

# Uloga mitohondrijskih proteina raspredanja u mehanizmu prijenosa protona kroz unutrašnju mitohondrijsku membranu

---

Škulj, Sanja

Doctoral thesis / Disertacija

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:217:020937>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-30**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Sanja Škulj

**Uloga mitohondrijskih proteina rasporezanja u  
mehanizmu prijenosa protona kroz unutrašnju  
mitohondrijsku membranu**

DOKTORSKI RAD

Mentor:  
dr. sc. Mario Vazdar

Zagreb, 2020





University of Zagreb  
FACULTY OF SCIENCE

Sanja Škulj

**The Role of Uncoupling Proteins in the Proton  
Transfer Mechanism Across the Inner Mitochondrial  
Membrane**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:  
Dr. Mario Vazdar

Zagreb, 2020





Ova disertacija izrađena je u *Laboratoriju za kemiju u modelnim biološkim sustavima Zavoda za organsku kemiju i biokemiju* Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Maria Vazdara u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Fizikalne kemije pri Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Računi su izvedeni na lokalnim radnim stanicama u sklopu *Laboratorija za kemiju u modelnim biološkim sustavima Zavoda za organsku kemiju i biokemiju* Instituta Ruđer Bošković, računalnom serveru Isabella u sklopu Sveučilišnog računskog centra (SRCE) Sveučilišta u Zagrebu, te na računalnim klasterima u Švedskoj (KTH PDC u Stockholmu).



*Ovim putem htjela bih se ponajprije zahvaliti mentoru, voditelju projekta i laboratorija, a iznad svega vrhunskom znanstveniku i čovjeku dr. sc. Mariu Vazdaru za nesebičnu potporu, profesionalno vođenje disertacije kao i znanstveno usavršavanje, strpljivost i odmjerenost u svemu, a ponajviše hvala na prenesenom znanju, svim raspravama i kritičkim promišljanjima.*

*Također veliko hvala i svima sa Sveučilišnog računskog centra (SRCE) koji su svojom tehničkom potporom omogućili izvođenje većine računa objavljenih u disertaciji. Hvala dr. sc. Katarini Vazdar i grupi profesorice Elene Pohl na eksperimentalnim rezultatima, kao i svim ostalim kolegama, pogotovo dr. sc. Zlatku Brkljači na svojoj pomoći i savjetima te dr. sc. Danijeli Bakarić.*

*Hvala učitelju kemije Marinku Milošu za pobuđivanje zanimanja za kemiju te dr. sc. Marku Rožmanu na uvođenju u svijet znanosti. Veliko hvala i mojim kolegama doktorandima s kojima je bilo lakše prolaziti ovaj put.*

*I na kraju, najveće hvala mojoj obitelji i prijateljima, ponajprije roditeljima Ružici i Ivici, bratu Josipu i sestri Gabrieli, bez kojih ništa od ovoga ne bi bilo moguće.*

*Sve mogu u Onome koji me jača.  
Sanja*



## Sadržaj

<b>SAŽETAK</b> .....	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XIII</b>
<b>§ 1. POPIS OZNAKÂ I KRATICÂ</b> .....	<b>1</b>
<b>§ 2. UVOD</b> .....	<b>4</b>
2.1. Cilj i hipoteze rada .....	4
2.2. Opseg i metode rada .....	4
<b>§ 3. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>6</b>
3.1. Transmembranski gradijent protona.....	6
3.2. Uloga proteina transportera u prijenosu protona.....	10
3.3. Uloga masnih kiselina u prijenosu protona potpomognutom proteinima AAC i UCP2 .....	18
3.4. Postojeći modeli prijenosa protona kroz UMM .....	19
3.5. Utjecaj oksidativnog stresa na prijenos protona .....	22
<b>§ 4. TEORIJSKA OSNOVA I RAČUNALNE METODE</b> .....	<b>26</b>
4.1. Teorijska osnova .....	26
4.2. Računalne metode .....	35
<b>§ 5. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>47</b>
5.1. Prijenos protona kroz unutarnju mitohondrijsku membranu .....	47
5.2. Uloga mitohondrijskog proteina raspredanja 2 (UCP2) u prijenosu protona kroz unutarnju mitohondrijsku membranu.....	57
5.3. Utjecaj oksidativnog stresa na prijenos protona kroz unutarnju mitohondrijsku membranu.....	85
<b>§ 6. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>111</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI</b> .....	<b>115</b>
<b>§ 8. DODATAK</b> .....	<b>121</b>
<b>§ 9. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA</b> .....	<b>139</b>





Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Doktorska disertacija

## SAŽETAK

Uloga mitohondrijskih proteina raspredanja u mehanizmu prijenosa protona kroz unutrašnju mitohondrijsku membranu

Sanja Škulj  
Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb

Prijenos protona kroz unutrašnju mitohondrijsku membranu dio je povezanih lančanih mehanizama koji su važni za normalno usklađeno funkcioniranje organizma. Većinski dio prijenosa protona odvija se uz pomoć transmembranskih proteina ADP/ATP translokatora (AAC) i mitohondrijskih proteina raspredanja (UCP1-5). U radu je naglasak stavljen na mitohondrijski protein raspredanja 2 (UCP2) za koji je predložena tercijarna struktura, a čija glavna uloga je kontrola oksidativnog stresa u organizmu. Uz protein za prijenos protona potrebna je i dugolančana masna kiselina koja se uz malu energetska barijeru translocira kroz unutrašnju mitohondrijsku membranu u neutralnoj formi, dok je povratak anionske forme potpomognut proteinom. Drugi dio istraživanja vezan je uz utjecaj oksidativnog stresa gdje je detaljno opisana modelna reakcija produkata lipidne peroksidacije reaktivnih aldehida 4-hidroksi-2-nonenala (HNE-a) i 4-okso-2-nonenala (ONE-a) s reaktivnim aminokiselinama iz proteina – lizinom, argininom, histidinom i cisteinom te fosfatidiletanolaminskim (PE) lipidom koji je sastavni dio unutarnje mitohondrijske membrane.

(140 stranica, 72 slike, 5 tablica, 131 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: transmembranski proteini/ UCP2 protein/ prijenos protona/ masne kiseline/ oksidativni stres/ MD simulacije/ QM računi/

Mentor: dr. sc. Mario Vazdar, v. zn. sur., IRB, Zagreb

Rad prihvaćen: 9. rujna 2020.

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša, PMF, Zagreb
2. dr. sc. Davor Margetić, zn. savj., IRB, Zagreb
3. dr. sc. Borislav Kovačević, v. zn. sur., IRB, Zagreb







University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Doctoral Thesis

## ABSTRACT

The Role of Uncoupling Proteins in the Proton Transfer Mechanism Across the Inner Mitochondrial Membrane

Sanja Škulj

Ruder Bošković Institute, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb

Proton transfer across the inner mitochondrial membrane is part of the related chain mechanisms that are important for normal functioning of the organism. Majority of proton transfers are mediated by transmembrane protein ADP/ATP translocator (AAC) and via mitochondrial uncoupling proteins 1-5 (UCP1-5). This thesis focuses primarily on mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) for which we proposed a tertiary structure, and whose main role is control of the oxidative stress in the body. In addition to the protein accommodating proton transfer, this process requires a presence of a long chain fatty acid, which is translocated through the inner mitochondrial membrane in its neutral form with a small energy barrier. Fatty acid returns to the cytosolic side of the membrane in its anionic form and this passage is supported by the protein. The second part of the research is related to the influence of oxidative stress, where we describe in detail the model reactions of two lipid peroxidation products, i.e. reactive aldehydes 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) and 4-oxo-2-nonenal (ONE), with reactive amino acids from proteins, namely lysine, arginine, histidine and cysteine as well as phosphatidylethanolamine (PE) lipid which is a constitutive part of inner mitochondrial membrane.

(140 pages, 72 figures, 5 tables, 131 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: transmembrane proteins/ UCP2 protein/ proton transfer/ fatty acids/ oxidative stress/ MD simulations/ QM calculations

Supervisor: Dr. Mario Vazdar, Senior Research Associate, RBI, Zagreb

Thesis accepted: 9.9.2020

Reviewers:

Dr. Branimir Bertoša, Associate Professor, FOS, Zagreb

Dr. Davor Margetić, Senior Scientist, RBI, Zagreb

Dr. Borislav Kovačević, Senior Research Associate, RBI, Zagreb



## § 1. POPIS OZNAKÂ I KRATICÂ

**AAC protein** – eng. *ADP/ATP carrier / Adenine Nucleotide Translocator*; ADP/ATP translokator / translokator nukleotida adenina

**BA kiselina** – eng. *bongkreki acid*; bongkrekinska kiselina

**c-strana** – citosol strana

**c-struktura** – struktura proteina otvorena prema citosolu

**CC metoda** – eng. *coupled cluster*; metoda spregnutih klastera

**CDL** – eng. *cardiolipin*; kardiolipin

**CG simulacije** – eng. *coarse grain*; simulacije krupnog zrna

**CI** – eng. *configurational interaction*; konfiguracijska interakcija

**DFT teorija** – eng. *density functional theory*; teorija funkcionala gustoće

**DOPE** – eng. *1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine*; 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamin

**DOPC** – eng. *1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*; 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfokolin

**DOPE energija** – eng. *discrete optimized protein energy*; diskretna optimizirana energija proteina

**EGTA** – eng. *ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*; etilen glikol-bis(β-aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraoctena kiselina

**ESI** – eng. *electrospray ionisation*; ionizacija elektrosprejem

**GGA aproksimacija** – eng. *generalized gradient approximation*; aproksimacija generaliziranog gradijenta

**HHE** – 2-hidroksi-2-heksenal

**HNE** – 4-hidroksi-2-nonenal

**IRC računi** – eng. *intrinsic reaction coordinate*; račun reakcijske koordinate

**LC-MS kromatografija** – eng. *liquid chromatography-mass spectrometry*; tekućinska kromatografija u kombinaciji s masenom spektrometrijom

**LDA aproksimacija** – eng. *local density approximation*; aproksimacija lokalne gustoće

**m-strana** – matriks strana

---

- 
- m-struktura** – struktura proteina otvorena prema matriksu
- MCF** – eng. *mitochondrial carrier family*; porodica mitohondrijskih nosača
- MD simulacije** – eng. *molecular dynamics*; simulacije molekulske dinamike
- MDA** – malonaldehid
- MES** – eng. *2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid*; 2-(N-morfolin)etansulfonska kiselina
- MM** – eng. *molecular mechanics*; molekulska mehanika
- NMR** – eng. *nuclear magnetic resonance*; nuklearna magnetska rezonancija
- ONE** – 4-okso-2-nonenal
- PBC** – eng. *periodic boundary conditions*; periodični rubni uvjeti
- PC** – eng. *principal components*; glavne komponente u PCA analizi **ZI** – eng. *zwitterion*; dvojni ion
- PCA** – eng. *principal components analysis*; analiza glavnih komponenata
- PDB baza podataka** – eng. *Protein Data Bank*; baza podataka proteina
- PG** – eng. *PhosphatidylGlycerol*; fosfatidilglicerol
- PE** – eng. *PhosphatidylEthanolamine*; fosfatidiletanolamin
- PME** – eng. *particle mesh Ewald*; Ewaldova sumacija
- PMF** – eng. *potential of mean force*; potencijal srednje sile
- POPE** – eng. *1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-glycero-3-PhosphoEthanolamin*; 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamin
- QM račun** – eng. *quantum-mechanics*; kvantno-mehanički račun
- REUS tehnika** - eng. *replica exchange umbrella sampling*; tehnika temperaturne izmjene *umbrella sampling*
- RMSD analiza** – eng. *root-mean-square deviation*; analiza srednjeg korijenskog kvadratnog odstupanja
- RMSF analiza** – eng. *root-mean-square fluctuation*; analiza fluktuacija ili analiza srednje korijenske kvadratne promjene
- ROS** – eng. *reactive oxygen species*; reaktivne kisikove vrste
- SCF** – eng. *self-consistent field*; kriterij samousklađenosti
- SLC25** – eng. *solute carrier family 25*; porodica nosača otopljene tvari 25
- SP račun** – eng. *single point*; račun energije u jednoj točki, odnosno konformaciji
-

**TRIS** – eng. *tris(hydroxymethyl)aminomethane*; tris(hidroksimetil)aminometan

**TS** – eng. *transition state*; prijelazno stanje

**TST** – eng. *transition state theory*; teorija prijelaznog stanja

**UCP1-5 proteini** – eng. *UnCoupling Proteins*; mitohondrijski proteini rasprezanja 1-5

**UCP2 protein** – eng. *UnCoupling protein 2*; mitohondrijski protein rasprezanja 2

**UMM** – eng. *inner mitochondrial membrane*; unutarnja mitohondrijska membrana

**VMM** – eng. *outer mitochondrial membrane*; vanjska mitohondrijska membrana

**WHAM analiza** – eng. *weighted histogram analysis method*; metoda analize ponderiranih histograma

**WT protein** – eng. *wild type*; divlji tip proteina

---

## § 2. UVOD

### 2.1. Cilj i hipoteze rada

Usljed transmembranskog gradijenta protona dolazi do prijenosa protona iz mitohondrijskog međustaničnog prostora – citosola u mitohondrijski matriks kroz unutarnju mitohondrijsku membranu (UMM). Za prijenos protona nužne su dugolančane masne kiseline koje zajedno s transmembranskim proteinima, ADP/ATP translokatorom (AAC) i mitohondrijskim proteinima rasprezanja (UCP1-5), sudjeluju u regulaciji transmembranskog gradijenta protona. Navedeni proteini indirektno prijenosom aniona masne kiseline kataliziraju prijenos protona kroz UMM. Reaktivni aldehidi (RA) koji su produkti oksidativnog stresa lako reagiraju s lipidima u membrani i aminokiselinama iz membranskih proteina uzrokujući različite modifikacije. U ovom radu opisan je mitohondrijski protein rasprezanja 2 (UCP2) koji zajedno s masnim kiselinama može prenositi protone, a ujedno je i regulator oksidativnog stresa.

Budući da detalji mehanizma prijenosa protona kroz UMM nisu poznati, kao ni detalji mehanizma reakcije RA s aminokiselinama iz proteina, cilj disertacije je objasniti mehanizam prijenosa protona kroz membranu putem UCP2 proteina i masnih kiselina, te proučiti utjecaj oksidativnog stresa na taj mehanizam.

Tri glavne hipoteze za postavljeni cilj su dane u nastavku, a početna je da se prijenos protona iz mitohondrijskog međumembranskog prostora u mitohondrijski matriks kroz UMM zbiva uz pomoć neutralnih dugolančanih masnih kiselina. Druga anticipira da UCP2 protein katalizira povratak aniona masne kiseline iz matriksa kroz membranu u međumembranski prostor putem smanjenja slobodne energije. Zadnja hipoteza je da RA koji su produkti oksidativnog stresa, uzrokuju modifikacije lipida i aminokiselina UCP2 proteina čime utječu na mehanizam prijenosa protona kroz membranu.

### 2.2. Opseg i metode rada

Kako bi opisali navedene mehanizme prijenosa protona kroz UMM i reakcije RA s aminokiselinama iz proteina na molekulskoj razini, korištene su različite tehnike molekuskog modeliranja čije smo rezultate usporedili s dostupnim eksperimentalnim rezultatima

provedenim pri normalnim i uvjetima oksidativnog stresa. Kako bi opisali navedene mehanizme, ovisno o složenosti i zahtjevnosti bioloških sustava koristili smo simulacije molekulske dinamike (eng. *molecular dynamics*, MD) i kvantno-mehaničke (eng. *quantum-mechanics*, QM) račune.

MD simulacije upotrijebljene su u proučavanju prijenosa neutralnih i anionskih formi dugolančanih masnih kiselina i UCP2 proteina gdje je svaki atom tretiran eksplicitno (eng. *all atom*). U računima Gibbsove energije prolaska masnih kiselina kroz fosfolipidni dvosloj korištena je tehnika *umbrella sampling*. Za fiziološki relevantnu strukturu UCP2 proteina na kojoj su provedene daljnje simulacije vezane uz prijenos protona i aniona masne kiseline, uspoređene su simulacije objavljene NMR strukture UCP2 proteina koja se nalazi u PDB bazi podataka proteina (eng. *Protein Data Bank*) pod kodom 2LCK i homološki modelirana primarna sekvenca UCP2 proteina na terciarnu strukturu AAC proteina (PDB kod: 1OKC).

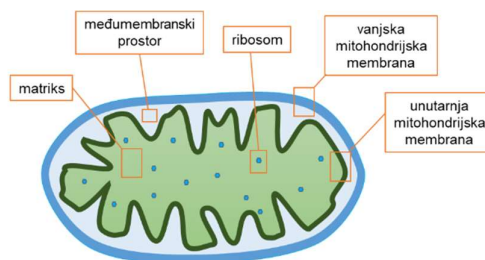
Modelni mehanizmi reakcije RA HNE-a i ONE-a i reaktivnih aminokiselina lizina, arginina, histidina i cisteina, kao i fosfatidiletanolaminskim (PE) lipidom, provedeni su QM računima te su na temelju izračunatih energija struktura minimuma i prijelaznih stanja predloženi detaljni mehanizmi reakcija. Nivo teorije korišten u optimizaciji struktura je teorija funkcionala gustoće (eng. *density functional theory*, DFT), te smo koristili najčešće i najšire primjenjivi hibridni funkcional B3LYP kombiniran s Popleovim osnovnim baznim skupom 6-31G(d) u različitim implicitnim SMD otapalima koja „imitiraju“ različitost okoliša u membranskim sustavima. Odredili smo i utjecaj eksplicitnog otapala na reakcijske barijere gdje molekule vode eksplicitno sudjeluju u samoj reakciji, tj. prijelaznom stanju. *Single point* (SP) računi dobiveni su na post Hartree-Fock *ab initio* Møller-Plesset perturbacijskoj teoriji (MP2 metoda) s osnovnim baznim skupom 6-311++G(d,p). Strukture prijelaznog stanja potvrđene su IRC računima (eng. *intrinsic reaction coordinate*, IRC) i frekvencijskom analizom, a strukture reaktanata i produkata dobivene su pomakom po vibracijskom modu odgovornom za imaginarnu frekvenciju prijelaznog stanja. Dobivene optimizirane strukture minimuma potvrđene su vibracijskom analizom. Teorijski rezultati uspoređeni su s eksperimentalno dobivenim rezultatima. Proučen je i utjecaj modificiranih lipida na prijenos protona masnim kiselinama MD simulacijama. Nakon analize svih računa i simulacija navedenih modelnih sustava te usporedbom s eksperimentalnim rezultatima, predložen je najvjerojatniji mehanizam koji objašnjava prijenos protona kroz unutarnju mitohondrijsku membranu.



## § 3. LITERATURNI PREGLED

### 3.1. Transmembranski gradijent protona

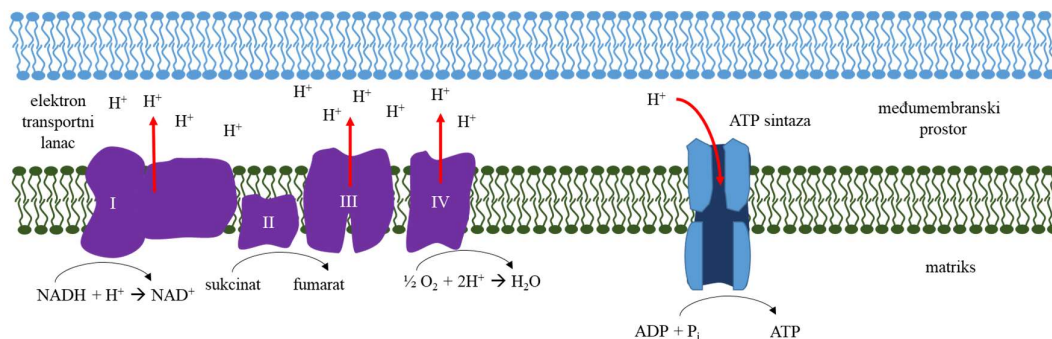
Transmembranski gradijent protona osnovna je pokretačka sila u živom organizmu kojom se generira energija potrebna za funkciju i rad organizma. Pravilan rad navedenog procesa utječe na funkcioniranje organizma i lančano povezane biološke procese te je stoga poznavanje transmembranskog gradijenta protona važno za objašnjenje niza povezanih bioloških procesa. Stanični organel mitohondrij (slika 1) koji se nalazi u citoplazmi eukariotske stanice je glavni proizvođač i izvor energije u organizmu koji je povezan s respiratornim sustavom preko elektrokemijskog gradijenta protona. Vanjska membrana mitohondrija (VMM) je propusnija od unutarnje membrane mitohondrija (UMM) koja je impermeabilna za većinu nabijenih i neutralnih malih molekula. Ova membrana ima zakrivljenu i veliku površinu koja dijeli različite okoline međumembranskog prostora i matriksa, a u kojoj se događaju važni biološki procesi koje pokreću membranski proteini<sup>1</sup> i kompleksi koji reguliraju navedene procese što je opisano u nastavku.<sup>2</sup>



Slika 1. Shematski prikaz mitohondrija i sastavnih dijelova mitohondrija

Iznimno važan biološki proces u kojemu dolazi do redukcije kisika u vodu događa se u elektron transportnom lancu (ETL) koji se sastoji od četiri kompleksa proteina I-IV (slika 2).<sup>3</sup> Tu elektroni iz kofaktora nikotinamid adenin dinukleotida (NADH) i flavin adenin dinukleotida (FADH<sub>2</sub>) reduciraju kisik u vodu preko elektron transportnog sustava proteina pri čemu se oslobađa energija kojom se pumpaju protoni u međumembranski prostor. Za pumpanje protona u međumembranski prostor su odgovorni kompleksi proteina I, III i IV pri čemu se stvara razlika u koncentraciji protona na dvije strane membrane – protonski gradijent koji je okidač daljnjih procesa. Protonski gradijent ( $\Delta p$ ) u UMM se sastoji od dvije komponente, električne ( $\Delta \Psi_m$ ) i kemijske ( $\Delta pH$ ).<sup>3</sup> U UMM se nastali gradijent protona koristi kako bi se sintetizirale

osnovne jedinice energije organizma, adenzin trifosfati (ATP) iz adenzin difosfata (ADP) i piruvata ( $P_i$ ) u matriksu procesom zvanim oksidativna fosforilacija, a sama sinteza se odvija pomoću rotirajućeg membranskog proteinskog kompleksa ATP-sintaze koji se sastoji od dvije podjedinice (F<sub>0</sub> i F<sub>1</sub>) što se može vidjeti na slici 2. Mitchell je prvi 1961. kemiosmotskom teorijom povezo da se protoni iz nastalog gradijenta protona koriste za proizvodnju ATP-a<sup>4</sup> za što je 1971. dobio Nobelovu nagradu "za doprinos razumijevanju transfera biološke energije formulacijom kemiosmotske teorije".



Slika 2. Shematski prikaz kemiosmotske teorije gdje se putem elektron transportnog lanca (proteinski kompleksi I-IV) i redukcijom kisika pumpaju protoni u međumembranski prostor od kojih se najveći dio troši za sintezu ATP-a iz ADP-a ATP-sintazom.

Nastale molekule ATP-a se prenose iz matriksa kroz UMM u ostale dijelove organizma pomoću proteina ADP/ATP translokatora (AAC; eng. *ADP/ATP carrier*). Nakon što se energija utroši na potrebnom mjestu u organizmu, disocirani ADP još jednom se transportira kroz UMM pomoću već navedenog AAC proteina, ovaj put u matriks, gdje ponovno počinje sinteza ATP-a, čime se čitav ciklus ponavlja.<sup>5</sup>

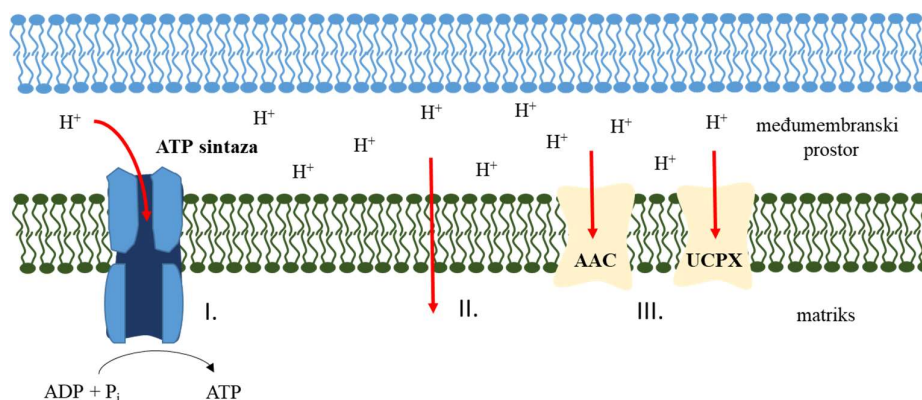
### 3.1.1. Curenje protona

Kao što je već navedeno, preko elektron transportnog sustava stvara se transmembranski protonski gradijent koji se koristi za sintezu jedinica energije ATP-a, a taj proces bio bi potpuno povezan (eng. *coupled*) kada bi se svi protoni u transmembranskom gradijentu koristili za sintezu ATP-a, kao i svi elektroni u ETL za redukciju kisika. Međutim, dio protona svejedno može proći UMM čime se ti protoni razdvajaju od oksidativne fosforilacije (eng. *uncoupling*) čime je omogućeno prilagođavanje energetskeg metabolizma radi regulacije metaboličke homeostaze i održavanja tjelesnih funkcija kao što su termogeneza, održavanje protoka ugljika

i moduliranje hranjivih tvari.<sup>2</sup> Upravo su zbog tog razdvajanja protona od sinteze ATP-a UCP1-5 proteini (eng. *UnCoupling Proteins* - UCP) dobili ime, iako njihova specifična uloga u organizmu nije u potpunosti razjašnjena.<sup>6-8</sup> Međutim, poznato je da UCP1 protein ima fiziološku ulogu reguliranja proizvodnje topline u masnom smeđem tkivu sisavaca.<sup>6</sup> U literaturi se navodi da uz UCP proteine i AAC protein sudjeluje u prijenosu protona uz svoju primarnu ulogu transporta ATP-a i ADP-a.<sup>3</sup>

Ravnotežnu razliku koncentracije protona van i unutar membrane je ključno održavati, te ukoliko se tijekom elektron transportnog lanca pumpa više protona u međumembranski prostor nego što ih se troši za sintezu ATP-a, povećava se razlika u koncentracijskom gradijentu protona. Kako bi se smanjio stres na membranu tada dolazi do tzv. curenja elektrona iz ETL-a, ranije opisanog oksidativnog metabolizma, zbog čega se umanjuje redukcija kisika u vodu, čime se smanjuje pumpanje protona i posljedično transmembranski gradijent protona. Curenjem elektrona proizvode se nusprodukti – superoksidi, zbog kojih nastaju unutarstanične reaktivne kisikove vrste (eng. *reactive oxygen species*, ROS), a čija povećana koncentracija može dovesti do oksidativnog stresa, oštećenja stanica i posljedično brojnih bolesti što je detaljnije objašnjeno kasnije.<sup>2</sup> Nastanak navedenih štetnih specija najviše ovisi o razlici potencijala, odnosno transmembranskom gradijentu protona, a kao stanični odgovor na ovaj fenomen se javljaju putevi propuštanja protona kroz UMM, točnije „curenje protona” (eng: *proton leak*).<sup>9,10</sup> Tijekom curenja protona dolazi do vodljivosti protona kroz UMM koja ne slijedi Ohmov zakon ( $R=U/I$ ), tj. povećanjem električnog gradijenta protona ( $\Delta\Psi_m$ ) povećava se vodljivost protona eksponencijalno, a ne linearno. Time se regulira i smanjuje navedeno oksidativno oštećenje i štiti UMM od električnog šoka. Kinetika prijenosa protona može se mjeriti tako da se simultano mjeri respiracija i membranski mitohondrijski potencijal.<sup>3</sup> Curenje protona, odnosno proton gradijent ( $\Delta p$ ) se povećava kada je ATP-sintaza inhibirana oligomicinom čime se smanjuje fosforilacija. Broj protona koje koristi ATP-sintaza, odnosno efikasnost kod hepatocita u većini vrsta (ektotermnih i endotermih) je ~ 80 %. Uloga curenja protona je prilagodba energetike metabolizma kako bi se regulirala metabolička homeostaza i održala tjelesna funkcija dok u specifičnim tipovima stanica uloga curenja protona uključuje i termogenezu, održavanje protoka ugljika unatoč maloj potražnji ATP-a i moduliranje odgovora nutrijenata u stanicama osjetljivim na glukozu.

Curenje protona kroz membranu, odnosno odvajanje protona od ATP-sintaze (slika 3 pod I), može biti bazalno (konstitutivno) i regulirano (inducibilno) (slika 3 pod II i III).<sup>3,9</sup>



Slika 3. Najveći dio nastalog proton gradijenta troši se za sintezu ATP-a (I.). Ostatak je tzv. „curenje protona” koje može biti bazalno (II.) i regulirano (III.) transmembranskim proteinima UCP1-5 i AAC proteinom.

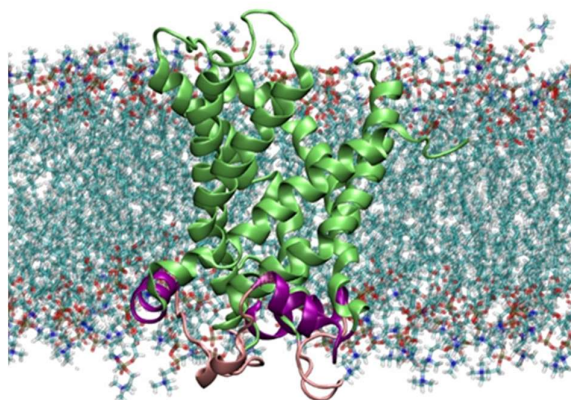
Bazalno curenje protona je direktan nekontrolirani prijenos kroz UMM te je njegova uloga regulacija protonskog gradijenta, a najveći dio ide preko proteina – mitohondrijskih prijenosnika aniona. U literaturi se uglavnom navodi da je to AAC protein, dok se manji dio, ~ 5 % bazalnog prijenosa protona, prenosi direktno kroz fosfolipidni dvosloj. Uz AAC protein, ponekad se u literaturi navodi da i UCP1 protein može doprinijeti bazalnom prijenosu. Ovaj tip prijenosa protona je specifičan za svaki tip stanice i korelira s bazalnom metaboličkom brzinom u mirovanju – što je brzina manja to je bazalni prijenos protona manji.<sup>3</sup>

Za razliku od bazalnog, regulirano curenje protona je značajno kompleksnije, a upravljano je transmembranskim proteinima AAC i UCP1-5 koji ovaj prijenos reguliraju nužno potpomognuti dugolančanim masnim kiselinama, a ovisno o specifičnom proteinu aktivirati ga mogu i superoksidi i/ili produkti peroksidacije.<sup>11</sup> Ovaj cjelokupni proces i mehanizam je precizno reguliran iako još uvijek nije detaljno objašnjen i jasan, dijelom jer je to dio kompleksnih lančano povezanih mehanizama, a dijelom i jer se to događa u UMM čije strukture proteina uglavnom još uvijek nisu riješene upravo zbog heterogenosti i kompleksnosti sustava.<sup>7</sup> U nastavku je objašnjen i prikazan pregled literature o reguliranom prijenosu protona kroz UMM, pregled literature i dosadašnja saznanja o transmembranskim proteinima kao i modeli mehanizma prijenosa protona.<sup>3</sup> Koliko je do sada poznato, većina reguliranog, odnosno induciranog prijenosa protona je katalizirano UCP1-5 proteinima koji kao i AAC pripadaju mitohondrijskim prijenosnicima aniona kojima prijenos protona vjerojatno nije glavna funkcija.<sup>7</sup>

### 3.2. Uloga proteina transportera u prijenosu protona

Proteini transporteri pripadaju porodici mitohondrijskih nosača (eng. *mitochondrial carrier family* – MCF) ili porodici SLC25 (eng. *solute carrier family 25*) proteina koja ovisno o organizmu sadrži otprilike 50 proteina koji posjeduju  $\alpha$ -uzvojnice. U UMM čovjeka postoje 53 takva proteina. Poznato je da svi ovi proteini imaju sličnu strukturu uronjenu u fosfolipidni dvosloj UMM, koja se sastoji od šest  $\alpha$ -uzvojnica (slika 4) i zadržane glavne motive u primarnoj sekvenci koja se ovisno o proteinu, organizmu i tkivu, sastoji od 250-350 aminokiselina.<sup>1,12,13</sup>

međumembranski prostor - citosol



matriks

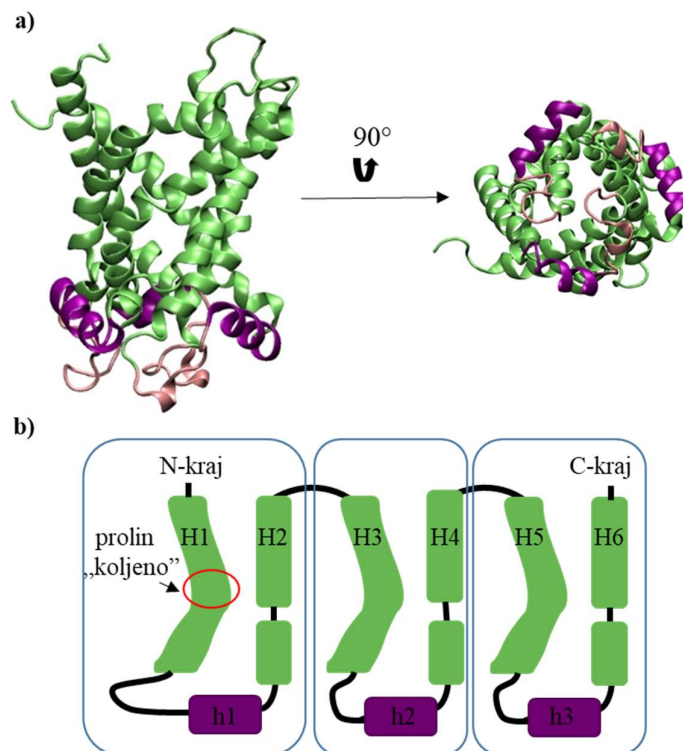
Slika 4. Tipičan položaj SLC25 proteina uronjenog u fosfolipidni dvosloj. Na slici je prikazan AAC protein u lipidnom dvosloju. Molekule vode su izostavljene radi preglednosti slike.

Ovi proteini imaju ukupno šest  $\alpha$ -transmembranskih uzvojnica H1-H6 gdje svaka uzvojnica ima 20–30 aminokiselina i sve uzvojnice imaju karakteristične motive. Tako neparne uzvojnice 1, 3 i 5 imaju očuvane motive PX(D/E)XX(K/R)X(K/R) i  $\pi$ G $\pi$ x $\pi$ G, dok parne uzvojnice 2, 4 i 6 imaju očuvane motive (D/E)GXXXX(W/Y/F)(K/R)G i  $\pi$ xxxx $\pi$ . Primjer tih motiva vidljiv je iz poravnatih primarnih sekvenci humanih proteina AAC i UCP1-5 (slika 5). Iz poravnatih primarnih sekvenci navedenih proteina vidljivo je da je identičnost za navedenih 6 humanih SLC25 proteina tek 9 % (odnosno 33 identične pozicije aminokiselina), a sličnost 20 % (odnosno 67 sličnih pozicija aminokiselina). Unatoč navedenom, većina identičnih i sličnih pozicija aminokiselina je na ključnim mjestima kako bi se očuvali motivi bitni za SLC25 proteine, što je vidljivo na slici 5.





strukture. Navedeno vrijedi i za ostale proteine koji nisu prikazani, a u ovoj su skupini proteina, kao i za proteine ove skupine koji su iz drugih organizama. Svaki protein ima takozvanu pseudo tri simetriju uzvojnica, točnije tri ponavljanja sačuvanih motiva od kojih svaki ima dvije duge transmembranske  $\alpha$ -uzvojnice koje se protežu duž fosfolipidnog dvosloja (slika 6).

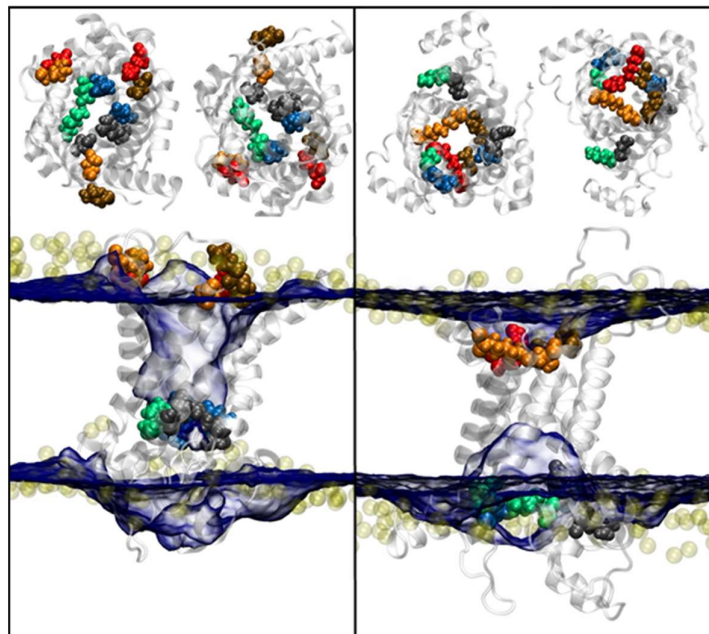


Slika 6. a) Tipična slika SLC25 proteina koji se sastoji od dugih transmembranskih  $\alpha$ -uzvojnica i tri kratke  $\alpha$ -uzvojnice koje povezuju i okomite su na duge uzvojnice. Na ovoj slici prikazan je AAC protein u DOPC lipidu, a radi bolje preglednosti su izostavljeni voda i DOPC lipid. b) U plavom okviru prikazana je jedna ponavljajuća jedinica od koje se sastoje SLC25 proteini – dvije duge i jedne kratke  $\alpha$ -uzvojnice.

Sekundarna struktura ovih proteina su  $\alpha$ -uzvojnice, a u terciarnoj strukturi su gore navedene transmembranske uzvojnice H1-H6 u matriksu (m-strana) povezane trima kratkim  $\alpha$ -uzvojnica h1-h3 koje su okomite na njih. Na slici 6 vidi se da su uzvojnice 2, 4 i 6 duge ravne uzvojnice, a uzvojnice 1, 3 i 5 imaju izraženo „koljeno“, točnije na jednom mjestu promijenjen smjer  $\alpha$ -uzvojnice za što su odgovorne aminokiseline prolina, a rjeđe serini koji su dio prolinskog motiva PX(D/E)XX(K/R) koje stabilizira mreža solnih mostova na m-strani (slika 5) koje ćemo kasnije detaljno analizirati.

Ovi proteini spona su između dvije strane UMM – matriksa i citosola, odnosno međumembranskog prostora, a C- i N- kraj proteina nalaze se u citosolnom dijelu UMM (c-

strana). Njihova glavna uloga je prijenos važnih metabolita, manjih molekula i iona s jedne na drugu stranu membrane pa tako protein može biti „otvoren” na obje strane membrane (ne istovremeno), prema c-strani ili prema m-strani, što je vidljivo na slici 7.



Slika 7. SLC25 proteini mogu biti otvoreni prema citosolu – c-strana (lijevo) ili matriksu – m-strana (desno). Također se može vidjeti kako postoje dvije mreže slanih mostova – s matriks i citosol strane. Kada je formirana mreža s matriks strane – vidljivo na lijevoj slici u plavom, zelenom i sivom VDW prikazu, protein je otvoren na c-strani, a kada je formirana s citosolne strane – vidljivo na desnoj slici u crvenom, narančastom i smeđem VDW prikazu, protein je otvoren na m-strani. Sa slike je također vidljivo kako formirana mreža slanih mostova zadržava vodu i jedan je od glavnih uzroka zašto je protein impermeabilan na vodu. Na ovoj slici prikazan je AAC protein u DOPC lipidu.

Iako proteini prenose različite molekule i ione, mehanizam prijenosa vjerojatno je za sve SLC25 proteine sličan i uključuje koordinaciju svih šest uzvojnica čijim pomakom se otvaraju i zatvaraju naizmjenično c- i m-strana proteina. Svaka strana proteina, matriks i citosol, ima tzv. mrežu solnih mostova (eng. *salt bridge network*) koja se sastoji od tri solna mosta (eng. *salt bridge*) koji zatvaraju protein na jednoj strani i otvoren je prema c- ili m- strani, što se može vidjeti na slici 5 gdje su u sivim okvirima prikazane aminokiseline koje mogu tvoriti mrežu solnih mostova na matriks strani, a u crnim okvirima na citosolnoj strani. Navedena mreža posebno je važna jer zatvara put prolasku vode, odnosno stvara impermeabilnost vode kroz protein iz matriksa u citosol i obrnuto, što se vidi na slici 7 gdje je lijevo protein otvoren prema c-strani, a desno prema m-strani. Svaki protein ima jedinstveno vezno mjesto za supstrat,



a ovisno o proteinu inhibitori prijenosa protona su purinski nukleotidi (ATP, ADP, GTP i GDP), dok su ROS i dugolančane masne kiseline aktivatori prijenosa protona.<sup>12,14</sup>

Poznato je da je strukture membranskih proteina vrlo teško eksperimentalno odrediti<sup>15,16</sup> pa su za ovu skupinu proteina poznate tercijarne strukture za samo dva proteina, UCP2 i AAC proteine, koji su zbog toga opisani i analizirani u ovoj disertaciji. Poseban naglasak stavljen je na UCP2 protein dok se AAC protein najčešće uzima kao referenca i usporedba za UCP2 protein pa su u nastavku dane osnovne informacije i o AAC proteinu.

### 3.2.1. AAC protein

ADP/ATP translokatoru – AAC proteinu (eng. *ADP/ATP Carrier*), koji se još naziva i adenin nukleotid translokator – ANT protein (eng. *Adenine Nucleotide Translocator*) glavna uloga je prijenos ATP-a i ADP-a. Njegova strukturna svojstva i mehanizam transporta intenzivno se istražuju upravo zato što sudjeluje u ciklusu prijenosa jedinica energije, što je ključno za pravilnu funkciju stanice. Posljedično je povezan s ostalim procesima u organizmu koji su direktno ili indirektno povezani s potrošnjom jedinica energije ATP-a. Zato je ovo najpoznatiji i najviše ispitan transmembranski protein u UMM.<sup>17</sup> Glavna uloga AAC proteina je prijenos ATP-a iz matriksa u međumembranski prostor i ADP-a u matriks iz međumembranskog prostora. Inhibitori ovog proteina su karboksiatractilozid (eng. *carboxyatractyloside* – CATR) kada je protein otvoren prema c-strani i bongkrekinska kiselina (eng. *bongkrekinic acid* – BA) kada je protein otvoren prema m-strani.

Prvu strukturu ovog proteina u kompleksu s CATR inhibitorom izolirala je 2003. grupa Pebay-Peyroula iz goveda *Bos Taurus*. Struktura proteina je određena difrakcijom X-zraka s rezolucijom od 2,20 Å i u PDB bazi podataka nalazi se pod kodom 1OKC.<sup>18</sup> Struktura proteina otvorena je prema c-strani. Samo dvije godine kasnije, 2005., u istoj grupi je objavljena nova struktura proteina iz istog organizma određena difrakcijom X-zraka s rezolucijom od 2,80 Å i u PDB bazi podataka nalazi se pod kodom 2C3E. Struktura je također otvorena prema c-strani, a naglasak u radu stavljen je na mogućim međusobnim interakcijama proteina, tj. protein–protein interakcijama.<sup>19</sup> 2014. godine su Kunji i suradnici došli do struktura još tri forme ovog proteina, točnije AAC2 i AAC3 proteina iz gljive pivskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, također difrakcijom X-zraka s rezolucijom 2,49 Å i 3,20 Å, a te su strukture također otvorene prema c-strani.<sup>20</sup> Do 2019. godine sve strukture proteina određene su okrenute prema c-strani

koja je stabilnija te je tek tada određena prva struktura ovog proteina okrenuta prema m-strani u kompleksu s inhibitorom BA i stabilizirana nanotijelom.<sup>21</sup> Protein je izoliran iz termofilne gljive (*Thermothelomyces thermophilus*) s rezolucijom 3,30 Å i jednostrukom mutacijom Q302K kako bi se povećala stabilnost strukture.

Ovi proteini su pozitivno nabijeni upravo jer im je funkcija prenositi anione kroz UMM. Veliku važnost u stabilizaciji proteina imaju i molekule kardiolipina (eng. *cardiolipin* – CDL) koje imaju svoja tri vezna mjesta na proteinu i dodatno ga stabiliziraju zbog negativnog naboja.<sup>19,22–25</sup> Molekule CDL-a također su prisutne u svim navedenim određenim strukturama proteina i to na matriks strani proteina.<sup>18–21</sup> Također je za strukture otvorene prema c-strani određeno da su molekule CDL-a vezane za AAC interakcijom od 10 – 23 kJ mol<sup>-1</sup>.<sup>22,26</sup> Osnovna funkcija ovog proteina je prijenos ATP-a i ADP-a i vjeruje se da je u mehanizam prijenosa uključena izmjena c- i m-strane proteina iako detalji mehanizma na molekularnoj razini još uvijek nisu poznati.<sup>27</sup> Sekundarna uloga AAC proteina je i prijenos protona kroz UMM uz pomoć dugolančanih masnih kiselina. Kirichok i suradnici<sup>28</sup> su 2019. godine pokazali da je prijenos protona integralna funkcija AAC proteina koji prijenosom ATP-a i ADP-a negativno regulira ovaj prijenos, a brzina regulacije, odnosno potražnja stanice za ATP-om utječe na prijenos protona. Time ovaj protein povezuje proizvodnju ATP-a i prijenos protona, odnosno termogenezu u proteinu.

### 3.2.2. UCP2 protein

UCP2 protein (eng. *UnCoupling Protein 2*), kao i svi UCP1-5 proteini je dobio ime jer odvaja protone (eng. *uncoupling*) iz procesa oksidativne fosforilacije i njihovog trošenja za proizvodnju ATP-a, time regulirajući prijenos protona kroz UMM. UCP2 protein u odnosu na AAC protein manje je istražen, a najviše je eksprimiran u tkivima sisavaca. Ovaj protein otkrila je Larrouyeva grupa 1997. imunohistokemijski iz jetre štakora,<sup>29</sup> a jedina struktura ovog proteina, i to NMR struktura, određena je iz miša (*Mus musculus*) 2011. i u PDB bazi podataka nalazi se pod kodom 2LCK.<sup>30</sup> Navedena struktura nije fiziološki relevantna jer se pri ekstrakciji proteina deterdžentom dodecilsulfokolinom (DPC) fiziološka funkcija proteina promijenila uslijed neprirodnog okruženja proteina DPC deterdžentom. U svome radu Zoonens i suradnici<sup>31</sup> eksperimentalno su pokazali da protein nema fiziološku funkciju prijenosa protona nakon ekstrakcije DPC deterdžentom dok ekstrakcijom deterdžentom Triton X-100 protein zadržava

svoju fiziološku funkciju. Također su simulacije molekulske dinamike (MD simulacije) pokazale da DPC deterdžent ne simulira pravilno fosfolipidnu membranu čime DPC mijenja terciarnu strukturu proteina u kojemu se tada javlja vodopropusni kanal kojeg ova vrsta proteina ne posjeduje.<sup>16</sup> Također je ubrzo pokazano da alkil fosfokolin deterdženti u koje spada i DPC deterdžent deformiraju i destabiliziraju terciarnu strukturu proteina.<sup>15</sup> Zbog navedenog ne postoji fiziološki relevantna terciarna struktura navedenog proteina pa je stoga zahtjevno odrediti mehanizam funkcije proteina i prijenosa protona na molekularnoj razini.

Dokazano je da UCP2 protein direktno sudjeluje u regulaciji reaktivnih kisikovih vrsta (eng. *reactive oxygen species*, ROS) koje ga aktiviraju, a najčešće se u literaturi navodi da je aktivator 4-hidroksi-2-nonenal (HNE), koji je sekundarni produkt ROS-a.<sup>11,32,33</sup> Regulacija ROS, odnosno njihovo smanjenje u metabolizmu mitohondrija, igra važnu ulogu u suzbijanju nastanka stanica raka i održavanju kemijske otpornosti na mnoštvo antikancerogenih lijekova. Kod stanica raka ovaj protein ima dvostruku ulogu, kao zaštitni mehanizam u normalnim stanicama, dok kod pretjerane ekspresije kod stanica raka može dovesti do razvitka otpornosti na kemoterapiju i veći opstanak stanica raka smanjenjem ROS. Primjerice, kod stanica raka dojke inhibicija UCP2 proteina u kombinaciji s citotoksičnim agensima kao što je tamoksifen može uzrokovati smrt stanica raka.<sup>34</sup> Dando i suradnici pokazali su da inhibicija UCP2 proteina inhibira Akt/mTOR put, točnije serin/treonin proteinsku kinazu B (Akt) koja aktivira ciljnu molekulu rapamicina mTOR (eng. *mammalian target of rapamycin*) u sisavaca u mehanizmu ovisnom o ROS-u u stanicama adenokarcinoma gušterače. mTOR jedan je od glavnih regulatora staničnog metabolizma, rasta i diobe, a navedenom aktivacijom se smanjuje antiproliferativni ishod inhibicije UCP2 proteina genipinom i stvaranje uvjeta za sinergističko odupiranje rastu stanica karcinoma s inhibitorom mTOR everolimus.<sup>35</sup> Jabůrek i suradnici<sup>36</sup> su pokazali *in vivo* antioksidativnu aktivnost u plućima i slezeni sinergijom UCP2 proteina i redoks osjetljive mitohondrijske fosfolipaze A2 (mt-iPLA2). Dijabetes tipa 2 također je povezan s radom UCP2 proteina gdje ključnu ulogu igraju  $\beta$ -stanice gušterače na koju utječe ponajviše glutotoksičnost i superoksidi. Li i suradnici<sup>37</sup> su pokazali da kod otočica gušterače miša, koji su prethodno podvrgnuti kroničnoj glutotoksičnosti i akutnom oksidativnom stresu, povećana ekspresija UCP2 proteina nije utjecala na mitohondrijski potencijal i sintezu ATP-a. Ekspresija je utjecala na zaštitu od glutotoksičnosti i smanjenje stanične smrti čime su autori zaključili da nije direktno povezana s proizvodnjom ROS-a. Ricquier i suradnici<sup>32</sup> su pokazali da odsutnost UCP2 proteina u pokusima s miševima povećava proizvodnju ROS-ova, a samim

time i oksidativni stres i povezane upalne bolesti.<sup>7,32,33</sup> Ovaj protein zajedno s UCP4 i UCP5 proteinima može se naći u centralnom živčanom sustavu i utjecati na rad neurona, a nepravilan rad ovog proteina povezuje se s neurodegenerativnim bolestima koje uključuju epilepsiju, Parkinsonovu i Alzheimerovu bolest, itd.<sup>38</sup> Za UCP2 protein je poznato da je povezan s raznim fiziopatološkim stanjima koja uključuju metaboličke poremećaje, upalne procese, ishemijski šok, karcinom, a povezan je i s izlučivanjem inzulina i posljedično s dijabetesom tipa 2, diferencijacijom matičnih stanica i starenjem. Predloženo je da te metaboličke promjene, zbog blage sličnosti s mehanizmom odvajanja protona od oksidativne fosforilacije posredstvom UCP1 proteina, i u kombinaciji s niskom razinom ekspresije UCP2 proteina, reguliraju otpuštanje ROS-a bez da utječu na konverziju energije.<sup>11,32,39-41</sup>

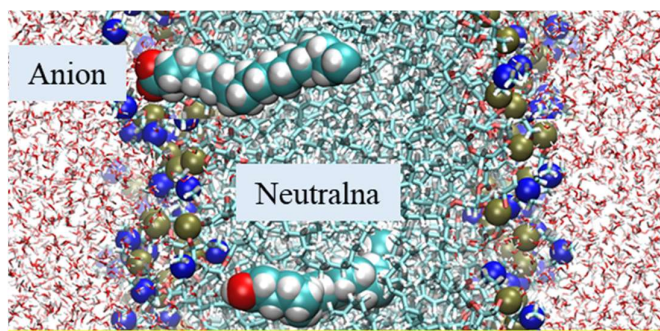
Kod rekonstruiranih liposoma pokazano je da je za funkciju prijenosa protona i za rad ovog proteina potrebna dugolančana masna kiselina. Inhibitori proteina su purinski nukleotidi, iako je sama inhibicija slabija kod UCP2 i UCP3 proteina nego kod UCP1 proteina.<sup>42</sup> Protein je pozitivno (+15e) nabijen, međutim manje nego AAC protein (+19e), a više od ostalih UCP proteina (UCP4 +6e, UCP5 +12e). Kao i kod AAC proteina, CDL molekule imaju ulogu u njegovoj stabilizaciji. I kod UCP2 proteina CDL molekule se nalaze s matriks strane te postoje tri vezna mjesta i moguće je da stabiliziraju protein u mehanizmu prijenosa protona kroz UMM.<sup>43</sup> Iako je transport protona masnom kiselinom potpomognut UCP2 proteinom izmjeren u rekonstruiranim liposomima,<sup>41,42</sup> neka istraživanja dvoje oko aktivnosti odvajanja protona od oksidativne fosforilacije *in vivo*<sup>28,44,45</sup> predlažući da je odvajanje protona od oksidativne fosforilacije sporedna uloga UCP2 proteina, a glavna uloga mu je u reprogramiranju metaboličkih puteva.<sup>46,47</sup> Navedeno pokazuje koliko su mehanizmi rada UCP2 proteina povezani i kompleksni te da UCP2 protein prenosi protone, iako možda u manjoj mjeri nego AAC i UCP1 proteini te da prenosi < 4 % protona u mišićima, < 11 % u mozgu i < 43 % u jetri, a najveći postotak u slezeni.<sup>45</sup> Navedeno je nedovoljno za bazalni prijenos protona, ali svakako doprinosi reguliranom prijenosu protona u prisutnosti specifičnih aktivatora koji uključuju alkenale, odnosno reaktivne aldehide (RA) i analoge retinoične kiseline. Jedan od predloženih mehanizama pretpostavlja da se regulirani prijenos protona koristi u obrani od oksidativnog stresa te da je aktiviran u prisutnosti aktivatora ROS-a kada je potrebno, a ukoliko ROS-ovi nisu prisutni, protein ne utječe na prijenos protona.<sup>11</sup> Jedno od objašnjenja je da se najprije katalizira blagi prijenos protona aktiviran reaktivnim aldehydima koji se generiraju lipidnom peroksidacijom iz superoksida. Time protein povećava broj protona odvojenih od primarne

svrhe fosforilacije odgovarajući lokalno na štetu uzrokovanu ROS molekulama smanjujući gradijent protona ( $\Delta p$ ). Time se smanjuje curenje elektrona kako bi se smanjila proizvodnja superoksida.<sup>48</sup> Regulacija navedenog prijenosa u kombinaciji s ostalim funkcijama proteina nesumnjivo igra važnu ulogu u pravilnoj funkciji i mehanizmima u stanici i organizmu pa tako protein prenosi protone samo na suprafiziološkoj razini kada se pojavljuju oštećenja mitohondrija.<sup>45</sup>

Iako UCP2 ima samo 23 % identičnosti s AAC proteinom, ova dva proteina imaju veliku sličnost u tercijskim strukturama i zadržane glavne motive koji su ključni za transmembranske proteine (slika 5). Zbog toga i neodređenih struktura ostalih membranskih proteina, a u slučaju UCP2 proteina zbog određene fiziološki nerelevantne strukture proteina, kristalna struktura AAC proteina često je korištena kao model i referentna struktura za UCP2 protein kao i za ostale UCP proteine.

### 3.3. Uloga masnih kiselina u prijenosu protona potpomognutom proteinima AAC i UCP2

Kao što je već navedeno, točan mehanizam prijenosa protona kroz UMM nije poznat, ali poznato je da je za njega osim proteina potrebna i dugolančana masna kiselina. Dugolančane masne kiseline imaju strukturu koja je stabilizirana u fosfolipidnom dvosloju zbog svoje amfifilnosti – polarna „glava“ koja je stabilizirana polarnim „glavama“ lipida vodikovim vezama i nepolarni „rep“ koji tvori nekovalentne interakcije s nepolarnim „repovima“ fosfolipidnog dvosloja. Na slici 8. vidljivo je da je neutralna forma više uvučena u fosfolipidni dvosloj jer tvori vodikove veze s fosforom i dušikom iz lipida dok je anionska forma polarnom „glavom“ izložena vodi kako bi se okružila polarnim molekulama vode.



Slika 8. Položaj anionske i neutralne forme dugolančane masne kiseline u fosfolipidnom dvosloju.

$pK_a$  masnih kiselina je u vodi  $\sim 4,75$ , dok je u membrani  $\sim 7,5$  što govori da je u membrani otprilike cca. 50% masnih kiselina protonirano – u neutralnoj formi, a cca. 50% deprotonirano – u anionskoj formi.<sup>49</sup>  $pK_a$  masnih kiselina u membrani teško se određuje i razlikuje se ovisno o eksperimentalnoj tehnici, ali povećava se povećanjem duljine lanca od 6,25 do 7,28 za C16:0 do C20:0, a smanjuje se povećanjem nezasićenosti od 7,28 do 6,13 za C20:0 do C20:4.<sup>50</sup> Masna kiselina u mehanizmu prijenosa protona kroz UMM bi bila protonofor – prenositelj protona iz citosola u matriks. Pokazano je da je optimalna i najefikasnija duljina lanca masne kiseline 14-20 ugljikovih atoma.

Dugolančana masna kiselina translocira se brzo,  $\geq 80\%$  masnih kiselina se translocira za 5-10 ms kroz UMM u neutralnom obliku za što je potrebna mala energija, dok je povratak aniona masne kiseline osjetno sporiji proces uz značajno veću barijeru.<sup>49-52</sup> Zbog toga je za prijenos aniona masne kiseline, kao i prijenos bilo kojih drugih iona kroz UMM, potreban protein koji katalizira taj prijenos i vraća anion masne kiseline iz matriksa u citosol kako bi se ciklus mogao ponoviti i na taj način kontrolirati gradijent protona. Permeabilnost bilo koje molekule kroz membranu povećava se povećanjem hidrofobnosti molekule, odnosno prema Overtonovom pravilu<sup>53</sup> kaže da što je masna kiselina dulja bit će permeabilnija i lakše će prolaziti kroz membranu. Overtonovo pravilo kod masnih kiselina vrijedi do laurinske kiseline (C12:0), kada se permeabilnost masne kiseline smanjuje zbog njihove slabije topljivosti u vodi, a ne manje permeabilnosti kroz samu membranu.<sup>54</sup>

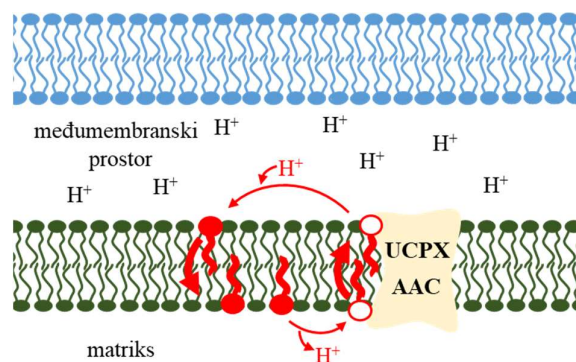
Iako se dugolančana masna kiselina lako i brzo translocira kroz UMM te na taj način može prenijeti proton iz citosola u matriks, povratak anionske forme je znatno sporiji proces uz veću energetska barijeru. Stoga samo masna kiselina nije dovoljna za zatvoreni ciklus prijenosa protona. No pokazano da je upravo prisutnost masne kiseline, uz prisutnost proteina AAC i UCP1-5, nužna za omogućavanje prijenosa protona.

### 3.4. Postojeći modeli prijenosa protona kroz UMM

Unatoč tome što se ne zna točan mehanizam prijenosa protona na molekulskoj razini kroz UMM, postoje različiti modeli prijenosa i rezultati istraživanja koji u većoj ili manjoj mjeri podupiru nekoliko različitih modela. Iako se nagađanja oko mehanizma prijenosa protona istražuju još od 1982. godine kada je prvi put pokazano da masne kiseline aktiviraju prijenos

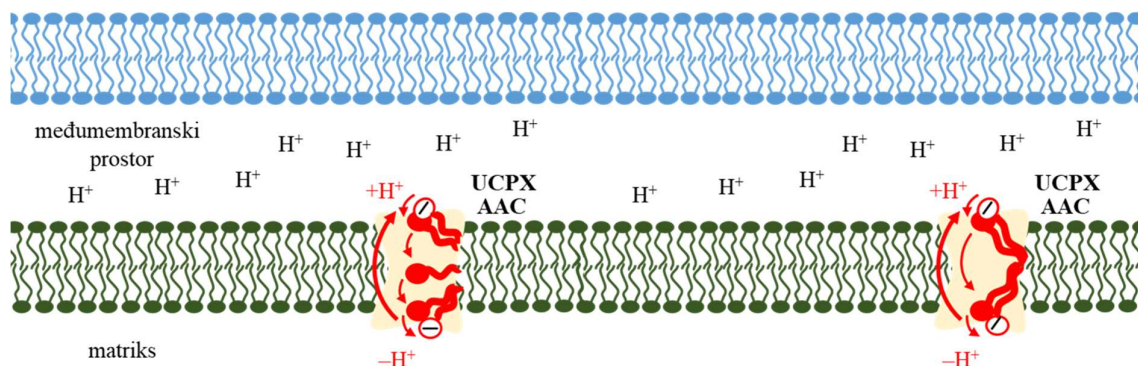
protona u mitohondriju,<sup>55,56</sup> mehanizam prijenosa na molekularnoj razini je još uvijek nepoznat. Dijelom je to zbog kompleksnosti sustava i povezanih mehanizama, a dijelom zbog heterogenosti sustava i teško odredivih struktura transmembranskih proteina.

Ako se pretpostavi da je za prijenos protona kroz UMM potrebna dugolančana masna kiselina i proteini AAC i UCP1-5 za koje se zna da su transporteri aniona, modeli se mogu podijeliti na tzv. statičke, gdje je masna kiselina fiksirana za protein, i cikličke, gdje se anion masne kiseline kontinuirano adsorbira i desorbira s proteina. Također možemo zamisliti modele u kojemu je protein samo prijenosnik aniona masne kiseline ili gdje je protein kanal u kojemu se nalazi masna kiselina. Najpoznatiji i najzastupljeniji modeli prijenosa protona su protonoforetski ciklički model, te dva u kojima je masna kiselina u kanalu proteina – kofaktorski (ili *shuttle*) model i *buffering* model, a svi su opisani detaljnije u nastavku.<sup>57</sup> Protonoforetski ciklički model<sup>46,47</sup> prikazan je na slici 9. i pretpostavlja protonoforetski ciklus – anion masne kiseline se protonira kada je na citosolnoj strani membrane. Protonirani neutralni oblik masne kiseline tada se translocira (*flip-flop*)<sup>49,51</sup> kroz membranu neovisno o proteinu i na matriks strani otpušta proton. Anionska forma masne kiseline tada se uz pomoć proteina (UCP1-5 i AAC) vraća u međumembranski prostor gdje se disocira s proteina i ciklus iznova počinje izjednačujući time gradijent protona. To je pojednostavljeni model i još uvijek se ne zna kojim mehanizmom bi se anion masne kiseline vratio iz matriksa u međumembranski prostor. Broj protona koji su preneseni jednak je broju masnih kiselina koje prijeđu kroz membranu, tj. odnos je stehiometrijski. Na taj način protein indirektno prijenosom aniona masne kiseline sudjeluje u prijenosu protona te tako omogućuje masnim kiselinama da budu ciklički protonofori.<sup>59,60</sup>



Slika 9. Protonoforetski ciklički model prijenosa protona kroz UMM. Dugolančana masna kiselina u neutralnom obliku lako se translocira kroz lipidni dvosloj i otpušta proton. Anion se preko proteina vraća u međumembranski prostor gdje se protonira čime cijeli ciklus ponovno započinje.

Za razliku od cikličkog protonoforetskog modela gdje se masna kiselina veže pa disocira s proteina, kod *buffering* i kofaktor (*shuttle*) modela masna kiselina je stalno vezana za protein, a međusobno se razlikuju u načinu prijenosa protona (slika 10).



Slika 10. *Buffering* (lijevo) i kofaktor/*shuttle* (desno) modeli gdje su masne kiseline ugrađene u kanal proteina. Kod *buffering* modela masne kiseline donor/akceptor sustavom prenose proton u matriks dok kod *shuttle* modela jedna masna kiselina je vezana u proteinu hidrofobnim interakcijama i sama premješta proton u matriks.

*Buffering* model predložili su Winkler i Klingenberg<sup>61,62</sup> – masne kiseline stalno su vezane u kanalu proteina i donor/akceptor vezama prenose proton kao što je prikazano na slici 10 lijevo. Kako u ovom modelu masna kiselina ostaje vezana za protein, ne sudjeluje stehiometrijski u prijenosu protona. Kod kofaktor modela, koji predstavlja relativno novi model, masna kiselina vezana hidrofobnim „repom“ u proteinu se protonira u međumembranskom prostoru te se premješta u matriks gdje otpušta proton. Model se zasniva na tezi da protein ne može vezati masnu kiselinu na matriks strani.<sup>63</sup> Također pretpostavlja da su hidrofobne interakcije koje vežu „rep“ masne kiseline jače od interakcija u lipidu, ali u prilog ovome mehanizmu ne idu eksperimenti s alkilsulfonatom gdje se uspostavlja gradijent masne kiseline.<sup>64</sup>

Što se navedenih mehanizama i UCP2 proteina tiče, Beck i suradnici<sup>65</sup> zagovaraju ciklički mehanizam, a pokazali su da je protein aktiviran više polinezasićenim nego zasićenim masnim kiselinama i vodljivost membrane protonima povećava se na sljedeći način, ovisno o prisutnoj kiselini: palmitinska (C16:0) < oleinska (C18:1) < eikozatrienonska (C20:3) < linoleinska (C18:2) < retinoinska < arahidonska (C20:4). Opravdanje za to je da će nezasićena masna kiselina uzrokovati veći nered i prostor u membrani (veću fluidnost) i time se brže reorijentirati. Također tvrde da se anion masne kiseline prenosi lateralnom difuzijom s vanjske strane proteina, na granici lipid-protein te da postoji vezno mjesto za anion masne kiseline.<sup>65</sup>



Berardi i suradnici<sup>66</sup> NMR-om su odredili vezno mjesto za masnu kiselinu, gdje UCP2 veže masnu kiselinu lateralno između H1 i H6 uzvojnica na periferni arginin R60 i lizin K271 s matriks strane proteina. Upravo to vezno mjesto može predstavljati početni korak u mehanizmu prijenosa protona, što međutim nije potpuno potvrđeno zbog destabilizacije tercijarne strukture prilikom ekstrakcije deterdžentom korištenim u NMR eksperimentima. Doduše, mutiranjem aminokiselina veznog mjesta, arginina i lizina u serin (R60S i K271S), tj. jednostruke i dvostruke mutacije, dolazi do smanjenja fluorescencije koja je povezana s funkcijom proteina, no još uvijek nema strukturne potvrde veznog mjesta. NMR rezultati su pokazali i da se GDP veže unutar proteina koji je otvoren s c-strane te kada je vezan inducira alosterički pomak masne kiseline čime ona prestaje biti vezana na protein uzrokujući time inhibiciju prijenosa protona. U navedenom radu rezultati ukazuju na ciklički mehanizam prijenosa protona gdje protein služi kao prijenosnik aniona masne kiseline.<sup>66</sup>

U svome radu antioksidativne aktivnosti u plućima i slezeni sinergijom UCP2 proteina i redoks osjetljive mitohondrijske fosfolipaze A2 (mt-iPLA2), Jabůrek i suradnici<sup>36</sup> su pokazali da nakon što vodikov peroksid aktivira mt-iPLA2, fosfolipaza otpušta masne kiseline iz mitohondrijske membrane. Povećan broj masnih kiselina uz pomoć UCP2 proteina sada služe kao prijenosnici protona kroz UMM, time smanjujući gradijent protona te povećavajući respiraciju čime brane stanicu od oksidativnog stresa.<sup>36,67</sup> Navedeno pokazuje da je UCP2 protein aktiviran oksidativnim stresom direktno ili indirektno povećanom proizvodnjom masnih kiselina. Pomoću njih protein prenosi protone kako bi regulirao i smanjio štetan utjecaj ROS-ova, o čemu je riječ u nastavku.

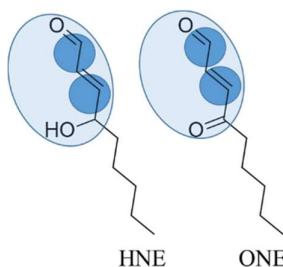
### 3.5. Utjecaj oksidativnog stresa na prijenos protona

#### 3.5.1. Oksidativni stres u mitohondriju

Tijekom ranije navedenog transportnog lanca elektrona kojim se pumpaju protoni u međumembranski prostor može doći do tzv. „curenja elektrona” iz kompleksa I i III (slika 2) i tada se ti elektroni ne koriste za redukciju kisika u vodu citokrom *c* oksidazom, već nastaju superoksidi iz kojih dalje nastaju već spomenute reaktivne kisikove vrste – ROS-ovi. Najčešće je inicirano povećanim gradijentom protona kako bi se membrana zaštitila od stresa. Nakupljanje stvorenih ROS-ova dovodi do poremećenog rada redoks signaliziranja te može

dovesti do zaustavljanja rasta stanica, pretjeranog starenja, neurodegenerativnih bolesti, Alzheimerove bolesti pa čak i smrti stanice.<sup>2,68,69</sup>

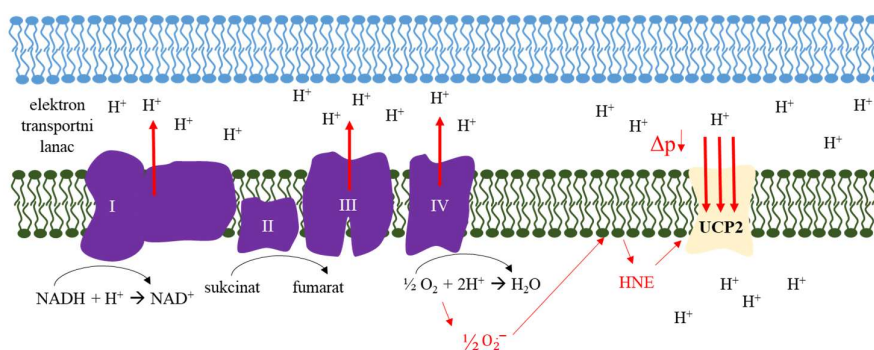
Nastali ROS-ovi mogu uzrokovati oštećenje stanica reakcijom s lipidima, proteinima i DNA/RNA. Primjerice, ROS-ovi mogu potencirati DNA oštećenje što može dovesti do mutacija koje pogoduju preživljavanju i rastu stanica raka.<sup>34,70,71</sup> Peroksidacija membranskih fosfolipida uzrokovanim ROS-ovima najprije inicijacijom, a zatim propagacijom lančanih reakcija radikala i na kraju terminacijom daje sekundarne produkte – citotoksične reaktivne aldehide (RA), alkene i hidroksialkene.<sup>72</sup> Kako RA nastaju u membrani, zbog svoje reaktivnosti će lako reagirati s okolnim lipidima, membranskim proteinima i DNA/RNA bazama.<sup>73</sup> Najpoznatiji RA koji nastaju uglavnom stvaraju alifatske lanace dužine 3 – 9 ugljikovih atoma, a najpoznatiji je 4-hidroksi-2-nonenal (HNE). Također nastaju i 4-okso-2-nonenal (ONE), malonaldehid (MDA), 2-hidroksi-2-heksenal (HHE) i akrolein.<sup>72</sup> Uglavnom su to  $\alpha,\beta$  – nezasićeni karbonili koji imaju zajedničku karakterističnu reaktivnu skupinu koja odmah reagira s nukleofilima te je odgovorna za biološku aktivnost RA. Dva su reaktivna mjesta, na karbonilnom položaju C1 i na položaju dvostruke veze C3 što daje široki spektar mogućih produkata. Strukture najčešćih RA, HNE-a i ONE-a, su prikazani na slici 11. Reakcije s lipidima i aminokiselinama uglavnom daju iste vrste produkata, ukoliko se reakcija odvije na karbonilnom ugljiku nastaju Schiffove baze, a reakcije na dvostrukoj vezi daju Michaelov adukt, hemiacetal ili piridin.<sup>74,75</sup> Također zbog velike reaktivnosti i dva reaktivna mjesta, RA daju unakrsno povezane dvostruke produkte gdje obje funkcionalne skupine reagiraju.<sup>76</sup>



Slika 11. Shematski prikaz HNE-a i ONE-a gdje su plavom osjenčana reaktivne skupine, C1 atom karbonilne skupine i C3 atom dvostruke veze.

Od navedenih RA elektrofilni HNE koji nastaje iz omega-6 masnih kiselina je posebno reaktivan, medijator je oksidativnog stresa i nastaje u najvećoj količini,<sup>72,77</sup> ali je pokazano da je to i signalna molekula koja pokreće mitohondrijske proteine.<sup>78</sup> Upravo zbog navedenog HNE se intenzivno istražuje i najpoznatiji je citotoksični produkt lipidne peroksidacije, a prvi put je

sintetiziran 1967. godine iz nezasićenih masnih kiselina u vodi.<sup>79</sup> Na slici 12 shematski je prikazan nastanak HNE-a iz superoksida peroksidacijom membranskih fosfolipida te njegova aktivacija UCP2 (ili ostalih UCP i AAC) proteina čime dolazi do odvajanja protona od ATP sintaze i posljedično smanjenja gradijenta protona  $\Delta p$  i povećane propusnosti membrane za protone.



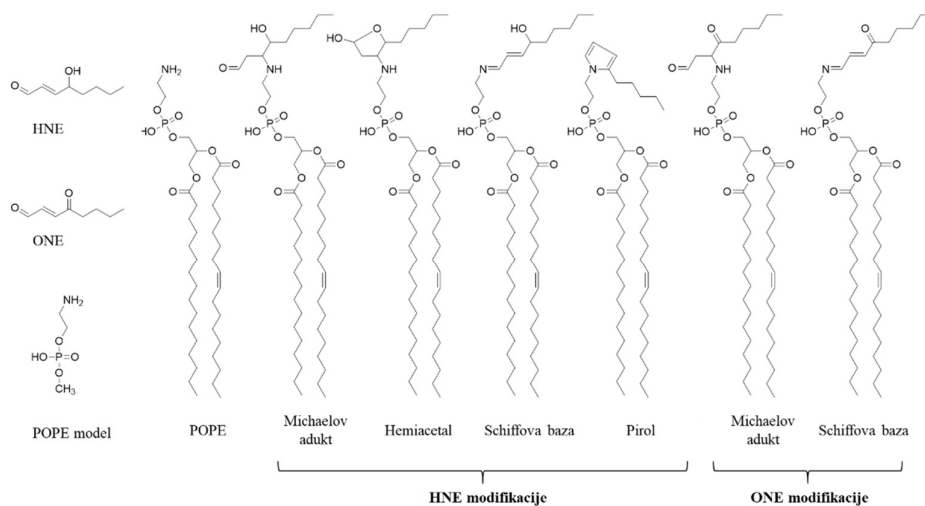
Slika 12. Tijekom elektronskog transportnog lanca može doći do „curenja” elektrona zbog čega dolazi do nastanka kisikovih radikala umjesto redukcije kisika u vodu. Nastali kisikovi radikali mogu reagirati s lipidima iz membrane pri čemu se stvaraju reaktivni aldehidi od kojih je najpoznatiji HNE, koji signalizira UCP2 proteinu čime se indirektno povećava propusnost protona kroz membranu, odnosno dolazi do smanjenja gradijenta protona  $\Delta p$ .

Potrebno je napomenuti da i ONE ima svoju ulogu u oksidativnom stresu, iako nastaje u manjim količinama od HNE-a. Važno je napomenuti da ONE nastaje lipidnom peroksidacijom neovisno o HNE-u.<sup>80,81</sup> Reaktivniji je od HNE-a u modifikaciji proteina i nastanku unakrsno povezanih dvostrukih produkata. ONE s cisteinom, histidinom i lizinom može tvoriti Michaelov adukt koji se može ciklizirati u furan ili podleći Paal-Knorr kondenzaciji s lizinom tvoreći pirol trisupstituirani unakrsno povezani produkt. Za oba RA (HNE i ONE) je dokazano da stvaraju Michaelov adukt/hemiacetal, pirol i 2-hidroksi-2-pentil-1,2-dihidropirol-3-on iminij s proteinima imunokemijskim metodama, uključujući i *in vivo* stvaranje navedenih produkata.<sup>82</sup>

Kao što je navedeno, RA lako reagiraju s nukleofilnim aminokiselinama iz proteina te su navedeni procesi vrlo istraživani gdje je većinom naglasak stavljen na proučavanje reakcija u kojima je prisutan elektrofilni HNE. Reakcijom RA s amino skupinama, tiolnom skupinom i imidazolnim prstenom proteina iz reaktivnih aminokiselina lizina, arginina, cisteina i histidina dolazi do modifikacije proteina navedenim aduktima čime se direktno mijenja funkcija proteina.<sup>75</sup> Sayre i suradnici pokazali su u više radova reakcije RA s aminokiselinama koje tvore

Michaelov adukt, koji u slučaju HNE-a cikliziraju u stabilniju hemiacetalsku formu. Kod cisteina i histidina bilo je moguće izolirati produkte, dok je kod lizina reakcija povratna i potrebno je produkt stabilizirati s natrijevim borhidridom – NaBH<sub>4</sub>. Također su pokazali da kao produkt nastaje i 2-pentil-pirol.<sup>83,84</sup> Michaelov adukt je glavni produkt i kod reakcije HNE-a s aminima, a kod ONE-a je to Schiffova baza. Općenito reaktivnost aminokiselina s HNE-om i ONE-om je sljedeća: kod reakcija s HNE-om favorizirano je stvaranje Michaelovog adukta, a reaktivnost je Cys >> His > Lys >> Arg, dok u reakcijama s ONE-om produkt ovisi o samoj aminokiselini pa je tako reaktivnost Cys Michaelov adukt >> Lys Schiffova baza > His Michaelov adukt >> Arg/Lys Michaelov adukt. Po navedenom se vidi da je cistein u oba slučaja najreaktivnija aminokiselina.<sup>82</sup>

Kod lipida, aminolipidi su podložni reakciji s RA upravo zbog amino skupine koja reagira dajući iste produkte kao i reakcija RA s aminokiselinama lizinom i argininom, čime se mijenja funkcionalnost membrane i raspored lipida oko membranskih proteina kojima se indirektno mijenja aktivnost.<sup>85</sup> Guichardant i suradnici<sup>77</sup> su pokazali utjecaj duljine alifatskog lanca na reaktivnost – što je RA dulji to je reaktivniji s fosfatidiletanolamin lipidom (eng. *PhosphatidylEthanolamine* – PE). Također su dokazali prisutnost Michaelovog adukta kod PE lipida.<sup>86</sup> Vazdar i suradnici također su eksperimentalno i računski pokazali reakciju HNE-a i ONE-a s aminolipidom 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamin (eng. *1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-glycero-3-PhosphoEthanolamine* – POPE) gdje su okarakterizirali Michaelov adukt (HNE i ONE) i hemiacetal (samo HNE), Schiffovu bazu (HNE i ONE) i pirol (samo HNE) što je prikazano na slici 13.<sup>87</sup>



Slika 13. Strukture reaktivnih aldehida HNE-a i ONE-a, čiji glavni motiv reaktivnih aldehida prikazan u svijetlo plavom krugu (C1 i C3). Prikazani su i eksperimentalno dobiveni produkti u reakciji s POPE aminolipidom.<sup>87</sup>

## § 4. TEORIJSKA OSNOVA I RAČUNALNE METODE

### 4.1. Teorijska osnova

Molekulsko modeliranje je grana računalne kemije koja uključuje računске i teorijske metode te se razvija paralelno s razvojem računala i uključuje tehnike kojima se oponaša ponašanje molekula u realnim sustavima. Začeci molekulskog modeliranja i računalne kemije datiraju još u vrijeme Drugog svjetskog rata nakon kojega ovo područje 1950-ih počinje naglo rasti sa širom upotrebom računala. Modeliranjem se mogu predvidjeti i razumjeti makroskopska svojstva sustava temeljena na detaljno opisanim atomskim svojstvima. Navedena makroskopska svojstva mogu biti statička (ravnotežna) i dinamička (neravnotežna). Razvojem sve jačih računala mogu se modelirati sve kompleksniji i veći sustavi što je iznimno važno za biološke sustave u kojima su lančano povezani različiti mehanizmi. Modeliranjem se može doći do saznanja koja se ne mogu jednostavno dobiti iz eksperimentalnih podataka kao što su duljine veza, atomske i molekulske orbitale, energije vezanja i prijelaza iz jednog stanja u drugo, itd. Modeliranjem se također mogu potvrditi i/ili nadopuniti eksperimentalna mjerenja. Iako relativno mlada, to je već široko razvijena grana koja se dijeli i razvija u različitim smjerovima te se pri tom koristi u razvoju i dizajnu lijekova, računalnoj biologiji te znanosti o materijalima. Ovisno o načinu tretiranja samih atoma – razlikujemo klasičnu molekulsku mehaniku (eng. *molecular mechanics*, MM) u kojoj atomi predstavljaju najmanje elemente/čestice sustava te kvantno-mehaničke (eng. *quantum-mechanics*, QM) račune u kojima su atomi tretirani eksplicitno te su pritom u račun uključene i subatomske čestice, tj. protoni, elektroni i neutroni.

Kod molekulske mehanike atomi se tretiraju kao najmanje jedinice – tvrde kuglice povezane oprugom te se zanemaruje elektronska struktura atoma. Upravo zbog toga se može pretpostaviti da se sustav može tretirati klasičnom mehanikom što dovodi do velikog pojednostavljenja zbog čega je moguće promatrati sustave s većim brojem čestica. Tako jedan atom ima više podtipova ovisno o okolnim atomima za koje je vezan i svaki je opisan tzv. poljem sila, odnosno parametrima koji određuju udaljenost i jačinu veza, kutova i torzijskih kutova. Na temelju klasične mehanike, odnosno Newtonovih jednadžbi gibanja, mogu se iz navedenih podataka izračunati sile iz kojih se mogu dobiti pomaci, brzine i akceleracije svih atoma unutar sustava. Kako bi se vidjelo ponašanje sustava u vremenu i prostoru koriste se Monte Carlo i simulacije molekulske dinamike (eng. *molecular dynamics*, MD). Ukoliko se

žele simulirati veći biološki sustavi, koriste se tzv. simulacije krupnog zrna (eng. *coarse grain*, CG) kojima nije jedan atom predstavljen jednom kuglicom, već više atoma zajedno sačinjavaju jednu kuglicu čime se znatno ubrzava vrijeme potrebno za izvođenje simulacije. Prednost MM pred QM računima je da uzima u obzir efekte tlaka i temperature.

Za razliku od molekulske mehanike, eksplicitno modeliranje protona, neutrona i elektrona koristi se u QM računima. Prednost ovih računa je da ovisno o metodi mogu vrlo precizno opisati ponašanje atoma. Iako navedena relativistički vremenski ovisna Schrödingerova jednadžba najbolje opisuje istinsko ponašanje atoma/molekula, nedostatak joj je to što je ograničena na sustave koji sadrže maksimalno nekoliko stotina. Upravo zbog toga se kod većih sustava koriste aproksimacije gdje se računski zahtjevni *ab initio* računi zamjenjuju QM računima u kojima je uvedena empirijska parametrizacija.

#### 4.1.1. Simulacije molekulske dinamike (MD simulacije)

Kao što je već navedeno, u MD simulacijama koriste se Newtonovi zakoni klasične mehanike koji opisuju kretanje čestica u prostoru. Drugi Newtonov zakon za svaki atom od ukupno  $N$  atoma u sustavu prema tome glasi prema navedenoj jednadžbi 1.

$$m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} = F_i, \quad i = 1 \dots N, \quad (1)$$

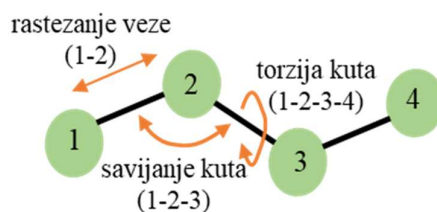
gdje je  $F_i$  sila koja djeluje na  $i$ -ti atom.

Navedena sila  $F_i$  također je jednaka negativnoj derivaciji funkcije potencijala  $V(r_1, r_2, \dots, r_N)$ .

$$F_i = -\frac{\partial V}{\partial r_i} \quad (2)$$

Prikazane jednadžbe se koriste iterativno uzimajući u obzir male vremenske korake, a rezultat su pomaci atoma te uzročno tome i cijelih molekula u prostoru. Potencijal u obzir uzima međusobnu interakciju atoma gdje oni mogu ostvarivati vezne i nevezne interakcije.

Vezne interakcije atoma ovise o 2, 3 ili 4 atoma koje uključuju rastezanje veze, savijanje kuta, torziju kuta i savijanje izvan ravnine što je vidljivo na slici 14.



Slika 14. Shematski prikaz veznih interakcija koje uključuju rastezanje veze, savijanje kuta i torziju kuta. Nije prikazano savijanje izvan ravnine.

Rastezanje veze između dva kovalentno povezana atoma  $i$  i  $j$  opisano je harmonijskim potencijalom  $V_b$  prema jednadžbi 3 gdje su atomi prikazani kao dvije kugle povezane oprugom koje titiraju duljinom  $r_{ij}$  oko ravnotežne duljine  $b_{ij}$ , a  $k_{ij}^b$  je konstanta rastezanja veze.

$$V_b(r_{ij}) = \frac{1}{2} k_{ij}^b (r_{ij} - b_{ij})^2 \quad (3)$$

Savijanje kuta među tri povezana atoma  $i, j$  i  $k$  također je prikazano harmonijskim potencijalom  $V_a$  gdje je ponašanje toga kuta  $\theta_{ijk}$  opisano titiranjem oko ravnotežnog kuta  $\theta_{ijk}^0$ , a  $k_{ijk}^\theta$  je konstanta savijanja kuta.

$$V_a(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2} k_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2 \quad (4)$$

Potencijal torzije kuta  $V_d$  je oscilacija kuta  $\phi$  između  $ijk$  i  $jkl$  ravnina četiri povezana atoma  $i, j, k$  i  $l$  koji titiraju oko ravnotežnog kuta  $\phi_s$ , gdje je  $k_\phi$  konstanta torzije kuta, a najčešće su opisani trigonometrijskom funkcijom ili zbrojem trigonometrijskih funkcija (najčešće kosinus).

$$V_d(\phi_{ijkl}) = k_\phi (1 + \cos(n\phi - \phi_s)) \quad (5)$$

Savijanje izvan ravnine uključuje sprječavanje nekih neprirodnih položaja povezanih atoma i uključuje primjerice držanje planarnih grupa u ravnini ili sprječavanje prelaska jednog enantiomera (diastereomera) u drugi. Harmonijski potencijal  $V_{id}$  uključuje torzijski kut  $\xi_{ijkl}$  koji je opisan pomoću ravnotežnog kuta  $\xi_0$  gdje su prisutna četiri povezana atoma  $i, j, k$  i  $l$ , a  $k_\xi$  konstanta savijanja izvan ravnine.

$$V_{id}(\xi_{ijkl}) = \frac{1}{2} k_\xi (\xi_{ijkl} - \xi_0)^2 \quad (6)$$

Nevezne interakcije mogu biti Van der Waalsove interakcije i elektrostatske (Coulombske) interakcije te se potencijal neveznih interakcija sastoji od članova koji su zaslužni za međusobno odbijanje atoma, disperziju te Coulombov član. Članovi za odbijanje i disperziju su najčešće kombinirani u Lennard-Jonesov ili Buckinghamov potencijal, dok se nabijeni atomi izražavaju putem Coulombovog člana. Lennard-Jonesov potencijal  $V_{LJ}$  za Van

der Waalsove interakcije između dva atoma  $i$  i  $j$ , a gdje je  $\sigma_{ij}$  idealna, odnosno referentna udaljenost između atoma može se opisati putem dolje navedene jednadžbe.

$$V_{LJ}(r_{ij}) = 4\epsilon_{ij} \left( \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right) \quad (7)$$

Coulombova interakcija, odnosno privlačenje između dvije nabijene čestice  $i$  i  $j$  može se prikazati pomoću umnoška parcijalnih atomskih naboja  $q_i q_j$ , a kada se podijeli s njihovom međusobnom udaljenošću dobivamo izraz proporcionalan elektrostatskom potencijalu  $V_c$ .<sup>88</sup>

$$V_c(r_{ij}) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{\epsilon_r r_{ij}} \quad (8)$$

Iz navedenih veznih i neveznih interakcija dobiva se ukupni potencijal i sile iz kojih se računaju pomaci, brzine i akceleracije, gdje su najčešće korišteni tzv. Leap-frog i Verletovi algoritmi.<sup>89</sup> Oba algoritma iz Newtonovih jednadžbi razvojem u Taylorov red računaju pomak atoma u vremenu. Početne brzine atoma dobivaju se pomoću Maxwell-Boltzmannove raspodjele iz koje je vjerojatnost  $p$  da se atom mase  $m_i$  pri temperaturi  $T$  giba brzinom  $v_i$  u prostoru dana donjim izrazom u jednadžbi 9.

$$p(v_i) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi k_B T}} e^{\left( \frac{-m_i v_i^2}{2k_B T} \right)} \quad (9)$$

U vremenu se generira ansambl struktura koje predstavljaju različita mikroskopska stanja sustava, pri čemu je očuvano makroskopsko stanje određeno sljedećim parametrima: temperaturom ( $T$ ), tlakom ( $p$ ), energijom ( $E$ ) i brojem čestica ( $N$ ). Ovisno o kombinaciji parametara koji ostaju očuvani tijekom simulacije, razlikujemo tri različita ansambla, a to su kanonski ( $NVT$ ), mikrokanonski ( $NVE$ ) i izobarno-izotermni ( $NpT$ ) ansambl. Mikrokanonski ansambl predstavlja izolirani sustav, dok kanonski i izobarno-izotermni ansambl posjeduju regulator temperature, tzv. temperaturnu kupku, koja održava konstantnu temperaturu putem restrikcije na ukupnu kinetičku energiju sustava i time je sustav bliži realnim eksperimentima. Za navedeno postoje različiti termostati, a jedan od njih je Nosé-Hoover termostat kod kojega energija simuliranog sustava fluktuiraju, ali je unatoč tome zbroj energije sustava i kupke očuvan.<sup>90,91</sup> Kod izobarno-izotermnih reakcija osim temperature se regulira i tlak barostatom, a najčešće korišten je Parrinello-Rahman barostat.<sup>92</sup> Budući da je mikrokanonski ansambl nepraktičan u primjeni i nema kontrolu temperature, najčešće se upotrebljavaju kanonski i izobarno-izotermni ansambl. Sva mikroskopska stanja koja odgovaraju većoj vjerojatnosti nalaženja sustava u njima imaju manju energiju, dok se stanja manje vjerojatnosti nalaze više na plohi potencijalne energije sustava. Na navedeni način se jednostavno iz vjerojatnosti



pronalaska mikroskopskog stanja može izračunati relativna energija u odnosu na druga mikroskopska stanja pomoću Boltzmannove raspodjele iz particijske funkcije  $Q$ .<sup>88</sup>

$$p = \frac{1}{Q} e^{\left(\frac{-E_i}{2kT}\right)} \quad (10)$$

$$Q = \sum_i e^{\left(\frac{-E_i}{2kT}\right)} \quad (11)$$

$$p_i = \frac{N_i}{N} \quad (12)$$

Ergodska hipoteza predlaže da, ukoliko se sustav simulira beskonačno dugo, on će posjetiti sva moguća mikroskopska stanja, odnosno stanja u termodinamičkoj ravnoteži. U realnim modelnim sustavima nije moguće ispuniti zahtjev ergodske hipoteze (nije moguće uistinu beskrajno dugo simulirati sustav) pa se primjenjuju napredne simulacijske tehnike koje ubrzavaju ili prisiljavaju sustav kako bi se našao u manje vjerojatnim mikroskopskim stanjima. Tako se sustavu najčešće dodaje određena energija izvana ili se prisilno (uobičajeno putem dodatne sile) sustav drži u manje vjerojatnim mikroskopskim stanjima kako bi se što prije dobile tražene makroskopske informacije o sustavu.

U MD simulacijama, sile na rubnim dijelovima sustava utječu na energiju interakcije što predstavlja artefakt same metode budući da se takva anomalija ne pojavljuje u realnim sustavima. Iz tog razloga su implementirani periodični rubni uvjeti (eng. *periodic boundary conditions*, PBC). Time se osnovna simulacijska „kutija“ periodički ponavlja u svim smjerovima čime se izbjegavaju i eliminiraju granični efekti, a uz minimalan račun se uzimaju u obzir i međusobne interakcije prisutnih kopija sustava čime se bolje opisuje realan sustav. Za međusobne elektrostatske interakcije atoma periodičnih kopija sustava za dugosežne interakcije koristi se Ewaldova sumacija PME (eng. *particle mesh Ewald*, PME) koja mijenja sumu interakcija u realnom prostoru s ekvivalentnom interakcijom u Fourierovom prostoru.<sup>93</sup> Prednost metode je brza konvergencija, a sama metoda zahtjeva neutralnost sustava kako bi se mogla dobiti ukupna Coulombova interakcija.

U daljnjem tekstu su opisane tehnike koje smo koristili u MD simulacijama, homologno modeliranje kako bi dobili željenu strukturu proteina i napredna tehnika računanja slobodne energije tehnikom *umbrella sampling*.

#### 4.1.2. Homologno modeliranje

Homologno ili komparativno modeliranje predviđa tercijarnu trodimenzijsku (3D) strukturu proteina tako što poravnava primarne sekvence proteina kojemu se traži struktura i ciljanog modelnog proteina poznate strukture. To je korisna metoda koja se upotrebljava kada struktura ili dio strukture proteina nije poznat ili ukoliko se želi provjeriti i usporediti struktura dva proteina. Primarna sekvenca proteina za koji se želi saznati tercijarna struktura se poravnava s primarnom sekvencom proteina koji kasnije služi kao „kalup” na koji će se modelirati primarna sekvenca ciljanog proteina (slika 5). Homologno modeliranje često se koristi i kod manjkavosti eksperimentalno određenih kristalnih struktura gdje primjerice nisu određeni dijelovi proteina, što je čest slučaj kod N- i C- krajeva proteina, također ukoliko su dijelovi proteina mutirani ili modificirani. Što je poklapanje, odnosno identičnost i sličnost proteina veća, to je metoda homolognog modeliranja pouzdanija. Dakle, poželjno je da je protein koji služi kao „kalup” što sličniji proteinu koji želimo homološki modelirati po slijedu aminokiselina, ali i po funkciji te da struktura ima što bolju rezoluciju. U dijelovima gdje je poklapanje sekvenci najbolje, najveća je i pouzdanost modela.

#### 4.1.3. Napredna tehnika računanja slobodne energije tehnikom *umbrella sampling*

Napredne tehnike računanja slobodne energije, gdje se sustav „prisiljava” ili mu se daje dodatna energija, razvijene su kako bi mogli istražiti visokoenergetska mikroskopska stanja sustava te istražiti prelazak jednog stanja u drugo. Takve metode omogućavaju izračun krivulje slobodne energije iz kojih se mogu donositi zaključci o stabilnosti stanja te barijerama prelaska među traženim stanjima. U slobodnim MD simulacijama (osnovne tehnike), minimumi na plohi slobodne energije imaju visoku vjerojatnost uzorkovanja, dok se područja veće energije, pogotovo prijelazna stanja, uzorkuju značajno slabije ili se uopće ne posjećuju. Dakle, cilj naprednih tehnika računa slobodne energije je upravo prisiliti sustav da uzorkuje stanja koja bi inače bila slabo ili nikako posjećena. Najpoznatije takve tehnike su termodinamička integracija, *umbrella sampling*, temperaturni *umbrella sampling*, metadinamika, itd.<sup>94,95</sup>

Kod tehnike *umbrella sampling* u MD simulacijama krivulje slobodne energije temelje se na ravnotežnim svojstvima sustava, a dobivaju se na način da se tzv. reakcijski put, odnosno put prijelaza iz jednog u drugo stanje podijeli u manje dijelove – prozore.<sup>96</sup> Navedeni prozori se dobiju tako da se upotrebom izvane dodane sile jedno stanje tjera u drugo te se tako prolazi kroz željeni prostor reakcijskog puta. Tada se sustav i svaki prozor prisiljava određenom

primijenjenom silom da ostaje u stanjima koja se nalaze na putu između dva željena stanja konfiguracijskog prostora.<sup>94,95</sup> Svaki prozor, ovisno o sili koja je primijenjena, pokriva određeni dio reakcijske koordinate podliježući Gaussovoj raspodjeli. Iz prikupljene statistike svakog od prozora (sila u vremenu ili pozicija atoma/skupine u vremenu na koju djeluje dodatna sila) se na kraju metodom analize ponderiranih histograma WHAM (eng. *weighted histogram analysis method*) dobiva krivulja slobodne energije prijelaza iz početnog u konačno stanje.<sup>95</sup>

#### 4.1.4. Kvantno-mehanički (QM) računi

Kada se u obzir uzimaju subatomske čestice koriste se QM računi koji se baziraju na kvantnoj fizici, tj. na računu valne funkcije koja je bazirana na vremenski neovisnoj Schrödingerovoj jednadžbi gdje je  $\hat{H}$  hamiltonov operator,  $\Psi$  valna funkcija,  $E$  energija sustava, a  $R$  i  $r$  koordinate jezgri i elektrona.

$$\hat{H}\Psi(R_1, R_2 \dots R_N, r_1, r_2 \dots r_n) = E\Psi(R_1, R_2 \dots R_N, r_1, r_2 \dots r_n) \quad (13)$$

Jednadžba ne može biti analitički riješena za više od dvije čestice, već se rješava aproksimativno. Osnovne aproksimacije zahtjevaju aproksimaciju jezgara kao točaka, vremensku neovisnost jednadžbe, isključivanje relativističkih efekata (koji počinju igrati ulogu kod teških elemenata) te korištenje Born-Oppenheimerove aproksimacije. Ova aproksimacija zasebno tretira kretanje jezgara i elektrona, što se opravdava činjenicom da su elektroni značajno manje mase u odnosu na protone i neutrone (tri reda veličine). Postoji beskonačno mnogo rješenja jednadžbe koja odgovaraju različitim valnim funkcijama i njihovim pripadajućim energijama, a po konvenciji su rješenja poredana po energijama tako da rješenje za  $\Psi_0$  odgovara najnižoj energiji  $E_0$ .

$$\hat{H}\Psi_i = E_i\Psi_i, i = 0, 1, 2, \dots, \infty \quad (14)$$

Rješenja su također ortogonalna i normalizirana, odnosno ortonormalna.

$$\langle \Psi_i | \Psi_j \rangle = \delta_{ij} \quad (15)$$

Iz rješenja Schrödingerove valne jednadžbe mogu se izraziti aproksimativne valne funkcije s egzaktnim rješenjima  $\Phi$  čime se može definirati energija  $W$ .

$$\Phi = \sum_{i=0} a_i \Psi_i \quad (16)$$

$$W = \frac{\langle \Phi | H | \Phi \rangle}{\langle \Phi | \Phi \rangle} \quad (17)$$

Varijacijskim pristupom energija  $W$  aproksimativne valne funkcije je uvijek veća ili jednaka najmanjoj energetskej razini  $E_0$ . Ukoliko je jednaka, onda je to stanje  $\Phi$  osnovno stanje valne

funkcije  $\Psi_0$ . Zbog navedenog principa moguće je matematički odrediti rješenje osnovnog stanja. Uslijed Born-Oppenheimerove aproksimacije elektronska valna funkcija ovisi jedino parametarski o atomskim koordinatama zbog čega se Schrödingerova jednadžba može separirati na valnu funkciju  $\Phi$  koja opisuje ponašanje jezgara i elektronsku valnu funkciju  $\psi$ .

$$\Psi(R_1, R_2 \dots R_N, r_1, r_2 \dots r_n) = \Phi(R_1, R_2 \dots R_N) \psi(r_1, r_2 \dots r_n) \quad (18)$$

Born-Oppenheimerova aproksimacija implicira da se Hamiltonijan može zapisati u sljedećem obliku, gdje je prvi član elektronska kinetička energija, drugi privlačenje elektrona i jezgre, treći odbijanje elektrona, dok je zadnji član odbijanje jezgri.

$$\hat{H} = -\frac{1}{2} \sum_i^n \nabla_i^2 - \sum_i^n \sum_I^N \frac{Z_I}{r_{iI}} + \sum_{i < j}^n \frac{1}{r_{ij}} + V^n \quad (19)$$

Nakon uvođenja Schrödingerove jednadžbe, Hartree je predložio da elektronska valna funkcija može biti aproksimirana pod pretpostavkom da se elektroni mogu promatrati odvojeni te je time valna funkcija svakog prikazana individualno.

$$\psi(r_1, r_2 \dots r_n) = \Phi_1(r_1) \Phi_2(r_2) \dots \Phi_n(r_n) \quad (20)$$

Mana navedene valne funkcije je što zanemaruje međusobnu interakciju elektrona, odnosno korelaciju. Stoga je energija koja se dobije najveća moguća energija pa tako svaka metoda koja uzima u obzir korelacijsku energiju daje nužno nižu energiju. Hartree metodapretpostavlja da se odbijanje elektrona  $i$  i ostalih elektrona može izračunati uzimajući u obzir prosječne pozicije ostalih elektrona u molekuli gdje se individualni elektron kreće u polju ostalih elektrona  $V_i^{eff}$ . Rješenje individualnih jednadžbi tada ovisi o rješenjima ostalih jednadžbi preko polja  $V_i^{eff}$ .

$$\left( -\frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_I^N \frac{Z_I}{r_{iI}} + V_i^{eff} \right) \Phi_i = E_i \Phi_i \quad (21)$$

Iz navedenih jednadžbi do rješenja se dolazi iterativno numeričkim metodama te se mora provjeriti zadovoljava li funkcija kriterij samousklađenosti (eng. *self-consistent field*, SCF) u odnosu na početnu funkciju. Inicijalno se predviđa jednoelektronska valna funkcija i iteracija se ponavlja sve dok  $\Phi_i$  ne bude nepromijenjen, odnosno kada je kriterij samousklađenosti postignut. Problem kod Hartree metode je što dobivena rješenja krše Paulijev princip, odnosno valna funkcija nije antisimetrična, tj. ne mijenja predznak zamjenom dvaju elektrona. Fock je to riješio izražavajući valnu funkciju Slaterovim determinantama tako da je razvijena Hartree-Fock metoda (HF). Ta metoda se pokazala uspješnom u predviđanju molekulskih geometrija, ali procjena termodinamičkih veličina značajno odstupa od stvarnih budući da metoda ne uzima elektronsku korelaciju u obzir. Mnogo metoda je temeljeno i unapređuje upravo HF metodu (post-HF metode) koja je varijacijska i veličinski konzistentna. Najpoznatije metode koje se

koriste, a nastale su iz HF metode su Møller-Plesset perturbacijska teorija drugog reda (MP2) i sve teorije zasnovane na njoj (SCS-MP2, SOS-MP2, ...), HF-3c, konfiguracijska interakcija (eng. *configurational interaction*, CI) i sve teorije izvedene iz nje (ovisno koliko je elektrona pobuđeno iz HF-a može biti jednostruka – CIS, dvostruka – CID, ..., kompletna – FCI), metoda spregnutih klastera (eng. *coupled cluster*, CC) i sve metode bazirane na toj metodi (CCSD, CCSD(T), DLPNO-CCSD(T)).

Također postoje metode koje nisu zasnovane na HF metodi, a najpoznatija i široko upotrebljavana je teorija funkcionala gustoće (eng. *density functional theory* – DFT) koja se zasniva na gustoći elektronskog oblaka. Ova metoda je zahvalna budući da su računi temeljeni na njoj značajno brži od post-HF metoda. Teorija se razvila posredstvom Hohenberg-Kohnovog teorema iz 1964. koji predlaže da je energija molekuskog sustava kao i ostale opservable, definirana elektronskom gustoćom sustava. Ovaj teorem pokazuje da je potencijal osnovnog stanja konačnog sustava direktno definiran elektronskom gustoćom. Navedeno implicira da nije potrebno nužno znati rješenje valne funkcije Schrödingerove jednadžbe, gdje računalno vrijeme eksponencijalno raste povećanjem broja elektrona. Kod gustoće funkcionala vrijeme rješavanja je neovisno o broju elektrona, a dimenzionalnost je 3 te je time ova metoda znatno brža.

Elektronska gustoća definirana kao  $\rho(r)$  opisuje ponašanje elektrona u sustavu, a u navedenoj elektronskoj gustoći vrhovi, odnosno šiljci, se javljaju na mjestima atomskih jezgri koje definiraju položaje atoma, a oblik samih vrhova određuje broj protona, odnosno vrsta atoma. Kako bi se odredio molekularni elektronski Hamiltonijan potrebno je znati broj elektrona i atomske koordinate što je poznato iz elektronske gustoće. Prema tome, svaki elektron doprinosi svojom specifičnom energijom koja je funkcija elektronske gustoće. Problem loše opisane kinetičke energije su riješili Kohn i Sham u svome formalizmu u kojemu se kinetička energija temelji na orbitalama što povećava dimenzionalnost DFT računa s 3 na 3N. Navedeni formalizam uključuje podjelu funkcionala za energiju na kinetičku energiju međusobno neovisnih elektrona  $T_S$ , energiju interakcije elektrona i jezgre  $E_{ne}$ , energiju međusobne interakcije elektrona  $J$  i član za korelaciju kinetičke energije i korelaciju odbijanja elektrona – korelacijsko-izmjenjski član  $E_{xc}$ .

$$E^{DFT}[\rho] = T_S[\rho] + E_{ne}[\rho] + J[\rho] + E_{xc}[\rho] \quad (22)$$

Kako bi se izračunao i riješio problem korelacijsko-izmjenjskog člana  $E_{xc}$  koristi se više aproksimacija, a najjednostavnija je aproksimacija lokalne gustoće (eng. *local density approximation*, LDA), a mana joj je što ne uzima u obzir delokaliziranost potencijala. Njen

poopćeni oblik je aproksimacija generaliziranog gradijenta (eng. *generalized gradient approximation*, GGA) koja u obzir uzima vrijednost elektronske gustoće koji lokalno ovisi o gradijentu gustoće, odnosno prostornoj promjeni gustoće. Nadalje, hibridni funkcionali aproksimaciju korelacijsko-izmjenškog člana  $E_{xc}$  tretiraju linearnom kombinacijom egzaktnog izmjenškog HF funkcionala, a ostatak iz ostalih izvora (*ab initio* ili empirijski). Najpoznatiji funkcional je B3LYP (Becke, 3-parametar, Lee-Yang-Parr) baziran na GGA aproksimaciji, Beckevom 88 izmjenškom funkcionalu i korelacijskoj funkciji Lee-Yang-Parr, koji se pokazao robustan pri određivanju svojstava na širokom dijapazonu kemijskih spojeva.

## 4.2. Računalne metode

Kako bi proučili mehanizam prijenosa protona kroz unutarnju mitohondrijsku membranu, kao i modifikacije koje nastaju tijekom procesa oksidativnog stresa, koristili smo MD simulacije i QM račune koji su najvećim dijelom provedeni na lokalnim radnim stanicama i računalnom klasteru Isabella smještenom na Sveučilišnom računalnom centru SRCE.

Za sve MD simulacije korišteni su programski paket GROMACS 5.1.4 i GROMACS 2018.4<sup>97</sup> te su za većinu MD simulacija korištene GPU jezgre dok je vizualizacija provedena programima za vizualizaciju VMD<sup>98</sup> i Chimera 1.13.1,<sup>99</sup> koji su uz Modeller 9<sup>100</sup> korišteni za pripremu homološki modeliranih sustava. Za pripremu membranskih sustava korišten je CHARMM-GUI generator.<sup>101,102</sup> Svi QM računi izvedeni su pomoću programskog koda Gaussian09<sup>103</sup> na CPU jezgrama, a rezultati su vizualizirani pomoću programa GaussView 5.0<sup>104</sup> i Molden.<sup>105</sup> U nastavku je detaljno opisana tehnička izvedba i način pripreme svakog MD i QM sustava kao i račun i analiza svih dobivenih rezultata.

### 4.2.1. MD simulacije dugolančanih masnih kiselina

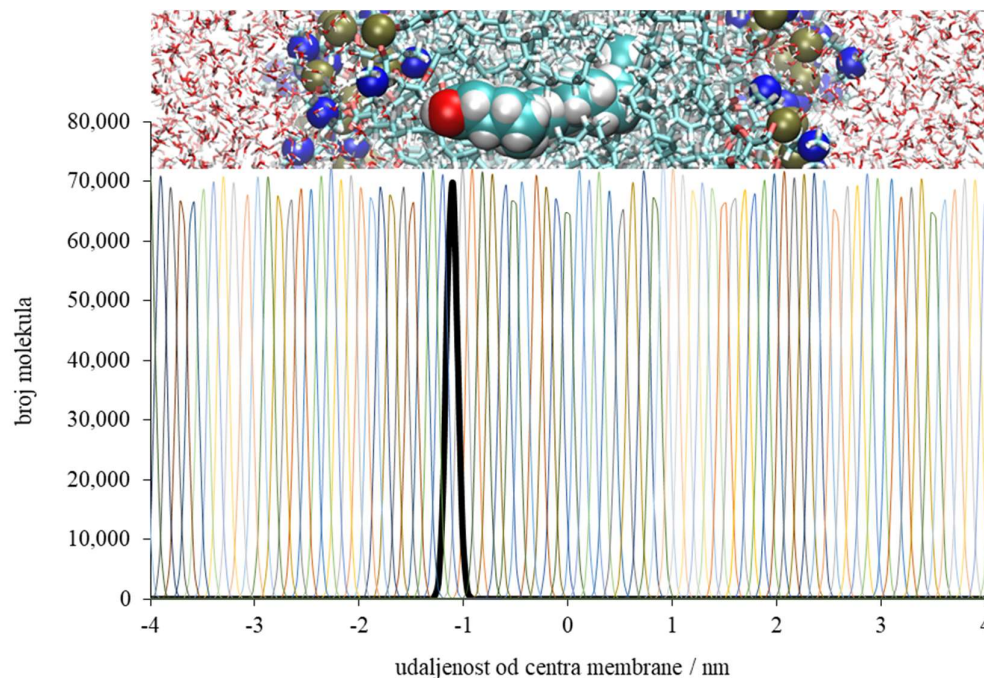
Pripremljeno je ukupno 14 sustava dugolančanih masnih kiselina, odnosno 7 različitih masnih kiselina u neutralnom i anionskom obliku: miristinska (C14:0), palmitinska (C16:0), stearinska (C18:0), arahidska (C20:0), arahidonska (C20:4), behenijska (C22:0) i lignocerinska (C24:0) kiselina. U svakom sustavu masna kiselina uronjena je u simetrični lipidni dvosloj 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfokolin (DOPC) koji se sastoji od 128 DOPC molekula (64 molekule po jednom sloju) koji je okružen s ~ 11500 molekula vode. Za anionsku formu u sustavu se nalazi još jedan

Na<sup>+</sup> ion za neutralizaciju. Simulacije su izvođene u PBC uvjetima u kutiji veličine *ca.* 6,5 nm × 6,5 nm × 12,3 nm. Polje sila za DOPC i masne kiseline je Slipids,<sup>106,107</sup> voda je model TIP3P.<sup>108</sup> Atomski naboji za masne kiseline izračunati su protokolom koji se koristi za parametrizaciju Slipids polja sila<sup>106</sup> – Merz-Singh-Kollman protokol, gdje se na B3LYP/6-1G(d) optimiziranoj geometriji računaju ESP naboji na B3LYP/cc-pVTZ razini teorije.<sup>109</sup> RESP metoda je korištena kako bi se dobili konačni naboji koristeći Antechamber modul.<sup>110</sup> Sustavi su simulirani u  $NpT$  ansamblu s Nosé-Hoover termostatom<sup>90,91</sup> (neovisno za DOPC/masna kiselina i voda/natrij) s konstantom vezanja 0,5 ps<sup>-1</sup> i Parrinello-Rahman barostatom<sup>92</sup> koji drži tlak na 1 bar s konstantom sparivanja od 10 ps<sup>-1</sup>. Korišten je Verletov algoritam,<sup>89</sup> kratkosežne elektrostatske interakcije dobivene su Coulombovim računom interakcije (odrezane na udaljenosti od 1 nm), a dalekosežne interakcije dobivene su PME metodom.<sup>93</sup>

Nakon što su svi sustavi pripremljeni, svaki je minimiziran i ekvilibriran te simuliran 200 ns koristeći slobodni MD. Početne točke za tehniku *umbrella sampling* generirane su tako da je „glava” masne kiseline (C1 atom) povučena koristeći silu od 1000 kJ mol<sup>-1</sup> nm<sup>-2</sup> brzinom od 0,001 nm ps<sup>-1</sup> iz svoje ravnotežne pozicije u membrani, i to prema obje strane membrane. Na taj način je pokrivena cijela membrana (-4,5 do 4,5 nm udaljenosti između C1 atoma masne kiseline i centra membrane) čime je generirano 90 inicijalnih sustava gdje je razmak između svakog 0,1 nm. Za neke od anionskih sustava provedene su REUS simulacije – tehnika temperaturne izmjene *umbrella sampling* (eng. *replica exchange umbrella sampling*) za područje -2,0 do 2,0 nm kako bi dobili što vjerodostojnije podatke. Izmjene među replikama su pokušavane (monte Carlo kriterij) svake 2 ps za susjedne replike.

Kako bi masna kiselina bila prisiljena biti na navedenim udaljenostima korišteno je harmoničko ograničenje s konstantom sile od 1000 kJ mol<sup>-1</sup> nm<sup>-2</sup>. Za anionske sustave za koje je korištena tehnika REUS, oko centra lipida korištene su konstante sila od 2000 i 3000 kJ mol<sup>-1</sup> nm<sup>-2</sup>. Svaki prozor je simuliran 30 ns po prozoru s 2 fs vremenskog koraka, osim za REUS simulacije koje su simulirane 40 ns po prozoru. Prvih 10 ns kod neutralnih formi, odnosno 20 ns kod anionskih formi su odbačene iz analize jer se smatra da je to vrijeme potrebno za ekvibraciju sustava. Potencijalom srednje sile (eng. *potential of mean force*, PMF) dobivene su krivulje slobodne Gibbsove energije tehnikom WHAM<sup>111</sup> za neutralnu i anionsku formu zasićenih dugolančanih masnih kiselina različitih duljina (slika 15). Ovdje je stanje najmanje

vjerojatnosti, tzv. usko grlo u računu slobodne energije upravo prijelaz masne kiseline kroz sami centar lipidnog dvosloja.

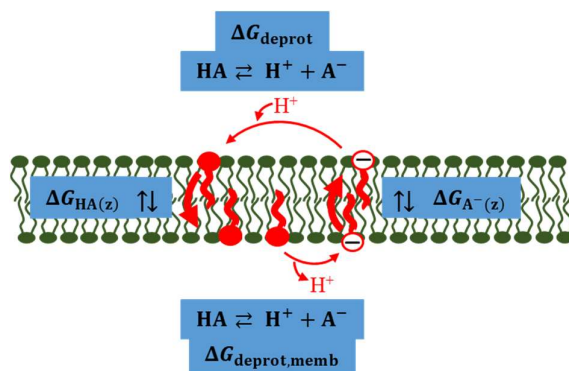


Slika 15. Tipičan primjer histograma za dugolančane masne kiseline, a za svaki od 90 prozora gledala se udaljenost C1 atoma masne kiseline i centra membrane. Može se primijetiti poželjno preklapanje histograma. Iznad je ilustrativno prikazan položaj masne kiseline u dvosloju, a histogram za navedeni položaj masne kiseline je predstavljen podebljanom crnom krivuljom. To je ujedno i ravnotežni položaj iz kojega su primjenom sile dobivene ostale konfiguracije i histogrami. Prikazani su histogrami za neutralnu palmitinsku kiselinu.

#### 4.2.2. Termodinamički ciklus i računi $pK_a$ masnih kiselina u membrani

Nakon što su dobivene krivulje slobodne energije za neutralnu i anionsku formu, izračunat je  $pK_a$  masne kiseline ovisan o položaju masne kiseline u membrani i određivi  $pK_{a,odr}$  iz položaja minimuma krivulja prema dolje navedenom ciklusu i jednadžbama. U termodinamičkom ciklusu prolaska masne kiseline kroz lipidni dvosloj (slika 16), ukoliko krenemo od anionske forme, najprije dolazi do protoniranja anionske forme u neutralnu gdje imamo prvu ravnotežu u ciklusu, a zatim do translokacije neutralne forme kroz lipid i deprotoniranja neutralne forme, što predstavlja drugu i treću ravnotežu ciklusa. Ciklus završava ponovnom translokacijom anionske forme masne kiseline gdje se ciklus završava.





Slika 16. Shematski prikaz termodinamičkog ciklusa masne kiseline.

Ako napišemo općenitu jednadžbu kemijske reakcije deprotonacije neutralne masne kiseline u obliku:



iz termodinamičkog ciklusa slijedi da je Gibbsova slobodna energija jednaka jednadžbi 24.

$$\Delta\Delta G_{(z)} = \Delta G_{\text{deprot,memb}} - \Delta G_{\text{deprot}} = \Delta G_{\text{A}^-(z)} - \Delta G_{\text{HA}(z)} \quad (24)$$

Iz navedenog proizlazi da je disocijacijska konstanta  $K_a$ :

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (25)$$

čijim se logaritmiranjem može izračunati  $\text{p}K_a$  masne kiseline prema jednadžbi 26.

$$\text{p}K_{a,\text{bulk}} = -\log K_a = -\log \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} = \frac{(G_{\text{H}^+} + G_{\text{A}^-}) - G_{\text{HA}}}{2,303RT} = \frac{\Delta G_{\text{bulk}}}{2,303RT} \quad (26)$$

Gibbsova slobodna energija u svakoj točki kroz membranu ( $z$ -os) prema tome jednaka je:

$$\begin{aligned} \Delta G_{(z)} &= (G_{\text{H}^+(z)} + G_{\text{A}^-(z)}) - G_{\text{HA}(z)} \\ &+ (G_{\text{H}^+\text{bulk}} + G_{\text{A}^-\text{bulk}}) - G_{\text{HA bulk}} \\ &- (G_{\text{H}^+\text{bulk}} + G_{\text{A}^-\text{bulk}}) + G_{\text{HA bulk}} \end{aligned} \quad (27)$$

Iz Gibbsove slobodne energije u svakoj točki kroz membranu ( $z$ -os) može se dobiti  $pK_a$  u istoj točki u membrani –  $pK_{a(z)}$  prema sljedećoj jednadžbi 28:

$$\begin{aligned}
 pK_{a(z)} &= \frac{\Delta G_{(z)}}{2,303RT} \\
 &= \frac{1}{2,303RT} [(G_{H^+ \text{bulk}} + G_{A^- \text{bulk}}) - G_{HA \text{bulk}} + (G_{A^- (z)} - G_{A^- \text{bulk}}) - (G_{HA (z)} - G_{HA \text{bulk}})] \\
 &= \frac{1}{2,303RT} [\Delta G_{\text{bulk}} + \Delta \Delta G_{(z)}] \\
 &= pK_{a,\text{bulk}} + \Delta pK_a
 \end{aligned} \tag{28}$$

Energija deprotonacije  $\Delta G_{\text{deprot}}$  je  $3,2 \text{ kcal mol}^{-1}$  pri  $310 \text{ K}$  na  $\text{pH} = 7$ .<sup>112</sup>

$$\Delta G_{\text{deprot}} = 2,303RT(pK_{\text{bulk}} - \text{pH}) = 2,303RT(4,75 - 7) = -3,2 \text{ kcal mol}^{-1}$$

$$\begin{aligned}
 pK_{a(z)} &= \frac{1}{2,303RT} [\Delta G_{\text{bulk}} + \Delta \Delta G_{(z)} + \Delta G_{\text{deprot}} - \Delta G_{\text{deprot}}] \\
 &= \frac{1}{2,303RT} [\Delta G_{\text{bulk}} + (\Delta \Delta G_{(z)} - 3,2) - 2,303RT(pK_{\text{bulk}} - \text{pH})] \\
 &= \left[ pK_{\text{bulk}} + \frac{(\Delta \Delta G_{(z)} - 3,2)}{2,303RT} - pK_{\text{bulk}} + \text{pH} \right] \\
 &= \text{pH} + \frac{\Delta \Delta G'_{(z)}}{2,303RT} \\
 &= \text{pH} + \Delta pK_{a(z)}
 \end{aligned} \tag{29}$$

U jednadžbu 29 uvedena je razlika slobodne energije  $\Delta \Delta G'_{(z)}$  koja je:

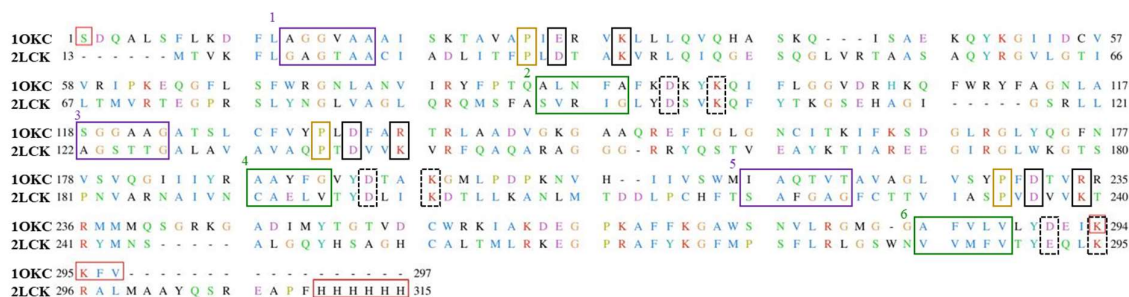
$$\begin{aligned}
 \Delta \Delta G'_{(z)} &= \Delta \Delta G_{(z)} - 3,2 = G_{A^- (z)} - G_{HA (z)} - 3,2 \\
 &= (G_{A^- (z)} - G_{A^- \text{bulk}}) - (G_{HA (z)} - G_{HA \text{bulk}} + 3,2)
 \end{aligned} \tag{30}$$

Iz navedenog se može izračunati konačno odrediti  $pK_{a,\text{odr}}$  iz minimuma krivulja slobodne Gibbsove energije za neutralnu i anionsku formu dugolančane masne kiseline:

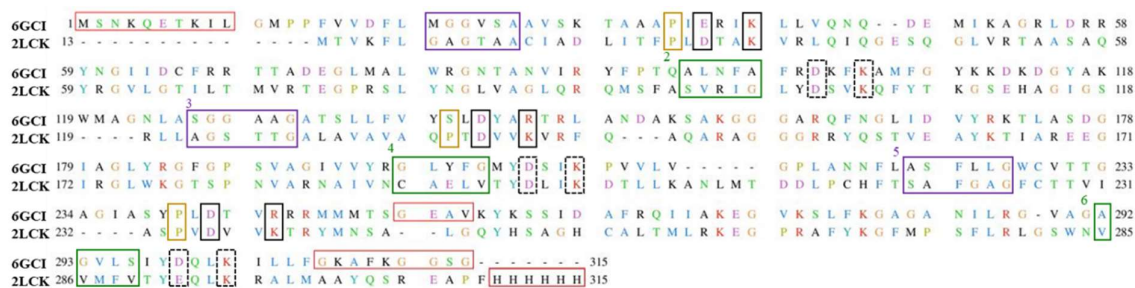
$$pK_{a,\text{odr}} = \text{pH} + \frac{\Delta G_{A^- \text{min}}(\Delta G_{HA \text{min}} + 3,2)}{2,303RT} \tag{31}$$

## 4.2.3. MD simulacije membranskih proteina

Kako objavljena NMR struktura UCP2 proteina (PDB kod: 2LCK, organizam *Mus musculus*) nije fiziološki relevantna,<sup>30,31</sup> korišteno je homologno modeliranje primarne sekvence UCP2 proteina. Kao što je ranije opisano, strukture membranskih proteina je vrlo teško potpuno karakterizirati te u bazi proteina postoji malo određenih struktura transmembranskih proteina u odnosu na ostale vrste proteina čiji broj određenih struktura raste gotovo eksponencijalno zadnjih dvadestak godina. Iz istih razloga je broj proteina koji se mogu koristiti kao „kalupi” u homolognom modeliranju poprilično ograničen. Za UCP2 protein kao „kalup” odabrane su kristalne strukture AAC-a, c-stanje (rezolucija 2,2 Å, PDB kod: 1OKC, organizam *Bos taurus*)<sup>18</sup> i m-stanje (rezolucija 3,3 Å, PDB kod: 6GCI, Gln302Lys mutacija, organizam *Myceliophthora thermophila*). Identičnost UCP2 sekvence iz 2LCK strukture s navedene dvije sekvence proteina je 25,6 % s 1OKC i 24,8 % za 6GCI sekvencama proteina. Svi proteini spadaju u skupinu transmembranskih proteina te posjeduju podjednak broj aminokiselina, jednako raspoređene uzvojnice u dvosloju te očuvane glavne transmembranske motive, što je vidljivo na slici 5. Bitno je za napomenuti da su i neke od bioloških funkcija oba proteina prijenos aniona.



Slika 17. Poravnanje primarnih sekvenci UCP2 proteina (2LCK) i AAC c-strukture (1OKC) proteina koji služi kao „kalup” za modeliranje. Žuto su osjenčane aminokiseline koje su predviđene kao  $\alpha$ -uzvojnice, u crvenim kvadratima su dijelovi strukture koji nisu određeni. Brojevima 1-6 označeni su karakteristični motivi  $\alpha$ -uzvojnica 1-6, parni  $\pi$ xxx $\pi$  motivi su označeni plavim kvadratima, a neparni  $\pi$ G $\pi$ x $\pi$ G motivi ljubičastim. Karakteristična prolinska koljena su označena žutim kvadratima. U crnim kvadratima označeni su solni mostovi: potencijalna mreža solnih mostova na matriks strani za protein okrenut prema c-strani označena je u neprekidanim crnim kvadratima, a potencijalna mreža solnih mostova na citosol strani za protein okrenut prema m-strani označena je u isprekidnim crnim kvadratima.

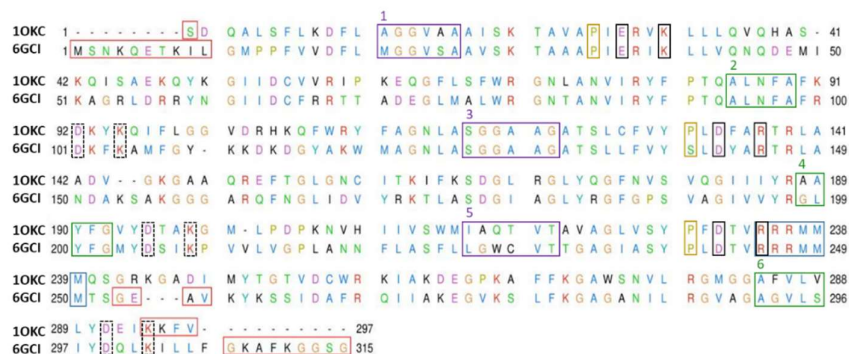


Slika 18. Poravnanje primarnih sekvenci UCP2 proteina (2LCK) i AAC m-strukture (6GCI) proteina koji služi kao „kalup” za modeliranje. Žuto su osjenčane aminokiseline koje su predviđene kao  $\alpha$ -uzvojnice, u crvenim kvadratima su dijelovi strukture koji nisu određeni. Brojevima 1-6 označeni su karakteristični motivi  $\alpha$ -uzvojnica 1-6, parni  $\pi$ xxxx $\pi$  motivi su označeni plavim kvadratima, a neparni  $\pi$ G $\pi$ x $\pi$ G motivi ljubičastim. Karakteristična prolinska koljena su označena žutim kvadratima. U crnim kvadratima označeni su solni mostovi: potencijalna mreža solnih mostova na matriks strani za protein okrenut prema c-strani označena je u neprekidanim crnim kvadratima, a potencijalna mreža solnih mostova na citosol strani za protein okrenut prema m-strani označena je u isprekidnim crnim kvadratima.

Na slici 17 i slici 18 može se vidjeti da se sekvence najviše poklapaju u transmembranskom dijelu proteina uronjenom u lipid te su upravo ti dijelovi najviše pouzdani u pogledu homolognog modeliranja. S druge strane, N- i C- krajevi proteina te dijelovi uronjeni u vodu najmanje se poklapaju te je samim time i pouzdanost dobivenog modela u njihovom slučaju manja. To je iznimno važno jer je upravo membranski dio proteina, koji je i najpouzdanije modeliran, najvažniji za aktivnost i funkciju proteina dok su krajevi proteina i dijelovi uronjeni u vodu i inače najfleksibilniji i podložni promjenama te manja pouzdanost modela nije od presudne važnosti. Zbog navedenog vjerujemo da je homološki model UCP2 proteina na AAC protein, unatoč niskoj identičnosti, prikladan te se može koristiti kao početna točka za MD simulacije (slika 17 i slika 18). Za svaki homološki model su najprije pronađene tercijarne strukture koje se najbolje poklapaju sa sekvencom UCP2 proteina (bez histidinskih oznaka proteina, aminokiseline 310-315) koji se želi modelirati pomoću Blast<sup>113</sup> proteinskog komparativnog strukturnog modeliranja implementiranog u UniProt Protein Knowledgebase.<sup>114</sup> Strukture AAC proteina pod PDB kodovima u bazi u proteina čije sekvence se najbolje poklapaju s UCP2 proteinom su: 1OKC, 2C3E, 4C9G, 4C9J, 4C9H, 4C9Q i 6GCI, s tim da su sve okrenute prema citosolnoj strani, osim 6GCI strukture koja je okrenuta prema matriksu. Kao „kalupi“ za modeliranje, gdje je korišten kriterij najbolje rezolucije i identičnosti, odabrana je 1OKC struktura AAC proteina za c-strukturu UCP2 proteina, dok je 6GCI odabrana kao jedina dostupna m-struktura AAC protein. Na svaku strukturu od dva odabrana proteina

modelirana je sekvenca UCP2 proteina i za svaki je dobiveno 10 modela od kojih je izabran onaj s najmanjom vrijednošću DOPE energije (eng. *discrete optimized protein energy*, DOPE) od 0,85 i 0,64 za c- i m-strukturu. Ove structure su reprezentativne structure UCP2 proteina uronjene u lipidni dvosloj i korištene u simulacijama c- i m-struktura UCP2 proteina.

Pripremljeno je 5 glavnih sustava proteina, dva za AAC i tri za UCP2 protein. AAC je pripremljen iz dvije različite kristalne strukture gdje je u jednoj otvoren prema citosolnoj strani – c-struktura s 297 aminokiselina (PDB kod: 1OKC, visoka rezolucija od 2,2 Å, organizam *Bos Taurus*),<sup>18</sup> a u drugoj prema matriks strani – m-struktura s 315 aminokiselina (PDB kod: 6GCI, srednja rezolucija od 3,3 Å, Gln302Lys mutacija, organizam *Myceliophthora thermophila*),<sup>5</sup> a kako su određeni iz različitih organizama identičnost među njima je 51 % (slika 19). Obje strukture određene su u prisutnošću molekula kardiolipina. Iako je identičnost samo 51 %, očuvani su glavni strukturni motivi karakteristični za AAC protein kao što je RRRMMM motiv,  $\pi G\pi\pi G$  i  $\pi\text{xxx}\pi$  motivi karakteristični za parne i neparne  $\alpha$ -uzvojnice, prolinska koljena te mreža solnih mostova odgovorna za otvorenost proteina prema c- ili m- strani.



Slika 19. Poravnanje primarnih sekvenci AAC proteina okrenutog prema c-strani (1OKC) i m-strani (6GCI). U u crvenim kvadratima su dijelovi strukture koji nisu određeni. Brojevima 1-6 označeni su karakteristični motivi  $\alpha$ -uzvojnica 1-6, parni  $\pi\text{xxx}\pi$  motivi su označeni plavim kvadratima, a neparni  $\pi G\pi\pi G$  motivi ljubičastim. Karakteristična prolinska koljena su označena žutim kvadratima. U crnim kvadratima označeni su solni mostovi: potencijalna mreža solnih mostova na matriks strani za protein okrenut prema c-strani označena je u neprekidanim crnim kvadratima, a potencijalna mreža solnih mostova na citosol strani za protein okrenut prema m-strani označena je u isprekidnim crnim kvadratima. RRRMMM motiv označen je svjetloplavim kvadratom.

UCP2 je pripremljen iz NMR-om određene strukture – UCP2-NMR (PDB kod: 2LCK)<sup>115</sup> i homološkim modeliranjem sekvence na AAC kristalne strukture proteina – UCP2-homo-c (PDB kod: 1OKC)<sup>18</sup> i UCP2-homo-m (PDB kod: 6GCI)<sup>21</sup> prema poravnanjima prikazanim na slici 17 i slici 18. Svaki sustav se sastoji od proteina uronjenog u 230 molekula

DOPC lipida (115 molekula po sloju lipida), 28 750 molekula vode i 15/19/11 kloridnih iona kako bi se neutralizirao ukupan naboj UCP2-sve strukture/ANT-c/ANT-m proteina. Za kristalografske i NMR-om određene proteine dodani su dijelovi proteina koji nedostaju u određenim strukturama, za ANT c-strukturu aminokiseline 1 i 293-297, za ANT m-strukturu aminokiseline 1-10, 253-256 i 307-315 te za UCP2-NMR aminokiseline 1-13 i 310-315. Svi arginini i lizini su u protoniranoj formi, dok su histidini i cisteini u neutralnoj formi te glutamati i aspartati u deprotoniranoj formi.

Svaki sustav je najprije minimiziran, a zatim ekvilibriran u 7 koraka ekvilibracijskog procesa prema CHARMM-GUI proceduri<sup>101</sup> gdje su u svakom koraku popuštane sile kojima je protein ekvilibriran u membrani. Nakon toga je svaki sustav simuliran klasičnim MD simulacijama u trajanju od 2  $\mu$ s bez ograničenja s vremenskim korakom od 2 fs. Također su provedene dodatne simulacije i testovi za svaki od AAC-c i AAC-m sustava, gdje su nakon 1 i 2  $\mu$ s pripremljene nove točke u konformacijskom prostoru s novim početnim brzinama. Svaki novi sustav je simuliran 0,5  $\mu$ s kako bi se dokazalo da je konformacijski prostor adekvatno uzorkovan. Također su obje strukture postavljene u hibridni lipidni dvosloj čija kompozicija odgovara kompoziciji unutarne mitohondrijske membrane u fiziološkoj koncentraciji od 0,1 M NaCl kako bi sustav bio što realnije prikazan te kako bi se mogao usporediti s pojednostavljenim sustavom u homogenoj membrani u nefiziološkoj koncentraciji soli. Hibridni lipidni dvosloj također se sastoji od 230 lipida, ali od 93 DOPC, 82 DOPE i 55 CDL molekula. Također su slojevi u dvosloju asimetrični pa citosolni sloj sadrži ~ 30 % DOPC, ~ 15 % DOPE (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamin) i ~ 5% CDL molekula dok se matriks sloj sastoji od ~ 10 % DOPC, ~ 20 % DOPE i ~ 20 % CDL molekula.<sup>116,117</sup>

MD simulacije su izvedene s CHARMM36m poljem sila,<sup>118</sup> u PBC uvjetima u svim smjerovima s kutijom veličine 9,5 $\times$ 9,5 $\times$ 13,2 nm. Simulacije su izvođene u  $NpT$  ansamblu pri temperaturi od 310 K koja je održavana Nosé- Hooverovim termostatom<sup>90,91</sup> neovisno za lipid, vodu/ione i protein podsustave s konstantom vezanja od 1,0 ps<sup>-1</sup>. Tlak je 1.013 bar i kontroliran semiizotropnim Parrinello-Rahman barostatom<sup>92</sup> s vremenskom konstantom sparivanja od 5 ps<sup>-1</sup>. Korišten je Verletov algoritam,<sup>89</sup> dalekosežne elektrostatske interakcije su izračunate PME metodom,<sup>93</sup> a kratkosežne elektrostatske interakcije dobivene su Coulombovim računom interakcije (prekinute na udaljenosti od 1,2 nm).

#### 4.2.4. QM računi mehanizma kemijske reakcije RA i reaktivnih aminokiselina

Detaljni QM računi mehanizma reakcije reaktivnih aminokiselina lizina, arginina, histidina i cisteina s reaktivnim aldehidima HNE-om i ONE-om provedene su u dva različita implicitna otapala – acetonitilu ( $\epsilon = 35,7$ ) i vodi ( $\epsilon = 78,3$ ) kako bi se simulirala dva različita okruženja. Aminokiseline su zaštićene acetil i N-metil skupinama. Korišten je SMD solvatacijski model pri temperaturi od 298 K i tlaku od 1 bar.<sup>119</sup> Kod simulacija u vodi dodatno je u strukturu prijelaznog stanja uključena i molekula eksplicitne vode. Svi računi provedeni su koristeći SMD/MP2/6-311++G(d,p)//B3LYP/6-31G(d) razinu teorije za optimizaciju struktura,<sup>120</sup> dok su MP2 računi korišteni za račun jedne točke SP energije (eng. *single point*, SP) i to na SMD/MP2/6-311++G(d,p) razini teorije.<sup>121,122</sup> Stacionarne točke, minimumi i prijelazna stanja na površini potencijalne energije potvrđeni su vibracijskom analizom, gdje prijelazna stanja imaju samo jednu negativnu vibraciju. Također su strukture potvrđene IRC analizom (eng. *intrinsic reaction coordinate*, IRC).<sup>123</sup> Strukture reaktanata i produkata dobivene su iz struktura prijelaznih stanja pomakom atoma po vektoru negativne imaginarne vibracije prijelaznog stanja, nakon čega su optimizirane. Gibbsova slobodna energija dobivena je zbrajanjem SP elektronske energije i termalne korekcije na Gibbsovu slobodnu energiju. U vodenom mediju amino skupina lizina je protonirana te se slobodna energija deprotoniranja može izračunati iz razlike pH otopine koji je u eksperimentima bio 7,4 i  $pK_a$  lizina 10,3, te iznosi  $\Delta G = 2,303RT(pK_a - pH)$  pri 40 °C, što je  $\sim 4,2 \text{ kcal mol}^{-1}$ .<sup>124</sup> Na isti način može se izračunati energija protoniranja aldehida pretpostavljajući da mu je  $pK_a$  vrijednost u vodi 13,3 što daje slobodnu energiju deprotonacije od  $\sim 8,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Navedene deprotonacije nisu uključene u energetski profil, već je samo dana procjena prema navedenim formulama te ih je potrebno dodatno uzeti u obzir.

#### 4.2.5. Eksperimentalni rezultati

**Modelne reakcije bočnog lanca lizina i HNE-a** (dr. sc. Katarina Vazdar, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, IRB) izvedene su u atmosferi argona. Modelni zaštićeni lizin Ac-Lys-NMe otopljen je u otapalu (diklormetan, acetonitril, acetonitril s 10 mol% fosfatnog pufera, acetonitril sa 50 mol% fosfatnog pufera, fosfatni pufer) te je dodan HNE uz miješanje pri temperaturi 40 °C tijekom 18 sati. Otopina fosfatnog pufera pH 7,4 pripremljena je otapanjem dinatrijevog hidrogen fosfata ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10,9 g) i natrijevog dihidrogen fosfata ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2,7

g) u destiliranoj, deioniziranoj vodi (1000 mL) kako bi se dobila 0,1 M otopina. Kromatografija na stupcu silikagela 60, 70-230 mesh, 60 Å (E. Merck, Darmstadt, Njemačka) izvedena je pri sobnoj temperaturi. Tankoslojna kromatografija provedena je na TLC aluminijskim pločama, 20 x 20 cm, silikagel 60 F254. Analiza tekućinske kromatografije i masene spektrometrije LC-MS (eng. *liquid chromatography-mass spectrometry*) provedena je na sustavu Agilent 1200 LC-MS, opremljenom Agilent diodnim detektorskim nizom i Agilent 6410 trostrukim kvadrupolnim masenim spektrometrom koji primjenjuje ionizaciju elektrosprejom ESI (eng. *electrospray ionisation*) (Agilent Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) u pozitivnom i negativnom načinu.

Sve opisane reakcije u nastavku miješane su na 40 °C tijekom 24 sata, a nakon toga je smjesa uparena do suhog i analizirana pomoću LC-MS. Adukti pirola sintetizirani su tako da je Ac-Lys-NMe (25 mg, 0,124 mmol, 1,0 ekviv.) otopljen u 1,2 mL suhog diklorometana te je dodan HNE (20,0 mg, 0,124 mmol, 1,0 ekviv.), a produkt je nakon uparavanja pročišćen kolonskom kromatografijom na silikagelu upotrebom petroletera i EtOAc (1 : 1) kao eluensa. Dobiveno je 24 mg (61%) proizvoda pirolnog adukta kao smeđa krutina. LC-MS eksperimenti u diklorometanu pripremljeni su na način da je Ac-Lys-NMe (13 mg, 0,064 mmol, 1,0 ekviv.) otopljen u 0,65 mL suhog diklorometana uz dodatak HNE-a (10,0 mg, 0,064 mmol, 1,0 ekviv.). LC-MS eksperimenti u acetonitrilu pripremljeni su tako što se Ac-Lys-NMe (13 mg, 0,064 mmol, 1,0 ekviv.) otopi u 0,65 mL suhog acetonitrila te doda HNE (10,0 mg, 0,064 mmol, 1,0 ekviv.). Acetonitril s fosfatnim puferom s omjerom smjese 9: 1 pripremljeni su na način da je Ac-Lys-NMe (13 mg, 0,064 mmol, 1,0 ekviv.) otopljen je u 0,65 mL smjese acetonitril: fosfatni pufer = 9: 1 nakon čega je dodan HNE (10,0 mg, 0,064 mmol, 1,0 ekviv.). Acetonitril s fosfatnim puferom s omjerom smjese 1: 1 pripremljen je tako da je Ac-Lys-NMe (13 mg, 0,064 mmol, 1,0 ekviv.) otopljen u 0,65 mL smjese acetonitril: fosfat = 1: 1 uz dodatak HNE-a (10,0 mg, 0,064 mmol, 1,0 ekviv.). Čisti fosfatni pufer pripremljen je tako da je Ac-Lys-NMe (13 mg, 0,064 mmol, 1,0 ekviv.) otopljen u 0,65 mL fosfatnog pufera. Dodan je HNE (10,0 mg, 0,064 mmol, 1,0 ekviv.). Prinosi svih produkata reakcija prikazani su u tablici u dodatku 1.

#### **Mjerenja električnih parametara membrana rekonstituiranih s UCP2 proteinom miša**

(Dr. Olga Jovanović i prof. Elena E. Pohl, Institut za fiziologiju, patofiziologiju i biofiziku, Odjel za biomedicinske znanosti, Sveučilište za veterinu u Beču). Ravni dvoslojni lipidi nastali su od (proteo-) liposoma sastavljeni od 45 : 45 : 10 mol% DOPC: DOPE: CDL. Koncentracija



lipida je 1,5 mg / mL, a omjer proteina i lipida 4 µg po mg lipida. Arahidonska kiselina u koncentraciji od 15 mol% dodana je izravno u lipidnu fazu prije stvaranja membrane. Pufer je sadržavao 50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM tris(hidroksimetil)aminometana (TRIS), 10 mM 2-(*N*-morfolin)etansulfonske kiseline (MES) i 0,6 mM etilen glikol-bis(β-aminoetil eter)-*N,N,N',N'*-tetraoctene kiseline (EGTA) pri pH = 7,34 i temperaturi 33 °C. Ispravno stvaranje membrane provjereno je mjerenjem specifičnog kapaciteta ( $C = 718 \pm 34 \text{ nF / cm}^2$ ) koji je neovisan o sadržaju bjelančevina, masne kiseline i ATP-a. Mjerenja struja-napon (I-U) izvedena su pojačalom sa stezaljkama (EPC 10 USB, HEKA Elektronik dr. Schulze GmbH, Njemačka). Ukupna provodljivost membrane na 0 mV dobivena je iz nagiba linearnog prilagođavanja eksperimentalnih podataka pri primijenjenim naponima od -50 mV do + 50 mV. ATP se otopi u puferu do koncentracije od 400 mM i otopina se namjesti na pH = 7,34. Volumen od 3,75 µL 400 mM matične otopine ATP-a (pH = 7,34) dodan je u 750 µL puferske otopine za konačnu koncentraciju od 2 mM ATP. Vrijeme inkubacije iznosilo je 30 min pri temperaturi 33 °C.

## § 5. REZULTATI I RASPRAVA

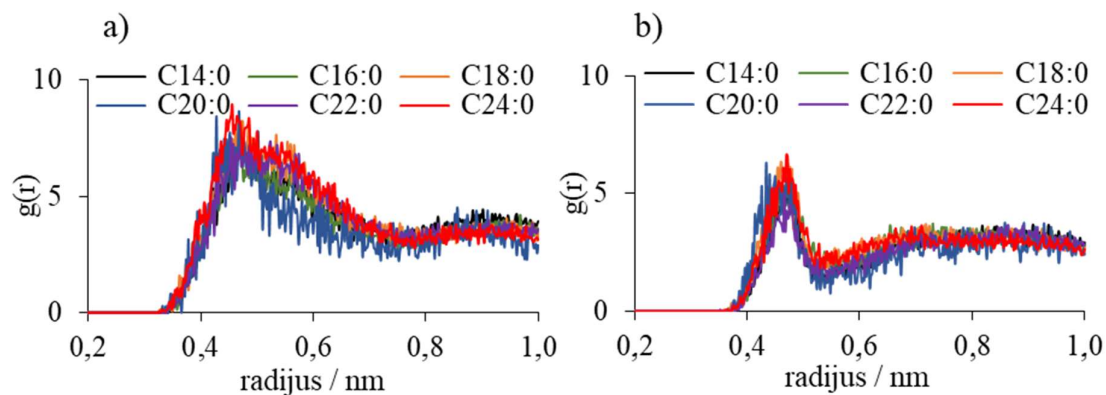
### 5.1. Prijenos protona kroz unutarnju mitohondrijsku membranu

Kako bi što više doprinijeli opisu mehanizma prijenosa protona kroz UMM, a uz dosadašnja saznanja da je za prijenos protona nužno potrebna dugolančana masna kiselina, najprije su izračunate energije koje su potrebne za translokaciju masne kiseline. Kao što je ranije navedeno iz literature, poznato je da se dugolančane masne kiseline u neutralnom obliku uz nisku energiju lako translociraju kroz lipidni dvosloj. Nakon otpuštanja protona, povratak anionskog oblika je vrlo spor proces koji se odvija uz značajno veću barijeru. Kako bi dobili slobodne Gibbsove energije za navedene procese koristili smo se naprednom simulacijskom tehnikom molekulske dinamike računanja slobodne energije, tj. naprednom simulacijskom tehnikom *umbrella sampling*, čiji detalji su opisani u poglavlju 4 u Teorijskoj osnovi i računalnim metodama. Treba napomenuti i da su ovo pojednostavljeni modelni sustavi gdje je radi jednostavnijeg i jasnijeg računa prisutna samo jedna masna kiselina u homogenoj membrani te da su obje strane membrane jednake, odnosno ne postoji gradijent protona i ne može se razlikovati matriks i citosolna strana membrane. Unatoč tome, model je dovoljno dobar kako bi se dobile željene informacije o položaju masnih kiselina u membrani i predvidjela njihova energetika.<sup>125</sup>

#### 5.1.1. Prijenos neutralne forme masne kiseline kroz lipid

Simulirane su zasićene masne kiseline različitih duljina alifatskog lanca od C14:0 do C22:0 (miristinska – C14:0, palmitinska – C16:0, stearinska – C18:0, arahidska – C20:0, behenijska – C22:0 i lignocerinska – C24:0) uronjene u DOPC fosfolipidni dvosloj. Svaki sustav je simuliran 200 ns slobodnom molekulsom dinamikom iz čega je određen položaj kiseline u membrani. Iz rezultata simulacije može se zaključiti da svaki neutralni oblik masne kiseline, neovisno o duljini lanca, tvori vodikove veze s fosforom i sn2 ugljikom iz lipida na istoj udaljenosti, što je vidljivo iz radijalne distribucijske funkcije (RDF) koja je prikazana na slici 20 gdje je prvi vrh nalazi na udaljenosti od ~ 0,45 nm. Također je prisutan slabo izražen i rašireni vrh na udaljenosti od ~ 0,85 nm. Navedene udaljenosti ukazuju na stvaranje vodikove veze gdje je neutralna masna kiselina donor, a fosfor iz fosfatne skupine i sn2 karbonil akceptori vodika. Usporedbom visine vrhova može se vidjeti da je vodikova veza u karbonilu čak

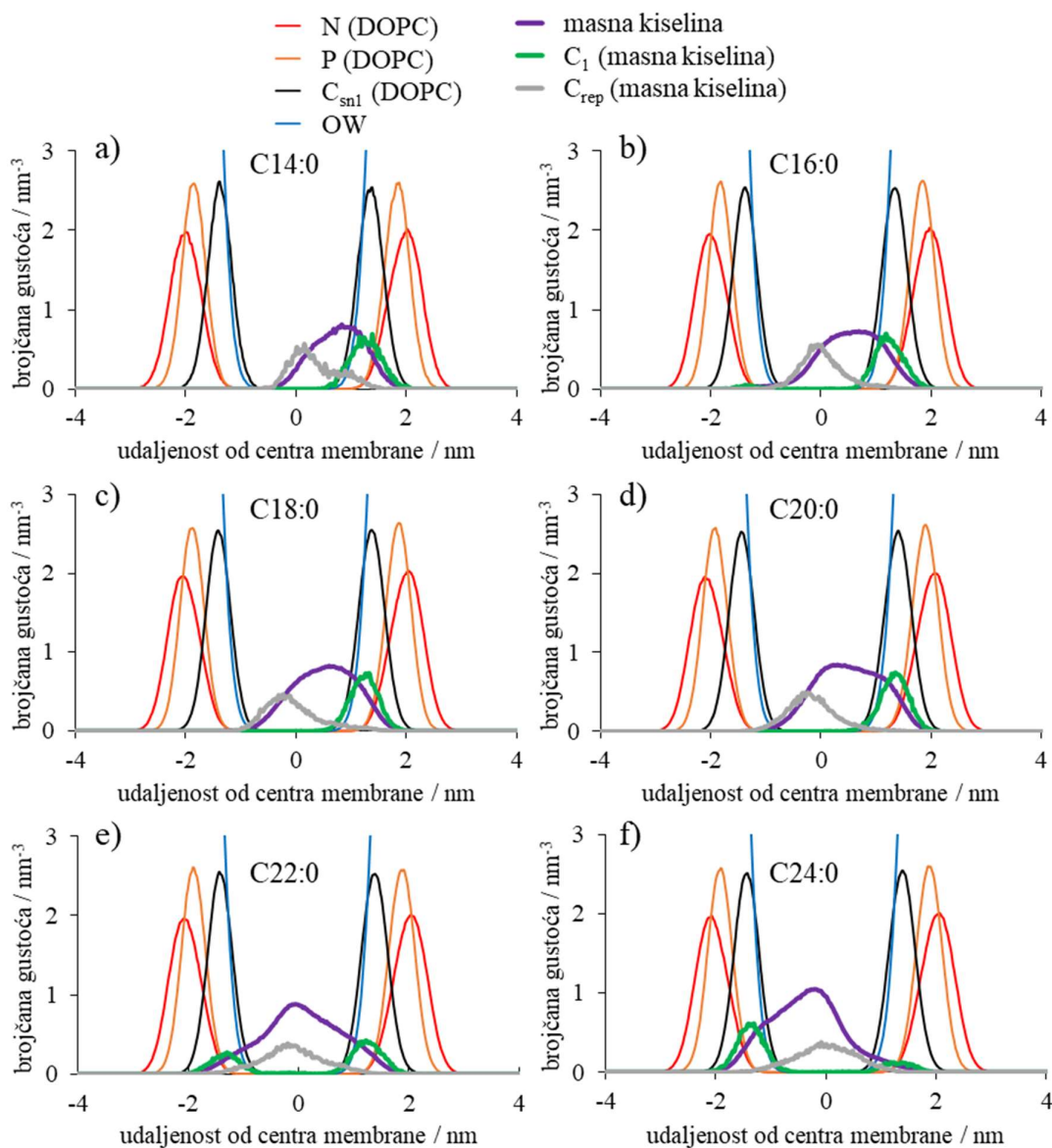
izraženija nego s fosfatom, a kako je već navedeno, duljina lanca ne utječe na položaj i intenzitet vrha.



Slika 20. Radijalna distribucijska funkcija (RDF)  $g(r)$  a) između karboksilnog ugljika neutralne forme masne kiseline i  $sn_2$  atoma ugljika karbonilne skupine DOPC-a i b) između karboksilnog atoma ugljika neutralne forme masne kiseline i atoma fosfora iz fosfatne skupine DOPC-a.

Položaj neutralne forme masne kiseline može se vidjeti na slici 21 gdje su prikazani položaji polarnih „glava“ (C1 atoma) masnih kiselina u odnosu na atome fosfora i  $sn_2$  ugljika lipida te kisika iz vode u slobodnim MD simulacijama. Uočljivo je da su na istoj udaljenosti od centra lipida C1 atomi lipida i „glava“ masne kiseline (C1 atom) te da su uronjeni u vodu dok su dušik i fosfor iz lipida uronjeni još dublje u vodu. DOPC membrana široka je  $\sim 4-5$  nm te je „rep“ masne kiseline u centru fosfolipidnog dvosloja za masne kiseline C14:0 i C16:0, dok se produljenjem lanca „rep“ pomiče prema drugom kraju fosfolipidnog dvosloja, kao i prosječan položaj masne kiseline. Također je vidljivo da su kod duljih masnih kiselina (C22:0 i C24:0) signali masne kiseline na oba kraja lipida što ukazuje na spontanu translokaciju neutralne masne kiseline, implicirajući nisku energetska barijeru već tijekom slobodne MD simulacije. Iz rezultata se može zaključiti i da je masna kiselina najstabilnija u fosfolipidnom dvosloju na  $\sim 1,3$  nm udaljenosti polarne „glave“ masne kiseline od centra membrane te da je hidrofobni „rep“ masne kiseline očekivano okrenut prema lipidnom centru. Naprednom simulacijskom tehnikom molekulske dinamike *umbrella sampling* izračunate su slobodne energije prema ranije opisanom postupku u poglavlju 4 – Teorijska osnova i računalne metode. Iz krivulja slobodne energije je potvrđeno da su masne kiseline stabilizirane u DOPC lipidu te da povećanjem duljine alifatskog lanca dolazi do stabilizacije masnih kiselina. Mjesta minimalnih energija na krivuljama se za sve masne kiseline nalaze na udaljenostima od 1,0 do 1,2 nm od centra membrane, a područje krivulje oko minimuma je plitko što ukazuje da je masna kiselina

stabilizirana podjednako u cijelom području širine  $\sim 0,6$  nm (od 0,8 do 1,4 nm udaljenosti od centra membrane).



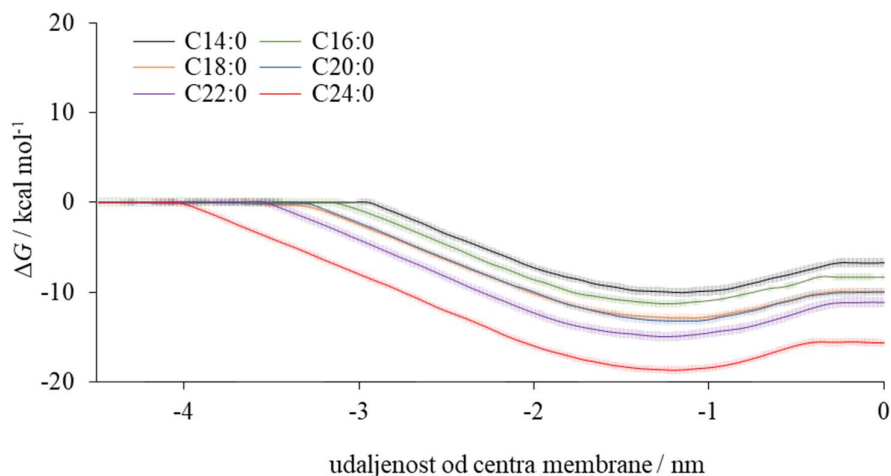
Slika 21. Brojčani profili gustoće za atome iz lipida i neutralne forme masne kiseline i molekulu masne kiseline po z-osi gdje 0 označava centar membrane.

U odnosu na vodu, masna kiselina stabilizirana je od 10,2 do 18,7  $\text{kcal mol}^{-1}$  što se vidi iz niže prikazane tablice 1 i slike 22.

Tablica 1. Slobodne energije translokacije i stabilizacije u kcal mol<sup>-1</sup> te određeni pK<sub>a,odr</sub> s određenom pogreškom za simulirane dugolančane masne kiseline u anionskom i neutralnom obliku.

Masna kiselina	C14:0			C16:0			C18:0		
Oblik kiseline	Neutralna	Anion	Hibrid	Neutralna	Anion	Hibrid	Neutralna	Anion	Hibrid
$\Delta\Delta G_{\text{flip-flop}}$ kcal mol <sup>-1</sup>	3,4 ± 0,3	16,3 ± 0,5	3,5 ± 0,4	3,0 ± 0,3	16,6 ± 0,2	3,2 ± 0,3	2,9 ± 0,2	17,4 ± 0,6	3,4 ± 0,5
$\Delta\Delta G_{\text{stabiliz}}$ kcal mol <sup>-1</sup>	10,2 ± 0,2	7,0 ± 0,3		11,4 ± 0,2	8,3 ± 0,2		13,0 ± 0,1	10,4 ± 0,4	
pK <sub>a,odr</sub>	7,0 ± 0,5			6,9 ± 0,3			6,5 ± 0,6		
Masna kiselina	C20:0			C22:0			C24:0		
Oblik kiseline	Neutralna	Anion	Hibrid	Neutralna	Anion	Hibrid	Neutralna	Anion	Hibrid
$\Delta\Delta G_{\text{flip-flop}}$ kcal mol <sup>-1</sup>	2,8 ± 0,3	17,0 ± 0,5	3,0 ± 0,4	3,8 ± 0,3	17,1 ± 0,5	7,0 ± 0,4	3,2 ± 0,3	17,3 ± 0,5	3,5 ± 0,4
$\Delta\Delta G_{\text{stabiliz}}$ kcal mol <sup>-1</sup>	16,0 ± 0,2	13,0 ± 0,3		15,0 ± 0,2	14,9 ± 0,3		18,7 ± 0,2	15,9 ± 0,3	
pK <sub>a,odr</sub>	6,8 ± 0,3			4,1 ± 0,3			6,5 ± 0,23		

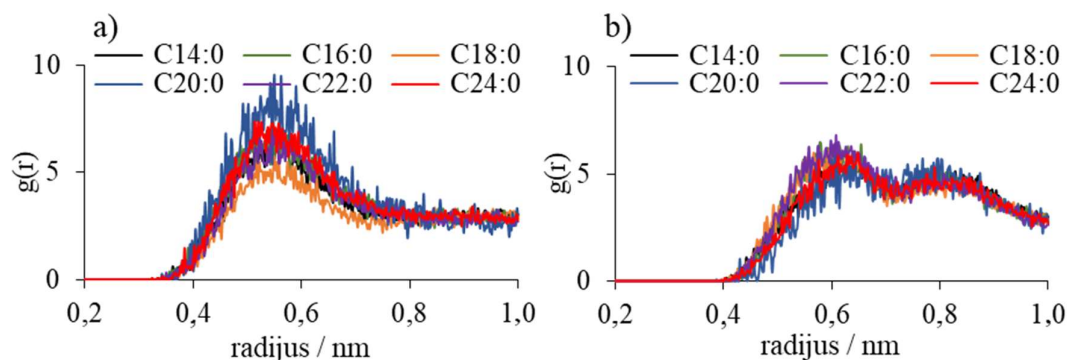
Također se produljenjem lanca masne kiseline ona počinje stabilizirati na većim udaljenostima polarne „glave“ kiseline od centra lipida upravo zbog stabilizacije hidrofobnim interakcijama lanca koji je dulji i prije stvara hidrofobne interakcije s lipidom. Krivulja ima blagi, ravni i neizraženi vrh u centru membrane, a ono što je najvažnije, slobodna Gibbsova energija prijelaza, za sve masne kiseline neovisno o duljini lanca, iznosi 2,8 – 3,8 kcal mol<sup>-1</sup>, tablica 1. Navedeno se slaže s prethodno objavljenim istraživanjima o kojima je pisano u Literaturnom pregledu, u kojima je utvrđeno da je translokacija vrlo brz proces uz nisku barijeru te da je vodljivost protona i barijera translokacije neovisna o duljini lanca masne kiseline. Iako su ovo modelni sustavi, ovako male barijere daju naznake da je u biološkim uvjetima, odnosno na kratkim vremenskim skalama (manje od 10 ms), moguć prijenos protona masnom kiselinom.



Slika 22. Gibbsove slobodne energije za translakaciju neutralnih masnih kiselina kroz lipid. Pogreška je osjenčana transparentnom bojom.

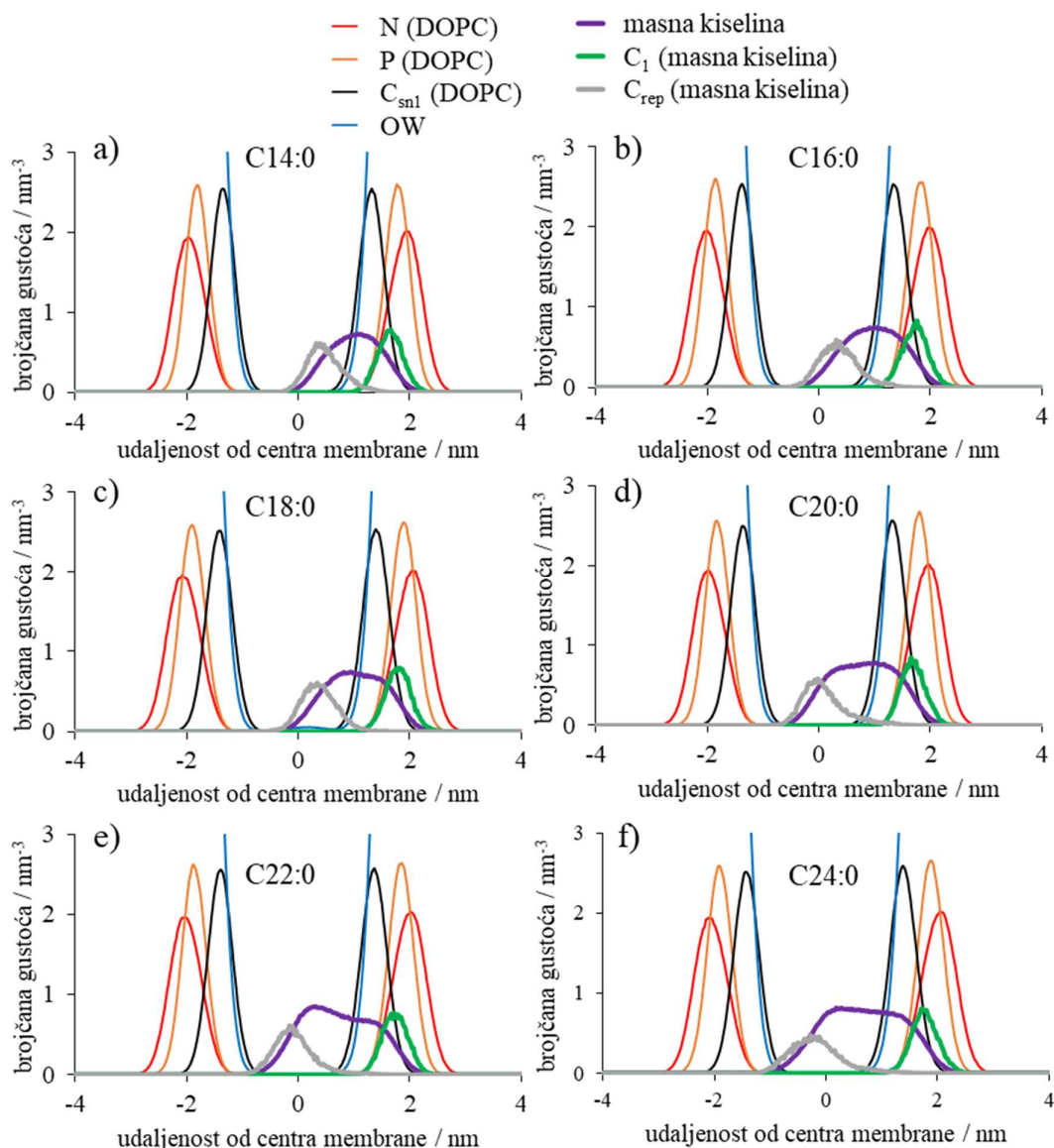
### 5.1.2. Prijenos anionske forme masne kiseline kroz lipid

Kao za neutralne, i za anionske parove masnih kiselina (C14:0 – C22:0) je na identičan način određen položaj u lipidnom dvosloju. Ove forme se nalaze bliže vodenom sloju, odnosno manje su uronjene u lipide i ne tvore vodikove veze s fosforom i ugljikom sn2 iz lipida (slika 23), već je negativna „glava“ masne kiseline okružena polarnom vodom koja neutralizira naboj. Udaljenost između karboksilnog ugljika anionske forme masne kiseline i DOPC atoma karbonila je 0,55 nm, dok drugi vrh ne postoji. Udaljenost između karboksilnog ugljika anionske forme masne kiseline i DOPC atoma fosfora je 0,55 – 0,60 nm, iza čega slijedi drugi vrh na 0,80 nm. Navedene udaljenosti ukazuju da se nisu stvorile vodikove veze već su to odvojeni atomi, za razliku od udaljenosti od 0,45 nm kod neutralnih formi.



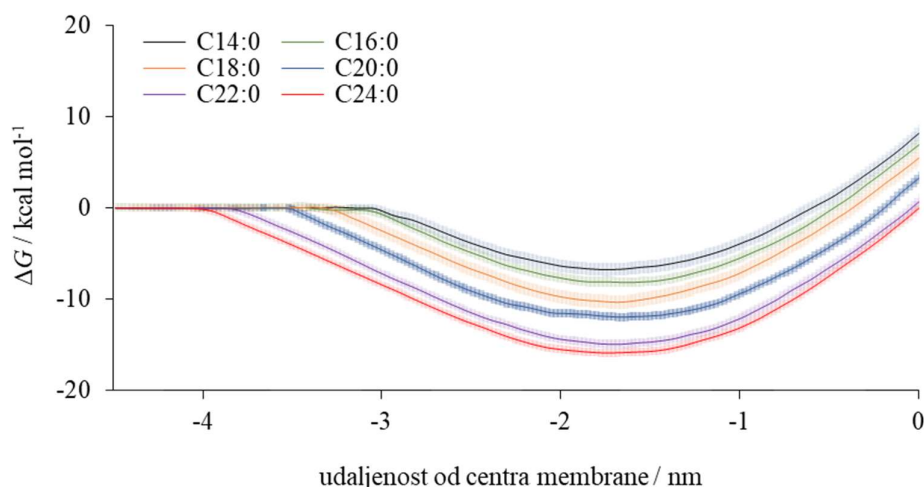
Slika 23. Radijalna distribucijska funkcija (RDF)  $g(r)$  a) između karboksilnog ugljika anionske forme masne kiseline i sn2 atoma ugljika karbonilne skupine DOPC-a i b) između karboksilnog atoma ugljika anionske forme masne kiseline i atoma fosfora DOPC iz fosfatne skupine DOPC-a.

Zbog gore navedenog je položaj anionskih formi više usmjeren prema vodi što je vidljivo i iz profila brojčane gustoće na slici 24, gdje se polarne „glave“ (C1 atomi) masnih kiselina nalaze na  $\sim 1,9$  nm udaljenosti od centra membrane što je za  $\sim 0,6$  nm pliće nego kod neutralnih masnih kiselina. Očekivano, hidrofobni „rep“ masne kiseline okrenut je prema lipidnom centru. Uočljivo je da su kod anionskih formi na istoj udaljenosti od centra lipida atomi fosfora iz lipida i „glava“ masne kiseline (C1 atom) te da su uronjeni u vodu, dok je dušik iz lipida uronjen još dublje u vodu.



Slika 24. Brojčani profili gustoće za atome iz lipida i masne kiseline te molekulu anionske forme masnih kiselina različitih duljina (C14:0 – C22:0) po z-osi gdje je 0 označava centar membrane.

Iz krivulja slobodne Gibbsove energije može se vidjeti da se u odnosu na vodu masna kiselina produljenjem alifatskog lanca stabilizira  $-7,0$  do  $-15,9$  kcal mol<sup>-1</sup> što se vidi iz tablice 1 i slike 25. Kao i kod neutralnih kiselina, i u anionskoj formi se primjećuje isti efekt gdje se produljenjem lanca masne kiseline ona počinje stabilizirati na većim udaljenostima polarne „glave“ kiseline od centra lipida zbog hidrofobnih interakcija lanca kiseline i unutrašnjosti lipida. Mjesta minimalnih energija na krivuljama se za sve masne kiseline nalaze na udaljenostima između 1,6 nm i 1,8 nm od centra membrane, a minimum je kao i kod neutralne kiseline plitak. Gibbsova energija translokacije za sve masne kiseline, neovisno o duljini lanca poprima vrijednosti od 16,3 – 17,4 kcal mol<sup>-1</sup>, što je očekivano visoka energija za prijenos nabijene vrste kroz hidrofobni centar lipidnog dvosloja. Navedena energijska barijera odgovara procesima na vremenskoj skali od minute na više, što je predugo za optimalno funkcioniranje u biološkim sustavima.<sup>54</sup> Za razliku od neutralnih, krivulje slobodne energije anionskih formi posjeduju izražen/oštar vrh u centru membrane.



Slika 25. Gibbsove slobodne energije za translokaciju neutralnih masnih kiselina različitih duljina (C14:0 – C22:0) kroz lipid. Pogreška je osjenčana transparentnom bojom.

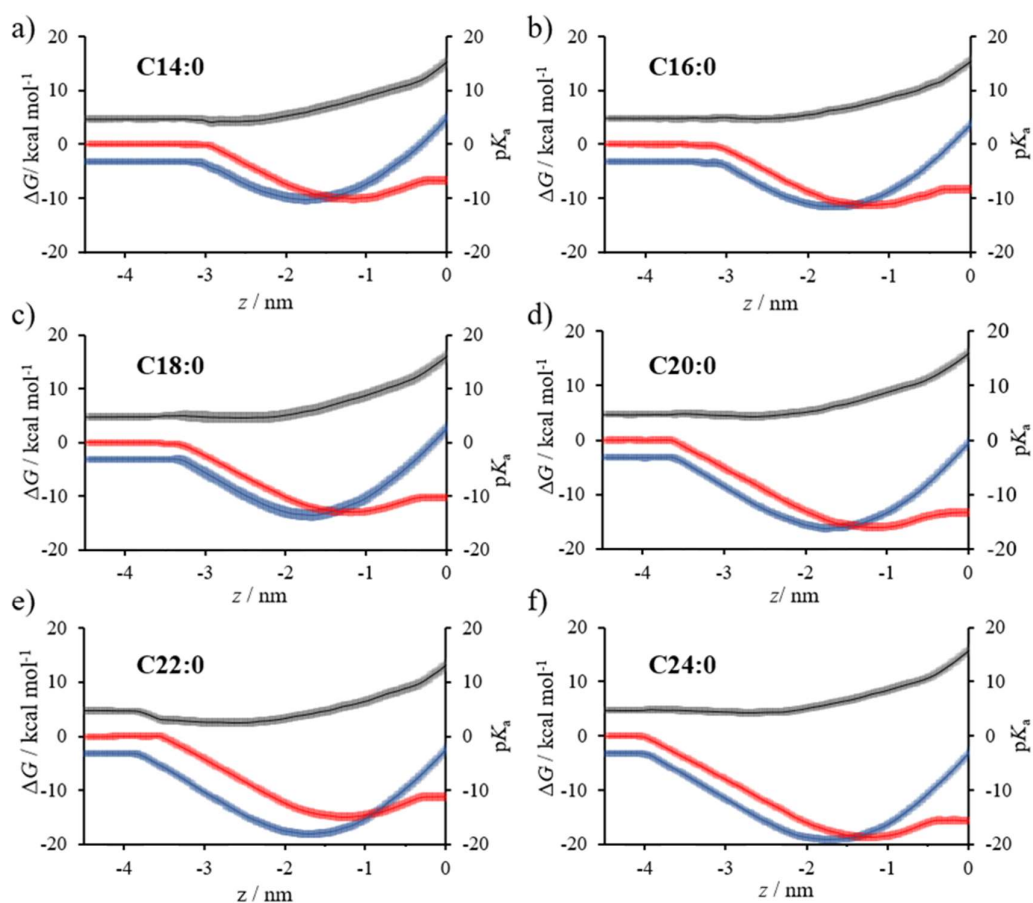
### 5.1.3. $pK_a$ masnih kiselina i hibridni profili

Kada uspoređujemo anionsku i neutralnu formu jedne kiseline potrebno je relativizirati odnos između dobivenih krivulja kako bi ih mogli zajedno prikazati. To je postignuto iz poznate razlike u stabilizaciji anionske i neutralne forme masne kiseline u vodenom mediju gdje je anionska forma stabilnija od neutralne forme u vodenom okruženju za cca. 3 kcal mol<sup>-1</sup> (slika 26). To je potrebno i za određivanje krivulje  $pK_a$  koja se također relativizira u vodenom mediju



prema  $pK_a$  karboksilne skupine koji je procijenjen na 4,75, a morao je biti procijenjen jer masne kiseline nisu topljive u vodi i ne može se izmjeriti točna vrijednost. Navedeni podaci bili su upotrijebljeni kao referenca kako bi relativizirali odnos između izračunatih krivulja slobodnih energija, što je vidljivo iz slike 26 pomakom anionske forme masne kiseline.

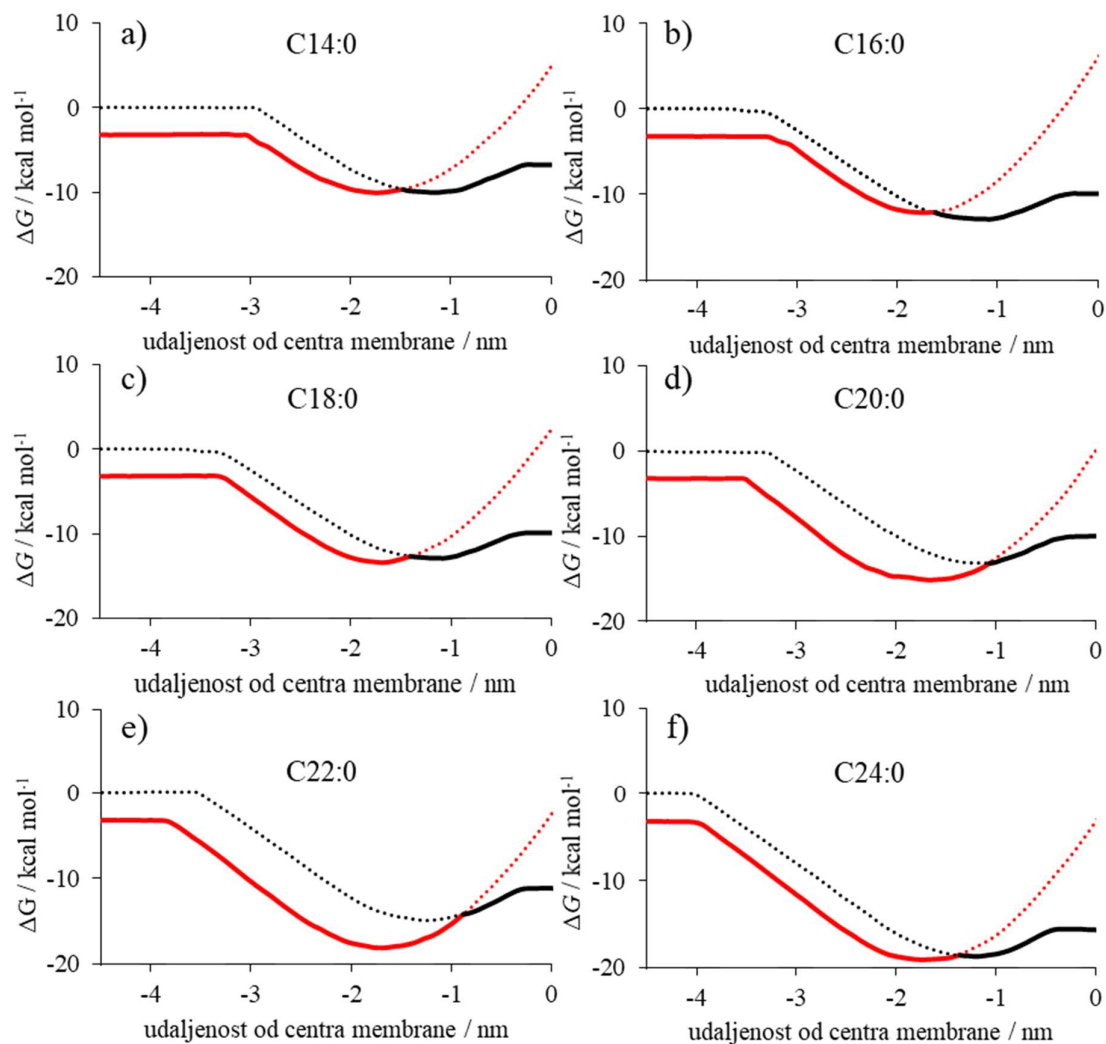
Iz slike 26 vidljivo je da je energetska minimum anionske forme pomaknut prema vodi dok je energetska minimum neutralnog oblika masne kiseline pomaknut više prema centru lipida, što je posljedica s jedne strane stvaranja vodikovih veza neutralne masne kiseline s fosforom i dušikom iz lipida, a s druge strane težnje nabijene anionske „glave“ masne kiseline da bude što izloženija vodi. Minimumi anionske i neutralne forme imaju podjednaku stabilnost, osim kod behenijske masne kiseline (C22:0) kod koje je minimum aniona izraženo stabilniji od minimuma neutralne forme.



Slika 26. Gibbsove slobodne energije za neutralnu (crvena krivulja) i anionsku formu (plava krivulja) te  $pK_a$  (crna krivulja) za sve dugolančane zasićene masne kiseline (C14:0 – C24:0). Anionska krivulja je pomaknuta, odnosno stabilizirana za 3,2 kcal mol<sup>-1</sup> u vodi u odnosu na neutralnu formu. Pogreška je osjenčana transparentnom bojom.

Na slici 26 su prikazane i krivulje  $pK_a$  iz razlika energije anionske i neutralne forme u svakoj točki kroz membranu prema ranije navedenim jednadžbama navedenim u poglavlju 4 u Teorijskoj osnovi i računalnim metodama. Prikazana je krivulja  $pK_a$  za svaku od simuliranih masnih kiselina u svakom položaju masne kiseline od vode kroz lipidni dvosloj. Iz minimuma tako dobivenih krivulja Gibbsove slobodne energije izračunati su određivi  $pK_{a,odr}$  za sve simulirane masne kiseline (tablica 1). Vidljivo je da za svaku masnu kiselinu krivulja  $pK_a$  raste prema centru membrane gdje postiže svoj maksimum. Određivi  $pK_{a,odr}$  porastom lanca masne kiseline blago pada zbog veće stabilizacije anionske forme masne kiseline porastom duljine lanca masne kiseline (tablica 1). Jedino behenijska kiselina (C22:0) odstupa i ima  $pK_{a,odr} = 4,13$ , što je vjerojatno posljedica preniske stabilizacije neutralne forme masne kiseline. Vrijednosti odredivih  $pK_{a,odr}$  vrijednosti su  $\sim 7$  za C14:0 i C16:0, što ukazuje da je udio neutralne i anionske forme kiseline u lipidu podjednak. Ostale masne kiseline (C18:0 – C24:0) imaju  $pK_{a,odr}$  vrijednosti malo niže od 7, što znači da blagu količinsku prednost ima anionska forma, s izuzetkom navedene behenijske kiseline. Anionska i neutralna krivulja sijeku se na udaljenosti  $\sim 1,4$  nm od centra lipidnog dvosloja, gdje je  $pK_a = 7$ , odnosno na tome mjestu se nalazi podjednak broj anionskih i neutralnih oblika masne kiseline, dok prije sjecišta idući prema vodenom sloju prevladava anionska forma, a nakon sjecišta idući prema centru membrane prevladava neutralna forma. Zbog toga se pretpostavlja da je upravo to sjecište krivulja mjesto protoniranja anionske forme masne kiseline, odnosno da je područje širine  $\sim 0,6$  nm oko mjesta koje se nalazi na udaljenosti 1,4 nm od centra membrane moguće mjesto protoniranja jer su obje krivulje plitke i podjednake energije.

Upravo iz tog razloga se mogu se dobiti hibridni profili prikazani na slici 27 prateći krivulje iz vode prema centru lipida, pri čemu je preuzet profil anionske forme sve do udaljenosti od  $\sim 1,4$  nm od centra membrane za većinu masnih kiselina, budući da je anionska forma u toj regiji stabilnija, te je od točke sjecišta, gdje su dvije forme jednako stabilne, idući prema centru lipida preuzet profil neutralne forme masne kiseline budući da je ta forma u navedenoj regiji značajno stabilnija. Kao što je navedeno, mjesto protoniranja bilo bi upravo na mjestu gdje se križaju krivulje slobodne Gibbsove energije neutralne i anionske forme.



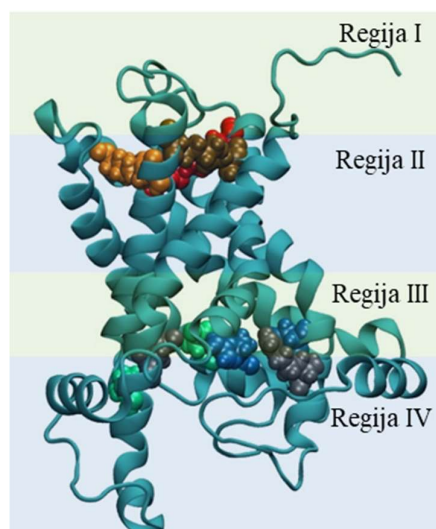
Slika 27. Hibridni profili dobiveni putem najniže energije anionske i neutralne forme različitih duljina lanca masne kiseline (C14:0 – C22:0).

Dobivenim rezultatima računa slobodne energije u modelnom biološkom sustavu pokazano je da se neutralna forma lako translocira kroz lipidnu membranu (barijera  $\sim 3$  kcal mol<sup>-1</sup>), čime su potvrđeni eksperimentalni podaci.<sup>125</sup> Barijera povratka anionske forme iznosi  $\sim 17$  kcal mol<sup>-1</sup>, što je previsoko za biološke sustave i upravo je to razlog sudjelovanja transmembranskih proteina u navedenom mehanizmu kojemu ćemo se detaljnije posvetiti u nastavku.

## 5.2. Uloga mitohondrijskog proteina raspredanja 2 (UCP2) u prijenosu protona kroz unutarnju mitohondrijsku membranu

Kako bi MD simulacijama dobili strukturu UCP2 proteina koja je fiziološki relevantna, najprije su simulirane i analizirane strukture AAC proteina okrenute prema citosolnoj (c-stanje) i matriks strani (m-stanje) membrane. Navedeni rezultati služe kao referenca za usporedbu s novom strukturom UCP2 proteina. Obje strukture su korištene kao „kalup“ u homolognom modeliranju primarne sekvence UCP2 proteina.

Kao što je ranije navedeno, kako bi transmembranski protein bio otvoren prema jednoj od strana s ciljem vezanja nukleotida, on mora tvoriti solnu mrežu na suprotnoj strani, a potencijalna solna mreža na toj strani ne smije se tvoriti. Dakle, kako bi m-strana bila otvorena, mora se tvoriti solna mreža na c-strani s aminokiselinama u parnim  $\alpha$ -uzvojnica (Regija II na slici 28), dok u slučaju otvorene c-strane solna mreža mora postojati na neparnim  $\alpha$ -uzvojnica na m-strani (Regija III na slici 28).

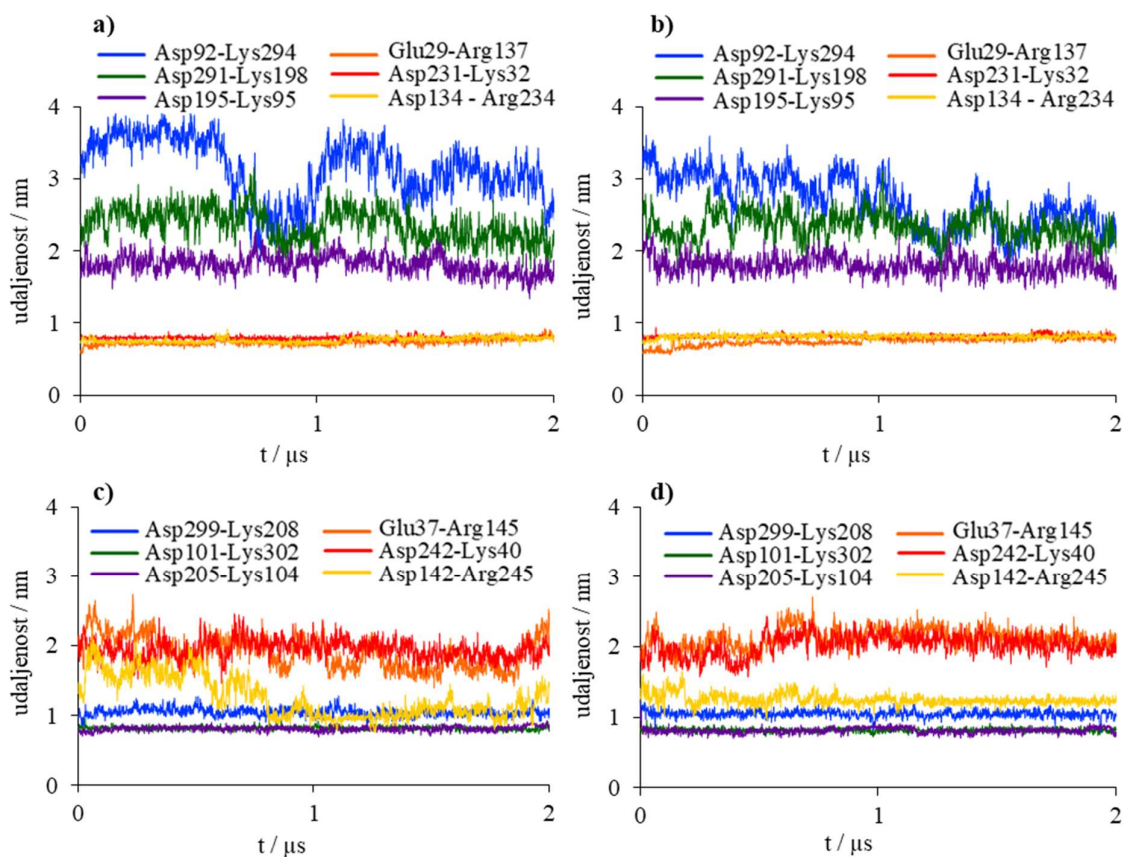


Slika 28. Shematski prikaz proteina podijeljenog u četiri regije. Regija I predstavlja područje proteina u vodi s citosolne strane, Regija II reprezentira transmembranski dio proteina s citosolne strane, Regija III predstavlja transmembranski dio proteina sa strane matriksa, dok je Regija IV područje proteina u vodi sa strane matriksa.

### 5.2.1. AAC protein kao referenca i kalup za UCP2 protein

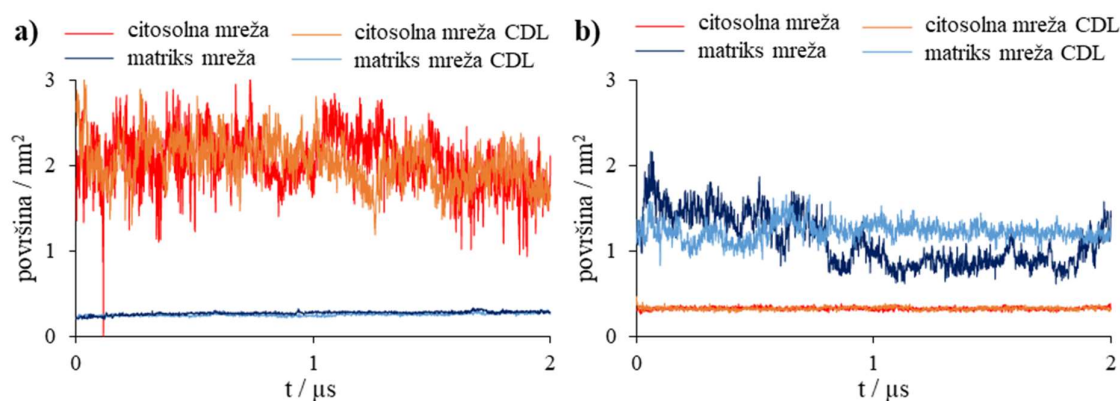
AAC protein simuliran je kako bi analizirani rezultati mogli biti uporište za usporedbu sa simulacijama UCP2 proteina. Simulirane su dvije kristalne strukture, kristalna struktura proteina okrenuta prema citosolu (PDB kod: 1OKC) i kristalna struktura okrenuta prema matriksu (PDB kod: 6GCI).

Najprije su analizirane solne mreže AAC proteina te struktura u kojoj je c-strana otvorena te koja tvori Glu29-Arg137, Asp231-Lys32 i Asp134-Arg234 solnu mrežu s m-strane. U ovom slučaju potencijalna solna mreža koja se nalazi s citosolne strane, tj. Asp92-Lys294, Asp291-Lys198 i Asp195-Lys95, nije stvorena (slika 29). Kvantitativni pokazatelj otvaranja/zatvaranja solne mreže je površina trokuta koji zatvaraju solni mostovi, s matriks strane ona iznosi 0,2 nm<sup>2</sup>, a s citosolne 2,0 nm<sup>2</sup>. Kardiolipin ne utječe na stabilnost solnih mostova. Druga struktura, otvorena prema m-strani tvori solnu mrežu Asp299-Lys208, Asp101-Lys302 i Asp205-Lys104 s citosolne strane (slika 29), dok potencijalna solna mreža Glu37-Arg145, Asp242-Lys40 s matriks strane nije formirana. No, udaljenost para aminokiselina Asp142-Arg245 iz te potencijalne mreže značajno je kraća u usporedbi s preostala dva para aminokiselina.



Slika 29. Mreža solnih mostova u slučaju a) proteina otvorenog prema c-strani bez kardiolipina, b) proteina otvorenog prema c-strani s kardiolipinom, c) proteina otvorenog prema m-strani bez kardiolipina i d) proteina otvorenog prema m-strani s kardiolipinom. Udaljenosti među aminokiselinama koje tvore solnu mrežu na citoplazmatskoj strani su prikazane u crvenoj, narančastoj i tamnožutoj boji dok su udaljenosti među aminokiselinama koje mogu tvoriti solnu mrežu na matriks strani prikazane u plavoj, zelenoj i ljubičastoj boji.

U slučaju formiranih solnih mostova, prosječna udaljenost između para Asp101-Lys302 je nešto dulja nego kod preostala dva para iz mreže, a razlog tomu vjerojatno leži u činjenici da Lys302 predstavlja mutirani dio proteina (mutant Gln302Lys se koristi kako bi se termalno stabilizirala kristalna struktura proteina) te ista pojava nije uočena u divljem tipu (eng. *wild type*, WT) proteina. Površina trokuta koju zatvaraju solni mostovi s citosolne strane iznosi 0,3 nm<sup>2</sup>, a s matriks strane 1,2 nm<sup>2</sup> (slika 30, tablica 2). Niti u ovoj strukturi kardiolipin ne utječe na stabilnost solnih mostova. Kod obje strukture su neformirane solne mreže značajno dinamičnije od formiranih, što se jasno vidi iz analize udaljenosti među aminokiselinama (slika 29).



Slika 30. Površina trokuta koji zatvara solna mreža s citosolne ili matriks strane u vremenu za a) c-stanje i b) m-stanje.

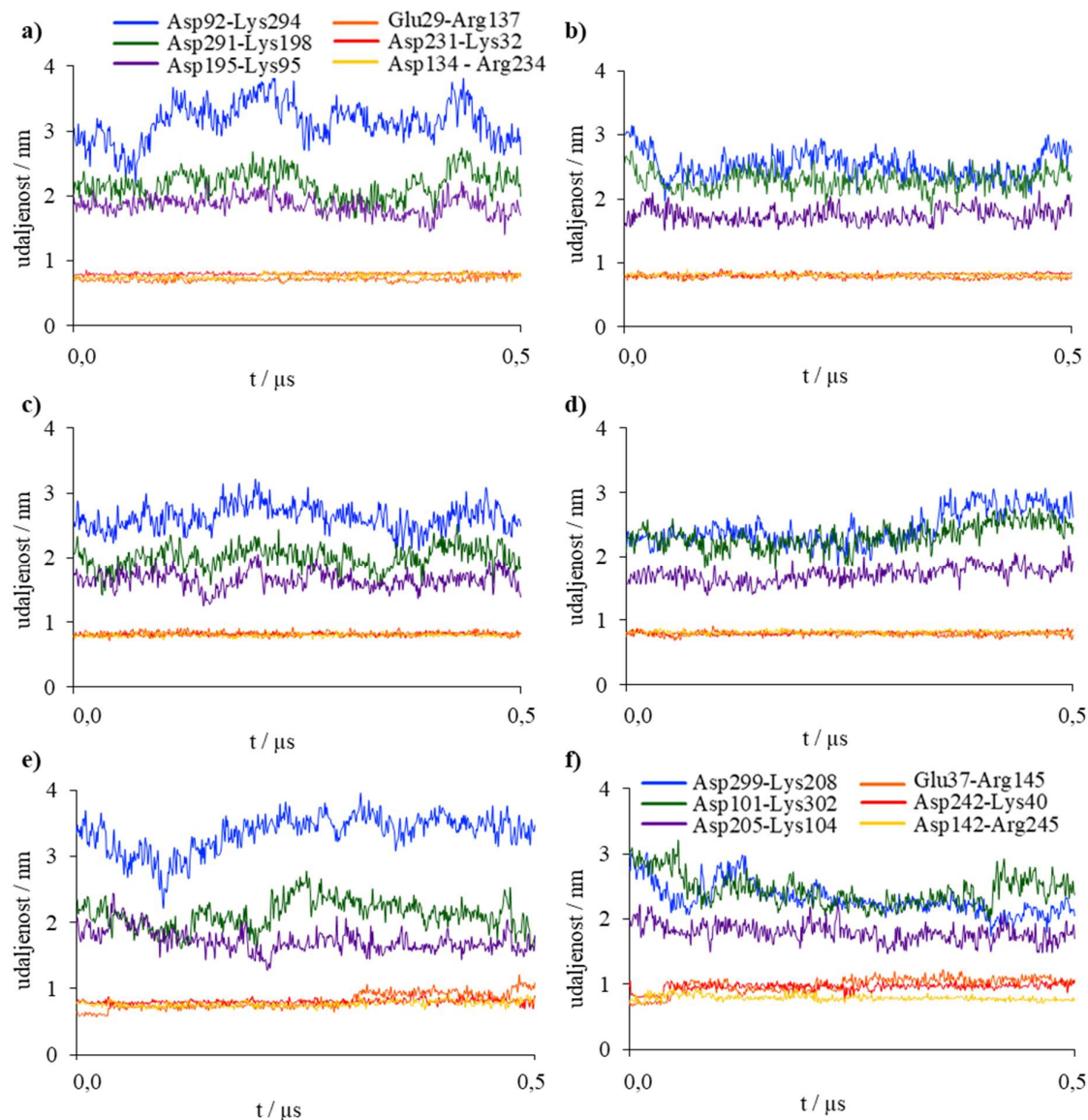
Tablica 2. Prosječna površina trokuta koji zatvara solna mreža s citosolne ili matriks strane.

prosječna površina	c-stanje / nm <sup>2</sup>	c-stanje-CDL / nm <sup>2</sup>	m-stanje / nm <sup>2</sup>	m-stanje-CDL / nm <sup>2</sup>
citosolna solna mreža	2,0	2,0	0,3	0,3
matriks solna mreža	0,2	0,3	1,1	1,2

Navedeni rezultati su potvrđeni kratkim replikama simulacija u trajanju od 500 ns za obje simulirane strukture, u prisutnosti i bez molekula kardiolipina. Replike su pokrenute iz različitih točaka faznog prostora, gdje su kao početne točke simulacija replika korištene strukture koje se javljaju nakon 1 µs i nakon 2 µs (početne brzine su radi izbjegavanja korelacija s prvotnom simulacijom izvedene s nanovo generiranim brzinama atoma prisutnih u sustavu). Dodatno su provedene i simulacije oba sustava u trajanju od 500 ns u heterogenoj membrani pri fiziološkoj koncentraciji NaCl (0,1 M) kako bi se istražilo ponašanje sustava u realnijim biološkim uvjetima. Također je poravnata, a zatim i homološki modelirana sekvenca c-strukture

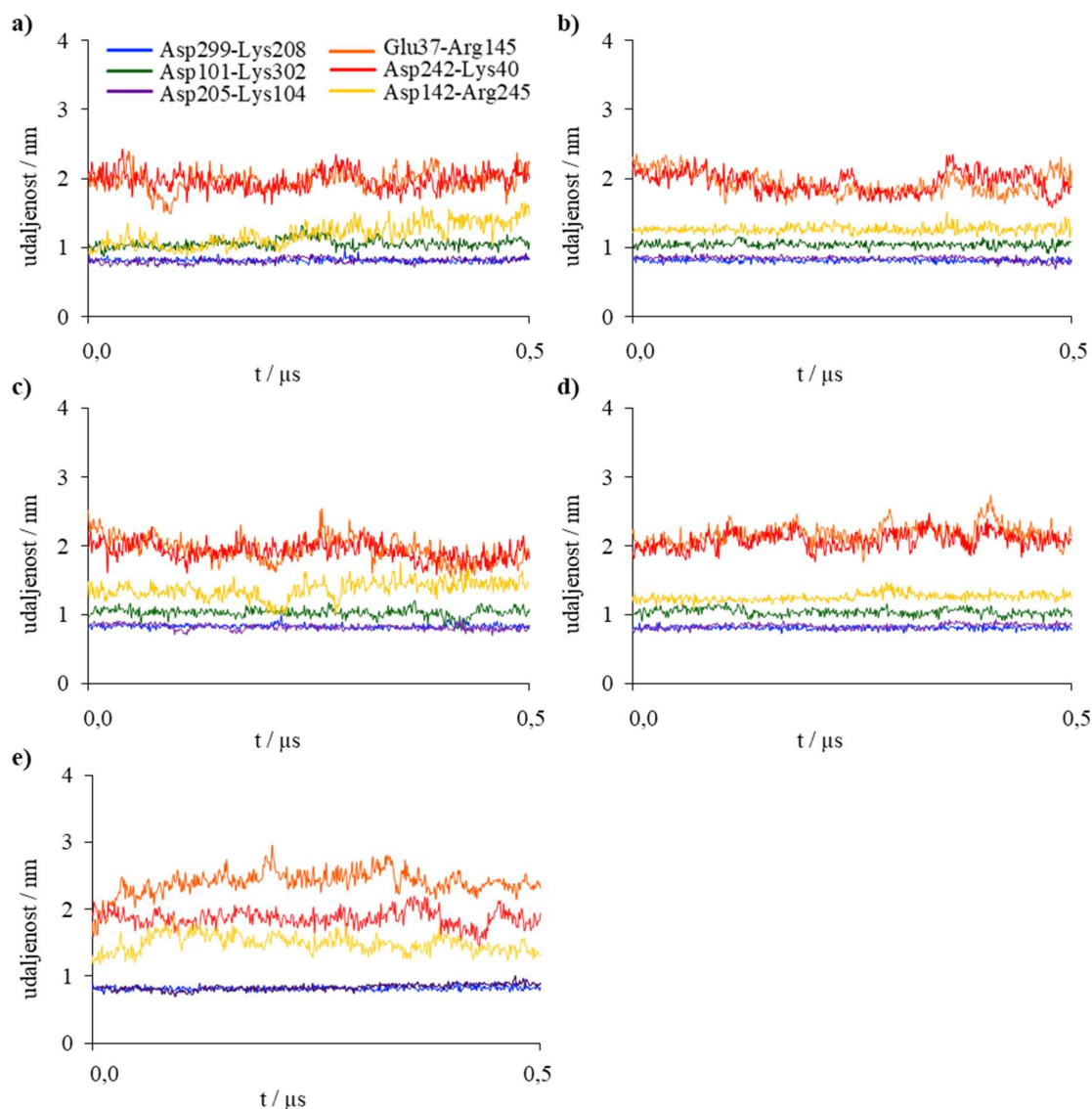


na m-strukturu kako bi se vidjele razlike i stabilnost struktura, budući da su njihove strukture određene iz različitih organizama. Tim postupkom se mogla usporediti ista sekvenca originalno određena u c-stanju s homološki modeliranim m-stanjem. Sve navedeno je prikazano na slici 31 za c-stanje i slici 32 za m-stanje.



Slika 31. Mreža solnih mostova za protein otvoren prema c-strani gdje su svi solni mostovi a-e iz iste sekvence 1OKC dok je kod f) sekvenca 6GCI. a) simulacije pokrenute iz glavne simulacije nakon 1 μs bez kardiolipina b) simulacije pokrenute iz glavne simulacije nakon 1 μs s kardiolipinom, c) simulacije pokrenute iz glavne simulacije nakon 2 μs bez kardiolipina d) simulacije pokrenute iz glavne simulacije nakon 2 μs s kardiolipinom, e) sustav simuliran u heterogenoj membrani u fiziološkoj koncentraciji (0,1 M NaCl) i f) sustav homološki modelirane sekvence c-strukture na m-strukturu.

Na slici 31a-d vidi se da je solna mreža za c-stanje stabilna i u ravnoteži u svim replika simulacijama, što je pokazatelj izuzetne stabilnosti formiranih solnih mreža. Solna mreža stabilna je, iako uz određene male oscilacije, i u heterogenoj membrani pri fiziološkoj koncentraciji soli (slika 31c) te kod homološki modelirane sekvence iz m-strukture na c-strukturu (slika 31d).

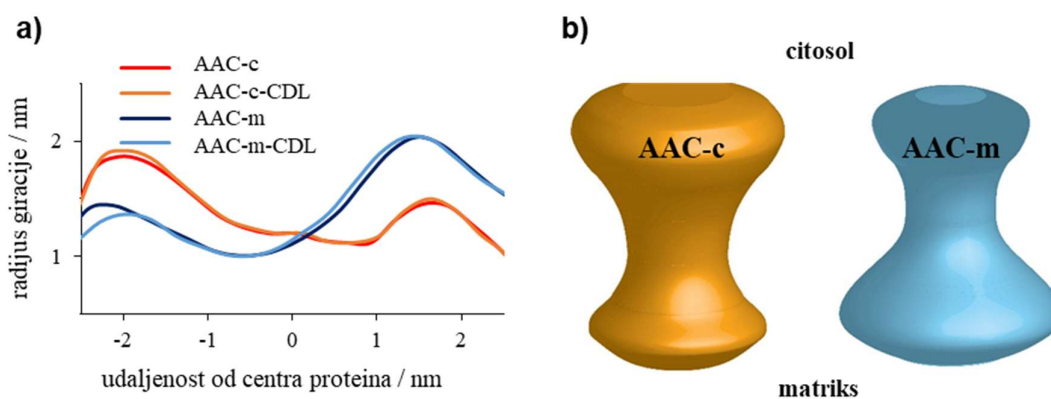


Slika 32. Mreža solnih mostova proteina otvorenog prema m-strani gdje su svi solni mostovi a-e iz iste sekvence IOKC: a) simulacije pokrenute iz strukture nađene nakon 1  $\mu$ s iz prvotne simulacije bez kardiolipina, b) simulacije pokrenute iz strukture nađene nakon 1  $\mu$ s iz prvotne simulacije s kardiolipinom, c) simulacije pokrenute iz strukture nađene nakon 2  $\mu$ s iz prvotne simulacije bez kardiolipina, d) simulacije pokrenute iz strukture nađene nakon 2  $\mu$ s iz prvotne simulacije s kardiolipinom i e) sustav simuliran u heterogenoj membrani pri fiziološkoj koncentraciji soli (0,1 M NaCl).



Kod m-stanja zatvorena solna mreža na citosolnoj strani je stabilna u svim replikama u prisutnosti i bez kardiolipina (slika 32a-d), jedino je udaljenost para Asp101-Lys302 nešto dulja od ostala dva para što je slučaj i u glavnoj simulaciji. Udaljenost para Asp142-Arg245 je i ovdje nešto kraća od ostala dva para solne mreže. Rezultati u heterogenoj membrani s fiziološkom koncentracijom NaCl (slika 32e) odlično se slažu s onima u homogenoj membrani gdje sol nije prisutna u fiziološkoj koncentraciji.

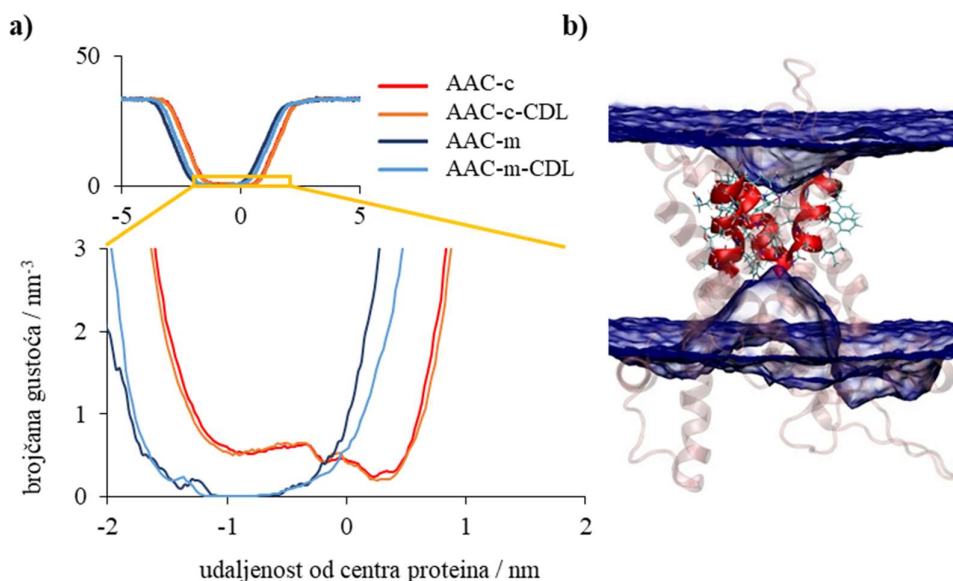
Upravo regije proteina gdje su solne mreže formirane odgovaraju najzatvorenijim dijelovima proteina te iste posjeduju najmanji radijus giracije. Kada se uspoređuju obje strukture, otvoreni dio m-strukture je ukupno širi od otvorenog dijela c-strukture, što je vidljivo iz radijusa giracije (slika 33). Iako m-struktura tvori regiju s najširim radijusom, s druge strane posjeduje i zatvoreniju drugu stranu proteina u usporedbi s c-strukturom, što je također vidljivo iz slike 33.



Slika 33. a) Radijus giracije za c- i m-strukturu proteina uzduž lipidnog dvosloja, gdje  $z < 0$  predstavlja citoplazmatsku stranu membrane, a  $z > 0$  odgovara matriks strani. b) Trodimenzijska rotacijska tijela koja predstavljaju c- i m-strukture u prisustvu kardiolipina izrađena su rotiranjem radijusa giracije oko x-osi (vidi a)).

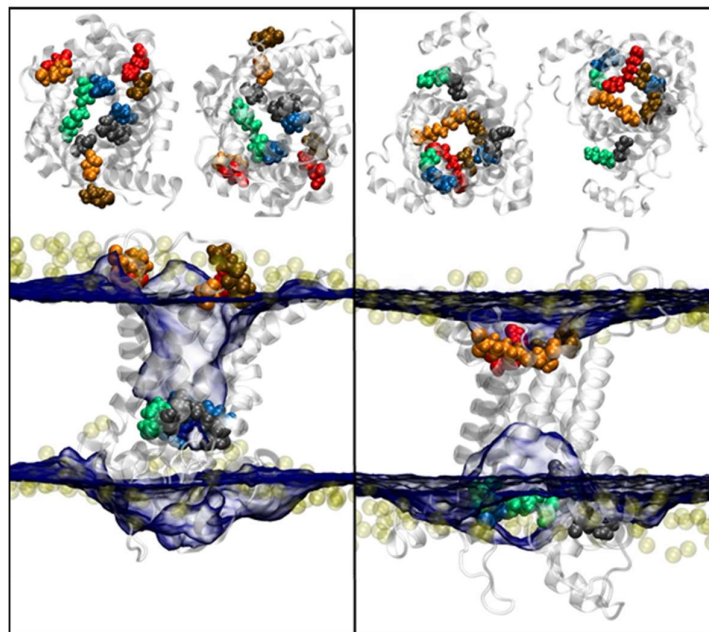
Navedeni radijus prvi je pokazatelj zatvorenije hidrofobne transmembranske unutrašnjosti m-strukture proteina. Na to ukazuje i brojčana gustoća vode uzduž lipida iz koje se može vidjeti da je prosječna gustoća vode za oba proteina manje od jedne molekule vode po  $\text{nm}^3$ , gdje je u slučaju m-strukture ta vrijednost efektivno nula, a i vidljivo je šire područje zatvorenosti proteina nego kod c-strukture (slika 34a). Iako brojčana gustoća vode u c-strukturi nikada nije nula, to ne ukazuje na postojanje vodenog kanala, budući da prisutne molekule vode, kojih je ionako mali broj, ne uspijevaju povezati citosolnu i matriks stranu membrane, što je vidljivo i iz volumne gustoće vode u unutrašnjosti proteina (slika 35 bez CDL, dodatak 2 s CDL). Važno je

napomenuti i da su strukture nepropusne tijekom cjelokupnog trajanja provedenih simulacija (dodatak 3). Također su simulacije replika, simulacije u heterogenoj membrani i simulacije homolognog modela dale ekvivalentne rezultate prethodno navedenima, i u slučaju c- i m-strukture (dodatak 4).



Slika 34. a) Brojčana gustoća vode kroz lipidni dvosloj za c- i m- strukturu proteina, u prisutnosti i bez kardiolipina. b) Volumna mapa vode (transparentna plava boja s izovrijednošću od 0,2) dobivene iz 2  $\mu$ s simulacije za m-strukturu proteina. Hidrofobne parne uzvojnice i aminokiseline su prikazane crvenom bojom i linijama. Protein je prikazan prozirnim  $\alpha$ -uzvojnica.

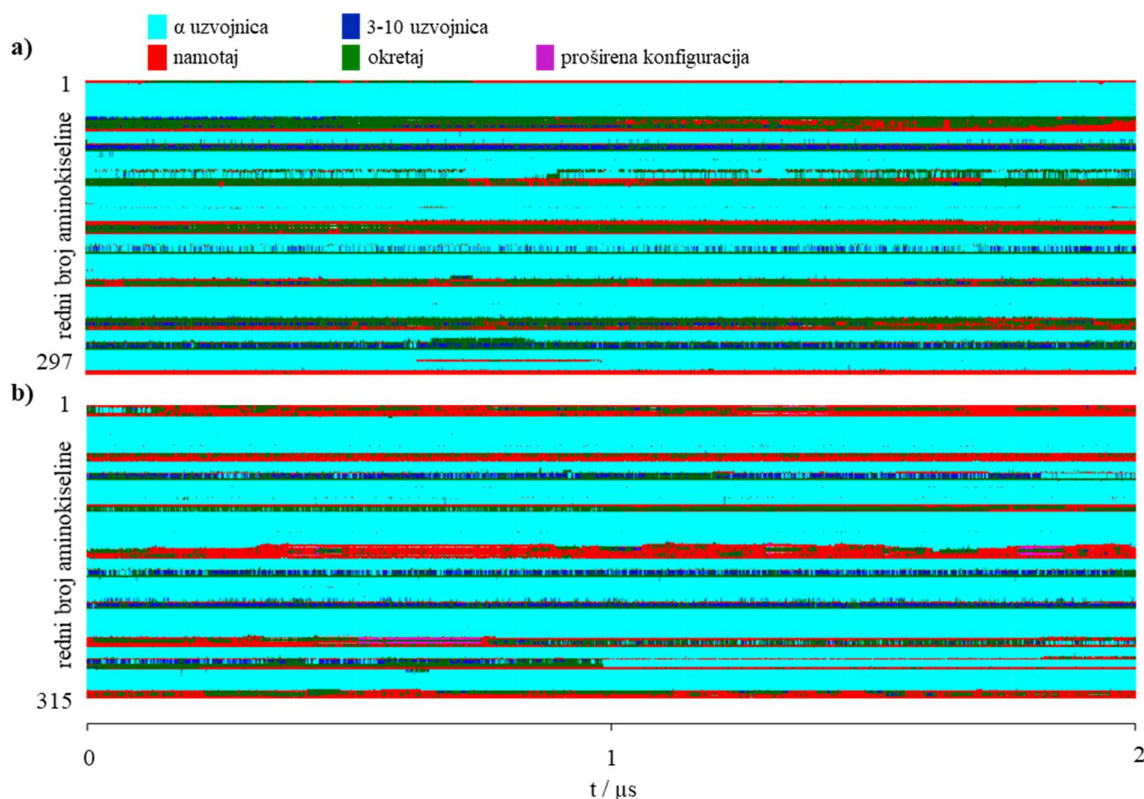
Veća kompaktnost i zatvorenija hidrofobna transmembranska unutrašnjost m-strukture proteina vjerojatno je posljedica kraće duljine ranije navedenog para aminokiselina, tj. Asp142-Arg245, koji i s otvorene strane formira djelomičnu solnu mrežu, a i ispod formirane solne mreže nalaze se hidrofobne aminokiseline koje se nalaze na parnim uzvojnica (2, 4 i 6 uzvojnice s  $\pi$ xxx $\pi$  motivom) proteina koje dodatno hidrofobnim interakcijama čine protein kompaktnijim (slika 34b). Navedeno se može vidjeti i na slici 35 gdje su uspoređene c- i m-struktura, gdje je na lijevom panelu prikazano kako je kod c-strukture isključivo solna mreža odgovorna za zatvorenost proteina i njegovu nepropusnost na vodu koja prodire s citosolne strane. Na panelu desno, tj. u slučaju m-strukture, prodiranje vode s matriks strane sprječavaju ponajprije hidrofobne aminokiseline na parnim uzvojnica, dok solna mreža sprječava ulazak vode s citosolne strane što rezultira većom zatvorenošću proteina.



Slika 35. Volumne mape vode (transparentna plava boja s izovrijednošću od 0,2) dobivene iz 2  $\mu$ s simulacija za c-strukturu (lijevi panel) i m-strukturu (desni panel). Prozirne žute kugle predstavljaju atome fosfora DOPC lipida, aminokiseline koje tvore solnu mrežu s citoplazmatske strane obojene su u žutu, narančastu i smeđu boju, dok su aminokiseline koje tvore solnu mrežu s matriks strane obojene u sivu, plavu i zelenu boju. Protein je prikazan prozirnim  $\alpha$ -uzvojnica.

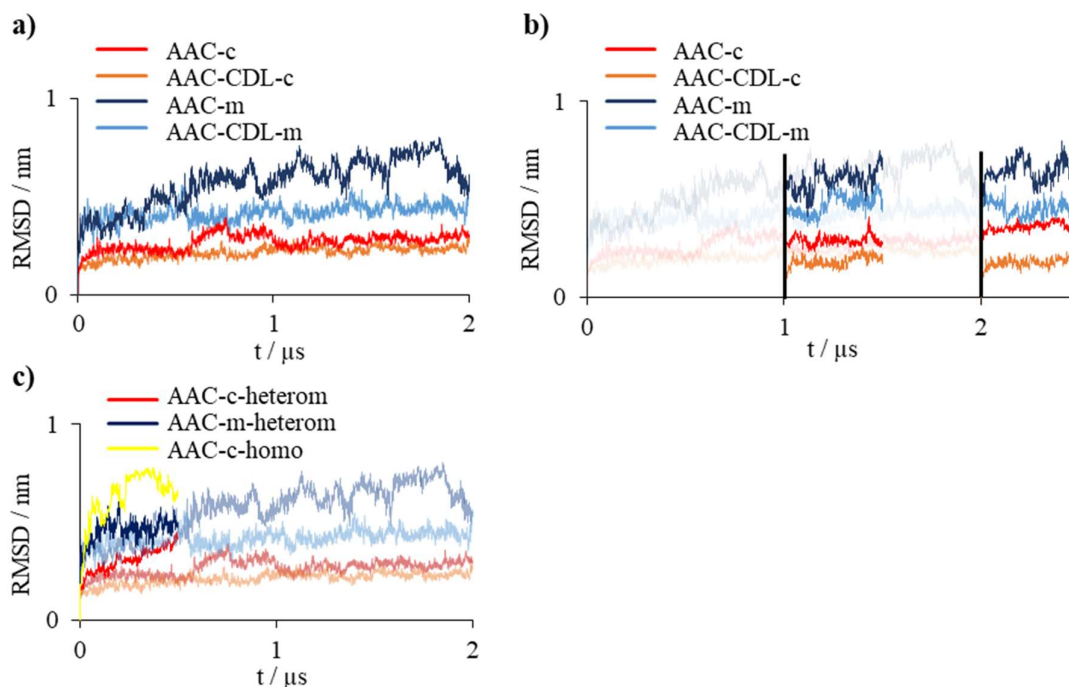
Dobiveni rezultati, gdje je pokazano da su obje strukture nepropusne za vodu, potvrđuju ekperimentalne podatke za AAC protein u kojima je protein nepropusan za vodu i zatvoren, što je vrlo važno jer bi propuštanje vode kroz protein moglo uzrokovati i propuštanje iona, čime bi se narušio transmembranski gradijent iona. Ovaj slučaj imamo upravo kod NMR strukture UCP2 proteina gdje struktura proteina nije fiziološki relevantna upravo zbog propuštanja vode i formiranja vodenog kanala kroz protein što će biti i pokazano u odlomku 5.2.2.

Svi prikazani rezultati ukazuju na stabilnost obje strukture, a to pokazuje i analiza sekundarne strukture (slika 36 bez CDL i dodatak 5 s CDL), odnosno  $\alpha$ -uzvojnica, koje su stabilne u vremenu. Uočljivo je kako je svih šest glavnih uzvojnica proteina koje su prikazane svijetloplavom bojom očuvano u vremenu te da kardiolipin ne utječe na stabilnost sekundarne strukture.



Slika 36. Prikaz sekundarne strukture u vremenu za glavnu simulaciju u trajanju od 2  $\mu$ s za a) c-strukturu i b) m-strukturu bez kardiolipina.

Stabilnost proteina i strukturne promjene koje nastupaju tijekom simulacije praćene su posredstvom srednjeg korijenskog kvadratnog odstupanja (eng. *root-mean-square deviation*, RMSD) okosnice proteina, odnosno  $C\alpha$  atoma proteina u vremenu (slika 37). Analiza četiri glavne simulacije (slika 37a) pokazuje da najveće strukturne promjene proteina nastupaju na samom početku simulacije te su u slučaju c- strukture nešto manje u odnosu na m-strukturu. Usporedbom c-struktura proteina sa i bez kardiolipina, može se vidjeti da su promjene neznatno manje u prisutnosti kardiolipina. Nadalje, m-struktura pokazuje znatno veće strukturne oscilacije u izostanku kardiolipina. Sve provedene replike simulacija (slika 37b) pokazuju isti trend kao i prvotne (duže) simulacije, dok su strukturne promjene proteina u simulacijama u heterogenoj membrani i homolognom modelu (slika 37c) nešto veće u slučaju c-strukture. Iz RMSD analize može se vidjeti da, za razliku od sekundarne strukture u kojoj je struktura jednako smotana bez obzira na kardiolipin, njegov utjecaj na smanjenje konformacijskih promjena proteina je značajan, pogotovo kod m-strukture.

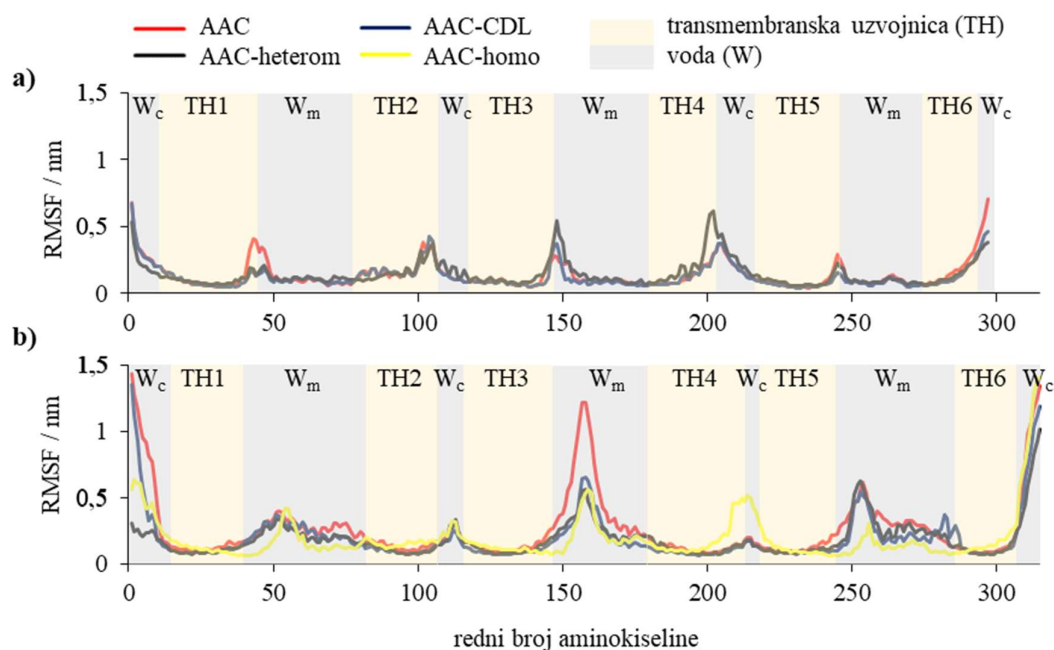


Slika 37. RMSD analiza u vremenu za a) četiri prvotne simulacije u trajanju od 2  $\mu\text{s}$ , b) simulacije pokrenute iz struktura nađenih nakon 1  $\mu\text{s}$  i 2  $\mu\text{s}$  u prvotnim simulacijama i c) simulacija u heterogenoj membrani pri fiziološkoj koncentraciji od 0,1 M NaCl te simulacija homološki modelirane sekvence m-strukture na c-strukturu. AAC-c predstavlja strukturu proteina okrenutu prema c-strani, AAC-CDL-c je struktura proteina okrenuta prema c-strani u prisutnosti kardiolipina, AAC-m označava strukturu proteina okrenutu prema m-strani, AAC-CDL-m je struktura proteina okrenuta prema m-strani u prisutnosti kardiolipina, AAC-c-heterom označava strukturu proteina okrenutu prema c-strani u heterogenoj membrani, AAC-m-heterom predstavlja strukturu proteina okrenutu prema m-strani u heterogenoj membrani te AAC-c-homo reprezentira homološki modeliranu strukturu okrenutu prema c-strani.

Kako bi vidjeli lokalne dijelove tercijarne strukture proteina na koje kardiolipin najviše utječe, provedena je analiza fluktuacija ili analiza srednje korijenske kvadratne promjene (eng. *root-mean-square fluctuation*, RMSF) po rednom broju aminokiselina (slika 38). Očekivano, najviše fluktuiraju C- i N- krajevi proteina te dijelovi proteina koji su u vodi ili na granici lipid/voda. Može se vidjeti i da je protein uronjeniji u vodu s matriks strane zbog prisutnosti tri okomite kratke uzvojnice koje su smještene na toj strani. Općenito, manje fluktuacije pokazuje c-struktura u odnosu na m-strukturu te pritom prisustvo kardiolipina smanjuje fluktuacije kod obje strukture, što je opet značajnije izraženo u m-strukturi. Zanimljivo je i to da c-struktura najviše fluktuiraju na granici lipid/voda dok se isto u slučaju m-strukture opaža u vodenom okruženju. Analiza homolognog modela sekvence m-strukture na c-strukturu prikazana je na slici 37b žutom linijom, što omogućava direktnu usporedbu c- i m- struktura za istu sekvencu.



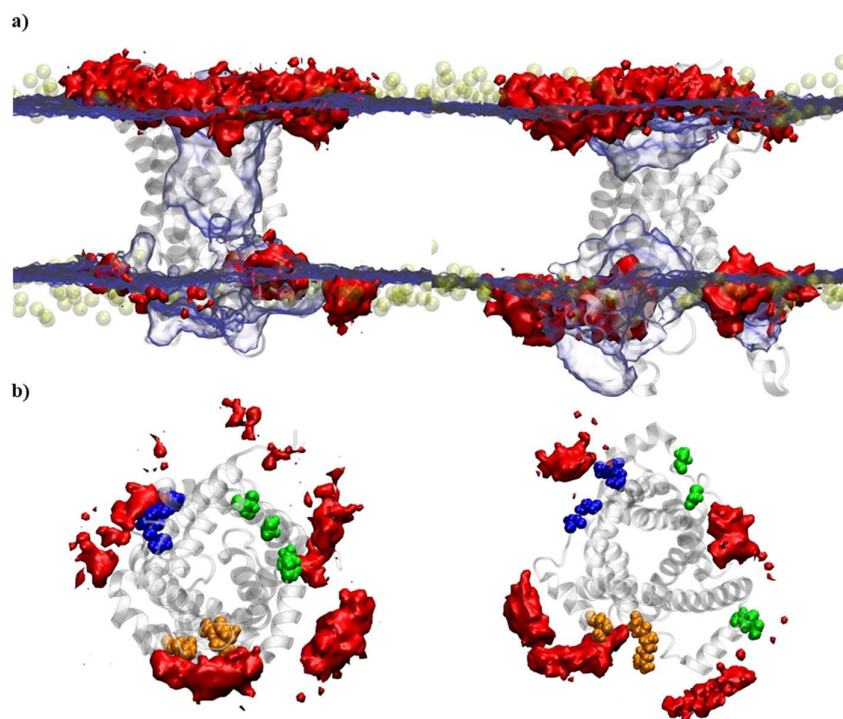
Pritom je vidljivo da se c-struktura općenito manje mijenja duž cijelog proteina. Istodobno je fluktuacija navedene c-strukture između transmembranskih uzvojnica 4 i 5 u vodi na citosolnoj strani veća, dok m-struktura gotovo da i ne pokazuje oscilacije u toj regiji. Rezultati analize fluktuacija (dodatak 6 za c-strukturu i dodatak 7 za m-strukturu) ukazuju da su strukturne promjene općenito manje u slučaju simulacija replika, što je moguće obrazložiti činjenicom da su te simulacije kraće od prvotnih (500 ns vs. 2  $\mu$ s), a i činjenicom da same početne točke tih simulacija odgovaraju sustavima koji su u ravnoteži.



Slika 38. Analiza fluktuacija (RMSF) po rednom broju aminokiselina za a) c-strukturu i b) m-strukturu, žutom bojom je prikazan homološki model sekvence na c-strukturu.

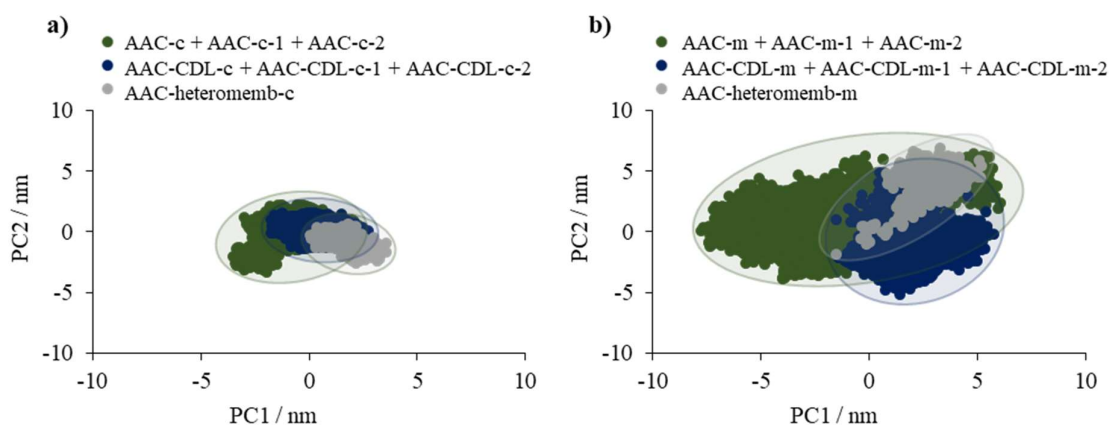
RMSD i analiza fluktuacija (RMSF) ukazuju na manju pokretljivost proteina kada su prisutne molekule kardiolipina, i to posebno u slučaju m-strukture. Kod heterogene membrane je u samom sastavu lipida prisutan i kardiolipin s obje strane dvosloja te tijekom simulacije od 500 ns dolazi do spontanog nakupljanja kardiolipina s matriks strane kod obje strukture (slika 39). Kardiolipin (3 kardiolipina kod c-strukture i 4 kod m-strukture) koji je određen na kristalnim strukturama je također u obje strukture prisutan s matriks strane i to na specifičnim područjima (dodatak 2) na koja se spontano okupio u simulaciji u heterogenoj membrani što je vidljivo na slici 39. U slučaju c-strukture ta područja se poklapaju s aminokiselinama S68, G72, T154 i G155 (prvo područje), aminokiselinama Q174, G175, G252 i T253 (drugo područje) i

aminokiselinama G52, I53, G272 i W274 (treće područje). Kod m-strukture ta područja odgovaraju nakupini aminokiselina A77, G81, N164 G165 (prvo područje), aminokiselinama R184, G185, S260 i S261 (drugo područje) i aminokiselinama G61, I62, G280 i G282 (treće područje). Zanimljivo je da su mjesta vezanja kardiolipina uglavnom bogata glicinima. Ta mjesta okupljanja kardiolipina razlog su za povećanu stabilnost tercijarne strukture proteina m-strukture jer oni učvršćuju i na određeni način fiksiraju strukturu sprječavajući fluktuacije. U m-strukturi upravo na toj strani nije formirana solna mreža koja stoga ne drži tu stranu zatvorenu, a upravo se na toj strani nalazi veća regija proteina koja je uronjena u vodu u usporedbi s citosolom. Time je protein podložniji fluktuacijama u usporedbi sa slučajem u kojemu je otvoren prema citosolnoj strani te upravo iz tog razloga postoje navedena vezna mjesta za kardiolipine koji smanjuju potencijalne fluktuacije.



Slika 39. Volumne mape vode (transparentna plava boja s izovrijednošću od 0,2) i atoma fosfora u kardiolipinu (crvena boja s izovrijednošću 0,01) dobivene iz 500 ns simulacija u heterogenoj membrani za c-strukturu (lijevi panel) i m-strukturu (desni panel) prikazane a) bočnim presjekom kroz lipid i b) „odozdo”. Prozirne žute kugle predstavljaju atome fosfora DOPC lipida, aminokiseline koje tvore solnu mrežu s citoplazmatske strane obojene su u žutu, narančastu i smeđu boju, dok su aminokiseliname koje tvore solnu mrežu s matriks strane obojene u sivu, plavu i zelenu boju. Protein je prikazan prozirnim  $\alpha$ -uzvojnica.

Kada je protein otvoren prema c-strani, solni mostovi tu stranu proteina drže zatvorenom i nepropusnom za vodu dok je na citosolnoj strani značajno manji dio proteina izložen vodi (također ne postoje tri kratke okomite uzvojnice) te samim time protein nije toliko podložan fluktuacijama. Utjecaj kardiolipina na strukturu AAC proteina vidljiv je i iz analize glavnih komponenti (eng. *principal components analysis*, PCA). Na slici 40 je vidljivo da sama c-struktura pokriva manje područje u konformacijskom faznom području imajući u vidu prve dvije glavne komponente (eng. *principal components*, PC) koje su bazirane na atomima ugljika koji pripadaju okosnici proteina. Rezultat pronađen u slučaju c-strukture je gotovo neovisan o prisutnosti kardiolipina, tj. konformacijski fazni prostor je tek nešto manji u simulacijama u kojima je kardiolipin prisutan. Utjecaj kardiolipina na m-strukturu je znatno veći te se pritom može primijetiti da je konformacijski fazni prostor značajno manji u prisustvu kardiolipina. PCA u heterogenoj membrani također pokazuje manje područje pokrivenosti kod obje strukture u odnosu na simulacije bez kardiolipina, iako na umu treba imati da je i sama simulacija kraća (500 ns) od ostalih (2  $\mu$ s). Kod simulacija replika konformacijski fazni prostori se preklapaju s područjima nađenim u prvotnim (dugim) simulacijama (dodatak 8a). Tako kod c-strukture dolazi do manjih promjena u strukturi neovisno o prisutnosti kardiolipina, dok su u slučaju m-strukture vidljive značajnije promjene u strukturi kada je kardiolipin prisutan (dodatak 8b). Općenito možemo zapaziti da je c-struktura u svakom slučaju podložna manjim fluktuacijama, tj. strukturno je stabilnija u odnosu na m-strukturu.



Slika 40. Projekcije struktura dobivenih simulacijama a) c-strukture i b) m-strukture na prve dvije zajedničke glavne komponente koje su izrađene uzeti u obzir sve ugljikove atome koji tvore okosnicu proteina.

Uspoređujući sve navedene rezultate za dvije objavljene kristalne strukture AAC proteina, gdje je jedna otvorena prema citosolu (c-struktura), a druga prema matriksu (m-



struktura), može se zaključiti da je c-struktura proteina stabilnija od m-strukture. Kod obje strukture transmembranski dio proteina nije podložan promjenama, dok je dio proteina izložen vodi daleko najpodložniji promjenama u samoj strukturi. Pokazano je i da su obje strukture nepropusne na vodu te da je u slučaju c-strukture glavni uzrok tome formirana solna mreža s matriks strane, dok su kod m-strukture uz solnu mrežu na citosolnoj strani važan čimbenik i transmembranske hidrofobne parne uzvojnice s  $\pi\text{xxx}\pi$  motivom. Molekule kardiolipina najviše utječu na stabilnost m-strukture proteina okupljajući se u tri različite regije čime „fiksiraju“ i stabiliziraju m-strukturu proteina, dok je c-struktura sama po sebi stabilna te prisutnost kardiolipina tek neznatno doprinosi stabilizaciji.<sup>126</sup>

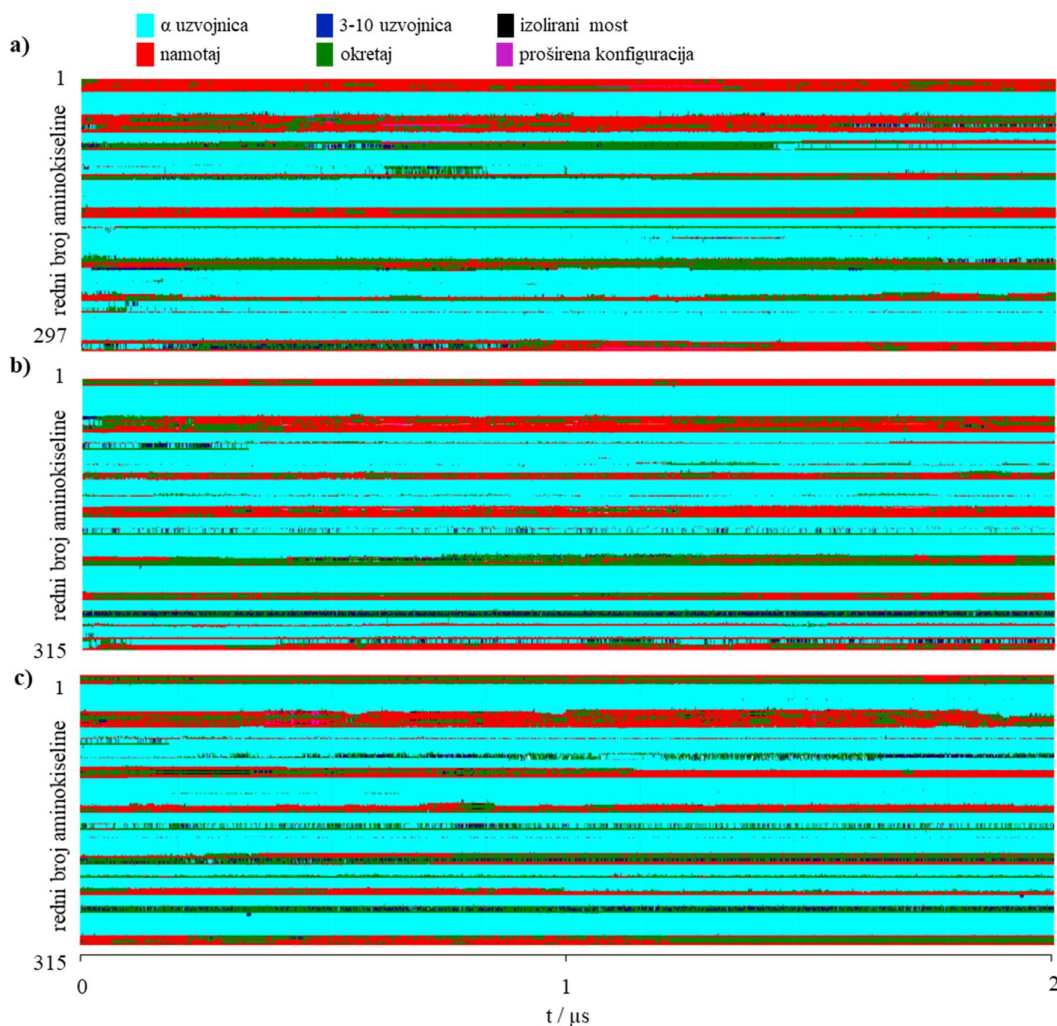
Ovime je dan detaljan i iscrpan pregled referentnih struktura AAC proteina koje su temelj i „kalup“ za homološke modele UCP2 proteina, čija analiza je prikazana u nastavku.

### 5.2.2. *Struktura UCP2 proteina*

Kako struktura UCP2 proteina određena NMR-om nije fiziološki relevantna, bilo je potrebno prvo odrediti strukturu koja će se moći koristiti u daljnjim simulacijama. Korištena su tri sustava, homološki modelirane strukture UCP2 proteina otvorene prema citosolu i matriksu te NMR-om određena struktura proteina kako bi se vidjelo može li se NMR struktura promijeniti tijekom simulacije te može li se dobiti fiziološki relevantna struktura. Sve tri strukture uspoređene su s AAC c- i m-strukturama koje predstavljaju najsličnije referentne strukture koje su kristalografski određene i koje smo prethodno detaljno karakterizirali (poglavlje 5.2.1). Provedene i detaljno analizirane simulacije kristalnih struktura AAC proteina temelj su daljnjih simulacija UCP2 proteina. Iz analize AAC proteina možemo zaključiti da struktura UCP2 proteina svakako mora biti nepropusna na vodu te kako glavni strukturni motivi moraju biti očuvani u vremenu. Kako je kod AAC proteina c-struktura znatno stabilnija, a i NMR struktura UCP2 proteina je određena tako da je otvorena prema citosolu, veći fokus je na c-strukturi UCP2 proteina, iako su prikazani i rezultati m-strukture proteina. Iz svih analiza AAC struktura nema vidljive razlike u ponašanju proteina u homogenoj i heterogenoj membrani pri fiziološkoj koncentraciji soli. Dakle, zbog što jednostavnije interpretacije, sustavi za određivanje UCP2 strukture provedeni su u homogenoj DOPC membrani. Iz istog razloga molekule kardiolipina nisu uzete u obzir jer na strukturu okrenutu prema citosolu kod AAC-a molekule kardiolipina ne utječu niti na stabilnost niti na strukturu. I na kraju, rezultati homološki modelirane sekvence m-strukture na c-strukturu AAC proteina pokazali su se prikladnima te je struktura usporediva

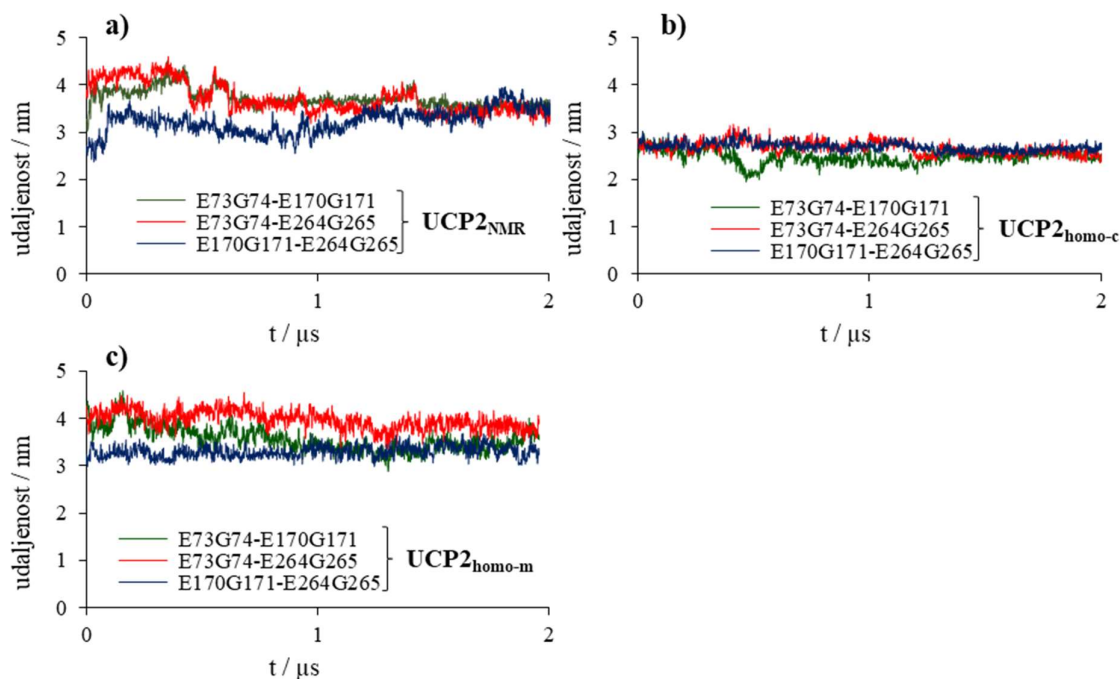
s c-strukturom koja je određena kristalografski, tako da upravo ona predstavlja dobru referencu u izradi homoloških modela UCP2 proteina. Ovo trenutno predstavlja i jedini pokušaj, uz provođenje simulacija NMR-om određene strukture, dobivanja fiziološki relevantne strukture UCP2 proteina. Priprema sustava i postupak homolognog modeliranja detaljno su opisani u Računalnim metodama (poglavlje 4.2.3).

Nakon pažljivog odabira simulacijskog sustava provedene su tri opsežne MD simulacije, svaka u trajanju od 2  $\mu$ s, za sustav od primarne važnosti, tj. NMR-om određenu strukturu i homološki modelirane c- i m-strukture. Stabilnost sekundarne strukture, odnosno  $\alpha$ -uzvojnica kod svih struktura nije upitna, što je vidljivo iz slike 41 iz koje se može vidjeti da ne dolazi do značajnih promjena u smotanosti proteinskih  $\alpha$ -uzvojnica tijekom 2  $\mu$ s, odnosno sekundarna struktura proteina kod svih struktura ostaje očuvana u vremenu.



Slika 41. Prikaz sekundarne strukture UCP2 proteina u vremenu za a) NMR-om određenu strukturu, b) homološku c-strukturu i c) homološku m-strukturu.

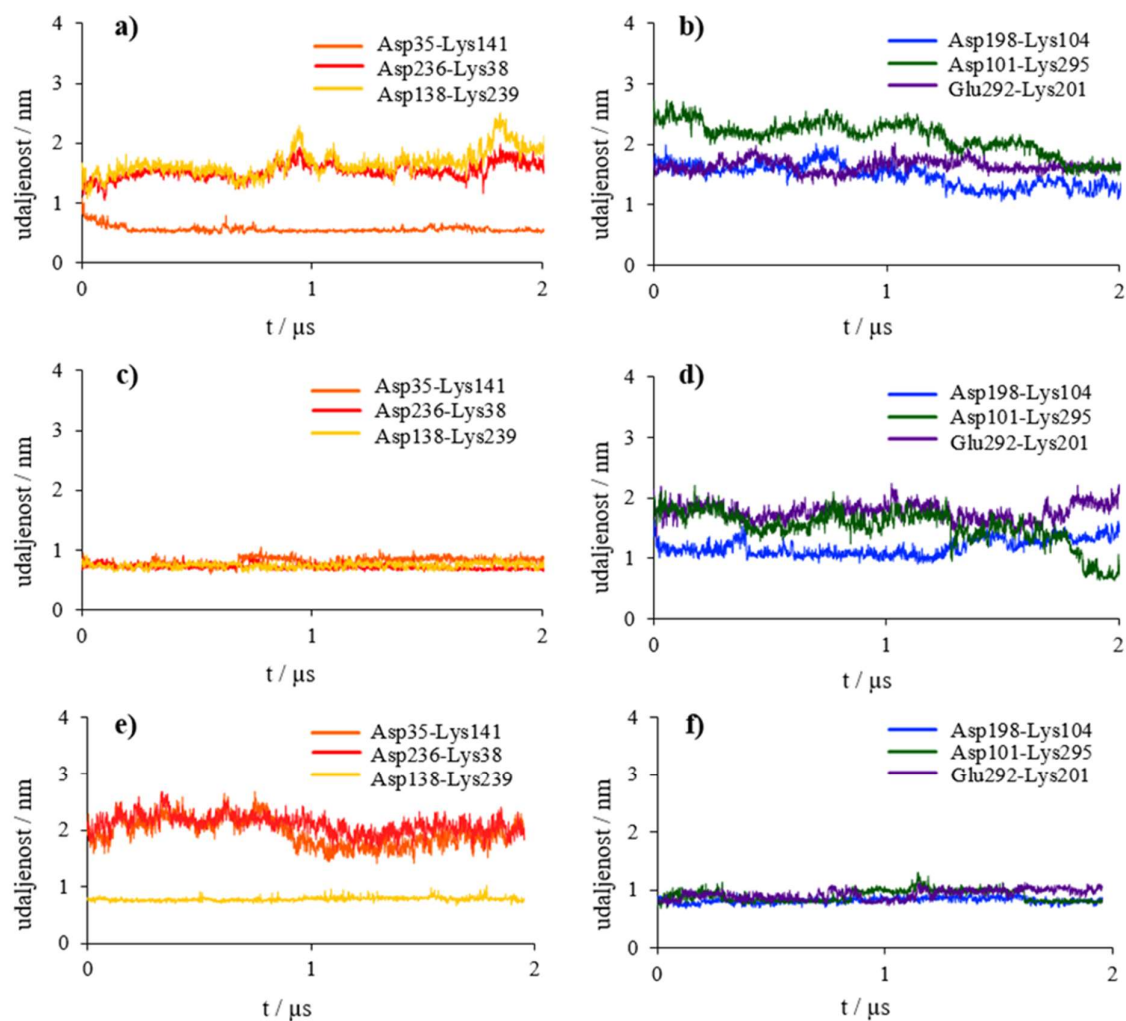
Jedan od pokazatelja karakteristične trostruke pseudosimetrije u proteinu je simetričnost uzvojnica i motiva koji se na njima nalaze. Jedan od njih je i EG motiv karakterističan za UCP2 protein u kojemu bi udaljenosti između centara masa konstitutivnih aminokiselina trebale biti jednake, time tvoreći približno jednakostraničan trokut, kako bi trostruka pseudosimetrija proteina bila očuvana. Iz rezultata na slici 42 je vidljivo da kod NMR-om određene strukture te udaljenosti osciliraju i u vremenu konvergiraju prema jednakostraničnom trokutu s duljinom stranice od  $\sim 3,9$  nm. Kod homološke c-strukture iste udaljenosti su tijekom cijele simulacije podjednake i kraće te iznose  $\sim 2,9$  nm, a također i bolje koreliraju s pripadnim jednakostraničnim trokutom u usporedbi s NMR-om određenom strukturom. Udaljenosti EG motiva kod homološke m-strukture više osciliraju u usporedbi s homolognom c-strukturom te im je prosječna udaljenost  $\sim 3,9$  nm. Udaljenosti kod NMR-om određene strukture u usporedbi s analognom c-strukturom su bliskije homolognoj m-strukturi što ukazuje da je matriks strana NMR-om određenog proteina šira od homološke c-strukture kojoj bi trebala biti sličnija, a suprotno očekivanju, ona pokazuje značajno veće slaganje sa suprotno otvorenom m-strukturom. Na slici 45 mogu se pobliže promotriti strukture proteina na kojima su prikazani i EG motivi u sivoj boji te udaljenosti među njima za sve tri strukture.



Slika 42. Udaljenost centra mase među EG motivima za a) NMR-om određenu, b) homološku c-strukturu i c) homološku m-strukturu UCP2 proteina.

Nadalje, ispitana je stabilnost tercijarne strukture uronjene u lipidni dvosloj gdje su  $\alpha$ -uzvojnice povezane solnim mrežama te hidrofilnim i hidrofobnim interakcijama koje svojim izmjeničnim formiranjem s jedne strane i neformiranjem s druge strane čine protein stabilnim, ali i funkcionalnim. U nastavku su diskutirani rezultati okarakteriziranih interakcija. Kod solne mreže NMR-om određene strukture koja je formirana na matriks strani proteina jedino je prosječna udaljenost para Asp35-Lys141 manja od 1 nm, dok je u slučaju preostala dva para (Asp236-Lys38 i Asp138-Lys239) ova udaljenost tijekom cijele simulacije veća od 1 nm. Vidljivo je i da udaljenosti među parovima koji grade solne mreže značajno osciliraju što ukazuje da je solna mreža tek djelomično formirana i u konačnici nestabilna (slika 43a i slika 44). Kod homološke c-strukture sva tri para su formirana i postojana (s manjim oscilacijama, slika 43c) tijekom cijele simulacije te su stabilna i usporediva sa solnom mrežom c-strane AAC proteina (slika 29 i slika 31). Homološka m-struktura posjeduje stabilnu solnu mrežu formiranu na citosolnoj strani proteina (Asp198-Lys104, Asp101-Lys295 i Glu292-Lys201), gdje su udaljenosti među solnim parovima također manje od 1 nm (slika 43c). U usporedbi s AAC m-strukturom gdje je udaljenost kod analognog para Asp101-Lys302 (slika 29d) u prosjeku nešto dulja nego kod ostala dva para, u ovom slučaju sva tri para koja tvore mrežu su formirana i stabilna tijekom cijele 2  $\mu$ s simulacije.

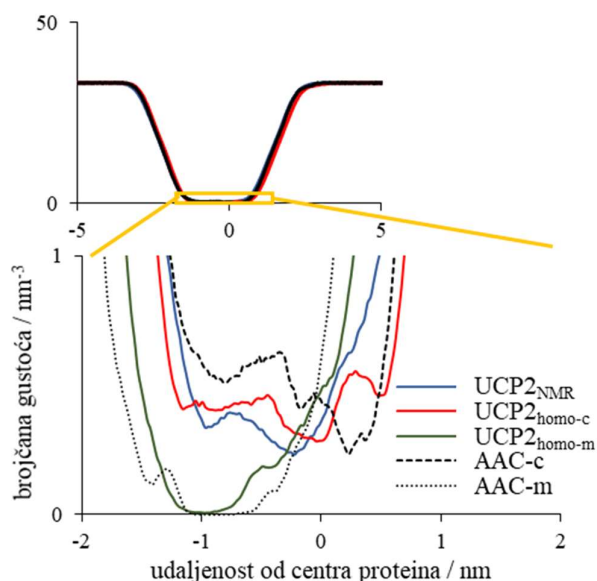
Očekivano, vremenska ovisnost udaljenosti potencijalnih solnih parova koji nisu formirani, kod svih struktura pokazuju izrazite fluktuacije, jedino je kod m-strukture udaljenost para Asp138-Lys239 kraća (slika 43e) tijekom cijele simulacije što ukazuje da se u tom slučaju formira solni most, identično kao i kod AAC m-strukture gdje je formiran ekvivalentan par Asp142-Arg245 (slika 29d). U usporedbi c-strukture s AAC proteinom, udaljenosti među parovima u solnoj mreži s citosolne strane kod obje c-strukture UCP2 proteina su u prosjeku nešto kraće (slika 29 i slika 31).



Slika 43. Potencijalne solne mreže u simulacijama UCP2 proteina za a) NMR-om određenu strukturu s matriks strane, b) NMR-om određenu strukturu s citosolne strane, c) homološku c-strukturu s matriks strane, d) homološku c-strukturu s citosolne strane, e) homološku m-strukturu s matriks strane i f) homološku m-strukturu s citosolne strane. Udaljenosti su izračunate između centara mase odgovarajućih aminokiselina.

Kako je svrha formirane mreže solnih mostova držati strukturu zatvorenom prema jednoj od strana i protein nepropusnim za vodu, izračunate su brojčane gustoće vode (slika 44) i volumna mapa vode (slika 45) uzduž obje strukture proteina, kako bismo prvenstveno analizirali utjecaj neformirane solne mreže kod NMR-om određene strukture na prisutnost i broj molekula vode u proteinu i usporedili broj tih molekula vode s ekvivalentnim parametrom u preostalim simuliranim strukturama. Prema brojčanoj gustoći vode uzduž lipida prikazanoj na slici 44, NMR-om određena i c-struktura UCP2 proteina sadrže manje od jedne molekule vode po  $\text{nm}^3$  tijekom simulacijskog vremena, kao i sama c-struktura AAC proteina, te se iz ove

analize ne mogu pronaći nikakve konkretne razlike u ponašanju NMR-om određene i homološki modelirane strukture UCP2 proteina. Zanimljivo je da je prodiranje vode s obje strane proteina kod c-struktura proteina najvidljivije kod NMR-om određene strukture koja zbog toga i posjeduje najuži centralni dio proteina u kojemu molekule vode nisu prisutne u većem broju. Homološka c-struktura posjeduje čak i nešto šire područje s minimalnim brojem molekula vode od referentne AAC c-strukture. Kod homološke m-strukture proteina može se vidjeti da je protein potpuno nepropusan za vodu pritom pokazujući šire područje zatvorenosti proteina, kao što je bio i slučaj s ranije opisanom AAC m-strukturom.



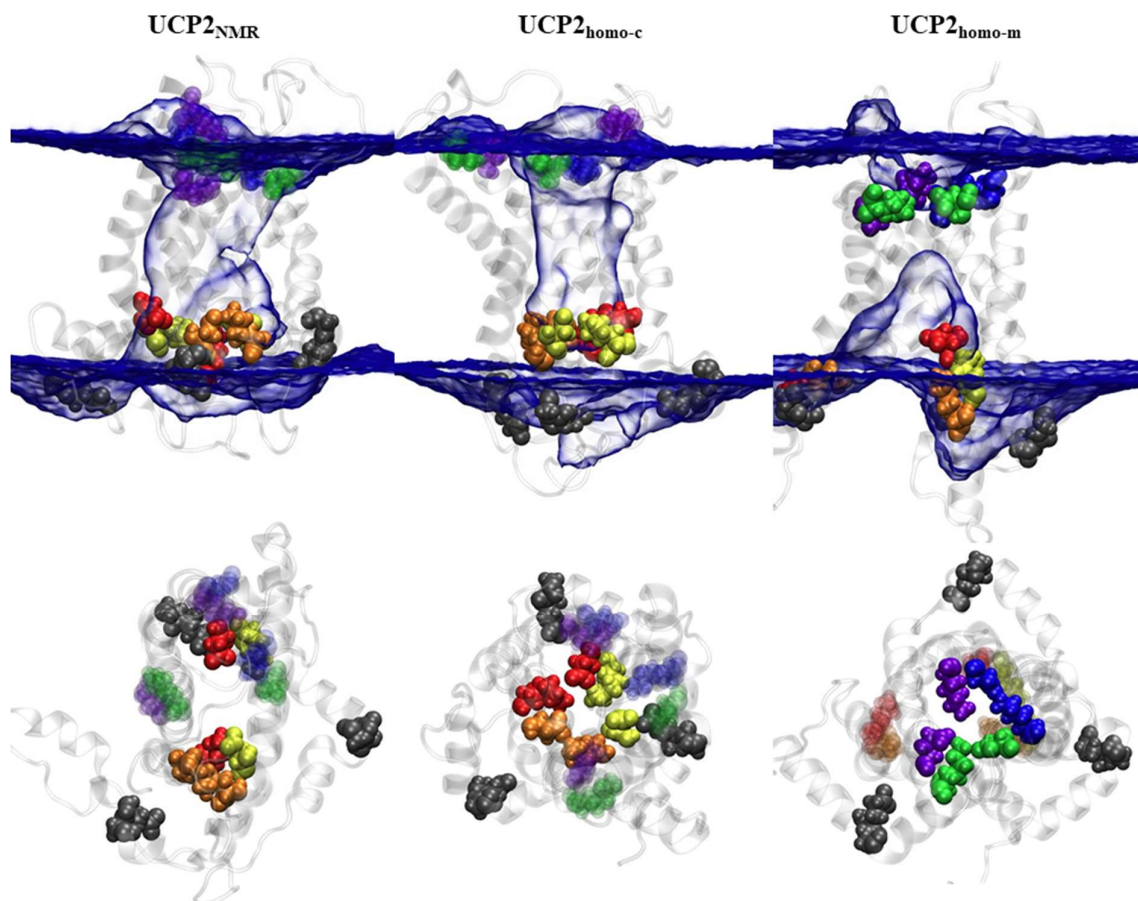
Slika 44. Brojčana gustoća vode u ovisnosti o udaljenosti od centra proteina za NMR-om određenu i homološke strukture UCP2 proteina.

Brojčana gustoća vode u vremenu (dodatak 9) pokazuje da se broj molekula vode s vremenom u NMR strukturi smanjuje, kao i da se širi područje s minimalnim brojem voda. Kod homoloških struktura nema značajnijih promjena broja vode u vremenu.

Kao što je ranije spomenuto, iako brojčana gustoća vode nije niti u jednom slučaju jednaka nuli, to ne ukazuje na postojanje kanala vode jer te molekule vode ne moraju povezivati dva kraja membrane, što je vidljivo iz volumne mape vode (slika 45). Kod NMR-om određene strukture UCP2 proteina vidi se da voda povezuje citosol i matriks kroz protein zbog nepotpuno zatvorene solne mreže s matriks strane. Kod obje homološke strukture, kao i kod ranije navedenog AAC proteina, ne postoji povezanost ta dva kraja te njihove volumne mape vode ukazuju nepropusnost za vodu. Tu se opaža i već viđeno iz brojčane gustoće vode, tj. homološka



m-struktura proteina sadrži volumno veću regiju bez molekula vode. Kao i kod AAC m-strukture, uzrok tome nije samo solna mreža zatvorena s citosolne strane, već i interakcije hidrofobnih aminokiselina koje se nalaze na parnim uzvojnica (2, 4 i 6 uzvojnica s  $\pi\text{xxx}\pi$  motivom) proteina koje dodatno hidrofobnim interakcijama čine protein kompaktnijim. Suprotno tome, c-strukturu zatvorenom drži samo solna mreža s matriks strane.



Slika 45. Volumne mape vode (plavi stakleni volumen s izvrijednošću od 0,2) dobivene iz 2  $\mu\text{s}$  simulacija NMR-om određene (lijevi panel), homološki modelirane c-strukture (srednji panel) i homološki modelirane m-strukture (desni panel). Na donjem panelu su prikazane odabrane strukture proteina iz ptičje perspektive (duž z-osi) kako bi formirane solne mreže bile najuočljivije. Solna mreža s matriks strane – par Asp35-Lys141 prikazan je narančastom bojom, Asp138-Lys219 žutom bojom i Asp236-Lys38 crvenom bojom. Lijevo se nalazi NMR-om određena struktura, a desno homološki modelirana struktura. Solna mreža s citosolne strane – par Asp198-Lys104 prikazan je plavom bojom, Asp101-Lys295 zelenom bojom te Glu292-Lys201 ljubičastom bojom. Sivo su prikazani EG motivi.

Gore navedeno ukazuje da NMR-om određena struktura potencijalno posjeduje vodeni kanal dok u slučaju homološke strukture molekule vode koje pripadaju dvjema stranama lipida

nisu povezane. Kako bi navedeno još dodatno provjerili, izračunati su osmotski koeficijenti permeabilnosti (tablica 3) (dr. sc. Zlatko Brkljača, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, IRB) za sve tri strukture prema metodi koju su koristili Zoonens i suradnici.<sup>31</sup> Iz dobivenih rezultata može se vidjeti smanjenje koeficijenta permeabilnosti kod NMR-om određene strukture u vremenu, iako je i nakon 2  $\mu$ s on čak za tri reda veličine veći nego kod homoloških struktura. Uspoređujući homološke strukture, m-struktura je nešto nepropusnija od c-strukture što je najvjerojatnije posljedica zatvorenije strukture zbog postojanja solne mreže i hidrofobnih interakcija među  $\pi$ xxxx $\pi$  motivima parnih uzvojnica.

Tablica 3. Osmotski koeficijenti permeabilnosti za navedene i UCP2 strukture proteina.

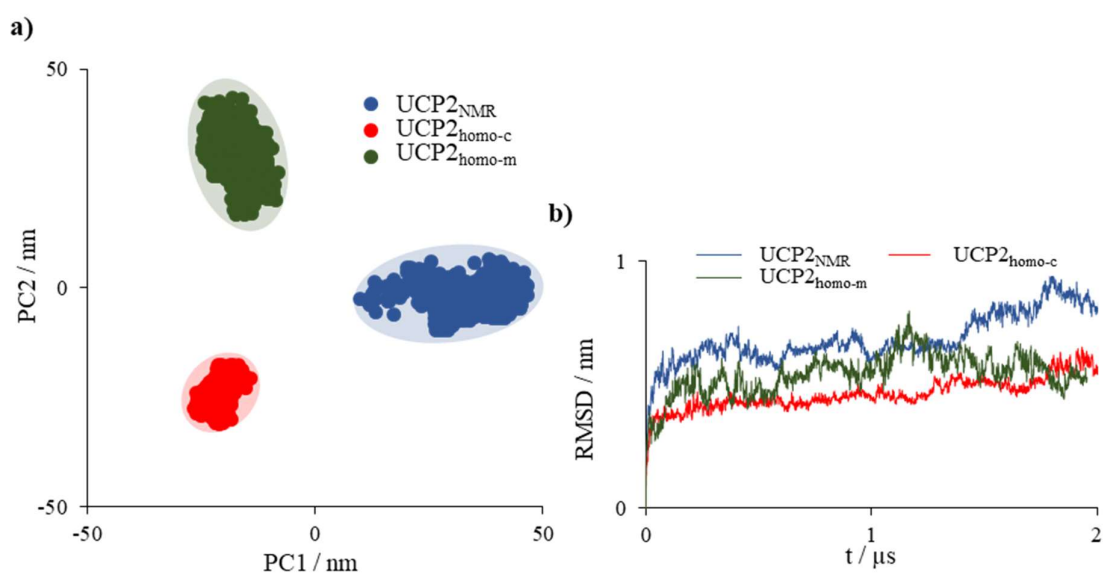
Struktura	Koeficijent permeabilnosti ( $\text{cm}^3 \text{s}^{-1}$ )
UCP2 <sub>NMR</sub> nakon ekvibracije	$(5,7 \pm 0,4) \times 10^{-13}$ ; $5,3 \times 10^{-13}$ u Zoonens <sup>31</sup>
UCP2 <sub>NMR</sub> nakon 200 ns	$(3,2 \pm 0,2) \times 10^{-13}$
UCP2 <sub>NMR</sub> nakon 2 $\mu$ s	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^{-13}$
UCP2 <sub>homo-c</sub> nakon 2 $\mu$ s	$(2,0 \pm 0,5) \times 10^{-16}$
UCP2 <sub>homo-m</sub> nakon 2 $\mu$ s	$(0,6 \pm 0,2) \times 10^{-16}$

Ovi rezultati samo potvrđuju već navedeno, tj. da je NMR-om određena struktura propusnija od homološki modeliranih te se u njoj uistinu stvara vodeni kanal. S vremenom se udio vode smanjuje, ali ni nakon 2  $\mu$ s simulacije rezultati ne pokazuju stabilizaciju proteina i smanjenje propusnosti za molekule vode.

Nadalje se ispitala stabilnost samog proteina u lipidu te oscilacije tercijarne strukture proteina. Navedeno se može vidjeti iz RMSD-a i PCA analize (slika 46), a lokalne promjene mogu se uočiti putem analize fluktuacija (slika 47). Iz PCA analize vidljivo je da homološka struktura pokriva znatno manje područje konformacijskog faznog područja u usporedbi s ostale dvije strukture, što ukazuje na to da je struktura stabilna u vremenu i nije podložna promjenama, dok su NMR-om određena i homološka m-struktura podložnije promjenama strukture što je vidljivo i iz RMSD analize (slika 46b). Uzduž prve glavne komponente (PC1), koja odgovara najvećoj varijanci analiziranih podataka, fazni prostor koji zauzima NMR-om određena struktura se nalazi značajno pomaknut u odnosu na fazni prostor homoloških struktura, koje se nalaze na bliskim vrijednostima prve glavne komponente. Veličina konformacijskog faznog prostora te rasap uzduž prve glavne komponente ukazuju na veće promjene unutar NMR-om određene strukture, što je pokazatelj nestabilnosti te strukture u lipidnom dvosloju, dok su



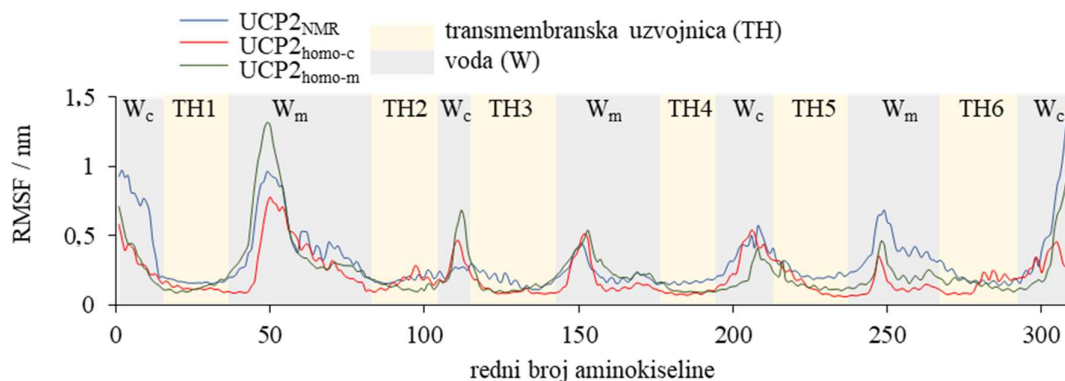
homološke strukture znatno stabilnije te su projekcije tih struktura znatno kompaktnije u faznom prostoru prvih dviju glavnih komponenti. Uspoređujući homološke c- i m- strukture, koje se nalaze na gotovo identičnim vrijednostima prve glavne komponente (PC1), razlike se očituju u njihovom položaju na drugoj glavnoj komponenti (PC2), koja ukazuje na strukturne promjene koje odgovaraju otvaranju/zatvaranju c- i m- strukture. RMSD analiza pokazuje da sve strukture UCP2 proteina i nakon 2  $\mu$ s pokazuju konformacijske fluktuacije, NMR-om određena struktura veće u odnosu na homološki modelirane, dok je referentna AAC struktura nakon 1  $\mu$ s stabilizirana. NMR-om određena struktura najpodložnija je konformacijskim promjenama te se i najviše promijenila u odnosu na početnu strukturu.



Slika 46. a) Projekcije struktura dobivenih simulacijama NMR-om određene i homološki modeliranih c- m- struktura UCP2 proteina na njihove prve dvije zajedničke glavne komponente (PC1 i PC2) koje su izrađene uzevši u obzir sve ugljikove atome koji tvore okosnicu proteina. b) RMSD analiza NMR-om određene i homološki modeliranih c- i m- struktura UCP2 proteina te c- strukture AAC proteina.

Lokalne promjene kod UCP2 proteina, kao i kod prethodno analiziranog AAC proteina, najprimjetnije i najizraženije su očekivano na dijelu proteina izloženom vodi, dok su transmembranske uzvojnice očuvane i stabilne u vremenu (slika 47). I ovdje je NMR-om određena struktura očekivano varijabilnija u usporedbi s homološki modeliranom c- strukturom duž cijele uzvojnice proteina. Općenito, u transmembranskom dijelu proteina uronjenom u lipidni dvosloj, u usporedbi s obje homološke strukture, NMR-om određena struktura je značano promjenjivija, iako je očekivano da taj dio neće biti toliko podložan fluktuacijama.

Homološka m-struktura je duž cijele uzvojnice slična u fluktuacijama homolognoj c-strukturi, osim kratkog dijela uzvojnice uronjenog u vodu s matriks strane između uzvojnice 1 i uzvojnice 2, gdje taj dio m-strukture pokazuje dvostruko veći vrh u analizi fluktuacija.



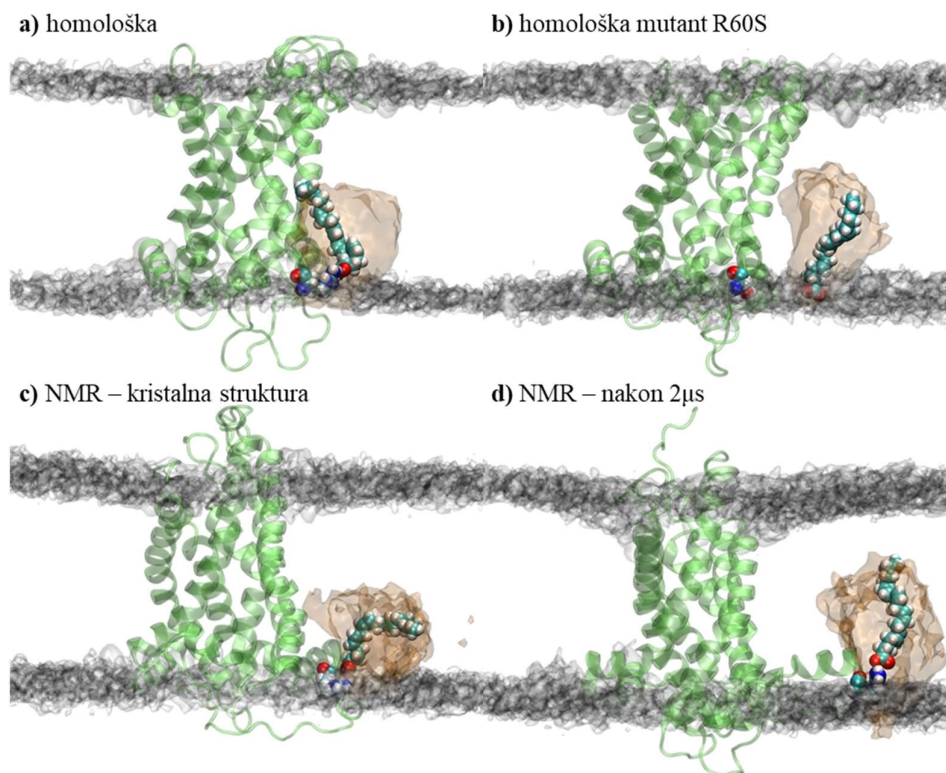
Slika 47. Analiza fluktuacija (RMSF) po rednom broju aminokiselina UCP2 proteina za NMR-om određenu i homološku strukturu.

Iz navedenih analiza triju struktura UCP2 proteina i usporedbe s AAC proteinom, homološke strukture pokazale su se kompaktnijim te povoljnijim početnim strukturama u daljnjem istraživanju, ponajprije zbog pokazane nepropusnosti na molekule vode kroz unutrašnjost proteina te zbog stabilnosti same strukture. Za razliku od homološke c-strukture, NMR-om određena struktura ne posjeduje u potpunosti formiranu solnu mrežu te se unutar nje stvara vodeni kanal. Iako NMR-om određena struktura nakon 2  $\mu$ s teži smanjenju broja molekula vode u unutrašnjosti proteina te manjim strukturnim oscilacijama, struktura i pri samom završetku dugačke 2  $\mu$ s simulacije još uvijek ne zadovoljava dva netom spomenuta kriterija koja obje homološke strukture zadovoljavaju. Ovaj rezultat sugerira da su potrebne značajno dulje vremenske skale simuliranja kako bi se NMR struktura uspjela stabilizirati u membrani. Kada se uspoređuju homološke strukture, dolazi se do sličnih zaključaka ranije napisanih za referentne strukture, odnosno „kalupe“ AAC proteina gdje c-struktura pokazuje veću stabilnost i manju promjenjivost u vremenu u odnosu na m-strukturu, dok pritom nalazimo da je m-struktura općenito zatvorenija. U nastavku je fokus ponajviše na homološku c-strukturu, budući da se ona pokazala kao najstabilnija struktura UCP2 proteina, kako bi pokušali objasniti mehanizam prijenosa protona, odnosno povratka aniona masne kiseline iz matriksa u citosol nakon translokacije neutralne forme i otpuštanja protona u matriks.

Poznato je da UCP2 protein prenosi anione, ali točan mehanizam rada proteina nije dokazan na molekularnoj razini. U ovome dijelu rada fokus je na prijenosu aniona dugolančane masne kiseline potpomognutom UCP2 proteinom, što predstavlja usko grlo mehanizma prijenosa protona kroz unutarnju mitohondrijsku membranu. Kao što je već navedeno, protein pomaže prijenosu aniona masne kiseline kroz hidrofobni lipidni sloj smanjenjem barijere koja iznosi  $\sim 17 \text{ kcal mol}^{-1}$  u čistom DOPC lipidu, čineći ovu barijeru biološki nepremostivom (pasivni scenarij).

Iz ranije objavljenih eksperimenata je poznato da vezno mjesto aniona masne kiseline čine periferni arginin R60 i lizin K271, gdje UCP2 protein veže masnu kiselinu lateralno između H1 i H6 uzvojnica s matriks strane.<sup>65,66</sup> Upravo iz navedenog razloga je provedena simulacija homološki modelirane strukture UCP2 proteina (početna struktura ekstrahirana nakon 2  $\mu\text{s}$  prethodno navedene simulacije homološki modeliranog UCP2 proteina) s nezasićenom arahidonskom dugolančanom masnom kiselinom (C20:4) vezanom na R60/K271. Ova kiselina izabrana je jer eksperimenti pokazuju da upravo ona pokazuje najveću vodljivost protona.<sup>65</sup> Također je simuliran sustav s mutacijom na veznom mjestu R60, gdje je arginin preveden u serin – mutacija R60S na homološki modeliranoj strukturi. Proveli smo simulacije i dviju varijanti NMR-om određene strukture s arahidonskom masnom kiselinom, gdje smo u obzir uzeli objavljenu NMR-om određenu strukturu i konfiguraciju koju NMR-om određena struktura postiže nakon 2  $\mu\text{s}$  simulacije (obje izvedene u trajanju od 500 ns).

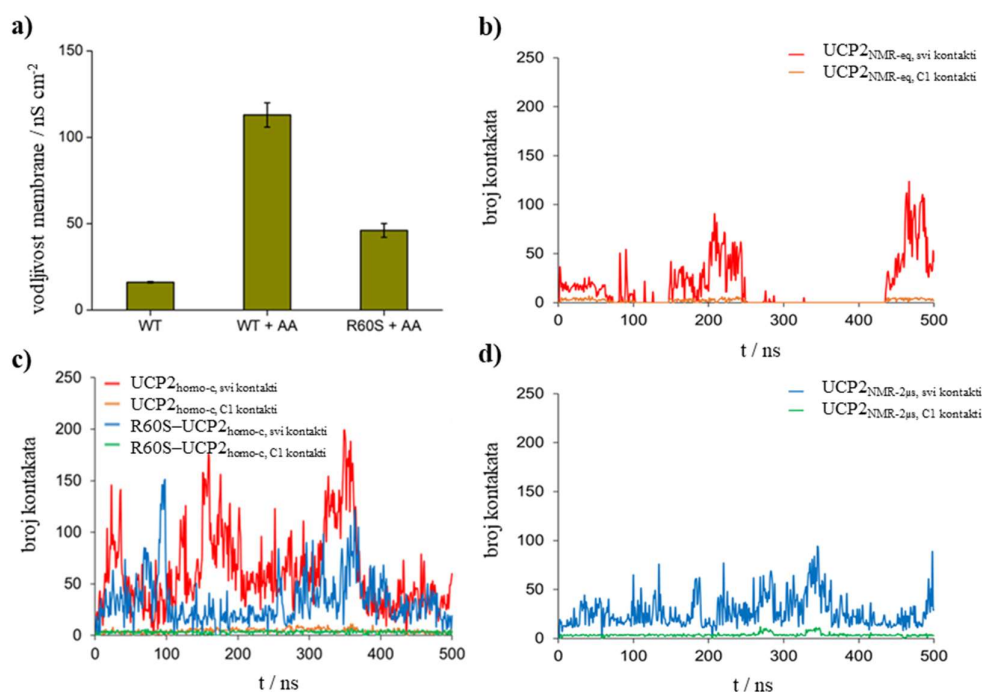
Volumne mape masne kiseline na slici 48 pokazuju da je u slučaju homološke c-strukture anion arahidonske kiseline vodikovim vezama u interakciji sa argininom R60 te stvara solni most, dok je pritom cijeli „rep“ masne kiseline uz protein u interakciji s hidrofobnim aminokiselinama. Kod mutirane strukture R60S ne dolazi do formiranja vodikovih veza niti interakcije hidrofobnog „repa“ kiseline s proteinom. U slučaju NMR-om određene strukture te NMR-om određene strukture nakon 2  $\mu\text{s}$  simulacije, prisutna masna kiselina uspijeva formirati vodikove veze s argininom R60, dok analiza pokazuje samo djelomičnu interakciju masne kiseline s hidrofobnim regijama proteina, a kod strukture nakon 2  $\mu\text{s}$  uopće ne dolazi do navedenih interakcija. U svakom slučaju, postojanost solnog mosta između „glave“ masne kiseline i aminokiseline R60 te interakcija „repa“ masne kiseline s hidrofobnim aminokiselinama proteina ukazuje na jako vezivanje masne kiseline na homološku c-strukturu UCP2 proteina, a navedena se interakcija potpuno gubi u R60S mutantu, dok su iste interakcije slabije ili nepostojeće u slučaju NMR-om određene strukture.



Slika 48. Sustavi UCP2 proteina s arahidonskom masnom kiselinom smještenom kraj veznog mjesta R60 u proteinu. Volumne mape koje odgovaraju atomima fosfora iz lipidnih „glava“ prikazane su u sivoj boji, dok su volumne mape masne kiseline prikazane narančastim staklenim volumenom. Radi jednostavnijeg i jasnijeg prikaza izostavljen je prikaz molekula vode. S gornje strane svakog proteina se nalazi citosolna strana membrane, dok donja strana odgovara matriksu.

Detaljna analiza MD simulacija u potpunosti se slaže s elektrofiziološkim mjerenjima (Jürgen Kreiter i prof. Elena E. Pohl, Institut za fiziologiju, patofiziologiju i biofiziku, Odjel za biomedicinske znanosti, Sveučilište za veterinu, Beč, Austrija) gdje je mjerena vodljivost membrane u dva sustava, divljem tipu (WT) i R60S mutantu UCP2 proteina (slika 49a). Za razliku od WT proteina, mutirani oblik proteina eksperimentalno pokazuje smanjenu vodljivost kroz membranu, a eksperimente potvrđuje i analiza kontakata između masne kiseline i homološke c-strukture proteina (slika 49c, crvena i narančasta krivulja), gdje vidimo da kontakt ne ostvaruje samo „glava“ masne kiseline s argininom R60, već je povećan i ukupan broj kontakata s cijelim proteinom. Suprotno tome, interakcija između „glave“ masne kiseline i mutiranog serina S60 je značajno slabija (slika 48c), rezultirajući nepostojanjem solnog mosta između serina S60 i masne kiseline, kao i znatno smanjenim brojem kontakata između masne kiseline i hidrofobnih aminokiselina prisutnih u proteinu (slika 49c, plava i zelena krivulja).

Analizom broja kontakata vidljivo je da u slučaju mutanta ne dolazi do vezanja masne kiseline, budući da je pozitivno nabijeni arginin R60 zamijenjen neutralnim serinom S60, što objašnjava eksperimentalnu vodljivost proteina i ranije objavljene eksperimentalne rezultate koji ukazuju na inicijalno vezanje masne kiseline na arginin R60 i lizin K271. Analiza ostvarenih kontakata masne kiseline i NMR-om određene strukture (slika 49b i c) pokazuje ranije navedeno, tj. polarna „glava“ masne kiseline se i dalje vezuje na eksperimentalno određeno vezno mjesto arginin R60, ali pritom ne dolazi do interakcija hidrofobnog „repa“ masne kiseline i proteina. Ovo nadalje ukazuje da se nezasićena arahidonska kiselina, posjedujući četiri *cis* dvostruke veze koje čine samu kiselinu poprilično rigidnom, značajno bolje veže na homološku c- negoli na NMR-om određenu strukturu.

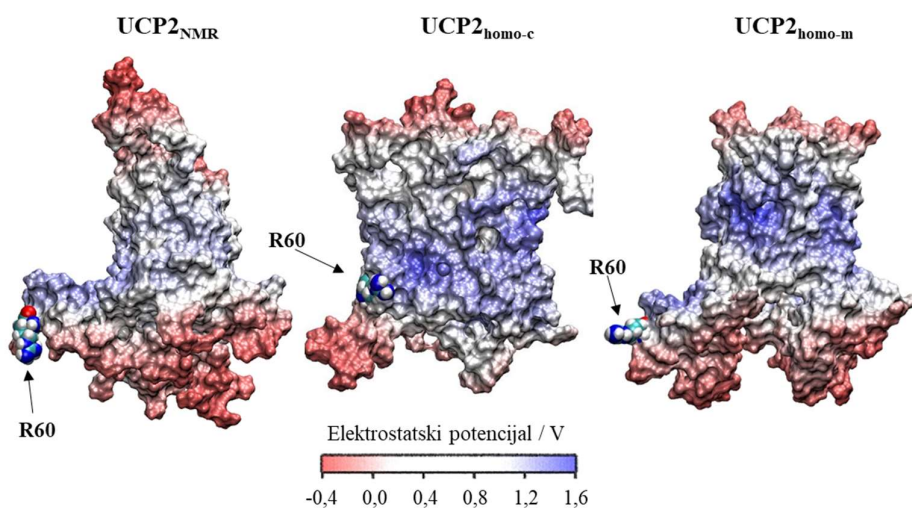


Slika 49. Membranska vodljivost UCP2 proteina za a) divlji tip WT-UCP2 bez prisustva arahidonske masne kiseline, divlji tip WT-UCP2 u prisustvu arahidonske masne kiseline (WT+AA) i mutant R60S UCP2 u prisustvu arahidonske masne kiseline (R60S+AA). Membrane su rekonstituirane iz *E. Coli* polarnih lipida uz dodatak 15 mol % AA i 4 mg UCP2 po miligramu lipida. Otopina pufera sadržavala je 50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM TRIS, 10 mM MES, 0,6 mM EGTA, pri pH = 7,34 i  $T = 33$  °C. Podaci prikazuju srednju standardnu devijaciju dobivenu iz tri neovisna eksperimenta. b) Ukupan broj kontakata unutar 0,35 nm između svih atoma masne kiseline i NMR-om određene strukture nakon uravnoteženja. c) Ukupan broj kontakata unutar 0,35 nm između svih atoma masne kiseline i homološke c-strukture (crvena boja) i mutirane R60S homološke c-strukture (plava boja). d) Ukupan broj kontakata unutar 0,35 nm između svih atoma masne kiseline i NMR-om određene strukture nakon 2 µs.

Kako bi proveli detaljniju analizu izračunali smo prosječan elektrostatski potencijal svih simuliranih sustava te su rezultati prikazani na slici 50. Provedena analiza pokazuje da je centralni dio proteina, bogat hidrofobnim aminokiselinama, pozitivnije nabijen od ostatka, do čega dolazi uslijed prisustva relativno gusto pakiranih pozitivno nabijenih aminokiselina, arginina i lizina. Dio proteina koji se nalazi u vodenom sloju, i na citosolnoj i matriks strani, je negativnije nabijen u odnosu na centralni dio proteina koji je uronjen u lipidni dvosloj.

Mapa elektrostatskog potencijala NMR-om određene strukture ukazuje na to da je ova struktura podjednako negativno nabijena s citosolne i matriks strane, dok se kod homoloških struktura primjećuju razlike uslijed prodiranja molekula vode i različite otvorenosti proteina (c- prema m-strukturi).

Kod homološke c-strukture, zbog prodiranja vode s citosolne strane i otvorenosti proteina prema istoj strani, taj dio proteina je negativniji od zatvorenog dijela proteina izloženog vodi s matriks strane. Homološka m-struktura UCP2 proteina pokazuje analogan trend, tj. budući da je protein sada otvoren prema matriksu, negativniji potencijal je vidljiv upravo na toj strani proteina. U ovom kontekstu, upravo pozitivniji potencijal središnjeg dijela proteina mogao bi predstavljati potencijalni mehanizam povratka aniona masne kiseline iz matriksa na citosolnu stranu, i to na način da anion masne kiseline koji se veže na arginin R60 bude „povučen“ razlikom potencijala između središnjeg dijela proteina i rubnih dijelova uronjenih u vodu.



Slika 50. Elektrostatski potencijal za tri simulirane strukture UCP2 proteina. Ostatak sustava (voda i lipidi) je izostavljen radi jasnijeg prikaza. Gornja strana predstavlja citosol, a donja matriks. Vezno mjesto masne kiseline, arginin R60, prikazan je pomoću van der Waalsovih radijusa pripadajućih mu atoma, a svaki protein rotiran je tako da se vezno mjesto masne kiseline nalazi u donjoj lijevoj regiji proteina.

Iz dobivenih rezultata veznog mjesta i elektrostatskog potencijala proteina, može se zaključiti kako bi se anion masne kiseline mogao vratiti natrag na citosolnu stranu slijedeći po njega povoljan gradijent potencijala uz vanjsku stranu proteina. Preciznije, anion masne kiseline bi se mogao gibati lateralno uz vanjski rub proteina prema citosolnoj strani, pri čemu bi njegovom prolasku kroz lipidni dvosloj tada pogodovali i pozitivni potencijal koji može „povlačiti“ negativno nabijenu „glavu“ aniona masne kiseline, dok bi u isto vrijeme nepolarni „rep“ bio stabiliziran interakcijama s „repovima“ lipida s jedne strane i interakcijama s centralnim hidrofobnim aminokiselinama UCP2 proteina s druge strane. Ovakav bi usmjereni povratak aniona masne kiseline prema citosolnoj strani potencijalno mogao značajno smanjiti prije spomenutu energetska barijeru pasivnog transporta aniona masne kiseline kroz lipidni dvosloj.

Svi rezultati simulacija UCP2 proteina potvrđuju da je NMR-om određena struktura fiziološki irelevantna te da, iako dolazi do blage stabilizacije ove strukture i smanjenja osmotske permeabilnosti za molekule vode, i nakon 2  $\mu$ s ova struktura nije niti izbliza dovoljno stabilna i nepropusna za vodu. Suprotno tomu, homološka c- i m-struktura pokazale su se stabilnima i nepropusnima za vodu, a pritom su obje strukture usporedive s referentnim i ranije analiziranim AAC strukturama, gdje je u oba slučaja c-struktura ta kojoj su glavni strukturni motivi očuvaniji u vremenu. Objе homološke strukture se mogu predložiti kao kvalitetne početne strukture u daljnjim istraživanjima. Nadalje, otkriveno je da se anion masne kiseline uistinu veže za eksperimentima određeno vezno mjesto, tj. arginin R60, gdje je nađeno da negativno nabijena „glava“ masne kiseline interagira vodikovim vezama s argininom R60 pritom stvarajući stabilni solni most, dok se „rep“ masne kiseline dodatno stabilizira hidrofobnim interakcijama sa središnjim dijelom proteina i okolnim lipidima. U konačnici, mape elektrostatskog potencijala ukazuju na postojanje povoljnog gradijenta potencijala uz vanjsku stranu proteina koji bi mogao predstavljati način/mehanizam povratka aniona masne kiseline iz matriksa prema citosolnoj strani. U tom pogledu, gradijent potencijala bi predstavljao silu „povlačenja“ negativno nabijene „glave“ masne kiseline, čime bi se pasivna energetska barijera translokacije aniona masne kiseline potencijalno značajno smanjila te bi se na taj način pomoglo u rješavanju još nerazjašnjenog mehanizma prijenosa protona kroz UMM.



### 5.3. Utjecaj oksidativnog stresa na prijenos protona kroz unutarnju mitohondrijsku membranu

Oksidativni stres koji se događa kada tijekom elektron transportnog lanca dolazi do curenja elektrona uzrokuje nastajanje kisikovih radikala koji u procesu lipidne peroksidacije stvaraju reaktivne aldehide koji dalje reagiraju s DNK/RNK, lipidima te aminokiselinama iz proteina. Posebno je važno naglasiti da je UCP2 protein podložan reakcijama s produktima oksidativnog stresa, a s druge strane je i jedan od regulatora stresa. U nastavku su opisani produkti koji nastaju reakcijom reaktivnih aldehida s aminokiselinama, ponajviše reakcija HNE-a s lizinom koja je i eksperimentalno okarakterizirana. U drugom dijelu je opisan mehanizam nastanka dvostrukih adukata i utjecaj stvorenih adukata na prijenos protona kroz membranu.

#### 5.3.1. Utjecaj reaktivnih aldehida na protein

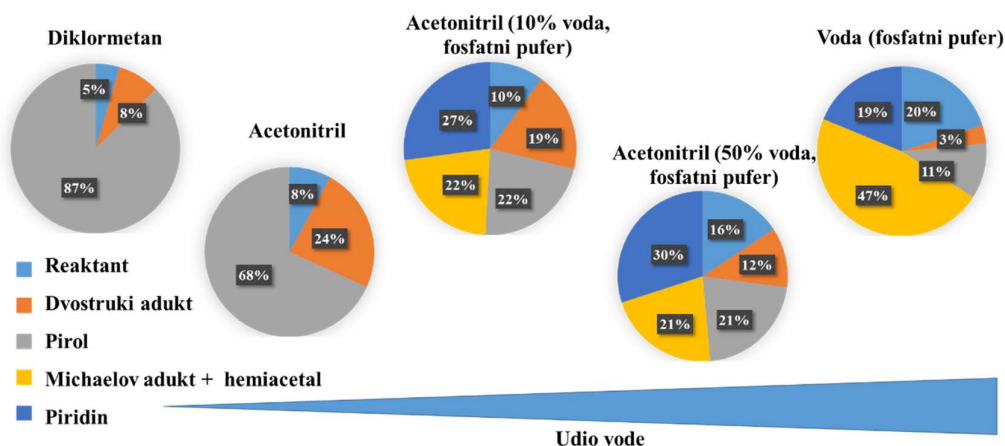
Kao što je ranije spomenuto, u navedenim reakcijama nastaje najviše aldehida HNE i zbog toga je odlučeno najviše pažnje posvetiti upravo njemu, dok je dodatno ispitano i ponašanje ONE aldehida koji je također vrlo čest nusprodukt. Upravo su ova dva kemijska spoja uzeta za određivanje modelnog mehanizma. Proučavana je modelna reakcija navedenih aldehida s tri bazične aminokiseline, tj. s lizinom, argininom i histidinom te reakcija s polarnim cisteinom u dva različita implicitna otapala, polarnoj vodi i aprotičnom acetonitrilu. Kako aldehidi imaju dva reaktivna mjesta, na karbonilnom položaju C1 i na položaju dvostruke veze C3, spektar mogućih produkata je izrazito širok (slika 51). Kako je mnogo mogućih kombinacija produkata i njima inherentnih reakcija, najprije su u kontroliranim uvjetima određeni produkti koji nastaju reakcijom lizina i HNE-a, eksperimentalno i računski, dok je za ostale kombinacije aminokiselina s HNE-om i svih aminokiselina s ONE-om mehanizam određen samo računski. Lizin i HNE su odabrani budući da u njihovoj međusobnoj reakciji nastaju svi mogući potencijalni produkti proučavane reakcije. U nastavku je stoga najprije detaljno opisan modelni reakcijski mehanizam lizina i HNE-a, a zatim i ostali modelni mehanizmi.





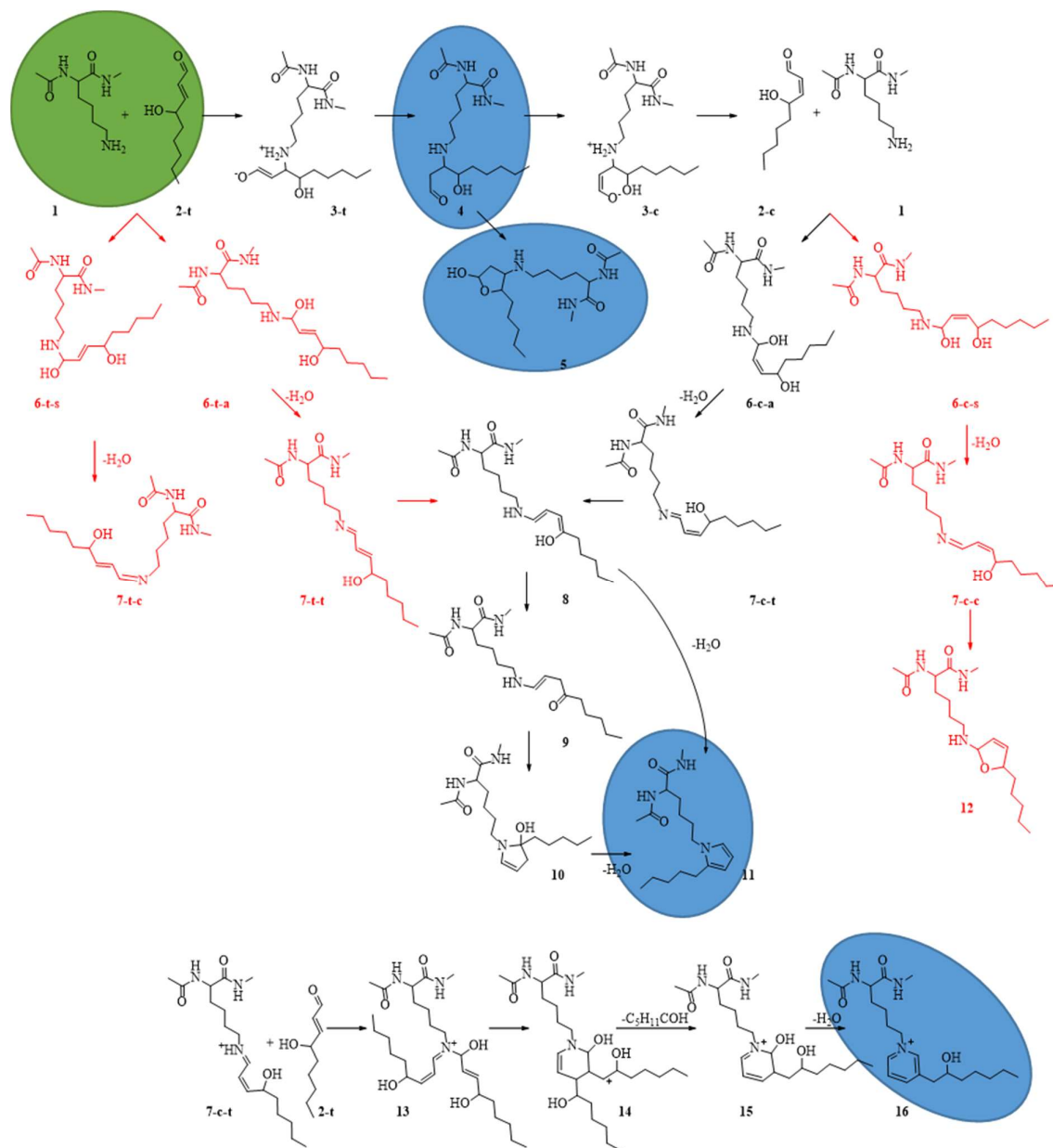
Slika 51. Shematski prikaz sustava kojemu je određen modelni reakcijski mehanizam te produkti koji mogu nastati.

Ekperimenti (dr. sc. Katarina Vazdar, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, IRB) su provedeni u tri različita otapala, diklormetanu, acetonitrilu i vodi te u dvije mješavine otapala u omjerima acetonitril:voda koji su iznosili 9:1 i 1:1.<sup>127</sup> Na slici 52 prikazani su udjeli pojedinih produkata, kao i zaostalog reaktanta, dobiveni LC-MS kromatografijom, iz čega se može vidjeti da je u aprotičnom otapalu diklormetanu glavni produkt pirol, dok je u polarnijem acetonitrilu taj udio manji. Uz pirol u oba otapala nastaje još i dvostruki adukt te zaostaje neizreagirani reaktant. Povećanjem udjela vode na 10 % u acetonitrilu smanjuje se udio pirola, a nastaju u podjednakom udjelu novi polarni produkti, piridin i smjesa Michaelovog adukta s hemiacetalom. Kada je odnos vode i acetonitrila jednak, nastaju navedeni produkti uz povećan udio piridina i neizreagirano reaktanta. U vodi, odnosno u fosfatnom puferu, većinski produkt pirol u aprotičnim otapalima sada je na svega ~ 10 %, dok je većina produkta smjesa Michaelovog adukta i hemiacetala. Prisutan je i piridinski produkt te i relativno značajna količina neizreagirano reaktanta (~ 20 %), što ukazuje da povećanje udjela vode usmjerava reakciju prema reaktantima. LC-MS rezultati dodatno su potvrđeni UV/vis kromatografskom analizom (200 nm). Sve strukture produkata su okarakterizirane i potvrđene jednom ili s više navedenih metoda: <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, COSY i HSQC spektroskopijom te ESI-MS spektrometrijom.



Slika 52. Eksperimentalni rezultati modelne reakcije lizina i HNE-a u različitim otapalima.

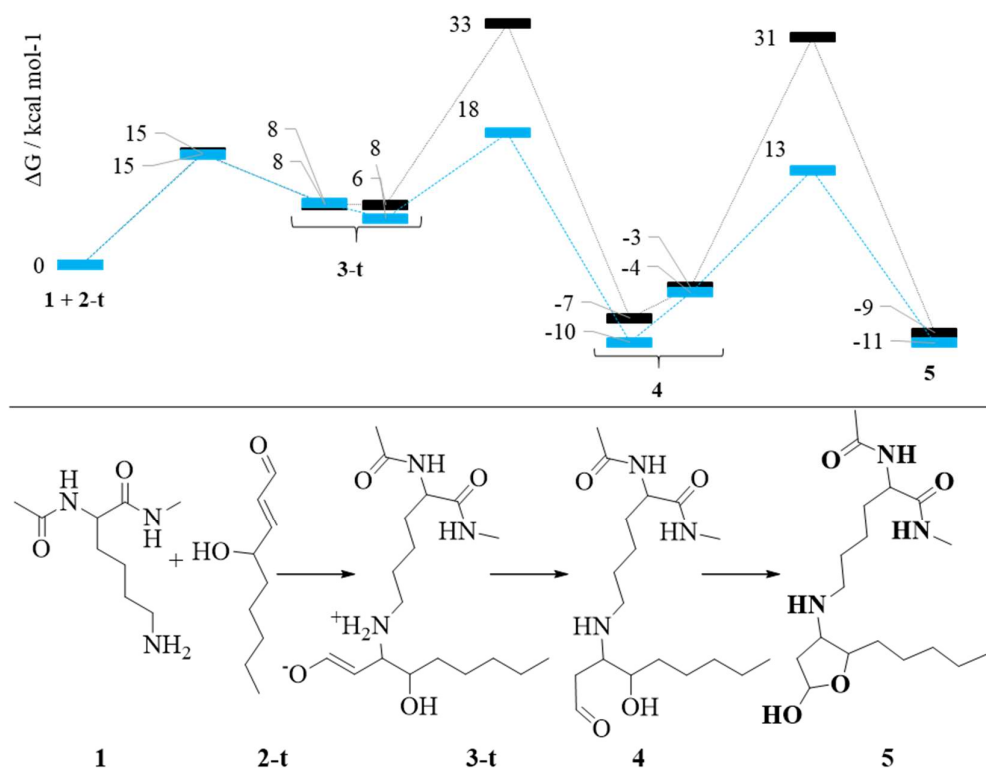
Navedeni eksperimentalni rezultati temelj su za QM račune i postavljanje modelnog mehanizma reakcije koji je nakon temeljite analize prikazan na slici 53. Plavom bojom su naznačeni eksperimentalno dobiveni produkti, te su to Michaelov adukt **4**, hemiacetal **5**, pirol **11** i piridin **17**. Početni reaktanti lizin **1** i HNE **2-t** su prikazani u zelenim elipsama. **2-t** HNE reaktant nalazi se u *trans* formi u kojoj nastaje lipidnom peroksidacijom iz nezasićenih „repova“ lipida. U nastavku su redom opisani mehanizmi nastanka navedenih produkata u implicitnim otapalima, acetonitrilu i vodi, koji su dobiveni kvantnomehaničkim računima. U slučaju reakcija koje se odvijaju u vodi, u prijelaznom stanju je, kad je god bilo izvedivo, uključena i jedna eksplicitna molekula vode koja sudjeluje u vibracijama prijelaznog stanja. U svim mehanizmima prikazanim u nastavku svaki reaktant i produkt je dobiven geometrijskim transformacijama imaginarne vibracije prijelaznog stanja, tako da svako prijelazno stanje ima odgovarajući karakter i reaktanta i produkta. Kako su ovo lančani mehanizmi, jedan produkt često je u sljedećoj reakciji reaktant pa mora doći do konformacijske promjene unutar molekule koja je veća ili manja, ovisno o geometriji sljedećeg produkta. Koliko su te konformacijske promjene značajne može se vidjeti iz razlike energija produkta jednog prijelaznog stanja unutar kojeg dolazi do konformacijske promjene u reaktant za sljedeće prijelazno stanje.



Slika 53. Detaljan modelni mehanizam reakcije lizina i reaktivnog aldehida HNE-a. Plavim elipsama su naznačeni produkti dobiveni eksperimentalno, dok se u zelenim elipsama nalaze početni reaktanti.

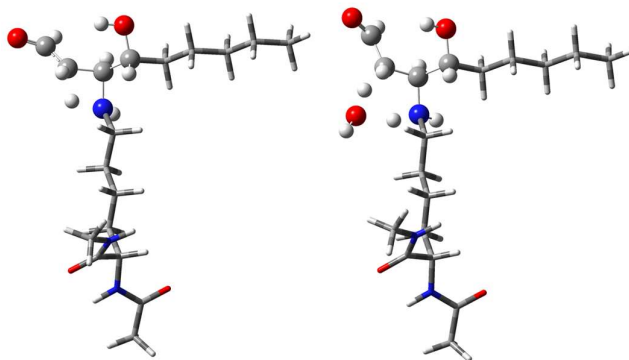
U prvoj proučavanoj grani ukoliko na slici 53 krenemo udesno od reaktanata, dolazi do nukleofilnog napada na C3 atom dvostruke veze HNE-a i formiranja dvojnog iona **3-t** (eng. *zwitterion*, ZI) koji je nestabilniji od reaktanata, a za koji je barijera jednaka  $15 \text{ kcal mol}^{-1}$  za oba otapala (slika 54). U ovom prijelaznom stanju eksplicitna voda ne sudjeluje jer ne dolazi do prijenosa protona, već dolazi samo do razdvajanja naboja. U sljedećem koraku dolazi do prijenosa protona, odnosno adicije i pucanja dvostruke veze te nastanka Michaelovog adukta **4**

koji je u smjesi s hemiacetalom **5** glavni produkt u čistoj vodi. Nastali Michaelov adukt je stabilniji od reaktanata, a barijera nastanka je 33 kcal mol<sup>-1</sup> u acetonitrilu i 18 kcal mol<sup>-1</sup> u vodi.



Slika 54. Mehanizam nastanka Michaelovog adukta **4** i hemiacetala **5** iz početnih reaktanata **1** i **2-t**.

Ovdje se može zamjetiti da eksplicitna voda znatno snižava barijeru (za ~ 15 kcal mol<sup>-1</sup>) kod prijelaznih stanja u kojima dolazi do prijenosa protona (slika 55). Prijenosom protona i ciklizacijom u jednom koraku iz Michaelovog adukta **4** nastaje ciklički hemiacetal **5** koji je otprilike jednako stabilan kao i Michaelov adukt **4** i posjeduje jednaku energetska barijeru za nastanak. I ovdje eksplicitna voda sudjeluje u prijelaznom stanju i snižava barijeru za ~ 18 kcal mol<sup>-1</sup>. U ovom slučaju moralo je doći do konformacijske promjene unutar Michaelovog adukta, odnosno rotiranja veze i destabilizacije molekule kako bi moglo doći do ciklizacije. Navedeno je vidljivo iz razlike energija od 4 i 6 kcal mol<sup>-1</sup> između nastalog Michaelovog adukta nakon prijenosa protona, i Michaelovog adukta koji ulazi u reakciju ciklizacije.

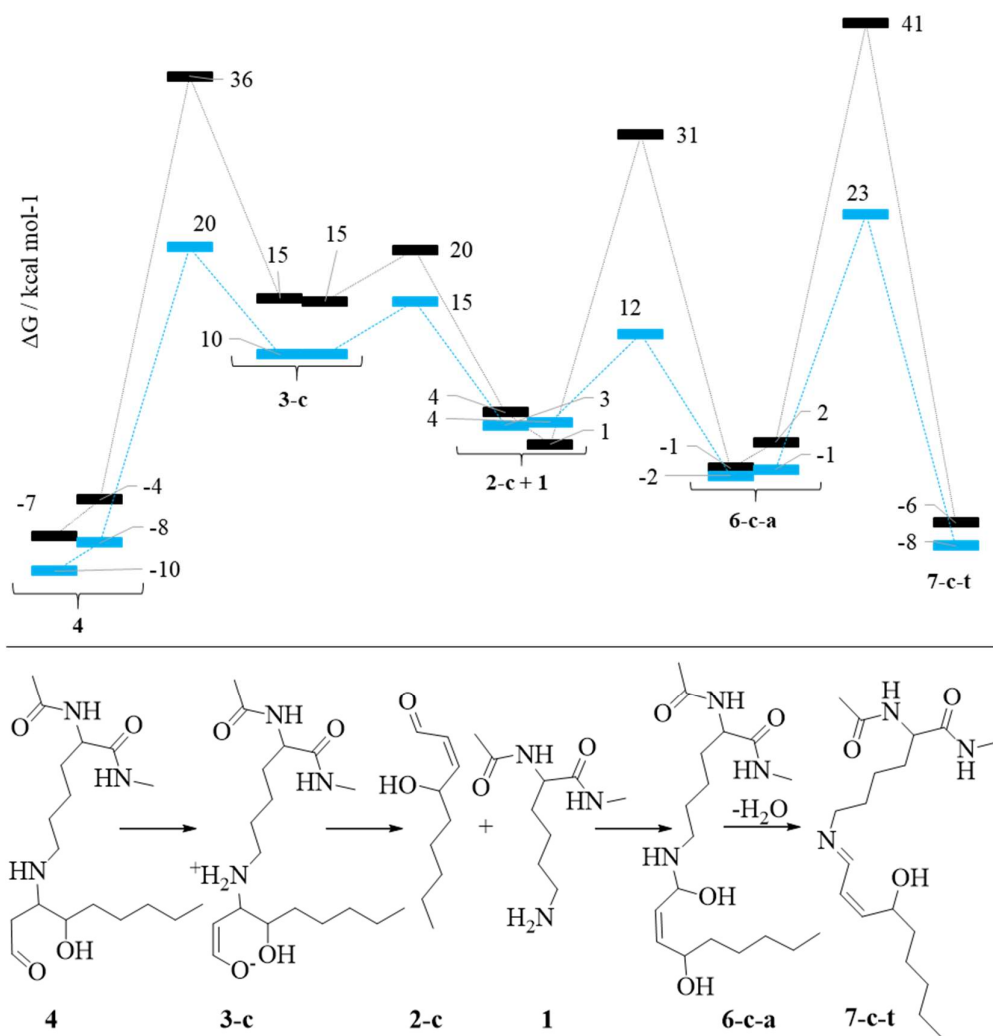


Slika 55. Primjer prijelaznog stanja prijenosa protona za dobivanje Michaelovog adukta **4** iz dvojnog iona **3-t**. Lijevo je prikazano prijelazno stanje za običan prijenos protona dok je desno prikazan prijenos protona uz uključenu eksplicitnu vodu u prijelaznom stanju koja doprinosi znatnom sniženju energetske barijere.

Kada nastane Michaelov adukt, ukoliko dođe do rotiranja oko novonastale jednostruke veze, može ponovno doći do prijenosa protona natrag na amino skupinu lizina i ponovnog nastanka dvojnog iona **3-c** i formiranja dvostruke veze i *cis-trans* izomerizacija HNE-a, odnosno povratka u *trans* formu molekule **2-t**, ali i *cis* oblika **2-c** čiji mehanizam je prikazan na slici 56. Barijera je opet znatno snižena (za  $\sim 15 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) u slučaju prisutnosti eksplicitne vode u prijelaznom stanju. Odvajanjem dvojnog iona nastaju reaktanti **1** i **2-c**, a opisana dva koraka predstavljaju simetričan povratak iz Michaelovog adukta u reaktante. Ovime su opisani produkti (Michaelov adukt **4** i hemiacetal **5**) i proces izomerizacije koji se može odvit na C3 dvostrukoj vezi HNE-a. U nastavku je opisan nešto kompleksniji mehanizam reakcije i mogući produkti na C1 karbonilnom atomu.

Početna *trans* forma **2-t**, ali i dobivena *cis* forma **2-c** HNE-a mogu reagirati na C1 atomu, a svaka može, ovisno o strani s koje amino skupina reagira s karbonilom, tvoriti *cis* ili *trans* Schiffovu bazu, tako da su moguće četiri kombinacije produkta, odnosno četiri Schiffove baze. Svi mehanizmi se sastoje od dva ista koraka, tj. prijenosa protona na karbonilni kisik i zatim eliminacije vode, ali jedino iz *trans* Schiffove baze može doći do daljnje reakcije. U nastavku je opisan mehanizam za nastanak *trans* Schiffove baze **7-c-t** iz *cis* HNE-a **2-c** (slika 56) jer je upravo to predstavlja put najmanje energije, a ostala tri mehanizma prikazana su u dodatku 10, dodatku 11 i dodatku 12. Dakle, prijenosom protona s amino skupine lizina **1** na kisikov atom karbonila *cis* HNE-a **2-c** dolazi do formiranja karbinolamina **6-c-t**. I u ovom koraku eksplicitna voda u prijelaznom stanju snižava barijeru za  $\sim 20 \text{ kcal mol}^{-1}$ . U sljedećem koraku dolazi do eliminacije vode i formiranja dvostruke veze Schiffove baze **7-c-t**, u ovom

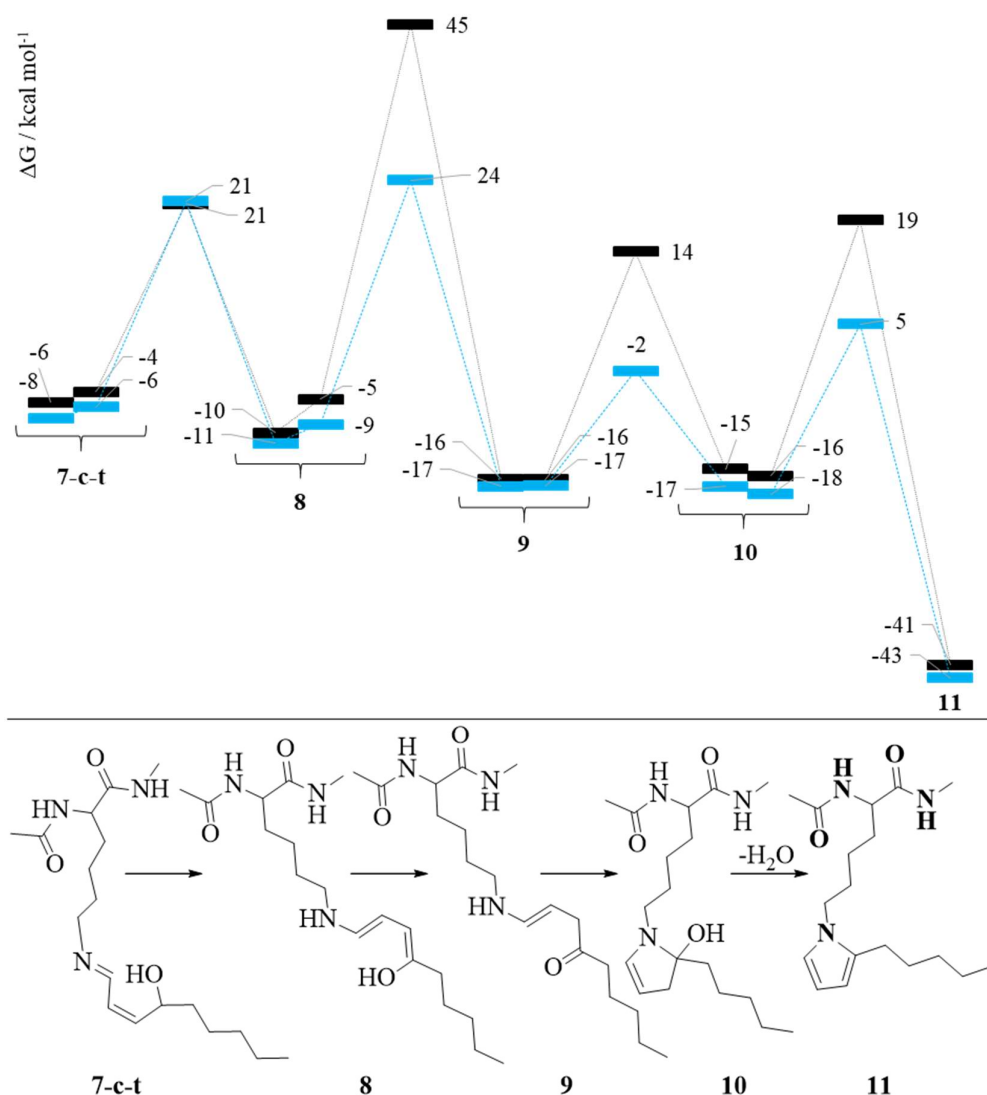
slučaju *trans* Schiffove baze. Ovaj korak je energetski zahtjevan s barijerom od 39 i 24 kcal mol<sup>-1</sup> u acetonitrilu i u vodi (eksplicitna voda je uključena u prijelazno stanje). Iako je nastala Schiffova baza **7-c-t**, ali i preostale Schiffove baze, tj. **7-c-c**, **7-t-t** i **7-t-c**, stabilnije od reaktanata, ovaj produkt eksperimentalno ne nastaje zbog daljnje reakcije i nastanka mnogo stabilnijeg produkta pirola **11**. Schiffova baza **7-c-c** može u daljnjim reakcijama dati furanski produkt **12** prema mehanizmu u dodatku 11, a ovaj produkt je i Sayre predložio u svojim istraživanjima,<sup>82</sup> ali u gore prethodno navedenim eksperimentima nije okarakteriziran.



Slika 56. Mehanizam nastanka *trans* Schiffove baze **7-c-t** iz Michaelovog adukta **4**.

Sljedeći korak reakcije Schiffove baze **7-c-t** je prijenos protona na dušik s C4 atoma HNE-a s barijerom ~ 25 kcal mol<sup>-1</sup> i nastanak adukta **8** koji je stabilniji od početne Schiffove baze **7-c-t** te je navedeno prikazano na slici 57. Ovo je jedini prijenos protona na čiju barijeru eksplicitna

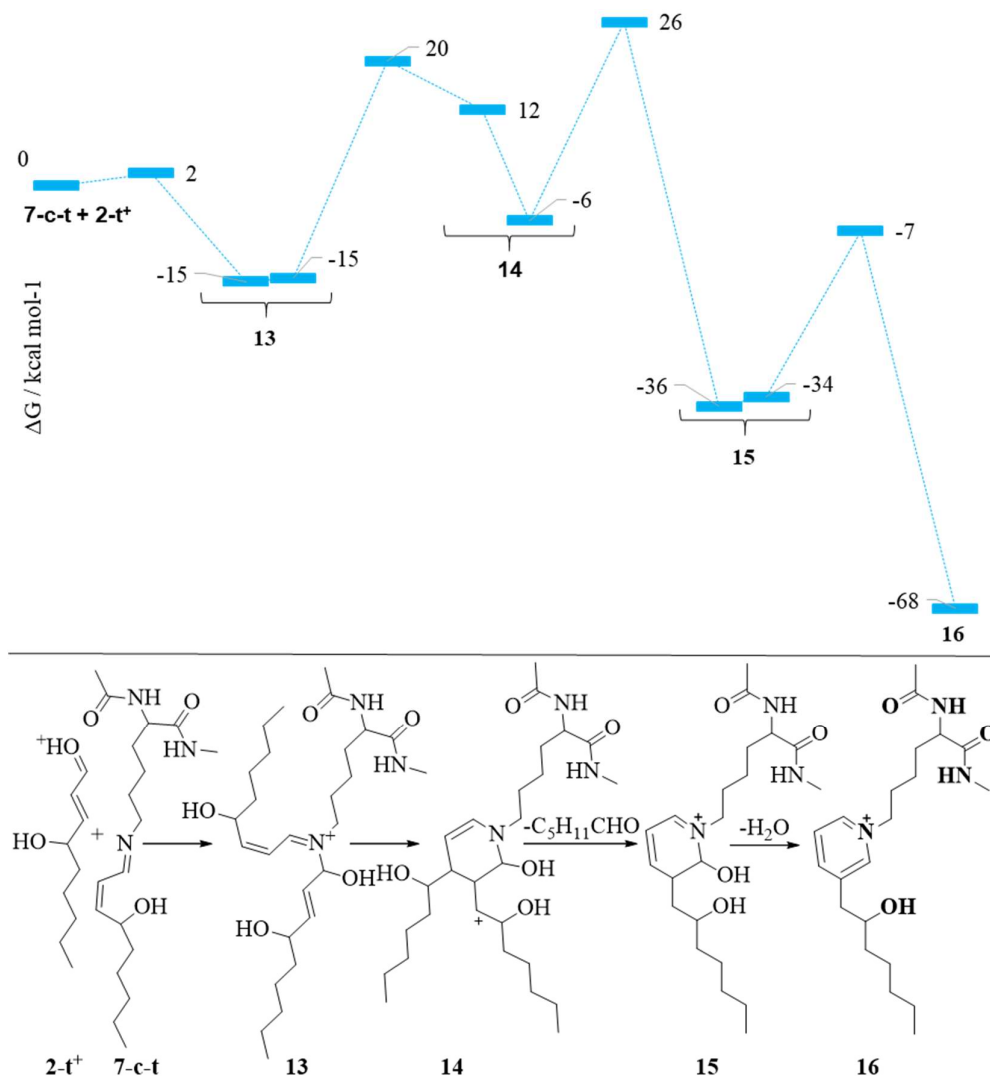
voda nije utjecala snižavanjem energije, vjerojatno jer je prijelazna struktura podosta rigidna i prostor za prijenos protona je znatno sužen pa se dodatna voda ne može uklopiti i utjecati na sniženje barijere. I sljedeći korak je prijenos protona koji predstavlja usko grlo ovog mehanizma, s energetsom barijerom od  $50 \text{ kcal mol}^{-1}$  u acetonitrilu, odnosno  $33 \text{ kcal mol}^{-1}$  u vodi (u prisustvu eksplicitne molekule vode). Ovu barijeru i u acetonitrilu može spustiti katalitička voda koja je eliminirana u prethodnom koraku i pri formiranju Schiffove baze. Također prije reakcije dolazi do reorganiziranja produkta iz prethodnog koraka i povećanja energije kako bi moglo doći do energetske zahtjevne reakcije prijenosa protona. I ovi produkti su stabilizirani u odnosu na adukt **8** iz prethodnog koraka. Nastali adukt **9** lako se ciklizira u adukt **10** uz prijenos protona uz barijeru od 32 i  $19 \text{ kcal mol}^{-1}$  u acetonitrilu i vodi u prisustvu jedne eksplicitne molekule vode. Iz nastalog adukta **10** u konačnici se eliminira voda s barijerama od 34 i  $25 \text{ kcal mol}^{-1}$  u acetonitrilu i vodi. Pritom nastaje termodinamički izuzetno stabilan produkt pirol **11** koji je u odnosu na početne reaktante stabilniji za  $41 \text{ kcal mol}^{-1}$  u acetonitrilu i  $43 \text{ kcal mol}^{-1}$  u vodi. Pirol **11** je eksperimentalno najstabilniji produkt u sustavima bez vode. Zanimljivo je da unatoč svojoj stabilnosti, pirolni produkt **11** u vodenom mediju nije najzastupljeniji što se objašnjava Le Chatelierovim principom u kojemu eliminirane vode iz tri različita koraka mehanizma do pirola **11** usmjeravaju ravnotežu reakcije prema reaktantima. Dakle, osim što voda s jedne strane smanjuje barijeru olakšavajući prijenose protona, s druge strane usmjerava reakciju prema reaktantima zbog očuvanja ravnoteže reakcije.

Slika 57. Mehanizam nastanka pirola **11** iz Schiffove baze **7-c-t**.

Posljednji eksperimentalno okarakterizirani produkt, piridinski kation **16**, eksperimentalno nastaje samo u prisustvu vode te je iz istog razloga mehanizam određen samo u implicitno opisanom vodenom okruženju u prisustvu jedne eksplicitno opisane molekule vode (slika 58). Ovaj adukt nastaje reakcijom Schiffove baze **7-c-t** s protoniranom aldehidnom skupinom HNE- a gdje najprije dolazi do nukleofilne adicije na Schiffovu bazu te se sama reakcija odvija uz vrlo malu energetska barijeru od 2 kcal mol<sup>-1</sup>, a nastali adukt **13** se dalje ciklizira uz barijeru od 20 kcal mol<sup>-1</sup>. Unutar nastalog adukta **14** dolazi do preraspodjele naboja i stabilizacije za 18 kcal mol<sup>-1</sup>, a sljedeći korak je eliminacija bočne skupine -C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>CHO iz nastalog piridinskog prstena i nastanak stabilnog adukta **15**. Na kraju dolazi do eliminacije vode koja je

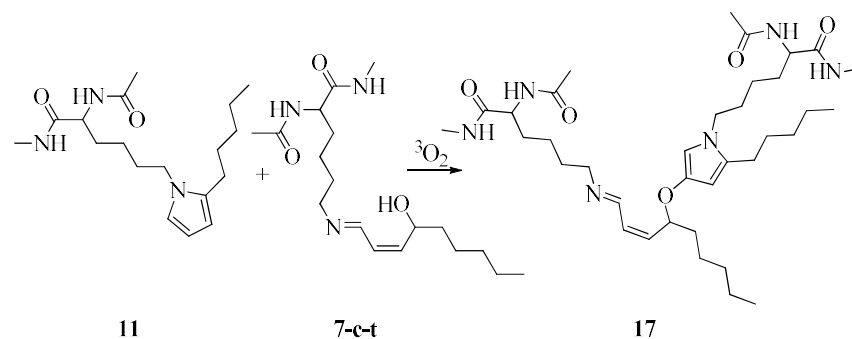


karakterizirana barijerom od 32 kcal mol<sup>-1</sup> te konačnog, termodinamički izuzetno stabilnog, piridinskog produkta **16**. Zanimljivo je da produkt **16** nastaje samo kada je voda prisutna, ali povećanjem udjela vode smanjuje se njegov udio zbog Le Chatelierovog principa koji usmjerava reakciju natrag prema reaktantima.



Slika 58. Mehanizam nastanka piridinskog produkta **16** iz *trans* Schiffove baze **7-c-t** i *trans* HNE-a **2-t**.

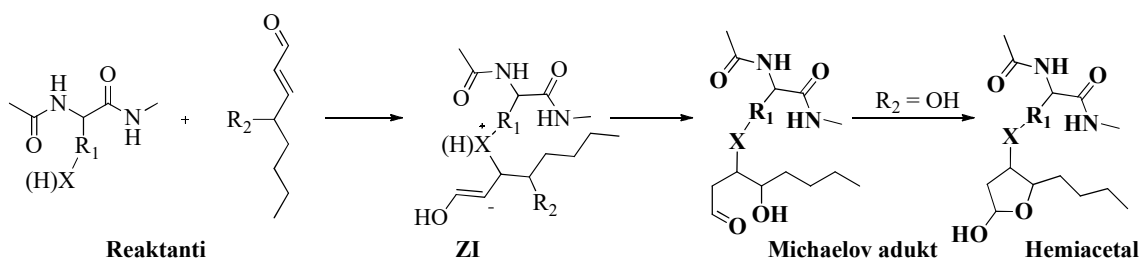
Također je predložen mehanizam bez izračunatih barijera za nastanak dvostrukog adukta prema shemi na slici 59 iz pirola **11** i Schiffove baze **7-c-t** autooksidacijom tripletnim kisikom. Ovime je završen iscrpan opis modelnog mehanizma reakcije lizina i HNE-a temeljen na eksperimentalnim rezultatima potvrđenih produkata.<sup>127</sup>



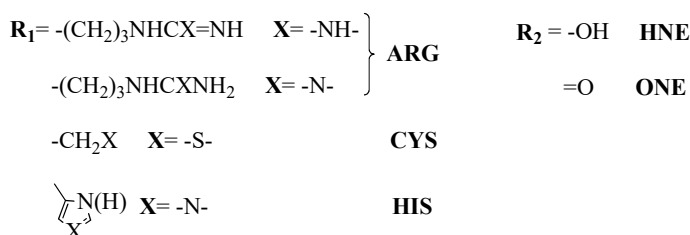
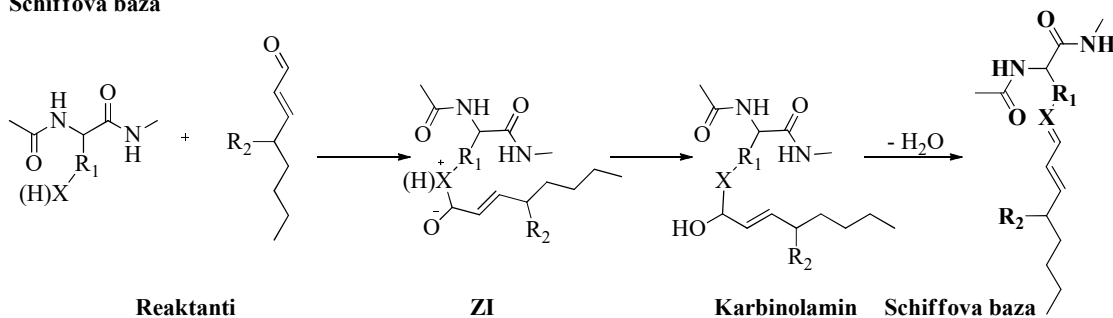
Slika 59. Predloženi mehanizam nastanka dvostrukog adukta 17 iz pirola 11 i Schiffove baze 7-c-t.

U nastavku su zajedno opisani modelni mehanizmi reakcija HNE-a i ONE-a s ostatkom prije navedenih aminokiselina (histidin, arginin i cistein) u acetonitrilu i acetonitrilu gdje je dodana eksplicitna molekula vode u strukturu prijelaznog stanja gdje god je to moguće. Kod ONE-a zbog prisustva karbonilne skupine (za razliku od HNE-a koji posjeduje hidroksilnu skupinu) ne može nastati niti hemiacetal niti pirol tako da su glavni produkti **Michaelov adukt** i **Schiffova baza** te mehanizam koji je prikazan na slici 60 nije toliko kompleksan kao u prethodnom primjeru. Ovim strukturama nisu pridruženi brojevi kao ranije jer su aminokiseline udružene na isti graf, a kako je prisutno svega nekoliko produkata, jednostavnije ih je označiti imenima, a to su **Michaelov adukt** i **Schiffova baza** te kod HNE-a i **hemiacetal**.

## Michaelov adukt



## Schiffova baza



Slika 60. Univerzalni modelni mehanizam **Michaelovog adukta** (i **hemiactal**a kod HNE-a) reakcijom na C3 dvostrukoj vezi i **Schiffove baze** reakcijom na karbonilnom atomu C1 reaktivnog aldehida.

Glavna razlika u mehanizmu je korak nastajanja **ZI** strukture koji se događa kod arginina, dok je kod ostalih aminokiselina taj korak preskočen te umjesto stvaranja **ZI** strukture odmah dolazi do reakcije prijenosa protona. Mehanizam je općenit i sličan za sve aminokiseline što je vidljivo na univerzalnom mehanizmu na slici 60, a u tablici 4 za HNE i tablici 5 za ONE mogu se vidjeti relativne slobodne energije produkata prema reaktantima za svaku aminokiselinu u sustavima acetonitril te acetonitrilu s eksplicitno dodanom vodom u strukturu prijelaznog stanja. U nastavku će biti opisan mehanizam reakcije i izračunate barijere pojedinačno za svaku aminokiselinu (arginin, cistein i histidin) s HNE-om i ONE-om u oba navedena sustava.

Tablica 4. Relativne slobodne energije ispitivanih produkata prema reaktantima u kcal mol<sup>-1</sup> za reakciju ispitanih aminokiselina arginina, cisteina i histidina s HNE-om na razini teorije SMD/MP2/6-311++G(d,p)//B3LYP/6-31G(d) u acetonitrilu i sustavu acetonitrila s eksplicitno dodanom vodom u prijelaznom stanju.

HNE	Arg - NH <sub>2</sub>	Arg - NH	Cys	His	Arg - NH <sub>2</sub>	Arg - NH	Cys	His
<b>Reaktanti</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TS <sub>1M</sub>	-	20,9	-	-	34,3	18,7	-	-
ZI <sub>M</sub>	-	10,2	-	-	31,9	9,1	-	-
TS <sub>2M</sub>	44,0	37,7	55,7	59,6	37,7	22,3	46,2	53,0
<b>Michaelov adukt</b>	-3,3	-3,6	-12,6	-11,1	-0,6	-6,2	-13,7	-8,0
TS <sub>3M</sub>	34,4	33,5	23,8	26,2	21,7	20,9	7,3	14,6
<b>Hemiacetal</b>	-3,8	-5,3	-14,0	-11,6	-1,9	-5,8	-15,6	-7,7
<b>Reaktanti</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TS <sub>1S</sub>	-	-	-	-	-	17,4	-	-
ZI <sub>S</sub>	-	-	-	-	-	13,6	-	-
TS <sub>2S</sub>	43,6	33,7	40,3	43,7	26,8	15,5	25,3	34,2
<b>Karbinolamin</b>	5,2	2,6	0,3	-0,6	5,6	3,4	-1,5	-1,7
TS <sub>3S</sub>	54,8	-	-	-	42,5	-	-	-
<b>Schiffova baza</b>	3,9	-	-	-	-1,2	-	-	-

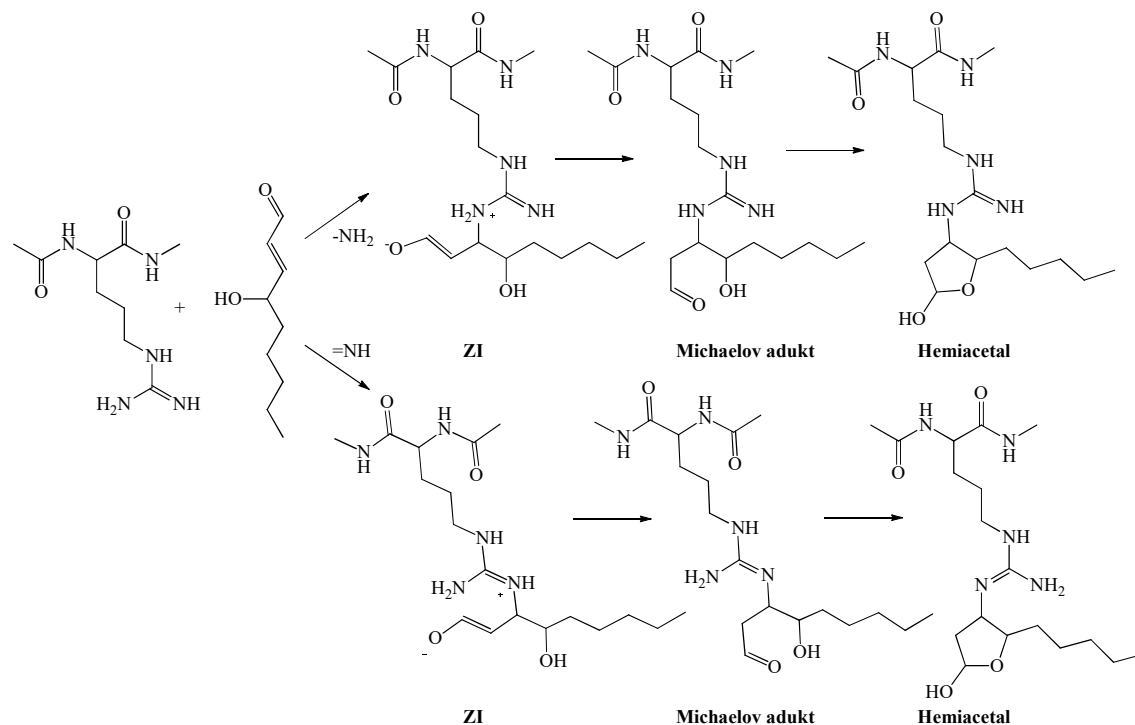
Tablica 5. Relativne slobodne energije ispitivanih produkata prema reaktantima u kcal mol<sup>-1</sup> za reakciju ispitanih aminokiselina arginina, cisteina i histidina s ONE-om na razini teorije SMD/MP2/6-311++G(d,p)//B3LYP/6-31G(d) u acetonitrilu i sustavu acetonitrila s eksplicitno dodanom vodom u prijelaznom stanju.

ONE	Arg - NH <sub>2</sub>	Arg - NH	Cys	His	Arg - NH <sub>2</sub>	Arg - NH	Cys	His
<b>Reaktanti</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TS <sub>1M</sub>	28,3	19,5	-	-	23,0	16,3	-	-
ZI <sub>M</sub>	28,8	10,8	-	-	22,6	5,2	-	-
TS <sub>2M</sub>	44,9	36,1	37,8	62,1	34,7	17,3	33,4	48,4
<b>Michaelov adukt</b>	-1,9	-0,5	-3,2	-7,8	-5,0	-8,4	-14,7	-6,4
<b>Reaktanti</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TS <sub>1S</sub>	-	-	-	-	-	15,1	-	-
ZI <sub>S</sub>	-	-	-	-	-	10,4	-	-
TS <sub>2S</sub>	44,5	34,0	55,7	46,4	23,8	13,3	23,9	32,5
<b>Karbinolamin</b>	6,5	2,9	-	1,2	3,7	0,7	-5,2	-3,0
TS <sub>3S</sub>	52,2	-	-	-	39,5	-	-	-
<b>Schiffova baza</b>	3,0	-	-	-	3,3	-	-	-

Aminokiselina arginin posjeduje dva reaktivna mjesta gvanidinske skupine, =NH i –NH<sub>2</sub> skupine te je za obje kvalitativno i kvantitativno opisan mehanizam nastanka **Michaelovog adukta i hemiacetala** s HNE-om (slika 61) i ONE-om (dodatak 13) te **Schiffove baze i karbinolamina** s HNE-om (slika 62) i ONE-om (dodatak 14). Zanimljivo je da se od svih aminokiselina jedino kod =NH reaktivne skupine arginina stvara početna intermedijerska **ZI** struktura u svakom od otapala za oba aldehida, kod svih mehanizama (jedini izuzetak je reakcija u acetonitrilu prilikom stvaranja **Schiffove baze**). Nastala **ZI** struktura je manje stabilna od samog reaktanta i zapravo je ona samo „stepenica“ na reakcijskom putu koja prelama barijeru sljedećeg koraka koji je prijenos protona. Kod –NH<sub>2</sub> skupine **ZI** struktura se stvara jedino na reakcijskom putu stvaranja **Michaelovog adukta** kod oba aldehida, u svim slučajevima osim kod HNE-a u acetonitrilu. Ovdje je nastali **ZI** intermedijer još nestabilniji nego kod =NH **ZI** intermedijera, a ranije je navedeno da i lizin tvori navedenu strukturu pri Michaelovom mehanizmu. U slučaju arginina, energetska barijera za nastanak **ZI** je ~ 20 kcal mol<sup>-1</sup> za =NH skupinu u oba otapala, a 34 kcal mol<sup>-1</sup> za –NH<sub>2</sub> skupine arginina s eksplicitnom vodom.

Nakon što je stvoren **ZI**, na dvostrukoj vezi atoma C3 dolazi do prijenosa protona i nastanka **Michaelovog adukta** kod svih sustava (oba aldehida i oba otapala) koji je stabilniji od reaktanta do 15 kcal mol<sup>-1</sup> ovisno o nastaloj strukturi (slika 61). Kod mehanizma s ONE-om **Michaelov b** je konačni produkt i mehanizam staje, dok kod HNE-a mehanizam ide još jedan korak dalje. Ciklizacijom i prijenosom protona kod mehanizma u jednom koraku s HNE-om dolazi do daljnjeg reakcijskog koraka i konačnog produkta **hemiacetala**, koji je do 3 kcal mol<sup>-1</sup> stabilniji od **Michaelovog adukta**. Barijera za sami prijenos protona je nešto manja kod reakcije =NH skupine nego kod –NH<sub>2</sub> skupine i to za 6 i 16 kcal mol<sup>-1</sup> u acetonitrilu i acetonitrilu s eksplicitnom vodom, dok je ciklizacija i prijenos protona te stvaranje **hemiacetala** energetski jednako zahtjevno u oba slučaja. Kada se uspoređuju acetonitril bez i sa dodanom molekulom eksplicitne vode, kao kod ranije navedenog lizina i ovdje dolazi do značajnog smanjenja barijere dodatkom eksplicitne molekule vode. Kod HNE-a je ta energetska razlika, odnosno stabilizacija kod prijenosa protona 6 kcal mol<sup>-1</sup> za –NH<sub>2</sub> i 16 kcal mol<sup>-1</sup> za =NH skupinu, a kod ONE-a 10 kcal mol<sup>-1</sup> za –NH<sub>2</sub> i 19 kcal mol<sup>-1</sup> za =NH skupinu. Kod HNE-a i nastanka hemiacetala je ta razlika u energiji 12 kcal mol<sup>-1</sup> za –NH<sub>2</sub> i 13 kcal mol<sup>-1</sup> za =NH skupinu. Kada se gleda ukupni mehanizam nastanka **Michaelovog adukta** (i **hemiacetala** kod HNE-a) energetski najskuplji korak je upravo prijenos protona te je ukupna barijera reakcije s HNE-om u acetonitrilu bez eksplicitne vode 44 kcal mol<sup>-1</sup> za –NH<sub>2</sub> i 38 kcal mol<sup>-1</sup> za =NH

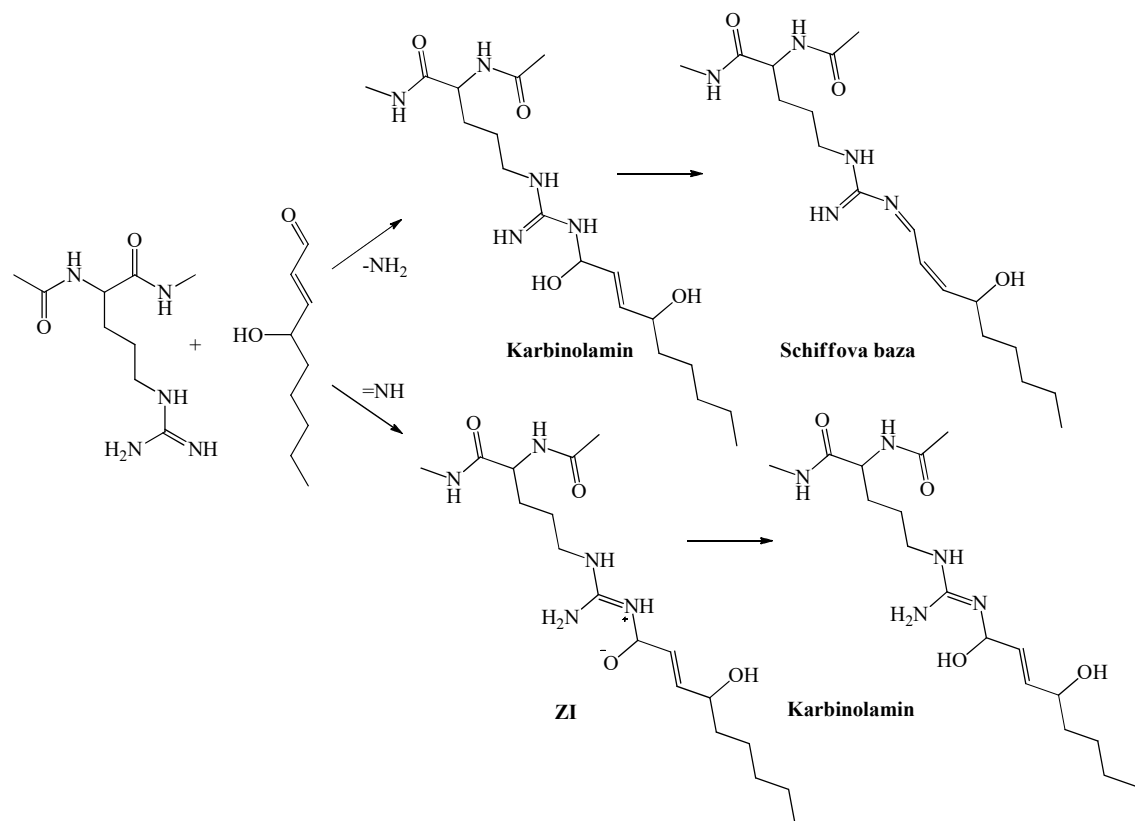
skupinu, a uz eksplicitnu vodu 38 kcal mol<sup>-1</sup> za –NH<sub>2</sub> i 22 kcal mol<sup>-1</sup> za =NH skupinu. Iz navedenog se vidi da eksplicitna voda u strukturi prijelaznog stanja značajno smanjuje reakcijsku barijeru i katalizira ukupnu reakciju nastanka **Michaelovog adukta** (i **hemiacetala**).



Slika 61. Mehanizam nastanka Michaelovog adukta reakcijom –NH<sub>2</sub> i =NH skupina arginina s HNE-om.

Kada se reakcija odvija na C1 atomu reaktivnog aldehida, u slučaju oba aldehida nastaje **Schiffova baza** reakcijama u kojima sudjeluje –NH<sub>2</sub> skupina dok se reakcijama u kojima sudjeluje =NH skupina mehanizam zaustavlja na **karbinolaminu**, što je prikazano za HNE na slici 62 i za ONE u dodatku 14. Ovdje =NH skupina, za oba aldehida, daje najprije **ZI** strukturu uz barijeru od 17 kcal mol<sup>-1</sup> kod HNE-a i 13 kcal mol<sup>-1</sup> kod ONE-a te se navedeno odvija isključivo uz prisustvo eksplicitne molekule vode. Sljedeći korak, koji ujedno predstavlja prvi kod ostalih slučajeva, je prijenos protona, čime nastaje **karbinolamin** koji je za 3-5 kcal mol<sup>-1</sup> nestabilniji od reaktanta. U sljedećem koraku samo –NH<sub>2</sub> skupina eliminacijom vode daje **Schiffovu bazu** koja je slične energije kao reaktanti, odnosno blago nestabilnija. Barijera prvog koraka prijenosa protona u acetonitrilu iznosi 45 kcal mol<sup>-1</sup> kod –NH<sub>2</sub> skupine i za HNE i ONE, odnosno 34 kcal mol<sup>-1</sup> kod =NH skupine također za oba aldehida. Navedene barijere, dodatkom eksplicitne molekule vode u strukturu prijelaznog stanja, se i u ovim slučajevima značajno smanjuju na 27 kcal mol<sup>-1</sup> kod –NH<sub>2</sub> skupine za HNE i 24 kcal mol<sup>-1</sup> za ONE, odnosno 15 kcal mol<sup>-1</sup> kod =NH skupine za oba aldehida, HNE i ONE. Kod =NH skupine te barijere su i

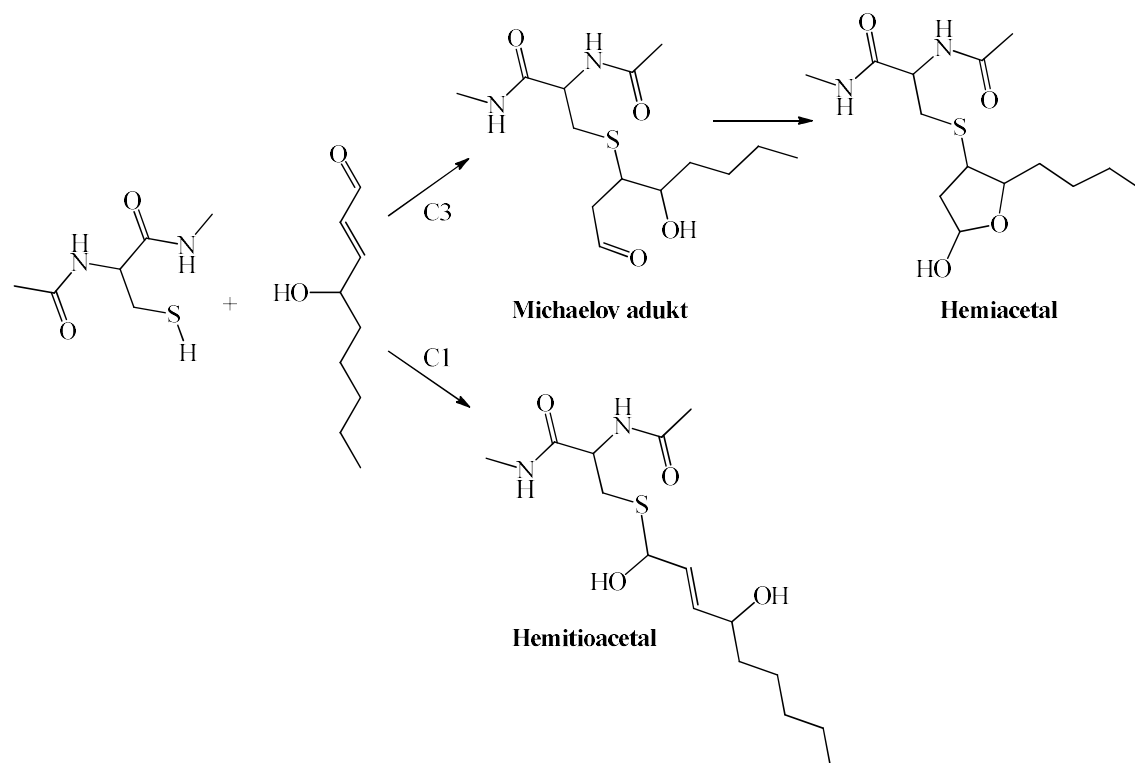
određujući korak jer je prijenos protona ujedno i jedini korak mehanizma. Kod  $\text{-NH}_2$  skupine sljedeći korak je eliminacija vode i nastanak **Schiffove baze** koji je ujedno i određujući korak mehanizma, a barijere su  $55 \text{ kcal mol}^{-1}$  za HNE i  $52 \text{ kcal mol}^{-1}$  za ONE u acetonitrilu, dok su te barijere kod eksplicitno dodane vode u strukturu prijelaznog stanja  $42 \text{ kcal mol}^{-1}$  u slučaju HNE-a i  $40 \text{ kcal mol}^{-1}$  u slučaju ONE-a. I ovaj mehanizma nastanka **Schiffove baze** je osjetljiv na dodatak eksplicitne vode, koja utječe na reakcijsku barijeru tako da ju smanjuje i tako što  $\text{=NH}$  skupine imaju manju barijeru za prijenos protona i nastanak **karbinolamina** koji je u ovom slučaju konačan produkt.



Slika 62. Mehanizam nastajanka **Schiffove baze** reakcijom  $\text{-NH}_2$  i  $\text{=NH}$  skupina arginina s HNE-om.

Aminokiselina cistein tvori manji broj kombinacija produkata nego arginin i lizin. Za razliku od arginina, cistein posjeduje jedno reaktivno mjesto,  $\text{-SH}$  skupinu i mehanizam reakcije s HNE-om prikazan je na slici 63, a mehanizam s ONE-om u dodatku 15. U ovom slučaju mogući produkti su **Michaelov adukt** te u slučaju HNE-a **hemitioacetal**, ukoliko se reakcije odvijaju na C3 atomu aldehida te **Schiffova baza** ukoliko reagira na C1 atomu. Niti u jednom od dva navedena slučaja cistein ne stvara **ZI** strukturu, već odmah dolazi do prijenosa protona, te je upravo iz tog razloga prvi korak određujući korak reakcije. Kod **Michaelovog adukta** prvi

korak prijenosa protona je i korak s najvećom barijerom koja u acetonitrilu iznosi  $56 \text{ kcal mol}^{-1}$  kod HNE-a i  $38 \text{ kcal mol}^{-1}$  kod ONE-a, a ta barijera s dodanom eksplicitnom vodom iznosi  $46 \text{ kcal mol}^{-1}$  kod HNE-a i  $33 \text{ kcal mol}^{-1}$  kod ONE-a. Kod ONE-a reakcija staje na **Michaelovom aduktu** dok kod HNE dolazi do ciklizacije u **hemiacetal** s barijerom od  $24 \text{ kcal mol}^{-1}$  u acetonitrilu i  $7 \text{ kcal mol}^{-1}$  s dodanom eksplicitnom vodom. **Michaelov adukt** i **hemiacetal** su podjednako stabilniji od reaktanata ( $\sim 15 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Kod reakcije na C1 atomu dolazi samo do jednog koraka, prijenosa protona i nastanka **hemitioacetala** uz barijere kod HNE-a od  $40 \text{ kcal mol}^{-1}$  u acetonitrilu i  $25 \text{ kcal mol}^{-1}$  s dodanom eksplicitnom vodom dok su kod ONE-a one  $56 \text{ kcal mol}^{-1}$  u acetonitrilu i  $24 \text{ kcal mol}^{-1}$  s dodanom eksplicitnom vodom. Struktura nastalog **hemitioacetala** je nešto stabilnija (do  $5 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) od reaktanata, jedino je struktura kod ONE-a u acetonitrilu stabilnija za  $15 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

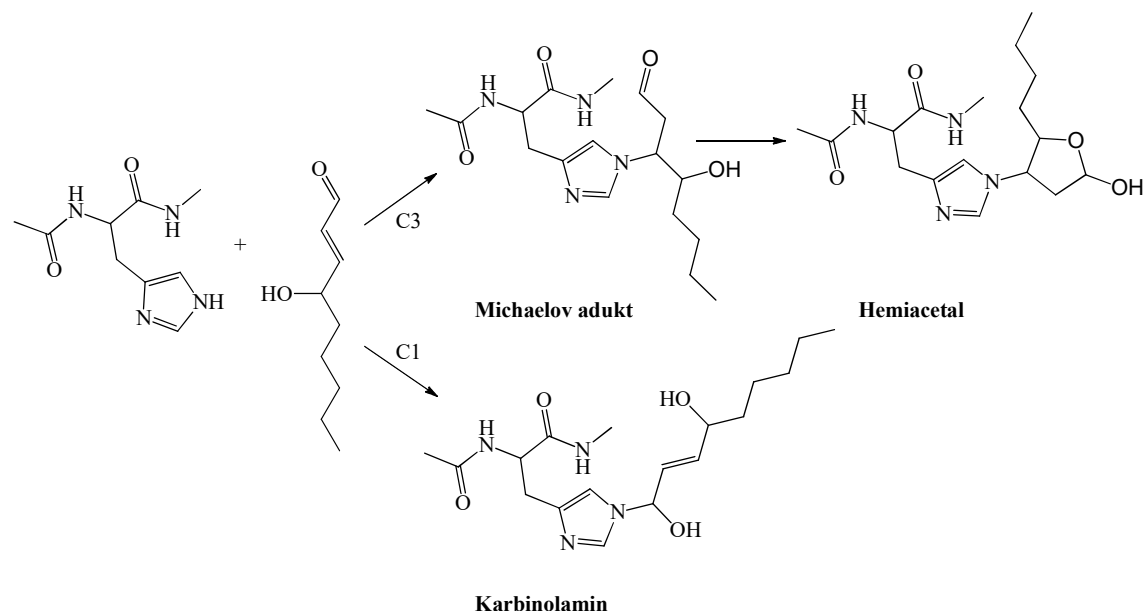


Slika 63. Mehanizam nastanka **Michaelovog adukta** i **hemitioacetala** reakcijom cisteina s HNE-om.

Histidin daje ekvivalentne produkte, slijedeći iste mehanizme kao i cistein, uz nešto veće barijere, a mehanizmi reakcija su prikazani na slici 64 za HNE i u dodatku 16 za ONE. Reaktivno mjesto kod histidina je NH dušikov atom  $\tau$  tautomera histidina. Reakcijom na C3 atomu direktnim prijenosom protona nastaje **Michaelov adukt** za koji su barijere  $60 \text{ kcal mol}^{-1}$  kod HNE-a i  $62 \text{ kcal mol}^{-1}$  kod ONE-a, a s dodanom eksplicitnom vodom barijera za isti korak

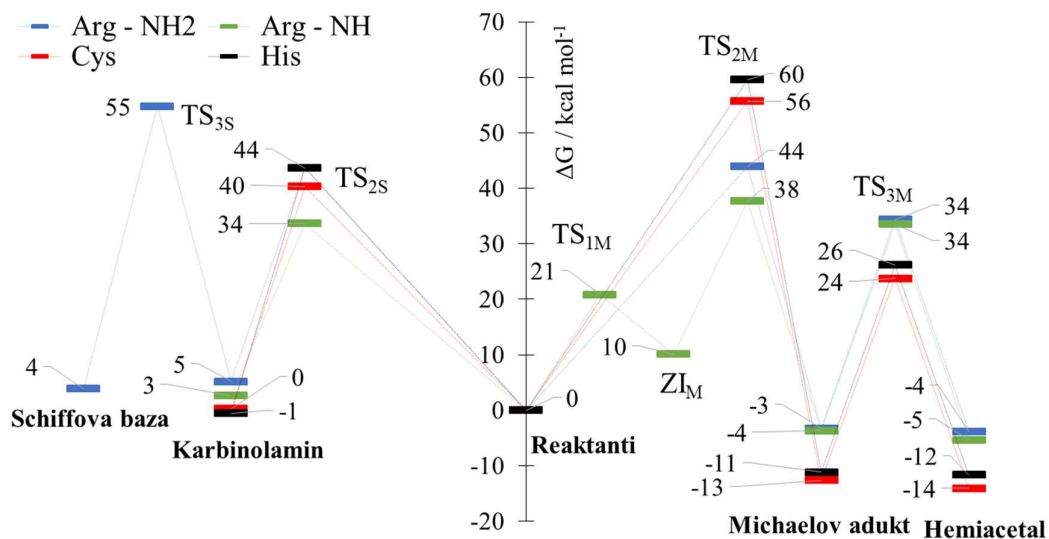


iznosi 53 kcal mol<sup>-1</sup> kod HNE-a i 48 kcal mol<sup>-1</sup> kod ONE-a. Barijera drugog koraka, pri kojem nastaje **hemiacetal**, iznosi 26 kcal mol<sup>-1</sup> u acetonitrilu i 15 kcal mol<sup>-1</sup> s dodanom eksplicitnom vodom. **Michaelov adukt** i **hemiacetal** jednake su stabilnosti, a od reaktanata su stabilniji za 8-12 kcal mol<sup>-1</sup>. I ovdje reakcijom na C1 atomu aldehida nastaje **karbinolamin** prijenosom protona za koji su barijere u acetonitrilu 44 kcal mol<sup>-1</sup> kod HNE-a i 46 kcal mol<sup>-1</sup> kod ONE-a, a s eksplicitnom vodom iste iznose 34 kcal mol<sup>-1</sup> kod HNE-a i 33 kcal mol<sup>-1</sup> kod ONE-a, a nastali **karbinolamin** neznatno je stabilniji (do 3 kcal mol<sup>-1</sup>) od početnih reaktanata.

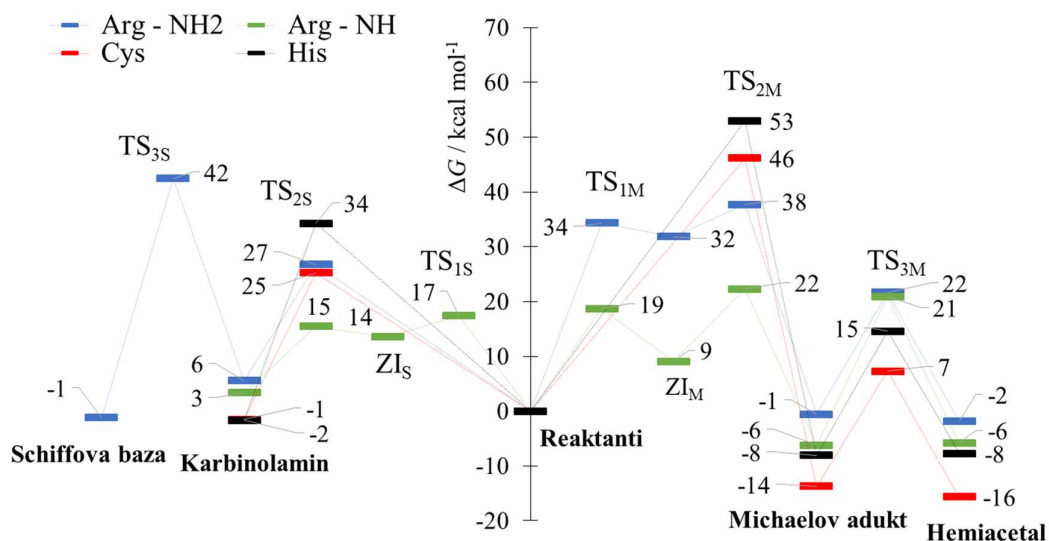


Slika 64. Mehanizam nastanka **Michaelovog adukta** i **karbinolamina** reakcijom histidina s HNE-om.

Iz slike 65 i slike 66 za HNE te dodatka 17 i dodatka 18 za ONE mogu se vidjeti barijere za svaki od navedenih koraka za sve tri analizirane aminokiseline. Kada se međusobno uspoređuju navedene aminokiseline, kod sva 4 analizirana sustava put najmanje energije do **Michaelovog adukta (hemiacetala)** i **Schiffove baze** ima aminokiselina arginin (=NH skupina), zatim cistein, dok histidin ima najveće barijere. Najstabilnije produkte u svim sustavima daje cistein koji je posljedično i eksperimentalno najreaktivnija aminokiselina.<sup>128</sup> Također je vidljivo i ranije navedeno da kod uključene eksplicitne molekule vode u prijelazno stanje dolazi do smanjenja barijera u koje je uključen prijenos protona.



Slika 65. Mehanizam nastanka **Michaelovog adukta** i **Schiffove baze** za histidin, cistein i arginin s HNE-om u acetonnitrilu.



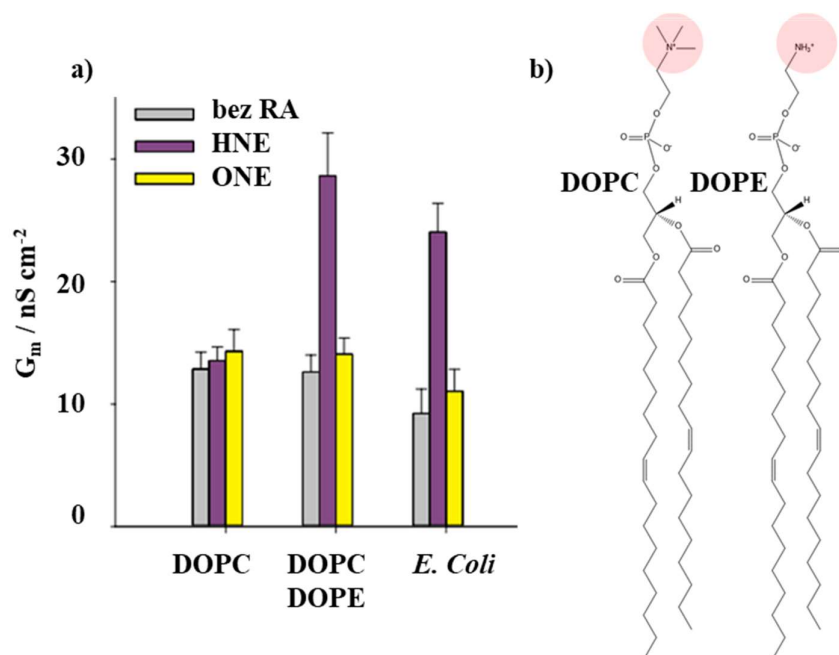
Slika 66. Mehanizam nastanka **Michaelovog adukta** i **Schiffove baze** za histidin, cistein i arginin s HNE-om u acetonnitrilu s eksplicitnom molekulom vode uključenom u strukturu prijelaznog stanja.

Ovime je opisan cjelokupni modelni mehanizam reakcije reaktivnih aldehida HNE-a i ONE-a s aminokiselinama lizinom, argininom, cisteinom i histidinom.<sup>129</sup> U nastavku je još opisan mehanizam reaktivnih aldehida s lipidom te utjecaj reaktivnih aldehida na prijenos protona kroz čistu membranu.

### 5.3.2. Utjecaj reaktivnih aldehida na fosfolipidnu membranu i prijenos protona kroz membranu

U nastavku su dani rezultati vodljivosti membrane i utjecaj ispitivanih reaktivnih aldehida HNE-a i ONE-a na istu te je ukratko opisan modelni mehanizam reakcije HNE-a s lipidom i nastanak dvostrukih adukata, dvostrukog Michaelovog adukta i dvostrukog adukta Schiffove baze. Elektrofiziološka mjerenja ukupne membranske vodljivosti ( $G_m$ ) (Dr. Olga Jovanović i prof. Elena E. Pohl, Institut za fiziologiju, patofiziologiju i biofiziku, Odjel za biomedicinske znanosti, Sveučilište za veterinu, Beč, Austrija) prikazana na slici 67a pokazuju da kod DOPC lipida ne dolazi do značajne promjene vodljivosti dodatkom RA (HNE i ONE), dok kod DOPC/DOPE miješane lipidne membrane i polarne bakterijske *E. coli* membrane dolazi do znatnog povećanja vodljivosti (više od dvostrukog povećanja), ali samo dodatkom HNE-a, dok kod ONE-a dolazi do neznatnog povećanja vodljivosti. Mjerena je ukupna vodljivost tako da je u nju uključena vodljivost natrijevog kationa  $Na^+$  i protona  $H^+$  ( $H_3O^+$ ). Iz navedenog se može zaključiti da DOPE lipid reagira s HNE-om stvarajući adukte zbog kojih dolazi do povećanja propusnosti iona, dok DOPC lipid ne reagira niti s jednim RA kao što niti ONE ne reagira ni sa jednim lipidom. Isto tako, ovi eksperimenti upućuju na činjenicu da je modifikacija lipida, i to konkretno DOPE lipida, odgovorna za povećanje vodljivosti, a ne modifikacija proteina.<sup>130</sup> Budući da je DOPE lipid sastavni dio svake unutarnje mitohondrijske membrane, reakcija s HNE-om koji nastaje upravo u lipidnom dvosloju je itekako bitna i detaljnije objašnjenje ovog mehanizma je ključno za razumijevanje utjecaja oksidativnog stresa na prijenos protona u mitohondriju. U nastavku će biti objašnjeni mogući adukti odgovorni za povećanu vodljivost, a samim time i prijenos protona te energetika i mehanizam njihovog nastanka.<sup>131</sup>

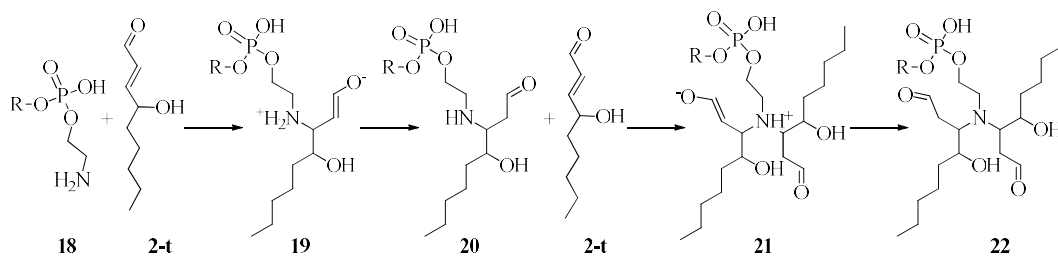
Kod DOPE lipida reaktivna je  $-NH_3^+$  skupina koja ne postoji kod DOPC lipida (slika 67b), a jedina razlika HNE i ONE strukture je da HNE posjeduje hidroksilnu, a ONE keto skupinu na C4 atomu aldehida. Upravo te razlike razlog su reaktivnosti DOPE lipida i aldehida HNE-a čiji mehanizam nastanka jednostrukih adukata s DOPE lipidom je opisan ranije,<sup>87</sup> a mehanizam nastanka dvostrukih adukata u nastavku. Navedeni dvostruki adukti Schiffove baze i Michaelovog adukta izabrani su jer su uz jednostruke adukte (Michaelov adukt i Schiffova baza) okarakterizirani masenom spektrometrijom.<sup>130</sup>



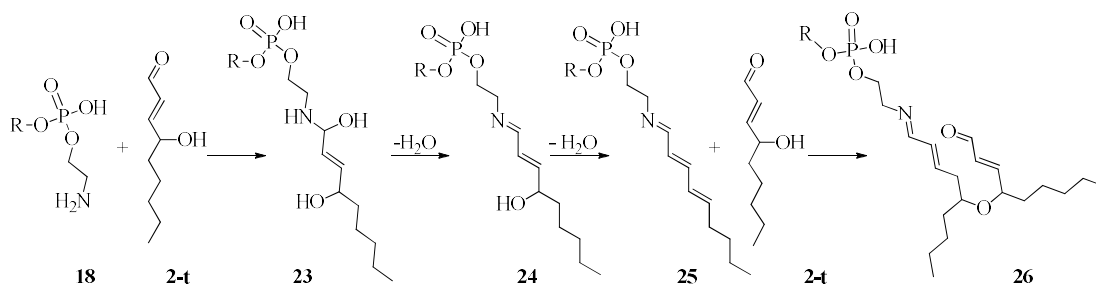
Slika 67. a) Vodljivost membrane –  $G_m$  za DOPC (DOPC:CDL=90:10 mol %), DOPC-DOPE (DOPC:DOPE:CDL=45:45:10 mol %) i *E. Coli* polarnog lipida (PE:PG:CDL=71,4:23,4:5,2 mol %). Otopina pufera sastavljena je od 50mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 10mM MES, te 10mM TRIS pri 32 °C i pH=7,32. Koncentracija lipida je 1,2 mg/mL, a RA 0,84 mM. b) Shematski prikaz DOPC i DOPE lipida, razlika u strukturi ovih lipida osjenčana je crvenom bojom.

Ukupni mehanizam nastanka dvostrukih adukata iz Michaelovog adukta **22** i Schiffove baze **26** je prikazan na slici 68 s tim da je mehanizam izračunat gdje su kao reaktanti uzeti već nastali Michaelov adukt **20** i Schiffova baza **24**. Reakcija je opisana između amino skupine  $-\text{NH}_2$  iz DOPE lipida **18** i HNE-a **2-t** na dva uobičajena reaktivna mjesta s uključenom eksplicitnom vodom u strukturu prijelaznog stanja. Aminogrupa je slične reaktivnosti kao amino skupina lizina. U računima su DOPE molekule pojednostavljene te su hidrofobni sn-1 i sn-2 acilni lanci zamijenjeni metilnom skupinom  $-\text{CH}_3$ . Kao što je napisano, ranije su okarakterizirani jednostruki adukti<sup>87</sup> **20** i **24** te nakon što je formiran Michaelov adukt **20** prema mehanizmu na slici 68 i analogno nastanku već opisanog Michaelovog adukta **4** lizina prema energetici prikazanoj na slici 54, može doći do reakcije s još jednom molekulom HNE-a.

## Dvostruki Michaelov adukt

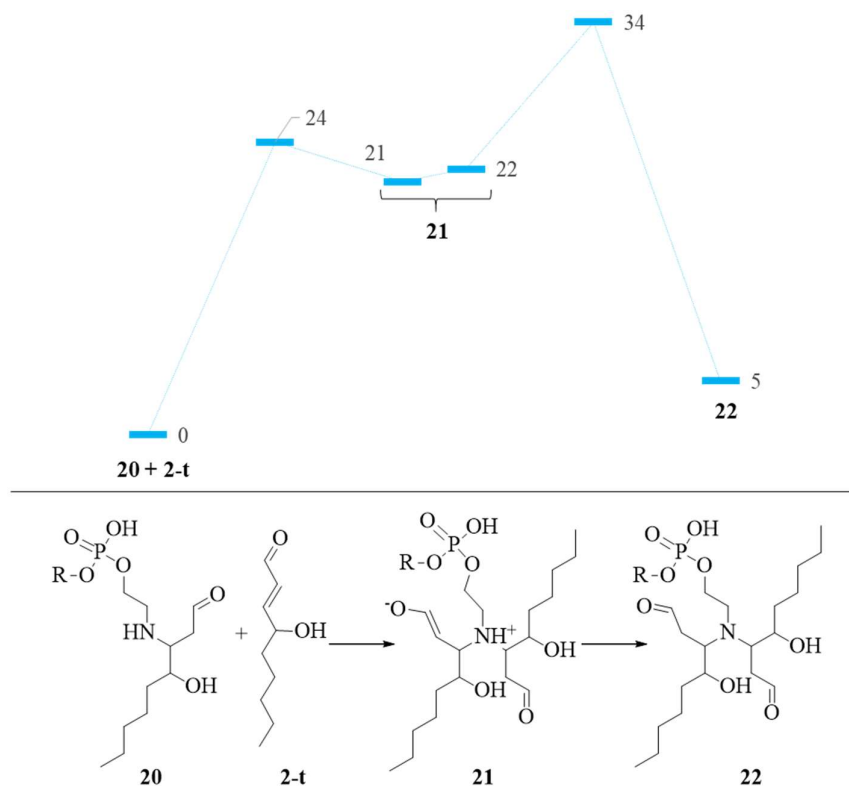


## Dvostruki adukt Schiffove baze



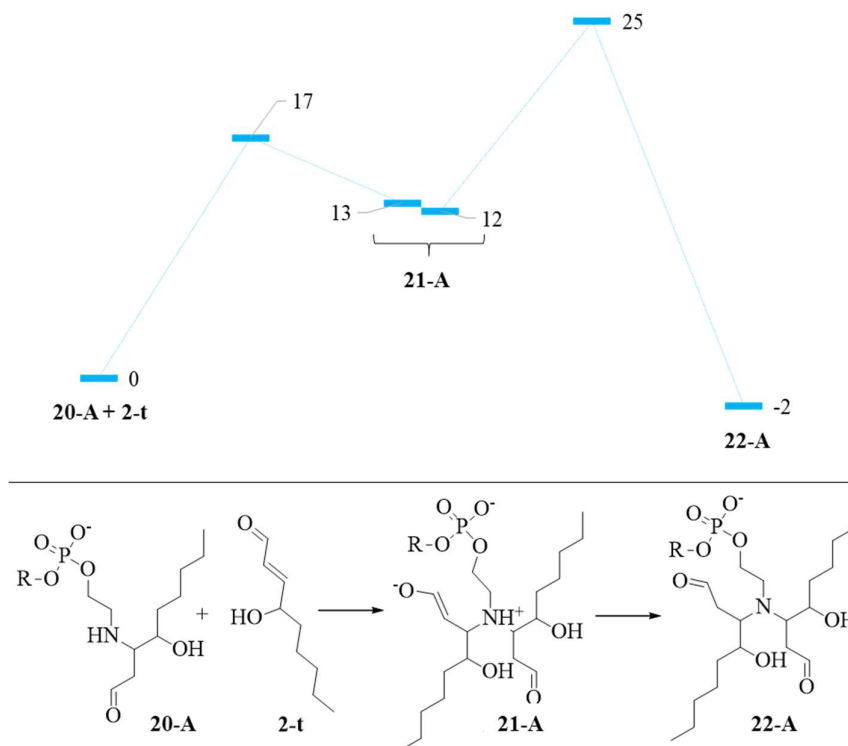
Slika 68. Mehanizam reakcije i nastanka Schiffove baze **24**, Michaelovog adukta **20** te dvostrukog Michaelovog adukta **22** i dvostruke Schiffove baze **26**.

Iz mehanizma prikazanog na slici 69 reakcijom na C3 atomu drugog HNE-a dolazi najprije do napada  $-NH$  skupine DOPE lipida i stvaranja izrazito nestabilne ZI strukture **21**, a zatim i do prijenosa protona i nastanka dvostrukog Michaelovog adukta **22**. Barijere navedenih koraka su 24 kcal mol<sup>-1</sup> za prvi te 12 kcal mol<sup>-1</sup> za konačni korak, a ukupna barijera reakcije iznosi 34 kcal mol<sup>-1</sup>. ZI struktura je nestabilnija 21-22 kcal mol<sup>-1</sup> od Michaelovog adukta, a konačni dvostruki adukt nestabilniji je za 5 kcal mol<sup>-1</sup>. Teoretski je moguć nastanak ovog dvostrukog Michaelovog adukta i kod ONE-a za koji mehanizam nije izračunat, ali pretpostavka je da je mehanizam ekvivalentan sa sličnom energetikom.



Slika 69. Mehanizam nastanka dvostrukog Michaelovog adukta **22** iz već formiranog Michaelovog adukta **20**.

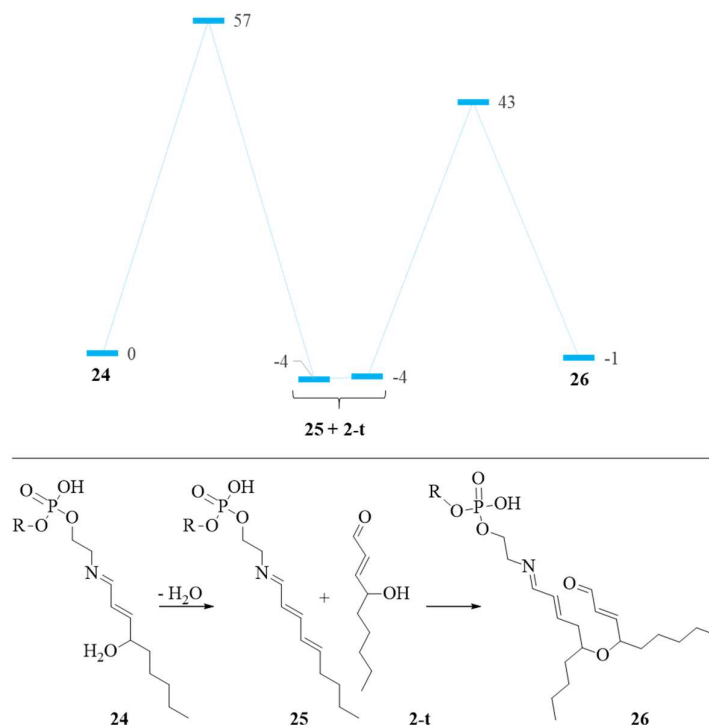
Mehanizam nastanka dvostrukog Michaelovog adukta **22** može biti opisan i na drugi način, u kojem je reakcijska barijera znatno manja kada se početni Michaelov adukt **20** nalazi u deprotoniranom obliku **20-A**. Tada je reakcijska barijera niža za 7 kcal mol<sup>-1</sup> za prvi i 9 kcal mol<sup>-1</sup> za drugi korak (barijera 17 kcal mol<sup>-1</sup> za prvi korak i 25 kcal mol<sup>-1</sup> za drugi) pri stvaranju dvostrukog Michaelovog adukta **22-A** koji je za samo 2 kcal mol<sup>-1</sup> stabilniji od početnog jednostrukog Michaelovog adukta **20-A** što je vidljivo na slici 70. Iz navedenog je vidljivo da postoji više mogućih reakcijskih puteva koji vode istom produktu.



Slika 70. Mehanizam nastanka dvostrukog Michaelovog adukta **22-A** preko anionske (*A*) strukture iz već formiranog Michaelovog adukta **20-A**.

Kod dvostrukog Schiffovog adukta, nakon nastanka Schiffove baze **24**, reakcija se može nastaviti prema mehanizmu prikazanom na slici 71. Prvi korak je eliminacija vode iz Schiffove baze za koju je barijera  $57 \text{ kcal mol}^{-1}$  i nastanak adukta **25**. Ovaj korak nije moguć kod ONE-a jer umjesto hidroksilne sadrži karbonilnu skupinu i eliminacija vode nije moguća te zato ne nastaje dvostruki Schiffov adukt. Upravo iz tog razloga je moguće da je ovaj adukt koji se stvara samo kod HNE-a odgovoran za ranije opisano povećanje vodljivosti membrane.

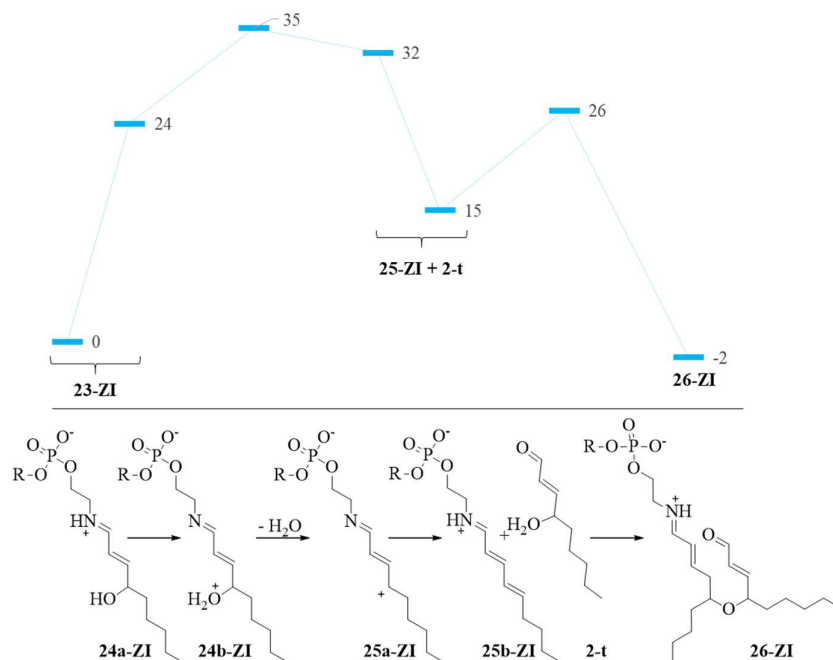
Nakon eliminacije vode slijedi prijenos protona hidroksilne skupine nove HNE molekule na dvostruku vezu adukta **25** iz čega nastaje konačni dvostruki Schiffov adukt **26** uz barijeru od  $43 \text{ kcal mol}^{-1}$ . I u ovome mehanizmu je pronađen put s manjom reakcijskom barijerom gdje je početni Schiffov adukt u ZI obliku.



Slika 71. Mehanizam nastanka dvostruke Schiffove baze **26** iz već formirane Schiffove baze **24**.

I u ovom slučaju dolazi do značajnog smanjenja barijere kada se u obzir uzme mehanizam gdje je početna Schiffova baza u obliku ZI strukture, što je vidljivo sa slike 72. Pritom prvo dolazi do intramolekulskog prijenosa protona s  $-NH$  skupine Schiffove baze **24a-ZI** na  $-OH$  skupinu u **24b-ZI** za koji nije izračunata barijera, a koji je nestabilniji za 24 kcal mol<sup>-1</sup> od početne strukture. Nakon internog prijenosa protona i destabilizacije molekule, eliminira se molekula vode s barijerom od 11 kcal mol<sup>-1</sup>. Daljnjom eliminacijom vode dolazi do nastanka relativno nestabilnog produkta **25a-ZI** (nestabilniji 32 kcal mol<sup>-1</sup> od početnog reaktanta), a intermolekulskim prijenosom protona na dušik stvara se 17 kcal mol<sup>-1</sup> stabilniji konjugirani produkt **25b-ZI** (nestabilniji 15 kcal mol<sup>-1</sup> od početnog reaktanta). Prijenosom protona hidroksilne skupine nove HNE molekule na dvostruku vezu nastaje konačni dvostruki Schiffov adukt **26-ZI**, opet uz barijeru od 11 kcal mol<sup>-1</sup>, koji je 2 kcal mol<sup>-1</sup> stabilniji od jednostrukog reaktanta. Ovim mehanizmom preko ZI strukture barijera reakcije spuštена je za 22 kcal mol<sup>-1</sup> (s 57 kcal mol<sup>-1</sup> na 35 kcal mol<sup>-1</sup>) u odnosu na ranije opisani mehanizam. Navedeni mehanizmi opisani na slici 70 i slici 72 zajednički su prikazani u dodatku 19.<sup>131</sup>





Slika 72. Mehanizam nastanka dvostruke Schiffove baze **26-ZI** iz već formirane Schiffove baze **24a-ZI** preko ZI struktura.

Svime navedenim pokazano je da HNE uzrokuje povećanu ukupnu vodljivost membrane, a samim time i olakšan prijenos protona, tako što uzrokuje modifikaciju DOPE lipida iz membrane, dok ONE ne uzrokuje povećanu vodljivost membrane. Ranije su okarakterizirani jednostruki produkti, a iz njih je opisan nastanak dvostrukih adukata iz DOPE lipida i HNE-a, dvostrukog Michaelovog adukta i Schiffove baze. Zbog keto skupine ONE ne može tvoriti dvostruku Schiffovu bazu, dok hidroksilna skupina HNE-a može. Upravo je taj dvostruki Schiffov adukt najvjerojatnije razlog povećane vodljivosti membrane u prisutnosti HNE-a, dok kod ONE-a to nije slučaj. Navedeni rezultat doprinosi boljem razumijevanju reakcija reaktivnih aldehida s membranama u realnim biološkim sustavima te lančano povezanih mehanizama u membranama. Te reakcije su od iznimne važnosti ne samo kod lipida, već i kod proteina, budući da uzrokuju oštećenja stanica kao posljedice oksidativnog stresa koja su začetak mnogih štetnih lančanih reakcija s različitim nepoželjnim posljedicama po cjelokupni organizam.

## § 6. ZAKLJUČAK

U ovoj disertaciji obrađen je problem mehanizma prijenosa protona putem dugolančanih masnih kiselina koji je potpomognut UCP2 proteinom kroz unutarnju mitohondrijsku membranu. Također je opisan utjecaj reaktivnih aldehida, produkata oksidativnog stresa, na protein i fosfolipidnu membranu te posljedično mehanizam prijenosa protona. U cikličkom mehanizam prijenosa protona proton se kroz membranu lako prenosi neutralnom masnom kiselinom i to njenom translokacijom kroz membranu iz matriksa u citosol neovisno o proteinu, a zatim dolazi do deprotonacije i povratka nastalog aniona masne kiseline na matriks stranu pomoću proteina. U prvom dijelu disertacije opisana je upravo translokacija neutralne i anionske forme masne kiseline kroz čisti fosfolipidni sloj bez prisustva proteina, dok je u drugom dijelu homološkim modeliranjem predložena struktura UCP2 proteina koja je uspoređena s NMR-om određenom strukturom i AAC proteinom za koji postoji više kristalno određenih struktura. Ispitala se i interakcija dobivene strukture UCP2 proteina s anionom masne kiseline te je predložen mogući put povratka aniona vanjskom stranom proteina koji je potpomognut pozitivnim elektrostatskim potencijalom proteina. U zadnjem, trećem dijelu disertacije, kvantnokemijskim računima su pokazani detaljni modelni mehanizmi reakcije reaktivnih aldehida HNE-a i ONE-a s aminokiselinama proteina (lizinom, argininom, histidinom i cisteinom) te njihova reakcija s lipidom. Produkti su bazirani i izabrani na zaključcima koji su dobiveni na temelju eksperimentalnih rezultata.

Rezultati provedenih računa slobodne energije za različite duljine lanaca dugolančanih masnih kiselina u anionskom i neutralnom obliku pokazuju da se u modelnom biološkom sustavu neutralna forma kiseline lako translocira kroz lipidnu membranu neovisno o duljini lanca zasićene masne kiseline, uz pripadnu energetska barijeru  $\sim 3$  kcal mol<sup>-1</sup>. Za razliku od vrlo brzog prijenosa neutralne forme masne kiseline, barijera za nabijenu anionsku formu je mnogostruko veća i iznosi  $\sim 17$  kcal mol<sup>-1</sup>. Obje forme masne kiseline se produljenjem lanca stabiliziraju zbog hidrofobnih interakcija „repa“ masne kiseline s hidrofobnim „repovima“ lipida. Krivulje slobodne energije neutralnog i anionskog oblika se sijeku na udaljenosti od  $\sim 1,4$  nm od centra membrane, što predstavlja najvjerojatnije mjesto protoniranja/deprotoniranja dugolančanih masnih kiselina. Prema tome, krećući se od vode prema centru lipida anionski

oblik masne kiseline dominira, dok od sjecišta krivulja slobodne energije neutralne i anionske forme krećući se prema centru membrane prevladava neutralni oblik masne kiseline.

Energetska barijera povratka anionske forme kroz lipidni dvosloj je previsoka za jedan usklađeni biološki mehanizam i zbog toga transmembranski proteini kataliziraju navedeni proces. Simulacijama je potvrđeno da NMR-om određena struktura UCP2 proteina (PDB kod: 2LCK) nije fiziološki relevantna jer propušta vodu kroz unutrašnjost proteina. Također su pripremljeni i simulirani homološki modeli gdje je sekvenca UCP2 proteina homološki modelirana na kristalne strukture AAC proteina (PDB kod: 1OKC i 6GCI) koje su okrenute prema citosolnoj i matriks strani membrane. Obje strukture su uspoređene s referentnim AAC strukturama na koje su modelirane, a koje su također simulirane i detaljno analizirane kako bi poslužile kao referenca za nove homološke strukture. Obje homološke strukture UCP2 proteina su stabilne i nepropusne za vodu, dok je struktura okrenuta prema citosolnoj strani stabilnija kao i u slučaju referentne AAC strukture. Manje stabilnu strukturu AAC proteina okrenutu prema matriksu dodatno stabiliziraju kardiolipini koji nemaju utjecaja na već stabilnu strukturu okrenutu prema citosolu. Kada se uspoređuju strukture UCP2 proteina, homološke strukture pokazale su se superiornijim u svim analizama u odnosu na simuliranu NMR-om određenu strukturu UCP2 proteina – svi strukturni motivi homološki modeliranih UCP2 proteina su stabilni te su strukture kompaktnije, a izračunata osmotska permeabilnost vode obje homološke strukture tri je reda veličine manja od permeabilnosti vode NMR-om određene strukture. Najmanje propusna je homološka struktura okrenuta prema matriksu, budući da je struktura proteina zatvorenija zbog postojanja zatvorene solne mreže i zbijenih hidrofobnih  $\pi\text{xxx}\pi$  motiva parnih uzvojnica, dok strukture otvorene prema citosolu posjeduju samo zatvorenu solnu mrežu. Iako je NMR-om određena struktura proteina permeabilna, počinje se stabilizirati tijekom provedene MD simulacije te nakon 2  $\mu\text{s}$  pokazuje šest puta manju permeabilnost vode u odnosu na početnu NMR-om određenu strukturu. Međutim, dobivena struktura nije niti izbliza zadovoljavajuća u usporedbi sa homološki modeliranim strukturama UCP2 proteina otvorenim prema citosolu i matriksu, koje predstavljaju povoljne početne strukture u daljnjim istraživanjima.

Homološki modelirana struktura otvorena prema citosolu i NMR-om određena struktura simulirane su u prisustvu aniona nezasićene arahidonske kiseline koji je smješten na od prije poznato (potvrđeno eksperimentom) vezno mjesto UCP2 proteina, tj. arginin R60. Pritom su obje strukture pokazale interakciju „glave“ masne kiseline s argininom R60, dok je samo

homološka struktura ostvarila dodatnu stabilizaciju hidrofobnog „repa“ masne kiseline s hidrofobnim aminokiselinama proteina. Ove interakcije se gube mutiranjem arginina u serin, tj. mutacijom R60S. Također je izračunat prosječan elektrostatski potencijal oba navedena proteina koji ukazuje na postojanje pozitivnog gradijenta potencijala s jedne strane proteina te je predložen mehanizam prijenosa aniona arahidonske masne kiseline potpomognut UCP2 proteinom po kojem bi anion prošao uz bočnu stranu proteina koja pokazuje pozitivan elektrostatski potencijal. Tako bi anion masne kiseline prošao uz vanjsku stranu proteina gdje bi negativna „glava“ išla uz pozitivni gradijent potencijala dok bi hidrofobni „rep“ bio u interakciji s hidrofobnim „repovima“ lipida, čime bi se mogla smanjiti barijera prijenosa aniona masne kiseline kroz lipidni dvosloj.

U zadnjem dijelu disertacije su predloženi modelni mehanizmi reakcije dva produkta oksidativnog stresa, HNE-a i ONE-a, s četiri različite aminokiseline – lizinom, argininom, histidinom i cisteinom te s DOPE lipidom. Najdetaljnije je ispitan mehanizam reakcije lizina i HNE-a koji je izveden i eksperimentalno i računski. Navedeni mehanizam ispitan je eksperimentalno u tri različita otapala, dok je računski proveden u dva otapala, acetonitrilu i vodi. Glavni produkt u acetonitrilu bez prisustva vode je pirol **11** koji se pokazao termodinamički izrazito stabilnim u odnosu na reaktante. Udio ovoga produkta pada eksperimentalno povećanjem udjela vode, a to je objašnjeno Le Chatelierovim principom. U mehanizmu na putu do pirola dolazi, u dva navrata, do eliminacije vode, a povećan udio vode u smjesi tada usmjereva reakciju natrag prema reaktantima. Povećanjem udjela vode javljaju se drugi produkti, a u čistoj vodi glavni produkt je smjesa Michaelovog adukta **4** i cikličkog hemiacetala **5**. Samo u prisustvu vode nastaje izrazito stabilan produkt piridin **17** jer se nalazi u obliku soli. Važno je napomenuti i da je u računima prijelaznog stanja u vodenom okruženju bila uključena i jedna eksplicitno opisana molekula vode. Zbog toga su energetske barijere reakcija u kojima dolazi do prijenosa protona (čest slučaj u istraživanim reakcijama) znatno niže negoli što bi bile bez prisustva eksplicitno opisane molekule vode, tj. u prisustvu isključivo implicitno opisanog vodenog okruženja. Kada se uspoređuju reaktivnosti ostalih aminokiselina s HNE-om i ONE-om, potencijalnih produkata je značajno manje, a moguća su samo dva reakcijska puta. Pritom prvi mehanizam odgovara Michaelovoj adiciji koja se zbiva na C3 dvostrukoj vezi reaktivnih aldehida, dok drugi odgovara nastanku Schiffove baze te se odvija na C1 karbonilnom atomu reaktivnih aldehida. Od ostalih aminokiselina najmanje barijere navedenih reakcija ima arginin, a cistein daje termodinamički najstabilnije produkte.

U membranskom okruženju je pokazano da HNE povećava ukupnu vodljivost membrane stvaranjem adukata s amino skupinom DOPE lipida, što kod ONE-a nije slučaj. Nadalje su prikazani mehanizmi nastanka dvostrukih adukata Michaelovog adukta i Schiffove baze. Kod nastanka dvostrukog adukta Schiffove baze dolazi do prijenosa protona s hidroksilne skupine HNE-a koju ONE aldehyd ne posjeduje te ne nastaje navedeni produkt. Upravo se iz tog razloga pretpostavlja da je dvostruki adukt Schiffove baze odgovoran za povećanje vodljivosti membrane u prisustvu HNE-a.

Ukupni rezultati navedenih simulacija molekulske dinamike i kvantno-mehaničkih računa pokazuju da se neutralna masna kiselina lako translocira kroz lipid, a da je za povratak anionske forme kiseline potreban protein. Predložene homološke strukture UCP2 proteina zadovoljile su sve ispitane parametre i pokazale se kao potencijalno fiziološki relevantne strukture UCP2 proteina koje dozvoljavaju prijenos aniona masne kiseline, gdje vjerojatni put prijenosa masne kiseline počinje na poznatom veznom mjestu (R60) te prati pozitivni potencijal koji postoji na vanjskoj strani proteina. Pokazano je i da reaktivni aldehydi HNE i ONE lako reagiraju i s aminokiselinama i s lipidima, gdje u potonjem slučaju HNE posljedično uzrokuje povećanu vodljivost membrane. Rezultati izneseni u ovoj disertaciji, dobiveni posredstvom modelnih sustava u kontroliranim uvjetima, predstavljaju bitan doprinos u rasvjetljavanju mehanizma prijenosa protona na molekularnoj razini i utjecaja oksidativnog stresa na staničnu membranu.

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. J. J. Ruprecht i E. R. S. Kunji, *Trends Biochem. Sci.* (2019) 1–15.
2. J. M. Berg, J. L. Tymoczko i L. Stryer, *Biochemistry* (W H Freeman, New York, 2002).
3. R. Z. Zhao, S. Jiang, L. Zhang i Z. Bin Yu, *Int. J. Mol. Med.* **44** (2019) 3–15.
4. P. Mitchell, *Nature* **191** (1961) 144–148.
5. E. R. S. Kunji, A. Aleksandrova, M. S. King, H. Majd, V. L. Ashton, E. Cerson, R. Springett, M. Kibalchenko, S. Tavoulari, P. G. Crichton i J. J. Ruprecht, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1863** (2016) 2379–2393.
6. F. Bouillaud, M. C. Alves-Guerra i D. Ricquier, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1863** (2016) 2443–2456.
7. D. RICQUIER i F. BOUILLAUD, *Biochem. J.* **345** (2000) 161–179.
8. P. Ježek, B. Holendová, K. D. Garlid i M. Jabůrek, *Antioxid. Redox Signal.* **29** (2018) 667–714.
9. M. Jastroch, A. S. Divakaruni, S. Mookerjee, J. R. Treberg i M. D. Brand, *Essays Biochem.* **47** (2010) 53–67.
10. M. D. Brand, L. F. Chien, E. K. Ainscow, D. F. S. Rolfe i R. K. Porter, *BBA - Bioenerg.* **1187** (1994) 132–139.
11. M. D. Brand i T. C. Esteves, *Cell Metab.* **2** (2005) 85–93.
12. M. Monné, i F. Palmieri, in: *Curr. Top. Membr.:* (Academic Press Inc., 2014), pp. 289–320.
13. Y.-J. Wang F. I. Khan, Q. Xu, i D.-Q. Wei, *Curr. Protein Pept. Sci.* **19** (2016) 507–522.
14. A. M. Woyda-Ploszczyca i W. Jarmuszkiewicz, *PLoS One* **9** (2014).
15. C. Chipot, J. R. Schnell, N. Zitzmann, E. Pebay-peyroula, L. J. Catoire, B. Miroux, E. R. S. Kunji, G. Veglia, T. A. Cross i P. Schanda, *Chem. Rev.* **118** (2018) 2559–3607.
16. M. Zoonens, J. Comer, S. Masscheleyn, E. Pebay-Peyroula, C. Chipot, B. Miroux i F. Dehez, *J. Am. Chem. Soc.* **135** (2013) 15174–15182.
17. M. Klingenberg, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1778** (2008) 1978–2021.
18. E. Pebay-Peyroula, C. Dahout-Gonzalez, R. Kahn, V. Trézéguet, G. J.-M. Lauquin i G. Brandolin, *Nature* **426** (2003) 39–44.
19. H. Nury, C. Dahout-Gonzalez, V. Trézéguet, G. Lauquin, G. Brandolin i E. Pebay-Peyroula, *FEBS Lett.* **579** (2005) 6031–6036.
20. J. J. Ruprecht, A. M. Hellowell, M. Harding, P. G. Crichton, A. J. McCoy i E. R. S. Kunji, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111** (2014) E426–E434.
21. J. J. Ruprecht, M. S. King, T. Zögg, A. A. Aleksandrova, E. Pardon, P. G. Crichton, J. Steyaert i

- E. R. S. Kunji, *Cell* **176** (2019) 435–447.e15.
22. G. Hedger, S. L. Rouse, J. Domański, M. Chavent, H. Koldsø i M. S. P. Sansom, *Biochemistry* **55** (2016) 6238–6249.
23. M. Klingenberg, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1788** (2009) 2048–2058.
24. F. Dehez, P. Schanda, M. S. King, E. R. S. Kunji i C. Chipot, *Biophys. J.* **113** (2017) 2311–2315.
25. Q. Yi, Q. Li, S. Yao, Y. Chen, M. X. Guan i X. Cang, *Mitochondrion* **47** (2019) 94–102.
26. R. A. Corey, O. N. Vickery, M. S. P. Sansom i P. J. Stansfeld, *J. Chem. Theory Comput.* **15** (2019) 5727–5736.
27. A. Pietropaolo, C. L. Pierri, F. Palmieri i M. Klingenberg, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1857** (2016) 772–781.
28. A. M. Bertholet, E. T. Chouchani, L. Kazak, A. Angelin, A. Fedorenko, J. Z. Long, S. Vidoni, R. Garrity, J. Cho, N. Terada, D. C. Wallace, B. M. Spiegelman i Y. Kirichok, *Nature* **571** (2019) 515–520.
29. D. Larrouy, P. Laharrague, G. Carrera, N. Viguerie-Bascands, C. Levi-Meyrueis, C. Fleury, C. Pecqueur, M. Nibbelink, M. André, L. Casteilla i D. Ricquier, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235** (1997) 760–764.
30. M. J. Berardi, W. M. Shih, S. C. Harrison i J. J. Chou, *Nature* **476** (2011) 109–113.
31. M. Zoonens, J. Comer, S. Masscheleyn, E. Pebay-Peyroula, C. Chipot, B. Miroux i F. Dehez, *J. Am. Chem. Soc.* **135** (2013) 15174–15182.
32. D. Arsenijevic, H. Onuma, C. Pecqueur, S. Raimbault, B. S. Manning, B. Miroux, E. Couplan, M. C. Alves-Guerra, M. Gubern, R. Surwit, F. Bouillaud, D. Richard, S. Collins i D. Ricquier, *Nat. Genet.* **26** (2000) 435–439.
33. A. Nègre-Salvayre, C. Hirtz, G. Carrera, R. Cazenave, M. Troly, R. Salvayre, L. Pénicaud i L. Casteilla, *FASEB J.* **11** (1997) 809–815.
34. D. G. Pons, M. Nadal-Serrano, M. Torrens-Mas, A. Valle, J. Oliver i P. Roca, *Free Radic. Biol. Med.* **86** (2015) 67–77.
35. I. Dando, R. Pacchiana, E. D. Pozza, I. Cataldo, S. Bruno, P. Conti, M. Cordani, A. Grimaldi, G. Butera, M. Caraglia, A. Scarpa, M. Palmieri i M. Donadelli, *Free Radic. Biol. Med.* **113** (2017) 176–189.
36. M. Jabůrek, J. Ježek i P. Ježek, *FEBS Open Bio* **8** (2018) 692–701.
37. N. Li, M. Karaca i P. Maechler, *Redox Biol.* **13** (2017) 541–549.
38. Z. B. Andrews, S. Diano i T. L. Horvath, *Nat. Rev. Neurosci.* **6** (2005) 829–840.
39. Z. B. Andrews, *Curr. Aging Sci.* **3** (2010) 102–112.
40. S. Diano i T. L. Horvath, *Trends Mol. Med.* **18** (2012) 52–58.
41. M. Jabůrek i K. D. Garlid, *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 25825–25831.

42. M. Jabůrek, M. Vařecha, R. E. Gimeno, M. Dembski, P. Ježek, M. Zhang, P. Burn, L. A. Tartaglia i K. D. Garlid, *J. Biol. Chem.* **274** (1999) 26003–26007.
43. T. Hoang, M. D. Smith i M. Jelokhani-Niaraki, *Biochemistry* **51** (2012) 4004–4014.
44. J. Nedergaard i B. Cannon, *Exp. Physiol.* **88** (2003) 65–84.
45. J. A. Stuart, J. A. Harper, K. M. Brindle, M. B. Jekabsons i M. D. Brand, *J. Biol. Chem.* **276** (2001) 18633–18639.
46. C. Pecqueur, T. Bui, C. Gelly, J. Hauchard, C. Barbot, F. Bouillaud, D. Ricquier, B. Miroux i C. B. Thompson, *FASEB J.* **22** (2008) 9–18.
47. A. Vozza, G. Parisi, F. De Leonardis, F. M. Lasorsa, A. Castegna, D. Amorese, R. Marmo, V. M. Calcagnile, L. Palmieri, D. Ricquier, E. Paradies, P. Scarcia, F. Palmieri, F. Bouillaud i G. Fiermonte, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111** (2014) 960–965.
48. A. S. Divakaruni i M. D. Brand, *Physiology (Bethesda)*. **26** (2011) 192–205.
49. F. Kamp, D. Zakim, F. Zhang, N. Noy i J. A. Hamilton, *Biochemistry* **34** (1995) 11928–11937.
50. A. A. Pashkovskaya, M. Vazdar, L. Zimmermann, O. Jovanovic, P. Pohl i E. E. Pohl, *Biophys. J.* **114** (2018) 2142–2151.
51. F. Kamp i J. A. Hamilton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89** (1992) 11367–70.
52. J. R. Simard, B. K. Pillai i J. A. Hamilton, *Biochemistry* **47** (2008) 9081–9089.
53. Q. Al-Awqati, *Nat. Cell Biol.* **1** (1999) E201–E202.
54. F. Kamp i J. A. Hamilton, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **75** (2006) 149–159.
55. R. M. Locke, E. Rial i D. G. Nicholls, *Eur. J. Biochem.* **129** (1982) 381–387.
56. R. M. Locke, E. Rial, I. D. Scot i D. G. Nicholls, *Eur. J. Biochem.* **129** (1982) 373–380.
57. P. G. Crichton, Y. Lee i E. R. S. Kunji, *Biochimie* **134** (2017) 35–50.
58. V. P. Skulachev, *FEBS Lett.* **294** (1991) 158–162.
59. K. D. Garlid, D. E. Orosz, M. Modrianský, S. Vassanelli i P. Ježek, *J. Biol. Chem.* **271** (1996) 2615–20.
60. K. D. Garlid, M. Jabůrek i P. Ježek, *FEBS Lett.* **438** (1998) 10–14.
61. E. Winkler i M. Klingenberg, *J. Biol. Chem.* **269** (1994) 2508–2515.
62. M. Klingenberg, *Trends Biochem. Sci.* **15** (1990) 108–112.
63. A. M. Bertholet i Y. Kirichok, *Biochimie* **134** (2017) 28–34.
64. P. Ježek, B. Holendová, K. D. Garlid i M. Jabůrek, *Antioxidants Redox Signal.* **29** (2018) 667–714.
65. V. Beck, M. Jaburek, T. Demina, A. Rupprecht, R. K. Porter, P. Ježek i E. E. Pohl, *FASEB J.* **21** (2007) 1137–1144.
66. M. J. Berardi i J. J. Chou, *Cell Metab.* **20** (2014) 541–552.
67. M. Jabůrek, J. Ježek, J. Zelenka i P. Ježek, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45** (2013) 816–825.



68. L. Sayre, M. Smith i G. Perry, *Curr. Med. Chem.* **8** (2012) 721–738.
69. L. M. Sayre, D. A. Zelasko, P. L. R. Harris, G. Perry, R. G. Salomon i M. A. Smith, *J. Neurochem.* **68** (1997) 2092–2097.
70. S. P. Hussain, L. J. Hofseth i C. C. Harris, *Nat. Rev. Cancer* **3** (2003) 276–285.
71. R. M. Sainz, F. Lombo i J. C. Mayo, *Cancers (Basel)*. **4** (2012) 442–474.
72. F. Guéraud, M. Atalay, N. Bresgen, A. Cipak, P. M. Eckl, L. Huc, I. Jouanin, W. Siems i K. Uchida, *Free Radic. Res.* **44** (2010) 1098–1124.
73. L. M. Sayre, G. Perry i M. A. Smith, *Methods Enzymol.* **309** (1999) 133–152.
74. X. Zhu, X. Tang, J. Zhang, G. P. Tochtrop, V. E. Anderson i L. M. Sayre, *Chem. Res. Toxicol.* **23** (2010) 467–473.
75. G. Xu i L. M. Sayre, *Chem. Res. Toxicol.* **11** (1998) 247–251.
76. G. Xu, Y. Liu i L. M. Sayre, *J. Org. Chem.* **64** (1999) 5732–5745.
77. P. B. Jones, R. G. Brinson, S. J. Sarma i S. Elkazaz, *Org. Biomol. Chem.* **6** (2008) 4204–4211.
78. K. S. Echtay, T. C. Esteves, J. L. Pakay, M. B. Jekabsons, A. J. Lambert, M. Portero-Otín, R. Pamplona, A. J. Vidal-Puig, S. Wang, S. J. Roebuck i M. D. Brand, *EMBO J.* **22** (2003) 4103–4110.
79. H. Esterbauer i W. Weger, *Monatshefte Für Chemie* **98** (1967) 1884–1891.
80. S. Hwa Lee i I. A. Blair, *Chem. Res. Toxicol.* **13** (2000) 698–702.
81. P. Spiteller, W. Kern, J. Reiner i G. Spiteller, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1531** (2001) 188–208.
82. L. M. Sayre, D. Lin, Q. Yuan, X. Zhu i X. Tang, *Drug Metab. Rev.* **38** (2006) 651–675.
83. L. M. Sayre, P. K. Arora, R. S. Iyer i R. G. Salomon, *Chem. Res. Toxicol.* **6** (1993) 19–22.
84. L. M. Sayre, W. Sha, G. Xu, K. Kaur, D. Nadkarni, G. Subbanagounder i R. G. Salomon, *Chem. Res. Toxicol.* **9** (1996) 1194–1201.
85. M. Guichardant, P. Taibi-Tronche, L. B. Fay i M. Lagarde, *Free Radic. Biol. Med.* **25** (1998) 1049–1056.
86. S. Bacot, N. Bernoud-Hubac, B. Chantegrel, C. Deshayes, A. Doutheau, G. Ponsin, M. Lagarde i M. Guichardant, (2007).
87. K. Vazdar, D. Vojta, D. Margetić i M. Vazdar, *Chem. Res. Toxicol.* **30** (2017) 840–850.
88. M. Abraham, B. Hess, D. van der Spoel i E. Lindahl, *Www.Gromacs.Org* (2015).
89. L. Verlet, *Phys. Rev.* **159** (1967) 98–103.
90. S. Nosé, *Mol. Phys.* **52** (1984) 255–268.
91. W. G. Hoover, *Phys. Rev. A* **31** (1985) 1695–1697.
92. M. Parrinello i A. Rahman, *J. Appl. Phys.* **52** (1981) 7182–7190.
93. U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee i L. G. Pedersen, *J. Chem. Phys.* **103**

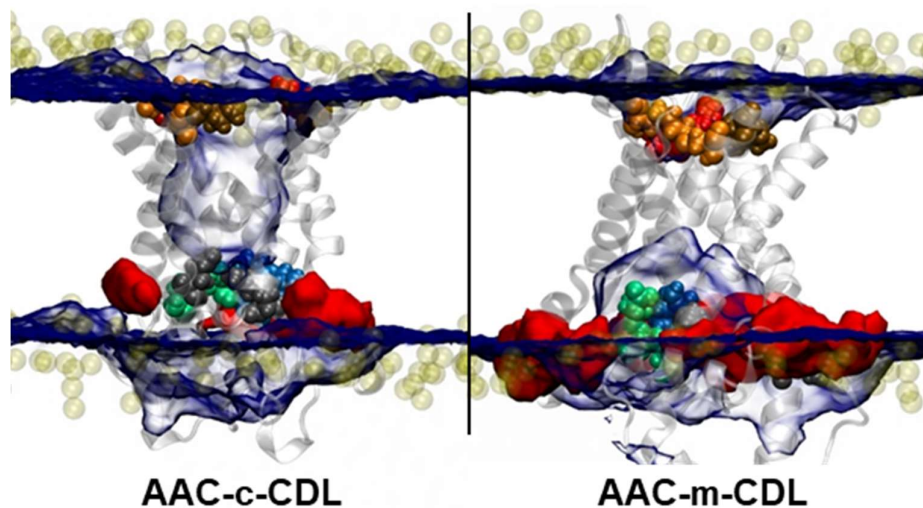
- (1995) 8577–8593.
94. D. F. Hahn i P. H. Hünenberger, *J. Chem. Theory Comput.* **15** (2019) 2392–2419.
95. J. Kästner, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **1** (2011) 932–942.
96. G. M. Torrie i J. P. Valleau, *J. Comput. Phys.* **23** (1977) 187–199.
97. M. J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Phill, J. C. Smith, B. Hess i E. Lindah, *SoftwareX* **1–2** (2015) 19–25.
98. W. Humphrey, A. Dalke i K. Schulten, *J. Mol. Graph.* **14** (1996) 33–8, 27–8.
99. E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng i T. E. Ferrin, *J. Comput. Chem.* **25** (2004) 1605–1612.
100. B. Webb i A. Sali, *Curr. Protoc. Bioinforma.* **47** (2014) 5.6.1–5.6.32.
101. S. Jo, T. Kim i W. Im, *PLoS One* **2** (2007) e880.
102. S. Jo, J. B. Lim, J. B. Klauda i W. Im, *Biophys. J.* **97** (2009) 50–58.
103. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A i ostali. Gaussian 09. Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA 2009.
104. GaussView Software - LAMMPS Tube <http://lammpstube.com/2019/11/09/gaussview-software/> (pristupljeno Aug 22, 2020).
105. G. Schaftenaar i J. H. Noordik, *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **14** (2000) 123–134.
106. J. P. M. Jämbeck i A. P. Lyubartsev, *J. Chem. Theory Comput.* **8** (2012) 2938–2948.
107. J. P. M. Jämbeck i A. P. Lyubartsev, *J. Chem. Theory Comput.* **9** (2013) 774–784.
108. W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey i M. L. Klein, *J. Chem. Phys.* **79** (1983) 926–935.
109. U. C. Singh i P. A. Kollman, *J. Comput. Chem.* **5** (1984) 129–145.
110. C. I. Bayly, P. Cieplak, W. Cornell i P. A. Kollman, *J. Phys. Chem.* **97** (1993) 10269–10280.
111. J. S. Hub, B. L. De Groot i D. Van Der Spoel, *J. Chem. Theory Comput.* **6** (2010) 3713–3720.
112. A. Warshel, F. Sussman i G. King, *Biochemistry* **25** (1986) 8368–8372.
113. S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers i D. J. Lipman, *J. Mol. Biol.* **215** (1990) 403–410.
114. S. Pundir, M. J. Martin i C. O’Donovan, in: *Methods Mol. Biol.*: (Humana Press Inc., 2017), pp. 41–55.
115. Marcelo J Berardi, W. M. Shih, S. C. Harrison i J. J. Chou, *Nature* **476** (2011) 109–113.
116. J. J. R. Krebs, H. Hauser i E. Carafoli, *J. Biol. Chem.* **254** (1979) 5308–5316.
117. B. A. Wilson, A. Ramanathan i C. F. Lopez, *Biophys. J.* **117** (2019) 429–444.
118. J. Huang, S. Rauscher, G. Nawrocki, T. Ran, M. Feig, B. L. de Groot, H. Grubmüller, A. D. MacKerell i Jr., *Nat. Methods* **14** (2017) 71–73.

119. A. V. Marenich, C. J. Cramer i D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. B* **113** (2009) 6378–6396.
120. A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 5648–5652.
121. W. J. Hehre, K. Ditchfield i J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **56** (1972) 2257–2261.
122. P. C. Hariharan i J. A. Pople, *Theor. Chim. Acta* **28** (1973) 213–222.
123. K. Fukui, *Acc. Chem. Res.* **14** (1981) 363–368.
124. A. Warshel, *Biochemistry* **20** (1981) 3167–3177.
125. S. Škulj i M. Vazdar, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **21** (2019).
126. S. Škulj, Z. Brkljača i M. Vazdar, *Isr. J. Chem.* **60** (2020) 735–743.
127. S. Škulj, K. Vazdar, D. Margetić i M. Vazdar, *J. Org. Chem.* **84** (2019) 526–535.
128. J. A. Doorn i D. R. Petersen, *Chem. Res. Toxicol.* **15** (2002) 1445–50.
129. S. Škulj i M. Vazdar, *Croat. Chem. Acta* **92** (2019) 229–239.
130. O. Jovanović, A. A. Pashkovskaya, A. Annibal, M. Vazdar, N. Burchardt, A. Sansone, L. Gille, M. Fedorova, C. Ferreri i E. E. Pohl, *Free Radic. Biol. Med.* **89** (2015) 1067–1076.
131. O. Jovanović, S. Škulj, E. E. Pohl i M. Vazdar, *Free Radic. Biol. Med.* **143** (2019).

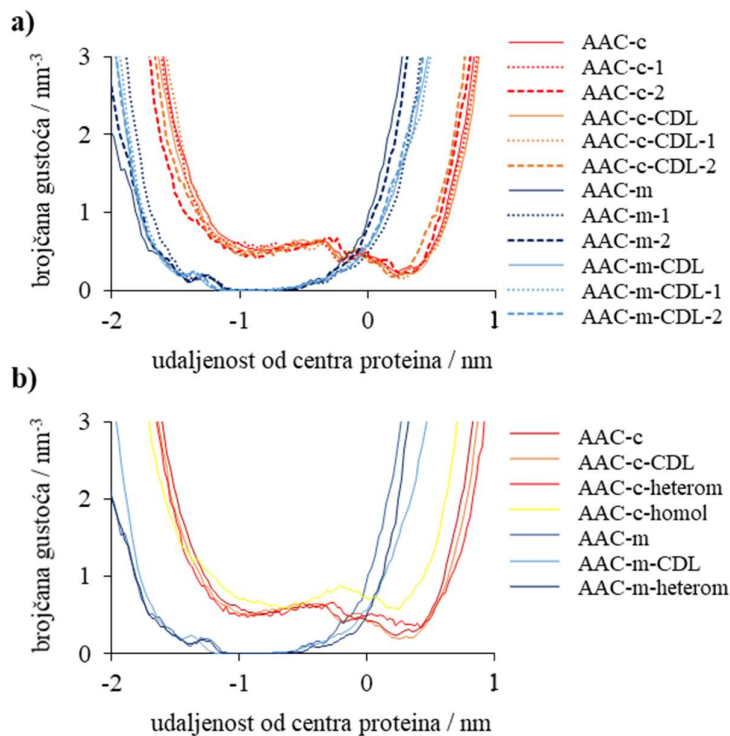
## § 8. DODATAK

Dodatak 1. Tablica prinosa adukata u eksperimentalnim reakcijama lizina i HNE-a u različitim otapalima određeni LC kromatografijom

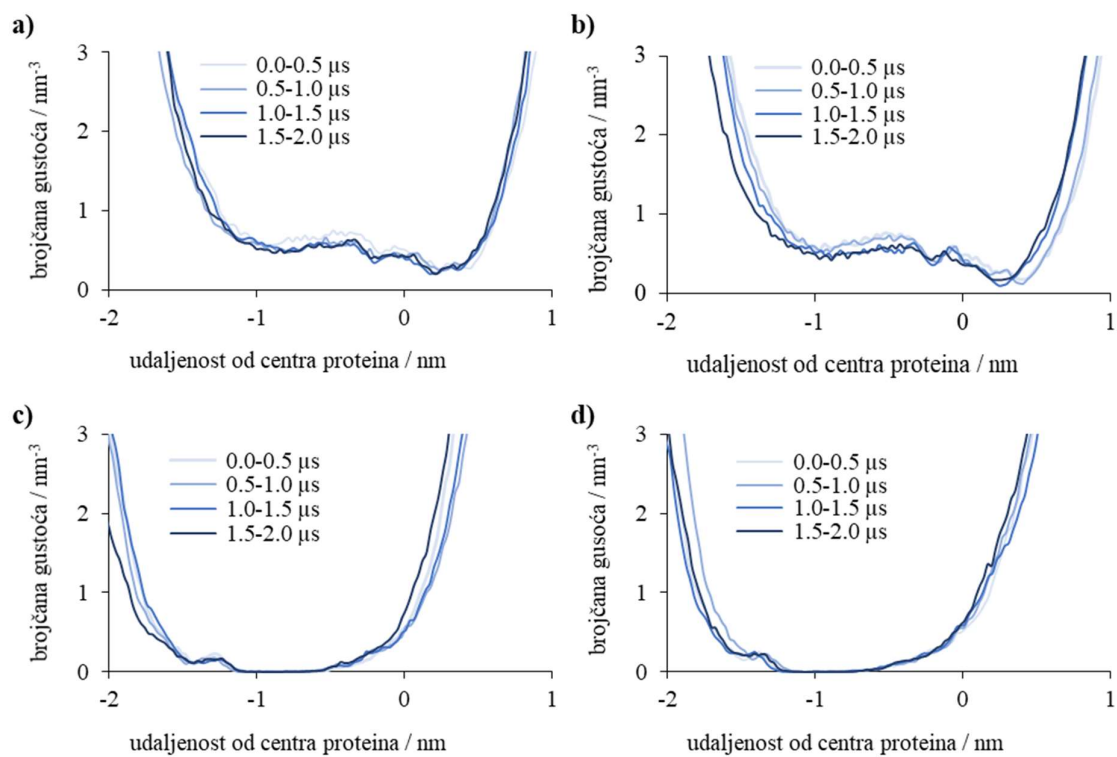
Otapalo	Količina (%)
Diklormetan	reaktant: 4% dvostruki adukt: 7% pirol: 76%
Acetonitril	reaktant: 5% dvostruki adukt: 15% pirol: 43%
acetonitril 10 % fosfatni puffer	reaktant: 6% Michaelov adukt + hemiacetal: 13% piridin: 16% dvostruki adukt: 11% pirol: 13%
acetonitril 50 % fosfatni puffer	reaktant: 11% Michaelov adukt + hemiacetal: 15% piridin: 21% dvostruki adukt: 8% pirol: 15%
fosfatni puffer	reaktant: 17% Michaelov adukt + hemiacetal: 40% piridin: 16% dvostruki adukt: 3% pirol: 9%



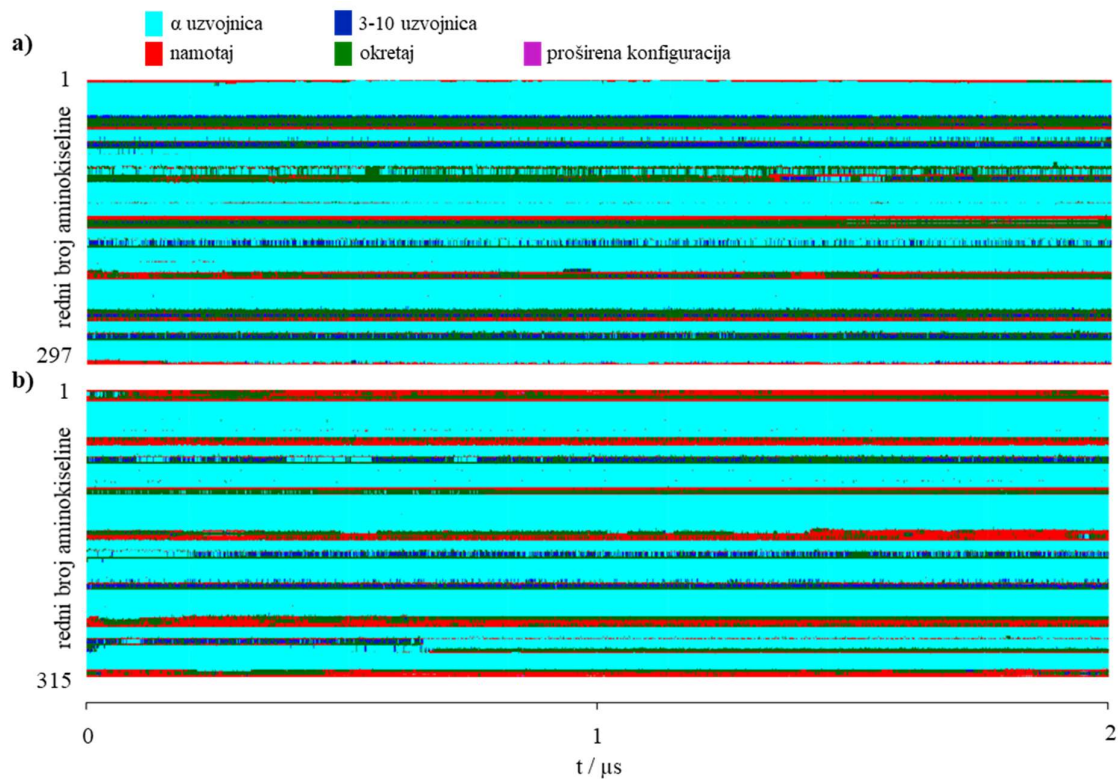
Dodatak 2. Volumne mape vode (transparentna plava boja s izvrijednošću od 0,2) i atoma fosfora kardiolipina (crvena boja s izvrijednošću 0,01) dobivene iz 2  $\mu$ s simulacija AAC proteina za c-strukturu (lijevi panel) i m-strukturu (desni panel). Prozirne žute kugle predstavljaju atome fosfora DOPC lipida, solna mreža s citoplazmatske strane je prikazana aminokiselinama obojenim u žutu, narančastu i smeđu boju, dok je solna mreža s citoplazmatske strane je prikazana aminokiselinama obojenim u sivu, plavu i zelenu boju. Protein je prikazan prozirnim  $\alpha$ -uzvojnica.



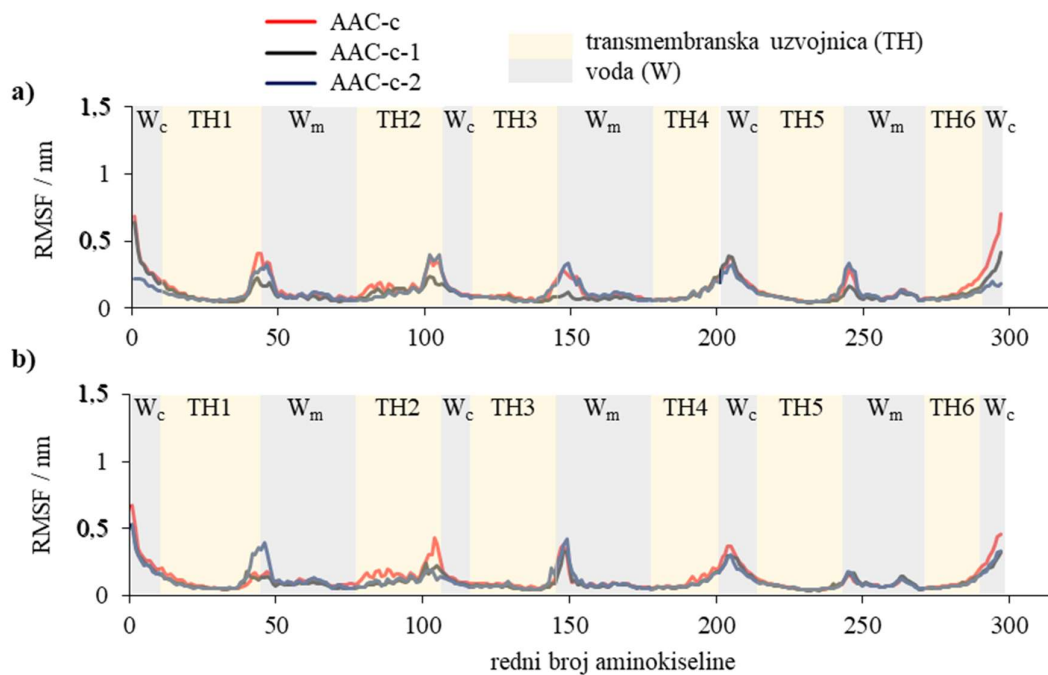
Dodatak 3. Brojčana gustoća vode kroz lipid za c- i m- strukturu AAC proteina za a) c-strukturu za četiri glavna sustava od 2  $\mu$ s i sustave replike pokrenute iz glavne simulacije nakon 1  $\mu$ s i 2  $\mu$ s od 500 ns i b) m-strukturu za četiri glavna sustava od 2  $\mu$ s i sustave simulirane u heterogenoj membrani u fiziološkoj koncentraciji 0,1 M NaCl i homološki modelirana sekvenca c-strukture na m-strukturu. AAC-c je struktura proteina okrenuta prema c-strani, AAC-CDL-c je struktura proteina okrenuta prema c-strani u prisutnosti kardiolipina, AAC-m struktura je struktura proteina okrenuta prema m-strani, AAC-CDL-m je struktura proteina okrenuta prema m-strani u prisutnosti kardiolipina, AAC-c-heterom je struktura proteina okrenuta prema c-strani u heterogenoj membrani, AAC-m-heterom je struktura proteina okrenuta prema m-strani u heterogenoj membrani i AAC-c-homo je homološki modelirana struktura okrenuta prema c-strani.



Dodatak 4. Brojčana gustoća vode u vremenu za glavne sustave od 2  $\mu$ s kroz lipid AAC proteina za a) c-strukturu bez kardiolipina, b) c- strukturu s kardiolipinom, c) m-strukturu bez kardiolipina i d) m-strukturu s kardiolipinom. Svaka simulacija je podijeljena u 4 dijela, svaki dio od 500 ns. Tamnije su obojeni dijelovi koji su kasnije u vremenu.

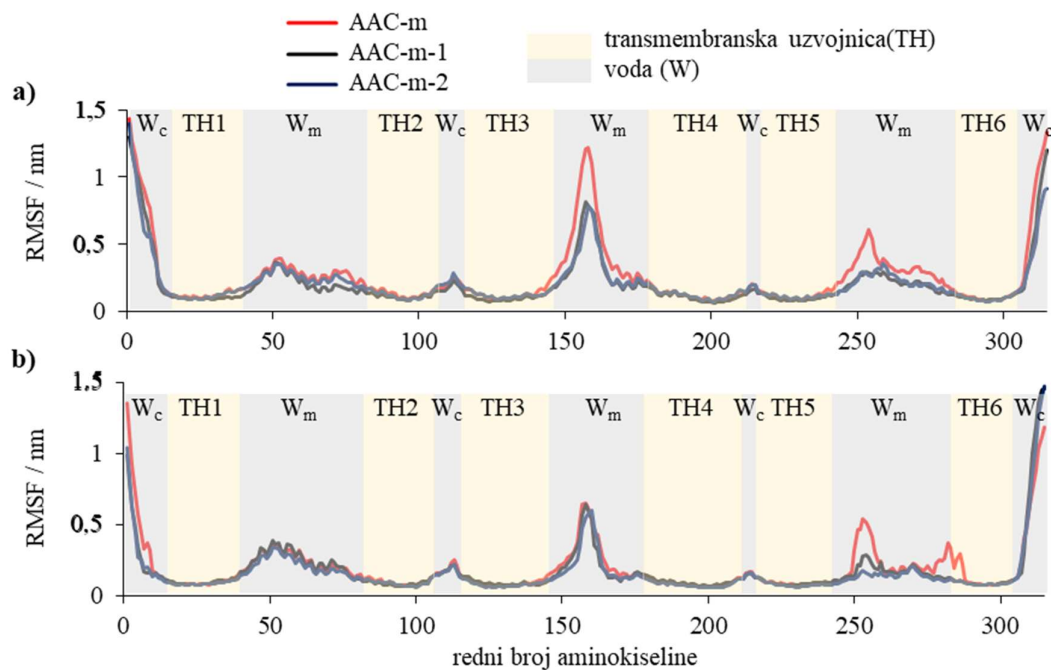


Dodatak 5. Prikaz sekundarne strukture AAC proteina u vremenu za glavnu simulaciju od 2  $\mu\text{s}$  za a) c-strukturu s kardiolipinom i b) m-strukturu s kardiolipinom.

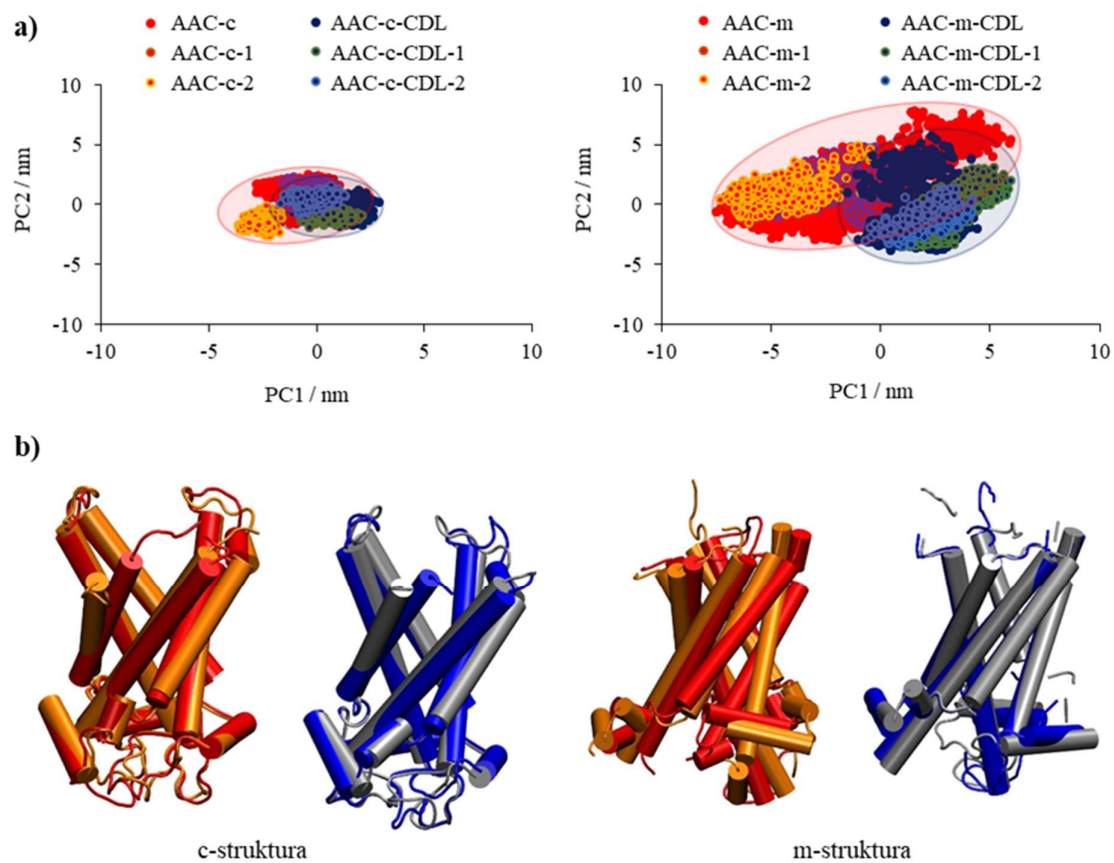


Dodatak 6. Analiza fluktuacija (RMSF) AAC proteina po rednom broju aminokiseline za c-strukturu za glavni sustav od 2  $\mu$ s i sustave replike pokrenute iz glavne simulacije nakon 1  $\mu$ s i 2  $\mu$ s od 500 ns za protein a) bez kardiolipina i b) s kardiolipinom.

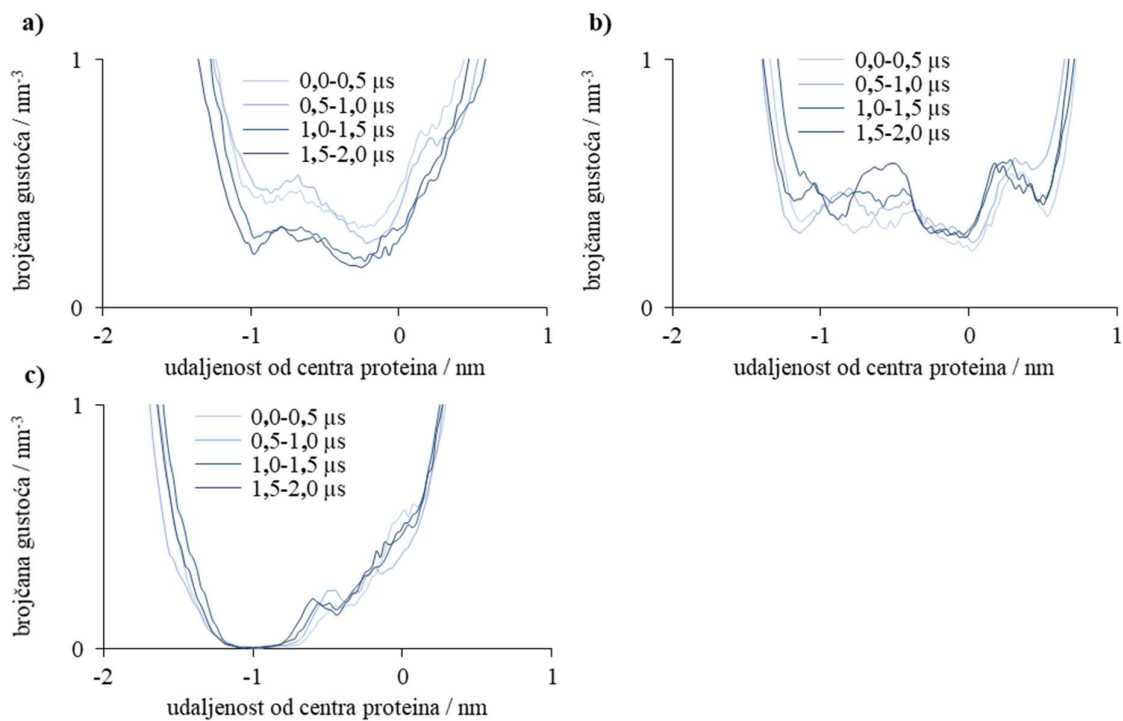




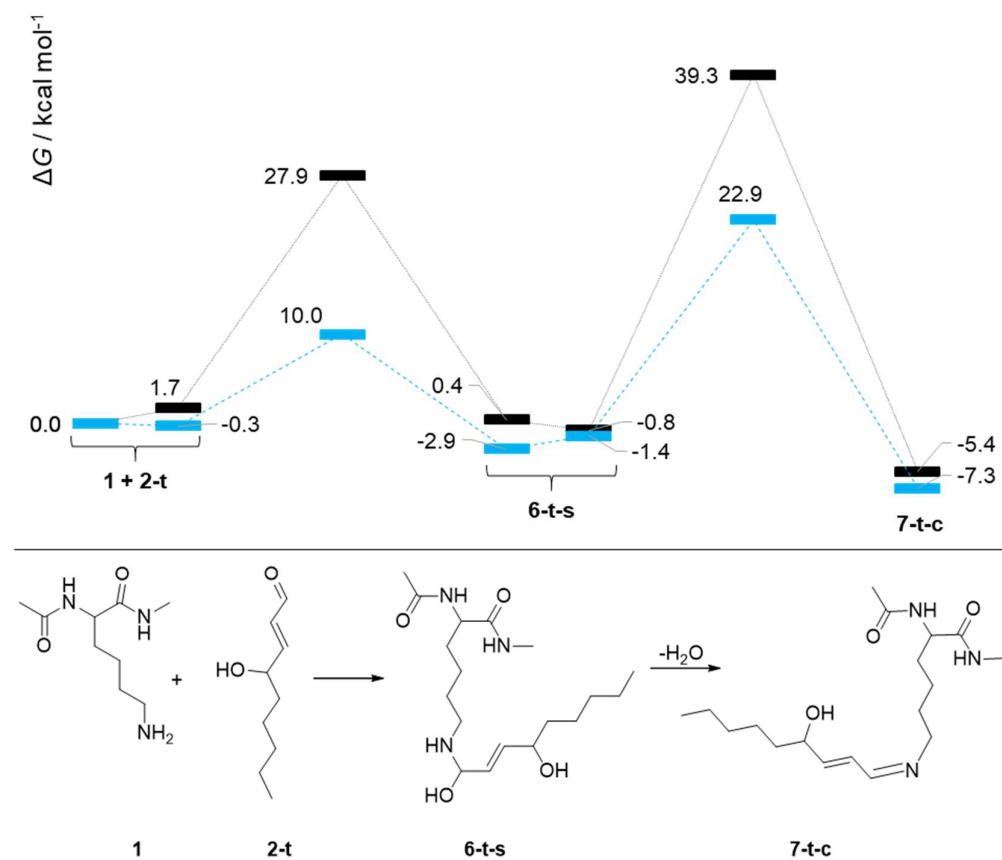
Dodatak 7. Analiza fluktuacija (RMSF) AAC proteina po rednom broju aminokiseline za m-strukturu za glavni sustav od 2  $\mu$ s i sustave replike pokrenute iz glavne simulacije nakon 1  $\mu$ s i 2  $\mu$ s od 500 ns za protein a) bez kardiopina i b) s kardiopinom.



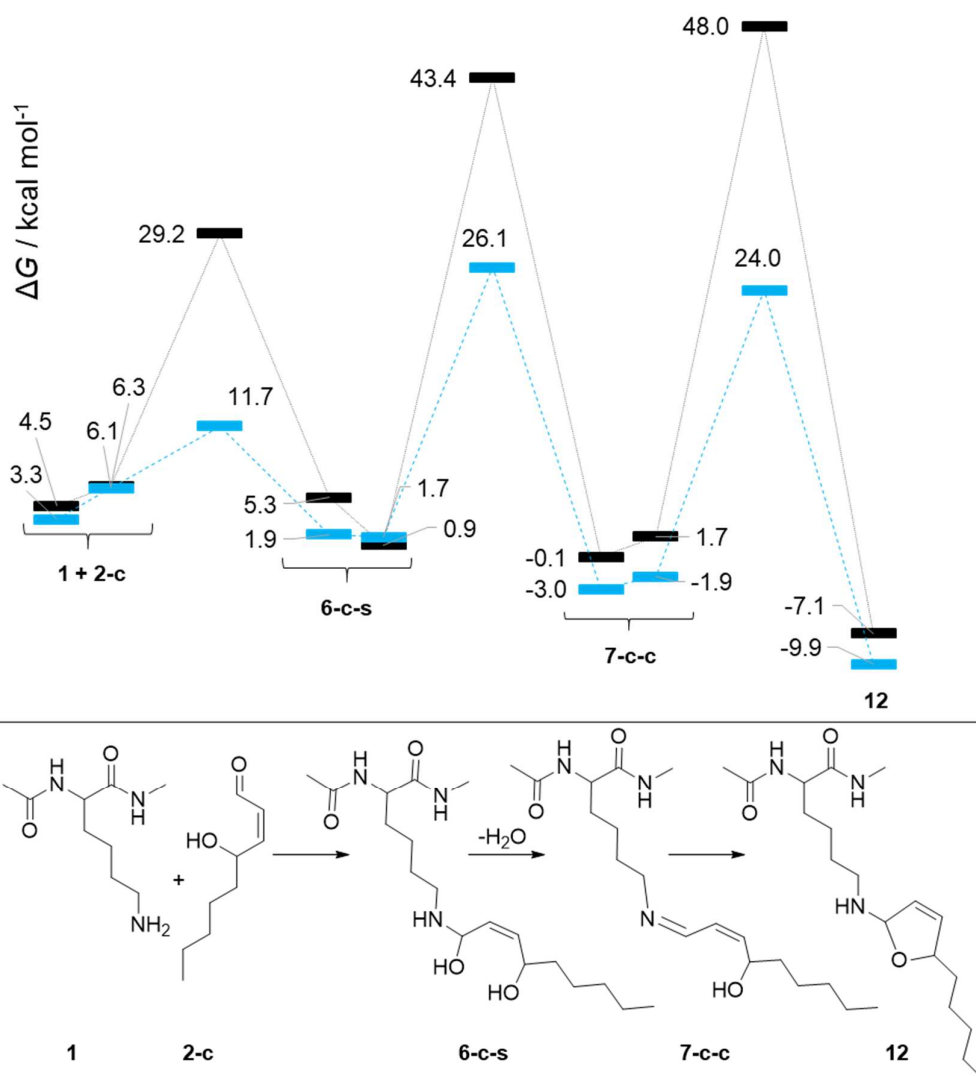
Dodatak 8. PCA analiza AAC proteina ugljikovih atoma okosnice proteina za glavni sustav od 2  $\mu$ s i sustave replike pokrenute iz glavne simulacije nakon 1  $\mu$ s i 2  $\mu$ s od 500 ns za a) c-strukturu lijevo i m-strukturu desno. b) Pomaci po PC jedinicama, prikazane su rubne strukture iz kojih se vidi koji dijelovi proteina su najfleksibilniji, a koji najrigidniji.



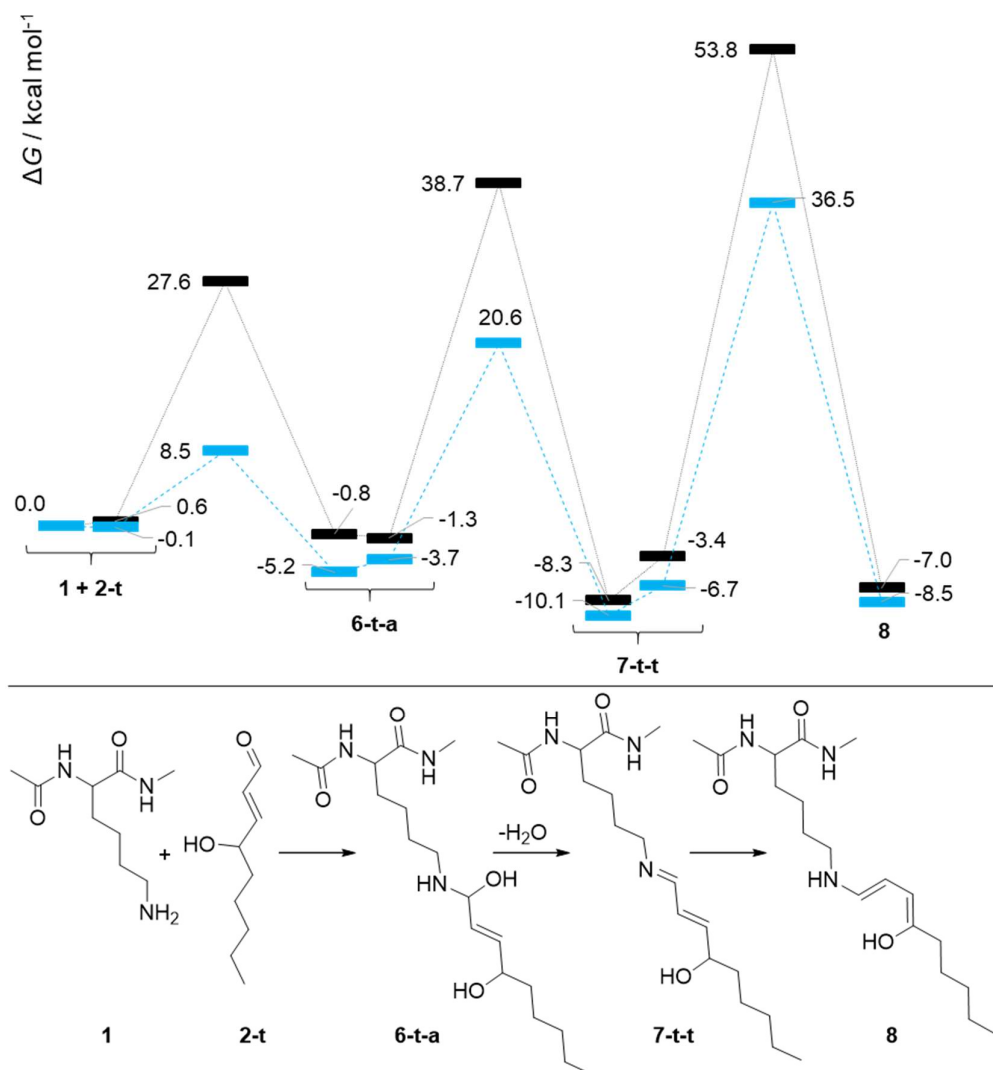
Dodatak 9. Brojčana gustoća vode u vremenu kroz UCP2 protein za glavne sustave od 2 μs kroz lipid za a) NMR strukturu, b) homološki modelirana c-struktura i c) homološki modelirana m-struktura. Simulacije je podijeljena u 4 dijela, svaki dio od 500 ns. Tamnije su obojeni dijelovi koji su kasnije u vremenu.



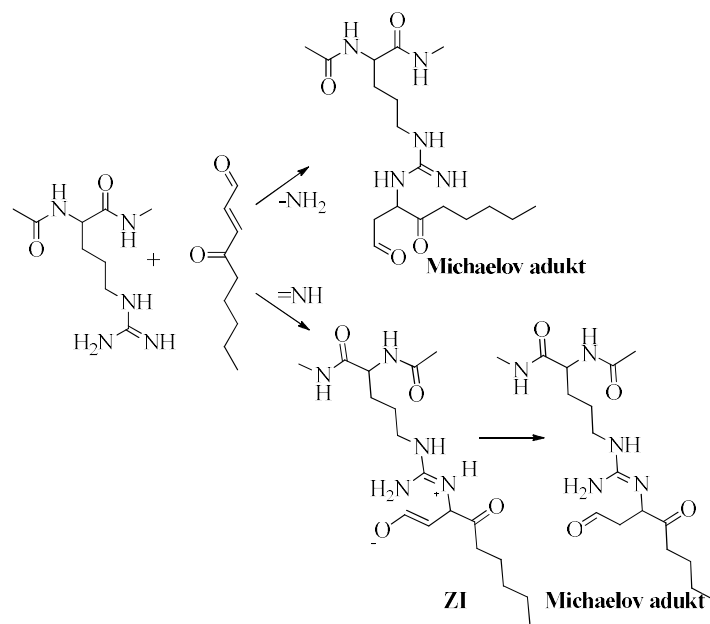
Dodatak 10. Mehanizam nastajanja *cis-trans* Schiffove baze **7-t-c** iz početnih reaktanata **1** i **2-t**.



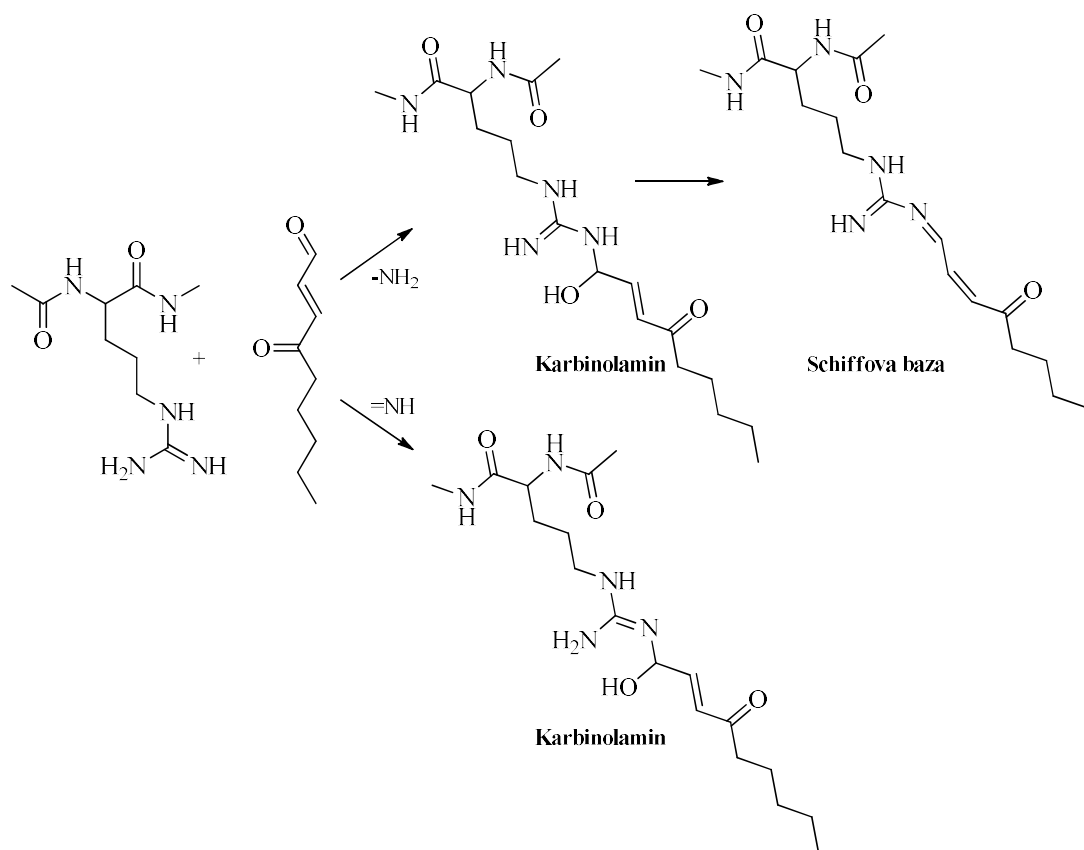
Dodatak 11. Mehanizam nastajanja *cis-cis* Schiffove baze **7-c-c** i furana **12** iz početnih reaktanata **1** i **2-c**.



Dodatak 12. Mehanizam nastajanja *trans-trans* Schiffove baze **7-t-t** i adukta **8** iz početnih reaktanata **1** i **2-t**.

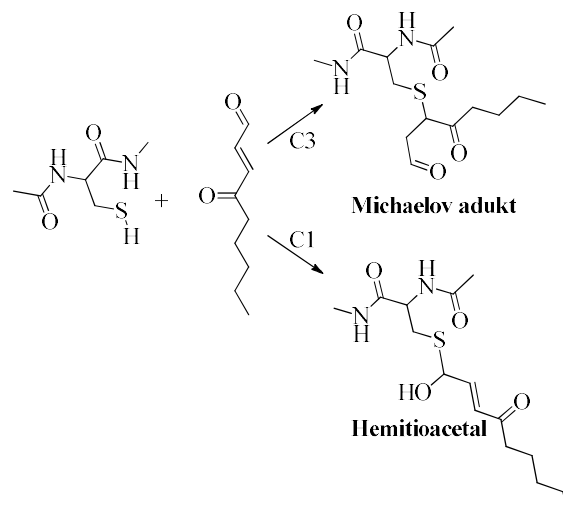


Dodatak 13. Mehanizam nastajanja **Michaelovog adukta** reakcijom  $-\text{NH}_2$  i  $=\text{NH}$  skupina arginina s ONE-om.

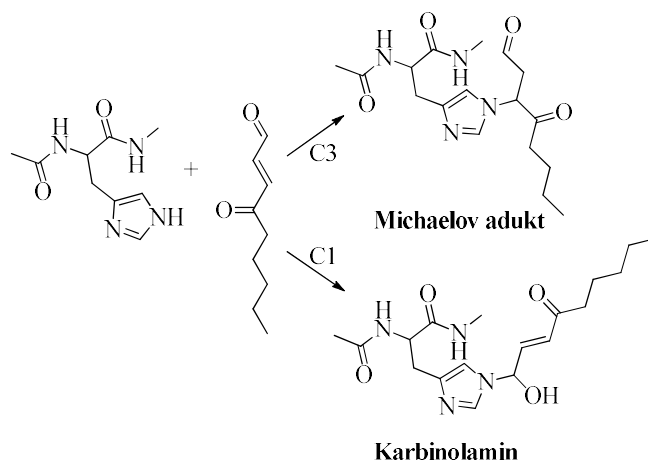


Dodatak 14. Mehanizam nastajanja **Schiffove baze** i **karbinolamina** reakcijom  $-\text{NH}_2$  i  $=\text{NH}$  skupina arginina s ONE-om.

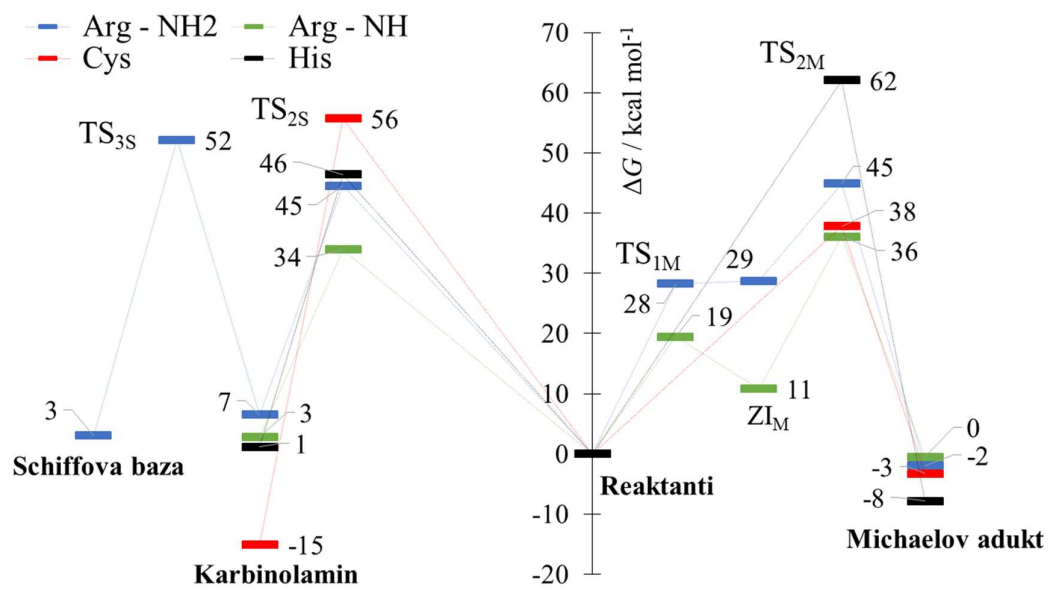




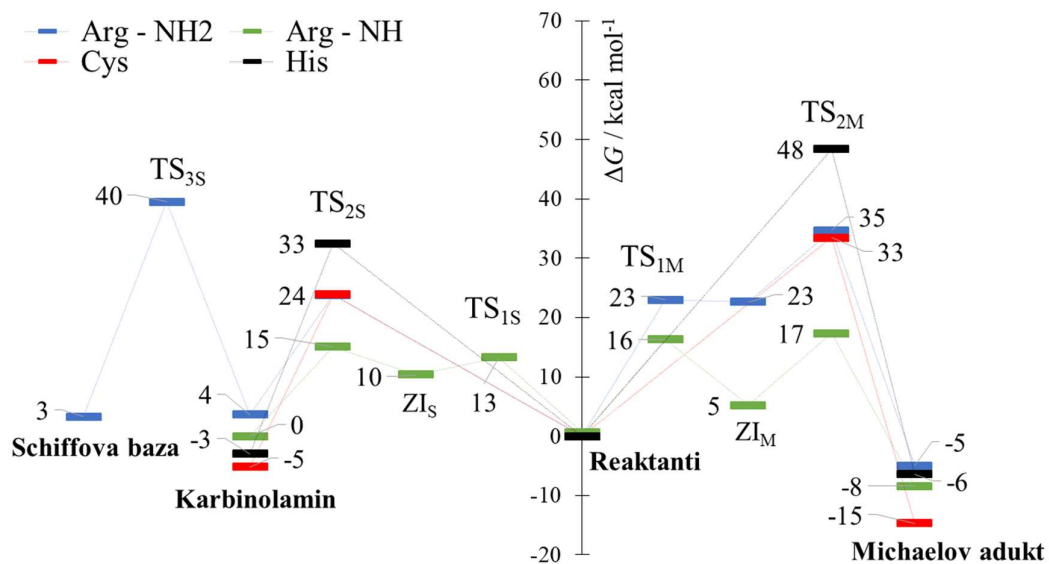
Dodatak 15. Mehanizam nastajanja **Michaelovog adukta** i **hemitioacetala** reakcijom cisteina s ONE-om.



Dodatak 16. Mehanizam nastajanja **Michaelovog adukta** i **hemitioacetala** reakcijom histidina s ONE-om.

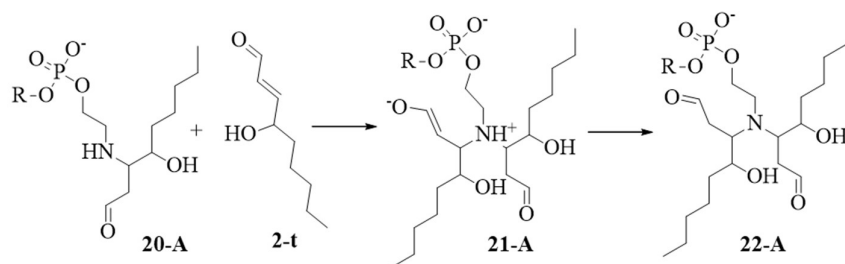


Dodatak 17. Mehanizam nastanka **Michaelovog adukta** i **Schiffove baze** za histidin, cistein i arginin s ONE-om u acetonitrilu.

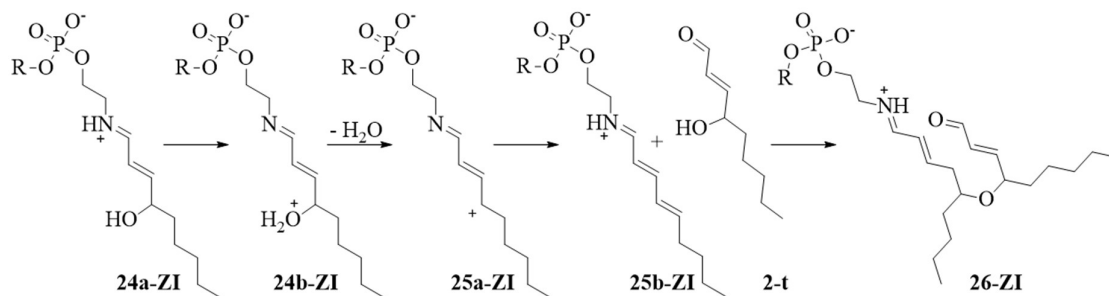


Dodatak 18. Mehanizam nastanka **Michaelovog adukta** i **Schiffove baze** za histidin, cistein i arginin s ONE-om u acetonitrilu s eksplicitnom molekulom vode uključenom u strukturu prijelaznog stanja.

## Dvostruki Michaelov adukt



## Dvostruki adukt Schiffove baze



Dodatak 19. Mehanizam nastajanja dvostrukog Michaelovog adukta **22-A** i dvostruke Schiffove baze **26-ZI** iz jednostrukih adukata iz anionske i ZI strukture.

## § 9. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

### ŽIVOTOPIS

Sanja Škulj rođena je 27.10.1990. u Travniku u Bosni i Hercegovini, a osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje (opću gimnaziju) završila je u Otočcu, Ličkom Osiku i Gospiću. U Gospiću je 2005. završila i Osnovnu glazbenu školu, klavir u klasi profesora Danka Ivšinića. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu upisala je 2009. gdje 2012. završava preddiplomski studij Primijenjene kemije, a diplomski studij Primijenjene organske kemije 2014. godine. Po završetku studija počinje raditi kao stručni suradnik na Institutu Ruđer Bošković na Zavodu za fizičku kemiju u Laboratoriju za kemijsku kinetiku i atmosfersku kemiju. Od listopada 2016. zaposlena je kao doktorand Hrvatske zaklade za znanost na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju u Laboratoriju za modelne biološke sustave pod vodstvom dr. sc. Maria Vazdara na uspostavnom istraživačkom projektu „*Molekularni aspekti oksidativnih procesa u stanicama*“. Također te iste godine započinje poslijediplomski studij Fizikalne kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu.

Početak četvrtne godine doktorskog studija provela je mjesec dana u grupi Dr. Lubomíra Rulíška na Institutu za organsku kemiju i biokemiju u Pragu prilikom čega je dobila financijsku potporu Instituta Ruđer Bošković za provođenje kratkoročnih studijskih boravaka. Iste godine provodi 2 tjedna u grupi Prof. Fahmija Hime na Sveučilištu u Stockholmu što je financirano HPC Europa3 stipendijom. U sklopu navedene stipendije u trajanju od 2 mjeseca napravila je kratki istraživački projekt pod nazivom „*Model reactions at the water/phospholipid interface*“. Do sada je u okviru izrade disertacije sudjelovala na 4 međunarodne škole te na 9 međunarodnih znanstvenih konferencija i radionica na kojima je prisustvovala s posterskim priopćenjima ili usmenom prezentacijom. Za 5 od svih navedenih škola/radionica/konferencija dobila je djelomičnu ili potpunu stipendiju.

**POPIS OBJAVLJENIH RADOVA**

1. S. Škulj, i M. Rožman, *Int. J. Mass Spectrom.* **391** (2015).
2. N. Perin, S. Škulj, I. Martin-Kleiner, M. Kralj, i M. Hranjec, *Polycycl. Aromat. Compd.* (2018) 1–12.
- \*3. S. Škulj, K. Vazdar, D. Margetić, i M. Vazdar, *J. Org. Chem.* **84** (2019) 526–535.
- \*4. S. Škulj, i M. Vazdar, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **21** (2019).
- \*5. O. Jovanović, S. Škulj, E. E. Pohl, i M. Vazdar, *Free Radic. Biol. Med.* **143** (2019) 433–440.
- \*6. S. Škulj, i M. Vazdar, *Croat. Chem. Acta* **92** (2019) 229–239.
- \*7. S. Škulj, Z. Brkljača, i M. Vazdar, *Isr. J. Chem.* **60** (2020) 735–743.

\* radovi iz područja doktorata