

# Elektrostatske interakcije pri stabilizaciji proteinskih struktura

---

Josić, Eva

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:500119>

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

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



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Eva Josić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **ELEKTROSTATSKE INTERAKCIJE PRI STABILIZACIJI PROTEINSKIH STRUKTURA**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za fizikalnu kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Neposredni voditelj rada: prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Zagreb, godina 2021.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

7. srpnja 2021.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

10. rujna 2021.

Mentor rada: prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Potpis:



## Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Solvatacijski modeli.....</b>	<b>4</b>
2.1.1. <i>Generalized Born model</i> .....	4
2.1.2. <i>Poisson-Boltzmannov model</i> .....	6
<b>2.2. Dielektrična granica.....</b>	<b>7</b>
<b>2.3. Smatanje proteina .....</b>	<b>9</b>
<b>2.4. Podjela proteina, raspored naboja u njihovoj strukturi i interakcija s biomolekulama....</b>	<b>10</b>
2.4.1. <i>Proteini topljivi u vodi</i> .....	10
2.4.2. <i>Intrinzično neuređeni proteini</i> .....	11
2.4.3. <i>Transmembranski proteini</i> .....	12
2.4.4. <i>Interproteinski kompleksi</i> .....	14
2.4.5. <i>Kompleksi proteina s membranama</i> .....	15
2.4.6. <i>Kompleksi proteina s nukleinskim kiselinama</i> .....	15
<b>2.5. Bolesti i poremećaji uzrokovani mutacijama koje vode promijenjenom elektrostatskom doprinosu.....</b>	<b>17</b>
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XX</b>



## § Sažetak

Osim hidrofobnih interakcija koje upogonjuju smatanje proteina i njihovo povezivanje, elektrostatske interakcije osiguravaju specifičnost kroz ionske mostove, vodikove veze i ostale manje specifične interakcije. U ovom radu predstavljena su dva modela za opis elektrostatskih interakcija proteina i otapala, Poisson-Boltzmanov model i Generalized Born model. Oba su implicitna te, za razliku od eksplicitnih modela, aproksimiraju otapalo kao kontinuum. Pri opisu solvacijskog doprinosa ukupnoj energiji proteina važan je odabir dielektrične granice između proteina i otapala. Ovdje su raspravljene van der Waalsova površina i „solvent-excluded surface“, površina bez šupljina dostupnih sfernoj probi otapala. Suvremeniji modeli za granicu uzimaju „smoothed van der Waals“ površinu, s glatkim prijelazom između dva dielektrika. Važnost elektrostatskih interakcija u proteinskoj strukturi kreće sa smatanjem proteina do nativne strukture. Hidrofobne interakcije su glavna pokretačka sila smatanja, a elektrostatske imaju ulogu u specifičnosti unutarproteinskih interakcija koje definiraju terciarnu strukturu. Osim solnih mostova i vodikovih veza, važne su i elektrostatske interakcije s nabijenim kofaktorima. Opisane su i vrste proteina kao i njihov aminokiselinski doprinos ovim interakcijama. U radu su navedena osnovna elektrostatska obilježja proteina topivih u vodi (globularnih), intrinzično neuređenih te transmembranskih proteina. Nadalje, opisane su interakcije proteina s drugim proteinima, nukleinskim kiselinama te biološkim membranama (fosfolipidnim dvoslojem). Ukoliko se elektrostatske interakcije naruše, poremećaj može voditi bolestima. Uzrok poremećaja su najčešće mutacije i posttranslacijske modifikacije RNA. Ovaj rad navodi i ukratko opisuje nekoliko stanja: srpastu anemiju, katarakt, karcinom, multiplu sklerozu te formiranje amiloidnih fibrila pri patogenezi neurodegenerativnih bolesti.



## § 1. UVOD

Proteini su polimeri aminokiselina povezanih peptidnom vezom. Aminokiseline se razlikuju prema vrsti bočnog ogranka, odnosno njegovoj kemijskoj strukturi. Osim lokalno nabijene amino i karboksilne skupine u zwitterionskom obliku, nabijeni mogu biti i bočni ogranci pri određenom pH. Aminokiseline s nabijenim bočnim ogrankom pri fiziološkom pH su: aspartat (Asp), glutamat (Glu), arginin (Arg), lizin (Lys) i histidin (His). Konstanta disocijacije kiseline bočnog ogranka ovisi i o neposrednoj kemijskoj okolini u kojoj se nalazi, poput aktivnog mjesta proteina.

Naboj i interakcije s drugim nabijenim vrstama određuju vrlo bitna svojstva proteina kao što su topljivost, sklonost polimerizaciji i fibrilaciji, specifičnost interakcija s drugim molekulama, lokalne promjene  $pK_a$  bočnih ogranka (kao u aktivnom mjestu), redukcijski potencijal. U slučaju promjene pH u sredini u kojoj se protein nalazi, dolazi do protonacije ili deprotonacije određenih skupina, što za posljedicu može imati čak i denaturaciju proteina. Osim same prirode bočnog ogranka, lokalni, a i ukupni, naboj proteina mogu mijenjati i kovalentne modifikacije kao što je fosforilacija, a zatim i defosforilacija aminokiselina poput serina (Ser), treonina (Thr) i tirozina (Tyr). Ovakav način modifikacije proteina jedan je od temeljnih za kontrolu proteinske aktivnosti. Ono je osnova regulacije na principu prekidača u lancu prenošenja signala.<sup>1</sup>

Održavanje povoljnog osmotskog tlaka, kao i elektrokemijskog gradijenta koji upogonjuje unutarstanične i izvanstanične procese ovisi o prijenosu iona preko membrane. Najčešće se njihov prijenos odvija putem proteinskih kanala i proteinskih prenositelja. Osim prijenosa metalnih iona, o elektrostatskim interakcijama s proteinima također ovisi i prijenos nabijenih molekula poput adenzin trifosfata, ATP-a.

Hidrofobnost nepolarnih bočnih ogranka uzrokuje smatanje proteina radi postizanja stabilizacije u vodenoj sredini, dok nabijeni bočni ogranci ulaze u elektrostatske specifične interakcije proksimalnih sekundarnih struktura. Hidrofobne interakcije upogonjuju smatanje, no elektrostatske utječu na stabilnost tog procesa. Elektrostatske interakcije malog dometa su solni mostovi. Formiraju ih suprotni naboji, parovi poput Glu ili Asp s His, Lys ili Arg, koji su

u prostornoj blizini u nativnoj strukturi proteina. Najčešće se nalaze usred istih sekundarnih struktura proteina, na udaljenosti od 4 Å,<sup>2</sup> u kojem intervalu se nalaze i oba bočna ogranka iz para. Pokazano je da ne moraju biti nužno stabilizirajući elementi. Prije svega, nalaze se primarno u nefleksibilnim područjima proteina što upućuje na to da imaju ograničavajući efekt na unutarnje kretanje proteina.<sup>1, 2</sup>

Od velikog su značaja za specifičnost i vodikove veze. Vodikova veza ima djelomično elektrostatski karakter te doprinosi stabilnosti tercijarne strukture proteina. Ustanovljeno je da jedna vodikova veza prosječno uvećava stabilnost proteina za 1 kcal / mol.<sup>1</sup> Kao i za druge elektrostatske interakcije, jakost vodikove veze uvelike ovisi o kemijskoj okolini. Naravno, u nepolarnijem mediju, veći je doprinos stabilizaciji, do 1,2 kcal / mol.<sup>1</sup> Računalno je pokazano kako solni mostovi iz unutrašnjosti proteina imaju velik stabilizirajući učinak, dok to nije slučaj s površinskim nabojima jer kod njih postoji kompeticija s molekulama otapala. Proteini bogati površinskim nabojima imaju često visok stupanj destabilizacije zbog odbijanja naboja, ali njihova funkcija je vezana uz to svojstvo. To su proteini visokog neto naboja pri fiziološkom pH, dakle jako visokih ili jako niskih pI, ili pak proteini s lokalno uvećanim brojem istoimenih naboja. Također, elektrostatske interakciju su jake i na značajnim udaljenostima, do 10 Å, zbog čega su bitne za razmatranje pri proučavanju interakcija proteina s različitim molekulama.<sup>3, 4</sup>

Proteini se u biološkim uvjetima nalaze u vodenom mediju. Hidrofobne interakcije između nepolarnih ostataka uzrokuju agregiranje proteina. Nabijene i polarne skupine osiguravaju dobru topljivost proteina u vodi, pa tako i sprječavanje agregiranja. Primjer razmjera utjecaja promjene (uklanjanja ili uvođenja) naboja na samo jednu aminokiselinu u polipeptidu je srpasta anemija. Jedan nabijeni Glu u β-lancu hemoglobina zamijeni se nepolarnim valinom (Val). Samo ta promjena vodi agregiranju deoksihemoglobina što uzrokuje bolest koju nazivamo srpasta anemija.<sup>5</sup>

Nabijeni ostatci svoje funkcije nalaze u: aktivnim mjestima, prijenosu protona, koordinacijskoj sferi metalnih iona u strukturnoj ulozi, ali i koordinacijskoj sferi metalnog iona kao kofaktora (proteaze, restrikcijske endonukleaze kao i mnogi drugi enzimi). Nabijeni ostatci su također dio veznih mjesta za nabijene molekule kao što je ATP. S druge strane, bazične aminokiseline se često nalaze u signalnim sljedovima za unos mnogih proteina u jezgru. Primjer su i transkripcijski faktori koji mogu Arg ostatke koristiti za detekciju specifičnog mjesta.<sup>1</sup>

---

Dielektrična konstanta,  $\epsilon_r$ , ovisi o vrsti medija, o ionskoj jakosti medija,  $I_c$ , i temperaturi,  $T$ . Postoje drastične razlike u dielektričnoj konstanti u unutrašnjosti proteina i u citoplazmi pri normalnim fiziološkim uvjetima. Od njih se razlikuje i dielektrična konstanta unutrašnjosti fosfolipidnog dvosloja. Navedene razlike omogućuju biološku kontrolu funkcije proteina u staničnim uvjetima.<sup>6</sup>

Cilj ovog rada je predstaviti strukturalna obilježja proteina elektrostatskog karaktera koja vode stabilizaciji, lokalnoj i globalnoj. Ukratko približiti nekoliko fizikalno-kemijskih modela za računanje doprinosa ovih interakcija ukupnoj energiji proteina. Također, napraviti pregled glavnih skupina proteina s obzirom na elektrostatska svojstva, te dati nekoliko primjera poremećaja u proteinskoj strukturi i ponašanju koji rezultiraju bolestima.

## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. Solvacijski modeli

Naboji u proteinu interagiraju međusobno, s dipolom otapala te nabojima iona i molekula u otapalu. Otapalo i ioni zasjenjuju interakciju između naboja proteinskih skupina. Sve navedeno utječe na elektrostatsku interakciju u strukturi proteina, a time i na njegovu stabilnost proteinske strukture.

#### 2.1.1. Generalized Born model

Kod molekuskog modeliranja sustava molekule u mediju, potrebno je kvantificirati interakciju molekule i medija. Medij se može modelirati eksplicitno, kao skup pojedinačnih molekula, ili implicitno, kao dielektrični kontinuum. Eksplicitni model u obzir uzima sve stupnjeve slobode molekula otapala, dok implicitni središnje polje za otopinu i ione modelirajući medij kao kontinuum. Svrha implicitnog modeliranja je integrirati stupnjeve slobode otapala i izračunati promjenu Gibbsove slobodne energije solvatacije na brži način no korištenjem eksplicitnih modela otapala.<sup>7</sup>

Jedan od modela za opis elektrostatskog doprinosa slobodnoj Gibbsovoj energiji je „generalized Born“ model (GB). Model GB je aproksimacija linearizirane Poisson-Boltzmannove (PB) jednačbe. Osim što je jednostavniji, GB model učinkovito daje zadovoljavajuće rezultate uz lakši račun u usporedbi s PB modelom. Zato je široko primijenjen, posebice za termodinamički opis vodenih sustava.

Elektrostatski doprinos slobodnoj energiji solvatacije GB modela je:

$$\Delta G_{solv,i} = -166 \left( \frac{1}{\epsilon_p} - \frac{1}{\epsilon_s} \right) \frac{q_i^2}{b_i} \quad (1)$$

U jednačbi (1)  $\epsilon_p$  i  $\epsilon_s$  označavaju redom dielektričnu konstantu proteina i otapala,  $b_i$  označava Bornov radijus, a  $q_i$  naboj.

A Gibbsova energija interakcije naboja iznosi:

$$G_{ij}^{int} = \frac{332q_iq_j}{\varepsilon_p r_{ij}} - 332 \left( \frac{1}{\varepsilon_p} - \frac{1}{\varepsilon_s} \right) \frac{q_iq_j}{f_{ij}} \quad (2)$$

$$f_{ij} = (r^{ij} + b_i b_j e^{-r_{ij}^2/4b_i b_j})^{1/2} \quad (3)$$

U jednadžbi (2)  $q_i$  i  $q_j$  označavaju naboje.  $b_i$  i  $b_j$  u jednadžbi (3) označavaju efektivan Bornov radijus atoma. Funkcija  $f_{ij}$  je funkcija interpolacije između efektivnog Bornovog radijusa kada je udaljenost  $r_{ij}$  među nabojima mala (preklapanje naboja), i efektivnog Bornovog radijusa na velikim  $r_{ij}$  (beskonačno udaljeni). Dielektričnu konstantu proteina i dielektričnu konstantu otapala označavaju redom  $\varepsilon_p$  i  $\varepsilon_s$ .<sup>1, 8, 9</sup>

Dielektrični kontinuum interagira s molekulama otopljene tvari, odnosno njenim nabojima. Soli stabiliziraju naboje, umanjujući elektrostatsko odbijanje i privlačenje. Te interakcije se mogu modelirati kvantnomehanički ili molekulskom mehanikom. Generalizirani Born model uvodi veliku aproksimaciju, a koristi se primarno kod termodinamičkog opisa makromolekula u polarnom mediju poput vode, u molekularnoj mehanici za proteine i nukleinske kiseline.

Velika prednost ovog modela je što eksplicitno uključuje elektrostatske interakcije u molekuli otopljene tvari. Oni imaju izravan utjecaj na energiju solvatacije. Ovaj model uključuje doprinose slobodnoj energiji od interakcija naboja do spremanja naboja u nepolarnu unutrašnjost bioloških makromolekula poput proteina.<sup>8</sup>

Osnovna ograničenja GB modela su ograničenja implicitnog modeliranja otapala kao kontinuum (udaljavanje od fizikalne stvarnosti) i korištenje Coulombove sile kao sile prema čijem polju se modelira realno električno polje molekule. Nužno se gubi na točnosti kod implicitne solvatacije. Ona ne uključuje promjene u temperaturi i tlaku, ne opisuje uspješno kemijsku okolinu kao što je dvostruka lipidna membrana (heterogeno okruženje), multivalentne ione ili smjese iona raznih naboja poput eksplicitnih simulacija. Stoga se GB modeli koriste za pretežno homogeni medij sačinjen od vode i iona u uskom temperaturnom rasponu. GB metoda

se često koristi kao zamjena za PB jer se pokazala kao brža i manje zahtjevna, a daje zadovoljavajuće rezultate u mnogim slučajevima.<sup>1,8,9</sup>

### 2.1.2. Poisson-Boltzmannov model

Drugi, realističniji, model je Poisson-Boltzmannov (PB). Također se koristi pri implicitnom opisu otapala kod izračuna elektrostatskog doprinosa ukupnoj promjeni slobodne energije pri desolvataciji naboja i interakciji istog. Model PB za izračun površine molekule proteina koristi radijus pojedinačnih atoma te svakome pripisuje parcijalni naboj.<sup>1,7</sup>

Poissonova jednačba za izračun ukupnog elektrostatskog potencijala sustava,  $\psi$ :

$$\nabla \cdot [\varepsilon(r)\nabla\psi(r)] + 4\pi[\rho^f(r) + \rho^{ion}(r)] = 0 \quad (4)$$

U jednačbi (4) veličina  $r$  je vektor položaja,  $\varepsilon$  je dielektrična konstanta,  $\psi$  je elektrostatski potencijal sustava,  $\rho^f$  je raspodjela naboja dane molekule, a  $\rho^{ion}$  je raspodjela naboja mobilnih iona u otopini.

Nelinearna Poisson-Boltzmannova jednačba glasi (NPBE):

$$\nabla \cdot [\varepsilon(r)\nabla\psi(r)] + 4\pi \left[ \rho^f(r) + \sum_i e z_i c_i^b \lambda_i e^{-\frac{z_i e \psi(r)}{kT}} \right] = 0 \quad (5)$$

U jednačbi (5) veličina  $r$  je vektor položaja,  $\varepsilon$  je dielektrična konstanta,  $\psi$  je elektrostatski potencijal sustava,  $\rho^f$  je raspodjela naboja dane molekule,  $e$  je jedinični naboj,  $z_i$  naboj  $i$ -te vrste,  $c_i$  je lokalna prosječna raspodjela iona,  $\lambda_i$  parametar dostupnosti iona, Konstanta  $k$  je Boltzmannova konstanta, a  $T$  označava termodinamičku temperaturu.

Linearna Poisson-Boltzmannova jednačba (izvodi se u slučaju slabog elektrostatskog potencijala):

$$|z_i e \psi| < kT \quad (6)$$

$e$  je jedinični naboj,  $z_i$  naboj  $i$ -te vrste,  $\psi$  je označava elektrostatski potencijal sustava konstanta  $k$  je Boltzmannova konstanta, a  $T$  označava termodinamičku temperaturu.

$$\nabla \cdot [\varepsilon(r)\nabla\psi(r)] + 4\pi\rho^f(r) - \frac{8\pi e^2 I}{kT} \lambda(r)\psi(r) = 0 \quad (7)$$

Veličina  $r$  je vektor položaja,  $\varepsilon$  je dielektrična konstanta,  $\psi$  je elektrostatski potencijal sustava,  $\rho^f$  je raspodjela naboja dane molekule,  $e$  je jedinični naboj,  $I$  je ionska jakost,  $\lambda$  parametar

dostupnosti iona bilo koje vrste, konstanta  $k$  je Boltzmannova konstanta, a  $T$  termodinamička temperatura. Rješenje jednadžbe je elektrostatski potencijal u svakoj točki prostora. Za složeni sustav, kao što je protein, potrebno je numerički riješiti PB jednadžbu.<sup>7, 10</sup>

U lineariziranoj PB jednadžbi, elektrostatska energija proteina je dana izrazom:

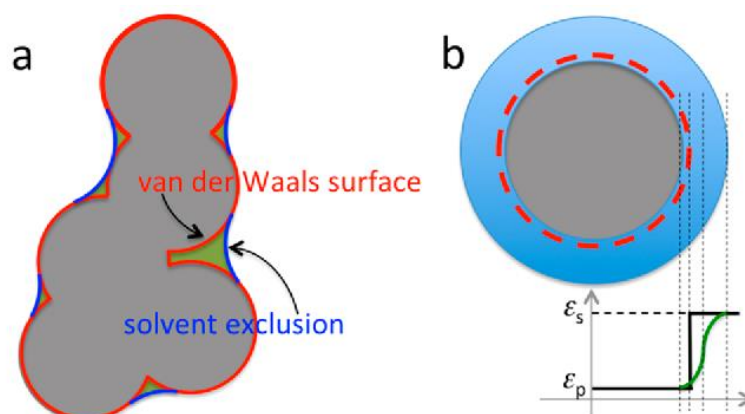
$$G^{el} = 166 \sum_i q_i \varphi_i' \quad (8)$$

$q_i$  je parcijalni naboj atoma, a  $\varphi_i$  označava elektrostatski potencijal na položajima atoma.

PB jednadžba je zasnovana na aproksimaciji središnjeg polja za mobilne ione u otapalu. Ona je dalje razvijena te neki od primjera modificiranih modela su NPBE sa ionima konačnih veličina te NPBE s ionskim korelacijama i fluktuacijama. Navedeno je od velike važnosti zato što se takvim modelima predviđa i interakcija jednako nabijenih biomolekula posredovana ionima suprotnog naboja. Takvi sustavi mogu potencijalno objasniti biološke pojave poput kondenzacije DNA.<sup>1, 7</sup>

## 2.2. Dielektrična granica

Prilikom računa elektrostatskog doprinosa slobodnoj Gibbsovoj energiji bitan je odabir površine, dielektrične granice koja odvaja protein od otapala. To su često van der Waalsova površina (vdW) i „solvent-excluded surface“ (SE), površina bez šupljina dostupnih otapalu (sfernoj probi). Van der Waalsova površina je sačinjena od zasebnih dijelova van der Waalsovih sfera (atoma) sa područjima šupljina sa visokim dielektrikom, otapalom. Površina SE izuzima te iste šupljine, a umjesto njih uvodi površinu koja bi odgovarala dodirnoj površini probi sfere molekule otapala i molekule proteina (slika 1). Iz navedenog je vidljivo da SE površina obuhvaća veći volumen slabijeg dielektrika – unutrašnjost proteina. To će rezultirati višom energijom desolvatacije jer su naboji u proteinu manje izloženi otapalu, i nižom energijom interakcije između naboja u proteinu zbog slabijeg dielektrika.



Slika 1. (a) Prikaz dvije dielektrične granice: plavo označava SE, a crveno vdW granicu, zelenom bojom je osjenčano područje nedostupno sfernoj probi (otapalu) u SE protokolu. (b) “Smoothed vdW“ površina, ili izgladana vdW površina, četiri vertikalne isprekidane linije označavaju redom početak dielektričnog prijelaza, pravu površinu atoma, srednju točku i krajnju točku dielektričnog prijelaza. Preuzeto iz izvora Zhou et al.<sup>1</sup>

Veće slaganje s eksperimentalnim podacima su pokazali rezultati računa u kojima je korištena vdW površina. Koristeći SE, rezultati su bili višestruko različiti, ili je pak član slobodne energije elektrostatske interakcije ispao pozitivan. Potonje bi značilo da navedene interakcije uvode destabilizaciju u sustav, što je suprotno od tumačenja rezultata računa s vdW. Ustanovljeno je da se uvećanjem dielektrične konstante proteina ( $\epsilon_p$ ) u SE može uvesti korekcija. Uvećanje  $\epsilon_p$  proteina ima ulogu kompenzacije manjka površinski šupljina dostupnih jačem dielektiku, otapalu. Stoga su teorijski SE računi uz korištenje  $\epsilon_p$  usporedivi s vdW računima.

Drugi način za usklađivanje rezultata pri korištenju dvije različite dielektrične granice je promjena u iznosu korištenog atomskog radijusa. S ciljem usklađivanja sa SE površinom, uzima se veći radijus prilikom korištenja vdW. Za manje molekule poput aminokiselina potrebno je uvećanje za do pet posto, dok za velike molekule (proteine) do 20 posto. Navedeno je posljedica povećanja broja intersticijskih šupljina koje prate povećanje proteina. Iste su uklonjene SE aproksimacijom površine. U slučaju malih molekula, moguće je reparametrizirati GB metodu koja koristi vdW površinu na način da odgovara PB rezultatima iz SE površine. Ista reparametrizacija ne mora biti važeća za velike molekule, i obrnuto.

Nagla razlika u dielektričnoj konstanti između otapala (voda) i otopljene tvari (protein) je uzrok velike razlike u elektrostatskoj energiji pri malim promjenama strukture proteina. Zbog



naglog skoka u vrijednosti (diskontinuiteta) i posljedično zahtjevnog računa, napravljeni su modeli u kojima je granica glatkog prijelaza između dva  $\varepsilon$ . Izvedena dodirna površina ispada slična van der Waalsovoj površini i naziva se  $smvdW$  prema „smoothed vdW“. Sličnost je prisutna zato što atomski-centrirane tranzicijske funkcije mogu uračunati intersticijske šupljine kao područja visokog dielektrika, što je obilježje modela s vdW površinom.<sup>1</sup>

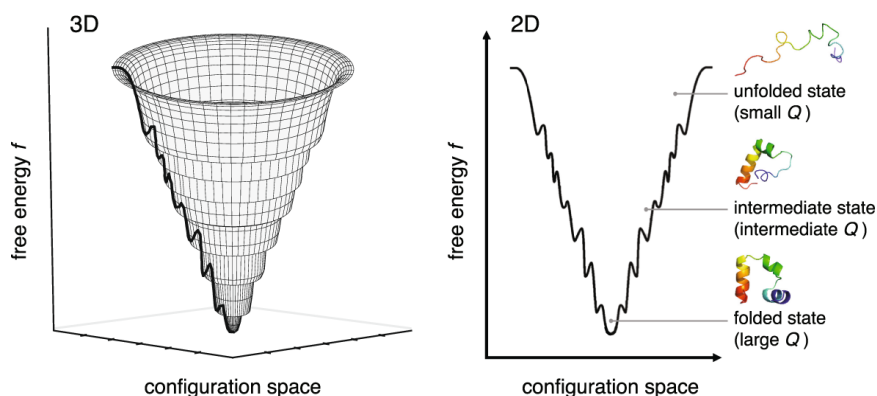
### 2.3. Smatanje proteina

Postavljeno je više modela smatanja proteina u nativnu strukturu. Neki od njih su: model nukleacije i rasta, model hidrofobnog kolapsa, model difuzije i kolizije, te hijerarhijski model. U biološkom sustavu smatanje proteina ima elemente više njih. Počevši od modela hidrofobnog kolapsa, pod utjecajem nepolarnih interakcija nastaje kompaktni globularni oblik koji nema konačnu terciarnu strukturu. Potom specifične interakcije iz te strukture pomiču ravnotežu prema nativnoj. Neke od tih su elektrostatske, primjerice interakcija proteina s kofaktorom ionom. Ukoliko se iz smjese ukloni kofaktor, protein napušta nativnu strukturu.<sup>2</sup>

Protein  $\alpha$ -laktalbumin je pomno proučeni protein za čije je smatanje ustanovljeno da je nepotpuno u odsustvu njegova kofaktora, iona  $Ca^{2+}$ . U tom slučaju zauzima tek kompaktni globularni oblik, bez specifičnih interakcija koje bi vodile nativnoj strukturi.<sup>11</sup>

Primjer su i restriksijske endonukleaze druge vrste, poput EcoRV endonukleaze koja u strukturu veže dva iona magnezija,  $Mg^{2+}$ . Jedan od njih koji se nalazi u aktivnom mjestu je u funkciji sniženja  $pK_a$  okoline i povećanja nukleofilnosti, dok drugi ion magnezija ima strukturnu ulogu. Nije nužan za katalizu, ali osim što stabilizira strukturu proteina, posredno stabilizira i prijelazno stanje DNA.<sup>12</sup>

Hijerarhijski model predlaže da smatanje u uređene strukture kreće lokalno. Najprije se formiraju sekundarne strukture, koje se potom organiziraju su lokalne strukture (motive). Potom se smatanje nastavlja do domena, koje se na posljetku smataju u nativnu konformaciju proteina. To se slaže s blizinom ostataka koji sudjeluju u formiranju mostova i motiva koji tvore  $\alpha$ -helikse i  $\beta$ -ploče, lokalno stabilizirajući prvenstveno sekundarne strukture vodikovim vezama i elektrostatskim interakcijama. Vodikova veza unutar sekundarnih struktura vodi padu energije jer kompenzira prekidanje vodikovih veza s molekulama otapala (slika 2). Elektrostatske interakcije u pravilu ne sudjeluju u stvaranju mostova između gradivnih elemenata koje su zasebne cjeline, već primarno unutar njih.<sup>13</sup>



Slika 2. 3D i 2D shematski prikaz slobodne Gibbsove energije u konfiguracijskom prostoru dane molekule proteina. Lokalni maksimumi predstavljaju prijelazna stanja, a globalni minimum nativnu strukturu. Preuzeto iz izvora Chong et al.<sup>14</sup>

Postoje i kompleksni solni mostovi, mreže složene od više nabijenih ostataka. Najčešće se nalaze na dodirnim površinama polipeptida, a njihova uloga je povezivanje podjedinica u kvaternu strukturu. Arg je aminokiselina čija gvanidijeva skupina ima ulogu konektora, a mutacije Arg su vrlo česti izvor bioloških poremećaja.<sup>2</sup>

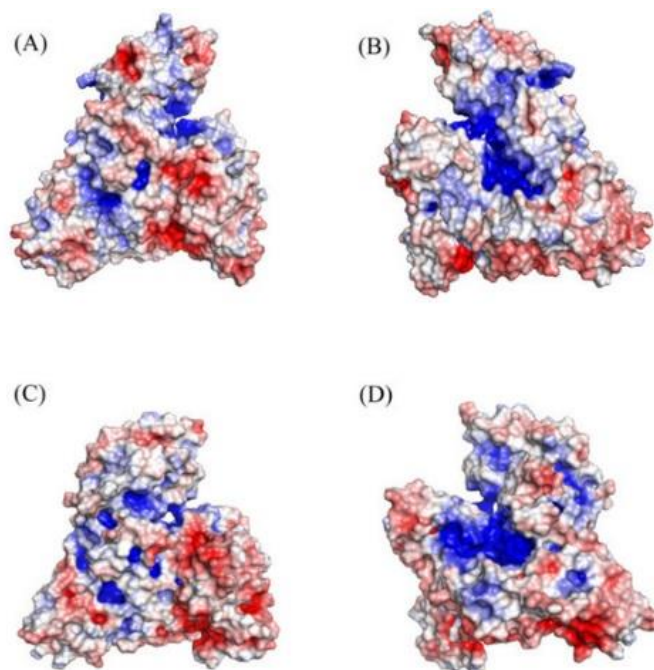
## 2.4. Podjela proteina, raspored naboja u njihovoj strukturi i interakcija s biomolekulama

Aminokiselinski slijed i kemijska okolina diktiraju terciarnu strukturu koja određuje funkciju proteina. U pravilu je unutrašnjost proteina pretežno nepolarna, dok je površina bogata nabojima i polarnim skupinama. Funkcija površinskih naboja je povećanje topljivosti proteina, pa tako i prevencija agregacije, te interakcije s raznim molekulama i strukturama.

### 2.4.1. Proteini topljivi u vodi

Unutrašnjost proteina topivih u vodi je nepolarna, a površine su im bogate nabojima i polarnim ostacima. Potonje je očekivano poznavajući visoku energije desolvatacije u slučaju spremanja tih ostataka u hidrofobnu unutrašnjost. Istraživanjem Kočańczyk et al. utvrđena je raspodjela aminokiselinskih ostataka na radijalnoj udaljenosti,  $r$ , s obzirom na središte sfemo aproksimiranih globularnih proteina. Radijalna raspodjela nepolarnih ostataka naglo pada s povećanjem  $r$ , a nabijenih i polarnih značajno raste (slika 3). Ostale aminokiseline su uniformno raspoređene kroz cijeli  $r$ . Uočena je i pravilnost kod komplementarnih parova – suprotno nabijene aminokiseline (poput Glu-Arg) se nalaze na određenoj blizini, 4 do 2,75 Å udaljenosti,

kao i parovi nepolarnih ostataka poput Leu (leucin) -Val. Pretpostavljeno je da navedeno upućuje na stabilizaciju smotane strukture proteina.<sup>1, 15</sup>



Slika 3. Raspodjela naboja humanog serumskog albumina (A, B) i kravljeg serumskog albumina (C, D). Dvije slike proteina su zarotirane 180° s obzirom na vertikalnu os. Crvena boja označava negativno područje potencijala, a plava pozitivno. Preuzeto iz izvora Mishra et al.<sup>16</sup>

#### 2.4.2. *Intrinzično neuređeni proteini*

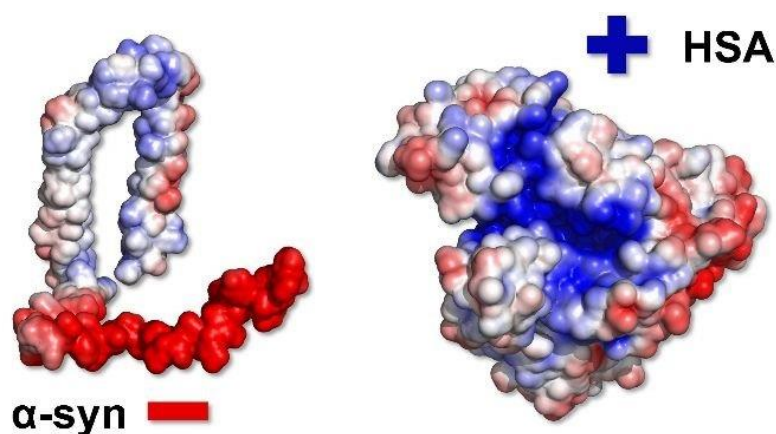
Oko 30 posto eukariotskih proteina je ili intrinzično neuređeno ili ima neuređene regije. INP (intrinzično neuređeni protein) i INR (intrinzično neuređena regija) proteini su najčešće dio regulacije transkripcije i prijenosa signala. U pravilu pri interakciji sa specifičnim molekulskim partnerima poprimaju uređenu strukturu. Zbog uključenosti u navedene bitne procese, INP su često uzročnici bolesti. INP i INR imaju karakterističan prepoznatljiv slijed aminokiselina koji diktira neuređenost. Utvrđeno je da imaju vrlo nisku hidrofobnost i visok ukupni naboj (slika 4,  $\alpha$ -sinuklein). Za održavanje neuređenosti važni su visoko odbijanje istovrsnih naboja, povoljna solvatacija i niska hidrofobnost. Dodatna uloga visokog naboja je otežavanje agregacije neuređenih proteina.

Pokazano je da povećanjem naboja po aminokiselinskom ostatku raste i veličina IDP-a, dok pri niskim nabojima prevladava efekt smanjenja zbog privlačenja raznoimenih naboja. Smanjenje je značajno kod proteina sa strukturnim segmentima suprotnih naboja između kojih

je jako elektrostatsko privlačenje, uz formiranje strukture ukosnice. Njihove dodirne površine s partnerima sadrže visok udio nepolarnih ostataka oko centralnog dijela, dok su na rubnim dijelovima dominantniji polarni i nabijeni ostatci.<sup>1, 17</sup>

Utjecaj elektrostatskih interakcija na vezanje INP pokazuje i ovisnost konstante brzine asocijacije,  $K_{on}$  o ionskoj jakosti otapala,  $I_c$ . Utvrđeno je da vrijednost  $K_{on}$  pada s povišenjem  $I_c$ , što pokazuje prisustvo povoljnih elektrostatskih interakcija u procesu vezanja. Konkretno, protein p53 pokazuje za par redova veličina veći afinitet vezanja za protein NCBD uz deseterostruko uvećanje ionske jakosti.<sup>18, 19</sup>

Protein protimozin- $\alpha$ , kiseli protein nađen kod sisavaca, uključen u proces odmatanja kromatinskih vlakana, primjer je intrinzično neuređenog proteina s vrlo visokim negativnim nabojem. Čak 60 posto aminokiselina su Glu i Asp. Također, specifičnost tako nestabilnih polipeptida je i visoka otpornost na ekstremne uvjete – teško je značajno destabilizirati već nestabilan sustav.<sup>20</sup>



Slika 4. Raspodjela naboja proteina  $\alpha$ -sinukleina (INP) i humanog serumskog albumina. Plava boja predstavlja pozitivni, a crvena negativni elektrostatski potencijal. Omjer veličina proteina nije realan. Preuzeto iz izvora Bellomo et al.<sup>21</sup>

### 2.4.3. Transmembranski proteini

Glavne uloge transmembranskih proteina su prijenos tvari, signala i komunikacija s okolinom. Dvije su osnovne strukture:  $\alpha$ -zavojnica i  $\beta$ -bačva. Za razmatranje njihovih 3D struktura važno je uzeti u obzir medij u kojem se nalaze, osim samog aminokiselinskog slijeda. Dvoslojna membrana je specifično fizikalno-kemijsko okruženje. Dielektrična konstanta u

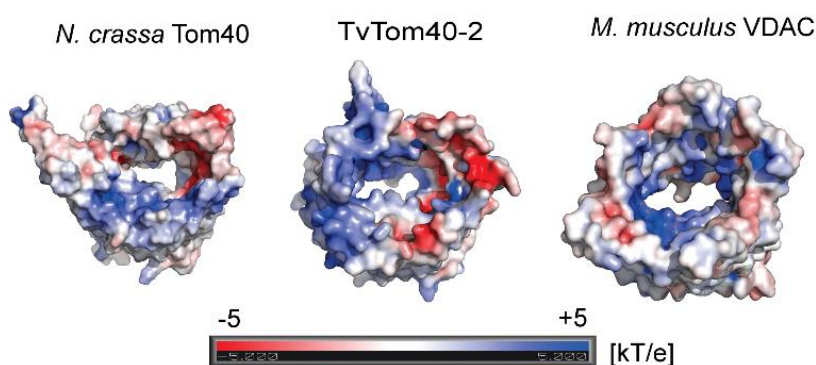
ugljikovodičnoj unutrašnjosti iznosi oko 2, u području karbonilne skupine i glicerola 5, kod polarnih glava 150, a u vodenom mediju oko 80.<sup>1</sup>

Nabijene i polarne aminokiseline nalaze se u karbonilnom/glicerolnom području i području polarnih glava, dok se nepolarne nalaze u ugljikovodičnoj unutrašnjosti. Zbog navedenoga proteini će biti građeni od karakterističnih slijedova; 10-30 nepolarnih aminokiselina ispred i iza kojih se nalazi slijed polarnih i nabijenih aminokiselina (slike 5 i 6). Pozitivno nabijeni aminokiselinski ostatci se često nalaze na citoplazmatskoj strani.<sup>1</sup>

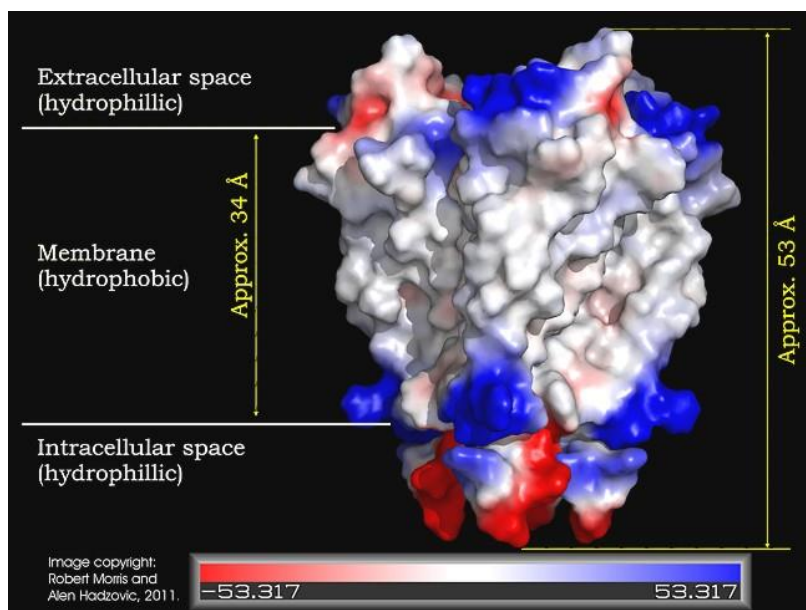
U unutrašnjosti proteina, od polarnih interakcija prevladavaju vodikove veze između amidnih i karbonilnih skupina iz peptidne veze, te vodikove veze između bočnih ogranaka. U ovom slučaju će one biti jake zbog nepolarnog okruženja. Ravnine peptidnih veza su paralelne zavojnici, zbog čega su donori i akceptori vodikove veze zaštićeni u strukturi i tvore jače veze. Ovi proteini imaju gusto pakirane zavojnice zbog velikog udjela glicina (Gly). Pritom nastaju i interhelikalne C<sub>α</sub>-H-O vodikove veze zbog zbijenosti zavojnica.<sup>22</sup>

Istraživanja su pokazala da kiseli aminokiselinski ostatci poput Asp i Glu su približno podjednako zastupljeni s obje strane dvosloja, dok bazični Arg i Lys su dominantni u citoplazmatskoj strani. Prateći vertikalni presjek dvosloja potvrđena je pravilnost u raspodjeli aminokiselinskih ostataka (hidrofobna unutrašnjost), slična onoj globularnih proteina topivih u vodi. Proteini strukture β-bačve, kojima su bogate bakterije, imaju također simetričnu raspodjelu naboja.

Nabijeni ostatci imaju i funkcijsku ulogu. Primjerice, naboji suprotni od naboja iona koji se transportira pomoću proteina ubrzavaju njegov prijenos te su zastupljeni u otvoru kanala (npr. K<sup>+</sup> transporter).<sup>1</sup>



Slika 5. Raspodjela naboja translokaza vanjske membrane staničnih organela u vrstama *N. crassa*, *T. vaginalis*. te *M. musculus*. Tom označava „translocase of the outer membrane“. Preuzeto iz izvora Makki et al.<sup>23</sup>



Slika 6. Raspodjela naboja  $K^+$  kanala bakterije *Streptomyces lividans*. Brzina difuzije kroz kanal je približno jednaka onoj kroz otopinu, uz  $10^4$  puta veću selektivnost za ione kalija nego natrija.<sup>24</sup>

#### 2.4.4. Interproteinski kompleksi

Međuproteinske interakcije su stereospecifične. Sastav i prostorni raspored aminokiselinskih ostataka dodirne površine između dva proteina se razlikuje od ostatka površine. Ona ima veći udio nepolarnih ostataka u središnjem dijelu nego na rubu koji je bogat nabijenim ostacima. Vrste koje su sklone ovom tipu interakcije razlikuju se od proteina koji tvore komplekse s membranom prema sastavu u vrlo maloj mjeri. Glavna razlika je što dodirne površine proteina koji sudjeluju u interproteinskim interakcijama imaju manje nepolarnih ostataka te udio nabijenih ovisi o komplementarnosti raznovrsnih naboja u dodirnim površinama dva proteina.

Pokazano je da su dodirne površine bogatije nabojem od unutrašnjosti, ali manje bogate nabojem od ukupne površine pojedinog proteina. Zbog povezivanja moraju imati visok hidrofobni udio. Varijabilan, ali manji od onog u unutrašnjosti proteina. Pokazano je da sadrže mnogo specifičnih interakcije malog dometa, poput H-veza i solnih mostova. Utvrđeno je da su ovi elementi stabilizirajući, a broj navedenih interakcija je u korelaciji sa slobodnom energijom vezanja. Ona pada s povećanjem njihovog broja.<sup>2</sup>

Na dodirnim površinama dominiraju ostatci Trp, Arg i Tyr, te su one ujedno i podložne patogenim mutacijama. Prije svega, pri promjeni naboja ostataka (primarno deiminacija Arg) dolazi do razvoja neurodegenerativnih stanja zbog promjene elektrostatskih interakcija na dodirnim površinama proteina. Primjer su amilodini fibrili, agregati inače topljivih proteina nađeni u stanicama kod osoba oboljelih od raznih, u mnogo slučajeva neurodegenerativnih, bolesti.<sup>25</sup>

#### 2.4.5. Kompleksi proteina s membranama

Protein se može vezati na membranu, na njenu površinu ili na drugi protein koji je sastavni dio membrane. Primjerice, topljivi protein citokrom-c se veže na vanjski sloj unutrašnje membrane mitohondrija, na membranski kardiolipin. Dio je lanca prijenosa elektrona pri čemu nastaje protonski gradijent za nastanak ATP-a. Interakcija citokroma-c s kardiolipinom ima visok elektrostatski karakter. Dodirne površine su im suprotno nabijene, a povećanjem ionske jakosti u okolini slabi njihova interakcija.

Elektrostatske interakcije imaju važnu ulogu u signalizaciji na staničnoj razini. Posebice je to slučaj u interakciji bazičnih aminokiselinskih ostataka, čiji je udio veći od kiselih, sa anionskim fosfolipidnim glavama kod perifernih membranskih proteina. Ustanovljeno je da nepolarni ostatci mogu prodrijeti u nepolarnu lipidnu unutrašnjost, dok polarni i nabijeni ostatci interagiraju na površini s nabijenim skupinama – polarnim glavama. U usporedbi s ostatkom sastava površine proteina, dodirna površina ima manji udio polarnih i nabijenih skupina. Ova skupina proteina zbog same svrhe, reverzibilnost vezanja na membranu, ima manje skokove i promjene kod raspodjele pojedine vrste ostataka s obzirom na radijalnu komponentu  $r$ .<sup>26-28</sup>

Protein  $\beta_2$ -glikoprotein I, ili apolipoprotein-H (apo-H), sadrži pozitivnu domenu čija jaka elektrostatska interakcija s anionskim fosfolipidima, primarno kardiolipinom, je pokretač brzog vezanja na membranu. Osim navedene domene, apo-H sadrži hidrofobnu petlju kojom se usidri u membranu te tada kreće agregiranje apo-H putem interproteinskih interakcija, na membrani. Kompleksi membrana i nakupina apo-H su mete antitijela i makrofaga kod sistemskog eritemskog lupusa.<sup>29</sup>

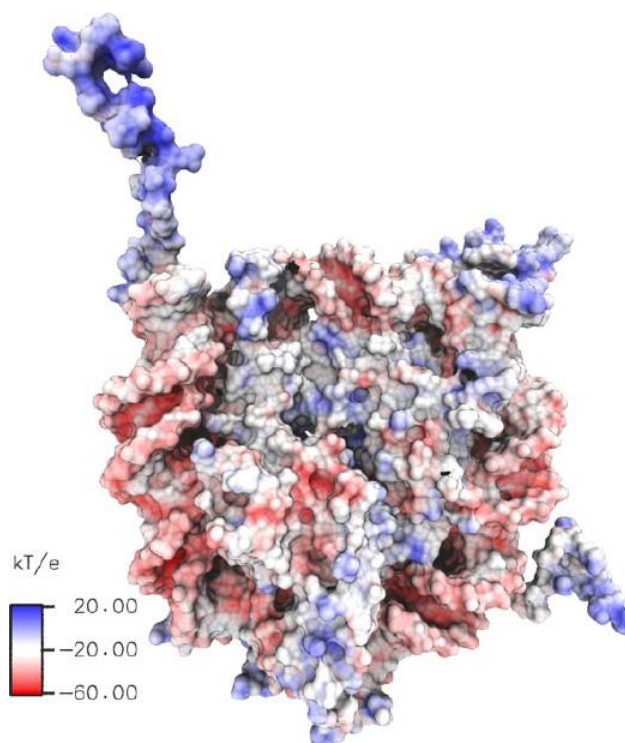
#### 2.4.6. Kompleksi proteina s nukleinskim kiselinama

Nukleinske kiseline imaju visok ukupan negativan naboj koji potječe od fosfatnih skupina. Jednolančane imaju sklonost stvarati kompaktne strukture s visokim udjelima ukosnica i omči,

dok dvolančane mogu biti izdužene u svojoj helikalnoj strukturi ili superzavijene ako su kružne.<sup>1</sup> Proteini koji interagiraju s nukleinskim kiselinama imaju rastuću zastupljenost polarnih i nabijenih aminokiselina prema površini proteina, dok je trend suprotan za hidrofobne ostatke. Primjerice, elektrostatska interakcija predstavlja silu za nastajanje nukleosoma. Nukleosom je građen od histona, oktamernog proteina, i oko njega omotane genomske DNA. Histoni su na dodirnoj površini bogati bazičnim ostacima (primarno Arg, uz to i Lys) (slika 7), a elektrostatske interakcije s negativnim nabojem nukleinske kiseline čine glavni doprinos slobodnoj Gibbsovoj energiji ovoga sustava.<sup>1</sup>

Arg i Lys imaju različite uloge. Pokazano je da Arg tvori vodikove veze primamo s dušičnom bazom gvaninom te da su one osnovni stabilizirajući elementi kompleksa. Arg s dušičnim bazama u većoj mjeri pokazuje i kation- $\pi$  interakcije s aromatskim sustavima, zbog pokazano veće stabilizacije. U rezultatima NMR istraživanja uočena je veća rigidnost strukture s više Arg, dok su s Lys mobilnije. Također, Arg ima manju gustoću naboja pa tako i manju energiju desolvatacije, dok za Lys vrijedi suprotno.<sup>30</sup>

Za ekspresiju gena, potrebno je gotovo neprekidno odmatati DNA s histona i ponovno zamatati, uz pomoć proteinskih faktora i iona. Zbog toga je kompleks DNA i histona izuzetno dinamičan te uključuje ione iz okoline s ciljem stabilizacije sustava.<sup>31</sup>





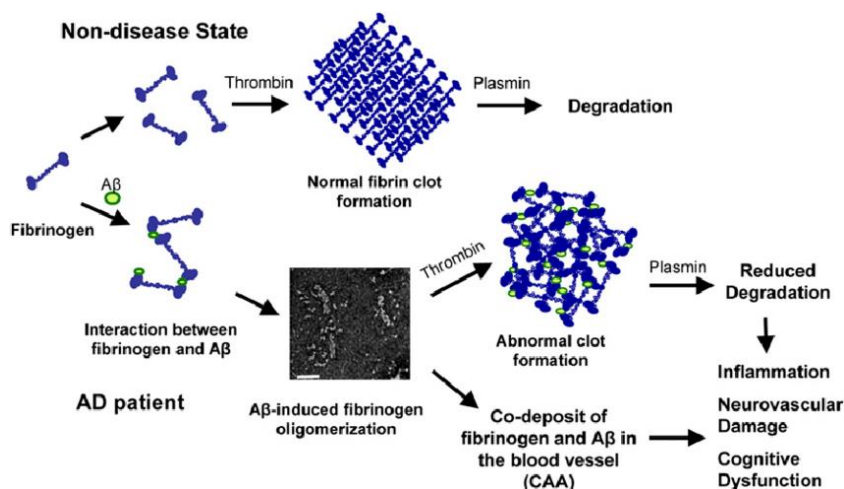
Slika 7. Raspodjela naboja kompleksa histona i DNA. DNA zavojnica pretežno crvene boje zbog negativnog elektrostatskog potencijala, a histonska površina je plave boje jer je bogata pozitivnim nabojima u području vezanja DNA. Preuzeto iz izvora Gebala et al.<sup>32</sup>

## 2.5. Bolesti i poremećaji uzrokovani mutacijama koje vode promijenjenom elektrostatskom doprinosu

Pri nekim mutacijama nukleinskih kiselina ili posttranslacijskim modifikacijama RNA dolazi do ugradnje pogrešne aminokiseline u protein. Pritom može doći do uklanjanja naboja ili uvođenja dodatnog naboja u aminokiselinski slijed. Zbog velikog doprinosa stabilizaciji proteina, te specifičnosti ovih interakcija, narušavanje elektrostatskih interakcija može uzrokovati poremećaje u fizikalno-kemijskim svojstvima proteina koji vode bolestima. Također, kao što je već spomenuto, pokazano je da su interakcijske površine između proteina čest izvor patogenih mutacija električki nabijenih ostataka u slijedu. Razlog tome je važnost protein-makromolekula te protein-protein komunikacije u prijenosu informacija i stvaranju supermolekulskih struktura na staničnoj razini te inaktivacije u slučaju agregiranja.

Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, Huntingtonova bolest i mnoge druge neurodegenerativne bolesti, srpasta anemija i katarakt, stanja su uzrokovana agregacijom određene vrste proteina koja se javlja kao posljedica promjene elektrostatske prirode aminokiselinskog sastava uslijed mutacije. Često je u pitanju povećani nepolarni karakter koji vodi smanjenju topljivosti i agregaciji proteina. Promjena u elektrostatskom doprinosu uslijed mutacije nabijenog ostatka vodi i bolestima poput karcinoma i multiple skleroze.<sup>33, 34</sup>

Amiloidni fibrili su vlaknaste i nerazgranate proteinske nakupine sa visoko zastupljenom sekundarnom strukturom  $\beta$ -ploča koje su međusobno povezane vodikovim vezama. Nađene su u tkivima osoba oboljelih od raznih bolesti. Primjeri su mutacija proteina  $\alpha$ -sinukleina koja vodi Parkinsonovoj bolesti, te mutacije  $\beta$ -amiloidnih peptida koje vode Alzheimerovoj bolesti. E46K je mutacija koja uvodi Lys na mjesto jednog Glu u  $\alpha$ -sinukleinu. Povećana hidrofobnost uzrokuje kondenzaciju proteina što vodi Parkinsonovoj bolesti. Čak 25 mutacija  $\beta$ -amiloidnih proteina vode stvaranju amiloidnih fibrila i Alzheimerovoj bolesti. Na primjer, A $\beta$ 42 protein je visoko hidrofoban proteolitički produkt i pokazano je da formira oligomere s fibrinogenom i sudjeluje u amiloidogenezi (slika 8).<sup>35-38</sup>



Slika 8. Shematski prikaz predloženog modela vezanja fibrinogena i A $\beta$ 42 peptida u patologiji Alzheimerove bolesti. Prikazani modificirani ugrušci fibrina imaju abnormalnu strukturu i nije ih moguće razgraditi enzimima za razgradnju fibrinogenih struktura. 50 nm skala u TEM slici fibrinogenog oligomera. Preuzeto iz izvora Ahn et al.<sup>35</sup>

Demijelinizacija aksona u slučaju multiple skleroze, potencijalno teške bolesti središnjeg živčanog sustava, može se povezati i sa deiminacijom argininskih ostataka u MBP proteinu. Mijelinska ovojnica se troši jer interakcija proteina smanjenog naboja s negativno nabijenim anionskim fosfolipidima (točnije fosfatidil-serinskom glavom) slabi. Uzrok tome je deiminacija Arg, pri čemu se uklanja pozitivni naboj.<sup>38</sup>

Primjer posttranslacijske modifikacije koja može uzrokovati patogenezu poput nastanka karcinoma je neregulirana hiperfosforilacija proteina uzrokovana hiperaktivacijom kinaza, koje su često posljedica nedostatka autoinhibicije. Do poremećaja u inhibiciji kod kinaze epidermalnog faktora rasta pak dolazi zbog R776H mutacije bazičnog arginina (Arg766).<sup>1,39</sup>

Također, mutacije mogu ukloniti fosforilacijsko mjesto ili dodati jedno na mjesto gdje se ne bi trebalo nalaziti, tako narušavajući regulaciju aktivnosti proteina. Nadalje, u slučaju patogeneze povezane s karcinomom, uočeno je povišenje pH od 0,2 ili više u stanicama karcinoma s obzirom na zdrave stanice, dok je ekstracelularni pH niži za 0,3 do 0,7. Kao posljedica se može javiti promjena u strukturi ili funkciji proteina uslijed promjene naboja na ionizabilnim skupinama, osim same inverzije gradijenta (u zdravim stanicama je ekstracelularni pH viši od intracelularnog, u tumorima je suprotno) što mijenja metabolizam. Posebno je osjetljiva na promjene fiziološkog pH aminokiselina His, koja ima  $pK_a$  sličnog iznosa

fiziološkom pH. Poznato je da mutacije Arg u His su zastupljene u kancerogenezi, primjer je mutacija R776H.<sup>1,40</sup>

Kod katarakta poremećaj nastaje uslijed raspršivanja svjetlosti na agregiranim proteinima leće oka. Pritom dolazi do zamućenja leće. Do agregacije dolazi zbog mutacije čija posljedica je gubitak naboja i povećanje nepolarnosti površine proteina. Zbog neutralizacije naboja Arg uzrokovane mutacijom, proteinima se naglo smanji topljivost i potiče brza kristalizacija. Postoji više vrsta mutacija koje uzrokuju neutralizaciju različitih površinskih naboja proteina leće oka te vode kataraktogenezi. Čak tri mutacije  $\gamma_D$ -kristallina vode nastanku katarakta uz neutralizaciju Arg ostatka: R36S, R58H, R14C. Sve uzrokuju smanjenje topljivosti i kristalizaciju proteina. Postoje i druge mutacije nabijenih ostataka koje vode povećanju interakcije dva tipa proteina i pri toj promjeni povećano je raspršenje svjetlosti.<sup>1</sup>

Srpasta anemija je kronična hemolitička bolest uzrokovana mutacijom na samo jednom položaju  $\beta$ -lanca hemoglobina, Glu6 u Val6. Promjena u hidrofobnosti čini kondenzaciju u agregat proteina povoljnijom, te u uvjetima hipoksije, dehidracije i oksidativnog stresa nastaju vlaknaste strukture kristaliziranog deoksiHbS, deoksigeniranog mutiranog hemoglobina. Nastali agregat je slabo topljiv i sastoji se od tisuća podjedinica deoksiHbS, što uzrokuje abnormalni srpasti oblik eritrocita. Spomenuto vodi ometanom protoku krvi kroz kapilare i smanjenom afinitetu abnormalnog hemoglobina za kisik.<sup>5</sup>

## § 3. LITERATURNI IZVORI

1. Zhou, H.-X., Pang, X., Electrostatic Interactions in Protein Structure, Folding, Binding and Condensation. *Chem. Rev.*, **118** (2018) 1691–1741.
2. Kumar S, Nussinov R. Close-range electrostatic interactions in proteins. *Chembiochem.*, **3**(7) (2002) 604–617.
3. Nick Pace, C., Scholtz, J.M., Grimsley, G.R.: Forces stabilizing proteins. *FEBS Lett.* **588** (2014) 2177–2184.
4. Dong, F., & Zhou, H.-X. Electrostatic Contributions to T4 Lysozyme Stability: Solvent-Exposed Charges versus Semi-Buried Salt Bridges. *Biophys. J.*, **83**(3) (2002) 1341–1347.
5. Pauling L, Itano HA, et al. Sickle cell anemia a molecular disease. *Science.*, **110**(2865) (1949) 543–548.
6. Stern, H. A., & Feller, S. E., Calculation of the dielectric permittivity profile for a nonuniform system: Application to a lipid bilayer simulation. *J. Chem. Phys.*, **118**(7) (2003) 3401–3412.
7. Fogolari, F., Brigo, A., Molinari, H.: The Poisson-Boltzmann equation for biomolecular electrostatics: a tool for structural biology. *J. Mol. Recognit.*, **15** (2002) 377–392.
8. Bashford D, Case DA. Generalized born models of macromolecular solvation effects. *Annu Rev Phys Chem.*, **51** (2000) 129–152.
9. Onufriev AV, Case DA. Generalized Born Implicit Solvent Models for Biomolecules. *Annu Rev Biophys.* **48** (2019) 275–296.
10. Grochowski, P., Trylska, J., Continuum molecular electrostatics, salt effects, and counterion binding—A review of the Poisson–Boltzmann theory and its modifications. *Biopolymers.* **89** (2008) 93–113.
11. Eugene A. Permyakov, Lawrence J. Berliner,  $\alpha$ -Lactalbumin: structure and function, *FEBS Lett.*, **473**(3) (2000) 269–274.
12. Zahran, M., Berezniak, T., Imhof, P., Smith, J.C.: Role of magnesium ions in DNA recognition by the EcoRV restriction endonuclease. *FEBS Lett.*, **585** (2011) 2739–2743.
13. Haspel, N., Tsai, C.-J., Wolfson, H., Nussinov, R.: Hierarchical protein folding pathways: A computational study of protein fragments. *Proteins*, **51** (2003) 2003–2015.

14. Chong, S.-H., Ham, S.: Folding Free Energy Landscape of Ordered and Intrinsically Disordered Proteins. *Sci. Rep.*, **9** (2019)
15. Kočańczyk, M.: Prediction of functionally important residues in globular proteins from unusual central distances of amino acids., *BMC Struct. Biol.*, **11(34)** (2011).
16. Mishra, V., Heath, R.J.: Structural and Biochemical Features of Human Serum Albumin Essential for Eukaryotic Cell Culture. *Int. J. Mol. Sci.* **22(8411)** (2021)
17. Rawat, N., Biswas, P.: Hydrogen Bond Dynamics in Intrinsically Disordered Proteins. *The J. Phys. Chem. B.*, **118** (2014) 3018–3025.
18. Dogan, J., Jonasson, J., Andersson, E., Jemth, P.: Binding Rate Constants Reveal Distinct Features of Disordered Protein Domains. *Biochemistry*. **54** (2015) 4741–4750.
19. Yang, J., Zeng, Y., Liu, Y., Gao, M., Liu, S., Su, Z., Huang, Y.: Electrostatic interactions in molecular recognition of intrinsically disordered proteins., *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **38** (2020) 4883–4894.
20. Uversky VN, Gillespie JR, Millett IS, Khodyakova AV, Vasiliev AM, Chernovskaya TV, Vasilenko RN, Kozlovskaya GD, Dolgikh DA, Fink AL, Doniach S, Abramov VM. Natively unfolded human prothymosin alpha adopts partially folded collapsed conformation at acidic pH. *Biochemistry*. **38(45)** (1999) 15009–15016.
21. Bellomo G, Bologna S, Cerofolini L, Paciotti S, Gatticchi L, Ravera E, Parnetti L, Fragai M, Luchinat C. Dissecting the Interactions between Human Serum Albumin and  $\alpha$ -Synuclein: New Insights on the Factors Influencing  $\alpha$ -Synuclein Aggregation in Biological Fluids. *J Phys Chem B.*, **123(20)** (2019) 4380–4386.
22. Hildebrand PW, Günther S, Goede A, Forrest L, Frömmel C, Preissner R. Hydrogen-bonding and packing features of membrane proteins: functional implications. *Biophys J.*, **94(6)** (2008) 1945–1953.
23. Makki, A., Rada, P., Žárský, V., Kereiche, S., Kováčik, L., Novotný, M., Jores, T., Rapaport, D., Tachezy, J.: Triplet-pore structure of a highly divergent TOM complex of hydrogenosomes in *Trichomonas vaginalis*. *PLoS Biol.*, **17** (2019)
24. <https://sites.chem.utoronto.ca/chemistry/coursenotes/GTM/JM/kchannel/start.htm> (datum pristupa 18. kolovoza 2021.)
25. Chiti F, Dobson CM. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu Rev Biochem.*, **86** (2017) 27–68.

26. Whited, A.M., Johs, A.: The interactions of peripheral membrane proteins with biological membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*. **192** (2015) 51–59.
27. Lomize, A.L., Pogozheva, I.D., Lomize, M.A., Mosberg, H.I.: The role of hydrophobic interactions in positioning of peripheral proteins in membranes. *BMC Struct. Biol.*, **7(44)** (2007)
28. Lomize MA, Pogozheva ID, Joo H, Mosberg HI, Lomize AL. OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Res.* **40** (2012) 370–376.
29. Gamsjaeger, R., Johs, A., Gries, A., Hermann, Romanin, C., Prassl, R., Hinterdorfer, P.: Membrane binding of  $\beta$ 2-glycoprotein I can be described by a two-state reaction model: an atomic force microscopy and surface plasmon resonance study. *Biochem, J.* **389** (2005) 665–673.
30. Yu, B., Pettitt, B.M., Iwahara, J.: Dynamics of Ionic Interactions at Protein–Nucleic Acid Interfaces. *Acc. Chem. Res.*, **53** (2020) 1802–1810.
31. Bowater, R.P., Cobb, A.M., Pivonkova, H., Havran, L., Fojta, M.: Biophysical and electrochemical studies of protein–nucleic acid interactions. *Monats. Chem.*, **146** (2015) 723–739.
32. Gebala, M., Johnson, S.L., Narlikar, G.J., Herschlag, D.: Ion counting demonstrates a high electrostatic field generated by the nucleosome. *eLife*. **8**, (2019).
33. Grant, M.A., Lazo, N.D., Lomakin, A., Condrón, M.M., Arai, H., Yamin, G., Rigby, A.C., Teplow, D.B.: Familial Alzheimer's disease mutations alter the stability of the amyloid beta-protein monomer folding nucleus. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, **104** (2007) 16522–16527.
34. Konno T. Amyloid-induced aggregation and precipitation of soluble proteins: an electrostatic contribution of the Alzheimer's beta(25-35) amyloid fibril. *Biochemistry*. **40(7)** (2001) 2148–2154.
35. Ahn, H.J., Zamolodchikov, D., Cortes-Canteli, M., Norris, E.H., Glickman, J.F., Strickland, S.: Alzheimer's disease peptide  $\beta$ -amyloid interacts with fibrinogen and induces its oligomerization. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, **107** (2010) 21812–21817.
36. Qing, H., Li, N.-M., Liu, K.-F., Qiu, Y.-J., Zhang, H.-H., Nakanishi, H.: Mutations of beta-amyloid precursor protein alter the consequence of Alzheimer's disease pathogenesis. *Neural Regener. Res.*, **14** (2019) 658–665.

- 
37. E. A. Greenbaum, C. L. Graves, A. J. Mishizen-Eberz, M. A. Lupoli, D. R. Lynch, S. W. Englander, P. H. Axelsen, B. I. Giasson, The E46K mutation in alpha-synuclein increases amyloid fibril formation. *J Biol Chem.* **280(9)** (2005) 7800–7807.
  38. B. György, E. Tóth, E. Tarcsa, A. Falus, E. I. Buzás. Citrullination: a posttranslational modification in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* **38(10)** (2006) 1662–1677.
  39. Z. Ruan., N. Kannan: Mechanistic Insights into R776H Mediated Activation of Epidermal Growth Factor Receptor Kinase. *Biochemistry.* **54** (2015) 4216–4225.
  40. B. A. Webb, M. Chimenti, M. P. Jacobson, D. L. Barber. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat Rev Cancer.* **11(9)** (2011) 671–677.