski serumski albumin .....	1
1.1.1	Promjene konformacije HSA .....	5
1.2	Masne kiseline.....	6
1.2.1	Kaprilna kiselina i taloženje HSA.....	7
1.3	Molekularna dinamika.....	8
1.4	Cilj istraživanja .....	11
2	Materijali i metode.....	12
2.1	Simulacije molekularne dinamike .....	12
2.1.1	Priprema datoteka .....	12
2.1.2	Minimizacija energije, ekvibracija sustava i simulacije molekularne dinamike ..	15
2.2	Analiza trajektorija.....	17
3	Rezultati.....	18
3.1	Utjecaj pH na konformaciju HSA .....	18
3.2	Analiza dinamike kaprilne kiseline .....	24
4	Rasprava .....	32
4.1	Promjena konformacije albumina .....	32
4.2	Ponašanje kaprilne kiseline pri različitim pH vrijednostima .....	33
5	Zaključak .....	35
6	Literatura .....	36

# 1 Uvod

## 1.1 Ljudski serumski albumin

Albumin je najzastupljeniji protein u plazmi svih kralježnjaka te se u ljudskoj krvi nalazi u koncentraciji od 35 do 50 mg/mL (Peters, 1995). Albumini su evolucijski konzervirana skupina proteina te sekvence ljudskog, goveđeg i albumina štakora sadrže 61% identičnih aminokiselinskih sljedova (He i Carter, 1992). Albumin iz ljudskog krvnog seruma (HSA) je jednolančani protein molekulske mase 66,3 kDa. Sastoji se od 585 aminokiselina koje formiraju tri homologne domene (Slika 1; Merlot, Kalinowski i Richardson, 2014).



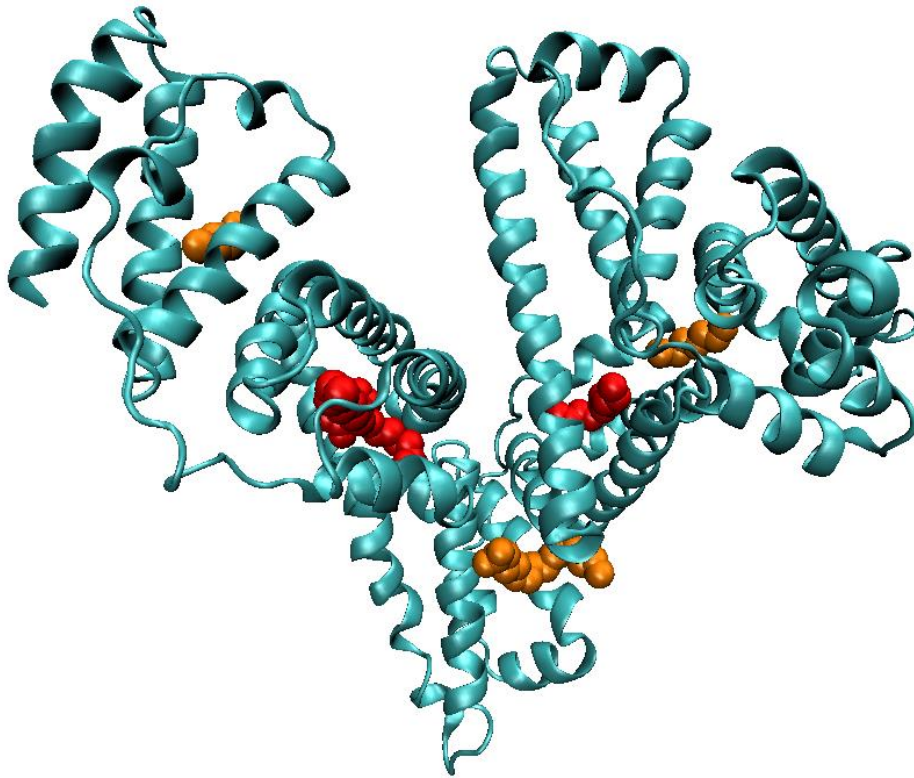
Slika 1. Kristalna struktura HSA iz baze podataka Protein Data Bank (PDB; Berman i sur., 2002) s različito obojenim homolognim domenama.



Osim u krvi HSA je zastupljen i u ekstravaskularnim prostorima u kojima se nalazi oko 60% njegove ukupne količine. Struktura HSA sadrži 17 disulfidnih mostova i jedan slobodni tiol. HSA ne prolazi proces glikozilacije i ne sadrži dodatne kofaktore (He i Carter, 1992). HSA se sintetizira u hepatocitima jetre u obliku preproalbumina dugog 609 aminokiselina. Signalni peptid dug 18 aminokiselina odstranjuje se pri ulasku u endoplazmatski retikulum. Preostala dodatna sekvenca duga 6 aminokiselina se odstranjuje u Golgijevu tijelu prije lučenja zrelog HSA van stanice. Stopa sinteze je kontrolirana primarno koloidnim osmotskim tlakom i osmolalnošću ekstrahepatičnog prostora, ali pokazan je i utjecaj hormona inzulina, tiroksina i kortizola (Nicholson, Wolmarans i Park, 2000). Zbog visoke koncentracije u krvi albumin je odgovoran za većinu plazmatskog koloidnog osmotskog potencijala te stoga sudjeluje u kontroli toka tekućina između tjelesnih odjeljaka. Funkcija HSA je transport raznolikih molekula kroz krv, među kojima su ioni kalcija, kolesterol, tiroidni hormoni, bilirubin i masne kiseline (Evans, 2002).

Tok HSA i vezanih liganada između intravaskularnih i ekstravaskularnih prostora događa se i pasivnim i aktivnim oblicima prijenosa. Pasivni prijenos odvija se u organima sa fenestriranim kapilarama (jetra i slezena) ili sinusoidnim kapilarama (gušterača i crijeva). Aktivni prijenos odvija se transcitozom posredovanom receptorom pri čemu se HSA veže na glikoproteinske receptore na luminalnoj membrani stanica endotela. Vezanje inducira endocitozu i nastanak vezikule koja migrira na abluminalnu membranu stanice te egzocitozom otpušta HSA u ekstravaskularni prostor. Glikoproteinski receptori koji su povezani s transportom HSA su membranski proteini gp60, gp18 i gp30. Od navedenih glikoproteina gp60 je odgovorna za transcitozu, dok se za gp18 i gp30 pretpostavlja da su dio puta za uklanjanje starih i oštećenih molekula HSA (Curry, 2003).

Istraživanja vezanja raznolikih molekula lijekova na HSA dovela su do definiranja dvaju mjesta na površini albumina koja su važna za vezanje raznolikih molekula – Sudlowljevo mjesto 1 i 2 (Slika 2). Mjesta se razlikuju u specifičnosti prema vrsti molekula koje vežu, tako da se na mjesto 1 najčešće vežu heterociklični anioni dok mjesto 2 najčešće veže aromatske spojeve (Kragh-Hansen, 1981).



Slika 2. Struktura HSA u kompleksu sa 7 molekula miristične kiseline (PDB kod 2BXL). Molekule kiseline obojene crveno vezane su na Sudlowljeva mjesta.

Istraživanjem interakcija između albumina i masnih kiselina (Goodman, 1958) pronađena su dva vezna mjesta jakog afiniteta, pet mjesta s afinitetom srednje jakosti i više od 20 mjesta sa slabim afinitetom vezanja masnih kiselina. Konstante vezanja za navedena mjesta mjerene su za oleinsku (18 atoma ugljika) i lauričnu (12 atoma ugljika) kiselinu te je primijećen porast afiniteta pri vezanju kiseline s dužim hidrofobnim lancem. Sedam mjesta za vezanje masnih kiselina s najvišim afinitetom u kasnijim istraživanjima proučavana su zajedno i u daljnjem tekstu označavana su oznakama FA1 do FA7. Oba Sudlowljeva mjesta imaju afinitet za vezanje masnih kiselina. Točnije FA7 se nalazi u Sudlowljevom mjestu 1 dok se FA3 i FA4 nalaze u Sudlowljevom mjestu 2. Za vezna mjesta FA1 do FA5 pokazano je da su masne kiseline vezane na mjesta s pomoću vodikovih veza s njihovom karboksilnom skupinom, dok u mjestima FA6 i FA7 nema polarnih interakcija (Fasano i sur., 2005).

Jedno od mjesta za vezanje masnih kiselina također veže i molekulu hema te je ta funkcija korisna u slučajevima povećane koncentracije hema u krvi. Zanimljivo je da HSA-hem kompleks pokazuje nekoliko emergentnih enzimatskih aktivnosti, primjerice peroksidaznu i katalaznu aktivnost te sposobnost detoksificiranja peroksinitrita. HSA veže i nekoliko lijekova, među kojima su ibuprofen, varfarin i lorazepam. Interakcija HSA s lijekovima je bitna pojava farmakologiji i medicini jer su molekule lijekova u kompeticiji s ostalim ligandima. Postotak molekula nekog lijeka može biti čak do 90%, što znači da naglo povišenje koncentracije nekog od kompetitivnih liganda u krvi (primjerice otpuštanje velike količine molekula hema uslijed oštećenja vaskularnog tkiva) može drastično povećati efektivnu koncentraciju lijeka u krvi. S druge povećana koncentracija HSA u krvi (na primjer zbog pretjeranog lučenja hormona štitnjače koji potiču njegovu sintezu) može smanjiti efektivnu koncentraciju istih lijekova. HSA veže i hormon štitnjače tiroksin koji se također veže na Sudlowljevo mjesto 1. Pri vezanju mnogih liganada na albumin primijećen je alosterički efekt. Vezanje već spomenutog varfarina drastično smanjuje afinitet HSA za hem. Alosterički efekt primijećen je i pri vezanju masnih kiselina, no samo za masne kiseline dužih hidrofobnih lanaca (broj ugljikovih atoma veći od 16). Stoga je koncentracija slobodnih masnih kiselina u krvi je bitan čimbenik za farmakokinetička svojstva lijekova koji se vežu na albumin jer masne kiseline utječu na njihov efektivnu koncentraciju i alosteričkim efektom i direktnom kompeticijom za vezna mjesta (Ascenzi i sur., 2015).

Visoka koncentracija HSA u krvi i velik afinitet za vezanje masnih kiselina rezultira vezanjem većine masnih kiselina u krvi na albumina (oko 99% svih masnih kiselina). Pokazano je da HSA ima visoke konstante disocijacije za najzastupljenije masne kiseline u krvi (od 1 do 10 nM za oleinsku, palmitinsku, palmitoleinsku, stearinsku i linoleinsku kiselinu. Za sve navedene masne kiseline također je utvrđen porast afiniteta vezanja s većom duljinom hidrofobnog lanca. Brzina asocijacije i disocijacije za sve ove kiseline relativno je visoka pa se pretpostavlja da HSA djeluje i kao puferski sustav u slučaju naglih fluktuacija koncentracije masnih kiselina u krvi (Curry, 2003).

### 1.1.1 Promjene konformacije HSA

Osim konformacijskih promjena malih razmjera koje se događaju uslijed vezanja različitih liganada na njihova vezna mjesta što izaziva alosterički efekt mijenjajući strukturu drugih veznih mjesta, HSA prolazi i nekoliko konformacijskih promjena većih razmjera. Zabilježeno je pet konformacija koje HSA poprima pod utjecajem promjene pH otapala.

Normalna ili izoforma N (Slika 1) je konformacija HSA pri fiziološkom pH.

Prelazak HSA u bazičnu ili izoformu B zamijećen je pri pH 8,6 kroz analizu spektrofotometrijskih svojstava, no zasad nije riješena kristalna struktura. Izoforma B pokazuje jači afinitet prema mnogim ligandima, pogotovo onima koji se vežu na Sudlowljevo mjesto 2. Otkriće da dodatak iona kalcija u otopinu snižava graničnu pH vrijednost prelaska iz izoforme N u izoformu B na pH 7,6 daje vjerodostojnost hipotezi da povećani afinitet za ligande izoforme B ima fiziološki značaj.

Daljnje povećanje bazičnosti otopine pri pH 9 vodi do prelaska HSA u izoformu A („aged“). Izoforma A otkrivena je nakon što je otopina HSA zabunom ostavljena na pH 9 tri do četiri dana nakon čega je zamijećeno njeno sporije kretanje tijekom elektroforeze u odnosu na izoformu B. Kasnije je pokazano da je za prelazak u izoformu A odgovorna reakcija izmjene disulfida, te da je reakcija reverzibilna iako izoforma A može opstati i do 20 sati na nižem pH nakon formiranja pri višim pH vrijednostima. Tranziciju izoforme B u izoformu A moguće je spriječiti dodatkom masnih kiselina ili drugih lipidnih spojeva čije vezanje stabilizira strukturu. Struktura izoforme A također nije razriješena no povećani signal kromofora zbog veće izloženosti otapalu indicira otvoreniju konformaciju u odnosu na izoforme N i B (Peters, 1995).

Prelazak HSA u izoformu F („fast“) zbiva se u rasponu pH između 4,5 i 3,5, ta je struktura opisana sa simulacijama molekularne dinamike pri pH 3,5 (Baler i sur., 2014). Izoforma F ima otvoreniju konformaciju te je slabije topljiva u vodi. Na temelju promjena u fluorescenciji bočnih ogranaka triptofana postavljena je hipoteza da se prelazak iz izoforme N u F događa preko intermedijera F1 prije potpunog prelaska u izoformu F (Sogami i sur., 2009). Struktura dobivena simulacijama molekularne dinamike pri pH 3,5 ekvivalentna je strukturi na slici 6 pod A. Izoforma F nema fiziološku funkciju.

Daljnje snižavanje pH ispod 3,5 vodi do postupnog razmatanja molekule HSA. Pri pH 2,5 dolazi do prelaska u skoro potpuno razmotanu izoformu E („expanded“). Prelasci između izoformi N, F i E su potpuno reverzibilni.

## 1.2 Masne kiseline

Masne kiseline su podvrsta karboksilnih kiselina. Dvije strukturne odlike masnih kiselina su karboksilna skupine i alifatski lanac. Ovisno o kompoziciji alifatskog lanca, masne kiseline dijelimo na razgranate i nerazgranate. Također ih dijelimo na zasićene i nezasićene ovisno o prisutnosti dvostruke veze između ugljikovih atoma alifatskog lanca.

Većina poznatih masnih kiselina ima paran broj ugljikovih atoma. Dužina alifatskog lanca može varirati od 2 do 80 atoma ugljika, no većina poznatih molekula se nalazi u rasponu od 12 do 22 atoma ugljika. Po duljini alifatskog lanca masne kiseline se dijele na kiseline s kratkim lancem („short-chained“, s manje od 5 atoma ugljika u alifatskom lancu), kiseline s lancima srednje duljine („medium-chained“, sa 6 do 18 atoma ugljika u alifatskom lancu) i masne kiseline s dugima lancima („long-chained“, s preko 18 atoma ugljika u alifatskom lancu). Molekule masnih kiselina posjeduju amfipatski karakter zbog polarne karboksilne skupine i nepolarnog alifatskog lanca. Masne kiseline su većinom slabe kiseline te imaju  $pK_a$  vrijednosti oko 4,8 (Gunstone, 1996).

### 1.2.1 Kaprilna kiselina i taloženje HSA

Kaprilna kiselina je zasićena masna kiselina kratkog lanca. Njen alifatski lanac sastoji se od osam ugljikovih atoma zbog čega se naziva i oktanoična kiselina. Kaprilna kiselina ima  $pK_a$  vrijednost 4,89 i slabo je topljiva u vodi (4,85 mmol/L). Topljivost opada pri nižim pH vrijednostima jer je manji udio karboksilnih skupina deprotoniran te dominira hidrofobni karakter alifatskog lanca (Trapp i sur., 2018).

Kaprilna kiselina se koristi u industrijskoj proizvodnji monoklonalnih i poliklonalnih protutijela (imunoglobulina) u fazi pročišćavanja proizvoda iz plazme kao alternativa kromatografskim metodama uklanjanja nečistoća. Pročišćavanje s pomoću kaprilne kiseline financijski je vrlo primamljiva opcija jer ju je moguće provesti direktno u bioreaktoru što smanjuje operativnu cijenu i olakšava povećanje razmjera proizvodnje u odnosu na kromatografske metode (Brodsky i sur., 2012).

Dodatak kaprilne kiseline u plazmatsku otopinu izaziva taloženje većine proteinske frakcije (koja se većinom sastoji od albumina i albuminu srodnih proteina) dok imunoglobulini ostaju u otopini. Istraživanja su pokazala da pročišćavanje protutijela kaprilnom kiselinom ima i dodatne pozitivne efekte kao što su inaktivacija virusa koji imaju lipidne ovojnice i niža stopa medicinskih nuspojava (Morais i Massaldi, 2012).

Mehanizam interakcije između HSA i kaprilne kiseline nije u potpunosti razjašnjen. Istraživanja su pokazala da učinkovitost taloženja HSA s pomoću kaprilne kiseline pada pri nižim pH vrijednostima što indicira da su za taloženje odgovorne hidrofobne interakcije (Brodsky i sur., 2012). Na temelju kvantitativnih testova precipitacije goveđeg serumskog albumina pri različitim koncentracijama kaprilne kiseline utvrđeno je da dolazi do direktne interakcije između proteina i molekula kiseline. Na temelju ovog rezultata predložen je model taloženja po kojem dolazi do vezanja molekula kaprilne kiseline na površinu albumina što izaziva promjenu konformacije albumina i otkrivanje dodatnih veznih mjesta za kaprilnu kiselinu. Gomilanje kaprilnih kiselina na novootkrivena vezna mjesta izaziva povećanje hidrofobnosti molekula goveđeg albumina te tako dovodi do agregacije i precipitacije proteina (Morais i Massaldi, 2012).

### 1.3 Molekularna dinamika

Molekularna dinamika je računalna simulacija kojom se predviđa kretanja atoma, odnosno molekula u sustavu od interesa. Cilj ovih simulacija je otkriti potencijalne promjene konformacija molekula, mehanizme interakcija između molekula i druge molekularne događaje pri zadanim uvjetima. Rezultat uspješne simulacije molekularne dinamike je trajektorija – zapis gibanja svih atoma sustava u određenom vremenu. Ovakvi rezultati potom se koriste kako bi se objasnili eksperimentalni rezultati ili da bi se navodila buduća eksperimentalna istraživanja ili da bi se postavio model molekularnog mehanizma nekog procesa.

Za simulaciju molekularne dinamike potrebna je inicijalna struktura (makro)molekule koja je cilj istraživanja. Najčešći izvor početne strukture za proteinske sustave su podaci dobiveni kristalografijom, no koriste se i strukture dobivene nuklearnom magnetskom rezonancom (NMR) ili elektronskom mikroskopijom.

Tijekom simulacije molekularne dinamike potrebno je izračunati silu koja dijelu na svaki atom sustava u specifičnom trenutku kako bi mogli izračunati brzinu i smjer gibanja tih čestica u sljedećem trenutku. Ovaj račun izvodi se s pomoću polja sila koje se sastoji od skupa parametara i funkcionala. Skup parametara sastoji se od podataka koji omogućavaju izračun energije interakcija između parova atoma koje očekujemo naći u strukturi molekule, odnosno proteina (npr. između atoma ugljika i karbonilnog kisika karboksilne skupine aminokiselina). U navedene energije interakcije spadaju energija istezanja kovalentnih veza, energija savijanja valentnih kutova, energija promjene torzijskih kutova, van der Waalsove sile i elektrostatske interakcije. Skup parametara također sadrži informacije o svim uključenim atomima poput mase, van der Waalsovog radijusa te vrijednosti parcijalnog naboja, optimalne daljine veze i kuteva za parove i skupine atoma. Vrijednosti naveden u skupu parametara dobivene su empirijskim metodama, odnosno eksperimentalnim podacima sličnih veza u jednostavnijim molekulama i rezultata kvantno mehaničkih računa. Dobiveno polje sila potom može proći nekoliko iteracija provođenja simulacija na sustavima čija je dinamika eksperimentalno dobro razjašnjena i ugađanja parametra polja sila da bi se smanjile razlike između rezultata simulacija i eksperimentalnih rezultata.

Drugi dio polja sila je funkcional koji na temelju poznatih parametara i konformacije molekula u jednom trenutku simulacije računa potencijalnu energiju sustava. Skup svih mogućih položaja

atoma u simuliranom sustavu čini višedimenzionalnu hiperplohu potencijalne energije koja ima energetske minimume (globalne i lokalne) koji predstavljaju stabilne konformacije promatranog sustava (konformere). Kinetička energiju čestica u simulaciji određena je postavljanjem temperature sustava. U svakom vremenskom koraku simulacije računa se sila koja djeluje na sve čestice s pomoću informacija sadržanih u polja sila.

Tijekom simulacije molekularne dinamike atome promatramo kao čestice čije se gibanje opisuje Newtonovim zakonima klasične mehanike, a kovalentne veze između njih su aproksimirane istezanjem opruga. Ove aproksimacije su nužne radi lakšeg izračuna velikog broja interakcija u makromolekularnim sustavima, no zbog njih nije moguće promatrati pucanje i stvaranje kovalentnih veza. Ako je za cilj istraživanja nužno uzeti u obzir pucanje veza, moguće je provesti kvantno-mehaničke računalne simulacije koja su preciznije, no i znatno zahtjevnije.

Prije početka simulacije nužno je odabrati način na koji će se simulirati otapalo i definirati rubne uvjete sustava. Simulacije je moguće provoditi u vakuumu bez otapala, te s implicitnim i eksplicitnim modelima otapala (najčešće vode). Pri korištenju implicitnih modela otapalo/voda nije definirano kao skup zasebnih čestica već kao kontinuirani potencijal. Eksplicitni modeli simuliraju eksplicitno prisutne molekule vode. Postoji nekoliko razina kompleksnosti eksplicitnih modela ovisno o broju mjesta na modelu molekule vode koje mogu interagirati s okolinom. Primjer ovakvih modela su TIP3P model u kojem je voda prikazana kao molekula s 3 mjesta interakcije na mjestima atoma vode koje posjeduju parcijalne naboje i TIP5P model koji uključuje dva dodatna mjesta interakcije koja predstavljaju dva para elektrona na atomu kisika te posjeduju odgovarajuće parcijalne naboje. Rubni uvjeti su način na koji tretiramo čestice kada dođu do ruba simulacijske kutije. Neki od korištenih rubnih uvjeta su rigidne granice, elastične granice i periodični rubni uvjeti. Pri uporabi periodičnih rubnih uvjeta, promatrani sustav je okružen kopijama samog sebe sa svih strana, te se česticama originalnog sustava omogući da dolaze u interakciju s česticama iz sustava-kopija. Na ovaj način se dobiva privid beskonačno velikog sustava te se izbjegavaju nepoželjne nerealistične interakcije molekula s rubovima simulacijskog prostora.

Prije provedbe simulacije molekularne dinamike poželjno je prvo dovesti sustav u najbliži lokalni minimum potencijalne energije kako bi se izbjegla potencijalna nerealistična visokoenergetska stanja izazvana malim udaljenostima između atoma u početnoj strukturi. Minimizacija energije,



odnosno optimizacija strukture se izvodi različitim algoritmima, jedan od njih je algoritam koji traži najstrijmiji spust niz plohu potencijalne energije sustava.

Simulacije molekularne dinamike imaju mnoge potencijalne primjene poput dizajna novih lijekova, istraživanju utjecaja mutacija na strukture proteina, proučavanja interakcija proteina s lipidnim membranama i drugih istraživanja. Često se koriste u situacijama kada su klasične eksperimentalne metode financijski neisplative ili čak nemoguće. Simulacije omogućuju promatranje makromolekularnih procesa na molekularnoj razini, što je teško postići s pomoću klasičnih eksperimentalnih metoda (Hollingsworth i Dror, 2018; Cramer, 2002).

## 1.4 Cilj istraživanja

Cilj ovog rada je istražiti mehanizme interakcije kaprilne kiseline i HSA te njihovu ovisnost o pH vrijednosti otopine. Istraživanje je provedeno s pomoću računalnih simulacija molekularne dinamike. Početne strukture HSA i kaprilne kiseline pribavljene su iz javno dostupnih baza podataka te su korištene za pripremu inicijalnih *in silico* modela na kojima su provedene simulacije. Simulacijama molekularne dinamike analizirana su dinamička i strukturna svojstva proteina HSA pri dvije pH vrijednosti. Analiza rezultata simulacija omogućila je istraživanje interakcija između kaprilne kiseline i HSA.

Iz dosadašnjih istraživanja jasno je da HSA istovremeno dolazi u interakciju s velikim brojem molekula kaprilne kiseline te su sustavi konstruirani u skladu s tom činjenicom. Pri obje pH vrijednosti, 4,5 i 6,0, simulirana su po dva različita sustava, jedan u kojem su molekule kaprilne kiseline raspoređene u pravilnu sferu oko strukture HSA, te drugi kod kojeg su molekule kaprilne kiseline raspoređene na potencijalna mjesta interakcije.

Analizom rezultata simulacija molekularne dinamike došlo je do saznanja o molekularnoj osnovi interakcije između kaprilne kiseline i HSA te saznanja o utjecaja pH vrijednosti sustava na ovu interakciju.

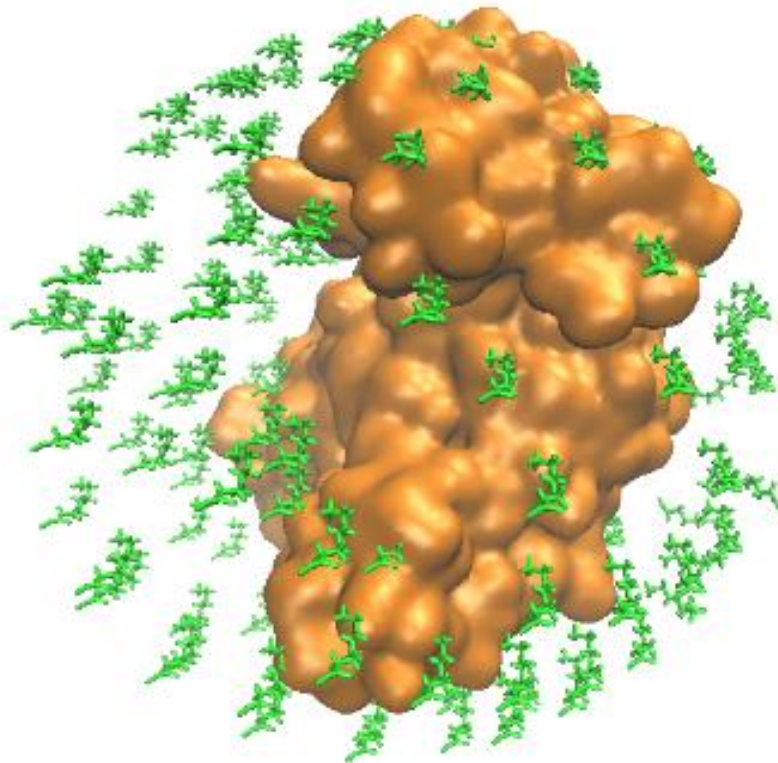
## 2 Materijali i metode

### 2.1 Simulacije molekularne dinamike

#### 2.1.1 Priprema sustava

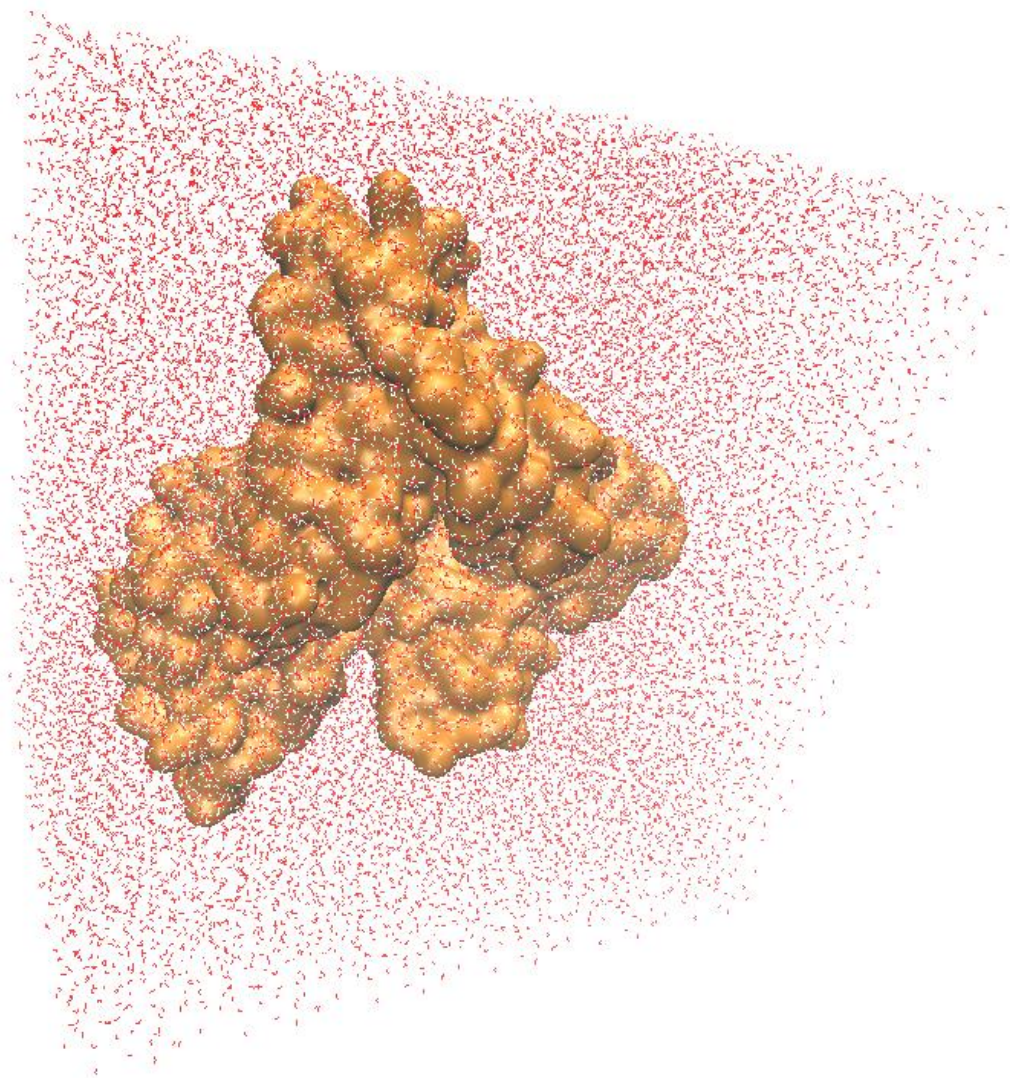
Za *in silico* istraživanje ljudskog serumskog albumina (HSA) odabrana je datoteka PDB oznake 1n5u (Wardell i sur., 2002) iz baze podataka RCSB PDB (Berman i sur., 2000) koja sadrži riješenu kristalnu strukturu ljudskog HSA u kompleksu s molekulom hema. Iz datoteke je uklonjena struktura hema te su sustavu dodani atomi vodika s pomoću programa PROPKA (Li, Robertson i Jensen, 2005) na mrežnom poslužitelju PDB2PQR (Dolinsky i sur., 2004). Dodavanje atoma vodika obavljeno je pri dvije pH vrijednosti (4,0 i 6,5) kako bi dobiveni sustavi obuhvatili ekstreme podataka o sustavima HSA i kaprilne kiseline iz literature (Trapp i sur., 2018). Za istraživanje kaprilne kiseline odabrana je struktura pdb oznake 5tif (Grisewood i sur., 2017) koja sadrži riješenu kristalnu strukturu acil-koenzim A tioesteraze u kompleksu s kaprilnom kiselinom. Struktura acil-koenzim A tioesteraze uklonjena je iz datoteke te su strukturi kaprilne kiseline dodani vodici s pomoću programa YASARA (Krieger i Vriend, 2014). Pripremljena je i struktura protoniranog oblika kaprilne kiseline tako da je jedan od vodika dupliciran i premješten na odgovarajuću poziciju s pomoću programa Pymol (URL1). Oba oblika kaprilne kiseline su potom parametrizirana u programu Antechamber koji je sastavni dio programskog paketa Amber16 (Wang i sur., 2006). Kriteriji korišteni pri odabiru datoteka bili su kompletnost strukture i rezolucija.

Sustavi kojima istražujemo interakciju HSA i kaprilne kiseline pri oba pH pripremljeni su s pomoću programskog koda napisanog u jeziku python i pokrenutog u programu Pymol. Ovaj program raspoređuje kopije kaprilne kiseline u sferu oko strukture proteina na minimalnu udaljenost pri kojoj nema preklapanja s proteinom i drugim molekulama kaprilne kiseline (Slika 3). Za sve ovako dobivene sustave pripremljene su kopije sustava u kojima su neke od molekula kaprilne kiseline ručno pomaknute u blizinu površine proteina na mjesta na kojima bi mogli očekivati stvaranje povoljnih elektrostatskih interakcija i/ili vodikovih veza.



Slika 3. Molekula HSA (narančasto) okružena molekulama kaprilne kiseline (zeleno). Grafički prikaz je napravljen u programu VMD.

Tako dobiveni sustavi učitani su u program tleap koji je dio programskog paketa Amber16 (Wang i sur., 2006). HSA je parametriziran s pomoću polja sila ff14SB (Maier i sur., 2015), a kaprilna kiselina s pomoću datoteka ranije dobivenih u programu antechamber. Svi sustavi (HSA te HSA i kaprilna kiselina) su smješteni u sredinu kvadra (Slika 4) koji je potom ispunjen molekulama vode modela TIP3P tako da je minimalna udaljenost od ruba kvadra do proteina 10 Å (Jorgensen i sur., 1983). Ukupni naboj sustava je sveden na nulu dodavanjem iona natrija ili klora.



Slika 4. HSA (narančasto) u sredini kvadra ispunjenog molekulama vode TIP3 modela (crveno).  
Grafički prikaz napravljen je u programu VMD.

### 2.1.2 Minimizacija energije, ekvilibracija sustava i simulacije molekularne dinamike

Minimizacija i ekvilibracija sustava provedene su s pomoću programa CUDA (Nickolls i sur., 2008) i programskog paketa Amber16. Minimizacija sustava provedena je u pet ciklusa pri čemu se svaki korak sastoji od 1000 koraka algoritma najstrmijeg spusta nakon čega slijedi 4000 koraka metode konjugiranih gradijenata. U svakom koraku odabranim skupinama atoma ograničeno je kretanje primjenom harmoničkog potencijala. Progresivne razlike između koraka navedene su u tablici (Tablica 1).

Tablica 1. Koraci minimizacije sustava.

<b>Korak minimizacije</b>	<b>Molekule/atomi kojima je dopušteno neograničeno kretanje</b>	<b>Konstanta sile harmoničkog potencijala koji ograničava kretanje ostalim atomima (kcal/(mol Å))</b>
1	Samo molekule vode	100
2	Molekule vode i vodikovi atomi	100
3	Svi atomi osim atoma proteinske okosnice	100
4	Svi atomi osim atoma proteinske okosnice	50
5	Svi atomi (nema restrikcija)	/

Nakon minimizacije, provedena je ekvilibracija u dva koraka u trajanju od 300 i 200 ps. U NVT ekvilibraciji temperatura (T) je postupno povišena od 0 do 298 K, dok su volumen (V) i ukupan broj čestica u sustavu (N) održavani konstantnim. Tijekom NVT ekvilibracije na sve atome primijenjen je harmonički potencijal s konstantom sile od 32 kcal/(mol Å).

Nakon završetka NVT ekvilibracije provedena je NPT ekvilibracija pri konstantnom tlaku (P) i bez primjene sile na atome. Tijekom NPT ekvilibracije temperatura (298 K) i tlak (101325 pa) održavani su konstantnim. U oba koraka ekvilibracije vremenski korak iznosio je 1 fs te je za određivanje brzina čestica korišten Berendsenov termostat uz vremenski korak temperaturnog sparivanja od 1 ps. Svi sustavi su potom podvrgnuti simulacijama molekularne dinamike u trajanju od 100 ns. Temperatura i tlak održavani su konstantnim na 298 K i 101325 pa. Korišten je vremenski korak od 1 fs i Berendsenov termostat uz vremenski korak temperaturnog sparivanja

od 1 ps. U tablici 2 nalazi se popis svih provedenih simulacija. Tijekom svih simulacija primijenjeni su periodični rubni uvjeti.

Tablica 2. Popis sustava za simulacije molekularne dinamike.

<b>Oznaka sustava</b>	<b>Početna struktura HSA</b>	<b>Broj molekula kaprilne kiseline i njihov inicijalni raspored</b>	<b>pH</b>
1	Konformacija nakon inicijalne ekvibracije HSA	0	4,0
2	Konformacija nakon inicijalne ekvibracije HSA	0	6,5
3	Konformacija nakon inicijalne ekvibracije HSA	155 molekula raspoređenih u pravilnu sferu oko proteina	4,0
4	Konformacija nakon inicijalne ekvibracije HSA	155 molekula raspoređenih u pravilnu sferu oko proteina	6,5
5	Konformacija nakon inicijalne ekvibracije HSA	155 molekula smještenih u blizinu površine	4,0
6	Konformacija nakon inicijalne ekvibracije HSA	155 molekula smještenih u blizinu površine	6,5
7	Konformacija nakon završetka simulacije 1	155 molekula raspoređenih u pravilnu sferu oko proteina	4,0
8	Konformacija nakon završetka simulacije 1	155 molekula smještenih u blizinu površine	4,0

## 2.2 Analiza trajektorija

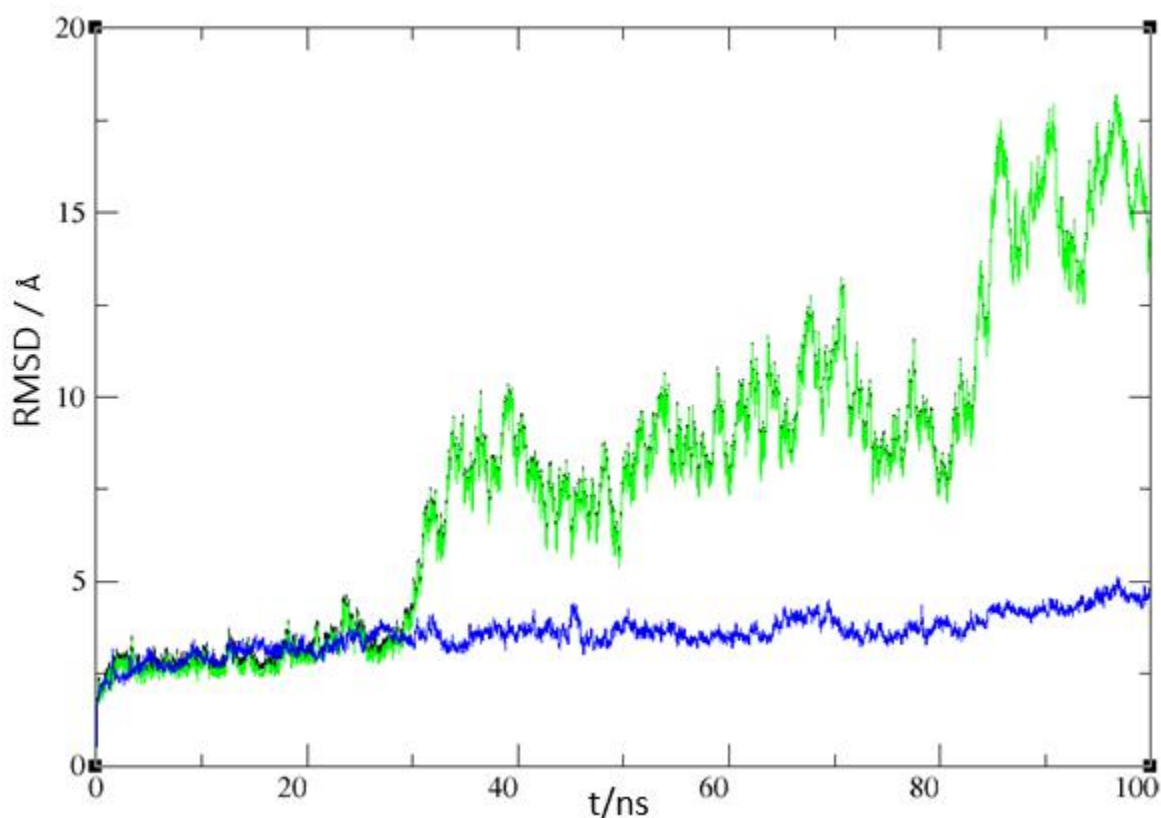
Analiza trajektorija obavljena je u programima VMD (Humphrey, Dalke i Schulten, 1996) i CPPTRAJ koji je dio programskog paketa Amber16. RMSD (“root mean square deviation“) i RMSF (“root mean square fluctuation“) vrijednosti izračunate su u programu cpptraj. RMSD vrijednost je mjera prosječne udaljenost atoma proteina od pozicija atoma referentne strukture u danom trenutku dok je RMSF vrijednost mjera odstupanja pozicije svakog atoma proteina od pozicija atoma referentne strukture kroz cijelo vrijeme simulacije. Kao referentna struktura u oba izračuna korištena je struktura proteina u početnom trenutku simulacije. Površina dostupna otapalu izračunata je s pomoću programskog koda napisanog u jeziku tcl i pokrenutog u programu VMD. Vodikove veze analizirane su pomoću hbonds dodatka za program VMD. Kritične vrijednosti za udaljenost između atoma donora i akceptora te kut između atoma akceptora, atoma donora i vodikovog atoma postavljene su na 3.5 Å i 30°. Grafički prikazi ovih izračuna napravljeni su u programskom jeziku R s pomoću paketa “ggplot2“. Hidrofobnost površine proteina analizirana je programom Swiss-PdbViewer (Guex i Peitsch, 1997).



### 3 Rezultati

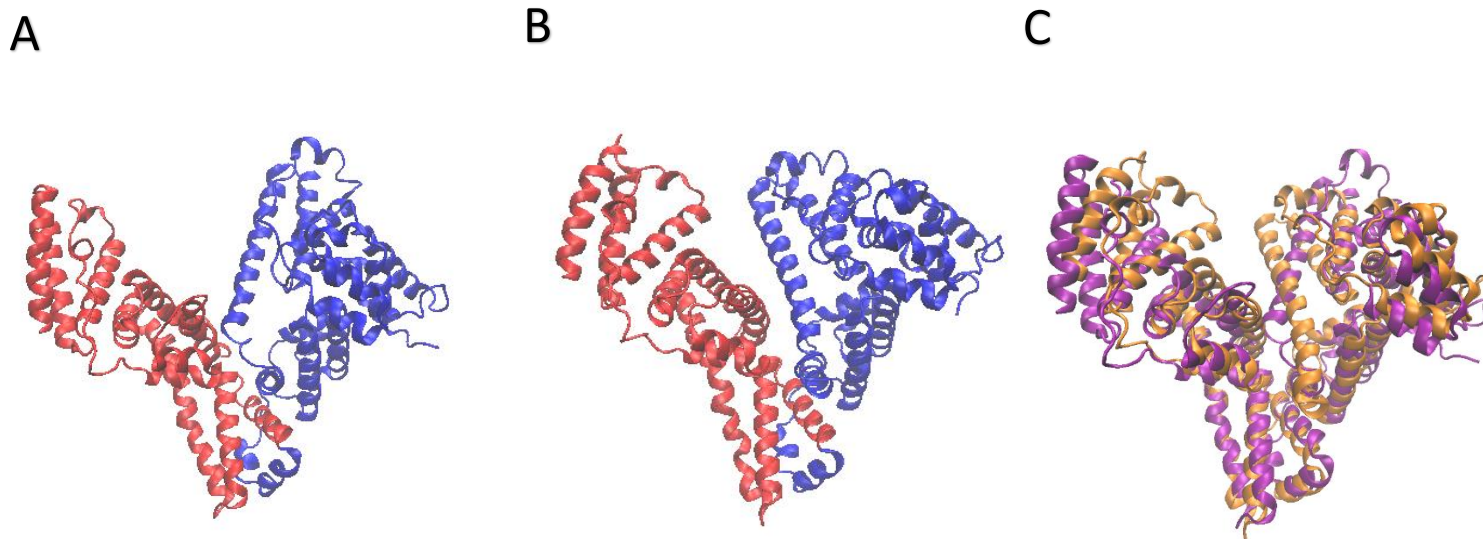
#### 3.1 Utjecaj pH na konformaciju HSA

Vrijednost RMSD za proteinsku okosnicu tijekom simulacije sustava koji sadrži HSA bez kaprilnih kiselina pri pH 6,5 je stabilna kroz cijelo vrijeme trajanja simulacije molekularne dinamike (MD), dok za isti sustav pri pH 4,0 dolazi do naglog skoka nakon 15 ns koji upućuje na značajnu promjenu konformacije proteina (Slika 5).



Slika 5. Vrijednost RMSD za proteinsku okosnicu tijekom trajektorija HSA pri pH 6,5 (plavo) i pH 4,0 (zeleno). Struktura s početka simulacije (ekvivalentna strukturi nakon posljednjeg koraka ekvilibracije) korištena je kao referentna za izračun RMSD vrijednosti.

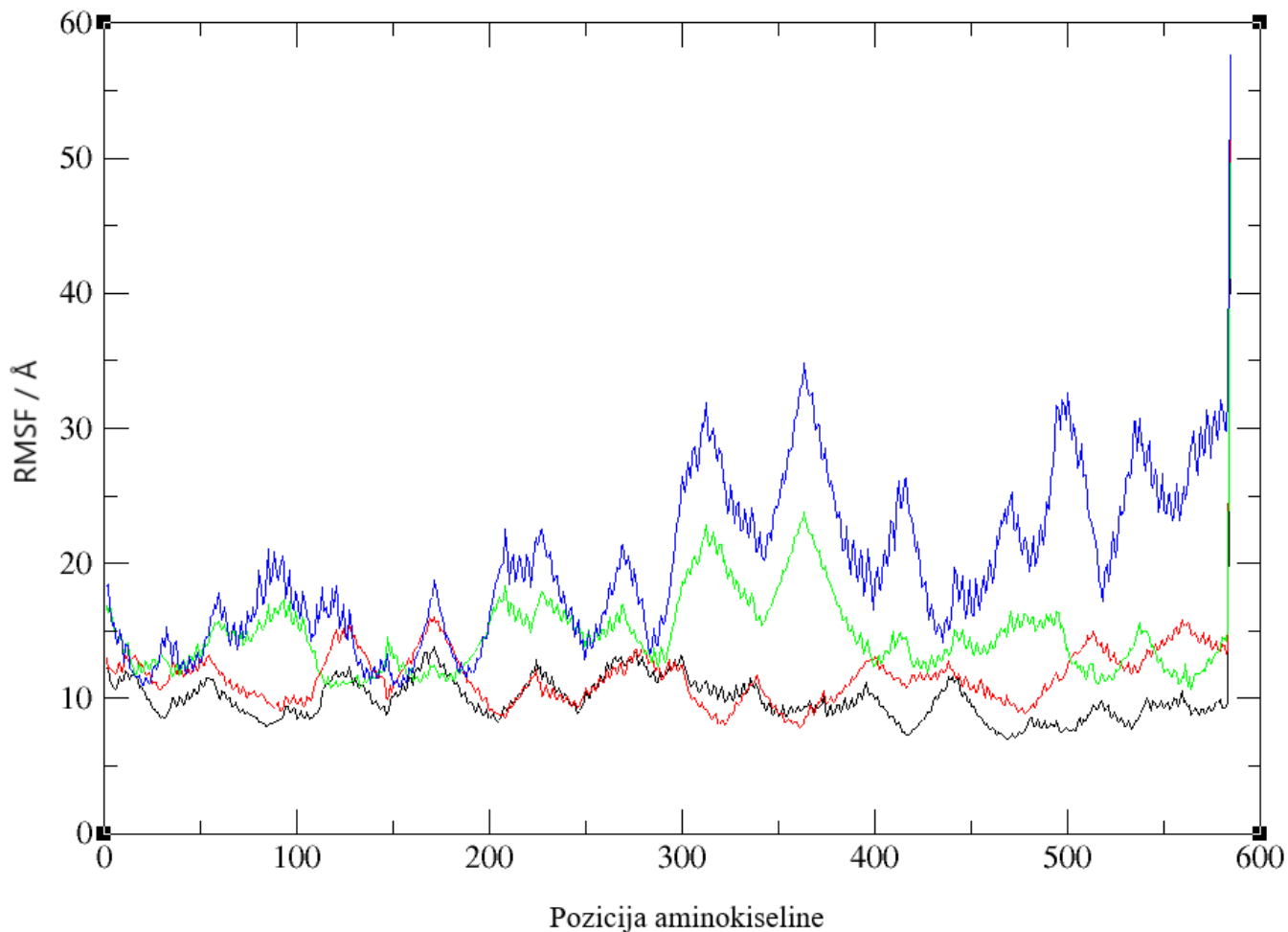
Vizualna provjera struktura tijekom trajektorije pokazuje djelomično razmatanje strukture HSA pri nižem pH (Slika 6). U toku simulacije pri pH 4,0 udaljenost između centara masa dviju domena povećava se s 32,6 Å na 37,5 Å (ove aminokiseline se nalaze na distalnim krajevima domena označenih crvenom i plavom bojom na Slika 6).



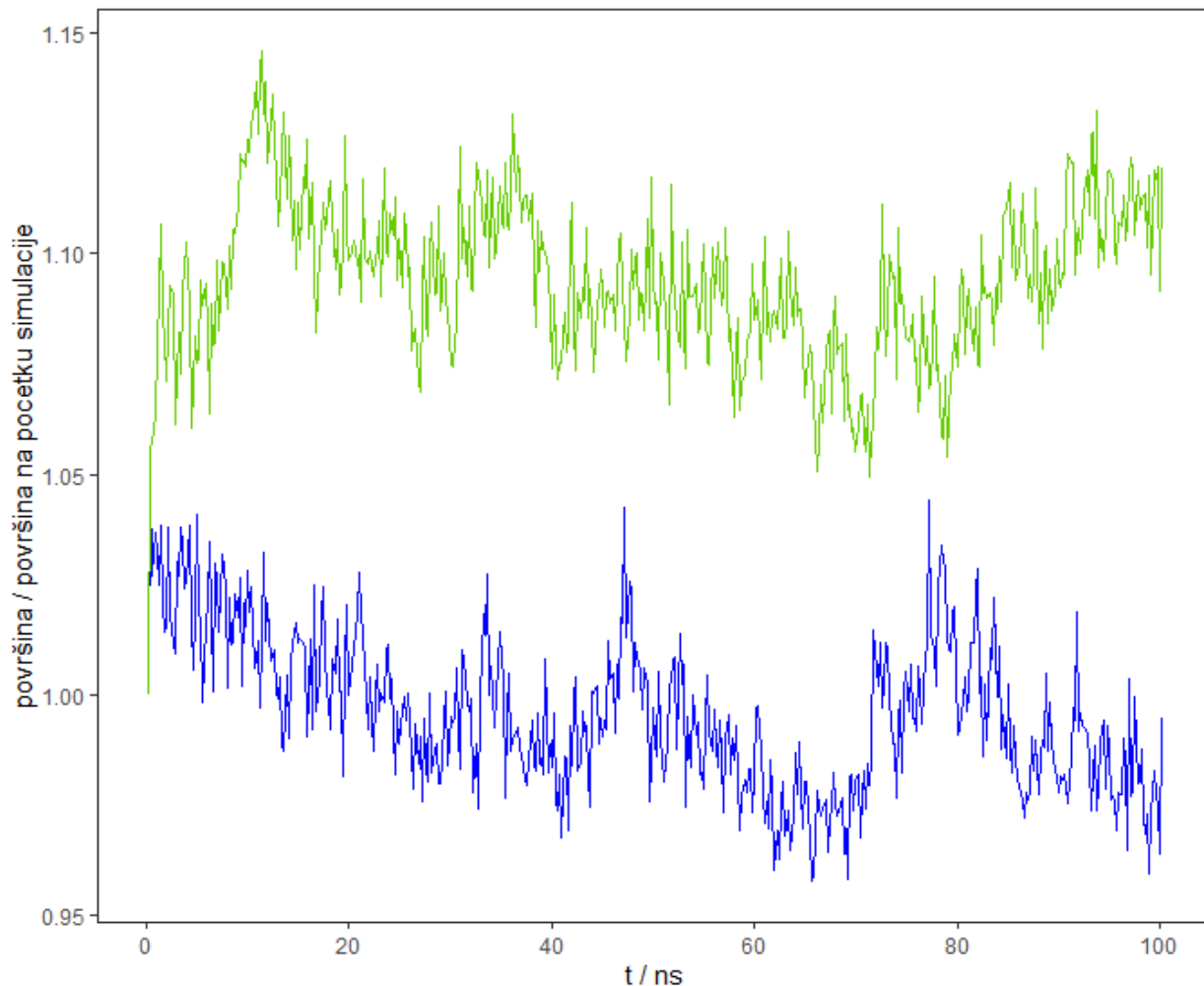
Slika 6. Vizualizacija konformacija HSA nakon 100 ns simulacija molekularne dinamike. Struktura A prikazuje HSA protoniran na pH 4,0, struktura B prikazuje HSA protoniran na pH 6,5. Dvije domene između kojih dolazi do najvećeg odvajanja u toku simulacija označene su crvenom i plavom bojom. Granica dviju domena odabrana je na vizualno, na temelju lokacije potencijalne zglobne regije tijekom opisane promjene konformacije. Struktura C sastoji se od preklopljenih struktura A (ljubičasto) i B (narančasto).

Tijekom obiju simulacija ne dolazi do značajne promjene u udjelu sekundarnih struktura i konformacije subdomena HSA. Glavna razlika između dviju simulacija pri različitim pH vrijednostima je razmicanje domena označenih crvenom i plavom bojom na Slika 6. Analiza RMSF vrijednosti (Slika 7) pokazuje malo razlika između simulacija pri pH 4,0 i 6,5. Dva najuočljivija signala pri simulacijama pri pH 4,0 odgovaraju razmicanju najudaljenijih krajeva domena opisanih na slici 6. Između simulacija sa i bez molekula kaprilnih kiselina pri pH 6,5 nema značajnijih razlika. Pri pH 4,0 dolazi do povećanja fleksibilnosti proteina u simulaciji sa

molekulama kaprilne kiseline, posebno na C-terminalnom kraju. Rezultati analize površine dostupne otapalu odgovaraju opisanim promjenama strukture (Slika 8). Vidljivo je da otvorenija konformacija HSA pri pH 4,0 rezultira povećanjem dostupne površine.

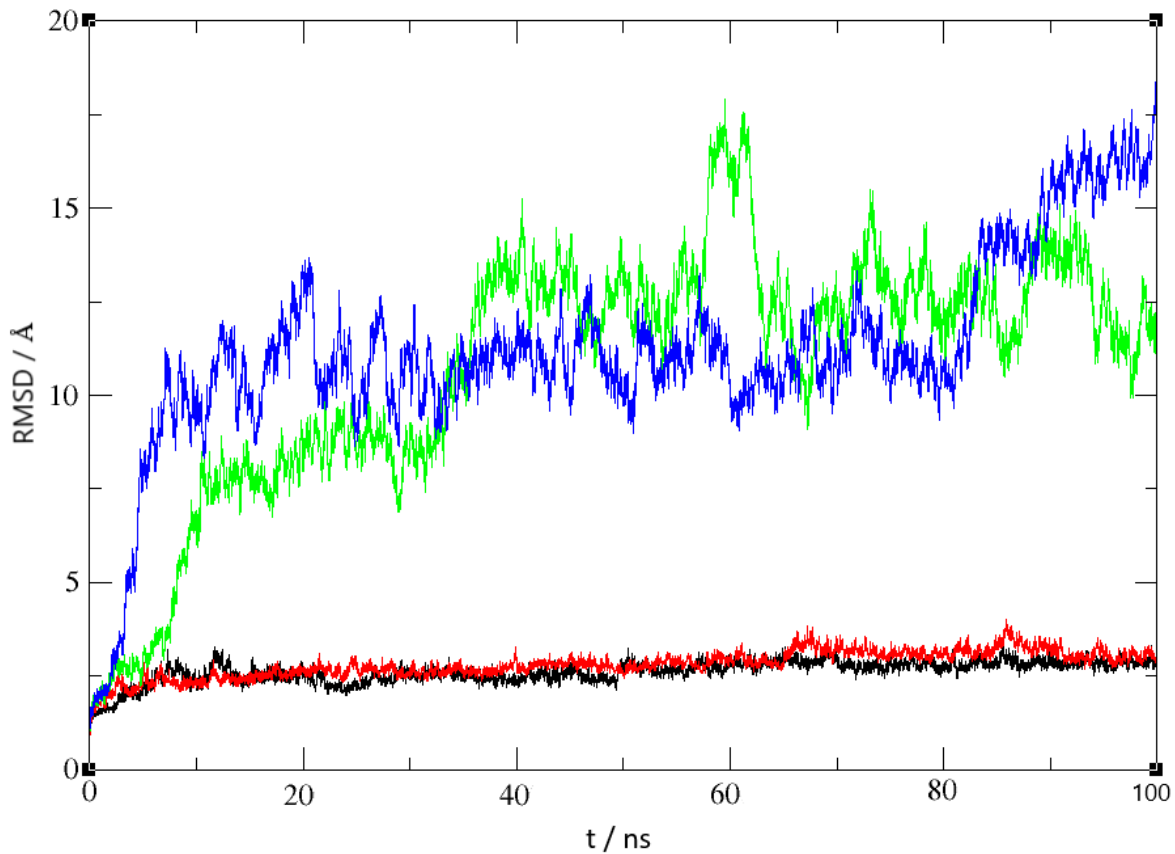


Slika 7. RMSF vrijednosti aminokiselina HSA tijekom 100 ns simulacije molekularne dinamike. Zeleno; HSA pri pH 4,0, crno; HSA pri pH 6,5, crveno; molekule kaprilne kiseline postavljene u sferu oko HSA pri pH 6,5, plavo; molekule kaprilne kiseline postavljene u sferu oko HSA pri pH 4,0.



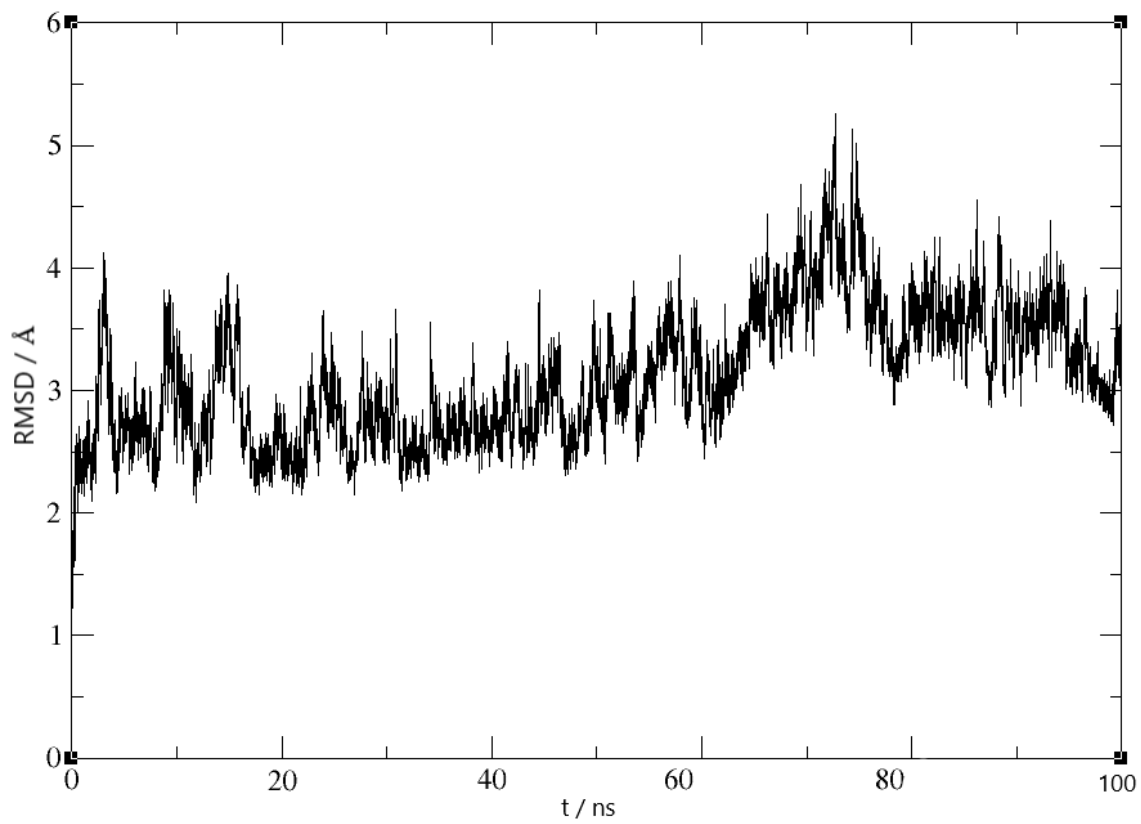
Slika 8. Promjena površine HSA dostupne otapalu kroz 100 ns simulacije molekularne dinamike. Vrijednosti za strukturu protoniranu na pH 6,5 prikazane su plavom bojom, a zelenom bojom su prikazane vrijednosti sustava pri pH 4,0. Vrijednosti površine HSA su normalizirane u odnosu na površinu HSA dostupnu otapalu na početku simulacije.

Analize promjene konformacija HSA u sustavima koje sadrže kaprilnu kiselinu daju slične rezultate kao i sustavi bez prisutnosti molekula kaprilne kiseline. Na temelju RMSD vrijednosti i analize strukture jasno je da pri pH 4,0 dolazi do iste promjene strukture kao i u simulaciji bez kaprilnih kiselina (Slika 9). Na temelju RMSD vrijednosti nema značajne razlike između sustava u kojima su molekule kaprilne kiseline ručno postavljene na potencijalna mjesta interakcije i sustava s kiselinama postavljenima u pravilnu sferu oko molekule HSA.



Slika 9. RMSD vrijednosti kroz 100 ns simulacija molekularne dinamike sustava HSA i kaprilne kiseline. Zeleno; molekule kaprilne kiseline postavljene u sferu oko HSA pri pH 4,0, plavo; molekule kaprilne kiseline ručno postavljene oko HSA pri pH 4,0, crveno; molekule kaprilne kiseline postavljene u sferu oko HSA pri pH 6,5, crno; molekule kaprilne kiseline ručno postavljene oko HSA pri pH 6,5.

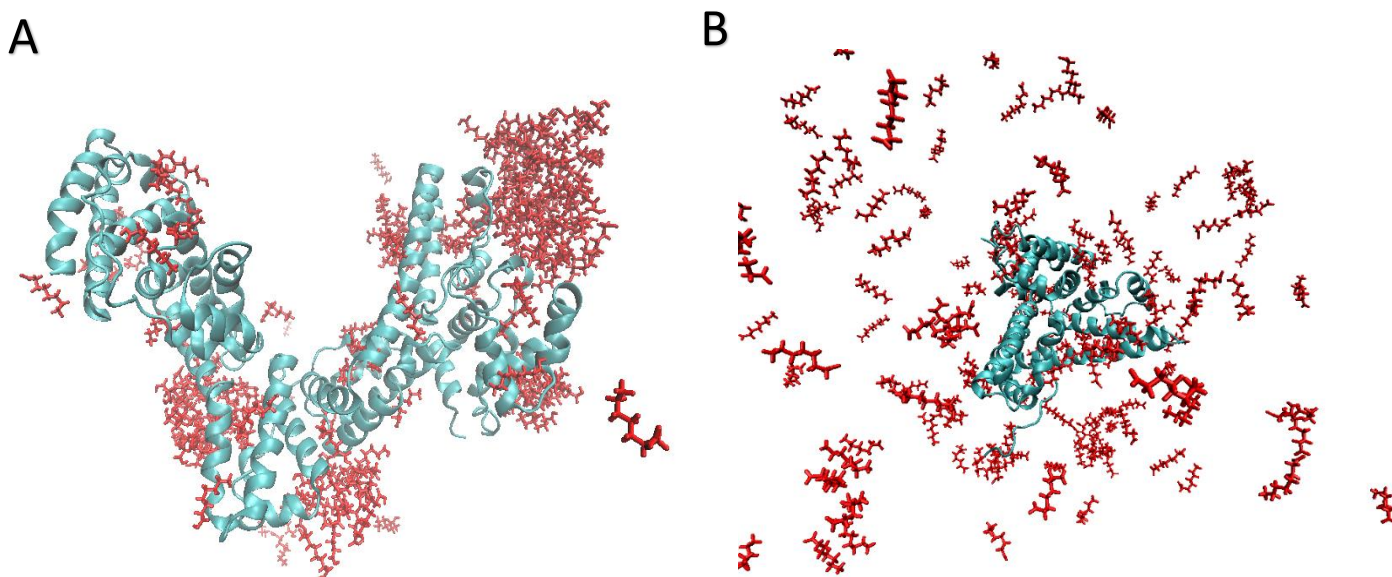
RMSD vrijednosti sustava koji su građen na temelju završne konformacije HSA pri pH 4,0 u simulaciji bez kaprilnih kiselina stabilne su tijekom cijelog trajanja simulacija (Slika 10). Ovo je indikacija da je završna konformacija HSA pri pH 4,0 (Slika 5) relativno stabilna u konačnom obliku.



Slika 10. RMSD vrijednosti tijekom 100 ns simulacije molekularne dinamike sustava s nasumičnom sferom kaprilnih kiselina oko završne konformacije HSA iz simulacije bez kiselina pri pH 4,0.

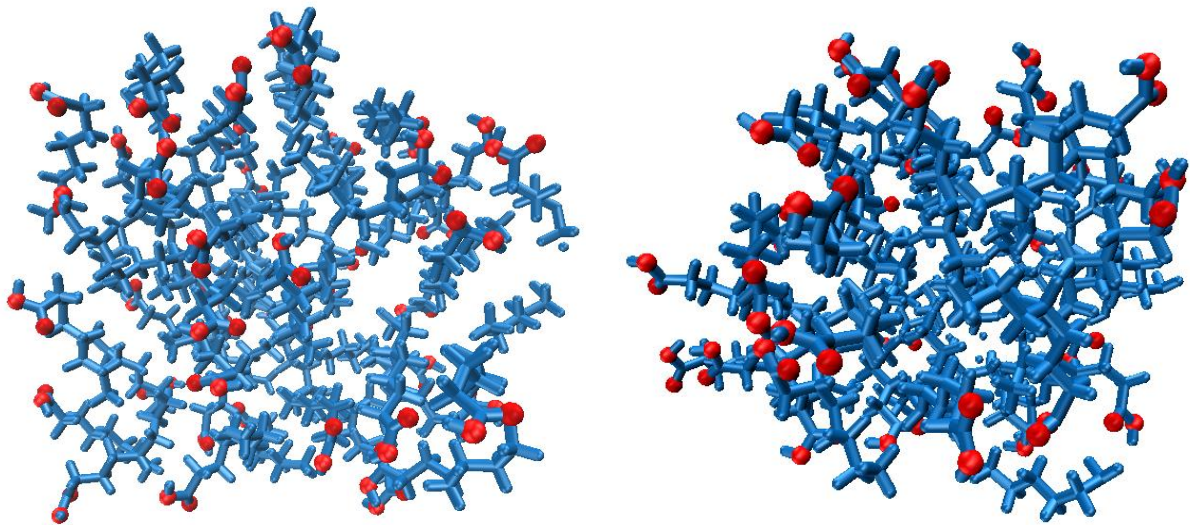
### 3.2 Analiza dinamike kaprilne kiseline

Primijećeno je različito ponašanje molekula kaprilne kiseline tijekom simulacija pri različitim pH vrijednostima. Molekule kaprilne kiseline pri pH 4,0 stvaraju micelama slične nakupine u otopini i u kontaktu s površinom proteina. Ova razlika je zamijećena, i u sustavima s nasumičnim, i u sustavima s usmjerenim rasporedom molekula kaprilne kiseline na početku simulacije. Na Slika 11 prikazano je stanje na kraju simulacije za sustave kod kojih je početni raspored kaprilne kiseline bio nasumičan te je uočeno stvaranje nakupina kaprilne kiseline pri pH 4,0, dok pri pH 6,5 takvog nakupljanja nema ili postoji u znatno manjem intenzitetu.



Slika 11. Konformacija HSA i raspored 155 molekula kaprilne kiseline nakon 100 ns simulacije molekularne dinamike, A) pri pH 4,0 i B) pri pH 6,5.

Takve nakupine pojavljuju se u svim simulacijama pri pH 4,0 te sadrže između 15 i 40 molekula. Nepravilnog su oblika, no postoji tendencija orijentacije polarne karboksilne skupine prema otapalu (Slika 12).

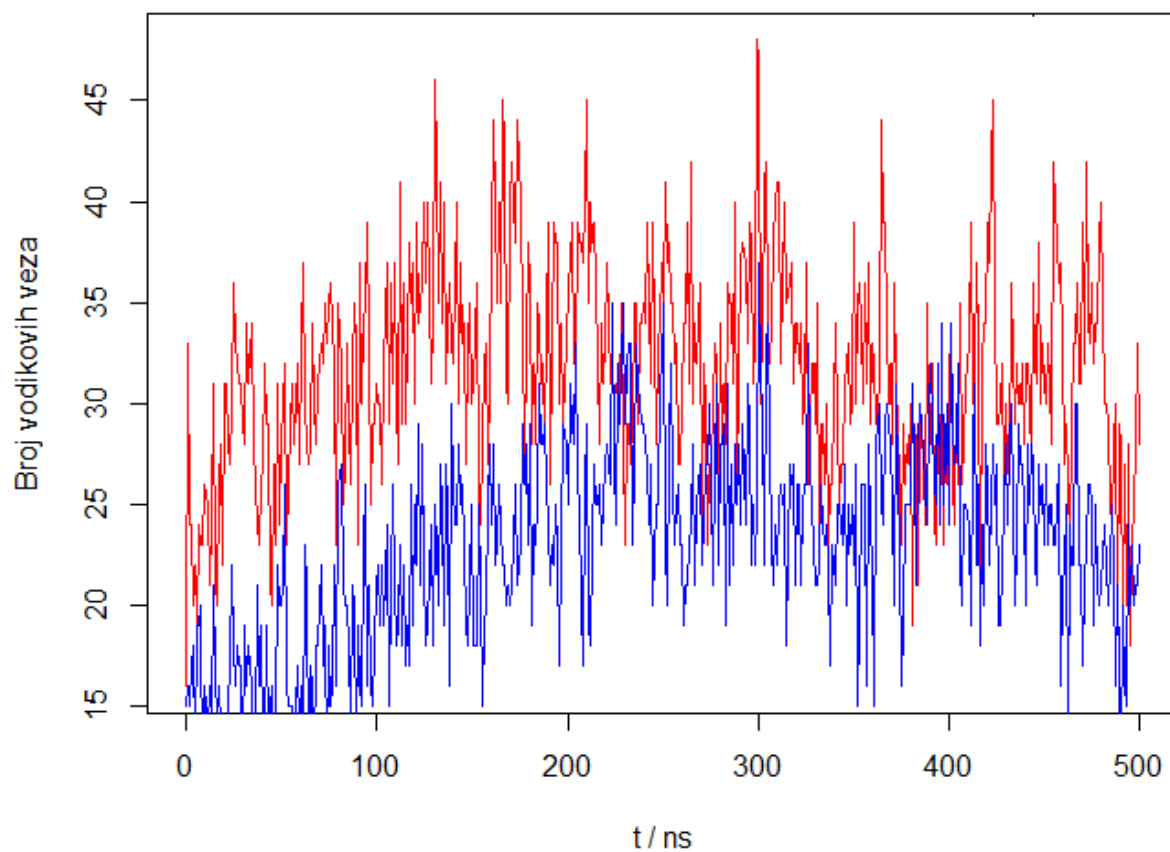


Slika 12. Primjer nakupina kaprilnih kiselina pri pH 4,0. Crvenim sferama označeni su atomi kisika karboksilne skupine. Polarni krajevi molekula orijentirani su van centara nakupine.

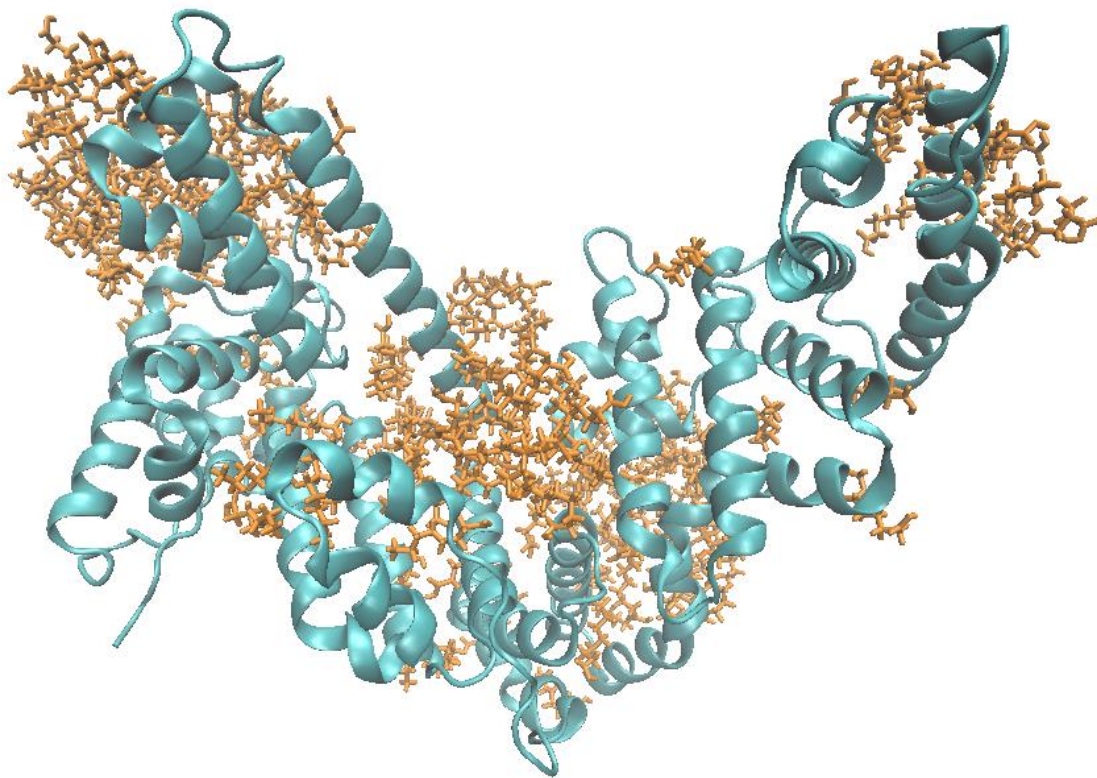
Tijekom simulacije pri pH 6,5 dolazi do sličnih kontakata individualnih molekula kiseline s površinom HSA, no nema nakupina kiselina. U simulacijama pri obje pH vrijednosti povećanje broja vodikovih veza između HSA i molekula kaprilne kiseline prati sličnu dinamiku. Veći broj vodikovih veza pri pH 4,0 vjerojatno je uzrokovan dodatnom površinom dostupnom otapalu uslijed prije opisanog djelomičnog razmatanja (Slika 13). Kod simulacija s nasumičnim početnim rasporedom kaprilnih kiselina prosječan broj vodikovih veza između HSA i molekula kiseline iznosi 32 pri pH 4,0 i 23 pri pH 6,5. Kod simulacija s molekulama kaprilne kiseline smještenim u blizini površine HSA prosječni broj vodikovih veza iznosi 35 pri pH 6,5 i 51 pri pH 4,0. Ručno namještanje kaprilnih kiselina u blizinu površine HSA povećalo je broj vodikovih veza na početku simulacije s 12 na 32 pri pH 6,5 te sa 16 na 35 pri pH 4,0.

U dvije simulacije u kojima je kao početna struktura korištena finalna konformacija simulacije pri pH 4,0 dobivene su srednje vrijednosti broj vodikovih veza između HSA i kaprilnih kiselina u iznosu 51 za simulaciju s nasumičnim rasporedom kiselina i 55 za simulaciju s usmjerenim rasporedom. Ručno raspoređivanje molekula kaprilne kiseline u ovim simulacijama dovelo je do povećanja broja vodikovih veza na početku simulacije s 35 na 50.





Slika 13. Broj vodikovih veza između HSA i molekula kaprilne kiseline u sustavu pri pH 6,5 (plavo) i sustavu pri pH 4,0 (crveno). U oba prikazana sustava molekule kiseline postavljene su u pravilnu sferu na jednaku udaljenost od centra mase proteina na početku simulacije.

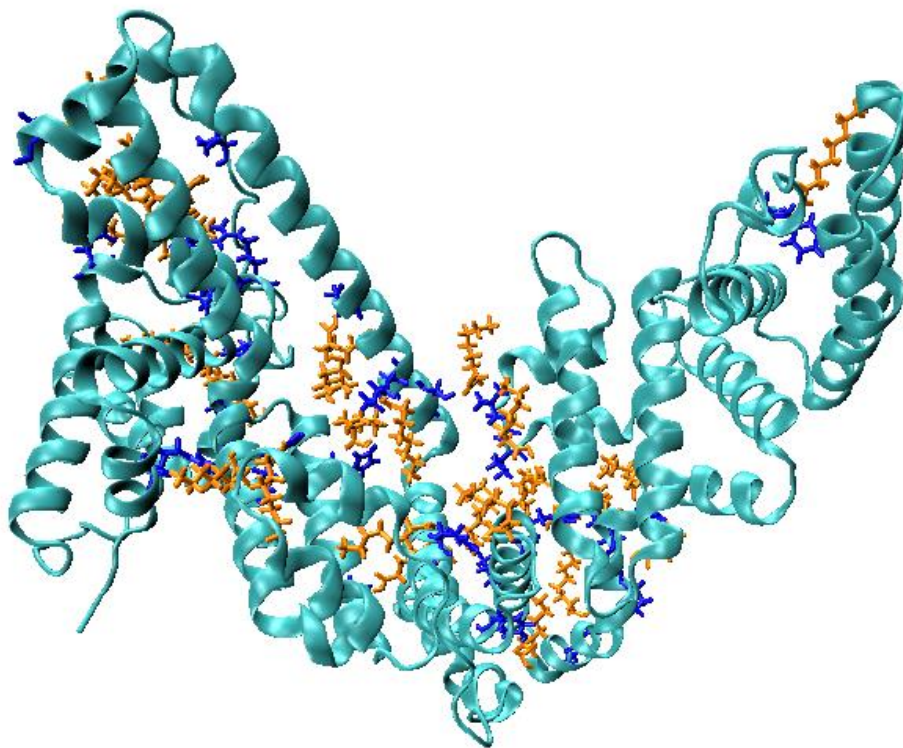


Slika 14. Vezna mjesta kaprilne kiseline na površinu HSA nakon 100 ns simulacije molekularne dinamike pri čemu je kao početna konformacija korištena konformacija s kraja simulacije pri pH 4,0.

Utjecaj razmatanja na interakcije kaprilne kiseline s HSA proučen je i simulacijama 7 i 8 (Tablica 2) u kojima je kao početna struktura HSA korištena završna konformacija nakon simulacije pri pH 4,0 (Slika 14). Iz ovih simulacija vidljivo je da se velik broj molekula kaprilne kiseline veže na dio površine proteina koji je bio nedostupan za vezanje prije djelomičnog razmatanja.

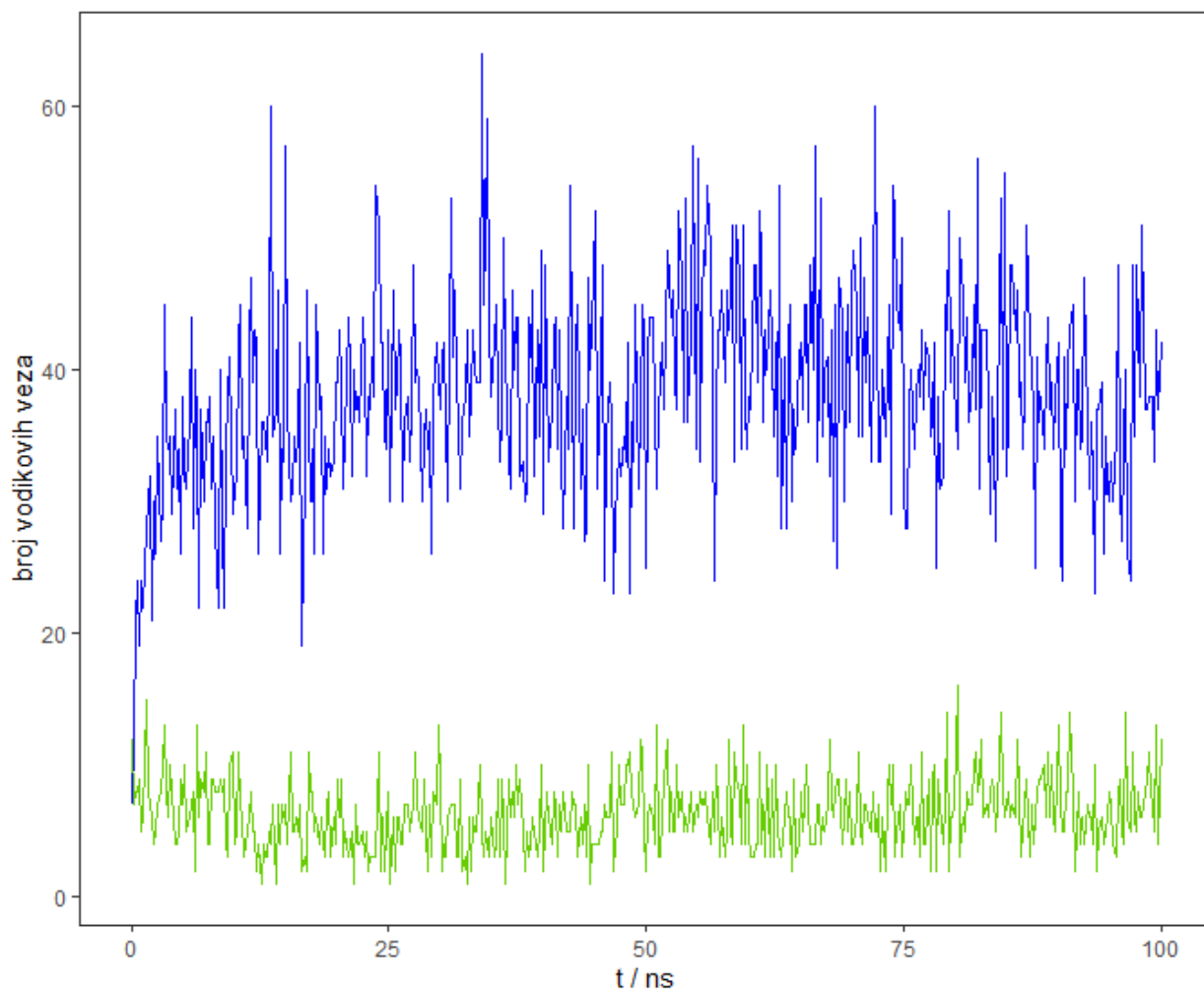
Detaljan prikaz molekula kaprilne kiseline koje dolaze u interakciju vodikovim vezama s aminokiselinama HSA nalazi se na slici 15. Za porast broja vodikovih veza odgovorne su polarne aminokiseline koje se nalaze u procjepu između dviju domena do čijeg razdvajanja dolazi pri pH 4,0 (Lys198, Arg217, Arg347, His241, Ser201 i Glu353). Neke od micela formiranih na površini HSA imaju nekoliko molekula kaprilne kiseline koje su povezane vodikovim vezama s aminokiselinama na površini HSA, no neke micelle i individualne molekule kiseline su vezane isključivo hidrofobnim interakcijama. Alifatski lanac većina molekula kaprilne kiseline koje

stupaju u vodikove veze nalazi se blizu površine HSA indicirajući da istovremeno stvaraju i hidrofobne interakcije s proteinom.



Slika 15. Aminokiseline HSA (plavo) i molekule kaprilne kiseline (narančasto) koje stvaraju vodikove veze nakon 100 ns simulacije molekularne dinamike pri čemu je kao početna konformacija korištena konformacija s kraja simulacije pri pH 4,0.

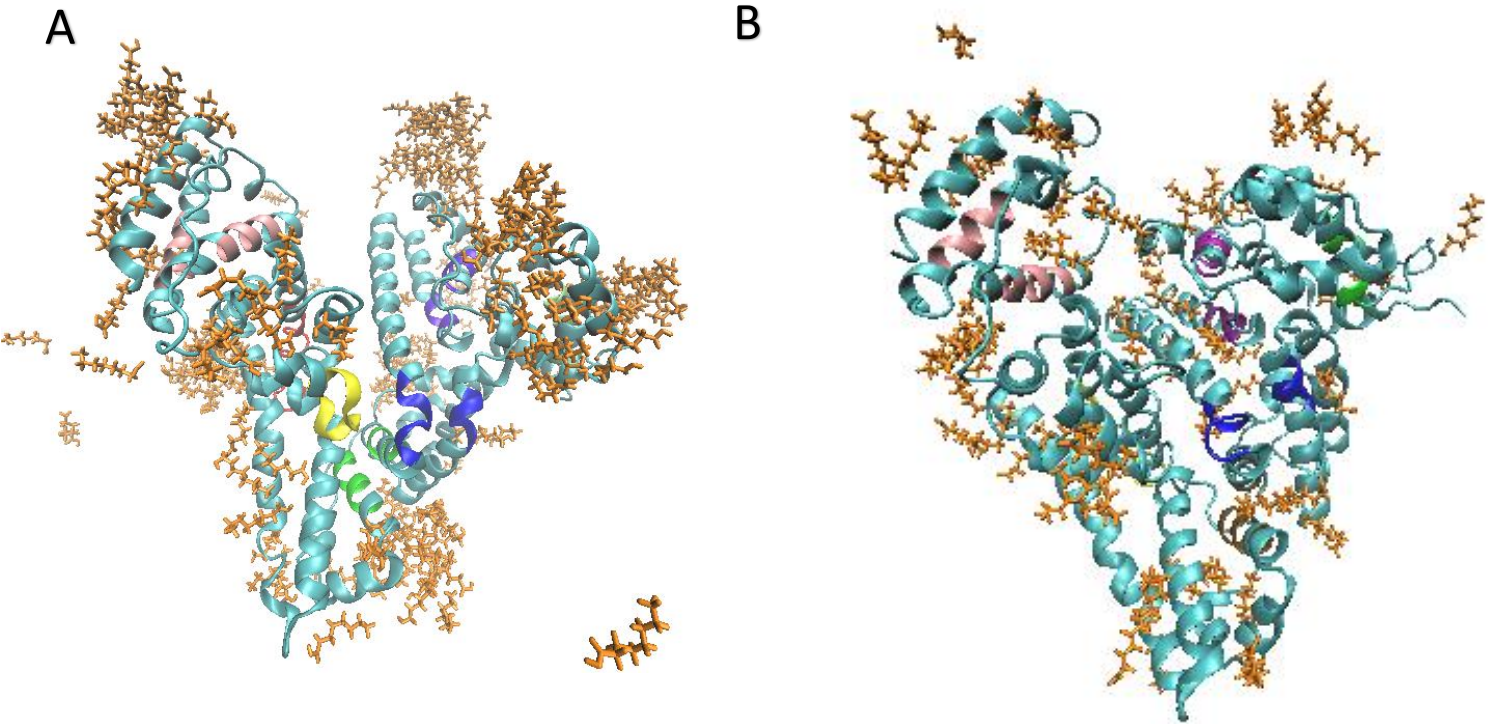
Razlika između ponašanja molekula kaprilne kiseline pri dvije pH vrijednosti opisana je brojem međusobnih vodikovih veza između molekula kiseline u toku simulacije (Slika 16). Broj vodikovih veza između molekula kiseline pri pH 6,5 je stabilan tijekom cijele simulacije, dok pri pH 4,0 dolazi do naglog porasta u prvih 20 ns nakon čega slijedi stabilizacija pri višim vrijednostima. Najvjerojatniji uzrok razlike u broju vodikovih veza između dviju pH vrijednosti je veća prosječna blizina molekula kaprilne kiseline uslijed stvaranja micela.



Slika 16. Broj vodikovi veza stvorenih između molekula kaprilne kiseline u toku simulacije pri pH 6,5 (zeleno) i pH 4,0 (plavo). Veći broj vodikovih veza pri pH 4,0 rezultat je nakupljanja molekula kiseline u micelama slične strukture.

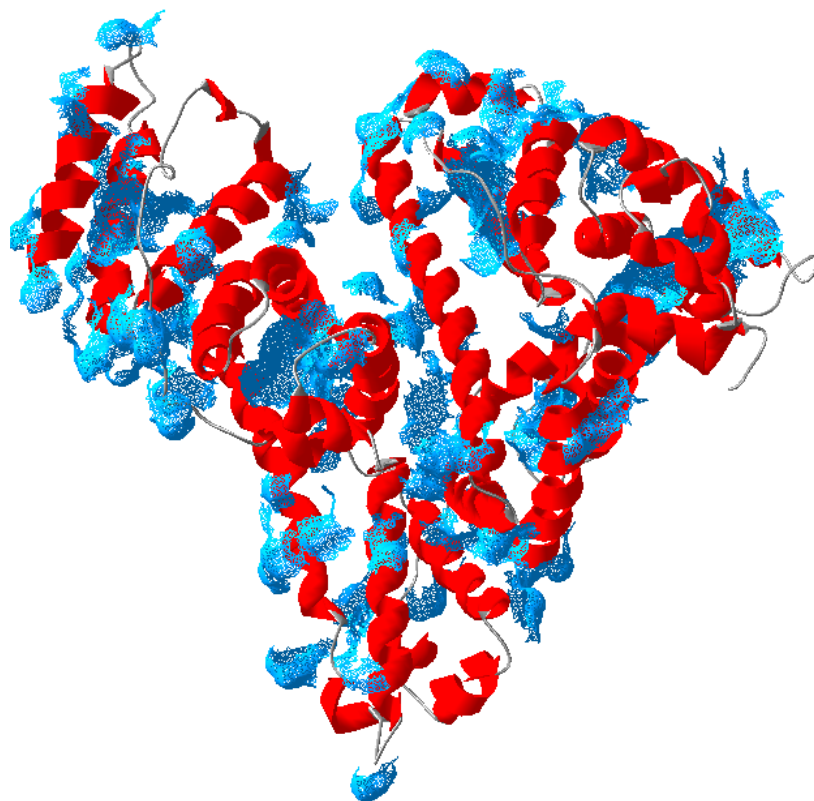
Uspoređena je lokalizacija kaprilne kiseline na površini HSA u odnosu na poznata visoko afinitetna vezna mjesta za masne kiseline na albuminu (Slika 17). Uočeno je da se mjesta interakcije molekula kaprilne kiseline s površinom HSA rijetko podudaraju s navedenim visoko afinitetnim mjestima. Mogući razlog ovog nepodudaranja je činjenica da su vezna mjesta za masne kiseline na HSA utvrđivana u odnosu na najčešće masne kiseline u ljudskoj krvi koje su sve znatno veće od kaprilne kiseline (Curry 2003). Broj kaprilnih kiselina koje se nalaze unutar  $3,5 \text{ \AA}$  udaljenosti od površine HSA tijekom simulacija pri pH 6,5 kreće se između 25 i 40 (Slika 11, Slika 17). Ova brojka blizu je teoretske brojke od 20 veznih mjesta s niskim afinitetom za masne kiseline

(Goodman, 1958). Pri pH 4,0 broj molekula kaprilne kiseline koje se nalaze u blizini površine HSA puno je veći uslijed stvaranja micela.



Slika 17. Mjesta interakcije HSA i kaprilne kiseline, A) pri pH 4,0 i B) pri pH 6,5. Obojana su mjesta na strukturi HSA koja formiraju 7 mjesta sa velikim afinitetom za vezanje masnih kiselina u krvi.

Provjerena je i raspodjela hidrofobnih regija na površini HSA kako bi provjerili je li opravdano objasniti prijanjanje molekula kaprilne kiseline uz površinu proteina pomoću hidrofobnog efekta (Slika 18). Broj i veličina pronađenih hidrofobnih regija na površini HSA može objasniti vezanje molekula kaprilne kiseline na površinu proteina.

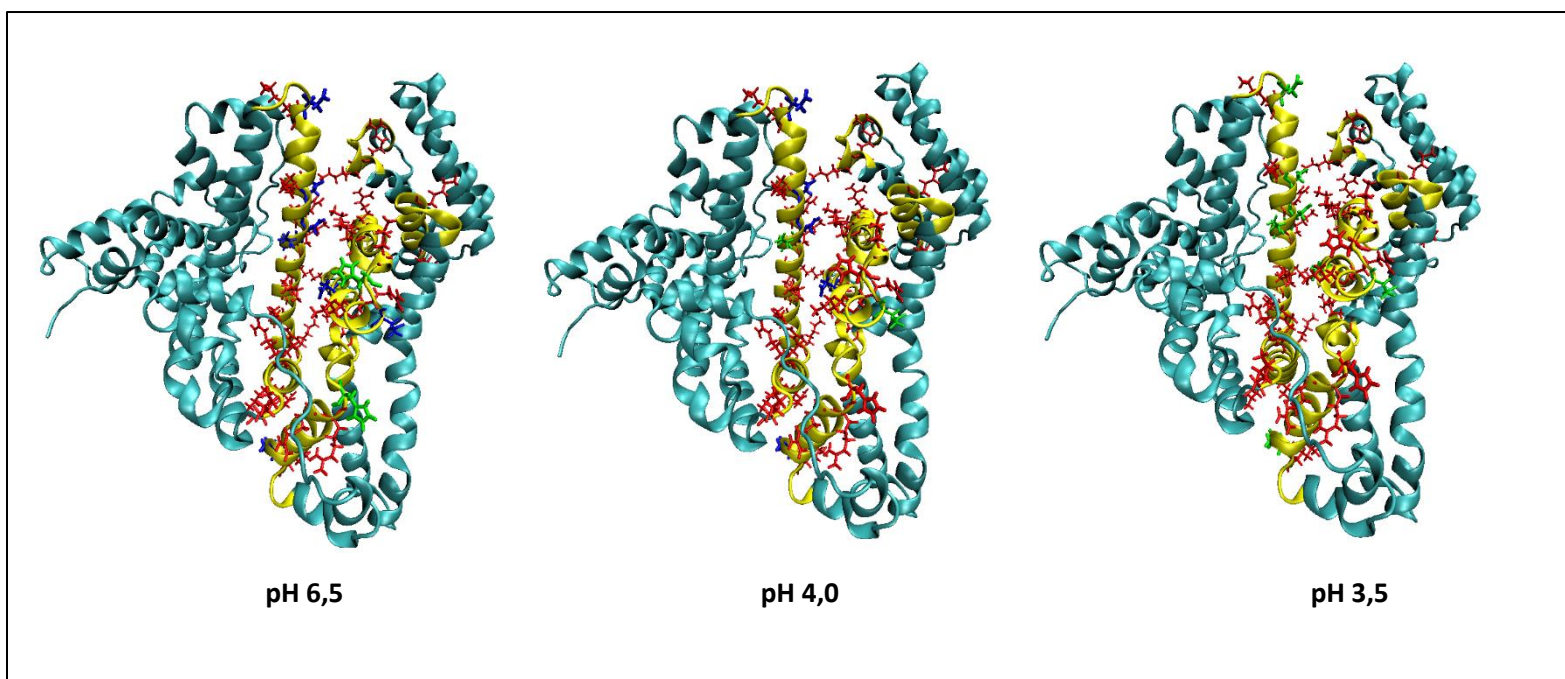


Slika 18. Struktura HSA s plavo označenim segmentima površine koji imaju hidrofobni karakter. Crveno su označene alfa zavojnice.

## 4 Rasprava

### 4.1 Promjena konformacije albumina

Djelomično razmatanje HSA uzrokovano elektrostatskim odbijanjima pri nižem pH već je prije opisana s pomoću simulacija molekularne dinamike pri pH 3,5 (Baler i sur., 2014). Ova vrijednost pH vjerojatno je izabrana jer pri njoj dolazi do protonacije većine aminokiselina u regiji HSA u kojoj dolazi do razmicanja domena. Ova regija približno se sastoji od aminokiselina 180 do 224, 336 do 346, 396 do 409, 417 do 465, 477 do 483 i 513 do 521, i karakterizira ju velika zastupljenost bazičnih aminokiselina (Slika 19).



Slika 19. Usporedba relativnih naboja bočnih ogranaka histidina, aspartata, glutamate, lizina i arginina koji se nalaze na granicama domena do čijeg razmicanja dolazi pri nižim pH vrijednostima. Zeleno su označene pretežito neutralne aminokiseline, crveno relativno pozitivno nabijene, a plavo one relativno negativno nabijene. Žutom bojom označena je regija u kojoj dolazi do elektrostatskih odbijanja. Do razmicanja lijevog i desnog dijela žuto označene regije dolazi kod pH 3,5 i kod pH 4,0.

Iz rezultata simulacija jasno je da do promjene konformacije HSA dolazi i pri pH 4,0. Glavna razlika između protonacije bočnih ogranaka aminokiselina između HSA pri pH 4,0 i pH 3,5 je raspodjela naboja na aspartatima, od kojih se tri nalaze u domenama između kojih dolazi do razmicanja (Asp182, Asp186 i Asp450).

## 4.2 Ponašanje kaprilne kiseline pri različitim pH vrijednostima

U simulacijama pri pH 4,0 zapaženo je stvaranje micelama sličnim struktura kaprilne kiseline na površini proteina i u otapalu. Različita kritična koncentracija za stvaranje micela masnih kiselina u protoniranom i deprotoniranom stanju uzrokovana je elektrostatskim odbijanjima deprotoniranih karboksilnih skupina pri višem pH (Salentinig i sur., 2014).

Interakcije kaprilnih kiselina s površinom proteina imaju nespecifični, hidrofobni karakter te ne koreliraju sa sedam poznatih, visoko specifičnih veznih mjesta za serumske masne kiseline na HSA, vjerojatno zato što su ta mjesta utvrđena u odnosu na znatno masne kiseline znatno duljih hidrofobnih lanaca u odnosu na kaprilnu kiselinu. Kaprilne kiseline vežu se na djelomično hidrofobne regije na površini proteina pri obje pH vrijednosti. Razlog odudaranja broja kiselina vezanog na površinu HSA u odnosu na broj teoretskih nisko afinitetnih mjesta vjerojatno je također razlika u veličini molekula čije je vezanje razmatrano. Pri nižoj pH vrijednosti vezanje kaprilnih kiselina na hidrofobne džepove na površini HSA praćeno je istovremenom agregacijom molekula kiselina u micelle, što rezultira stvaranjem većih nakupina kaprilne kiseline uz površinu proteina.

Mnoge od interakcija kaprilne kiseline s površinom proteina imaju i karakter vodikove veze s aminokiselinama na površini HSA. S obzirom na veličinu i broj hidrofobnih džepova na površini proteina u odnosu na relativno kratki hidrofobni lanac kaprilne kiseline postoje dva moguća načina vezanja. Na većim hidrofobnim džepovima na površini proteina ili hidrofobnim procjepima koji su skriveni unutar strukture HSA dolazi do vezanja samo hidrofobnim interakcijama nakon čega slijedi potencijalno stvaranje micelarne nakupine oko već vezane molekule kiselina pri nižim pH vrijednostima. U drugom slučaju molekula kaprilne kiseline veže se i hidrofobnom interakcijom s alifatskim lancem i vodikovom vezom s obližnjom polarnom aminokiselinom. Molekule kaprilne kiseline zamijećene tijekom analize vodikovih veza koje nisu istovremeno u hidrofobnoj



interakciji s površinom proteina uvijek su bile dio micelarnih nakupina u blizini površine. Ovakve dodatne vodikove veze možda omogućuju stabiliziranje micela na površini proteina.

Na temelju broja direktnih interakcija kaprilnih kiselina s površinom HSA pri pH 6,5 vjerojatno je da su velike micelle vidljive u simulacijama pri pH 4,0 rezultat stapanja više manjih micela koje se formiraju oko pojedinačnih molekula kaprilne kiseline vezanih na hidrofobne džepove na površini HSA.

## 5 Zaključak

Pri pH 4,0 dolazi do izražene promjene konformacije HSA koja rezultira znatnim povećanjem površine dostupne otapalu. Pri pH 6,5 ne dolazi do ove promjene te je konformacija HSA stabilna kroz svih 100 ns simulacije molekularne dinamike. Razlog ove promjene konformacije su elektrostatska odbijanja koja nastaju uslijed naboja koje imaju bočni ogranci aspartata (Asp182, Asp186 i Asp450) unutar centralne regije proteina pri pH 4,0. Povećanja površine dostupne otapalu koje nastaje zbog konformacijske promjene proteina pri pH 4,0 uzrokuje povećanje broja interakcija HSA s molekulama kaprilne kiseline.

Molekule kaprilne kiseline stvaraju micelle u protoniranom stanju pri pH 4,0. Pri pH 6,5 ne dolazi do stvaranja micela zbog prevelikih odbijanja nabijenih karboksilnih skupina u deprotoniranom stanju.

Tijekom simulacija pri obje pH vrijednosti dolazi do vezanja molekula kaprilne kiseline na površinu proteina. Vezanje je uzrokovano hidrofobnim efektom između hidrofobnih lanaca kaprilne kiseline i hidrofobnih džepova na površini HSA. Uz hidrofobne interakcije, u vezanju kaprilne kiseline sudjeluje i velik broj vodikovih veza, no na svim mjestima vezanja nužna je i hidrofobna interakcija. Kombinacija stvaranja micela i vezanja molekula kaprilne kiseline na površinu HSA uzrokuje stvaranje velikih micelarnih nakupina na površini proteina pri pH 4,0.

## 6 Literatura

- Ascenzi, P., A. di Masi, G. Fanali i M. Fasano. 2015. "Heme-Based Catalytic Properties of Human Serum Albumin." *Cell Death Discovery* 1(1).
- Baler, K., O. A. Martin, M. A. Carignano, G. A. Ameer, J. A. Vila i I. Szleifer. 2014. "Electrostatic Unfolding and Interactions of Albumin Driven by PH Changes: A Molecular Dynamics Study." *The Journal of Physical Chemistry. B* 118(4):921–30.
- Berman, Helen M., Tammy Battistuz, T. N. Bhat, Wolfgang F. Bluhm, Philip E. Bourne, Kyle Burkhardt, Zukang Feng, Gary L. Gilliland, Lisa Iype, Shri Jain, Phoebe Fagan, Jessica Marvin, David Padilla, Veerasamy Ravichandran, Bohdan Schneider, Narmada Thanki, Helge Weissig, John D. Westbrook, i Christine Zardecki. 2002. "The Protein Data Bank." *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 58(6 I):899–907.
- Berman, Helen M., John Westbrook, Zukang Feng, Gary Gilliland, T. N. Bhat, Helge Weissig, Ilya N. Shindyalov i Philip E. Bourne. 2000. *The Protein Data Bank*. Vol. 28.
- Brodsky, Yan, Cheng Zhang, Yinges Yigzaw i Ganesh Vedantham. 2012. "Caprylic Acid Precipitation Method for Impurity Reduction: An Alternative to Conventional Chromatography for Monoclonal Antibody Purification." *Biotechnology and Bioengineering* 109(10):2589–98.
- Cramer, Christopher J. 2002. *Essentials of Computational Chemistry*. John Wiley & Sons.
- Curry, Stephen. 2003. "Plasma Albumin as a Fatty Acid Carrier." *Advances in Molecular and Cell Biology* 33:29–46.
- Dolinsky, Todd J., Jens E. Nielsen, J. Andrew McCammon i Nathan A. Baker. 2004. "PDB2PQR: An Automated Pipeline for the Setup of Poisson-Boltzmann Electrostatics Calculations." *Nucleic Acids Research* 32(WEB SERVER ISS.).
- Evans, T. W. 2002. "Review Article: Albumin as a Drug-Biological Effects of Albumin Unrelated to Oncotic Pressure." *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 16(s5):6–11.
- F.D.Gunstone. 1996. *Fatty Acid and Lipid Chemistry*. 1. Springer.
- Fasano, Mauro, Stephen Curry, Enzo Terreno, Monica Galliano, Gabriella Fanali, Pasquale

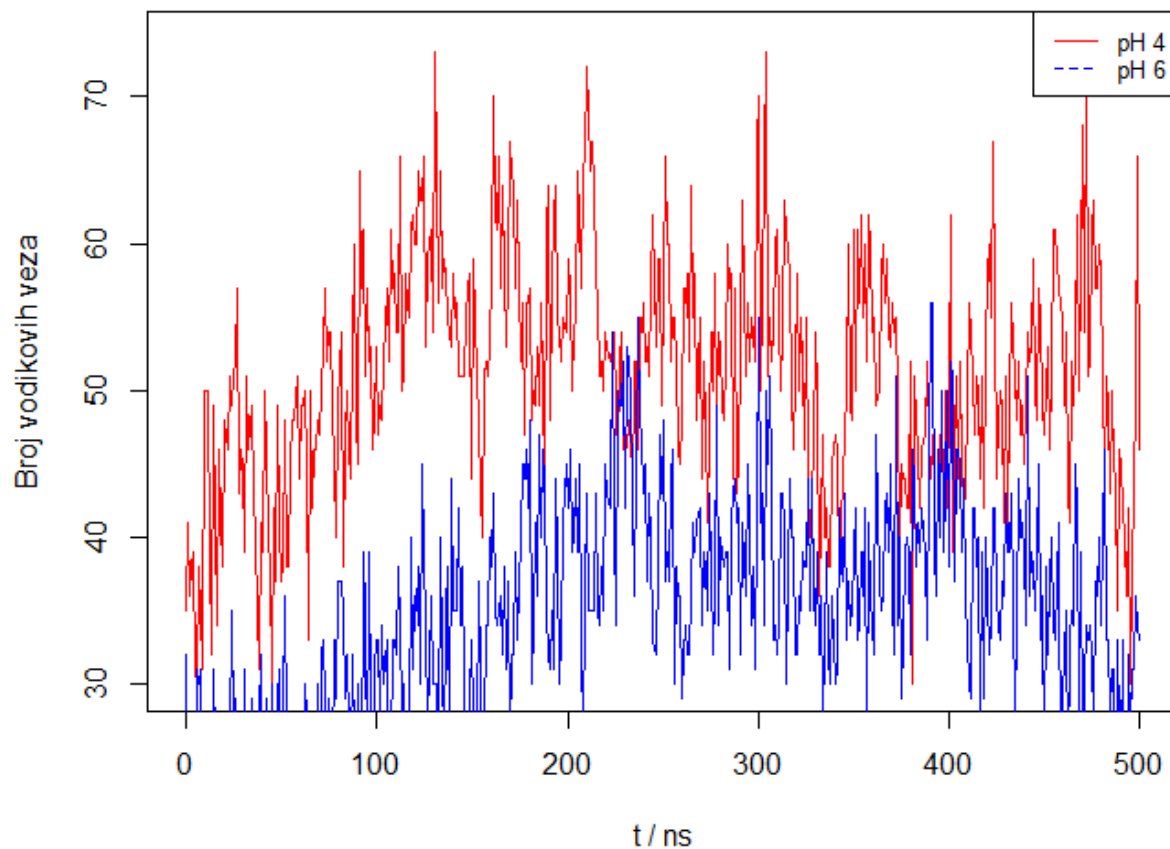
- Narciso, Stefania Notari i Paolo Ascenzi. 2005. "The Extraordinary Ligand Binding Properties of Human Serum Albumin." *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)* 57(12):787–96.
- Goodman, DeWitt S. Witt S. 1958. "The Interaction of Human Serum Albumin with Long-Chain Fatty Acid Anions." *Journal of the American Chemical Society* 80(15):3892–98.
- Grisewood, M. J., N. J. Hernandez Lozada, J. B. Thoden, N. P. Gifford, D. Mendez-Perez, H. A. Schoenberger, M. F. Allan, M. E. Floy, R. Y. Lai, H. M. Holden, B. F. Pflieger i C. D. Maranas. 2017. "Computational Redesign of Acyl-ACP Thioesterase with Improved Selectivity toward Medium-Chain-Length Fatty Acids." *ACS Catal* 7:3837–49.
- Guex, Nicolas i Manuel C. Peitsch. 1997. "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An Environment for Comparative Protein Modeling." *Electrophoresis* 18(15):2714–23.
- He, Xiao Min i Daniel C. Carter. 1992. "Atomic Structure and Chemistry of Human Serum Albumin." *Nature* 358(6383):209–15.
- Hollingsworth, Scott A. i Ron O. Dror. 2018. "Review Molecular Dynamics Simulation for All."
- Humphrey, William, Andrew Dalke i Klaus Schulten. 1996. "VMD: Visual Molecular Dynamics." *Journal of Molecular Graphics* 14(1):33–38.
- Jorgensen, William L., Jayaraman Chandrasekhar, Jeffry D. Madura, Roger W. Impey i Michael L. Klein. 1983. "Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water." *The Journal of Chemical Physics* 79(2):926–35.
- Kragh-Hansen, U. 1981. "Molecular Aspects of Ligand Binding to Serum Albumin." *Pharmacological Reviews* 33(1):17–53.
- Krieger, Elmar i Gert Vriend. 2014. "YASARA View - Molecular Graphics for All Devices - from Smartphones to Workstations." *Bioinformatics (Oxford, England)* 30(20):2981–82.
- Li, Hui, Andrew D. Robertson i Jan H. Jensen. 2005. "Very Fast Empirical Prediction and Rationalization of Protein PK a Values." *Proteins: Structure, Function and Genetics* 61(4):704–21.
- Maier, James A., Carmenza Martinez, Koushik Kasavajhala, Lauren Wickstrom, Kevin E.

- Hauser i Carlos Simmerling. 2015. “Ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from Ff99SB.” *Journal of Chemical Theory and Computation* 11(8):3696–3713.
- Merlot, Angelica M., Danuta S. Kalinowski i Des R. Richardson. 2014. “Unraveling the Mysteries of Serum Albumin—more than Just a Serum Protein.” *Frontiers in Physiology* 5.
- Morais, Victor i Hugo Massaldi. 2012. “A Model Mechanism for Protein Precipitation by Caprylic Acid: Application to Plasma Purification.” *Biotechnology and Applied Biochemistry* 59(1):50–54.
- Nicholson, J. P., M. R. Wolmarans i G. R. Park. 2000. “The Role of Albumin in Critical Illness.” *British Journal of Anaesthesia* 85(4):599–610.
- Nickolls, John, Ian Buck, Michael Garland i Kevin Skadron. 2008. *Scalable Parallel PROGRAMMING*.
- Salentinig, Stefan, Stephanie Phan, Tamim A. Darwish, Nigel Kirby, Ben J. Boyd i Elliot P. Gilbert. 2014. “PH-Responsive Micelles Based on Caprylic Acid.” *Langmuir* 30(25):7296–7303.
- Sogami, Masaru, Seichi Era, Shunji Nagaoka i Hiroshi Inouye. 1982. “Circular Dichroic and Fluoropolarimetric Studies on Tryptophyl Residues in Acid-induced Isomerization of Bovine Plasma Albumin.” *International Journal of Peptide and Protein Research* 19(3):263–69.
- T.Peters. 1995. *All about Albumin*. Academic Press.
- Trapp, Anja, Alexander Faude, Natalie Hörold, Sven Schubert, Sabine Faust, Thilo Grob i Stefan Schmidt. 2018. “Multiple Functions of Caprylic Acid-Induced Impurity Precipitation for Process Intensification in Monoclonal Antibody Purification.” *Journal of Biotechnology* 279(April):13–21.
- Wang, Junmei, Wei Wang, Peter A. Kollman i David A. Case. 2006. “Automatic Atom Type and Bond Type Perception in Molecular Mechanical Calculations.” *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 25(2):247–60.

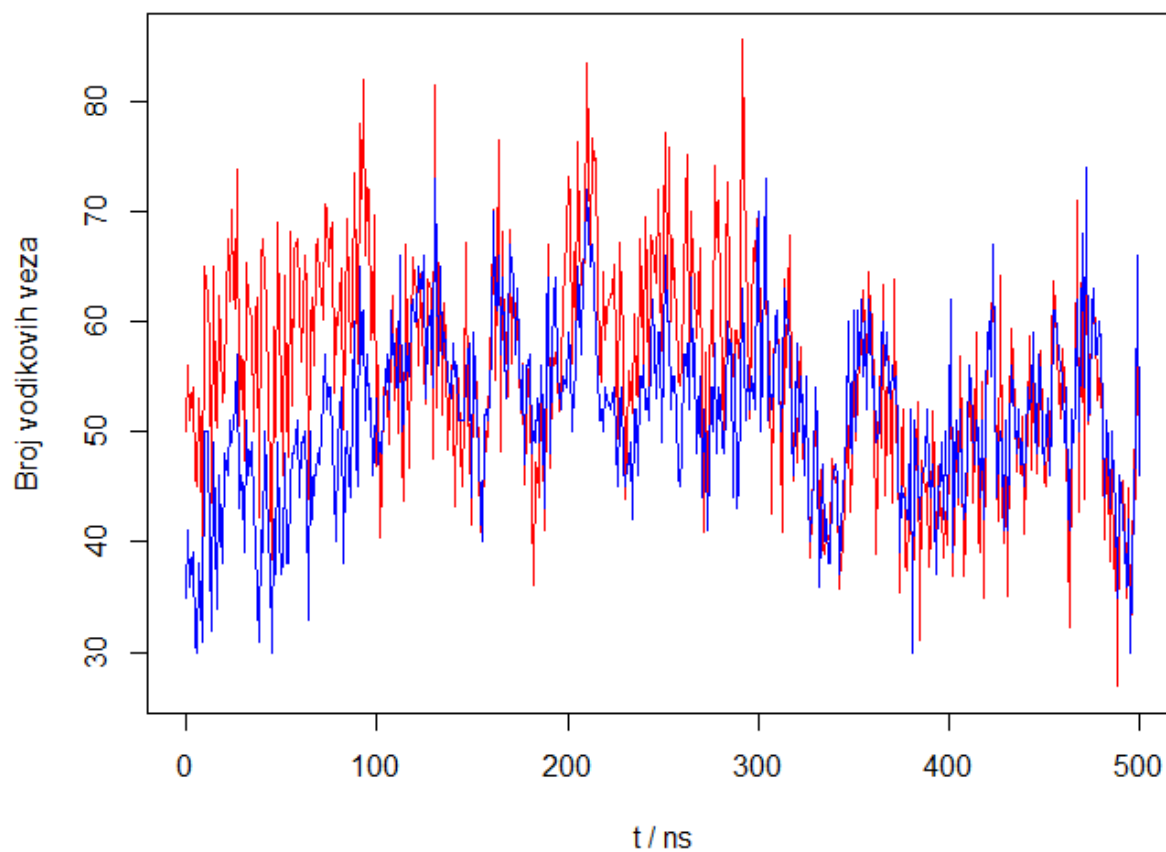
Wardell, M., Z. Wang, J. X. Ho, J. Robert, F. Ruker, J. Ruble i D. C. Carter. 2002. "The Atomic Structure of Human Methemalbumin at 1.9 Å." *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 291:813–19.

URL1: The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.23, Schrödinger, LLC., dostupno na <https://pymol.org/2/> (3.12.2019)

## Prilog

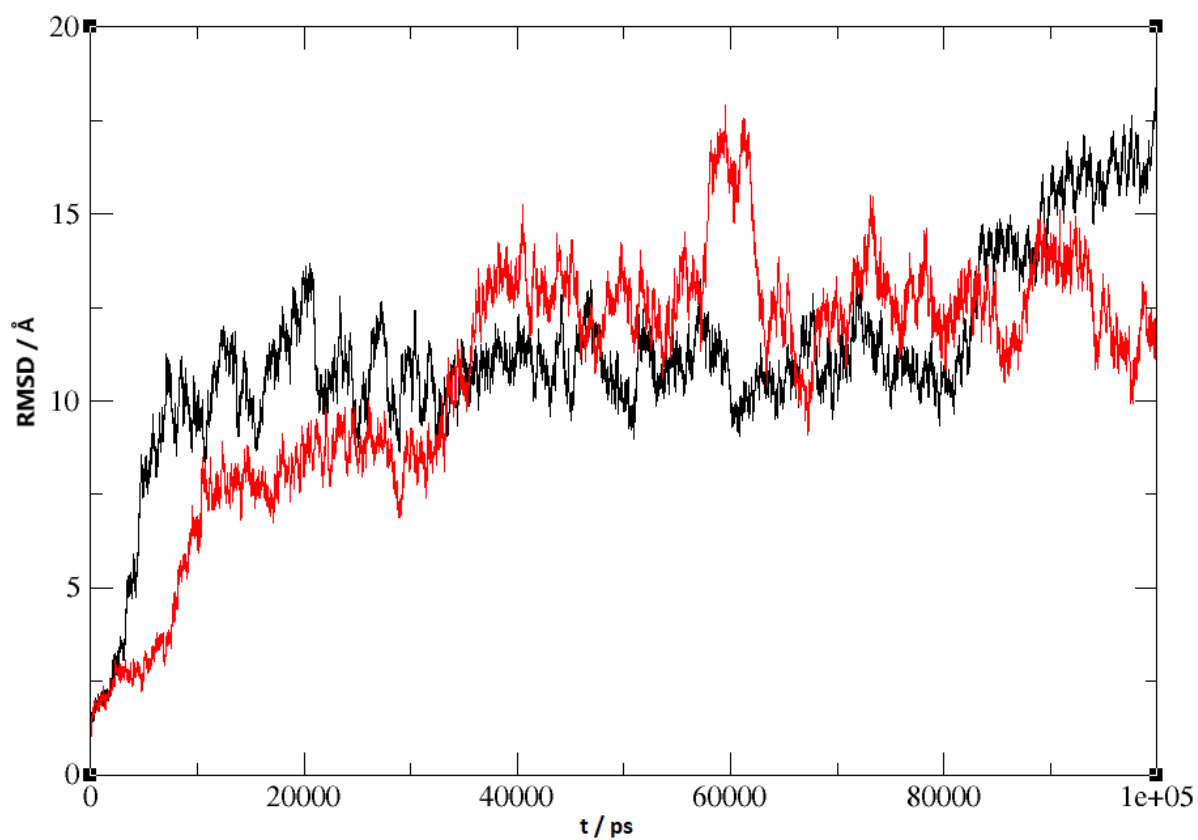


Slika P1. Broj vodikovih veza između HSA i molekula kaprilne kiseline u sustavu pri pH 6,5 (plavo) i sustavu pri pH 4,0 (crveno). U oba prikazana sustava molekule kiseline postavljene su u pravilnu sferu na jednaku udaljenost od centra mase proteina nakon čega su neke od molekula kiseline premještene u potencijalna mjesta interakcije

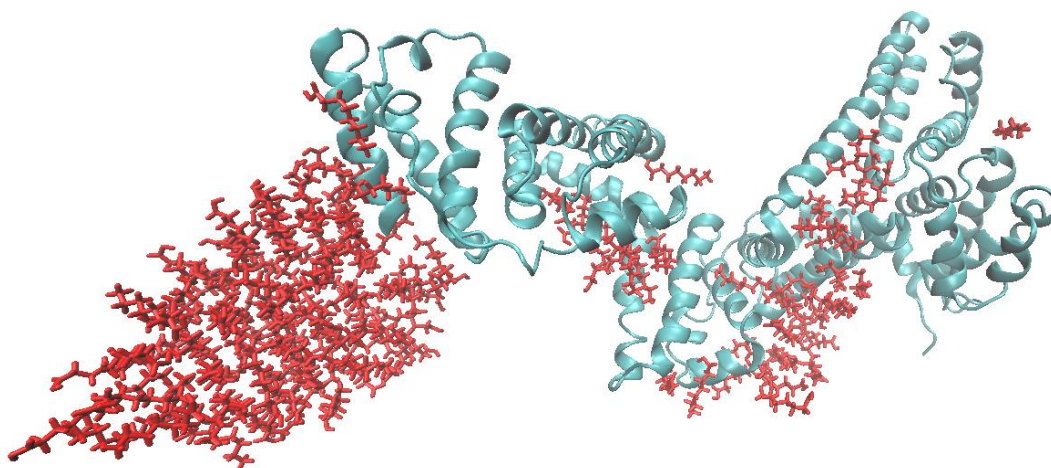


Slika P2. Broj vodikovih veza između HSA i molekula kaprilne kiseline u sustavima u kojima je kao početna konformacija korištena finalna konformacija iz simulacija pri pH 4,0. Plavom bojom su označen vrijednosti za sustav u kojem su molekule kaprilne kiseline raspoređene u pravilnu sferu, a crveno vrijednosti za sustav u kojem su ručno raspoređene na potencijalna mjesta interakcije.





Slika P3. RMSD vrijednosti kroz 100 ns simulacija molekularne dinamike sustava HSA i kaprilne kiseline. Crveno; molekule kaprilne kiseline postavljene u sferu oko HSA pri pH 4,0, crveno; molekule kaprilne kiseline ručno postavljene oko HSA pri pH 4,0.



Slika P4. Konformacija HSA i raspored 155 molekula kaprilne kiseline nakon 100 ns simulacije molekularne dinamike, pri pH 4,0 s ručno postavljenim molekulama kiseline na početku simulacije.

## **Životopis**

Bruno Srezović Bijelić je rođen 15. lipnja 1995. godine u Zagrebu. Od 2014. godine studira na Biološkom odsjeku Prirodoslovno–matematičkog fakulteta u Zagrebu. Preddiplomski studij završava 2017. godine sa završnim radom „Suživot virusa i čovjeka - HHV-1 i potvrda migracijskih puteva suvremenog čovjeka“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Dijane Škorić. Iste godine upisuje diplomski studij molekularne biologije. U toku studija obavlja posao demonstratora na kolegijima Organska kemija, Fizikalna kemija i Bakteriologija i virologija.

Izvan akademskih obaveza član je hrvatske lacrosse reprezentacije i lacrosse kluba Varaždin Royals. S hrvatskom lacrosse reprezentacijom sudjeluje na svjetskom lacrosse prvenstvu u Netanyi 2018, što je prvo sudjelovanje hrvatske reprezentacije na velikim međunarodnim natjecanjima.