Računalna analiza interakcija kvercetina i epigalokatehin-3-galata te njihovih metabolita sa serumskim albuminima

Matić, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:409118

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Sara Matić

Računalna analiza interakcija kvercetina i epigalokatehin-3-galata te njihovih metabolita sa serumskim albuminima

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj rad, izrađen na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom prof.dr.sc. Sanje Tomić, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Računalna analiza interakcija kvercetina i epigalokatehin-3-galata te njihovih metabolita sa serumskim albuminima

Sara Matić

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Polifenoli su aromatski sekundarni biljni metaboliti, za koje postoje brojni dokazi o povoljnom učinku na ljudsko zdravlje. Antioksidativne, antikancerogene i mnoge druge opažene aktivnosti polifenola ovise o njihovoj bioraspoloživosti. Budući da su polifenoli prisutni u plazmi metabolički modificirani, analizom glavnih komponenti uspoređen je utjecaj metilacije, sulfatacije i glukuronidacije te deprotonacije i dvostruke oksidacije na farmakokinetička svojstva kvercetina i katehina zelenog čaja. Ovi polifenoli se u plazmi vežu na serumski albumin, najzastupljeniji protein plazme, čija je najvažnija funkcija reverzibilno vezanje i transport velikog broja endogenih i egzogenih molekula. Utjecaj metaboličkih modifikacija na način i afinitet vezanja kvercetina i katehina u Sudlovljevo vezno mjesto 1 istražen je molekulskim uklapanjem u ljudski i goveđi serumski albumin pomoću programa AutoDock. Dobiveni rezultati su u skladu s dostupnim eksperimentalnim podacima iz literature. Sulfatacija se općenito pokazala najpovoljnijom modifikacijoma za vezanje ovih polifenola na oba albumina i mogla bi biti uzrokom kompeticije polifenola s lijekovima za vezanje na albumin u plazmi. Rezultati dobiveni za ljudski i goveđi albumin su međusobno značajno različiti što ukazuje da goveđi albumin nije povoljan analog humanom za istraživanje vezanja polifenola na serumski albumin. Također je deteljno ispitan utjecaj početnih struktura i parcijalnih atomskih naboja na rezultate molekulskog uklapanja AutoDockom.

(73 stranice, 44 slike, 19 tablica, 113 literaturnih navoda. Izvornik je napisan na hrvatskom jeziku.)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.
Ključne riječi: polifenoli, serumski albumin, molekulsko uklapanje, analiza glavnih komponenti, farmakokinetička svojstva
Voditelj: Prof. dr. sc. Sanja Tomić
Suvoditelj: Izv. prof. dr. sc. Biljana Balen
Ocjenitelji: Izv. prof. dr. sc. Biljana Balen,
Izv. prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek,
Izv. prof. dr. sc. Vesna Benković,
zamjena: Doc. dr. sc. Ivana Ivančić Baće
Rad prihvaćen: 02.06.2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Computational analysis of interactions of quercetin and epigallocatechin-3-gallate as well as their metabolites with serum albumins

Sara Matić

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

Polyphenols are aromatic secondary plant metabolites, with numerous evidences for human health benefit. Antioxidative, anticancer and other activities of polyphenols depend on their free plasma concentration. Since polyphenols present in plasma are usually metabolically modified, the principle component analysis was used to study effects of methylation, sulfation and glucuronidation, as well as deprotonation and double oxidation, on pharmacokinetic properties of quercetin and green tea catechins. In plasma, these polyphenols bind to serum albumin, the most abundant plasma protein which reversibly binds various endogenous and exogenous compounds. In order to determine the effects of metabolic modifications of polyphenols on binding pose and affinity for Sudlow binding site 1, molecular docking was performed in human and bovine serum albumin using AutoDock. The results agree with available experimental data. Sulfation was shown to be the most favourable modification for binding of polyphenols to both albumins, and may be responsible for competition with drugs for binding to albumin. The results obtained for HSA and BSA were significantly different, pointing out that bovine albumin is not a suitable replacement for human analogue in affinity studies. Furthermore, effects of initial structures and partial atomic charges on the results of molecular docking with AutoDock have been studied.

(73 pages, 44 figures, 19 tables, 113 references. Original in croatian.)

Thesis deposited in the Central Biological Library
Key words: polyphenols, serum albumin, molecular docking, principle component analysis, pharmacokinetic properties
Supervisor: Dr. Sanja Tomić, Prof.
Cosupervisor: Dr. Biljana Balen, Assoc. Prof.
Reviewers: Dr. Biljana Balen, Assoc. Prof.,
Dr. Željka Vidaković-Cifrek, Assoc. Prof.,
Dr. Vesna Benković, Assoc. Prof.,
substitution: Dr. Ivana Ivančić Baće, Prof.
Thesis accepted: 02.06.2016.

SADRŽAJ

SAŽETAK
ABSTRACT

1. UVOD.....1
1.1. Polifenoli.....1
1.1.1. Značaj polifenola.....1
1.1.2. Kemijska struktura i klasifikacija polifenola.....1
1.1.3. Metaboliti polifenola u plazmi.....2
1.1.3.1. Metaboliti kvercetina.....3
1.1.3.2. Metaboliti katehina.....3
1.1.4. Bioraspoloživost polifenola.....4
1.2. Serumski albumini (SA) – struktura i vezna mjesta.....4
1.2.1. Utjecaj strukture na afinitet polifenola prema SA.....7

2. MATERIJALI I METODE.....9
2.1. Analiza veznog mjesta 1 HSA i BSA pomoću programa MOLE.....9
2.2. Usporedba ADME svojstava polifenola i njihovih metabolita pomoću programa VolSurf+ i analize glavnih komponenti.....9
2.3. Molekulsko uklapanje programom AutoDock (AD).....9
2.3.1. Program AutoDock.....10
2.3.1.1. Genetički algoritam (GA).....10
2.3.1.2. Lamarckov genetički algoritam (LGA).....11
2.3.1.3. Polje sila.....12
2.3.2. Odabir struktura albumina HSA i BSA u bazi PDB.....13
2.3.3. Priprema proteinskih struktura SA i parametri molekulskog uklapanja AutoDockom.....14
2.3.4. Odabir i priprema liganada za molekulsko uklapanje.....15

3. REZULTATI.....20
3.1. Analiza veznog mjesta 1 HSA i BSA pomoću programa MOLE.....20
3.2. Usporedba ADME svojstava polifenola i njihovih metabolita pomoću programa VolSurf+ i analize glavnih komponenti.....21
3.3. Molekulsko uklapanje varfarina i ostalih testnih spojeva u HSA.....24
3.3.1. Analiza rezultata.....24
3.3.2. Utjecaj početnih struktura na rezultate molekulskog uklapanja za varfarin.....26
3.3.3. Utjecaj početnih struktura na rezultate molekulskog uklapanja ostalih testnih spojeva.....31
3.4. Molekulsko uklapanje kvercetina i njegovih metabolita u HSA.....31
3.4.1. Utjecaj početnih konformacija i parcijalnih atomskih naboja na rezultate molekulskog uklapanja.....31
3.4.2. Učinak metaboličkih transformacija na vezanje kvercetina na HSA.....39
3.4.2.1. Vezanje kvercetina.....39

3.4.2.2. Vezanje aniona kvercetina.....40
3.4.2.3. Vezanje oksidiranih kvinonskih formi kvercetina.....41
3.4.2.4. Vezanje metiliranih derivata kvercetina.....41
3.4.2.5. Načini vezanja vn4, vn1, Vb i vs/ob.....41
3.4.2.6. Vezanje sulfatiranih metabolita.....42
3.4.2.7. Vezanje glukuronida kvercetina.....43
3.5. Molekulsko uklapanje metabolita katehina u HSA.....45
3.5.1. Vezanje EGCG-a, njegovih aniona i metil-etera.....47
3.5.2. Vezanje sulfata EGCG-a.....48
3.5.3. Vezanje glukuronida EGCG-a.....48
3.5.4. Vezanje EGC-a i njegovih metabolita 49
3.5.5. Vezanje EC-a i njegovih metabolita.....50
3.5.6. Vezanje valerolaktona.....51
3.6. Molekulsko uklapanje u BSA.....52
3.6.1. Molekulsko uklapanje kvercetina i njegovih metabolita.....53
3.6.2. Učinak metaboličkih transformacija na vezanje kvercetina.....54
3.6.3. Molekulsko uklapanje katehina i njihovih metabolita.....57
3.6.3.1. Vezanje EGCG-a i njegovih metabolita.....57
3.6.3.2. Vezanje EGC-a i njegovih metabolita.....59
3.6.3.3. Vezanje EC-a i njegovih metabolita.....59
3.6.3.4. Vezanje valerolaktona.....59
4. RASPRAVA.....60
5. ZAKLJUČAK.....67
6. LITERATURA.....68

POPIS KRATICA I SIMBOLA

AD - AutoDock
ADME - apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija
ADT - AutoDock Tools
BSA - goveđi serumski albumin (eng. bovine serum albumin)
CACO2(VolSurf+) - permeabilnost kroz membrane CACO2 modelnih stanica
COMT - katehol- O-metiltransferaze
DIFF(VolSurf+) - difuzivnost
EC - (-)-epikatehin
EGC - (-)-epigalokatehin
EGCG - (-)-epigalokatehin-3-galat
G - glukuronid
GA - genetički algoritam
H-veza - vodikova veza
HSA - ljudski serumski albumin (eng. human serum albumin)
HSA(VolSurf+) - hidrofobna površina
LGA - Lamarckov genetički algoritam
LgBB(VolSurf+) - logaritam permeabilnosti kroz krvno-moždanu barijeru
logP(VolSurf+) - particijski koeficijent između n-oktanola i vode
$logD_{7.5}$(VolSurf+) - distribucijski koeficijent između oktanola i vode pri pH= 7.5
M1 - struktura *R*-varfarina iz programa Marvin s negativnim nabojem "lokaliziranim" na atomu 4-O
M2 - struktura *R*-varfarina iz programa Marvin s delokaliziranim negativnim nabojem definiranim ručnom aromatizacijom veza u pironskom prstenu prije optimiranja strukture
M3 - struktura neutralnog *R*-varfarina iz programa Marvin
Me - metil
MW(VolSurf+) - molekulska masa
n - način vezanja u središnjem procjepu sličan načinu vezanja naproksena u strukturi BSA 4OR0
NCC(VolSurf+) - ukupan broj nabijenih atoma
OB - Open Babel
parc. at. naboj - parcijalni atomski naboj
PB(VolSurf+) - postotak vezanja na proteine plazme
PC - glavna komponenta (eng. principal component)
PCA - analiza glavnih komponenti (eng. principal component analysis)
PDB - proteinska baza podataka (Protein Dana Bank)
PSA(VolSurf+) - polarna površina
PVM - prošireno vezno mjesto
RMSD - kvadratni korijen prosječnih korijena devijacije oko srednje vrijednosti grupe podataka, (engl. Root Mean Square Deviation)
Sulf - sulfat
SA - serumski albumin
SAR - odnos strukture i aktivnosti (eng. structure-activity relationship)
SBDD - metode strukturi molekulske mete (eng. structure based drug design)
SOLY(VolSurf+) - topljivost
UGT - UDP-glukuroniltransferaze
Va - varfarinski način vezanja s istom orijentacijom prstena A/C kao u strukturi 2BXD
Vb - varfarinski način vezanja sa suprotnom orijentacijom prstena A/C od one u strukturi 2BXD
VD(VolSurf+) - volumen distribucije
Ver. - verzija programa
VM - vezno mjesto
vn1 - prvi način vezanja predviđen za neutralnu strukturu *R*-varfarina (M3)
vn4 - četvrti način vezanja predviđen za neutralnu strukturu *R*-varfarina (M3)
vs/ob - način vezanja predviđen za strukturu *S*-varfarina iz programa OB

UVOD

1. UVOD

Sekundarni biljni metaboliti polifenoli pobudili su posljednjih godina veliki znanstveni interes zahvaljujući rastućem broju dokaza o njihovom povoljnom učinku na ljudsko zdravlje (Pandey i Rizvi 2009). Opaženi biološki učinci polifenola ovise o njihovoj slobodnoj koncentraciji u plazmi, tzv. bioraspoloživosti. Polifenoli se u plazmi većinom vežu na serumski albumin (SA) (Dangles i sur. 2001, Boulton i sur. 1998). Interakcija s albuminom općenito određuje slobodnu, aktivnu koncentraciju spojeva, može služiti za njihovo dugotrajnije pohranjivanje te značajno utjecati na apsorpciju, distribuciju, metabolizam, ekskreciju (skraćeno ADME) i farmakokinetički profil spojeva, pa tako i polifenola (D'Archivio i sur. 2007, Buxton 2005, Zinellu i sur. 2015, Gleeson 2008).
Polifenoli podliježu brojnim metaboličkim transformacijama u ljudskom organizmu (O'Leary i sur. 2003). One mijenjaju strukturu i svojstva polifenola te utječu na njihovo vezanje na SA (Xiao i Kai 2012). Računalnim metodama moguće je relativno brzo i točno proučiti utjecaj tih modifikacija na afinitet i mjesto vezanja polifenola u strukturama SA, što je i tema ovog diplomskog rada.

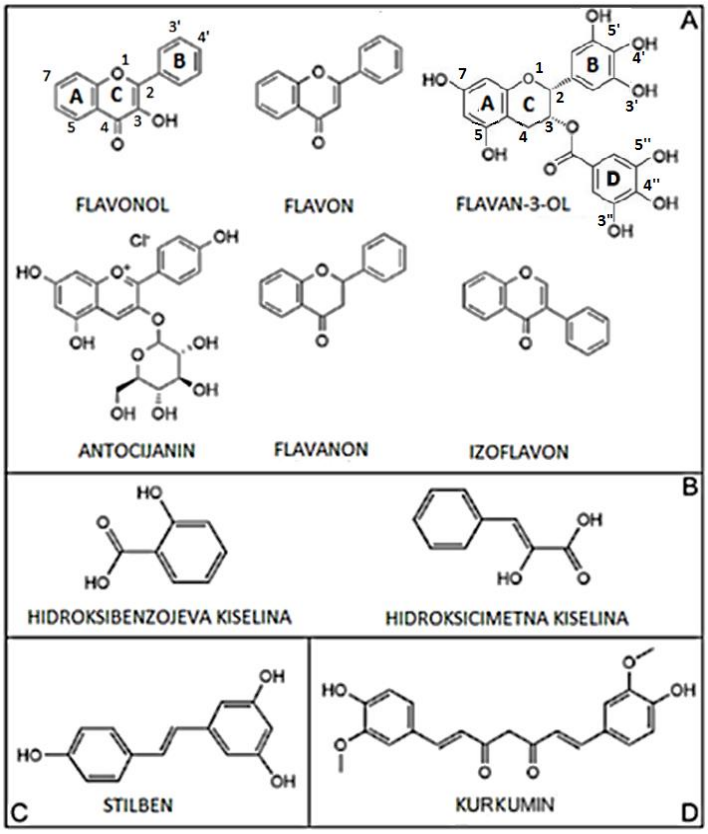
1.1.Polifenoli

1.1.1. Značaj polifenola

Pozitivni učinci polifenola na ljudsko zdravlje pripisuju se uglavnom njihovom antioksidativnom djelovanju. No, neka istraživanja pokazala su da polifenoli mogu imati i prooksidativni učinak, posebice ako se uzimaju u velikim količinama (Mennen i sur. 2005). Neki flavonoidi imaju i antibakterijska i antikancerogena svojstva (Li i sur. 2014), koja se djelomično pripisuju interakcijama polifenola s endogenim biomolekulama kao što su lipidi, proteini i DNA te utjecaju na signalne puteve. Primjerice, za kvercetin i (-)-epigalokatehin-3-galat (EGCG) poznato je da imaju značajan indirektan utjecaj na proteine raznih signalnih puteva kao što su kinaze i faktori rasta (Stepanić i sur. 2014, Russo i sur. 2014, Rodriguez i sur. 2006). Na taj način oni mogu utjecati na epigenetske modifikacije kromatina kao što su acetilacija i metilacija, inhibirati mutagenezu i angiogenezu ili uzrokovati zaustavljanje staničnog ciklusa te smrt tumorskih stanica.

1.1.2. Kemijska struktura i klasifikacija polifenola

Polifenoli su spojevi koji se sastoje od barem jednog aromatskog prstena s jednom ili više hidroksilnih grupa. Prema kemijskoj strukturi mogu se podijeliti u nekoliko skupina (slika 1).



Slika 1. Primjeri struktura najzastupljenijih skupina polifenola A-flavonoidi, B-fenolne kiseline, C-stilbeni i D-kurkuminoidi. Modificirano prema Fantini i sur. (2015). Na strukturi flavonola i flavanola označeni su prstenovi i numerirani atomi.

Flavonoidi su glavna i široko rasprostranjena skupina polifenola (Ross i Kasum 2002). Njihova struktura karakteristična je po benzenskom prstenu A, kondenziranom s heterocikličkim šesteročlanim piranskim ili pironskim prstenom C, koji na drugom ili trećem položaju ima vezan fenilni prsten B (slika 1). Identificirano je preko 4000 različitih flavonoida izoliranih iz biljaka koji su podijeljeni u podskupine: flavonoli, flavoni, flavanoli, antocijanini, flavanoni i izoflavoni (Middleton i Kandaswami 1993, Fantini i sur. 2015).
U ovom radu proučavano je vezanje najzastupljenijeg flavonola kvercetina, i flavanola katehina zelenog čaja (-)-epigalokatehin-3-galata (EGCG-a), (-)-epigalokatehina (EGC-a) i (-)-epikatehina (EC-a) na albumin. Glavna razlika u strukturi flavonola i flavanola je prisutnost dvostruke veze C2=C3 i keto skupine na položaju 4-pironskog prstena C (slika 1).

1.1.3. Metaboliti polifenola u plazmi

Metaboličke modifikacije značajno mijenjaju strukturu i aktivnost polifenola. Polifenoli se u hrani nalaze uglavnom kao β-glikozidi (Day i sur. 1998). Prilikom unosa hranom, prvo se deglikoziliraju (Walle i sur. 2005), a zatim se nastali aglikoni prevode u konjugirane derivate pomoću enzima metabolizma faze II (O'Leary i sur. 2003). Sulfatacija i glukuronidacija su posebno važne modifikacije polifenola. One povećavaju topljivost i molekulsku masu polifenolnih aglikona, što pospješuje njihovu eliminaciju putem urina u slučaju malih metabolita poput monosulfata, ili žuči u slučaju velikih ili višestruko modificiranih metabolita (Manach i sur. 2004). Time se smanjuje njihov potencijalno toksičan učinak kada su prisutni u visokim koncentracijama. Međutim, u ciljnim tkivima metaboličke modifikacije mogu biti uklonjene (Scalbert i sur. 2002).

1.1.3.1.Metaboliti kvercetina

Kvercetin je dostupan u različitoj biljnoj hrani, posebice luku i jabukama (Hollman i sur. 1997). Nakon konzumacije hrane bogate kvercetinom, glavni metaboliti identificirani u ljudskoj plazmi su kvercetin-3-*O*-glukuronid, kvercetin-3'-*O*-sulfat i 3'-*O*-metil-kvercetin (izorhamnetin) (Day i sur. 2001, Mullen i sur. 2006). Njihove maksimalne plazmatske koncentracije su nisko mikromolarne.

Enzimi uključeni u sintezu konjugiranih metabolita kvercetina su UDP-glukuroniltransferaze (UGT), sulfotransferaze i katehol- *O*-metiltransferaze (COMT). Ovi enzimi pronađeni su u ljudskim crijevima i nužni su za unos kvercetina iz crijeva u krvotok (Radominska-Pandya i sur. 1998, De Santi i sur. 2000, Mannisto i Kaakkola, 1999). Kvercetin-3-*O*-glukuronid i kvercetin-3'-*O*-sulfat su glavni produkti metabolizma kvercetina epitelnih stanica tankog crijeva (O'Leary i sur. 2003). Iz crijeva ovi metaboliti prelaze u portalnu venu i jetru. U jetri se dalje transformiraju u izorhamnetin te hibridne konjugate, kao što je izorhamnetin-3-*O*-glukuronid, kvercetin-glukuronid-sulfat te kvercetin diglukuronid (Mullen i sur. 2006, O'Leary i sur. 2003). Korištenjem modelnih stanica jetre, HepG2, O'Leary i sur. (2003) su pokazali da kvercetin-3-*O*-glukuronid ima u jetri dvije moguće metaboličke sudbine: metilaciju kateholne skupine ili hidrolizu glukuronida endogenom β-glukuronidazom te zatim sulfataciju, najčešće do kvercetin-3'-*O*-sulfata.

1.1.3.2. Metaboliti katehina

Zeleni čaj bogat je drugom skupinom flavonoida, a to su katehini. Zeleni čaj uz EGCG sadrži i katehine EGC i EC. Nakon konzumacije zelenog čaja u krvnoj plazmi je oko 70% EGCG-a prisutno u nepromijenjenom obliku, dok je oko 70% EGC-a i EC-a prisutno u obliku konjugata (Chow i sur. 2011, Lee i sur. 2002).

Oko 15% EGCG-a u krvnoj plazmi prisutno je u obliku dimetiliranog konjugata 4',4''-di-*O*-metil-EGCG. Dok je u ljudskoj plazmi 4”-*O*-metil-EGCG pronađen samo u tragovima (Chow i sur. 2011), u tkivu prostate pronađen je u niskim koncentracijama (42.1 +/- 32.4 pmol/g tkiva), sličnim onima EGCG-a u plazmi, što sugerira da detektirani 4”-*O*-metil-EGCG potječe od metilacije EGCG-a u tkivu. U skladu s tim su i rezultati koji pokazuju da stanice raka prostate LNCaP mogu metilirati EGCG u 4”-*O*-metil-EGCG (Wang i sur. 2010). Sulfatirani i glukuronidirani konjugati EGCG-a pronađeni su u vrlo malim udjelima (Sun i Ho 2008, Lu i sur. 2003). Glukuronidacija EGCG-a ovisi o ispitivanom tkivu (Chow i sur. 2011). Ljudski jetreni mikrosomi imaju glavnu funkciju u glukuronidaciji EGCG-a. Jetrene UGT metaboliziraju EGCG uglavnom u EGCG-4''-*O*-glukuronid te rjeđe u 3'-*O* izomer. Ti metaboliti većinom se izlučuju iz tijela putem žuči (Chen i sur. 1997). Taj model je u skladu s činjenicom da je EGCG u plazmi prisutan uglavnom u nekonjugiranom obliku (Chow i sur. 2011). Kada je glavno mjesto glukuronidacije EGCG-a 4''-O zauzeto metilnom skupinom, njegova glukuronidacija nekim izozimima UGT je puno slabija i izlučivanje EGCG-a putem žuči je slabije. Uočeno je da uz visoku aktivnost enzima COMT, ljudski bubrezi imaju visoku ekspresiju izozima UGT neosjetljivog na metilaciju (Lu i sur. 2003), što ukazuje da se regulacija metabolizma i ekskrecije EGCG-a odvija na više razina i uključuje kompleksnu enzimsku mrežu. EC i EGC također se metiliraju enzimima COMT, na položajima 3' ili 4' (Perry 2014). Za EC je također utvrđeno da može biti glukuronidiran i sulfatiran na položaju 3', i takvi su konjugati pronađeni u ljudskoj plazmi u značajnim koncentracijama (Actis-Goretta i sur. 2012). Bakterije debelog crijeva razgrađuju EGCG do (-)-5-(3',4',5'- trihidroksifenil)-γ-valerolaktona i (-)-5-(3',4'-dihidroksifenil)-γ-valerolaktona, koji su također detektirani u ljudskoj plazmi (Lee i sur. 2002, Sun i Ho, 2009).

1.1.4. Bioraspoloživost polifenola

Prema hipotezi slobodne frakcije (Buxton 2005), bioraspoloživost nekog spoja određena je koncentracijom njegovog slobodnog oblika u plazmi. Interakcija s proteinima plazme utječe na bioraspoloživost spojeva uključujući i polifenole (D'Archivio i sur. 2007). Polifenoli i njihovi metaboliti u cirkulaciji brzo prelaze iz slobodne frakcije u frakciju vezanu na proteine plazme, i obratno. Stupanj vezanja na proteine plazme može utjecati na brzinu izlučivanja polifenola iz organizma te na njihovu dopremu do ciljnih stanica i tkiva (Pandey i Rizvi 2009). Uz to, budući da se značajan broj heterocikličkih lijekova veže u isto vezno mjesto kao i polifenoli, moguće su njihove tzv. lijek-lijek interakcije koje mogu značajno utjecati na slobodnu koncentraciju lijekova u plazmi i time na njihov terapeutski indeks (Tesseromatis i Alevizou 2008, Di Bari i sur. 2010).

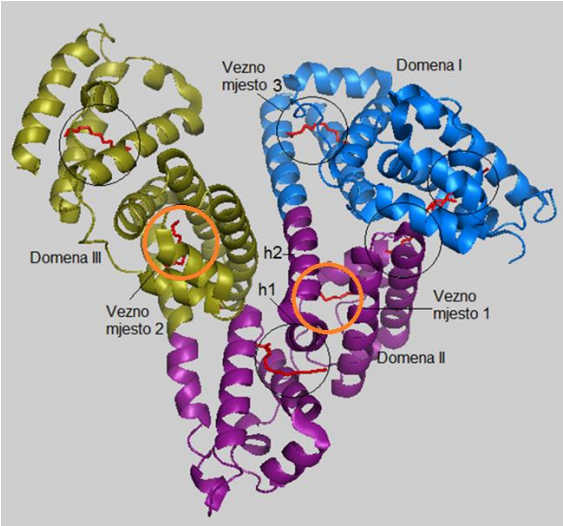
Inkubacija kvercetina u ljudskoj plazmi u uvjetima *in vitro* pokazala je da se on preferentno nalazi vezan na proteine plazme i to na ljudski serumski albumin (eng. *human serum albumin*, HSA) (Boulton i sur. 1998). Slično, inkubacijom EGCG-a s HSA utvrđeno je njegovo vezanje na taj plazmatski protein, te je kao glavni strukturni element za afinitet vezanja prepoznata galoilna skupina (Zinellu i sur. 2015). Vezanje katehina na HSA ima izrazito stabilizirajući učinak, sprječavajući njihovu oksidaciju i epimerizaciju u vodenoj otopini.

Varijacije u lokalnim fizikalno-kemijskim uvjetima, kao što je npr. promjena pH, na specifičnim mjestima u organizmu, npr. na mjestima upale, mogu prouzročiti konformacijske promjene albumina, koje dovode do smanjenja afiniteta i disocijacije kompleksa albumina i promatranog liganda.

1.2. Serumski albumini (SA) – struktura i vezna mjesta

Serumski albumin je najzastupljeniji protein plazme, prisutan u visokoj koncentraciji od ~40 mg/mL (Dockal i sur. 1999). Ovaj negativno nabijen protein iznimno je dobro topljiv te ima velik značaj za pohranu i prijenos brojnih egzogenih i endogenih komponenti plazme (Carter i Ho 1994, Curry 2009, Kratochwil i sur. 2002). Uz afinitet za male, negativno nabijene aromatske spojeve, SA ima i veliki afinitet za vezanje masnih kiselina, hematina i nekonjugiranog bilirubina. Osim transportne, SA ima i mnoge druge uloge, kao što je hvatanje slobodnih radikala i njihova inaktivacija, a može inaktivirati i razne toksične lipofilne metabolite, kao što je bilirubin (Carter i Ho 1994).

HSA je građen od oko 70% α-zavojnica, preostalih 30% strukture čini nasumično klupko, te u cijeloj strukturi nema β-ploče. To mu daje velik stupanj konformacijske fleksibilnosti neophodan za vezanje raznovrsnih liganada. Polipeptidni lanac HSA (Uniprot P02768), veličine 66.5 kDa, sastoji se od 585 aminokiselina. Protein ima srcolik oblik (slika 2). Dvije polovice srcolike molekule drže se zajedno elektrostatskim i hidrofobnim interakcijama. Tri domene, od kojih se svaka sastoji od ~190 aminokiselina, označuju se kao I, II i III, počevši od N-kraja (slika 2). Svaka domena sastoji se od 10 zavojnica povezanih disulfidnim vezama i podijeljena je na subdomene A i B (Carter i Ho 1994).



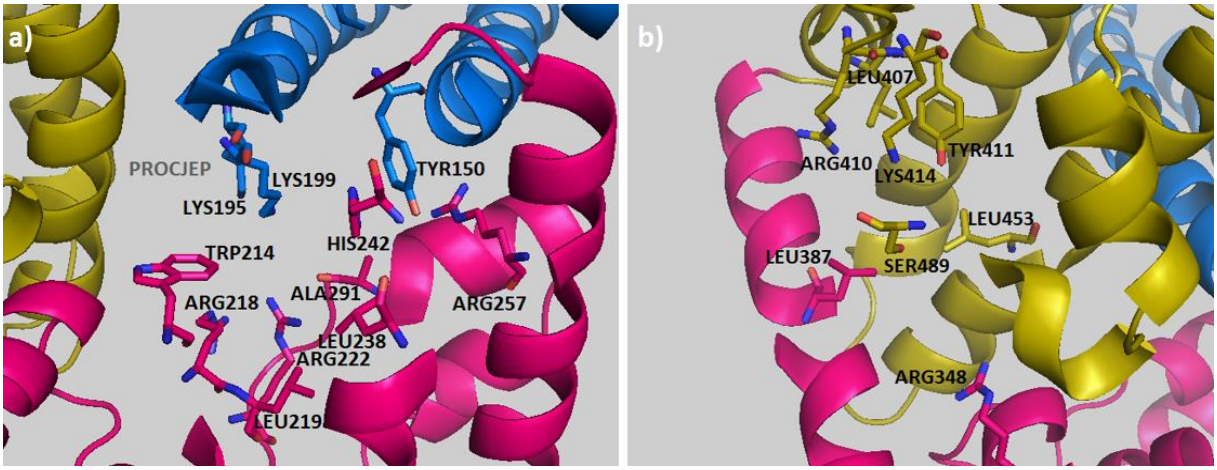
Slika 2. Struktura HSA s ligandima masnim kiselinama (crvena) u 7 specifičnih veznih mjesta (VM). Dva glavna vezna mjesta 1 i 2, te manje vezno mjesto 3, poznata su po vezanju raznih drugih liganada. Ulaz u VM1 čine zavojnice h1, na kojoj je smješten Trp214, i h2.

Goveđi serumski albumin, BSA (eng. *bovine serum albumin*, Uniprot P02769), je često istraživan u kinetičkim i afinitetnim testiranjima lijekova kao zamjena za HSA. Razlog tome bila je njegova lakša dostupnost i stabilnost te strukturna sličnost s HSA, koja iznosi visokih 76%. BSA se, kao i HSA, sastoji od jednog polipeptidnog lanca, ali od 583 aminokiseline. Također ima globularnu srcoliku strukturu s tri domene povezane unakrsno disulfidnim mostovima. Svaka od domena BSA se sastoji od devet zavojnica u obliku tripleta, koje čine sekvence velika-mala-velika zavojnica (Bujacz 2012, Bujacz i sur. 2014).

Iako se, zbog velike raznolikosti molekula koje se vežu na SA, u početku smatralo da se one vežu nespecifično, otkriveno je da u strukturi SA postoji nekoliko specifičnih veznih mjesta za ligande male molekulske mase. U bazi proteinskih struktura Protein Data Bank (PDB) raspoloživo je oko stotinjak struktura kompleksa albumina s raznim kemijskim spojevima (www.rcsb.org, Berman i sur.2000, Buttar i sur. 2010, Ghuman i sur. 2005, Petitpas i sur. 2001 a,b, 2003, Yang i sur. 2007). No, već prije nego što je 3D struktura SA bila određena, Sudlow i sur. (1975, 1976) postavili su temeljnu klasifikaciju veznih mjesta. Na temelju analize kompetitivnim isključivanjem uz korištenje fluorescencijskih proba identificirana su dva osnovna vezna mjesta (VM) za ligande male molekulske mase. Ona su nazvana Sudlowljevo vezno mjesto 1 (VM1) i vezno mjesto 2 (VM2) (slika 2). Tipične konstante asocijacije vezanja u VM1 i VM2 se kreću u rasponu od 10^4 do 10^6 M^{-1} (Carter i Ho 1994, Kratochwil i sur. 2002).

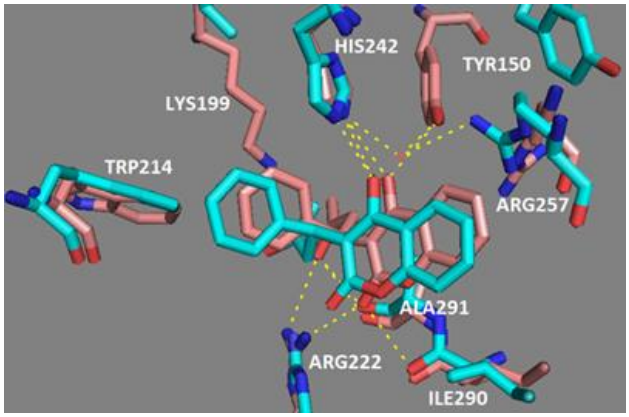
U VM1 smještenom na subdomeni IIA (slike 2 i 3 a), vežu se većinom heterocikličke molekule, često s delokaliziranim negativnim nabojem u blizini središta molekule. To je mjesto poznato kao varfarinsko VM. VM1 je prostrano i može smjestiti i više liganada istovremeno, što je uočeno u kristalnim strukturama HSA s parovima fenilbutazon-indometacin (2BXQ) te azapropazon-indometacin (2BXK) (Ghuman i sur. 2005). VM2, koje se nalazi u subdomeni IIIA (slike 2 i 3b), preferentno veže izdužene aromatske karboksilne kiseline s negativnim nabojem udaljenim od hidrofobnog dijela molekule. VM2 je poznato i kao indol-diazepinsko ili ibuprofensko VM (Ghuman i sur. 2005). Ipak, te strukturne karakteristike nisu strogi preduvjet za vezanje u VM1 ili VM2 te je poznat velik broj liganada koji se vežu u oba vezna mjesta, iako s različitim afinitetom (Petitpas i sur. 2003). Za neke spojeve čije je primarno mjesto vezanja VM1, uočeno je da kao sekundarno VM imaju VM2 i obratno.

Osim dva primarna vezna mjesta, hidrofobna šupljina u obliku slova L u subdomeni IB, koja se još naziva i VM3 (slika 2), također je primarno VM za ligande kao što je bilirubin (Zunszain i sur. 2003, Zunszain i sur. 2008) i naproksen (Lejon i sur. 2008). Osim toga, SA posjeduje i dodatna manje specifična VM u svojoj strukturi, koja mogu služiti i kao sekundarna VM za ligande koji se primarno vežu u VM1 ili VM2.



Slika 3. a) VM1 i b) VM2 HSA u strukturi 2BXD iz baze PDB, s označenim aminokiselinskim ostacima koji najčešće ostvaruju interakcije s ligandima. Domene su označene bojama kao na slici 2. Neki dijelovi strukture radi jasnoće nisu prikazani.

Iako je VM1 glavninom smješteno u subdomeni IIA, ono uključuje i aminokiselinske ostatke subdomena IB (npr. Tyr150, Lys195, Lys199), IIB (npr. Val 343, Leu 347) i IIIA (Leu481) (Slika 2 i 3 a) (Ghuman i sur. 2005, Petitpas i sur. 2001 b). Ulaz u VM1 je smješten između zavojnica h1 i h2 (Slika 2), promjera je oko 10 Å, i okružen je s četiri bazične aminokiseline Lys195, Lys199, Arg218 i Arg222 čime se postiže selektivnost VM1 prema negativno nabijenim ligandima (Slika 3 a). Uz ulaz u VM1 smješten je odjeljak koji čine Phe211, Trp214, Ala215, Arg218 i Leu219. Središnja šupljina VM1 uz apolarne aminokiselinske ostatke npr. Ala291 i Leu238, sadrži i polarne ostatke npr. Tyr150, His242 i Arg257 (Slika 3 a). Spojevi prikladne veličine, s barem dvije polarne ili anionske grupe na suprotnim krajevima, mogu ostvarivati višestruke povoljne interakcije s oba kraja VM1 i vezati se visokim afinitetom (Buttar i sur. 2010, Ghuman i sur. 2005, Petitpas i sur. 2001 b).
U odnosu na HSA, značajnije su razlike u strukturi VM1 BSA prisutne u blizini ulaza u VM1. Lys195 i Lys199 u HSA zamijenjeni su većim argininima Arg194 i Arg198 u BSA. Suprotno, Arg222 HSA-a je zamijenjen s Lys221 u BSA.



Slika 4. Vezanje varfarina u VM1 HSA u kristalnim strukturama 2BXD (svjetlo ružičasta) i 1H9Z (cijan).

Iako pri vezanju liganada male molekulske mase ne dolazi do velikih konformacijskih promjena albumina, položaji bočnih ogranaka određenih aminokiselina veznog mjesta se mijenjaju, što je važno uzeti u obzir prilikom odabira kristalne strukture za molekulsko uklapanje (Buttar i sur. 2010, Ghuman i sur. 2005, Petitpas i sur. 2001 b). Npr., vezanje masnih kiselina inducira konformacijsku promjenu u VM1 strukture 1H9Z koja mijenja strukturu VM1 na način da pomiče Tyr150, i nešto manje Arg257, van iz veznog džepa, pa oni više ne mogu stvarati interakcije s ligandima (Ghuman i sur. 2005) (slika 4). U odnosu na strukturu 2BXD, u strukturi 2BXM s indometacinom, indolni prsten Trp214 je zarotiran radi ostvarivanja povoljne π-π interakcije (Buttar i sur. 2010, Ghuman i sur. 2005).

Interakcija liganada, uključujući polifenole, sa SA istraživana je raznim eksperimentalnim metodama. Ravnotežnom dijalizom, ultrafiltracijom i ultracentrifugiranjem najčešće se određuju slobodne tj. vezane frakcije spojeva u plazmi. Kapilarna elektroforeza, afinitetna kromatografija, spektrometrija masa, spektroskopske i fluorescencijske metode koriste se za karakterizaciju specifičnih interakcija spojeva sa SA (Boulton i sur. 1998, Sengupta i Sengupta 2002, Doufur i Dangles 2005, Janisch i sur. 2004, Xiao i sur. 2009, Khan i sur. 2011). Tim metodama određuju se afiniteti i stehiometrija vezanja, termodinamički i kinetički parametri vezanja te konformacijske promjene SA prilikom vezanja.

Međutim, ovim eksperimentalnim metodama ne može se točno odrediti mjesto i način vezanja polifenola, što otežava razumijevanje prirode njihovih interakcija sa SA. Vezanje fluorescentnih polifenola, kao što je kvercetin, na SA najčešće je istraživano gašenjem intrinzične fluorescencije triptofanskih ostataka. Na temelju dobivenih rezultata zaključeno je da se polifenoli vežu u blizini triptofanskog ostatka na ulazu u VM1, što sugerira vezanje u to VM. Međutim taj rezultat ne isključuje vezanje u procjep između subdomena IIA, IIB i IIIA, gdje su također moguće interakcije vezanih liganada s Trp214 HSA ili Trp213 BSA. Uz to, BSA ima dodatni triptofanski ostatak Trp134 smješten na površini subdomene IB koji također utječe na spektroskopske rezultate, čime je otežano prepoznavanje liganada VM1 BSA ovom metodom.

Najbrži i najjeftiniji način određivanja mogućeg mjesta i načina vezanja spojeva u SA omogućuje primjena računalnih metoda. Ukoliko je poznata 3D struktura proteina, primjenom računalnih metoda, moguće je proučiti vezna svojstva veznih mjesta u SA, te predvidjeti koji će se spojevi, gdje, kako, i s kojim relativnim afinitetom vezati u definirano vezno mjesto.

1.2.1. Utjecaj strukture na afinitet polifenola prema SA

Rezultati istraživanja pokazuju da metabolizam kvercetina u crijevima i jetri ima velik utjecaj na vezanje na SA (Janisch i sur. 2004, Xiao i Kai 2012). Afinitet polifenola za SA varira u skladu s njihovom kemijskom strukturom. Tako npr. glikozidi kvercetina i luteolina imaju manji afinitet vezanja za SA od aglikona (Dangles i sur. 1999, Doufur i Dangles 2005, Xiao i sur. 2009). Smanjeni afinitet glikozida za SA u odnosu na aglikone pripisan je steričkim smetnjama uslijed porasta molekulske veličine, neplanarnoj strukturi glikozida i njihovoj manjoj hidrofobnosti u odnosu na aglikone (Xiao i Kai 2012). Slično, glukuronidi kvercetin-3-*O*-glukuronid i 3'- *O*-metil- kvercetin-3- *O* glukuronid imaju slabiji afiniteti za HSA u odnosu na aglikon, dok se kvercetin-4'-*O*-glukuronid vjerojatno ne veže na HSA (Janisch i sur. 2004). Glukuronidi flavanona naringenina i hesperitina imaju sličan afinitet vezanja na HSA kao i njihovi aglikoni (Khan i sur. 2011). Neki metaboliti polifenola, poput sulfata kvercetina, pokazuju veći afinitet za vezanje na SA od samih aglikona (Janisch i sur. 2004).

Utjecaj sulfatacije, glukuronidacije i metilacije uvelike ovisi o položaju supstitucije. U radu Janisch i sur. (2004) eksperimentalno je određen redoslijed po jačini vezanja kvercetina i njegovih glavnih metabolita na HSA: kvercetin-3'-*O*-sulfat > kvercetin > kvercetin-3-*O*-glukuronid > izorhamnetin-3-*O*-glukuronid > kvercetin-4'-*O*-glukuronid. U svom radu Doufur i Dangles (2005) odredili su da, u odnosu na aglikon, kvercetin-7-*O*-sulfat pokazuje viši afinitet vezanja na HSA i BSA, dok izomer 3-*O*-sulfat pokazuje podjednak afinitet za HSA i značajno manji afinitet za BSA.
Dosadašnji radovi koji su istraživali vezanje polifenola na SA računalnim metodama, analizirali su način i afinitet vezanja polifenola ne uzimajući u obzir njihove plazmatske metabolite, te nisu razmatrali utjecaj deprotonacije i oksidacije hidroksilnih skupina na vezanje na SA. Ako pretpostavimo da su hidroksilne skupine polifenola glavne farmakoforne točke za interakcije s proteinima, njihova promjena na različitim dijelovima molekule metabolita može različito utjecati na afinitet vezanja na SA i na promjene u biološkoj aktivnosti. Zbog toga je u ovom radu analiziran utjecaj metaboličkih transformacija hidroksilnih grupa odabranih polifenola na afinitet vezanja na SA.

U ovom diplomskom radu, za aglikone kvercetin, EGCG, EGC i EC, njihove metabolite te deprotonirane i oksidirane oblike, analiza vezanja na HSA i BSA provedena je primjenom računalnih metoda i programa prikazanih u tablici 1.

Tablica 1. Pregled metoda *in silico* i programa primijenjenih u ovom radu.

Metoda	**Program**
Usporedba svojstava VM1 HSA i BSA	MOLE
Usporedba ADME-svojstava polifenola i njihovih metabolita analizom glavnih komponenti (PCA)	VolSurf+
Predviđanje mjesta i načina vezanja te računanje afiniteta vezanja polifenola u HSA i BSA	AutoDock i AutoDock Tools

MATERIJALI I METODE

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Analiza veznog mjesta 1 HSA i BSA pomoću programa MOLE

Program MOLE (Ver. 2.13.9.6) omogućuje određivanje i aminokiselinsko profiliranje šupljina i tunela u proteinima, te karakterizaciju njihovih fizikalno-kemijskih svojstava (Sehnal i sur. 2013). Te informacije korisne su za procjenu veličine i tipova liganada koji mogu ući i proći kroz tunele.
U ovom radu MOLE je upotrijebljen za analizu VM1 u albuminima HSA i BSA, koristeći originalne vrijednosti algoritamskih parametara. Za svaki albumin korištene su po dvije konformacije proteina iz baze PDB: apo-konformacija (HSA 1AO6; BSA 4F5S) i struktura kompleksa s ligandom (HSA 2BXD; BSA 4OR0). Svim strukturama su za potrebe ove analize prethodno uklonjene molekule vode i ligandi. Za sve četiri strukture tuneli su određeni koristeći kao rubne točke za HSA: Arg257, Tyr150, His242, Ala291, Trp214 i za BSA: Arg256, Tyr149, His241, Ala290, Trp213, te su izračunati njihovi fizikalno-kemijski profili.

2.2. Usporedba ADME svojstava polifenola i njihovih metabolita pomoću programa VolSurf+ i analize glavnih komponenti

Analiza glavnih komponenti (eng. *principal component analysis*, PCA) je multivarijantna statistička metoda za analizu odnosa strukture i aktivnosti (eng. *structure-activity relationship*, SAR) (Eriksson i sur. 2006, Wilson i Lill 2011). U ovom diplomskom radu metoda PCA je provedena programom VolSurf+ koristeći ujedno i deskriptore izračunate tim programom.
VolSurf+ je program dizajniran za predviđanje i analizu farmakokinetičkih svojstava kemijskih spojeva, posebno sa svrhom eliminacije spojeva s lošim farmakokinetičkim profilom u ranoj fazi otkrivanja lijekova (Cruciani i sur. 2000). VolSurf+ predviđa 128 fizikalno-kemijskih i ADME svojstava za dani kemijski spoj iz generiranih 3D mapa energija interakcije (engl. *GRID Based Molecular Interaction Fields*) između dane molekule i raznih kemijskih proba (npr. vode, atoma karbonilnog kisika, atoma amidnog dušika). Ti se deskriptori mogu u programu VolSurf+ koristiti i za izgradnju modela SAR, kao što je npr. model PCA.
U ovom radu pomoću programa VolSurf+ provedena je analiza metabolita kvercetina i polifenola zelenog čaja kako bi se utvrdio učinak metaboličkih transformacija polifenolnih aglikona na njihova fizikalno-kemijska i ADME svojstva. Promatrani prirodni spojevi uneseni su u VolSurf+ u obliku zapisa SMILES.

2.3. Molekulsko uklapanje programom AutoDock (AD)

Metoda molekulskog uklapanja (engl. *molecular docking*) je jedna od najčešće korištenih metoda u proučavanju interakcija kemijskih spojeva i ciljnih makromolekula, utemeljenih na poznavanju 3D strukture ciljne makromolekule – proteina ili nukleinske kiseline (eng. *structure based drug design*, SBDD) (Ferreira i sur. 2015, Ghosh i sur. 2006). U molekulskom uklapanju, proučavani kemijski spojevi, bilo prirodni ili sintetski, se uklapaju u najčešće predefinirano mjesto vezanja, što omogućuje određivanje njihovih mogućih načina vezanja i relativnih afiniteta vezanja za proučavanu ciljnu makromolekulu.

Molekulsko uklapanje polifenola i njihovih metabolita u SA provedeno je pomoću programa AutoDock (Ver.4.2.) (Morris i sur. 2009) uz upotrebu grafičkog sučelja AutoDockTools (ADT, Ver.1.5.6.) (Morris i sur. 2009).

2.3.1. Program AutoDock

Predviđanje načina vezanja liganda u vezno mjesto receptora molekulskim uklapanjem sastoji se od dva glavna stupnja: 1) pretraživanja konformacijskog prostora liganda i 2) procjene energije vezanja pojedine konformacije pomoću metoda baziranih na polju sila (Kitchen i sur. 2004, Huey i sur. 2007). U AutoDocku je primarna metoda pretraživanja konformacijskog prostora unutar veznog mjesta Lamarckov genetički algoritam (LGA).
Vezni prostor u strukturi proteina je opisan kao 3D mreža točaka (eng. *grid*) (Morris i sur. 1998). Za svaku točku se unaprijed izračunavaju afinitet i energetski doprinos za interakcije pojedinih tipova atoma liganda. Atomi liganda se tijekom uklapanja sekvencijalno postavljaju u pojedine točke mreže, što omogućuje brzo izračunavanje veznih energija pojedinih konformacija.

2.3.1.1. Genetički algoritam (GA)

Genetički algoritam je metoda globalne pretrage koja oponaša glavne karakteristike Darwinove evolucije te primjenjuje Mendelova genetička načela. U primjeni GA u molekulskom uklapanju, kompleks proteina i liganda je definiran skupom varijabli stanja, pri čemu svaka varijabla odgovara jednom genu. Prva tri gena su Cartesijeve koordinate (*x, y*, *z*) koje određuju položaj liganda u 3D prostoru i opisuju njegovu translaciju. Sljedeća četiri gena su varijable koje definiraju orijentaciju liganda, a svaki sljedeći gen predstavlja vrijednost za jednu torziju u ligandu. Redoslijed gena koji kodiraju torzijske kutove definiran je torzijskim stablom (*torsion tree*), kojeg generira program za pripremu liganada *AutoTors* paketa ADT.
Ukupno stanje liganda koje odgovara genotipu se odražava na atomske koordinate koje predstavljaju fenotip. Nasumična stanja križaju se procesom krosingovera, u kojem nova stanja nasljeđuju funkcije stanja od bilo kojeg od dva roditelja. Dodatno, neki od potomaka dobivaju nasumične mutacije u nekima od funkcija stanja tako da se one promijene za nasumičnu veličinu. GA započinje stvaranjem nasumične inicijalne populacije, pri čemu broj jedinki u populaciji definira korisnik. Nakon toga izvodi se petlja kroz generacije, koja se ponavlja dok nije dosegnut ili maksimalan broj generacija ili maksimalan broj energetskih evaluacija koji su unaprijed zadani. Svaka generacija uključuje pet faza: i) mapiranje i procjena fitnesa; ii) selekcija; iii) krosingover; iv) mutacija i v) elitistička selekcija.
Mapiranjem se svaki pojedini genotip iz populacije prevodi u odgovarajući fenotip. Atomske koordinate se uklapaju u 3D mrežu unaprijed određenu za protein i izračunava se fitnes, tj. energija interakcije proteina s ligandom. Kao i u evolucijskoj biologiji, i ovdje fitnes određuje sposobnost jedinke da prenese svoje gene u slijedeću generaciju. Rješenja koja bolje odgovaraju svom okolišu nastavljaju se razmnožavati. U selekciji, jedinke koje imaju fitnes niži (tj. povoljniji) od prosječnog unutar generacije, proporcionalno dobivaju veći broj potomaka prema formuli:

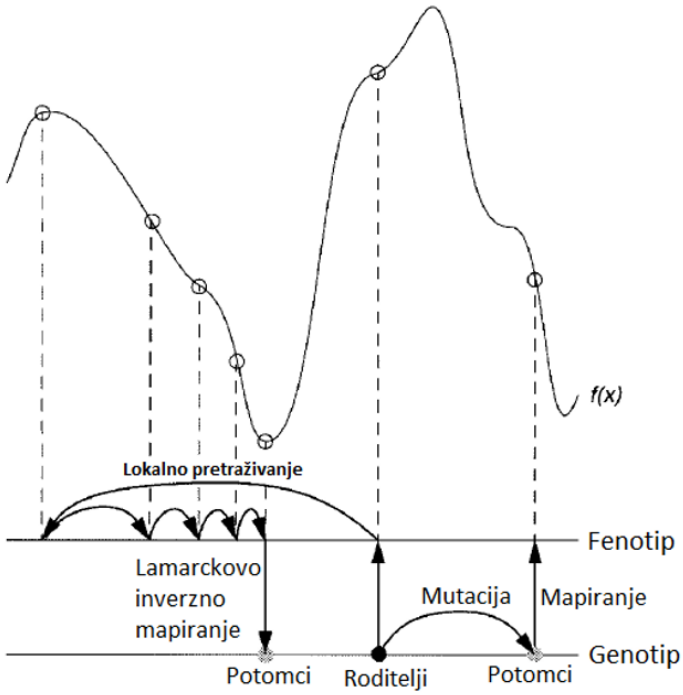
$$n = \frac{f_w - f_i}{f_w - [f]} \quad f_w - [f] \neq 0 \qquad (1)$$

gdje su: *n* prirodni broj potomaka koji se dodjeljuju jedinki; f_i fitnes jedinke (tj. energija vezanog liganda); f_w fitnes najlošije jedinke, odnosno najviša energija u populaciji, u posljednjih *N* generacija (*N* je vrijednost koju definira korisnik, uobičajeno je to 10); [*f*] je srednja vrijednost fitnesa za populaciju.

Ako je fitnes najlošije jedinke jednak prosječnom (tj. $f_w - [f]=0$), došlo je do konvergencije i proces uklapanja se prekida. U krosingoveru se izmjene događaju samo između gena. Nastali potomci zamjenjuju roditelje u populaciji, pri čemu se veličina populacije drži konstantnom. Budući da su geni za translaciju, orijentaciju i torzije predstavljeni realnim varijablama, mutacije se izvode tako da se varijablama dodaju nasumični realni brojevi. Krosingover i mutacije se izvode na nasumičnim članovima populacije prema stopama koje definira korisnik. Dodatni parametar koji definira korisnik, elitizam, određuje koliko najviše rangiranih jedinki jedne generacije automatski preživljava u sljedeću generaciju.

2.3.1.2. Lamarckov genetički algoritam (LGA)

U programu AD koristi se inačica GA, Lamarckov genetički algoritam (LGA) (Morris i sur. 1998). LGA se temelji na teoriji Jeana Baptistea Lamarcka, u kojoj se tvrdi da fenotipska obilježja stečena tijekom života jedinke postaju nasljedne osobine. Ta teorija, iako odbačena u klasičnoj genetici, ponovno se razmatra u kontekstu epigenetike (Skinner 2015).
LGA odgovara hibridu GA i metode lokalnog pretraživanja (slika 5) u kojem svaka generacija, uz genotipske, prolazi još i kroz lokalnu pretragu po fenotipu, koja se izvodi na dijelu populacije koju zadaje korisnik). U molekulskom uklapanju to je moguće provesti jer postoji inverzna funkcija mapiranja za određivanje genotipa iz fenotipa, tj. stanja liganda iz atomskih koordinata. Rezultat lokalne pretrage po fenotipu u sljedećoj generaciji zamjenjuje odgovarajuću varijablu stanja u genotipu početne jedinke.



Slika 5. Usporedba klasičnog GA i LGA. *f(x)* je funkcija fitnesa. Desno je prikazan rezultat genotipske mutacije koja se prevodi u fenotip funkcijom mapiranja. Lijevo je prikazano lokalno pretraživanje na fenotipskom prostoru koristeći vrijednosti fitnesa. Dovoljan broj koraka lokalnog pretraživanja po fenotipu dovodi do lokalnog minimuma funkcije fitnesa, te se odgovarajući fenotip Lamarckovim inverznim mapiranjem prevodi u genotip. Modificirano prema Morris i sur. (1998).

2.3.1.3. Polje sila

U programu AD fitnes se temelji na semiempirijskom polju sila (jedn. 2). Uz standardne članove u jednadžbi molekularno-mehaničkog polja sila dodani su članovi određeni kalibracijom prema eksperimentalno određenim vrijednostima parametara za skup kompleksa proteina i liganada poznatih struktura i veznih energija (Morris i sur. 1998, Morris i sur. 2009). Upotreba semiempirijskog polja sila povećava točnost kod usporedbe slobodnih energija vezanja liganada s različitim brojem atoma, tj. različite veličine.

U programu AD funkcija za izračunavanje slobodne energije vezanja je zbroj pet članova:

$$\Delta G = \Delta G_{vdw} \sum_{i,j} \left(\frac{A_{i,j}}{r_{i,j}^{12}} - \frac{B_{i,j}}{r_{i,j}^{6}} \right) + \Delta G_{hbond} \sum_{i,j} E(t) \left(\frac{C_{i,j}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} - E_{hbond} \right) + \Delta G_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\varepsilon(r_{ij}) r_{ij}} + \Delta G_{tor} N_{tor} + \Delta G_{sol} \sum_{i_c,j} S_i V_j e^{(-r_{ij}^2/2\sigma^2)} \quad (2)$$

pri čemu se sumiranje izvodi za svaki par atoma liganda, *i*, i proteina, *j*, i za svaki par atoma liganda udaljen za tri ili više veza.

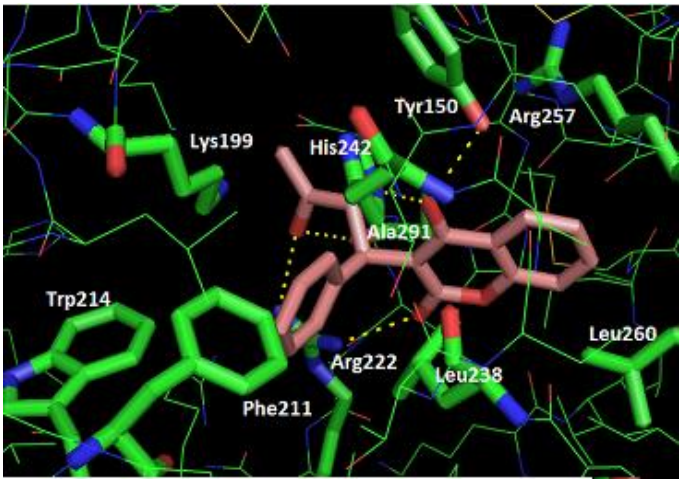
Prva tri člana jednadžbe su doprinosi *in vacuo*: (1) Lennard-Jonesov 12-6 disperzijski potencijal između atoma na udaljenosti $r_{i,j}$. Vrijednosti disperzijskih parametara *A* i *B* preuzeti su iz polja sila AMBER. (2) Usmjereni 12-10 potencijal koji opisuje stvaranje vodikovih veza (H-veza) i desolvataciju polarnih atoma i ovisi o kutu *t* između liganda i proteina. Tim članom broj postignutih H-veza normalizira se s ukupnim brojem mogućih H-veza za ligand. Promjena slobodne energije prilikom vezanja je obično mala, $\Delta G_{\text{hbond}} \approx 0$, jer je broj H-veza liganda u kompleksu sličan broju H-veza u otapalu. No, u obzir je uzet i desolvatacijski parametar E_{hbond}, koji odgovara prosječnoj energiji stvaranja H-veze između vode i polarnih atoma (O, N i S). Parametri $C_{i,j}$ i $D_{i,j}$ su kalibrirani su na vezama O-H, N-H i S-H. Tako je postignuto da, iako je razlika u ukupnoj energiji stvaranja vodikovih veza blizu nuli, postoji kazna za neostvarene H-veze u kompleksu od ~0.2 kcal/mol za atome kisika i dušika, što potiče simulaciju uklapanja prema konformacijama s maksimalnim brojem ostvarenih vodikovih veza. (3) Coulombski elektrostatski potencijal za parove iona s nabojima q_i i q_j na udaljenosti r_{ij}, u mediju s dielektričkom konstantom ε.

Članovi (4) i (5) su empirijski određeni linearnom regresijskom analizom na skupu kompleksa proteina i liganada s poznatim eksperimentalno određenim konstantama vezanja (Morris i sur. 1998, Morris i sur. 2009). ΔG_{tor} predstavlja restrikciju internih rotora i globalne rotacije i translacije i mjeri nepovoljnu entropiju uslijed vezanja liganda zbog restrikcije konformacijske slobode. N_{tor} je broj rotabilnih veza u ligandu. ΔG_{sol} je slobodna energija desolvatacije liganda uslijed vezanja na protein i odgovara hidrofobnom učinku. U programu AD za računanje parametra desolvatacije se koristi prilagođena metoda bazirana na volumenu (Stouten i sur. 1993). Ona je u skladu s konceptom 3D afinitetnih mreža AutoDocka. Za svaki atom liganda *i*, prema njegovom tipu, računaju se parcijalni volumeni (V_j) atoma proteina koji ih okružuju. Postotak volumena proteina oko liganda se uzima kao mjera za atomski solvatacijski parametar (S_i) pojedinog atoma liganda. σ je konstanta (3.5 Å).

2.3.2. Odabir struktura albumina HSA i BSA u bazi PDB

Više od 100000 3D struktura za više od 38000 različitih proteinskih sekvenci raspoloživo je u bazi Protein Data Bank (PDB, www.rcsb.org, Berman i sur. 2000). U ovom radu iz baze PDB preuzete su i detaljno analizirane strukture albumina HSA i BSA. Analiza molekulskih struktura proteina provedena je programima za analizu molekulskih struktura PyMol (Schrödinger, LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Ver. 1.1eval) i MOLE (Ver. 2.13.9.6) (Sehnal i sur. 2013).

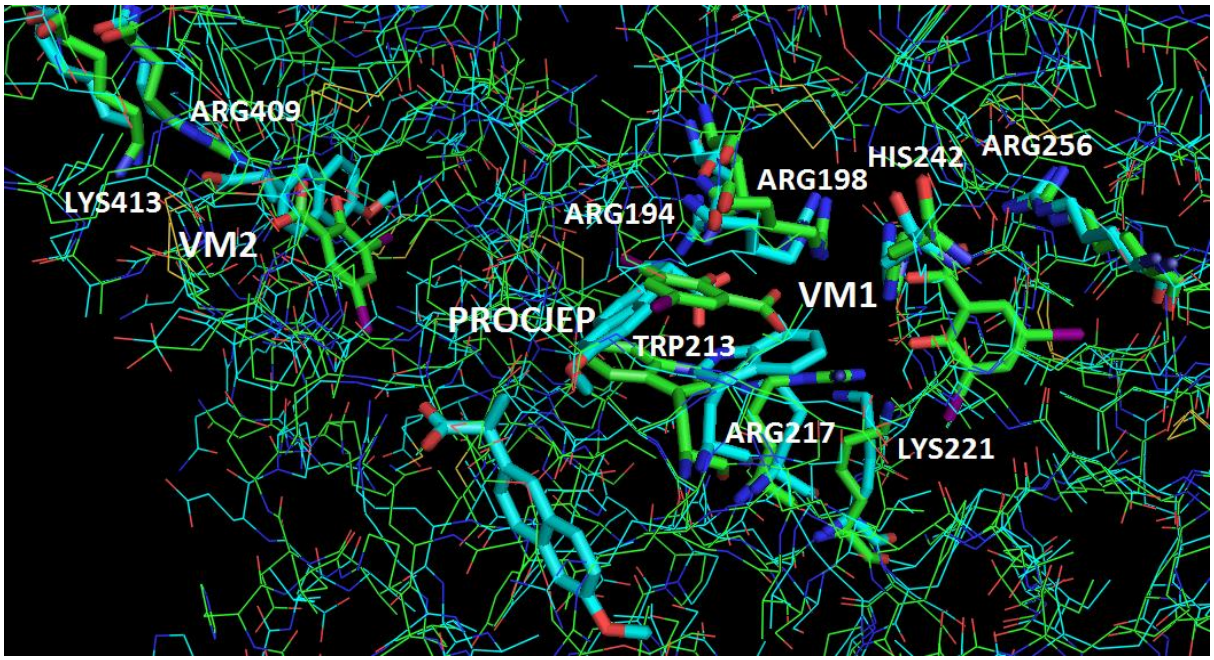
U bazi PDB pronađeno je 100-tinjak struktura HSA i oko 15 struktura BSA. Među strukturama kompleksa SA s ligandima u bazi PDB, strukturno najsličniji ligand HSA proučavanim polifenolima je varfarin. U bazi PDB postoje tri kristalografske strukture HSA s varfarinom: 2BXD i 1H9Z za *R*-enantiomer i 1HA2 za *S*-enantiomer varfarina. Način vezanja, tj. smještaj i orijentacija oba enantiomera u Sudlowljevo VM1 su jednaki (Petitpas i sur. 2001 b). U strukturi 2BXD varfarin u VM1 ostvaruje H-veze s bočnim ograncima His242 preko atoma kisika 4-O te s Arg222 i Ala291 preko karbonilnih kisikovih atoma iz pironskog prstena i bočnog lanca (slika 6). Međutim, u strukturama 1HA2 i 1H9Z, zbog vezanja masnih kiselina Tyr150 je pomaknut u odnosu na položaj u strukturi 2BXD i ne tvori interakcije s varfarinom. U tim strukturama na mjestu OH grupe Tyr150 nalazi se molekula vode koja djeluje kao strukturni element podržavajući vezanje varfarina u tom položaju. Dodatno, u strukturama 1H9Z i 1HA2 položaj fleksibilnog bočnog ogranka aminokiseline Lys199 nije točno određen te nedostaje u koordinatama atoma proteinske strukture. Stoga je u ovom radu za molekulsko uklapanje u HSA odabrana struktura 2BXD.



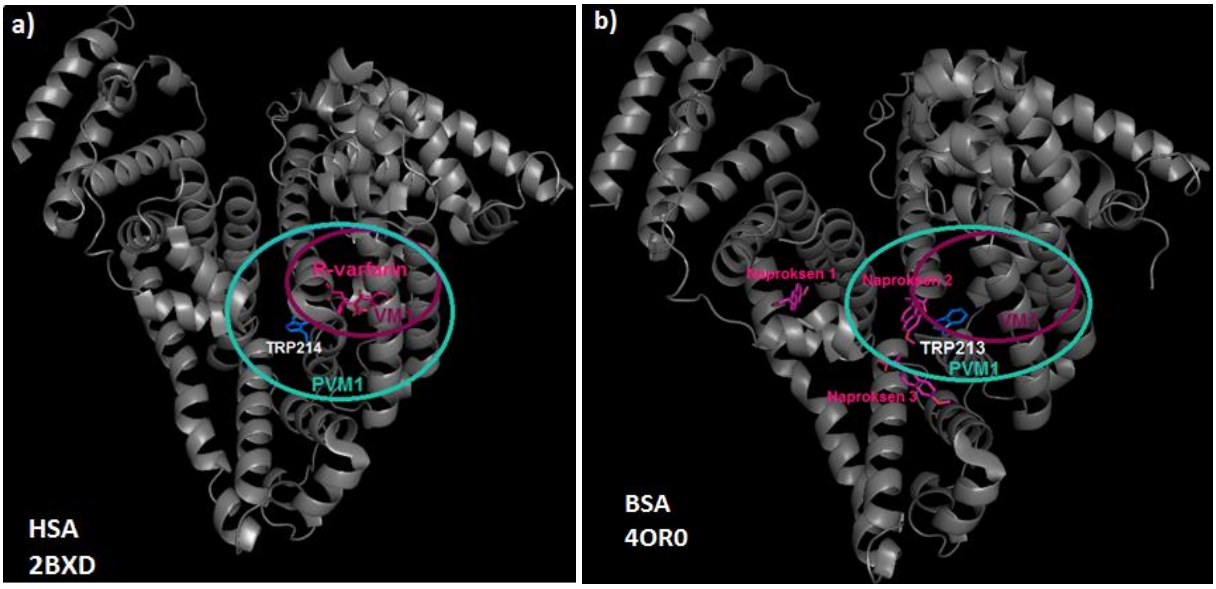
Slika 6. Interakcije između *R*-varfarina i aminokiselina u VM1 HSA u kristalnoj strukturi 2BXD.

Za BSA, u bazi PDB postoje dvije riješene strukture kompleksa s ligandima: 4JK4 i 4OR0 (slika 7). U strukturi 4JK4, četiri molekule 3,5-dijodosalicilne kiseline vezane su na jednu molekulu BSA, dvije u i kraj VM1, te po jedna u VM2 i VM3 (Sekula i sur. 2013). U strukturi 4OR0 (Lejon i sur. 2008), tri molekule naproksena vezane su u VM2, u procjepu na ulazu u VM1 te u procjepu, dalje od ulaza u VM1 (slike 7 i 8). Na varfarinskom položaju smještena je molekula di(hidroksietil)etera.

Vezanje dvaju molekula dijodosalicilne kiseline u području VM1 u strukturi 4JK4 uzrokovalo je konformacijsku promjenu u kojoj je prsten Trp213 zarotiran prema središnjem procjepu albumina (slika 7). Stoga je za molekulsko uklapanje u PVM1 (slika8) izabrana struktura 4OR0 kompleksa BSA s naproksenom, koji je i po veličini sličniji kvercetinu.



Slika 7. VM2 i (P)VM1 u strukturama kompleksa BSA s naproksenom (4OR0, cijan) i 3,5-dijodosalicilnom kiselinom (4JK4, zelena). Prikazani su i značajni aminokiselinski ostaci.



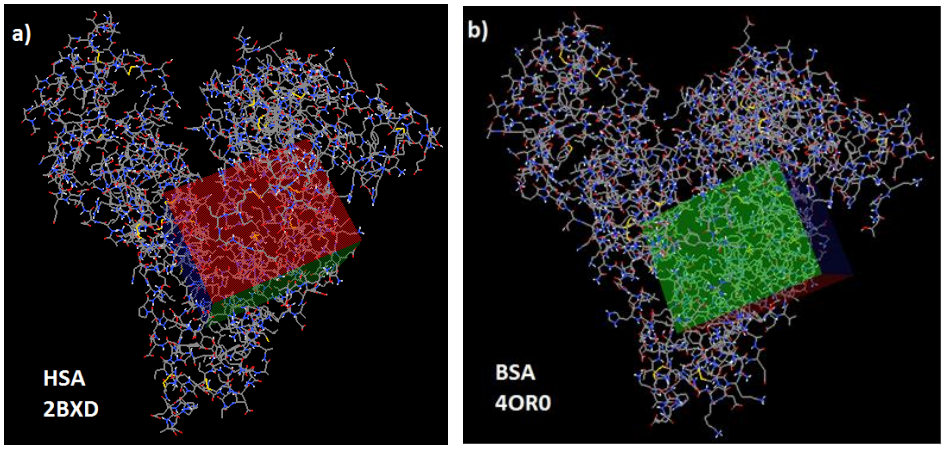
Slika 8. VM1 i PVM1 u strukturama a) HSA (2BXD), i b) BSA (4OR0). Na obje strukture označen je Trp214/213 na ulazu u VM1. U strukturi 4OR0 neki dijelovi strukture nisu prikazani kako bi se vidjela vezna mjesta liganada.

2.3.3. Priprema proteinskih struktura SA i parametri molekulskog uklapanja AutoDockom

Iz kristalnih struktura 2BXD i 4OR0 uklonjeni su B-lanci i molekule vode te ligandi varfarin tj. naproksen. U grafičkom sučelju ADT dodani su atomi vodika, određeni Gasteigerovi parcijalni atomski naboji (Gasteiger i Marsili 1980) i tipovi atoma.

U ovom radu, molekulsko uklapanje provedeno je u prošireno VM1 (PVM1) koje uz VM1 uključuje i procjep u blizini ulaza u VM1 koji odgovara veznom mjestu naproksena u BSA (Lejon i sur. 2008) (Slika 8). U HSA, PVM1 je bilo zadano kao 3D mreža točaka sa središtem u točki s koordinatama (4,–11,3) smještenom između mjesta vezanja varfarina i Trp214. Veličina mreže je bila određena sa 60x60x80 točaka s razmakom 0.375 Å, što odgovara volumenu od (22.5 * 22.5*30.0) $Å^3$, tj. 15187.5 $Å^3$ (Slike 1 i 9).

U BSA su položaj i veličina područja za izračunavanje 3D mreže u programu AD određeni tako da se najbolje poklapaju s mrežom definiranom u HSA (slika 9). Da bi se to postiglo bilo je potrebno koristiti veći broj točaka, 60x70x80 (s koordinatama središta -5, 28, 103), odnosno područje od (22.5*26.25*30.0) $Å^3$, tj. 17718.8 $Å^3$.
3D mreže na zadanom području za svaki od tipova atoma liganada izračunate su pomoću programa AutoGrid (Kitchen i sur. 2004).

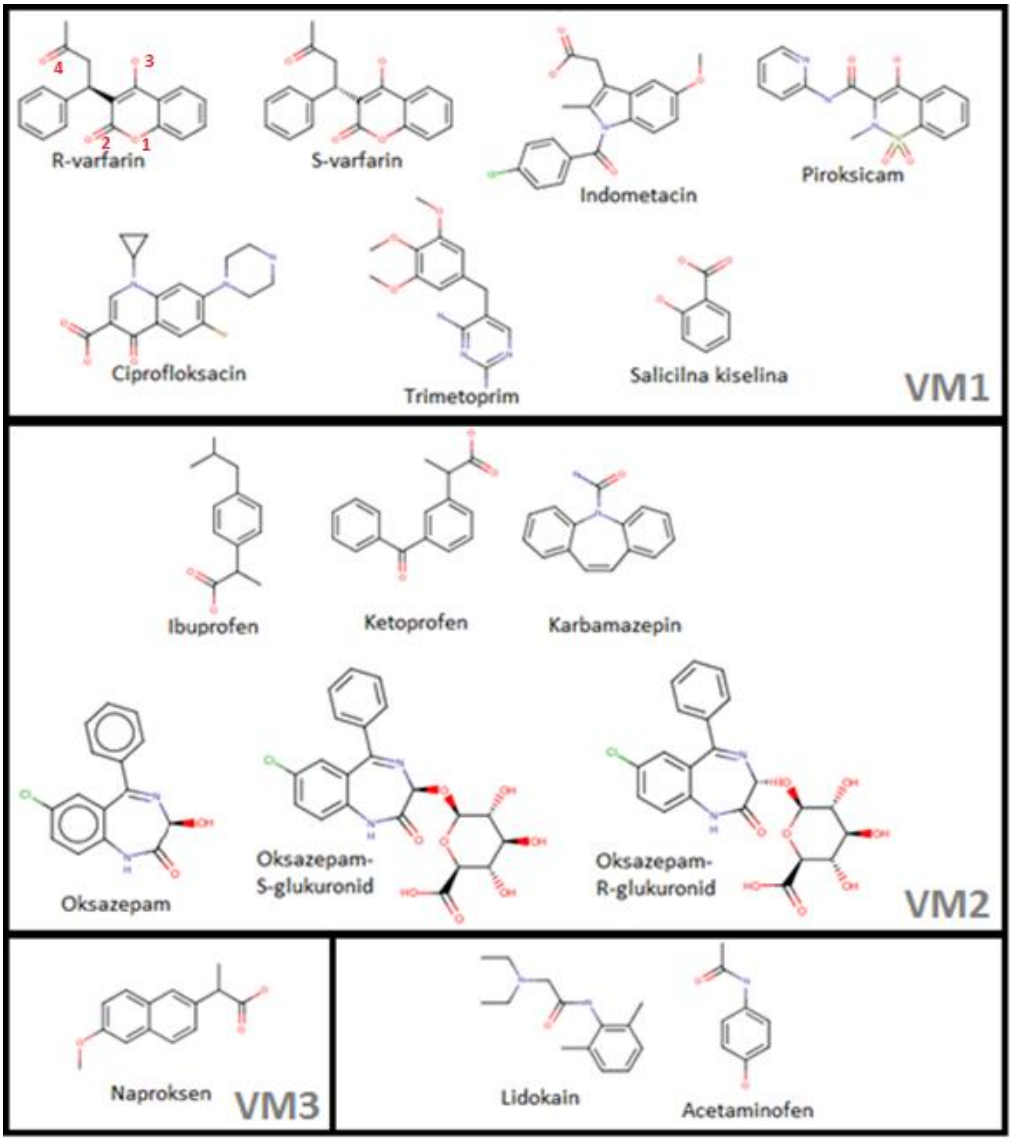


Slika 9. PVM1 u strukturama a) HSA i b) BSA, definirana za izračunavanje 3D mreža tj. molekulsko uklapanje promatranih molekula.

Pri molekulskom uklapanju strukture proteina tretirane su kao rigidne. To znači da nije dozvoljena rotacija veza njihovih aminokiselinskih bočnih ogranaka prilikom simulacije vezanja. Za uklapanje svakog spoja u SA korišten je broj od 100 ciklusa LGA, tj. generirano je 100 konformacija po spoju. Vrijednosti za sve ostale algoritamske parametre korišteni su kako su originalno zadani u programu: veličina populacije 150, maksimalni broj procjena energije uklapanja 2500000 i maksimalni broj generacija 27000. Stopa genetske mutacije bila je 0.02, a stopa krosingovera 0.8, uz jednu jedinku koja automatski preživljava u novoj generaciji. Rezultat molekulskog uklapanja AutoDockom je bilo 100 veznih konformacija, poredanih po rastućoj energiji vezanja te grupiranih s obzirom na međusobnu sličnost, definiranu s vrijednosti kvadratnog korijena prosječnog korijena devijacije oko srednje vrijednosti molekulskih koordinata, RMSD (eng. *Root Mean Square Deviation*) od 2.0 Å. Svaki klaster odgovara jednom predviđenom načinu vezanja, a prezentiran je veznom konformacijom s najnižom energijom vezanja.

2.3.4. Odabir i priprema liganada za molekulsko uklapanje

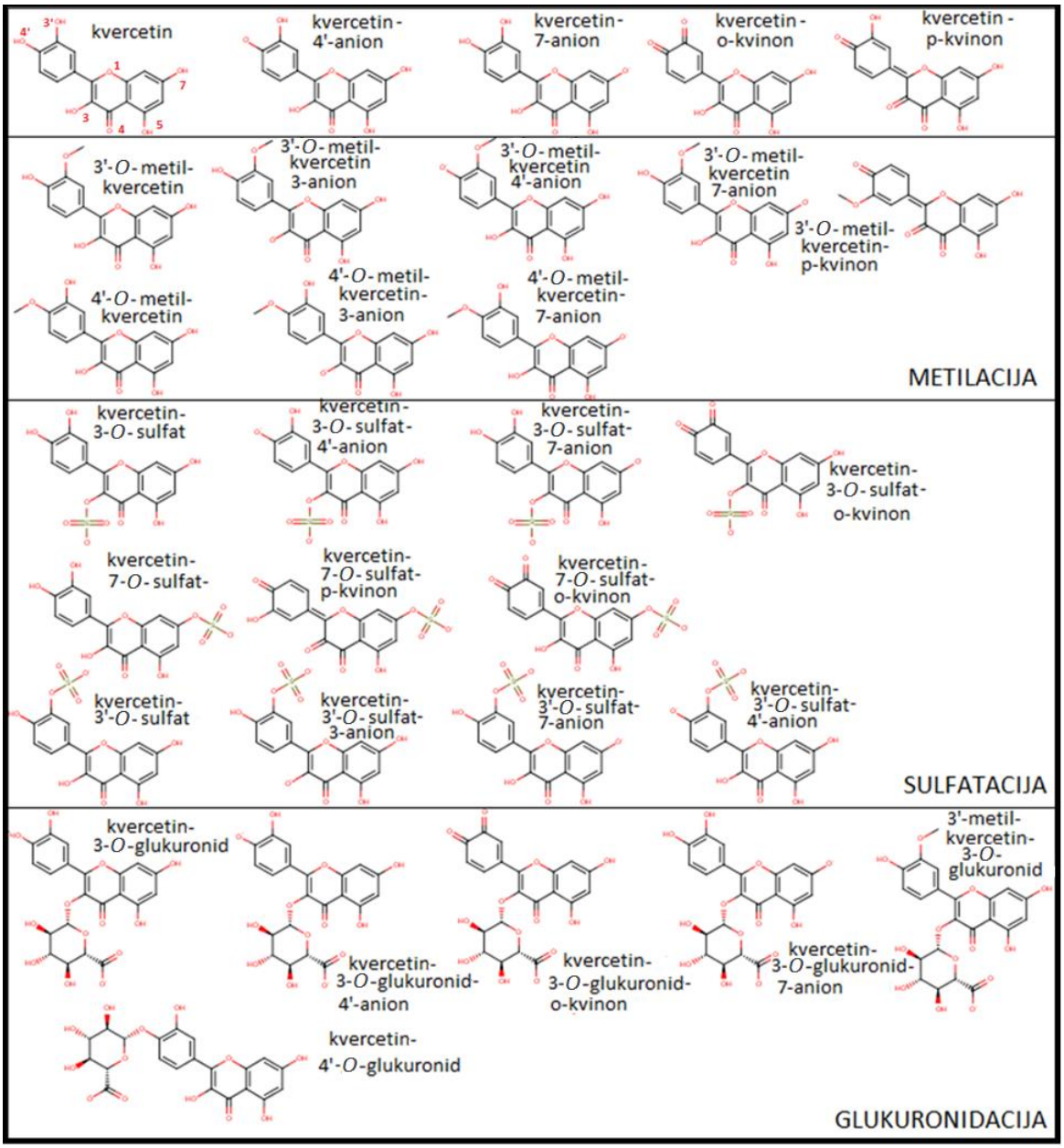
Molekulsko uklapanje u ovom diplomskom radu provedeno je s tri skupa molekula prikazanih na slikama 10-12:
1) Skup od 16 testnih molekula s različitim afinitetom vezanja za SA, uključujući varfarin i naproksen, za "kalibraciju" modela za molekulsko uklapanje u PVM1 (slika 10) (Valko i sur. 2003). Uklapanjem ovih spojeva u strukture 2BXD i 4OR0, istražen je utjecaj početnih struktura i parcijalnih atomskih naboja (parc. at. naboja) na predviđanje načina vezanja i energija vezanja.
2) Skup od 30 struktura kvercetina i njegovih metabolita, odabranih prema zastupljenosti u ljudskoj plazmi (poglavlje 1.1.3.1.), uključujući različita deprotonacijska i dvostruko oksidirana stanja (slika 11).
3) Skup od 19 struktura katehina EGCG-a, EGC-a i EC-a i njihovih metabolita (poglavlje 1.1.3.2.), uključujući različita deprotonacijska stanja (slika 12).



Slika 10. 2D strukture poznatih lijekova korištene za kalibraciju modela za molekulsko uklapanje u SA AutoDockom.

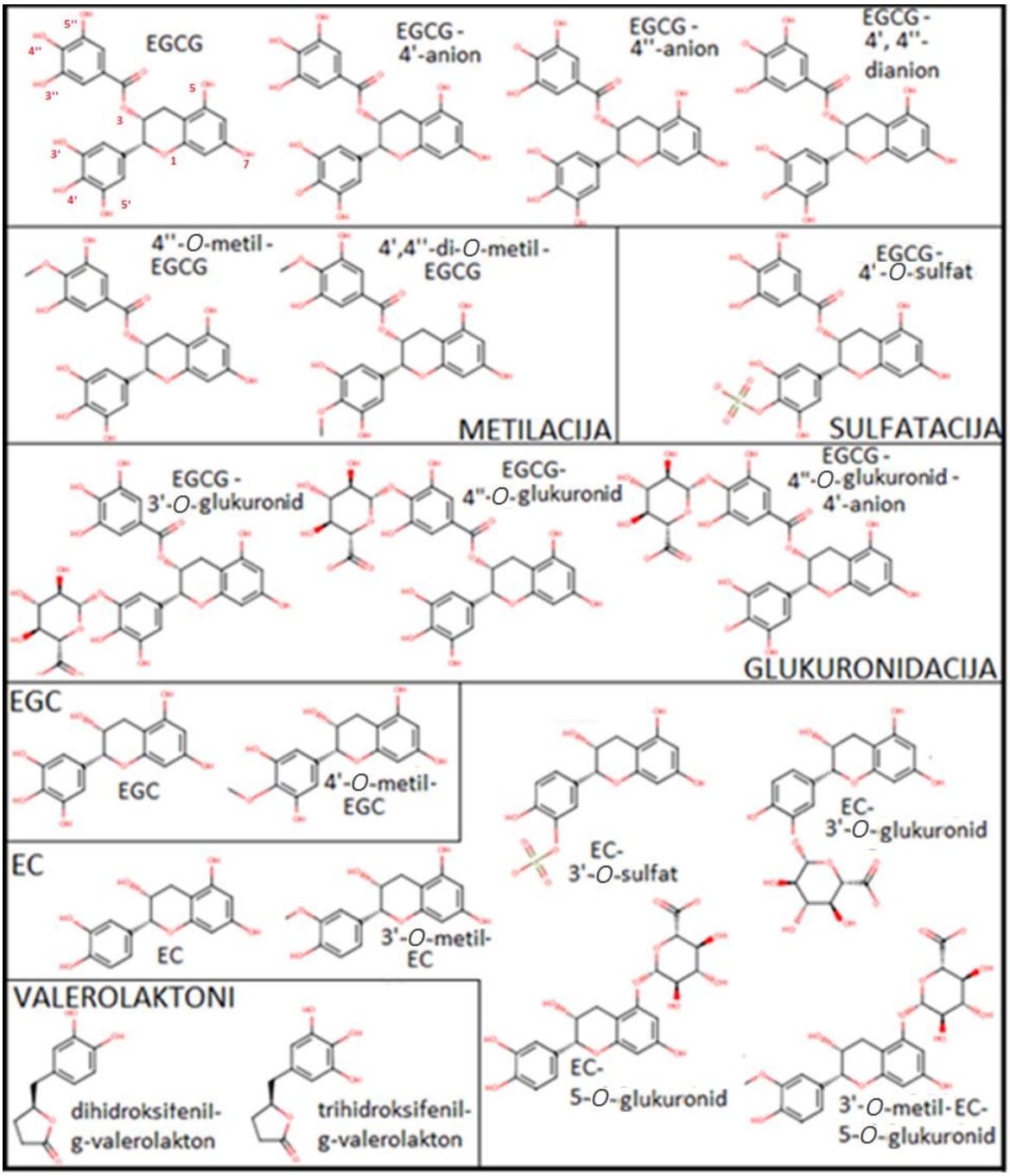
Početne 3D strukture proučavanih polifenolnih spojeva i njihovih metabolita generirane su iz zapisa SMILES pomoću tri programa: Marvin (http://www.chemaxon.com), CORINA (http://www.molecular-networks.com, Molecular Networks GmbH 2014) i Open Babel (O'Boyle i sur. 2011, The Open Babel Package Ver.2.3.1, http://openbabel.org).

U programu Marvin 3D konformer određen je opcijom *Conformations-Conformers*, geometrijskom optimizacijom uz upotrebu Dreidingovog polja sila (Mayo i sur. 1990), uz prethodno dodavanje atoma vodika i određivanje konformera s najnižom energijom. Korištene su programske postavke svih računalnih parametara uključujući postavku *Hyperfine* koja povećava preciznost uključivanjem većeg broja iteracijskih koraka u računanje najpovoljnije konformacije. Strukture su unesene u AD u formatu mol2.



Slika 11. 2D strukture kvercetina i njegovih metabolita, uključujući različita deprotonacijska i dvostruko oksidirana stanja proučavana u ovom radu. Strukture su podijeljene na one bez metaboličkih modifikacija, te metilirane, sulfatirane i glukuronidirane metabolite.

Internetska aplikacija CORINA je automatizirani model generiranja 3D struktura koji se temelji na upotrebi vrijednosti duljina veza i torzijskih kutova, određenih za pojedine tipove atoma i fragmente na temelju eksperimentalnih podataka (Sadowski i sur. 1994). Za prstenaste strukture primjenjuje se zaseban pristup baziran na korištenju tablica konformacija koje omogućuju zatvaranje prstena. Za neprstenaste fragmente i molekule koristi se princip 'najduljeg puta', s maksimalno izduženim lancima s torzijskim kutovima u *trans* konfiguraciji (ukoliko nije drugačije specificirano). Na kraju se provjeravaju nevezna intramolekulska preklapanja i kontakti prstenastih i neprstenastih dijelova i takve interakcije se uklanjaju rotacijom oko jednostrukih veza ili promjenom torzijskih kutova. 3D koordinate struktura generirane pomoću programa CORINA preuzete su iz internetske aplikacije u formatu mol, te su pomoću programa Marvin spremljene u format mol2 kako bi se mogle unijeti u AD.



Slika 12. 2D Strukture katehina i njihovih metabolita, uključujući različita deprotonacijska i dvostruko oksidirana stanja, čije je molekulsko uklapanje proučavano u ovom radu. Strukture su podijeljene na one bez metaboličkih modifikacija, te metilirane, sulfatirane i glukuronidirane metabolite, te na produkte razgradnje crijevnim bakterijama, valerolaktone.

Generiranje 3D strukture u Open Babelu iz zapisa SMILES izvodi se za neprstenaste fragmente prema zadanim geometrijskim pravilima temeljenim na hibridizaciji atoma (O'Boyle i sur. 2011). Za određivanje 3D struktura prstenastih molekula koriste se modeli konformacija za poznate prstenaste strukture, koji se pretražuju pomoću iterativnog algoritma. Prilikom određivanja tipova atoma provjerava se aromatičnost prstenaste strukture s (4n+2) π-elektrona. Zadnji korak u određivanju 3D konformera je minimizacija korištenjem jednog od polja sila. Strukture liganada u ovom radu generirane su uz primjenu standardnog polja sila u programu OB – MMFF94. Koordinate su spremljene u PDB formatu u slučaju testnih molekula, a u mol2 formatu u slučaju molekula metabolita.

Parc. at. naboji izračunati su programima Marvin, OB ili AD i njihov utjecaj na rezultate molekulskog uklapanja programom AD je detaljno istražen u ovom radu.

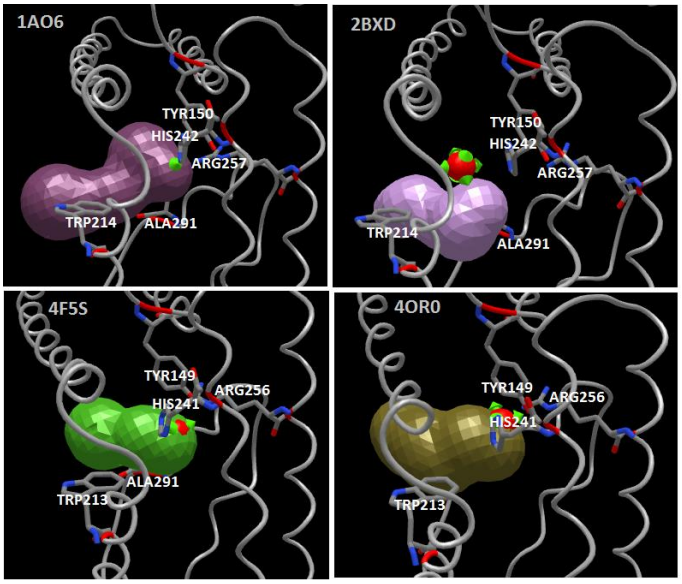
Početne konformacije iz tri programa međusobno su uspoređene računanjem RMSD između x,y,z koordinata (u Å) pomoću funkcije *Pair Fitting* u programu PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.).

REZULTATI

3. REZULTATI

3.1. Analiza veznog mjesta 1 HSA i BSA pomoću programa MOLE

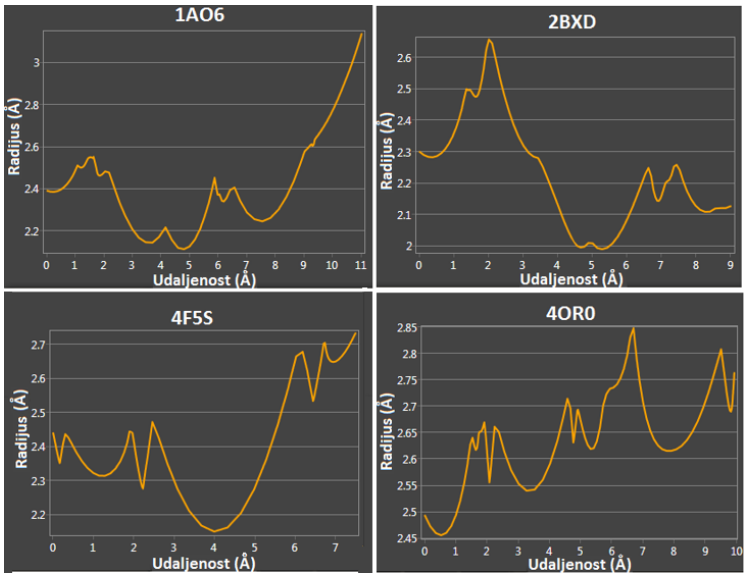
U programu MOLE određeni su tuneli u PVM1 u strukturama HSA 1AO6 (apo) i 2BXD, te strukturama BSA 4F5S (apo) i 4OR0. Na slici 13 prikazan je tunel koji odgovara središnjoj šupljini VM1. Duljine i izračunata fizikalno-kemijska svojstva tih tunela uspoređeni su u tablici 2. Dijagrami radijusa tunela u ovisnosti o udaljenosti od njegove početne točke prikazani su na slici 14).



Slika 13. Najkraći tuneli u VM1 izračunati programom MOLE u strukturama HSA 1AO6 (apo) i 2BXD, te strukturama BSA 4F5S (apo) i 4OR0 za rubne točke zadane položajima aminokiselinskih ostataka Arg257(HSA)/256(BSA), Tyr150/149, His242/241, Ala291/290, Trp214/213.

Tablica 2. Duljina i fizikalno-kemijska svojstva tunela koji odgovara unutrašnjoj šupljini VM1 u strukturama SA.

	HSA		BSA	
	1AO6	2BXD	4F5S	4OR0
Duljina (Å)	11.04	9.04	7.51	9.93
Naboj	4	4	3	3
Hidropatija	-2.26	-2.17	-2.09	-2.22
Hidrofobnost	0	0.29	0.01	-0.03
Polarnost	31.65	32.61	30.36	29.62



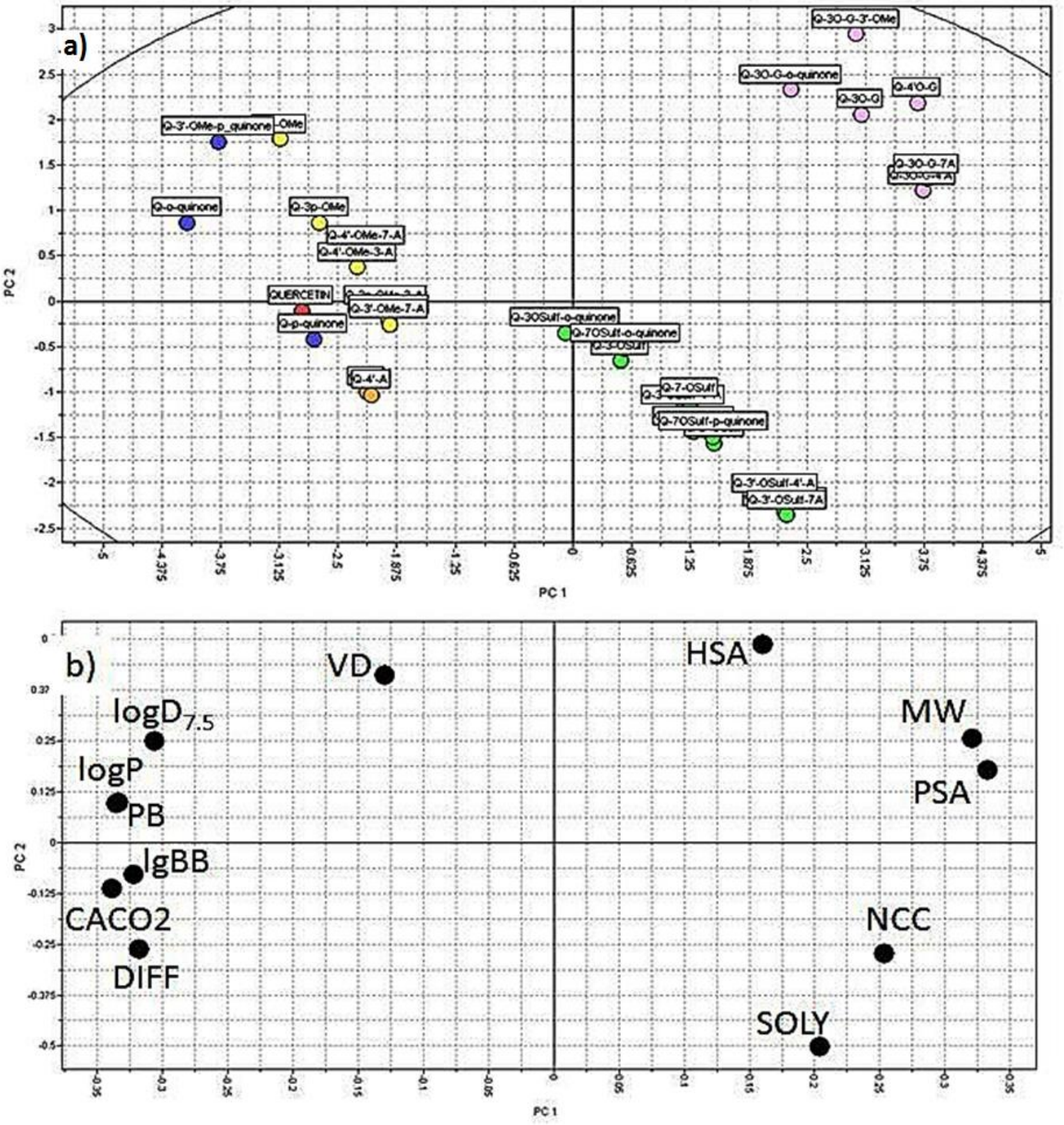
Slika 14. Dijagrami širina tunela VM1 u odnosu na udaljenost od početne točke u unutrašnjosti tog veznog mjesta zadane položajima pet aminokiselinskih ostataka (slika 13).

3.2. Usporedba ADME svojstava polifenola i njihovih metabolita pomoću programa VolSurf+ i analize glavnih komponenti

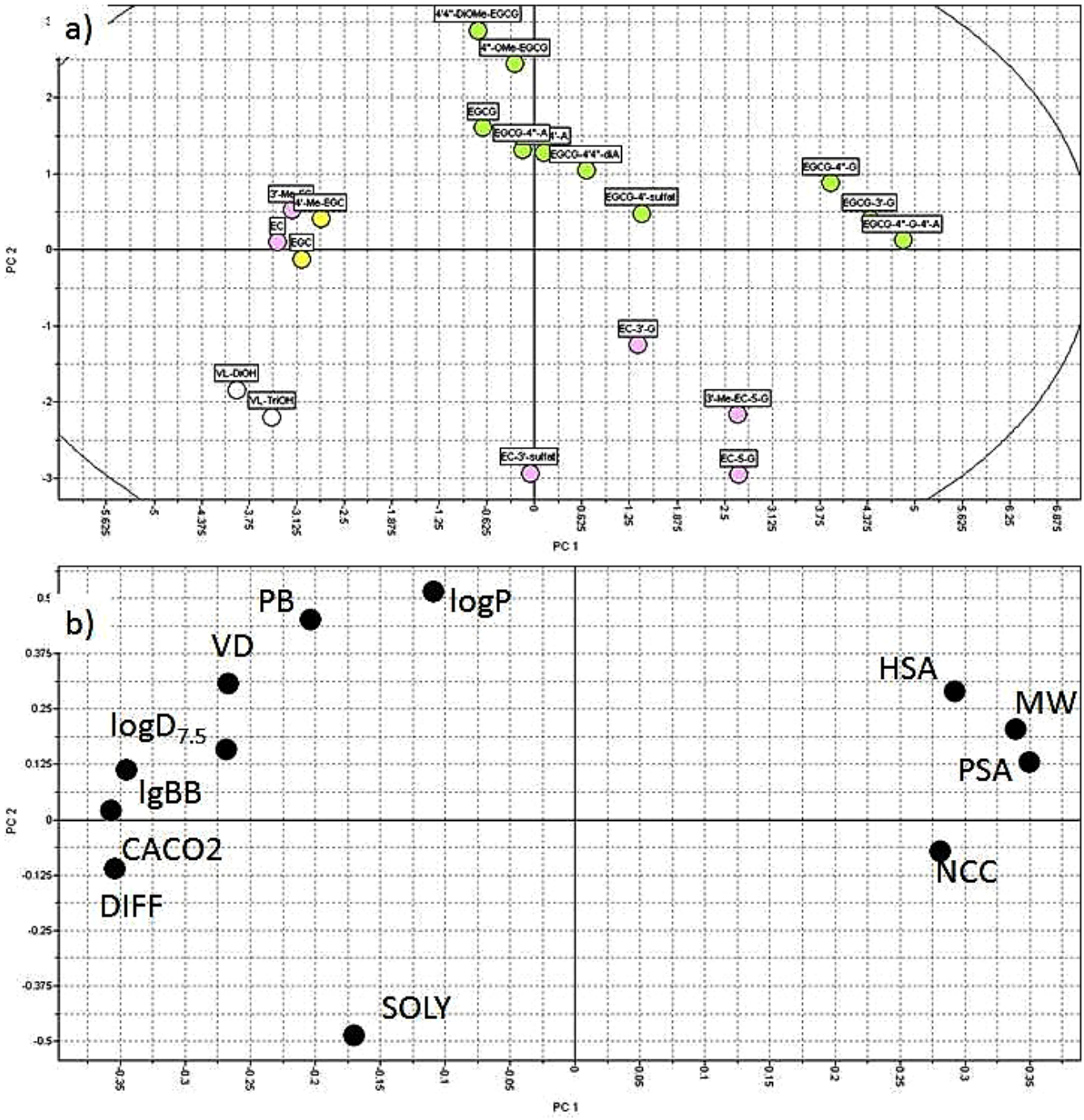
Molekulska svojstva koja najviše pridonose razlici svojstava ADME promatranih polifenolnih aglikona i njihovih metabolita određena su pomoću metode PCA i deskriptora izračunatih u programu VolSurf+. Provođenjem metode PCA za kvercetin i katehine zelenog čaja, te njihove metabolite i derivate (slike 11 i 12), na skupu od svih 128 VolSurfovih deskriptora, kao i raznim podskupovima odabranih deskriptora, kao najrelevantniji, s najvećim doprinosom u glavnim komponentama i jasnim interpretacijskim značenjem (tablica 3), odabrano je 12 deskriptora: molekulska masa (MW), ukupan broj nabijenih atoma (NCC), polarna i hidrofobna površina (PSA i HSA), topljivost (SOLY), difuzivnost (DIFF), particijski koeficijent između oktanola i vode (logP), distribucijski koeficijent pri pH= 7.5 ($logD_{7.5}$) između oktanola i vode, postotak vezanja na proteine plazme (PB), permeabilnost kroz membrane modelnih stanica epitelnog kolorektalnog adenokarcinoma (CACO2), logaritam permeabilnosti kroz krvno-moždanu barijeru (LgBB) i volumen distribucije (VD) (slike 15 i 16). Prve dvije, najznačajnije glavne komponente PC1 i PC2 pripadnog PCA-modela izgrađene od ovih 12 deskriptora, opisuju 82.3 % ukupne varijance za dani skup kvercetina i njegovih 29 derivata (tablica 3). Skup je grupiran u četiri skupine (slika 15 a) s obzirom na specifična svojstva (slika 15 b). Srednje vrijednosti odabranih deskriptora za skup kvercetina i njegovih derivata uspoređene su u tablici 4.
Slično, za skup 20 katehina - EGCG, EGC i EC i njihove metabolite, model PCA dobiven s istim deskriptorima, opisivao je 85.3 % varijance (tablica 3, slika 16).

Tablica 3. Statistički parametri za modele PCA s pet glavnih komponentni određeni pomoću programa VolSurf+.

Skup, Broj molekula	Broj deskriptora	Ukupni % objašnjene varijance R^2 s PC1+PC2	R^2 sa svih 5 PC
Kvercetin *N* = 30	12	82.3	96.0
EGCG,EGC,EC *N* = 20	12	85.3	95.4



Slika 15. PCA model (tablica 3) za kvercetin i njegove metabolite. a) Raspodjela kvercetina (crvena) i njegovih metabolita (anioni i metil-kvercetini – žuta, kvinoni – plava, sulfati – zelena, glukuronidi – svijetlo ružičasta) u prostoru glavnih komponenti PC1 i PC2 (engl. *score plot*). b) Raspodjela molekulskih deskriptora u prostoru PC1 - PC2 (engl. *loadings plot*). Značenje deskriptora je opisano u tekstu.



Slika 16. Dijagrami (a) *score* i (b) *loadings* za model PCA za 20 katehinskih derivata (tablica 3)– EGCG (zelena), EGC (žuta), EC (svijetlo ružičasta) i njihove metabolite, uključujući valerolaktone (bijela), izgrađen pomoću 12 jednakih deskriptora kao i za skup kvercetina (slika 15).

Tablica 4. Srednje vrijednosti nekih VolSurfovih deskriptora za kvercetin i njegove derivate.

Spoj	MW	NCC	DIFF	logP	PSA	HSA	SOLY	CACO2	PB	LgBB
KVERCETIN	302.2	0.0	0.8	2.1	128.6	271.8	-2.4	-0.9	68.6/ 50.6[a]	-3.0
ANIONI 4'-O^- i 7-O^- KVERCETINA	301.2	1.0	0.8	2.1	131.4	268.3	-2.2	-1.0	45.7	-2.8
KVINONI *o*- i *p*-	300.2	0.0	0.8	2.4	122.2	270.7	-3.3	-0.9	53.7	-2.2
METIL-ETERI	315.4	0.6	0.7	2.3	120.7	310.3	-2.8	-0.7	58.6	-2.4
SULFATI	380.3	1.5	0.6	0.3	176.7	289.4	-1.2	-1.6	32.3	-3.3
GLUKURONIDI	479.0	1.3	0.4	0.04	237.5	339.1	-2.4	-2.5	25.2	-4.2

[a] Prva/druga vrijednost je predviđena za strukturu kvercetina bez/s intramolekulske H-veze između dviju kateholnih grupa na prstenu B. Za varfarin, previđen PB% je bio 61.7%.

3.3. Molekulsko uklapanje varfarina i ostalih testnih spojeva u HSA

Utjecaj početnih konformacija i parc. at. naboja na rezultate molekulskog uklapanja AutoDockom je detaljno istražen na skupu testnih molekula liganada te na skupu kvercetina i njegovih derivata. Skup od 16 testnih molekula je uključivao i varfarin (*R*- i *S*-enantiomer) – ligand u strukturi HSA 2BXD, i *S*-naproksen – ligand u strukturi BSA 4OR0. Početne strukture testnih molekula liganada bile su pripremljene u tri programa: Marvin, CORINA i OB. Za strukture generirane programima Marvin i CORINA parc. at. naboji su bili izračunati programom Marvin, dok su za strukture iz programa OB parc. naboji bili izračunati AutoDockom.

3.3.1. Analiza rezultata

Prilikom analiziranja rezultata molekulskog uklapanja u grafičkom sučelju ADT i odabiru reprezentativnog načina vezanja promatranih molekula u SA korištena su dva kriterija. Prvi kriterij bio je energijski. Što je energija vezanja niža, način vezanja, položaj i interakcija vezne konformacije liganda u veznom mjestu su povoljniji. Drugi kriterij se temeljio na zastupljenosti (veličini klastera) previđenog načina vezanja u ukupnom broju generiranih veznih konformacija. Što je broj konformacija u klasteru za zadani RMSD veći, može se očekivati da je predviđeni način vezanja vjerojatniji. To se može razumjeti ako se uzme u obzir način na koji AD predviđa način vezanja. On koristi stohastičku metodu, što znači da pretražuje konformacijski prostor nasumično generirajući vezne konformacije liganda u VM (slika 5). Nasumičnim promjenama u konformaciji i položaju liganda, prevladavaju se energetske barijere i povećava vjerojatnost pronalaska globalnog minimuma. Može se pretpostaviti da je broj mogućih konformacija koje vode ka globalnom minimumu veći od broja konformacija koje vode nekom od lokalnih minimuma (Shortle i sur. 1998). Dakle, veličina klastera može se uzeti kao mjerilo vjerojatnosti da se pripadni vezni položaj i konformacija nalaze bliže globalnom minimumu, odnosno stvarnoj strukturi kompleksa.

Stoga je kao reprezentativan načina vezanja za svaki spoj općenito odabran onaj najzastupljeniji. Za većinu testnih molekula on je odgovarao prvom klasteru tj. načinu vezanja s najnižom predviđenom energijom vezanja. U slučajevima kada je razlika u broju konformacija najzastupljenijeg i energetski najpovoljnijeg načina vezanja bila mala, tada je kao reprezentativan odabran energetski najpovoljniji (tablica 5).

Tablica 5. Eksperimentalno određeni postotci vezanja testnih molekula na HSA (% HSA) i rezultati njihovog molekulskog uklapanja u PVM1 strukture HSA 2BXD, za početne 3D strukture određene s tri programa.

Testni spoj	Ionizacijsko stanje	% HSA[a]	Vezno mjesto u HSA[b]	Referenca za VM	Marvin	CORINA	OB
					E_v / kcal/mol [c]	E_v / kcal/mol [c]	E_v / kcal/mol [c]
***R*-varfarin**	anion	99.2	VM1	Petitpas i sur. 2001	-9.39 (89%; 2)	-9.32 (62%; 3)	-9.77 (*67%; 3)
***S*-varfarin**	anion		VM1	Petitpas i sur. 2001	-9.2 (73%; 3)	-8.73 (100%; 1)	-8.76 (46%; 4)
Indometacin	anion	99	VM1	Ghuman i sur. 2005	-9.26 (76%; 2)	-9.12 (92%; 4)	-9.09 (*80%; 4)
Piroksikam	anion	99.3	VM1	Trnavska i sur. 1984	-9.26 (68%; 4)	-9.29 (79%; 4)	-7.86 (*72%; 5)
Ciprofloksacin	amfipasko	44.9	VM1	Varshney i sur. 2014	-10.0 (100%; 1)	-9.94 (100%; 1)	-8.71 (100%; 1)
Trimetoprim	kation	44.0	VM1	Deng i sur. 2013	-7.13 (*46%; 11)	-7.22 (**27%; 14)	-7.12 (31%; 12)
Salicilna kiselina	anion	98.1	VM1 i VM3	Yang i sur. 2007	-5.17 (*91%; 3)	-5.17 (*49%; 5)	-4.87 (100%; 1)
***S*-oksazepam**	neutralno	99.4	VM2	Boudinot i sur. 1985	-7.88 (100%; 1)	-7.91 (100%; 1)	-7.42 (100%; 1)
***S*-oksazepam-glukuronid**	anion	96.2	VM2	Boudinot i sur. 1985	-11.38 (**15%; 20)	-10.02 (39%; 18)	-9.05 (45%; 11)
***R*-oksazepam-glukuronid**	anion	75.1	N/A		-11.38 (25%; 13)	-11.29 (49%; 10)	-8.84 (*54%; 12)
***R*-ketoprofen**	anion	99.9	VM2	Maciążek-Jurczyk 2014	-8.45 (**36%; 4)	-8.39 (51%; 7)	-8.2 (73%; 5)
***S*-ibuprofen**	anion	99	VM2	Sudlow i sur. 1976	-6.49 (83%; 4)	-6.37 (81%; 5)	-6.32 (94%; 4)
Karbamazepin	neutralno	75.0	VM2	Kim i sur. 2005	-7.59 (93%; 4)	-7.88 (100%; 1)	-6.98 (100%; 1)
***S*-naproksen**	anion	99.7	VM3	Lejon i sur. 2008	-7.63 (99%; 2)	-7.57 (96%; 2)	-7.37 (100%; 1)
Lidokain	kation	33.3	Procjep između domena 1 i 3	Hein i sur. 2010	-6.64 (**14%; 12)	-6.78 (30%; 10)	-5.83 (78%; 7)
Acetaminofen	neutralno	0			-5.1 (*83%; 7)	-5.04 (**24%; 12)	-4.73 (86%; 6)

[a] Iz Valko i sur. (2003). [b] Za oksazepam-*R*-glukuronid VM je nepoznato. [c] (Postotak veznih konformacija uključenih u dani klaster; ukupan broj predviđenih načina vezanja). *Načini vezanja koji ne odgovaraju energetski najpovoljnijem klasteru. **Kada je razlika u broju konformacija najzastupljenijeg i energetski najpovoljnijeg položaja bila mala, tada je kao reprezentativan odabran položaj s nižom energijom vezanja. Energije vezanja za najpovoljniji način vezanja su: -9.87 kcal/mol za OB *R*-varfarin; -9.18 kcal/mol za OB indometacin; -8.54 kcal/mol za OB piroksikam; -7.52 kcal/mol za Marvin trimetoprim; -5.93 kcal/mol za Marvin salicilnu kiselinu, -6.0 kcal/mol za CORINA salicilnu kiselinu; -10.17 kcal/mol za OB *R*-oksazepam-glukuronid, -5.49 kcal/mol za Marvin acetaminofen.

Energija vezanja najzastupljenijeg načina vezanja je uvijek bila uspoređena s onom najpovoljnijom prvog načina vezanja. Vrijednost od ~1 kcal/mol odabrana je kao prihvatljiva vrijednost razlike energija vezanja pri odabiru najzastupljenijeg klastera, jer je i) približno jednaka prosječnoj translacijskoj energiji pri 25^{o}C, ii) približno odgovara maksimalnoj razlici u energiji vezanja između energija vezanja predviđenih za tri ulazne konformacije svih 16 testnih spojeva te iii) ta je vrijednost u skladu s razlikom u predviđenim energijama vezanja za spojeve koji se jako i slabije vežu u VM1 (tablica 5).

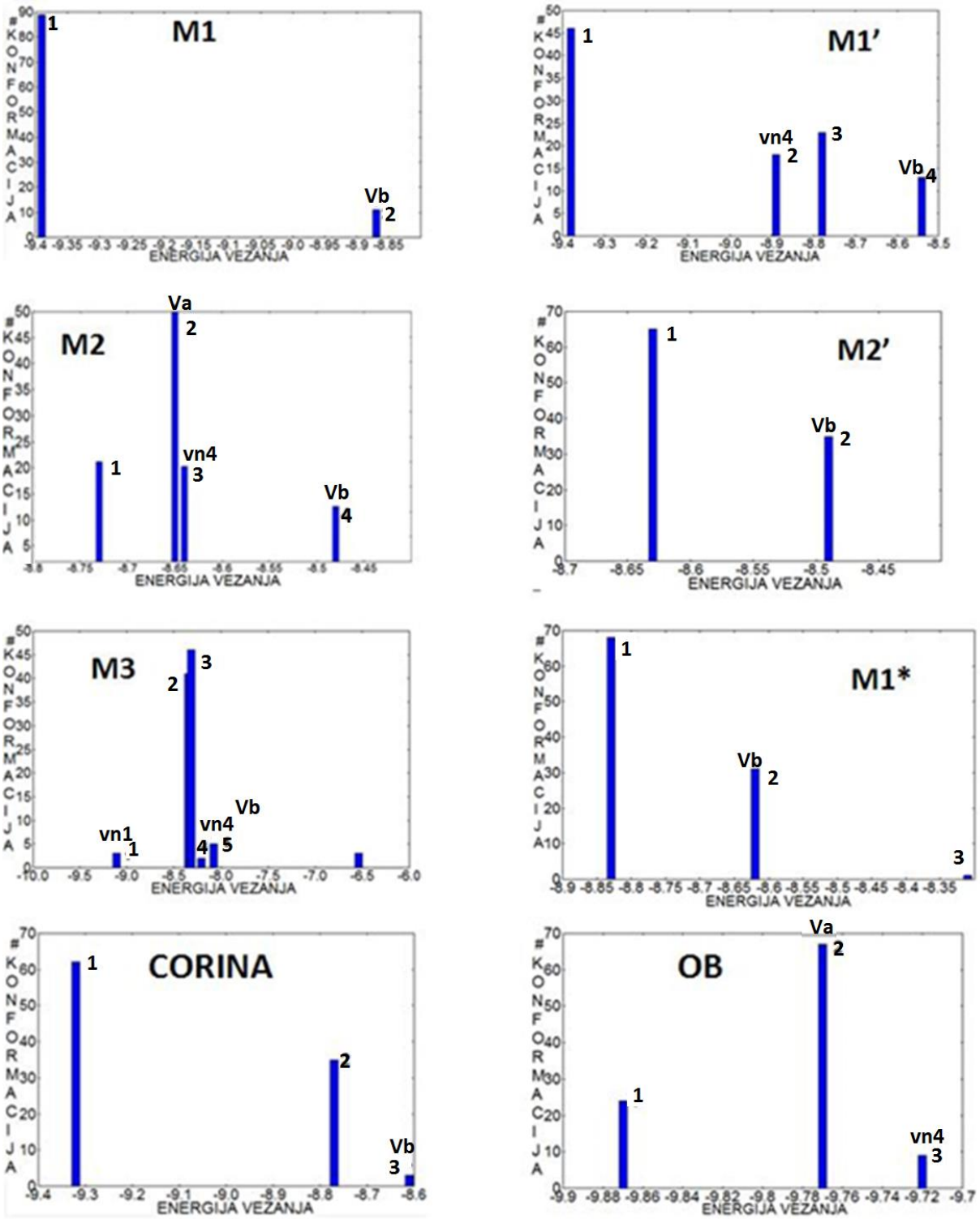
3.3.2. Utjecaj početnih struktura na rezultate molekulskog uklapanja za varfarin

Za *R*-varfarin je generirano 8 početnih konformacija (poglavlje 2.3.4.), 6 programom Marvin te po jedna programom CORINA (parc. at. naboji na atomima kisika (slika 10): O1,-0.25; O2,-0.43; O4,-0.36) i OB (O1,-0.27; O2,-0.26; O4,-0.29). Šest konformacija iz programa Marvin bile su: M1 (O1,-0.25; O2,-0.43; O4,-0.36) s negativnim nabojem "lokaliziranim" na atomu 4-O; M1' s inverznom orijentacijom supstituenata na 4-C atomu u odnosu na M1; M1* (O1,-0.27; O2,-0.26; O4,-0.19) s identičnom konformacijom kao M1, ali s Gasteigerovim nabojima izračunati u programu AD; M2 (O1,-0.14; O2,-0.25; O4,-0.29) s delokaliziranim negativnim nabojem definiranim ručnom aromatizacijom veza u pironskom prstenu prije optimiranja strukture; M2' – inverzna M2; M3 (O1,-0.15; O2,-0.25; O4,-0.28; H4,+0.28) - struktura neutralnog *R*-varfarina.

Strukture M1 te M1*, M2' i M3 imale su suprotnu orijentaciju fenilnog i 3-oksobutilnog supstituenta na *R*-ugljikovom atomu 11-C od one u kristalografskom varfarinu, dok su strukture M1' i M2 te one iz programa CORINA i OB imale istu orijentaciju, što je vidljivo iz vrijednosti RMSD pri usporedbi tih struktura (tablica 6).

Programi Marvin i CORINA generirali su planarne strukture s konjugiranom dvostrukom vezom C3=C4. Program OB je generirao strukturu s neplanarnim pironskim prstenom C i esterskom vezom, te lokaliziranom dvostrukom vezom C3=C4. Međutim, unatoč neplanarnosti i nearomatičnosti, predviđene duljine veza u pironskom dijelu strukture OB bile su najsličnije eksperimentalnim duljinama veza *R*-varfarina iz 2BXD.

Prema rezultatima molekulskog uklapanja za *R*-varfarin, broj generiranih klastera tj. predviđenih načina vezanja ovisio je o početnoj konformaciji tj. orijentaciji supstituenata na atomu 4-C, dok su predviđene energije vezanja ovisile uglavnom o ukupnom naboju i parc. at. nabojima (npr. M1 vs. M3, te M1 vs. M2') (slika 17).



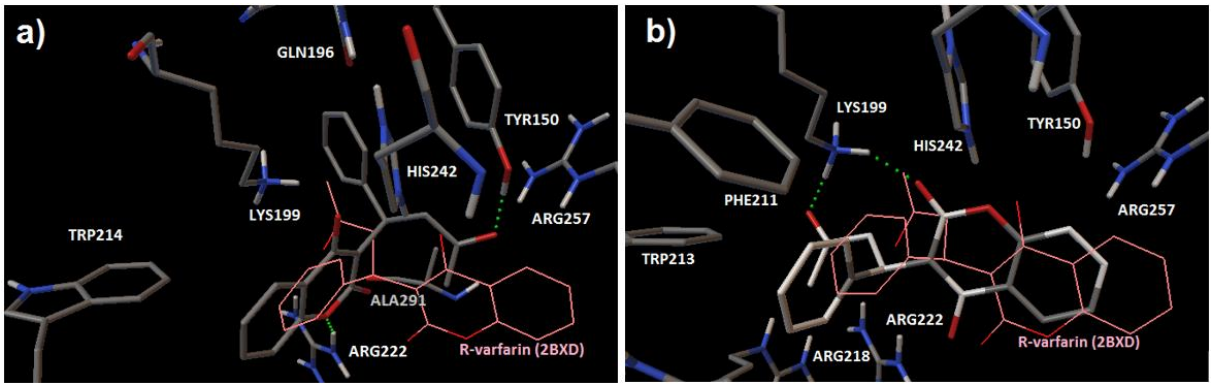
Slika 17. Raspodjela veznih konformacija i pripadne vezne energije za načine vezanja (klastere) predviđene uklapanjem početnih struktura *R*-varfarina iz programa Marvin: M1, M1', M2, M2', M3 i M1*, te programa CORINA i OB, u PVM1 HSA. Va i Vb su načini vezanja koji odgovaraju kristalografskom načinu vezanja varfarina, s istom ili suprotnom orijentacijom prstena A/C kao u strukturi 2BXD. vn1 i vn4 su označeni prema načinima vezanja predviđenim za neutralnu strukturu *R*-varfarina klasterima 1 i 4 (Slika 19).

Tablica 6. Usporedba sličnosti početnih konformacija izračunatih pomoću programa Marvin, CORINA i OB preko parametra RMSD (u Å) izračunatog programom PyMol.

Kalibracijska struktura	RMSD između dvije strukture		
	Marvin-OB	**Marvin-CORINA**	**CORINA-OB**
***R*-varfarin**	1.327	1.617	0.932
***S*-varfarin**	0.873	0.855	0.71
Indometacin	1.474	0.838	0.942
Piroksikam	0.575	1.300	1.377
Ciprofloksacin	0.446	0.633	0.382
Trimetoprim	1.646	0.603	1.466
Salicilna kiselina	0.032	0.028	0.027
***S*-oksazepam**	1.454	0.233	1.546
***S*-oksazepam-glukuronid**	1.197	2.546	2.589
***R*-oksazepam-glukuronid**	0.524	1.387	1.119
***R*-ketoprofen**	0.133	1.588	1.719
***S*-ibuprofen**	0.463	0.535	0.168
Karbamazepin	0.846	0.114	0.553
***S*-naproksen**	0.417	1.061	1.114
Lidokain	1.043	0.721	1.290
Acetaminofen	0.076	0.177	0.207

Za strukturu M1, način vezanja s najnižom energijom od -9.39 kcal/mol bio je ujedno i najnapučeniji s 89% svih veznih konformacija (slika 17). Međutim, razlikovao se značajno od kristalografskog načina vezanja (slike 6 i 18 a), s RMSD od 5.07 Å. U tom načinu vezanja varfarin je smješten na ulazu u VM1 i njegov negativno nabijeni atom 4-O^- ostvaruje vezu s pozivno nabijenom amonijevom skupinom NH_3^+ Lys199, dok laktonski kisikovi atomi ostvaruju H-veze s Arg222 i slabe interakcije s karbonilnom skupinom iz okosnice Ala291. 3-okso skupina tvori H-vezu s Tyr150.

Drugi način vezanja s veznom energijom -8.87 kcal/mol i 11% veznih konformacija (slika 17) te s RMSD u odnosu na kristalografski način vezanja 4.98 Å, položajem je odgovarao načinu vezanja u kristalografskoj strukturi 2BXD, ali je imao suprotnu orijentaciju kumarinskog prstena (slika 18 b). Takav način vezanja je u ovom diplomskog radu označen kao Vb. U načinu vezanja Vb, interakcija varfarina s OH grupom Tyr150 je ostvarena preko kisika 1-O umjesto kisika 4-O^- kao u strukturi 2BXD. Atom 4-O^- preferentno ostvaruje interakciju s imidazolnom skupinom Arg222, dok okso atomi ostvaruju H-veze s NH_3^+ skupinom Lys199.



Slika 18. Načini vezanja predviđeni uklapanjem strukture M1 u strukturu HSA 2BXD, koji odgovaraju a) prvom i b) drugom klasteru (Vb) veznih konformacija (slika 17). H-veze između aminokiselina i varfarina u veznom mjestu prikazane su zelenim točkama. *R*-varfarin iz kristalografske strukture 2BXD je označen ružičasto.

Za strukturu M2 su predviđena četiri načina vezanja (slika 17). Prvi je odgovarao jednakom načinu vezanja kao i u slučaju struktura M1 i M1' (slika 18 a). Međutim, zbog različitih vrijednosti parc. at. naboja u odnosu na strukture M1 i M1', njegova energija vezanja bila je nepovoljnija (-8.73 kcal/mol) i bio je zastupljen sa svega 20% generiranih konformacija (slika 17, tablica 7). Najzastupljeniji način vezanja za M2 bio je drugi klaster s 50% veznih konformacija i samo s $\Delta G \approx 0.1$ kcal/mol višom energijom vezanja u odnosu na prvi klaster. On je po smještaju i orijentaciji 2-kromanonske jezgre odgovarao kristalografskom načinu vezanja varfarina u strukturi kompleksa 2BXD i označen je kao Va u ovom radu.

Tablica 7. Doprinosi pojedinih članova (jednadžba 2) ukupnoj energiji vezanja (u kcal/mol), za načine vezanja predviđene za anionske ulazne strukture *R*-varfarina M1, M1*, M2 te neutralnu strukturu M3 u VM1 HSA.

Struktura	**M1**		**M1***		**M2**				**M3**	
Način vezanja	**1**	**2***	**1**	**2***	**1**	**2****	**3**	**4***	**2**	**3**
% zastupljenosti	**89**	**11**	**68**	**31**	**20**	**50**	**19**	**11**	**41**	**46**
energija vezanja	-9.39	-8.87	-8.83	-8.62	-8.73	-8.65	-8.64	-8.44	-8.35	-8.32
intermolekulska energija	-10.59	-10.06	-10.03	-9.81	-9.92	-9.84	-9.83	-9.68	-9.84	-9.81
vdw, desolv. i energija H-veza	-9.8	-9.38	-9.77	-9.5	-9.61	-9.26	-9.5	-9.33	-9.52	-9.5
elektrostatska energija	-0.79	-0.69	-0.26	-0.31	-0.32	-0.58	-0.33	-0.35	-0.33	-0.31

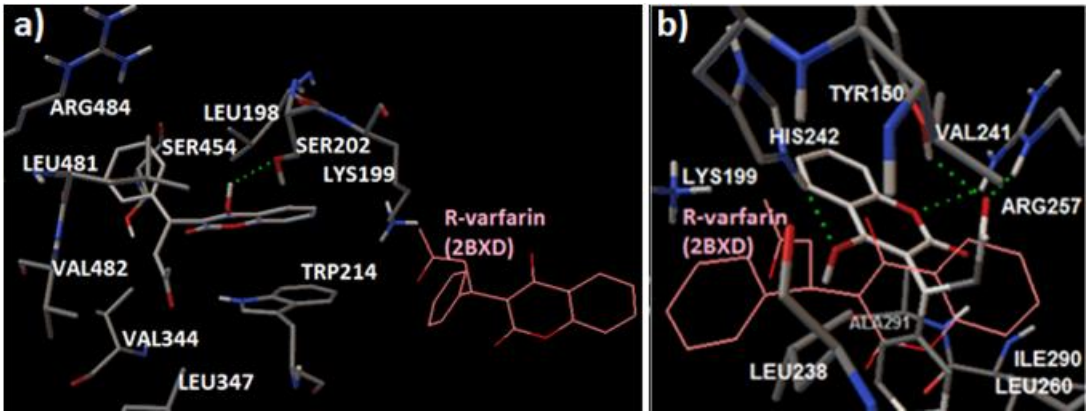
* Način vezanja koji položajem odgovara onom u kristalografskoj strukturi 2BXD (Vb)

** Način vezanja koji odgovara onom u kristalografskoj strukturi i orijentacijom kumarinskog prstena (Va)

Za neutralnu strukturu M3 dobiveni su različiti rezultati od onih za anionske strukture. Predviđeno je šest načina vezanja (slika 17). Kao energijski najpovoljnije mjesto vezanja (-9.11 kcal/mol), predviđen je središnji procjep između domena II i III ispred ulaza u VM1, u kojem varfarin ostvaruje π-π interakcije s Trp214, H-vezu sa Ser202 preko 4-OH, i niz van der Waalsovih interakcija s okolnim hidrofobnim aminokiselinama (slika 19 a). Taj način vezanja bio je zastupljen sa svega 3% veznih konformacija (slika 17). U ovom radu on je označen kao vn1.

Najzastupljeniji načini vezanja - drugi i treći, svaki s ~42% veznih konformacija, odgovarali su energijski najpovoljnijem načinu vezanja anionskih struktura. Međusobno su se razlikovali po smještaju supstituenata na atomu 11-C u VM1. No interakcije ostvarene u oba ova vezna načina bile su energijski ekvivalentne (tablica 7).

Četvrti način vezanja neutralnog varfarina M3, u kojem kromanonski atomi 1-O i 2-O tvore H-veze s Tyr150 i Arg257 i His242, 4-OH grupa H-vezu s His242 i fenilni prsten π-kationsku interakciju s Lys199 (slika 19 b), je u radu označen kao vn4. Iako je za neutralni varfarin predstavljen sa samo 2% veznih konformacija, on je određen kao način vezanja kvercetina u PVM1 albumina HSA (poglavlje 3.4.2.1.). Tek je način vezanja 5, sa svega 5% predviđenih veznih konformacija, odgovarao kristalografskom načinu vezanja varfarina s obrnutim položajem kromanonske jezgre, Vb, i imao je znatno nepovoljniju energiju vezanja od anionskih struktura.



Slika 19. Načini vezanja predviđeni uklapanjem strukture M3 u strukturu HSA 2BXD, koji odgovaraju a) prvom (vn1) i b) četvrtom klasteru veznih konformacija (vn4, slika 17).

Od svih početnih struktura izračunatih potpuno prema izvornim postavkama triju programa, kristalografski način vezanja jedino je bio reproduciran s početnom strukturom 4-O^- aniona generiranom programom OB i nabojima iz programa AD, unatoč nerealnoj neplanarnosti kumarinskog prstena te strukture. Prvi klaster (-9.87 kcal/mol) s 24% veznih konformacija (slika 17) odgovarao je analognom prvom veznom načinu predviđenom za ostale anionske strukture. Međutim, drugi način vezanja, koji je odgovarao potpuno onom kristalografskom, Va, bio je najzastupljeniji sa 67% svih veznih konformacija, i nestabilniji u odnosu na prvi klaster za samo 0.1 kcal/mol (slika 17).

Tri početne konformacije *S*-varfarina generirane različitim programima bile su međusobno sličnije nego u slučaju *R*-enantiomera, s vrijednostima RMSD manjim od 1 Å (tablica 6). U sve tri strukture orijentacija supstituenata na atomu 11-C odgovarala je onoj iz kristalografske strukture 2BXD. Sukladno tome, računima molekulskog uklapanja, za razliku od *R*-enantiomera, za sve tri početne anionske konformacije *S*-varfarina iz programa Marvin (analogna strukturi M1 *R*-varfarina), CORINA i OB, u najzastupljenijem načinu vezanja *S*-varfarin je bio vezan na mjesto kristalografskog varfarina u 2BXD na način Vb. Za početne konformacije iz programa Marvin i CORINA ovaj način vezanja bio je ujedno i energetski najpovoljniji. Za strukturu iz programa OB s neplanarnim pironskim prstenom, ovaj način vezanja bio je zastupljen s 46% konformacija i za samo 0.14 kcal/mol je bio nepovoljniji od energetski najpovoljnijeg načina vezanja, zastupljenog s 32% konformacija.

3.3.3 Utjecaj početnih struktura na rezultate molekulskog uklapanja ostalih testnih spojeva

Rezultati dobiveni molekulskim uklapanjem testnih molekula u strukturu ljudskog albumina 2BXD prikazani su u tablici 5.

Za većinu testnih spojeva, početne 3D konformacije izračunate s tri programa, bile su dosta slične (tablica 6). RMSD vrijednosti su bile općenito manje od 2 Å i rasle su s veličinom molekule. Koeficijent linearne korelacije srednje vrijednosti triju vrijednosti RMSD i relativne molekulske mase za skup od 16 spojeva iz tablice 6 je r= 0.75.

Za sve testne spojeve položaj vezanja predviđen uklapanjem u PVM1 je odgovarao varfarinskom mjestu vezanja VM1. Za većinu testnih molekula razlike u početnim konformacijama odrazile su se neznatno na vrijednosti energija vezanja i zastupljenost predviđenih načina vezanja (tablica 5). Dakle, predviđeni način vezanja je bio dosta neovisan o početnoj strukturi i izračunatim parc. at. nabojima. Međutim, u nekim slučajevima, npr. za piroksikam i ciprofloksacin, koji su se razlikovali u vrijednostima parc. at. naboja, posebno na heteroatomima (atomi O, N i S) izračunatim programom Marvin za strukture iz programa Marvin i CORINA ili programom AD za strukture iz programa OB, unatoč analognom načinu vezanja, procijenjene energije vezanja bile su značajno različite.

3.4. Molekulsko uklapanje kvercetina i njegovih metabolita u HSA

U ovom diplomskom radu, način i afinitet vezanja u PVM1 albumina određen je za kvercetin (K) i njegovih 29 derivata (slika 11): anione nastale deprotoniranjem 4'-OH ili 7-OH grupe (pH ≥ 7, K-4'-A i K-7-A) (Stepanić i sur. 2013), konačne produkte dvostruke oksidacije *orto* (o) i *para* (p) kvinone (K-*o*- i K-*p*-kvinon) (Amić i sur. 2014), najzastupljenije metabolite u krvi nastale metilacijom, sulfatacijom i glukuronidacijom te njihove deprotonirane oblike (Day i sur. 2001, Mullen i sur. 2006, Lee i sur. 2012). U skraćenom označavanju istraživanih molekula, naznačeno je mjesto supstitucije (slike 1 i 11) i deprotonacije (A - anion). Tako npr. K-3-OSulf-7-A označuje dvostruki anion kvercetina s negativno nabijenom SO_3^- grupom vezanom na atom 3-O i deprotoniranom 7-OH grupom, tj. s grupom 7-O^-. U skup je bio uključen i jedan hibridni metabolit K-3-OG-3'-OMe s glukuronskom grupom vezanom na atom 3-O i metilnom na atom 3'-O.

3.4.1 Utjecaj početnih konformacija i parcijalnih atomskih naboja na rezultate molekulskog uklapanja

Kao i za testne molekule, za svaku od navedenih molekula početna struktura je bila određena s tri programa. Za većinu molekula, početne strukture su bile međusobno slične (tablica 8). Prosječne vrijednosti RMSD za usporedbu struktura iz programa Marvin i CORINA, Marvin i OB te CORINA i OB bile su 0.851 Å, 0.624 Å tj. 0.842 Å. Najveće razlike, s RMSD većim od 2.0 Å, primijećene su za najveće proučavane metabolite - glukuronide. Preklapanjem struktura uočili smo da su se početne strukture najčešće međusobno razlikovale u jednoj od sljedećih karakteristika: i) smještaju fenilnog prstena B i 3'-OH skupine u odnosu na 4-kromanonski prsten A/C, tj. u veličini torzijskog kuta < (3-C,2-C, 1'-C, 2'-C) (slika 1), ii) prostornoj orijentaciji metaboličkih supstituenata te iii) planarnosti/neplanarnosti prstena A/C. Razlike (i) su bile najčešće . Razlike (ii) primijećene su između početnih struktura za velike konjugirane metabolite s intramolekulskim H-vezama - sulfate i glukuronide, i imale su najveći doprinos vrijednostima RMSD (tablica 8). Deformacija

pironskog prstena C (iii) uočena je najčešće za strukture generirane programom OB (tablica 8), slično kao i u slučaju varfarina. Međutim, prsten C je bio određen kao neplanaran i s preostala dva programa u slučaju kvinonskih derivata. Kako je u AutoDocku kriterij određivanja aromatičnosti prstena veličina torzijskog kuta koji određuje planarnost (maksimalno dopušteno odstupanje od planarnosti za aromatičnost je 7.5°), tip ugljikovih atoma u tim prstenovima bio je sp^3 hibridizirani.
Gasteigerovi naboji su za početne konformacije bili izračunati u različitim programima: (1) u programu Marvin za strukture iz programa Marvin i CORINA, (2) u programu OB za strukture iz tog programa, te, dodatno, (3) u programu AD za sve tri početne strukture.
U tablicama 9 i 10 navedeni su načini vezanja i pripadne energije vezanja za prvi klaster s najnižom predviđenom energijom vezanja i klaster predstavljen s najviše generiranih veznih konformacija dobiveni na šest načina.

Tablica 8. Usporedba sličnosti početnih konformacija izračunatih pomoću 3 programa: Marvin (M), CORINA (C) i OB preko parametra RMSD.

	RMSD među strukturama			nearomatičnost	
METABOLIT	**Marvin-OB**	**Marvin-CORINA**	**CORINA-OB**	**prsten C**	**prsten B**
kvercetin, K	0.439	0.434	0.634		
K-4'-A	0.442	0.439	0.63		
K-7-A	0.469	0.436	0.646		
K-o-kvinon	0.066	0.669	0.68	C	
K-p-kvinon	0.888	0.602	0.664	M,C,OB	M
Metil (Me)					
K-3'-O-Me	0.409	0.458	0.587		
K-3'-O-Me-3-A	0.392	0.613	0.42		
K-3'-O-Me-4'-A	0.42	0.463	0.148		
K-3'-O-Me-7-A	0.39	0.46	0.164		
K-3'-O-Me-p-kvinon	0.276	0.529	0.289	M,C,OB	M
K-4'-O-Me	0.577	0.614	0.12		
K-4'-O-Me-3-A	0.141	0.088	0.141		
K-4'-O-Me-7-A	0.611	0.095	0.644		
Sulfat (Sulf)					
K-3-O-Sulf	0.629	0.641	0.566	OB	
K-3-O-Sulf-4'-A	0.706	0.659	0.259	OB	
K-3-O-Sulf-7-A	0.674	0.656	0.577	OB	
K-3-O-Sulf-o-kvinon	0.651				
K-7-O-Sulf	0.429	0.079	0.398		
K-7-O-Sulf-o-kvinon	0.527	0.406	0.607	C	
K-7-O-Sulf-p-kvinon	0.475	0.734	0.658	C,OB	
K-3'-O-Sulf	0.855	0.53	1.155		
K-3'-O-Sulf-3-A	1.485	0.531	1.179		
K-3'-O-Sulf-4'-A	1.73	0.529	1.408		
K-3'-O-Sulf-7-A	0.353	0.53	0.619		
Glukuronid (G)					
K-3-OG	2.672	0.306	2.465	OB	
K-3-OG-4'-A	2.432	1.156	2.340	OB	
K-3-OG-7-A	1.792	2.252	1.471	OB	
K-3-OG-o-kvinon	1.216	0.396	1.402	C,OB	
K-4'-OG	1.878	0.735	1.667		
K-3-OG-3'-O-Me	1.497	2.051	1.877		

Tablica 9. Postotak veznih konformacija (% konf.), način i energija vezanja (Ev) za energetski najpovoljniji[a] i najzastupljeniji način vezanja[b] određeni s početnim konformacijama iz tri programa (prvi dio imena) i parc. at. nabojima iz dva programa (drugi dio imena).

	Marvin_Marvin						CORINA_Marvin						OB_OB					
	najpovoljniji			najzastupljeniji			najpovoljniji			najzastupljeniji			najpovoljniji			najzastupljeniji		
METABOLIT	% konf.	Način vezanja	E_v/ kcal/mol	% konf.	Način vezanja	E_v/ kcal/mol	% konf.	Način vezanja	E_v/ kcal/mol	% konf.	Način vezanja	E_v/ kcal/mol	% konf.	Način vezanja	E_v/ kcal/mol	% konf.	Način vezanja	E_v/ kcal/mol
kvercetin. K	13	vn1	-9.28	87	vn4	-8.39	4	vn1	-8.97	84	vn4	-8.13	3	vn1	-9.10	65	vn4	-8.12
K-4'-A	7	vn1	-9.05	61	Vb	-7.34	2	vn1	-8.62	69	Va	-7.97	2	vn1	-8.98	36	Va	-8.11
K-7-A	6	vn1	-8.53	37	vs/ob	-7.25	3	vn1	-7.81	56	vs/ob	-7.28	4	vn1	-8.63	29"	vs/ob	-7.37
K-o-kvinon	93	vn4	-8.3				6	vn1	-10.15	87	vn4	-7.96	5	vn1	-9.78	66	vn4	-8.17
K-p-kvinon	51	vn4	-8.62				50	vn4	-7.71				87	vn4*	-7.82			
Metilacija																		
K-3'-OMe	16	vn1	-9.78	22"	vn4	-7.97	4	vn1	-9.23	76	vn4	-8.11	3	vn1	-9.91	61	vn4	-7.94
K-3'-OMe-3-A	9	vn1	-9.79	17"	vn4	-8.39	84	vn4	-8.75				69	vn4	-8.57			
K-3'-OMe-4'-A	8	vn1	-9.48	51	Vb	-7.87	1	vn1	-9.41	36	Va	-8.25	1	vn1	-9.36	38	Va	-8.53
K-3'-OMe-7-A	14	vn1	-9.29	50	Vb	-6.92	2	vn1	-8.53	57	vs/ob	-7.34	3	vn1	-9.36	27	vs/ob	-7.07
K-3'-OMe-p-kvinon	67	vn4	-8.29				76	vn4*	-8.27				3	n	-7.98	50	Vb	-7.84
K-4'-OMe	13	vn1	-9.0	16"	vn4	-8.14	6	vn1	-9.37	56	vn4	-8.34	3	vn1	-9.56	35	vn4	-8.25
K-4'-OMe-3-A	83	vn4	-8.82				54	vn4	-8.78				4	vn1	-9.61	50	vn4	-8.86
K-4'-OMe-7-A	15	vn1	-9.2	27	vn4	-7.23	5	vn1	-8.81	28	Vb*	-7.13	2	vn1	-9.19	47	Va*	-7.34
Sulfatacija																		
K-3-OSulf	87	Vb	-9.25				97	Vb	-9.23				86	Vb	-9.49			
K-3-OSulf-4'-A	9	Vb*	-8.95	35	Vb	-8.61	16	Vn4*	-8.86	59	Vb	-8.62	20	Va	-9.17	33	Vb	-9.0
K-3-OSulf-7-A	75	Vb	-9.42				92	Vb	-9.35				89	Vb	-9.72			
K-3-OSulf-o-kvinon	16	vn4	-9.33	51	Vb	-8.74	-	-	-	-	-	-	1	n	-9.61	51	Vb	-8.94
K-7-OSulf	5	vs/ob*	-8.91	47	Vb	-8.38	2	vs/ob*	-9.20	52	vs/ob	-8.99	6	n*	-9.14	43	Vb	-8.32
K-7-OSulf-o-kvinon	30	Vb	-9.18	39	vs/ob	-8.2	96	Vb	-8.8				11	Vb	-9.22	31	vs/ob	-8.64
K-7-OSulf-p-kvinon	4	vs/ob*	-9.1	54	Vb	-8.16	54	Vb	-9.63				62	vs/ob	-9.26			
K-3'-OSulf	25	Va	-9.14				21	Va	-9.48	33	vn4	-9.01	25	Va	-9.46	32	vn4	-8.76
K-3'-OSulf-3-A	14	Va	-9.64	42	vn4	-9.27	15	Va	-9.76	31	vn4	-9.57	28	Va	-9.81			
K-3'-OSulf-4'-A	37	Vb	-9.81				51	Vb	-9.97				15	Va	-10.17	44	Vb	-9.8
K-3'-OSulf-7-A	39	Va	-8.84				34	Va	-9.11				30	Va	-9.1	44	Vb	-8.71
Glukuronidacija																		
K-3-OG	58	vn4	-9.74				5	Va	-9.75	50	vn4	-9.57	3	Va	-9.62	48	vn4	-9.41
K-3-OG-4'-A	51	vn4	-9.38				7	Va	-9.82	43	vn4	-9.43	19	Va	-10.09	61	vn4	-9.8
K-3-OG-7-A	26	Va	-9.63				18	Va	-9.38	24	vn4*	-7.66	15	Va	-10.03	30	vn4	-8.67
K-3-OG-o-kvinon	50	vn4	-10.3				11	Va	-10.43	46	vn4	-10.31	10	Va	-9.99	20	vn4*	-9.19
K-4'-OG	21	n	-8.02	28	vn4	-7.69	4	n*	-7.78	28	n*	-7.08	10	n	-8.3	15	Va	-6.74
K-3-OG-3'-OMe	25	vn4	-10.13				47	vn4	-10.13				24	Vb	-9.03			

[a] Za molekule za koje je prvi klaster s najnižom izračunatom energijom vezanja bio i najzastupljeniji, prikazani su rezultati samo za njega. [b] Načini vezanja Va, Vb, vn1 i vn4 su opisani kod slike 17, vs/ob je način vezanja predviđen za strukturu *S*-varfarina iz programa OB, a n način vezanja u središnjem procjepu, sličan načinu vezanja naproksena u strukturi BSA 4OR0 (slika 7). U slučaju kada je najzastupljeniji način izračunat s >1 kcal/mol višom energijom od najpovoljnije, naveden je, ako postoji, način vezanja zastupljen većim brojem konformacija od prvog, ali s energijom vezanja koja nije viša za >1 kcal/mol, te je označen s " u % konf. Najzastupljeniji položaji za iznimke označene s ": K-7-A(OB): 33%,Vb,-6.75 kcal/mol; K-3'-OMe(Marvin): 25%,vs/ob,-7.04 kcal/mol; K-3'-OMe-3A(Marvin): 20%,vs/ob,-7.55; K-4'-OMe(Marvin): 23%, Vb, -6.96 kcal/mol.

Tablica 10. Postotak veznih konformacija, način i energija vezanja za energetski najpovoljniji i najzastupljeniji načini vezanja određeni s početnim konformacijama iz tri programa (prvi dio imena) i parc. at. nabojima iz programa AD (drugi dio imena).

	Marvin_AD						CORINA_AD						OB_AD					
	najpovoljniji			najzastupljeniji			najpovoljniji			najzastupljeniji			najpovoljniji			najzastupljeniji		
METABOLIT	% konf.	Način vezanja	E_v/ kcal/mol	% konf.	Način vezanja	E_v/ kcal/mol	% konf.	Način vezanja	E_v/ kcal/mol	% konf.	Način vezanja	E_v/ kcal/mol	% konf.	Način vezanja	E_v/ kcal/mol	% konf.	Način vezanja	E_v/ kcal/mol
kvercetin. K	7	vn1	-8.09	66	vn4	-7.21	2	vn1	-7.81	71	vn4	-7.25	6	vn1	-8.2	53	vn4	-7.24
K-4'-A	13	vn1	-8.68	82	vn4	-7.37	4	vn1	-8.49	86	vn4	-7.44	3	vn1	-8.61	70	vn4	-7.19
K-7-A	5	vn1	-8.08	79	vn4	-7.63	5	vn1	-7.98	75	vn4	-7.62	5	vn1	-7.95	43	vn4	-7.46
K-o-kvinon	1	vn1	-8.96	74	vn4	-7.54	7	vn1	-9.33	89	vn4	-7.33	2	vn1	-8.97	71	vn4	-7.55
K-p-kvinon	68	vn4	-7.98				30	vn4	-7.35	39	vn4*	-6.8	68	vn4*	-7.19			
Metilacija																		
K-3'-OMe	1	vn1	-8.06	57	vn4	-7.27	3	vn1	-8.48	81	vn4	-7.38	1	vn1	-8.91	34	vn4	-7.1
K-3'-OMe-3-A	1	vn1	-9.32	81	vn4	-7.83	2	vn1	-9.2	76	vn4	-7.9	3	vn1	-9.45	60	vn4	-7.63
K-3'-OMe-4'-A	3	vn1	-9.36	72	vn4	-7.94	2	vn1	-9.3	92	vn4	-8.04	4	vn1	-9.32	70	vn4	-7.82
K-3'-OMe-7-A	14	vn1	-8.76	19"	vn4	-7.58	2	vn1	-8.6	73	vn4	-7.52	2	vn1	-8.69	51	vn4	-7.35
K-3'-OMe-p-kvinon	65	vn4	-7.71				70	vn4*	-7.67				54	Vb	-7.33			
K-4'-OMe	3	vn1	-8.55	27"	vn4	-7.43	41	vn4	-7.46				3	vn1	-8.53	22"	vn4	-7.32
K-4'-OMe-3-A	2	vn1	-8.26	43	vn4	-7.94	4	vn1	-8.46	39	vn4	-7.94	4	vn1	-9.25	46	vn4	-7.91
K-4'-OMe-7-A	31	vn4	-7.72				3	vn1	-8.36	42	vn4	-7.71	7	vn1	-8.54	29	vn4	-7.39
Sulfatacija																		
K-3-OSulf	81	Vb	-8.47				85	Vb	-8.48				94	Vb	-8.72			
K-3-OSulf-4'-A	13	n*	-8.91	60	Vb	-8.5	10	n*	-8.69	60	Vb	-8.5	6	n*	-9.02	78	Vb	-8.54
K-3-OSulf-7-A	88	Vb	-8.96				91	Vb	-9.09				91	Vb	-8.91			
K-3-OSulf-o-kvinon	5	n*	-8.66	61	Vb	-8.24							9	n*	-9.11	84	Vb	-8.37
K-7-OSulf	31	vs/ob	-8.24	39	vs/ob*	-7.73	12	vs/ob	-8.63	45	vs/ob*	-7.65	13	n*	-7.88	19"	vs/ob	-7.44
K-7-OSulf-o-kvinon	53	vs/ob*	-8.65				2	vs/ob	-8.64	64	vs/ob*	-7.8	60	vs/ob	-8.34			
K-7-OSulf-p-kvinon	13	vs/ob	-8.75	67	vs/ob*	-8.29	100	vs/ob	-9.08				97	vs/ob	-8.8			
K-3'-OSulf	47	Va	-8.54				31	Va	-8.71	44	Vb	-8.39	39	Va	-8.9			
K-3'-OSulf-3-A	40	Va	-9.12				18	Va	-9.19	50	Vb	-8.85	69	Va	-9.14			
K-3'-OSulf-4'-A	52	Va	-9.25				25	Va	-9.21	59	Vb	-8.97	22	Va	-9.3	54	Vb	-8.78
K-3'-OSulf-7-A	45	Va	-8.93				36	Va	-9.54	39	Vb	-8.39	34	Va	-9.38	46	Vb	-8.35
Glukuronidacija																		
K-3-OG	15	Va	-9.15	37	vn4	-8.11	39	vn4	-8.45				3	Va	-8.25	36	vn4	-8.23
K-3-OG-4'-A	50	vn4	-9.11				10	Va	-9.34	40	vn4	-9.07	46	vn4	-9.39			
K-3-OG-7-A	21	Va	-9.47	34	vn4	-8.51	42	vn4	-8.61				17	Va	-9.61	56	vn4	-8.96
K-3-OG-o-kvinon	27	Va	-10.06	29	vn4	-9.05	6	Va	-9.53	47	vn4	-9.41	7	Va	-9.53	13"	n*	-8.95
K-4'-OG	6	Vb	-6.84	15"	n	-6.33	9		-6.6	26		-6.07	16	n*	-7.53			
K-3-OG-3'-OMe	36	vn4	-9.15				7	Va	-9.05	44	vn4	-8.96	36	Vb	-8.15			

Oznake kao u tablici 9. Najzastupljeniji položaji za iznimke označene s " : K-3'-OMe-7-A(Marvin): 26%,Va,-7.26 kcal/mol; K-4'-OMe(Marvin): 40%,Vb,-6.59 kcal/mol; K-4'O-Glukuronid(Marvin): 18%, preko ulaza s glukuronskom skupinom u VM1, -6.04 kcal/mol; K-4'-OMe(OB): 37%, Vb, -6.69 kcal/mol; K-7-OSulf(OB): 38%, vs/ob*, -7.29 kcal/mol; K-3O-G-*o*-kvinon(OB): 19%, vn4*, -8.32 kcal/mol.

U tablici 11 prikazani su pripadni deskriptivni statistički parametri. U slučaju kad je naboj bio izračunat AutoDockom, najveće razlike u energijama vezanja za razne početne strukture bile su manje nego kad su parc. at. naboji bili određeni na različite načine. Također su prosječne razlike između energija vezanja prvog i najzastupljenijeg klastera bile manje kad su naboji izračunati AutoDockom. Općenito su medijan i prosječne vrijednosti razlika u energijama bile oko 1 kcal/mol. Za strukture iz Marvina s parc. at. nabojima iz AutoDocka, prosječna vrijednost razlika je iznosila -0.84 kcal/mol, i maksimalne vrijednosti od -1.49 kcal/mol i -1.41 kcal/mol su bile opažene za anione kvercetina metiliranog na položaju 3'-O: K-3'-OMe-3-A tj. K-3'-OMe-4'-A i bile su najmanje maksimalne razlike između šest upotrijebljenih pristupa.

Tablica 11. Maksimalne vrijednosti te medijan i prosječne vrijednosti razlika u energijama vezanja između prvog klastera i klastera s najvećim brojem predviđenih veznih konformacija, za tri početne konformacije (prvi dio imena stupca) i razne parc. at. naboje (program s kojim je naboj izračunat je dan u drugom dijelu imena stupca).

Molekula	Marvin_Marvin	CORINA_Marvin	OB_OB	Marvin_AD	CORINA_AD	OB_AD
Maks. razlika	-2.37	-2.19	-2.29	-1.49	-2	-1.81
Medijan	-0.96	-0.68	-0.82	-0.79	-0.56	-1.00
Prosjek	-1.12	-0.81	-0.95	-0.84	-0.71	-0.95

U tablicama 12 i 13 uspoređeni su parametri molekulskog uklapanja za šest primijenjenih inačica molekulskog uklapanja za načine vezanja koji su odabrani kao reprezentativni za promatrane molekule. Odabir reprezentativnog načina uklapanja bio je analogan onome određenom na testnim molekulama (poglavlje 3.3.1). Za većinu molekula najzastupljeniji način vezanja, ukoliko nije bio energijski najpovoljniji, odgovarao je sljedećem, tj. drugom klasteru po energiji kad su parc. naboji bili određeni AutoDockom (tablica 13). U slučaju kad su naboji bili izračunati programom Marvin ili OB, dobiveni su neujednačeniji rezultati (tablica 12). Tako npr. za anion 7-O^- kvercetina (K-7-A), predviđen način vezanja sa svakom od tri početne konformacije i nabojima iz programa AD je bio isti (tzv. vn4) i sa sličnom energijom vezanja, odgovarao je drugom klasteru i imao je najviše za 0.5 kcal/mol višu energiju od prvog klastera (tablica 13). Međutim, kad je naboj bio izračunat s programima Marvin ili OB, najzastupljeniji klaster je bio treći za strukture iz programa Marvin i CORINA i sedmi za strukturu iz programa OB, dok je predviđena energija vezanja bila veća od najpovoljnije u prosjeku za više od 1 kcal/mol (tablica 12).

Kako bi se procijenilo slaganje između rezultata dobivenih sa šest različitih inačica uklapanja, izračunati su koeficijenti linearne korelacije između ukupnog broja predviđenih klastera, napućenosti najzastupljenijeg klastera i njihovih veznih energija (Ev) (tablica 14). Linearne korelacije opažene su između parametara dobivenih sa svih šest pristupa. Međutim, slaganje je bilo najbolje između tri pristupa koji su koristili isti algoritam za izračunavanje Gasteigerovih parc. at. naboja, tj. onaj iz AutoDocka.

Tablica 12. Ukupni broj određenih načina vezanja, tj. klastera, te redni broj, postotak veznih konformacija i energija vezanja za reprezentativni način vezanja određen s početnim konformacijama iz tri programa.

PAN iz M/OB	broj klastera			red, br, najvećeg			% konf, najvećeg			Ev (kcal/mol) najvećeg		
METABOLIT	M	C	OB	M	C	OB	M	C	OB	M	C	OB
kvercetin, K	2	7	11	2	2	2	87	84	65	-8,39	-8,13	-8,12
K-4'-A	4	8	7	3	2	2	61	69	36	-7,34	-7,97	-8,11
K-7-A	7	7	9	3	3	7	37	56	33	-7,25	-7,28	-6,75
K-o-kvinon	4	6	12	1	2	2	93	87	66	-8,3	-7,96	-8,17
K-p-kvinon	3	5	4	1	1	1	51	50	87	-8,62	-7,71	-7,82
K-3'-OMe	10	6	13	3	2	2	25	76	61	-7,04	-8,11	-7,94
K-3'-OMe-3-A	10	8	9	5	1	1	20	84	69	-7,55	-8,75	-8,57
K-3'-OMe-4'-A	7	8	10	3	2	2	51	36	38	-7,87	-8,25	-8,53
K-3'-OMe-7-A	10	13	16	3	3	4	50	57	27	-6,92	-7,34	-7,07
K-3'-OMe-p-kvinon	9	5	6	1	1	3	67	76	50	-8,29	-8,27	-7,84
K-4'-OMe	11	9	13	5	2	2	23	56	35	-6,96	-8,34	-8,25
K-4'-OMe-3-A	6	7	8	1	1	2	83	54	50	-8,82	-8,78	-8,86
K-4'-OMe-7-A	14	18	17	2	6	5	27	28	47	-7,23	-7,13	-7,34
K-3-OSulf	10	4	5	1	1	1	87	97	86	-9,25	-9,23	-9,49
K-3-OSulf-4'-A	8	8	9	3	2	2	35	59	33	-8,61	-8,62	-9
K-3-OSulf-7-A	6	4	3	1	1	1	75	92	89	-9,42	-9,35	-9,72
K-3-OSulf-o-kvinon	9	-	11	5	-	4	51	-	51	-8,74	-	-8,94
K-7-OSulf	11	8	11	5	2	5	47	52	43	-8,38	-8,99	-8,32
K-7-OSulf-o-kvinon	9	2	16	5	1	4	39	96	31	-8,2	-8,8	-8,64
K-7-OSulf-p-kvinon	5	2	3	3	1	1	54	54	62	-8,16	-9,09	-9,26
K-3'-OSulf	9	11	7	1	2	2	25	33	32	-9,14	-9,01	-8,76
K-3'-OSulf-3-A	10	7	9	3	2	1	42	31	28	-9,27	-9,57	-9,81
K-3'-OSulf-4'-A	9	8	10	1	1	2	37	51	44	-9,81	-9,97	-9,8
K-3'-OSulf-7-A	15	15	11	1	1	2	39	34	44	-8,84	-9,11	-8,71
K-3-OG	10	13	22	1	2	2	58	50	48	-9,74	-9,57	-9,41
K-3-OG-4'-A	11	15	12	1	2	2	51	43	61	-9,38	-9,43	-9,8
K-3-OG-7-A	17	23	19	1	5	2	26	24	30	-9,63	-7,66	-8,67
K-3-OG-o-kvinon	13	13	15	1	2	5	50	46	20	-10,3	-10,31	-9,19
K-4'-OG	18	23	24	2	6	8	28	28	15	-7,69	-7,08	-6,74
K-3-OG-3'-OMe	22	20	21	1	1	1	25	47	24	-10,13	-10,31	-9,03

Izračunati parc. at. naboji su imali značajan utjecaj na rezultate molekulskog uklapanja AutoDockom, značajniji nego li početne konformacije. Iako su u većini slučajeva početne konformacije metabolita izračunate s tri programa bile međusobno slične (tablica 8), parc. at. naboji izračunati s različitim programima su bili međusobno različiti, naročito za anione. U skladu s tim su predviđeni načini vezanja za tri početne strukture bili znatno ujednačeniji kada su naboji izračunati istim algoritmom, onim iz AutoDocka (tablica 10 (tj. tablica 13) u odnosu na one prikazane u tablici 9 (tj. tablici 12)). Parcijalni atomski naboji su utjecali na ukupan broj predviđenih načina vezanja, redni broj najzastupljenijeg klastera i na vezne energije. Tako je npr. za početne konformacije generirane programom Marvin, broj predviđenih načina vezanja uglavnom bio veći s nabojima izračunatim AutoDockom, i predviđene energije vezanja, Ev, su bile nešto pozitivnije s tim nabojima.

Tablica 13. Ukupni broj određenih načina vezanja, tj. klastera, te redni broj, postotak veznih konformacija i energija vezanja za reprezentativni način vezanja određen s početnim konformacijama iz tri programa.

PAN iz AD	broj klastera			red, br, najvećeg			% konf, najvećeg			Ev (kcal/mol) najvećeg		
METABOLIT	**M**	**C**	**OB**	**M**	**C**	**OB**	**M**	**C**	**OB**	**M**	**C**	**OB**
kvercetin, K	7	8	15	2	2	2	66	71	53	-7,21	-7,25	-7,24
K-4'-A	6	7	11	2	2	2	82	86	70	-7,37	-7,44	-7,19
K-7-A	6	9	13	2	2	2	79	75	43	-7,63	-7,62	-7,46
K-o-kvinon	11	5	12	2	3	2	74	89	71	-7,54	-7,33	-7,55
K-p-kvinon	4	4	4	1	2	1	68	39	68	-7,98	-6,80	-7,19
K-3'-OMe	14	8	18	2	2	2	57	81	34	-7,27	-7,38	-7,10
K-3'-OMe-3-A	9	9	12	2	2	2	81	76	60	-7,83	-7,90	-7,63
K-3'-OMe-4'-A	14	6	12	2	2	2	72	92	70	-7,94	-8,04	-7,82
K-3'-OMe-7-A	14	10	15	3	2	2	26	73	51	-7,26	-7,52	-7,35
K-3'-OMe-p-kvinon	9	4	6	1	1	1	65	70	54	-7,71	-7,67	-7,33
K-4'-OMe	13	11	15	5	1	6	40	41	37	-6,59	-7,46	-6,69
K-4'-OMe-3-A	8	11	9	2	2	2	43	39	46	-7,94	-7,94	-7,91
K-4'-OMe-7-A	13	9	12	1	2	2	31	42	29	-7,72	-7,71	-7,39
K-3-OSulf	5	5	4	1	1	1	81	85	94	-8,47	-8,48	-8,72
K-3-OSulf-4'-A	7	7	7	2	2	2	60	60	78	-8,50	-8,50	-8,54
K-3-OSulf-7-A	6	5	4	1	1	1	88	91	91	-8,96	-9,09	-8,91
K-3-OSulf-o-kvinon	9	-	7	5	-	2	61	-	84	-8,24	-	-8,37
K-7-OSulf	9	9	12	3	3	4	39	45	38	-7,73	-7,65	-7,29
K-7-OSulf-o-kvinon	8	6	10	1	5	1	53	64	60	-8,65	-7,80	-8,34
K-7-OSulf-p-kvinon	6	1	3	2	1	1	67	100	97	-8,29	-9,08	-8,80
K-3'-OSulf	8	9	6	1	2	1	47	44	39	-8,54	-8,39	-8,90
K-3'-OSulf-3-A	11	6	8	1	2	1	40	50	69	-9,12	-8,85	-9,14
K-3'-OSulf-4'-A	9	5	8	1	2	2	52	59	54	-9,25	-8,97	-8,78
K-3'-OSulf-7-A	11	6	7	1	3	3	45	39	46	-8,93	-8,39	-8,35
K-3-OG	18	17	27	2	1	2	37	39	36	-8,11	-8,45	-8,23
K-3-OG-4'-A	14	16	18	1	2	1	50	40	46	-9,11	-9,07	-9,39
K-3-OG-7-A	18	15	16	2	1	2	34	42	56	-8,51	-8,61	-8,96
K-3-OG-o-kvinon	12	12	20	2	2	4	29	47	19	-9,05	-9,41	-8,32
K-4'-OG	23	21	24	7	7	1	18	26	16	-6,04	-6,07	-7,53
K-3-OG-3'-OMe	21	21	28	1	2	1	36	44	36	-9,15	-8,96	-8,15

Razlike između energija vezanja za reprezentativne načine vezanja (tablice 12 i 13), kao i razlike u energiji prvog i najzastupljenijeg klastera (tablice 9 i 10) nisu, međutim, korelirale (nisu prikazani rezultati) s razlikama u početnim strukturama tj. vrijednostima RMSD (tablica 8). Veća razlika u početnim strukturama nije značila i veću razliku u predviđenim rezultatima, tj. načinu vezanja i energijama vezanja s različitim pristupima.

Tablica 14. Koeficijenti linearne korelacije (*R*) između broja klastera (Num), % veznih konformacija u najzastupljenijem klasteru (%Max) i njegove vezne energije (Ev) za šest načina molekulskog uklapanja. U donjoj tablici su dane prosječne vrijednosti tih parametre za svaki od šest pristupa.

	Num_M_AD	Num_C_AD	Num_OB_AD	%Max_M_AD	%Max_C_AD	%Max_OB_AD	Ev_M_AD	Ev_C_AD	Ev_OB_AD	Num_M_M	Num_C_M	Num_OB_OB	%Max_M_M	%Max_C_M	%Max_OB_OB	Ev_M_M	Ev_C_M	Ev_OB_OB
Num_M_AD	1.00	0.82	0.83	-0.70	-0.47	-0.61	0.17	0.06	0.01	0.77	0.81	0.88	-0.42	-0.51	-0.53	-0.10	0.03	0.14
Num_C_AD			0.88	-0.63	-0.63	-0.68	0.13	0.04	-0.01	0.70	0.81	0.81	-0.35	-0.43	-0.48	-0.21	-0.05	0.11
Num_OB_AD				-0.55	-0.39	-0.69	0.22	0.10	0.19	0.57	0.66	0.87	-0.28	-0.26	-0.46	-0.09	-0.04	0.17
%Max_M_AD				1.00	0.77	0.72	-0.05	-0.01	0.03	-0.68	-0.71	-0.74	0.43	0.66	0.67	0.15	0.04	-0.12
%Max_C_AD						0.69	0.05	-0.07	0.06	-0.56	-0.64	-0.53	0.41	0.64	0.41	0.31	0.09	-0.03
%Max_OB_AD							-0.28	-0.25	-0.33	-0.56	-0.62	-0.69	0.46	0.47	0.56	-0.05	-0.09	-0.39
Ev_M_AD							1.00	0.88	0.82	-0.14	0.05	0.20	0.00	0.09	-0.07	0.79	0.76	0.79
Ev_C_AD								1.00	0.80	-0.18	0.01	0.16	0.01	0.12	0.00	0.71	0.80	0.84
Ev_OB_AD									1.00	-0.17	-0.08	0.11	-0.01	0.19	-0.01	0.73	0.60	0.78
Num_M_M										1.00	0.80	0.70	-0.60	-0.50	-0.53	-0.25	-0.17	0.02
Num_C_M											1.00	0.77	-0.47	-0.69	-0.53	-0.18	0.12	0.19
Num_OB_OB												1.00	-0.40	-0.37	-0.59	-0.05	0.10	0.25
%Max_M_M													1.00	0.52	0.53	-0.17	-0.07	-0.18
%Max_C_M														1.00	0.56	0.16	-0.05	-0.07
%Max_OB_OB															1.00	-0.03	-0.03	-0.23
Ev_M_M																1.00	0.77	0.75
Ev_C_M																	1.00	0.87
Ev_OB_PB																		1.00

	Num_M_AD	Num_C_AD	Num_OB_AD	%Max_M_AD	%Max_C_AD	%Max_OB_AD	Ev_M_AD	Ev_C_AD	Ev_OB_AD	Num_M_M	Num_C_M	Num_OB_OB	%Max_M_M	%Max_C_M	%Max_OB_OB	Ev_M_M	Ev_C_M	Ev_OB_PB
average	10.83	9.03	12.28	53.79	60.31	53.83	-8.08	-8.06	-8.01	9.66	9.76	11.45	48.03	56.90	46.69	-8.50	-8.62	-8.54
sd	4.80	4.92	6.66	19.42	21.03	20.81	0.81	0.78	0.74	4.53	5.74	5.53	21.26	21.68	20.06	0.99	0.91	0.88
min	4.00	1.00	3.00	18.00	26.00	16.00	-9.25	-9.41	-9.39	2.00	2.00	3.00	20.00	24.00	15.00	-10.30	-10.31	-9.81
max	23.00	21.00	28.00	88.00	100.00	97.00	-6.04	-6.07	-6.69	22.00	23.00	24.00	93.00	97.00	89.00	-6.92	-7.08	-6.74

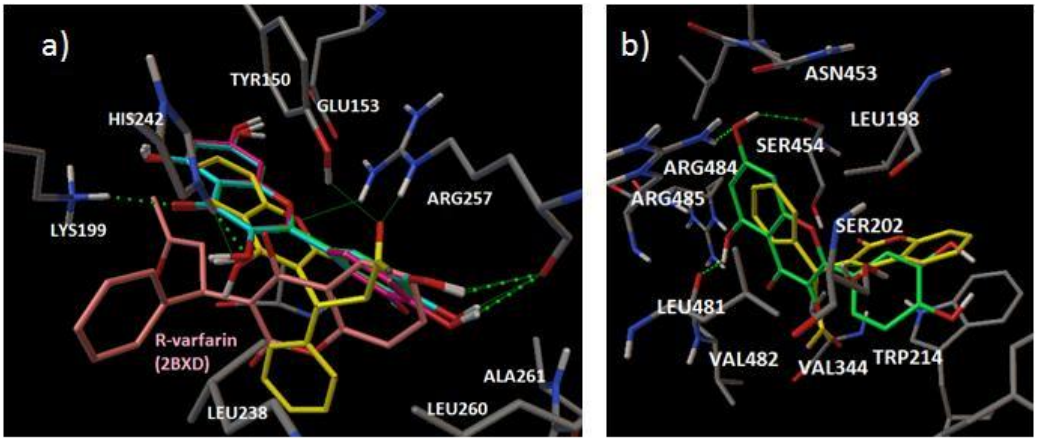
Ova detaljna studija utjecaja početnih struktura i parc. at. naboja na rezultate molekulskog uklapanja AutoDockom pokazala je da način vezanja predviđen ovim stohastičkim programom ovisi manje o početnoj konformaciji, a više o nabojima. U analizi utjecaja metaboličkih transformacija na vezanje kvercetina na albumin u sljedećem poglavlju, upotrijebljeni su uglavnom rezultati određeni s konformacijama iz programa Marvin i parc. at. nabojima iz AutoDocka. Međutim, ukoliko najzastupljeniji način vezanja nije bio dominantan (tj. zastupljen s puno više veznih konformacija od ostalih načina vezanja, i njegova vezna energija je bila dosta nepovoljnija od prvog načina vezanja), analizirani su i rezultati dobiveni drugim pristupima. Upotreba raznih početnih konformacija i parc. at. naboja je omogućila da se vjerodostojnije istraži utjecaj metaboličkih transformacija na vezanje kvercetina na glavni nosač spojeva u krvi, albumin.

3.4.2. Učinak metaboličkih transformacija na vezanje kvercetina na HSA

Eksperimentalno određeno vezanje varfarina u VM1 kao aniona reproducirano je molekulskim uklapanjem na područje PVM1 strukture 2BXD (poglavlje 3.3.2.). Zbog strukturne sličnosti kvercetina i varfarina, pretpostavljeno je da se kvercetin i njegovi metaboliti, barem oni slične veličine, vežu u isto vezno mjesto, VM1, kao i varfarin. Stoga je molekulsko uklapanje kvercetina i njegovih metabolita provedeno na analogan način kao i za varfarin (i testne spojeve) u prošireno varfarinsko vezno mjesto PVM1.

3.4.2.1. Vezanje kvercetina

Za neutralni kvercetin, molekulskim uklapanjem sa svih šest inačica, tj. bez obzira na početnu konformaciju i parc. at. naboje, predviđen je jednak način vezanja. On je ujedno bio i najzastupljeniji način vezanja (53%-87% veznih konformacija), koji je za nešto manje od 1 kcal/mol bio nepovoljniji od prvog energetski najpovoljnijeg veznog načina (tablice 9 i 10). S obzirom na *R*-varfarin, ovaj način vezanja odgovarao je veznom načinu 4 (vn4) njegove neutralne strukture M3 (slika 19).



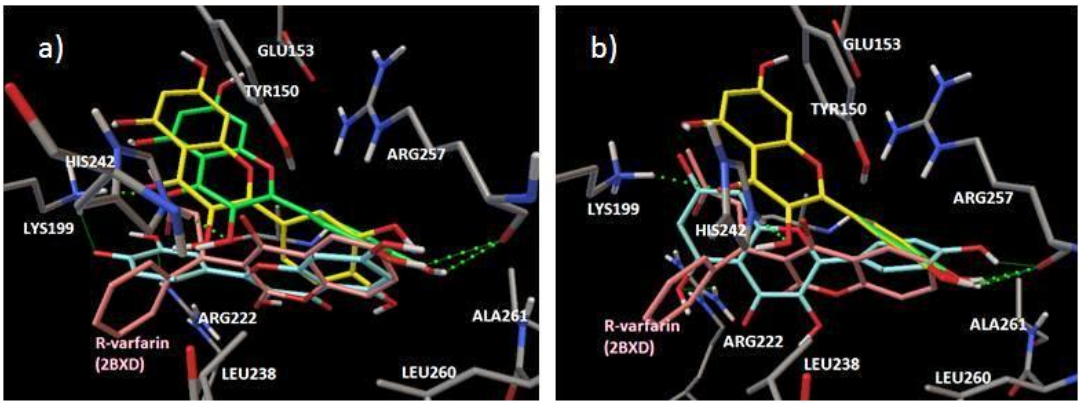
Slika 20. Predviđeni načini vezanja u strukturu HSA 2BXD za neutralni kvercetin. a) vn4 s početnim strukturama iz tri programa: M-zelena, CORINA-tamno ružičasta, OB-cijan. b) vn1 s početnom strukturom iz programa Marvin. *R*-varfarin u kristalografskoj strukturi 2BXD prikazan je ružičasto, a u vn4 i vn1 žuto.

U načinu vezanja vn4 kvercetin stvara interakcije s istim aminokiselinskim ostacima kao i *R*-varfarin (slike 19 b i 20 a). Svojim kromanonskim 1-O atomom tvori H-veze s Arg257 smještenim u stražnjem dijelu VM1, a keto atomom 4-O i hidroksilnim atomom 5-O tvori H-veze s Lys199 smještenim na ulazu u VM1. 3-OH grupa tvori H-vezu s His242 u središnjem

dijelu VM1. Dodatno, grupa 7-OH ostvaruje interakcije s aminokiselinama Ser192 te Glu153 i His288 iz gornjeg dijela VM1. Kateholne skupine 3'-OH i 4'-OH na fenilnom prstenu B neutralnog kvercetina ostvaruju H-veze s karbonilnim kisikom iz okosnice Arg257, a prsten B π-kation interakciju s gvanidinskom grupom iste aminokiseline.
Za neutralni kvercetin, energetski najpovoljniji način vezanja, označen kao vn1 (slika 19 a za *R*-varfarin (M3)), odgovara mjestu vezanja u središnjem procjepu HSA, blizu ulaza u VM1 (slika 20 b). To mjesto vezanja predviđeno je također kao energijski najpovoljnije i za anione kvercetina te većinu njegovih promatranih metil-etera, tj. molekule slične veličine.
Općenito je vn1 bio zastupljen s uglavnom < 10% generiranih veznih konformacija, i s energijama vezanja za 1-1.5 kcal/mol povoljnijim od najzastupljenijih načina (tablice 9 i 10). U načinu vezanja vn1 kvercetin u svim oblicima ostvaruje H-veze s aminokiselinama domene IIIA, bočnim ogrankom Arg485, te okosnicama Ser454 i Leu481 (slika 20 b). Povoljne hidrofobne interakcije omogućuju bočni ogranci tri leucina, Leu198 domene II te Leu451 i Leu481 domene III. Fenilni prsten B vezan je π-π interakcijama s Trp214 na ulazu u VM1, gdje polarnim interakcijama s grupama 3' i 4'-OH doprinosi i Ser202.

3.4.2.2. Vezanje aniona kvercetina

Deprotoniranjem na položajima 4'-OH i 7-OH, afinitet kvercetina se nije jako promijenio (tablice 9 i 10).
Predviđen način vezanja aniona ovisio je o pristupu upotrjebljenom za molekulsko uklapanje. Općenito, s parc. at. nabojima izračunatim u AutoDocku, vezno mjesto aniona 4'-O^- i 7-O^- je bilo vn4, kao i za neutralan kvercetin (slika 21 a, tablica 10). Međutim, s nabojima iz programa Marvin ili OB, najzastupljeniji predviđeni način vezanja za anion 4'-O^- (K-4'-A) odgovarao je kristalografskom načinu vezanja varfarina i označen je s Va/Vb ako je imao istu/obrnutu orijentaciju kromanonske jezgre kao i varfarin. U načinu Vb, prsten B je bio smješten na ulazu u VM1 gdje 4'-O^- tvori ionsku interakciju s Lys199 i Arg222 (slika 21 a). U tom načinu vezanja skupina ostvaruje H-veze s His242, dok grupa 7-OH tvori H-vezu u stražnjem dijelu VM, s keto skupinom Arg257 iz proteinske okosnice.
Za anion 7-O^- (K-7-A) najzastupljeniji način vezanja s nabojima iz programa Marvin i OB (tablica 9), odgovarao je onom predviđenom za strukturu *S*-varfarina iz programa OB i označen je s vs/ob (slika 21 b). U njemu je negativni naboj na atomu 7-O^- stabiliziran ionskim interakcijama s istim aminokiselinama na ulazu u VM1. Anion K-7-A s parc. at. nabojima iz AutoDocka se veže jednako kao i neutralni kvercetin, tj. na način vn4 pri čemu atom 7-O^- ostvaruje interakcije s Glu153 iz gornjeg dijela VM1.



Slika 21. Načini vezanja neutralnog kvercetina (zelena) i njegovog a) 4'-O^- aniona b) 7-O^- aniona, predviđeni s početnom strukturom i nabojima iz programa Marvin (cijan) ili istom strukturom s nabojima iz programa AD (žuta).

3.4.2.3. Vezanje oksidiranih kvinonskih formi kvercetina

Orto i *para* kvinoni kvercetina, koji nastaju oksidacijom hidroksilnih skupina 3'-OH i 4'-OH tj. 3-OH i 4'-OH, su neutralne molekule. Predviđen im je sličan način vezanja kao i za aglikon kvercetin, tj. vn4, s pet upotrijebljenih inačica molekulskog uklapanja. Jedino je za strukturu iz programa OB kao prvi rezultat predviđen položaj s istim položajem 4-kromanonske jezgre A/C, ali nešto različitim položajem prstena B (tablica 9, vn4*). Za oba kvinona predviđeni afiniteti vezanja na HSA bili su slični kao i za aglikon (tablice 9 i 10).

U vn4, 4-kromanonski prsten oba kvinona ostvaruju iste interakcije kao i kvercetin (slika 20 a). Za razliku od hidroksilnih, nastale keto grupe u kvinonima mogu biti jedino akceptori H-veza te je fenil B smješten drugačije nego li za aglikon kvercetin. Tako u *o*-kvinonu, atom 3'-O može tvoriti H-veze s Arg257, Tyr150 i Ser287, dok u *p*-kvinonu atom 3-O ostvaruje H-vezu s His242. Keto atom 4'-O u obje kvinonske forme ne ostvaruje jače interakcije. U *p*-kvinonu, 3'-OH grupa tvori H-vezu s karbonilnim atomom iz okosnice Ser287.

3.4.2.4. Vezanje metiliranih derivata kvercetina

Metilacija je česta metabolička modifikacija kvercetina. Utjecaj ove modifikacije na vezanje na SA proučavan je za kvercetin metiliran na jednoj od kateholnih skupina 3'- ili 4'-OH.
Metiliranje ovih grupa ne utječe značajno na mjesto, način i afinitet vezanja kvercetina za HSA (tablice 9 i 10). U oba metilna etera, kromanonski prsten ostvaruje iste interakcije s albuminom kao i u slučaju aglikona. Međutim, iako je prsten B malo zarotiran u odnosu na kvercetinski, i dalje tvori π-kationsku interakciju s gvanidinskom grupom Arg257. U 3'-O-metil eteru, 3'-O kisik tvori intermolekulsku H-vezu s gvanidinskom grupom Arg257, uz intramolekulsku s grupom 4'-OH. U 4'-*O*-metil eteru, kisik 4'-O tvori interakcije s okosnicom aminokiselina Arg257 i Ala261, a grupa 3'-OH ostvaruje H-veze s atomima iz okosnice Ser287. Dakle, u odnosu na kvercetin, glavne interakcije fenilnog prstena s Arg257, kao i interakcije kromanonskog prstena, ostale su sačuvane, pa se energije vezanja nisu značajno promijenile metilacijom.

3.4.2.5. Načini vezanja vn4, vn1, Vb i vs/ob

U dosad analiziranim rezultatima uklapanja kvercetina i njegovih jednostavnih metaboličkih oblika slične molekulske mase, najveći broj generiranih veznih konformacija odgovarao je načinu vezanja vn4 unutar VM1 (slike 19 i 20). Međutim, energijski najpovoljniji način vezanja za većinu ovih molekula (izuzeci su kvinoni) je bio analogan energijski najpovoljnijem načinu vezanja neutralnog varfarina, u procjepu između domena II i IIIA na ulazu u VM1, tzv. način vezanja vn1. Općenito, način vezanja vn1 je bio za oko 1 kcal/mol ili više povoljniji od načina vezanja vn4 (tablice 9 i 10). No, vn1 je bio uglavnom zastupljen s manje od 10 generiranih veznih konformacija.
U interpretaciji rezultata kao reprezentativan način vezanja odabrali smo onaj reprezentiran većim brojem generiranih veznih konformacija. No, način vezanja vn1 odgovara jednom od lokalnih minimuma energije vezanja. Slično, vezni načini Va, Vb te vs/ob koji predstavljaju vezanje promatranih aniona u varfarinsko VM1 odgovaraju lokalnim minimumima i mogući su načini vezanja.

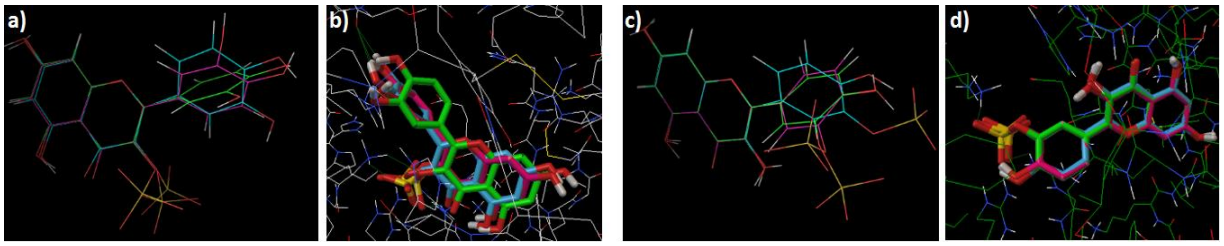
3.4.2.6. Vezanje sulfatiranih metabolita

Sljedeća metabolička modifikacija, čiji je utjecaj na vezanje kvercetina na HSA proučavan, bila je sulfatacija.

Prema našim rezultatima molekulskog uklapanja, uvođenje negativno nabijene sulfatne grupe povećava afinitet kvercetina za albumin, posebno na položajima 3-O i 3'-O, pri čemu afinitet približno odgovara onome izračunatom za varfarin (tablice 9 i 10, te 12 i 13). Međutim, načini i energije vezanja triju sulfatnih izomera bili su različiti.

Vezanje negativno nabijene i relativno velike sulfatne grupe na kvercetin znatno je perturbiralo njegovo vezanje na albumin. Za sulfate molekulskim uklapanjem nije predviđen položaj vezanja u središnjem procjepu HSA kao kod prethodno opisanih metabolita. Najzastupljeniji načini vezanja odgovarali su onima određenima za varfarin s obzirom na mjesto i orijentaciju kromanonskog prstena bila jednaka ili inverzna onoj varfarina u strukturi 2BXD. Za svaki od sulfata reprezentativan način vezanja bio je različit (tablice 9 i 10). No, način vezanja 4-kromanonske jezgre za svaki od sulfatnih izomera ostao je jednak za sve njihove promatrane deprotonirane i oksidirane forme.

Sulfatni metaboliti su se općenito vezali na mjesto varfarina. Njihovo vezanje je bilo određeno povoljnim interakcijama sulfatne grupe. Stoga su i razlike u početnim konformacijama općenito prevladane postizanjem istog povoljnog položaja pri uklapanju svakog od promatranih sulfata (slika 22).



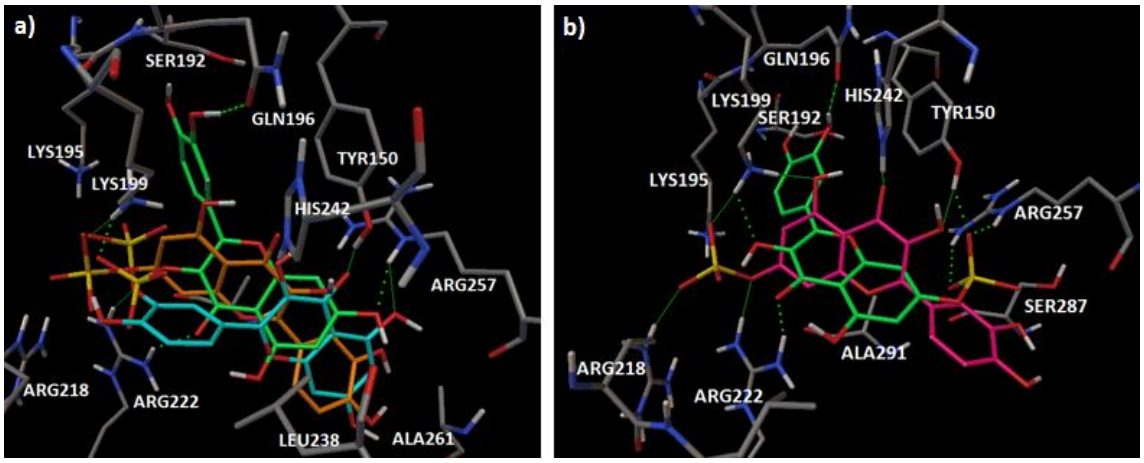
Slika 22. Početne strukture i predviđeni načini vezanja u VM1 za a) i b) kvercetin- 3-*O*-sulfata te c) i d) kvercetin-3'-*O*-sulfata. Marvin - zelena, CORINA - ružičasta i OB - cijan.

Općenito, svih šest pristupa dali su jednoznačne rezultate s obzirom na predviđeni način vezanja za svaki od tri promatrana sulfatna izomera kvercetina (tablice 9 i 10), kao što je na slici 22 ilustrirano za kvercetin-3-*O*-sulfat i kvercetin-3'-*O*-sulfat. Uz to, zbog postojanja dominantne ionske interakcije, koja određuje mjesto i način vezanja, za većinu 3-*O*- i 3'-*O*-sulfatnih molekula, ili je energetski najpovoljniji način vezanja bio ujedno i najzastupljeniji ili se najzastupljeniji način vezanja razlikovao za samo ≤ 0.5 kcal/mol od prvog klastera.

Za kvercetin-3-*O*-sulfat, sa svih šest pristupa, predviđen je s visokom zastupljenošću veznih konformacija (81-97%) jednak način vezanja, Vb (slika 23). Pritom 3-*O*-sulfatna grupa tvori ionske interakcije s pozitivno nabijenim aminokiselinama smještenim na ulazu u VM1, Lys199 i Lys195 te Arg218 i Arg222. U skladu s tim dominantnim interakcijama, grupa 7-OH ostvaruje H-vezu s Arg257, a grupe 3'-OH i 4'-OH sa Ser192, obratno nego li je previđeno za kvercetinski aglikon. Atom 1-O smješten je u blizinu grupe OH Tyr150.

Formiranje dvostrukih aniona deprotonacijom 7-OH ili 4'-OH grupe, kao i oksidacija u *o*-kvinonski oblik ne mijenja način vezanja 3-*O*-sulfata (tablice 9 i 10).

3'-*O*-sulfat i njegovi dianioni ostvaruju interakcije s jednakim aminokiselinama u VM1 kao i 3-*O* izomer (tablice 9 i 10, slika 23). Sulfo-grupa na prstenu B tvori ionske interakcije s Lys195 i Lys199 te Arg218 i Arg222 na ulazu u VM1 kao i u 3-*O*-sulfatu. U skladu s tim, u 3'-*O*-sulfatu 4-kromanonski prsten orijentiran je na analogan način kao u kristalografskom varfarinu, Va, ali ostvaruje interakcije s jednakim aminokiselinama kao i u 3-*O*-sulfatu (slika 23).



Slika 23. a) Načini vezanja predviđeni za kvercetin-3-*O*-sulfat (Vb, zelena), 7-*O*-sulfat (vs/ob, narančasta) i 3'-*O*-sulfat (Va, cijan). b) Načini vezanja predviđeni za kvercetin-7- *O*-sulfat s nabojima iz programa AD (vs/ob, ružičasta) i Marvin (Vb, zelena).

Vezanje 7-*O*-sulfata bilo je nešto drugačije nego li vezanje ovih dvaju izomera. Kao i u 3-*O* i 3'-*O* izomerima, u 7-*O* izomeru sulfo-grupa ostvaruje interakcije s istim pozitivno nabijenim aminokiselinskim ostacima u prednjem dijelu VM1. Međutim, kako je ona smještena na prstenu A, fenilni prsten B je položen u unutrašnjosti VM1 gdje ostvaruje slabe interakcije s okosnicom Arg257 (slika 23). Taj način vezanja 7-*O*-sulfata analogan je onome za OB strukturu *S*-varfarina, te je označen kao vs/ob. Način vezanja s parc. at. nabojima iz programa Marvin odgovara pak načinu vezanja Vb s obzirom na položaj 4-kromanonske jezgre, dok sulfatna grupa ostvaruje H-veze s Arg257, Tyr150 i Ser287 u stražnjem dijelu VM1 (slika 23 b). Kisik 4-O ostvaruje H-vezu s Arg222, 3-O s Lys199, i 3'-O s Gln196 (tablica 9, slika 23 b).

Sa svim pristupima je predviđeno da je afinitet 7-*O*-sulfata za albumin manji od onog za 3-*O* i 3'-*O* izomera i da se oksidacijom u kvinonske forme povećava (tablice 9 i 10). Prsten B *o*- i *p*-kvinona smješten je u hidrofobni džep od Phe223, Leu234, Leu238 i Ile264 u unutrašnjosti VM1.

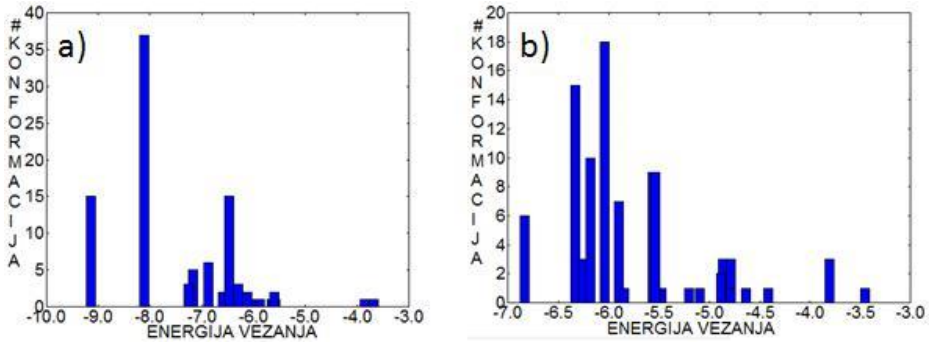
Za vezanje sulfata kvercetina u HSA predviđene su niže energije vezanja nego za kvercetin, a najpovoljnije vezanje među sulfatiranim metabolitima predviđeno je za kvercetin-3'-*O*-sulfat. No, kada se energije vezanja podijele s brojem 'teških' atoma, i usporede s vrijednostima za kvercetin, dobivene relativne normirane energije vezanja su za 3-*O* i 3'-*O* izomere gotovo jednake, a za 7-*O* izomer nešto nepovoljnije od one predviđene za aglikon.

3.4.2.7. Vezanje glukuronida kvercetina

Glukuronidacija je također česta metabolička modifikacija kvercetina. Glukuronska kiselina je preko 6-C atoma eterskom vezom vezana najčešće grupom 3-OH kvercetina (Radominska-Pandya i sur. 1998, Mullen i sur. 2006). U ovom diplomskom radu istražili smo utjecaj glukuronidacije, osim na položaju 3, i na položaju 4' na vezanje kvercetina u PVM1 humanog albumina.

Glukuronidi su najveći metaboliti kvercetina proučavani u ovom radu. Glukuronska skupina ($M_r \approx 193$) je dvostruko veći supstituent od sulfatne grupe ($M_r \approx 96$). Unutar danog skupa molekula, za glukuronide je predviđen najveći broj vezanja po molekulskom uklapanju (tablice 12 i 13, slika 24). Međutim, unatoč tome, najzastupljeniji načini vezanja za 3-*O*-glukuronid i njegove 4'- i 7-O^- dianione i oksidirani *p*-kvinonski oblik, kao i 3'-*O*-metil-eter (najfleksibilniju molekulu u skupu), su predviđeni s više od 1/3 generiranih veznih konformacija (tablice 9 i 10).

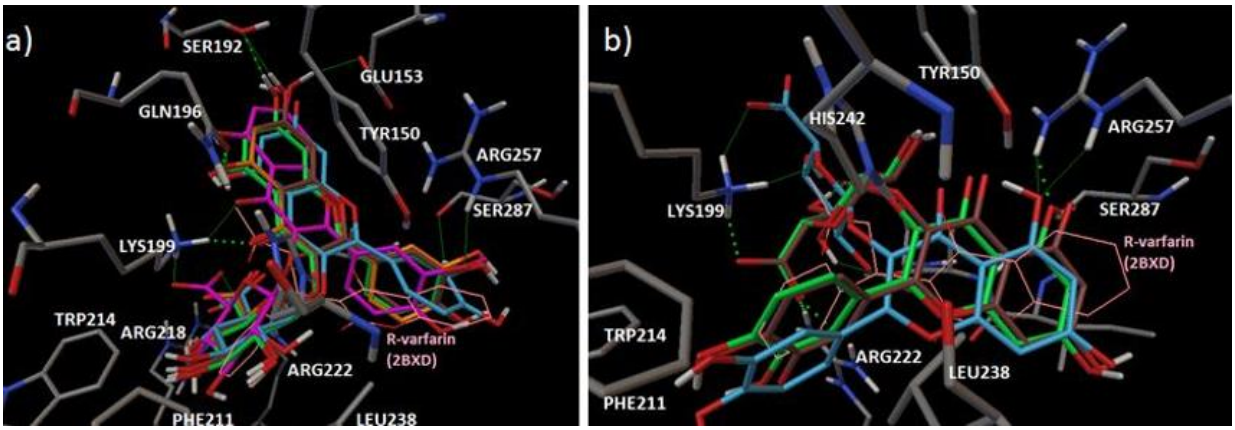
Način vezanja za 4'-*O* izomer nije bilo moguće jednoznačno odrediti na taj način (slika 24).



Slika 24. Raspodjela konformacija i pripadne vezne energije za načine vezanja a) 3-*O*-glukuronida i b) 4'-*O*-glukuronida.

Kao i u slučaju sulfata, razlike u položaju glukuronske skupine u početnim konformacijama su prevladane elektrostatskim interakcijama s aminokiselinama na ulazu u VM1, Lys199 i Arg222. Slično tome, i u strukturama oba enantiomera glukuronida oksazepama, glukuronska grupa je bila smještena na ulazu u VM1 tvoreći interakcije s istim aminokiselinama.

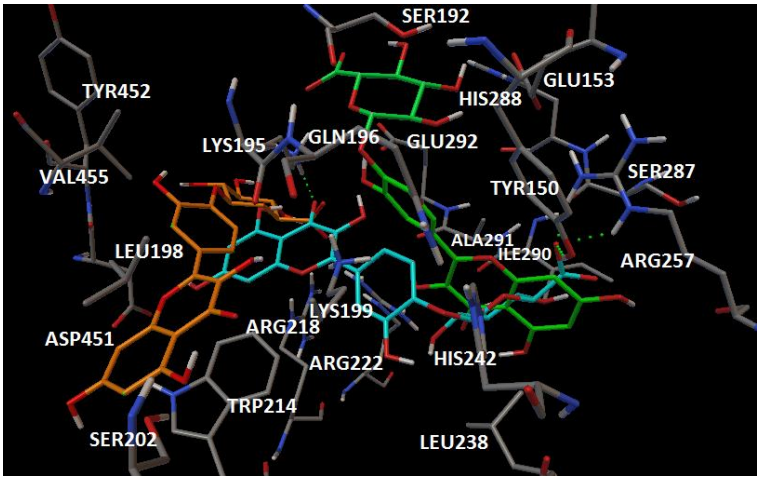
Za kvercetin-3-*O*-glukuronid, s pet načina molekulskog uklapanja (tablice 9 i 10), kao najvjerojatniji način vezanja predviđen je vn4, u kojem je 4-kromanonska jezgra vezana kao u aglikonu, ostvarujući H-veze s Lys199 preko grupe 4-O, s Gln196 preko 5-OH, sa Ser192 preko 7-OH, dok kateholna grupa tvori interakcije s Arg257 i Ser287 (slika 25 a). Glukuronski fragment preko grupe COO^- tvori ionsku vezu s Arg222 i Lys199 te s His242 preko kisika 3-O. Glukuronske hidroksilne grupe uključene su u intramolekulske H-veze. Način vezanja je isti i za dianione s deprotoniranom 4'-OH ili 7-OH grupom, *o*-kvinonski oblik te 3'-*O*-metil eter (tablice 9 i 10, slika 25 a).



Slika 25. Načini vezanja a) najzastupljeniji vn4 i b) energijski najpovoljniji Va, za kvercetin-3-*O*-glukuronid (zelena), te njegov 4'-anion (narančasta), 7-anion (cijan), *o*-kvinon (smeđa) i 3'-*O*-metil-kvercetin-3-*O*-glukuronid (ružičasta).

Kao energijski najpovoljniji način vezanja za 3-*O*-glukuronid predviđen je i način vezanja Va (slika 25 b), u kojem grupa COO^- ostvaruje interakcije također s Lys199 i Arg222, ali na sličan način kao sulfatna grupa u 7-*O* izomeru i ketopropanska grupa varfarina. Atomi 4-O i 5-O tvore veze s Arg257 i Ser287, a prsten B π-kation interakcije s Lys199. Hidroksilne grupe glukuronskog fragmenta tvore H-veze s Glu292 te interakcije s Lys195, Tyr150 i okosnicom Ala291.

S druge strane, prema dobivenim rezultatima, glukuronidacija na 4'-OH grupi, smanjuje afinitet kvercetina za VM1 albumina. Sva 23 predviđena načina vezanja (slika 24 b) imaju nepovoljniju energiju vezanja u odnosu na 3-*O*-glukuronid i aglikon kvercetin (tablice 9 i 10). Na temelju rezultata nismo mogli odrediti preferentan način vezanja 4'-*O*-glukuronida u PVM1. Na slici 26 prikazani su najpovoljniji te dva najzastupljenija načina vezanja 4'-*O*-glukuronida. Najpovoljniji način vezanja najsličniji je načinu Vb. Prema drugom, najzastupljenijem klasteru, koji je ujedno drugi klaster po energiji, 4'-*O*-glukuronid kvercetina veže se na sličan način kao naproksen u kristalografskoj strukturi BSA 4OR0, te je taj način vezanja označen slovom n (tablice 9 i 10). U tom načinu vezanja grupa COO^- također tvori interakcije s aminokiselinama Lys199, Arg222 i Arg218, dok kromanonski prsten ostvaruje π-π interakcije s Trp214. Najzastupljeniji, sedmi klaster predstavlja način vezanja djelomično izvan VM1, s glukuronskom skupinom smještenom na varfarinskom veznom mjestu (slika 26).



Slika 26. Prvi (Vb, zelena), drugi (n, narančasta) i najzastupljeniji (cijan) predviđen način vezanja za kvercetin-4'-*O*-glukuronid.

Iako je, kao i za sulfate, energija vezanja izračunata za glukuronide kvercetina uglavnom povoljnija u odnosu na aglikonsku, uzme li se u obzir broj 'teških' atoma koje nosi ova modifikacija, ta razlika nije vrlo značajna.

3.5. Molekulsko uklapanje metabolita katehina u HSA

U ovom diplomskom radu, način i afinitet vezanja u PVM1 albumina određen je za EGCG i 19 njegovih derivata, uključujući metabolite koji nastaju razgradnjom crijevnom mikroflorom, γ-valerolaktone, s dvije ili tri hidroksilne skupine na fenilnom prstenu (γ-valerolakton-DiOH i γ-valerolakton-TriOH) (slika 12) (Sun i Ho 2008). Za uklapanje u strukturu HSA 2BXD su korištene 3D strukture generirane programom Marvin, s parc. at. nabojima izračunatim u istom ili programu AD.
Rezultati uklapanja katehina dani su u tablicama 15 i 16. Predviđeni načini vezanja uglavnom su bili analogni onima određenim za metabolite kvercetina.

Tablica 15. Rezultati molekulskog uklapanja EGCG-a, njegovih anionskih oblika i metabolita, te EGC-a i EC-a i njihovih metabolita u PVM1 HSA strukture 2BXD, za početne 3D strukture generirane u programu Marvin s parc. at. nabojima izračunatim u istom programu. Naveden je ukupan broj predviđenih klastera (# klastera).

	najpovoljniji			najzastupljeniji			
METABOLIT	% konf.	Način vezanja	Ev/ kcal/mol	% konf.	Način vezanja	Ev/ kcal/mol	# klastera
EGCG	1	n	-11,29	47	Va	-10,52	21
EGCG-4'-A	60	Va	-10,85				17
EGCG-4''-A	52	vn4	-9,66				15
EGCG-4',4''-DiA	48	Va	-9,89				18
4''-OMe-EGCG	43	Va	-10,26				19
4',4''-Di-OMe-EGCG	36	Va	-11,06				16
EGCG-4'-OSulf	11	Va	-11,64				32
EGCG-3'-OG	4	djelomično u VM1	-9,53	9	djelomično u VM1	-8,42	53
EGCG-4''-OG	14	vn4, G izvan	-9,14				34
EGCG-4''-OG-4'-A	14	djelomično u VM1	-9,6	18	vn4, G izvan	-7,47	25
EGC	5	vn1	-8,88	36	vn4	-7,47	13
4'-OMe-EGC	1	vn1	-8,68	28	vn4	-7,75	13
EC	6	vn1	-8,83	58	Vb	-7,18	11
3'-OMe-EC	2	vn1	-9,47	42	Va	-7,02	11
EC-3'-OSulf	37	Vb	-8,86				14
EC-5-OG	5	n	-8,49	11	izvan VM1	-7,88	26
EC-3'-OG	15	Va	-8,71				30
3'-OMe-EC-5-OG	1	n	-9,28	12	izvan VM1	-7,84	29
γ-valerolakton-DiOH	6	vn1	-7,53	70	VM1	-7,36	7
γ-valerolakton-TriOH	13	vn1	-8,08	37	VM1	-7,33	10

Oznake kao u tablici 9.

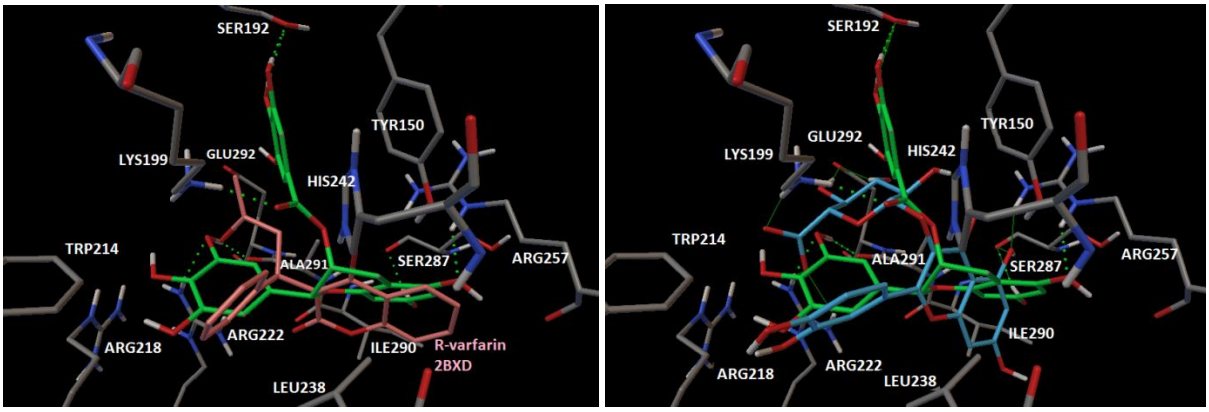
Tablica 16. Rezultati molekulskog uklapanja EGCG-a, njegovih metabolički modificiranih te anionskih oblika u PVM1 HSA strukture 2BXD, za početne 3D strukture generirane u programu Marvin s parc. at. nabojima izračunatim u programu AD.

	najpovoljniji			najzastupljeniji			
METABOLIT	% konf.	Način vezanja	Ev/ kcal/mol	% konf.	Način vezanja	Ev/ kcal/mol	# klastera
EGCG	46	Va	-9,23				17
EGCG-4'-A	53	Va	-9,4				15
EGCG-4''-A	45	Va	-9,05				16
EGCG-4',4''-DiA	47	Va	-9,55				18
4''-OMe-EGCG	41	Va	-8,89				19
4',4''-Di-OMe-EGCG	37	Va	-9,5				25
EGCG-4'-OSulf	23	Va	-10,32				26
EGCG-3'-OG	4	djelomično u VM1	-9,12	8	djelomično u VM1	-6,19	57
EGCG-4''-OG	17	vn4, G izvan	-7,79				28
EGCG-4''-OG-4'-A	11	djelomično u VM1	-7,64	18	vn4, G izvan	-7,19	24
EGC	4	vn1	-8	40	vn4	-6,77	11
4'-OMe-EGC	31	vn4	-7,03				12
EC	5	vn1	-8,17	45	Vb	-6,68	11
3'-OMe-EC	1	vn1	-8,86	36	Va	-6,54	15
EC-3'-OSulf	57	Vb	-8,51				10
EC-5-OG	2	djelomično u VM1	-8,08	7	n	-7,56	29
EC-3'-OG	11	VM1	-7,98	13	Va	-7,91	34
3'-OMe-EC-5-OG	21	djelomično u VM1	-7,71				30
γ-valerolakton-DiOH	4	vn1	-7,08	72	VM1	-6,87	7
γ-valerolakton-TriOH	5	vn1	-7,39	42	VM1	-6,6	10

Oznake kao u tablicama 9 i 15.

3.5.1. Vezanje EGCG-a, njegovih aniona i metil-etera

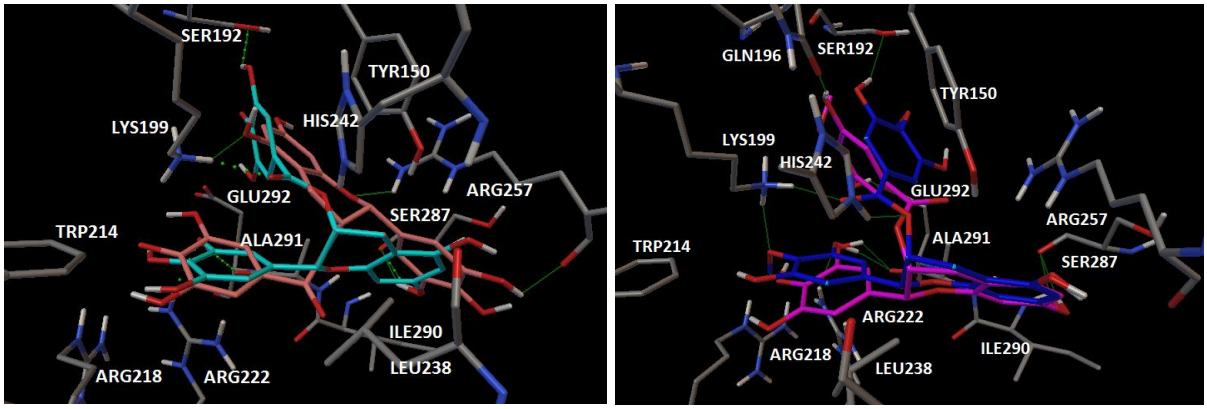
Za neutralni EGCG, njegove anione i metil-etere s oba tip parc. at. naboja predviđen je jednak način vezanja u VM1, koji odgovara kristalografskom načinu vezanja *R*-varfarina u strukturi 2BXD, tzv. Va (slika 27 a). Taj način vezanja je bio energijski najpovoljniji i najzastupljeniji (47 i 46% veznih konformacija) (tablice 15 i 16).



Slika 27. a) Način vezanja EGCG-a (zelena) u odnosu na način vezanja *R*-varfarina u kristalografskoj strukturi 2BXD (ružičasta). b) Način vezanja EGCG-a (zelena) u odnosu na predviđeni način vezanja kvercetin-3-*O*-glukuronida (cijan).

U načinu vezanja Va EGCG stvara slične interakcije s aminokiselinskim ostacima kao i *R*-varfarin (slika 27 a). Atomima 5-O i 7-O tvori H-veze s Arg257 i keto grupom okosnice Ser287 smještenima u stražnjem dijelu VM1. Preko grupe 3'-OH tvori H-vezu s okosnicom Ala291 kao donor te s Arg222 kao akceptor. Hidroksilne grupe 4'-OH i 5'-OH fenilnog prstena B ostvaruju interakcije s Arg218 i Lys199. Kisici iz esterske veze tvore H-veze s Lys199 i His242. Grupe 3''-OH i 4''-OH fenilnog prstena D tvore H-veze sa Ser192 u gornjem dijelu VM1, a 5''-OH ostvaruje interakcije s Glu292. U usporedbi s kvercetinom, način vezanja EGCG-a je sličan onome kvercetin-3-*O*-glukuronida po ostvarenim interakcijama i po energiji vezanja (slika 27 b, tablice 9 i 10, te 15 i 16).

Deprotoniranjem grupe 4'-OH nastaje anion 4'-O^- koji ostvaruje povoljne elektrostatske interakcije s Arg222, Arg218 i Lys199 na ulazu u VM1. Za ostala dva promatrana anionska oblika predviđen način vezanja ovisio je o načinu računanja parc. at. naboja (tablice 15 i 16, slika 28 a).

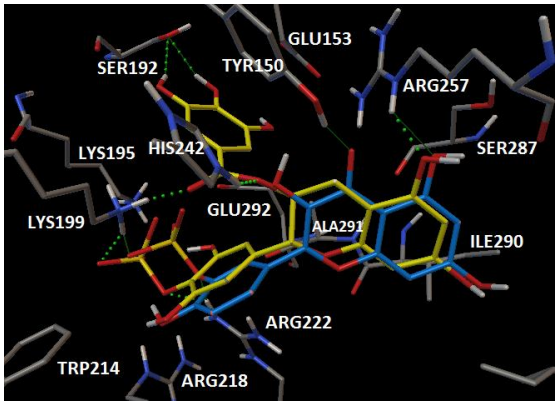


Slika 28. a) Načini vezanja predviđeni za anion EGCG-4''-A s parc. at. nabojima izračunatim u programu AD (Va, cijan) i programu Marvin (vn4, ružičasta). b) Načini vezanja predviđeni za metil etere 4''-OMe-EGCG (tamno ružičasta) i 4', 4''-Di-OMe-EGCG (plava).

Metiliranje EGCG-a ne utječe na mjesto i način vezanja (slika 28 b), kao što je prethodno uočeno i za kvercetin. No dok je monometiliranje 4'-OH grupe uzrokovalo smanjenje afiniteta vezanja EGCG-a za HSA, dimetiliranje 4'-OH i 4''-OH grupe nije značajno promijenilo afinitet vezanja na HSA u odnosu na nemetilirani EGCG (tablice 15 i 16, slika 28 b).

3.5.2. Vezanje sulfata EGCG-a

Uvođenje negativno nabijene sulfatne grupe na položaj 4'-O ne utječe znatno na način vezanja i afinitet EGCG-a za HSA (tablice 15 i 16). Način vezanja EGCG-4'-*O*-sulfata sličan je onome kvercetin-3'-*O*-sulfata (slika 29), no sa značajno povoljnijom energijom vezanja: -10.32 kcal/mol (tablica 16) vs. -8.54 kcal/mol (tablica 10). Sulfatne skupine oba sulfata smještene su između Arg218, Arg222, Lys199 i Lys195 na ulazu u VM1, i obje ostvaruju H-veze s Arg222 i Lys199. Keto grupa iz esterske veze EGCG-a ostvaruje dodatno H-vezu s Lys199, a kisik iz esterske veze H-vezu s His242 (slika 29). Hidroksilne grupe 3''- i 4''-OH obje ostvaruju H-veze sa Ser192. Ove dodatne interakcije galoilne skupine D povoljno utječu na vezanje EGCG-a na HSA u odnosu na kvercetin (tablice 9 i 10, 15 i 16).

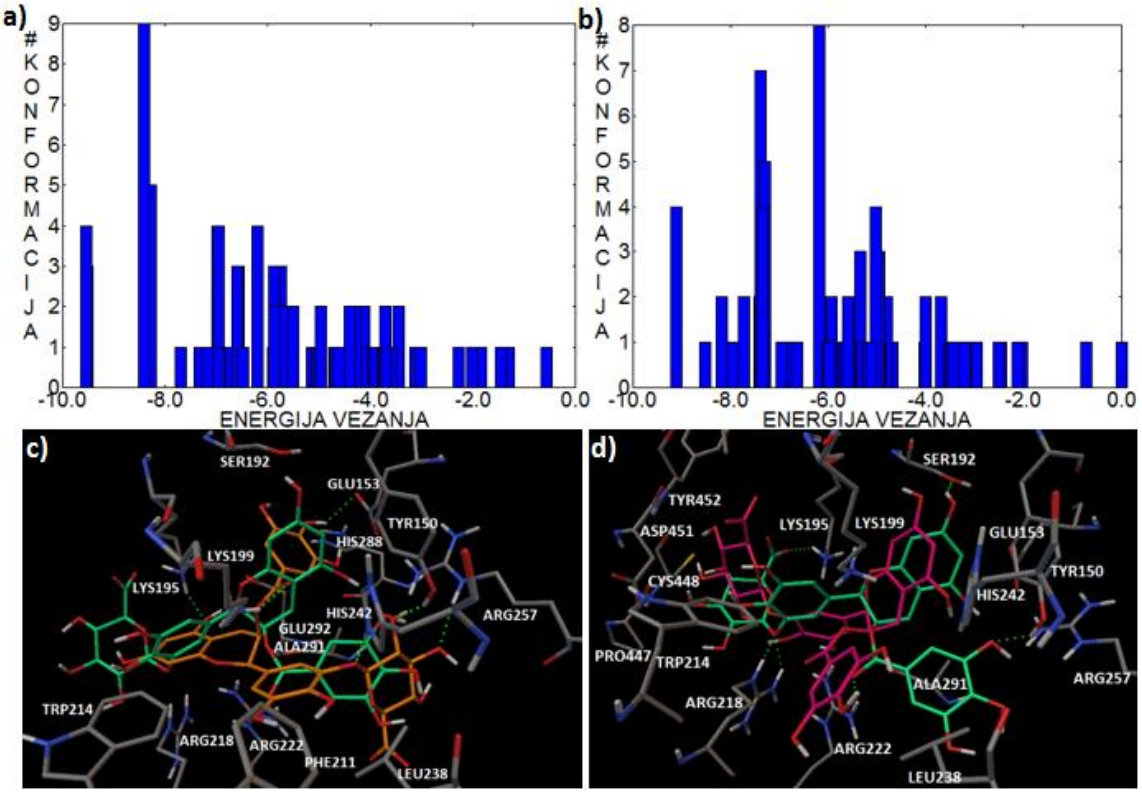


Slika 29. Načini vezanja predviđeni za EGCG-4'-*O*-Sulf (žuta) i kvercetin-3'-*O*-Sulf (plava).

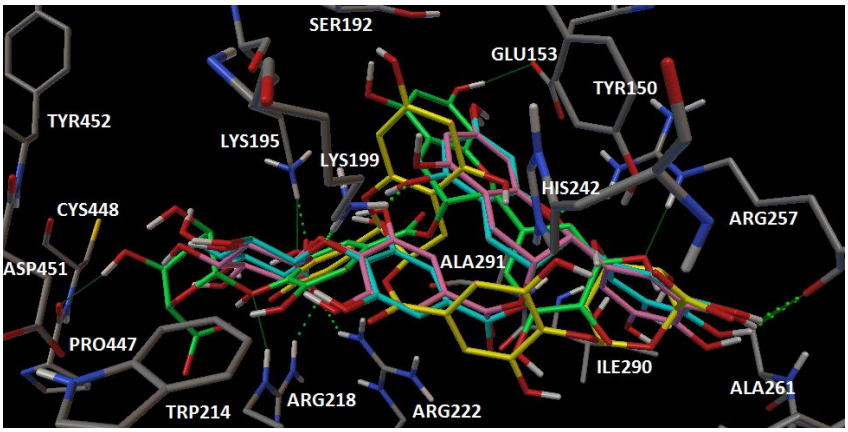
3.5.3. Vezanje glukuronida EGCG-a

U ovom radu istražili smo vezanje 3'-*O*- i 4''-*O*-glukuronida EGCG-a na albumine. To su ujedno najveće molekule proučavane u ovom radu. Rezultati molekulskog uklapanja pokazali su da glukuronidacija smanjuje afinitet vezanja EGCG-a na HSA prvenstveno zbog veličine nastalih metabolita. Veličine ovih metabolita usporedive su s veličinom same šupljine VM1 (slike 30 i 31) te je njihovo optimalno smještanje u VM1 zbog toga ograničeno. Iz tog razloga je broj određenih klastera bio velik i najzastupljeniji klasteri sadržavali su manje od 15 veznih konformacija (slika 30 a i b, tablice 15 i 16).

Npr. glukuronska skupina EGCG-4''-*O*-glukuronida vezanog unutar VM1 djelomično zauzima procjep između domena II i III ostvarujući interakcije s pozitivno nabijenim aminokiselinskim ostacima na ulazu u VM1 (slika 31). Ostatak molekule ostvaruje slične interakcije kao kvercetin u ovom veznom načinu (vn4, slika 20 a). Prema izračunatim energijama vezanja može se očekivati da se EGCG-4''-*O*-glukuronid i njegov anion 4'-O^- vežu znatno slabije na HSA u odnosu na aglikon EGCG (tablice 15 i 16).



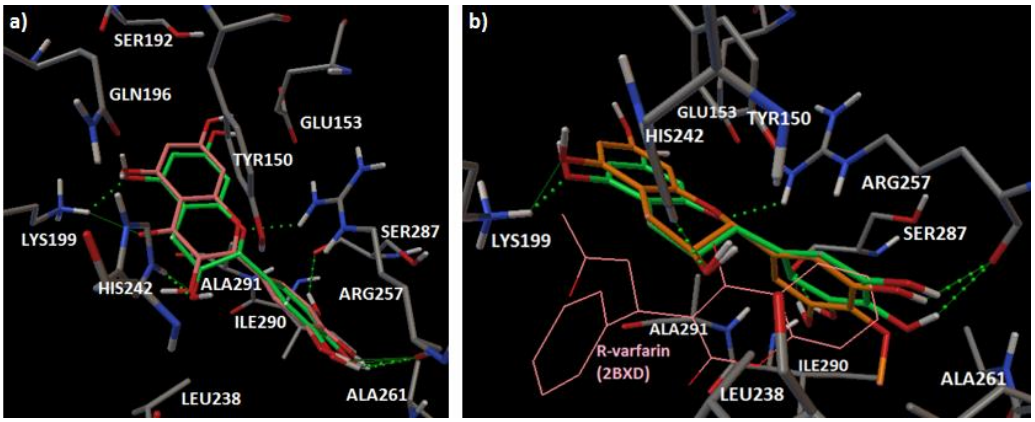
Slika 30. Raspodjela konformacija predviđenih molekulskim uklapanjem prema energiji vezanja za 3'-*O*-glukuronid EGCG-a s parc. at. nabojima iz programa a) Marvin i b) AD. c) Načini vezanja predviđeni za strukturu 3'-*O*-glukuronida EGCG-a s parc. at. nabojima iz programa AD koji odgovaraju prvom (narančasta) i najnapućenijem (zelena) klasteru na dijagramu b). d) Načini vezanja predviđeni za strukturu 3'-*O*-glukuronida EGCG-a s nabojima iz programa AD (zelena) i Marvin (ružičasta), koji odgovaraju najzastupljenijim klasterima.



Slika 31. Načini vezanja predviđeni za 4''-*O*-glukuronid EGCG-a s nabojima iz programa AD (cijan) i Marvin (ružičasta), te načini vezanja predviđeni za njegov anion s najpovoljnijom energijom vezanja (žuta) i najzastupljenijim klasterom (zelena). Svi načini vezanja su slični za strukture s oba tipa parc. at. naboja.

3.5.4. Vezanje EGC-a i njegovih metabolita

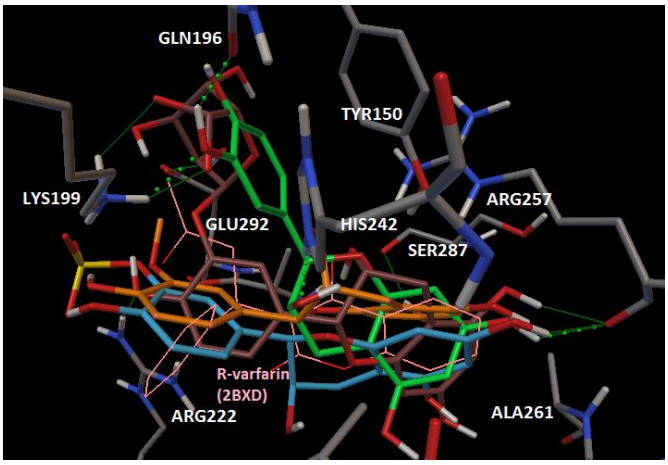
Katehin EGC se veže u VM1 na isti način, vn4, kao i kvercetin zbog njihove sličnosti u veličini i strukturi (slika 32 a), ali EGC sa slabijim afinitetom (tablice 9 i 10, 15 i 16). U tom načinu vezanja, kvercetin tvori H-vezu s Lys199 preko 4-keto grupe, a EGC preko 5-OH grupe (slika 32). Ostale interakcije između ta dva liganda i HSA su jednake. Na sličan način se veže i 4'-*O*-metil eter EGC-a koji umjesto H-veza sa Ser187 i okosnicom Arg257 ima metilnu grupu smještenu u hidrofobni džep (slika 32 b).



Slika 32. a)Način vezanja EGC-a (zelena) u odnosu na način vezanja kvercetina predviđen molekulskim uklapanjem (ružičasta). b) Način vezanja EGC-a (zelena) i 4'-OMe-EGC-a (narančasta).

3.5.5. Vezanje EC-a i njegovih metabolita

Za EC energijski najpovoljniji način vezanja odgovara načinu vn1 izvan VM1. Način vezanja predstavljen s najviše generiranih veznih konformacija Vb ima značajno nepovoljniju energiju vezanja (tablice 15 i 16, slika 33). U tom načinu vezanja EC ostvaruje H-veze svojim hidroksilnim gupama 7-OH, 3-OH i 3'-OH s keto grupom okosnice Arg257, bočnim ogrankom His242 te Gln196 i Lys199 (slika 33). Metilacija skupine 3'-OH smanjuje/povećava afinitet za vezanje EC-a unutar/izvan VM1 (tablice 15 i 16, slika 33).



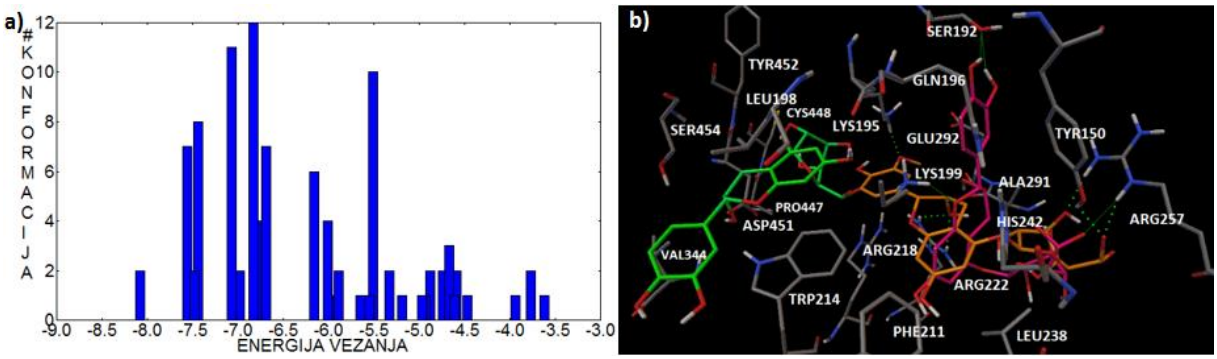
Slika 33. Načini vezanja predviđeni kao najzastupljeniji (tablica 16, Marvin_AD) za EC (Vb, zelena), te njegove metabolite: 3'-*O*-metil (Va, narančasta), 3'-*O*-sulfat (Vb, cijan) i 3'-*O*-glukuronid (Va, smeđa).

U 3'-*O*-sulfatu EC-a sulfatna grupa tvori interakcije s Lys199 i Arg222 na ulazu u VM1 kao i drugi sulfatni metaboliti (slika 33). Smještaj katehinske jezgre A/C je jednak kao i u drugim derivatima EC-a.

EC-3'-*O*-glukuronid se smješta unutar VM1 na način Va tvoreći sa COO^- grupom interakciju s Lys199.

Za EC-5-*O*-glukuronid predviđen je velik broj klastera slične veličine s maksimalno 12 konformacija (slika 34 a). Vjerojatan način vezanja ovog izomera je u procjepu izvan VM1 pri čemu glukuronska COO^- grupa tvori interakcije s Arg218 na ulazu u VM1. Grupa 7-OH, koja je u blizini glukuronske skupine u 5-*O* izomeru, ostvaruje H-vezu s Lys195, a 3-OH u ovom načinu vezanja ostvaruje H-veze s Trp214 iz domene II i Asp451 iz domene III.

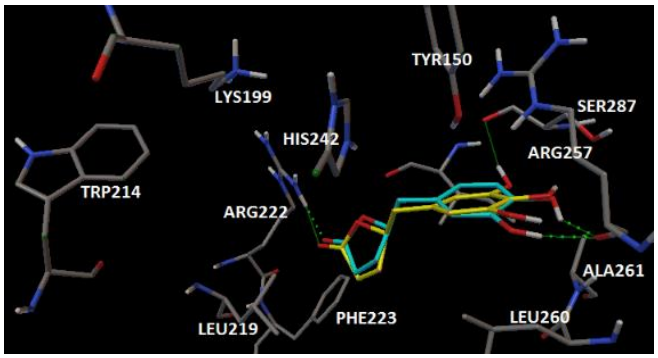
Najzastupljeniji klaster za ovaj metabolit s nabojima iz programa AD obuhvaća 12 konformacija, ima energiju vezanja 1.25 kcal/mol višu od najniže i predstavlja način vezanja u unutrašnjosti VM1 (slika 34 b). Glukuronska skupina veže se u stražnji dio VM1 gdje COO^- tvori ionsku vezu s Arg257. Isti položaj glukuronskog fragmenta predviđen je i za energetski najpovoljniji i najzastupljeniji klaster, s 21-om konformacijom metiliranog 3'-*O*-Me- EC-5-*O*-glukuronid (slika 34 b). S obzirom na predviđene energije vezanja, moguće je da glukuronidacija smanjuje afinitet EC-a za HSA (tablice 15 i 16).



Slika 34. a)Raspodjela konformacija predviđenih molekulskim uklapanjem EC-5-*O*-glukuronida prema energiji vezanja za s parc. at. nabojima iz programa AD b) Načini vezanja predviđeni za strukturu EC-5-*O*-glukuronida s parc. at. nabojima iz programa AD koji odgovaraju drugom (zelena) i najnapućenijem klasteru (ružičasta) na dijagramu a), te način vezanja predviđen za 3'-OMe-EC-5-*O*-glukuronid s parc. at. nabojima iz programa AD (narančasta).

3.5.6. Vezanje valerolaktona

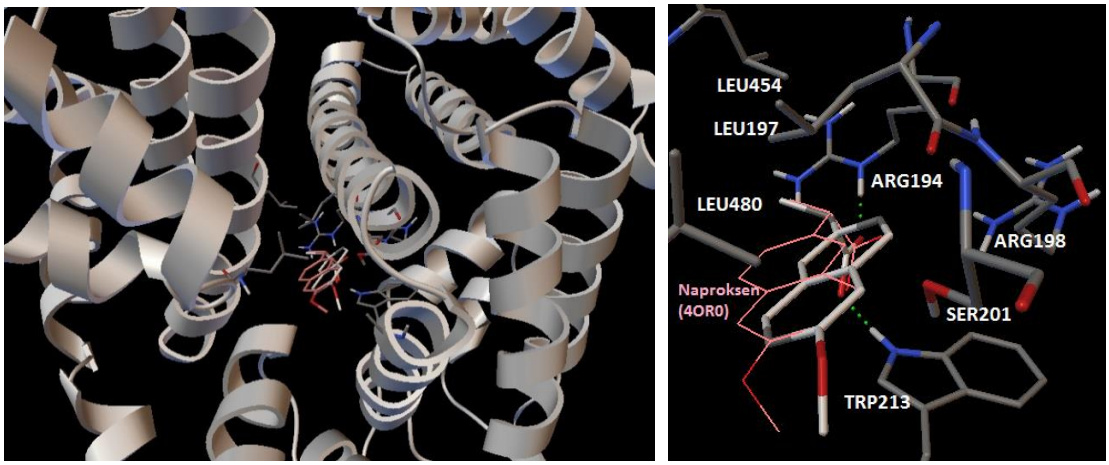
Valerolaktoni su najmanji i strukturno značajno različiti od ostalih metabolita katehina čije je vezanje na SA proučavano u ovom radu. Njihov fenilni prsten je smještena na analogan način onom EGC-a u VM1 te tvori H-veze s okosnicom Arg257 i s OH-skupinom Ser287 (slika 35). Laktonski prsten je vezan bliže ulazu u VM1, gdje keto grupa tog prstena ostvaruje H-vezu s Arg222. Predviđeni afiniteti vezanja valerolaktona u VM1 HSA su usporedivi s onima EC-a.



Slika 35. Načini vezanja predviđeni kao najzastupljeniji za dihidroksifenil-γ-valerolakton (cijan) i trihidroksifeni-γ-valerolakton (žuta).

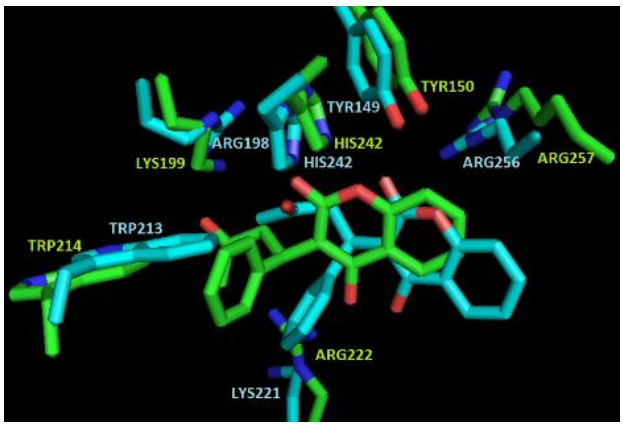
3.6. Molekulsko uklapanje u BSA

U protein BSA molekulsko uklapanje spojeva promatranih u ovom diplomskom radu provedeno je s kristalografskom strukturom 4OR0 kompleksa BSA s ligandom naproksenom (poglavlje 2.3.2). U strukturi 4OR0 naproksen je vezan u središnjem procjepu albumina (slika 7), na način označavan u ovom radu slovom n. Ovaj način vezanja naproksena u PVM1 BSA je reproduciran molekulskim uklapanjem (slika 36). On je odgovarao prvom klasteru s najpovoljnijom predviđenom energijom vezanja -8.93 kcal/mol i bio je ujedno najzastupljeniji sa 70 % generiranih veznih konformacija. Uz interakcije karboksilne grupe COO^- s pozitivno nabijenim aminokiselinama npr. Arg194, za vezanje naproksena su značajne i hidrofobne interakcije s npr. leucinskim ostacima BSA.
BSA i HSA imaju različite aminokiselinske ostatke u ovom dijelu strukture. Na ekvivalentnim položajima Arg194 i Arg198 u BSA, u HSA se nalaze Lys195 i Lys199 koji su, za razliku od Arg194 i Arg198 BSA-a, manje izloženi u središnji procjep i više prema VM1.



Slika 36. a) Mjesto vezanja naproksena u strukturi 4OR0 (ružičasta) i predviđeno molekulskim uklapanjem (siva) u središnjem procjepu BSA između domena II i III. b) Aminokiselinski ostaci s kojima naproksen ostvaruje interakcije prilikom vezanja na način n.

S druge strane, uklapanjem *R*-varfarina (strukture M1) u strukturu 4OR0, dobiveni su rezultati analogni onima dobivenim uklapanjem u strukturu 2BXD humanog albumina (poglavlje 3.3.2.). Način vezanja Vb u VM1, koji odgovara kristalografskom iz 2BXD, s obrnutom orijentacijom 4-kromanskog prstena (slika 37), predviđen je s najnižom energijom vezanja, -9.47 kcal/mol i najvećim brojem konformacija, 50 %.



Slika 37. Predviđeni načini vezanja *R*-varfarina (Marvin_AD) u VM1 HSA (2BXD; zelena) i BSA (4OR0; cijan).

3.6.1. Molekulsko uklapanje kvercetina i njegovih metabolita

Molekulsko uklapanje kvercetina i njegovih 29 derivata (slika 11, poglavlje 2.3.2) u strukturu 4OR0 provedeno je s početnim strukturama određenim programom Marvin i parc. at. nabojima iz programa Marvin ili AD. Načini vezanja predviđeni s različitim parc. at. nabojima (tablice 17 i 18) bili su međusobno dosljedni.

Tablica 17. Rezultati molekulskog uklapanja kvercetina i njegovih metabolita, pripremljenih u programu Marvin te s parc. at. nabojima izračunatim u istom programu, u PVM1 strukture BSA 4OR0.

	najpovoljniji			najzastupljeniji			
METABOLIT	% konf.	Način vezanja	E_v/ kcal/mol	% konf.	Način vezanja	E_v/ kcal/mol	# klastera
kvercetin, K	39	vn1	-9.06				6
K-4'-A	50	n	-9.53				4
K-7-A	33	n	-10	54	vs/ob	-8.24	4
K-o-kvinon	29	n	-8.42	30	Va	-7.18	8
K-p-kvinon	48	n	-9.04				5
Metilacija							
K-3'-OMe	33	vn1	-9.14	39	vn4	-8.04	7
K-3'-OMe-3-A	19	vn1	-9.44	42	vn4	-8.78	5
K-3'-OMe-4'-A	41	n	-9.93	48	Vb	-7.53	5
K-3'-OMe-7-A	46	n	-8.53				5
K-3'-OMe-p-kvinon	12	n	-9.17	28	n	-9.06	5
K-4'-OMe	5	vn1	-8.88	47	n	-8.62	9
K-4'-OMe-3-A	23	vn1	-9.88	44	n	-9.06	9
K-4'-OMe-7-A	4	vn1	-9.04	53	n	-8.73	5
Sulfatacija							
K-3-OSulf	4	n	-9.24	63	vn4	-8.31	8
K-3-OSulf-4'-A	30	Va	-9.66				4
K-3-OSulf-7-A	3	n	-10.51	67	vs/ob	-9.21	6
K-3-OSulf-o-kvinon	19	Va	-9.23	22	vn4	-8.19	10
K-7-OSulf	10	n	-12.11	52	vs/ob	-8.65	12
K-7-OSulf-o-kvinon	19	n	-11.89	41	vs/ob	-9.26	9
K-7-OSulf-p-kvinon	14	n	-11.07	39	vs/ob	-9.52	7
K-3'-OSulf	10	n	-10.83	33	Vb	-8.71	10
K-3'-OSulf-3-A	12	n	-11.09	41	Va*	-9.6	15
K-3'-OSulf-4'-A	23	n	-11.61	38	Va	-10.74	7
K-3'-OSulf-7-A	3	n	-10.65	37	vs/ob	-8.75	15
Glukuronidacija							
K-3-OG	35	Vb	-8.19				20
K-3-OG-4'-A	26	Va	-9.36	39	Vb	-8.97	18
K-3-OG-7-A	1	n	-9.50	16	Va	-8.08	13
K-3-OG-o-kvinon	33	Va	-9.48	45	Vb	-9.43	11
K-4'-OG	6	n	-9.51	39	Va. G izvan	-8.28	16
K-3-OG-3'-OMe	11	Va	-8.7	22	Vb	-8.58	27

Oznake kao u tablicama 9 i 15.

Tablica 18. Rezultati molekulskog uklapanja kvercetina i njegovih metabolita u PVM1 strukture BSA 4OR0. 3D strukture pripremljene se u programu Marvin s parc. at. nabojima izračunatim u programu AD.

	najpovoljniji			najzastupljeniji			
METABOLIT	% konf.	Način vezanja	E_v/ kcal/mol	% konf.	Način vezanja	E_v/ kcal/mol	# klastera
kvercetin, K	28	n	-7.87	36	vn4	-6.59	5
K-4'-A	13	vn1	-8.38	33	n	-7.87	7
K-7-A	34	n	-8.46	41	vs/ob	-6.81	7
K-o-kvinon	8	vn1	-8.2	29	n	-7.92	5
K-p-kvinon	32	n	-8.27				6
Metilacija							
K-3'-OMe	16	vn1	-8.07	18	n	-7.34	10
K-3'-OMe-3-A	24	vn1	-8.56	45	vs/ob	-7.54	9
K-3'-OMe-4'-A	19	vn1	-8.65	26	vs/ob	-7.15	10
K-3'-OMe-7-A	35	vn1	-8.35	42	vn4	-7.07	5
K-3'-OMe-p-kvinon	8+29	n	-8.4	57	vs/ob	-8.18	5
K-4'-OMe	7	vn1	-8.44	19	n	-7.97	10
K-4'-OMe-3-A	5	vn1	-8.94	30	n	-8.03	7
K-4'-OMe-7-A	6	vn1	-8.6	33	n	-8.5	13
Sulfatacija							
K-3-OSulf	10	vs/ob	-7.79	60	vn4	-6.78	9
K-3-OSulf-4'-A	7	vs/ob	-7.86	50	Vb	-7.39	13
K-3-OSulf-7-A	27	vs/ob	-8.35	58	vn4	-7.2	9
K-3-OSulf-o-kvinon	23	Va	-8.26	26	Vb	-7.64	10
K-7-OSulf	19	n	-9.6	39	vs/ob	-8.68	7
K-7-OSulf-o-kvinon	15	n	-11.48	43	vs/ob*	-8.8	9
K-7-OSulf-p-kvinon	20	n	-10.62	38	vs/ob*	-8.91	5
K-3'-OSulf	8	n	-10.15	38	Va	-8.11	10
K-3'-OSulf-3-A	22	n	-10.73	40	Va	-8.68	9
K-3'-OSulf-4'-A	10	n	-10.74	50	Vb	-8.71	5
K-3'-OSulf-7-A	9	n	-10.71	39	Va	-8.56	11
Glukuronidacija							
K-3-OG	54	Va	-7.48				20
K-3-OG-4'-A	35	Vb	-8.15				17
K-3-OG-7-A	27	Va	-8.24	30	vn4	-7.26	18
K-3-OG-o-kvinon	55	Va	-8.54				15
K-4'-OG	7	Va	-7.7	35	Vb	-7.08	10
K-3-OG-3'-OMe	1	n*	-8.67	18	Vb	-7.8	34

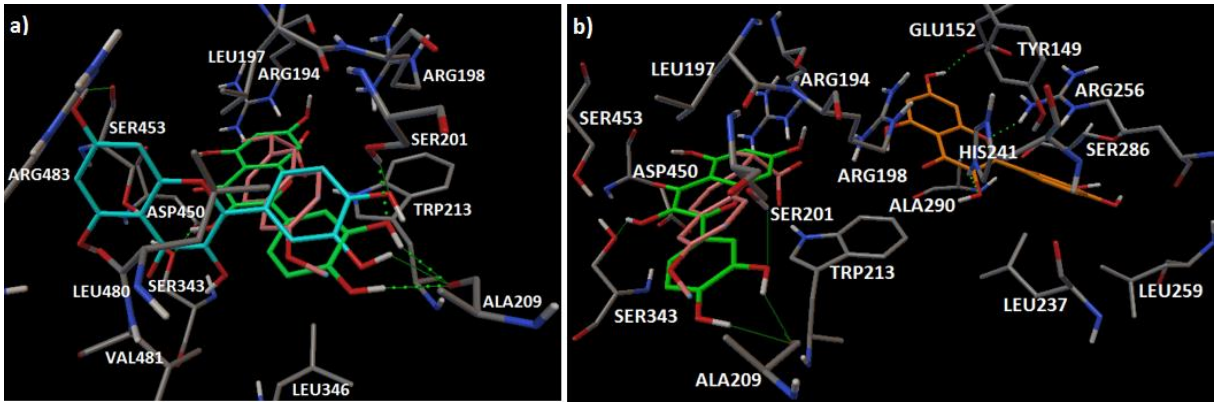
Oznake kao u tablicama 9 i 15.

3.6.2. Učinak metaboličkih transformacija na vezanje kvercetina

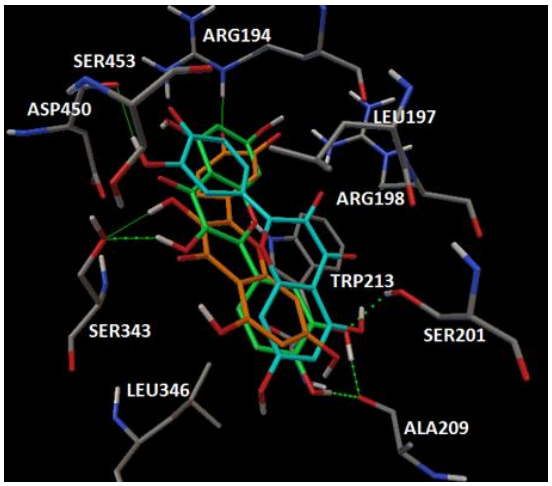
Rezultati molekulskog uklapanja pokazuju da se kvercetin i njegovih metaboliti različito vežu u ljudski i goveđi SA. Kvercetin se u BSA veže u procjep između domena II i III, tj. izvan varfarinskog VM1 (tablica 18, slika 38 a). Najzastupljeniji klaster je odgovarao načinu vezanja vn4 unutar VM1, u kojem kvercetin u BSA ostvaruje slične interakcije kao i u HSA (slika 38 b).

Međutim, kako je taj klaster veći od prvog, energijski najpovoljnijeg, za svega 8 konformacija, ali pripadnom energijom vezanja nepovoljniji za 1.28 kcal/mol, kao reprezentativan način vezanja kvercetina u BSA odabran je način n (slika 38 b). S nabojima iz Marvina, predviđeno vezanje također u procjepu, ali na način vn1 (tablica 17, slika 20 b i 38 a).

Deprotonacija kvercetina ne mijenja naproksenski način vezanja, n, kvercetina, ali je predviđeno da povećava afinitet kvercetina za BSA (tablice 17 i 18). Za kvinone kvercetina su također predviđeni analogni položaji vezanja na BSA kao za aglikon. No, orijentacija kvinoskih oblika u veznom mjestu je obrnuta u odnosu na aglikon (slika 39).

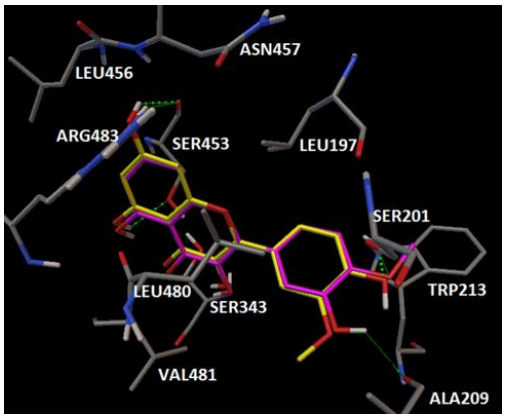


Slika 38. Vezanja kvercetina u PVM1 u strukturi BSA 4OR0. a) Energijski najpovoljniji načini vezanja predviđeni s parc. at. nabojima izračunatim u programu AD (zelena) i Marvin (cijan). b) Najpovoljniji način vezanja (n) u procjepu (zelena) i najzastupljeniji način vezanja (vn4, narančasta), predviđeni sa strukturom s parc. at. nabojima iz programa AD. Kristalografski položaj vezanja naproksena označen je ružičasto.



Slika 39. Predviđeni načini vezanja n za *o*-kvinon (narančasta) i *p*-kvinon kvercetina (cijan) u odnosu na predviđeni način vezanja aglikona kvercetina (zelena).

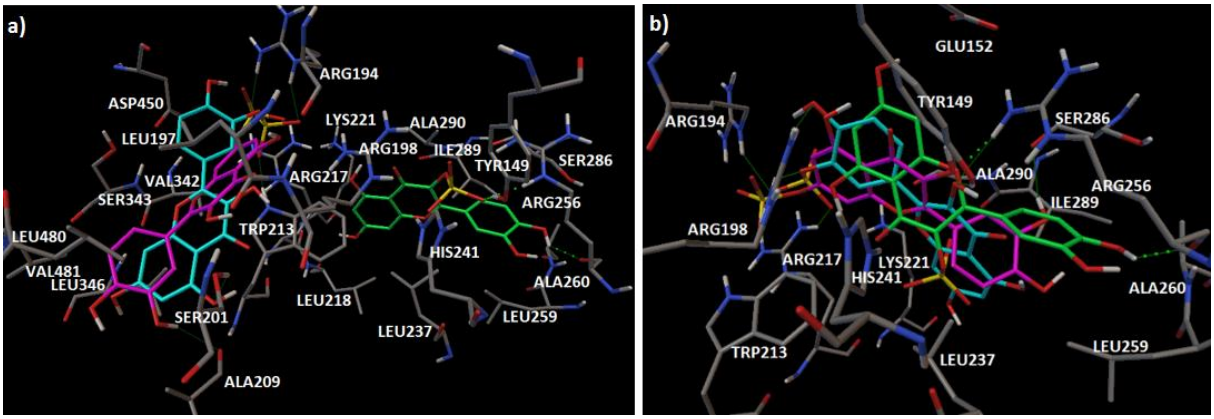
Za metilirane metabolite kvercetina također je predviđeno da se preferentno vežu u procjep, tj. izvan VM1. Vezni način vn1 (slika 40) predviđen je kao energijski povoljniji od načina n za oba metilirana metabolita (tablice 17 i 18). Deprotonacija etera snižava energiju vezanja za sve ispitivane anionske oblike, kao i u slučaju aglikona.



Slika 40. Predviđeni načini vezanja (vn1) 3'-metil- (žuta) i 4'-metil-kvercetina (ružičasta) u strukturi BSA 4OR0.

Energijski najpovoljniji načini vezanja za većinu sulfata odgovaraju naproksenskom načinu vezanju u procjepu, n (tablice 17 i 18). Međutim, najzastupljeniji načini vezanja odgovaraju vezanju sulfata kvercetina u VM1 BSA. Orijentacija 4-kromanonske jezgre u VM1 (vn4, Va, Vb, vs/ob) određena je položajem sulfatne grupe i njenim interakcijama s BSA. U 3-*O* izomeru, za koji se može očekivati vezanje unutar VM1, sulfatna grupa tvori interakcije s His241 te s Arg256 i Tyr149 (slika 41). U 3'-*O* i 7-*O* izomerima, sulfatna grupa je smještena pri ulazu u VM1 gdje tvori interakcije s pozitivno nabijenim grupama aminokiselinskih ostataka Arg194, Arg199, Arg217, Lys221 (slika 41). I u načinu vezanja n, sulfatna skupina u oba ova izomera tvori interakcije s istim aminokiselinama.

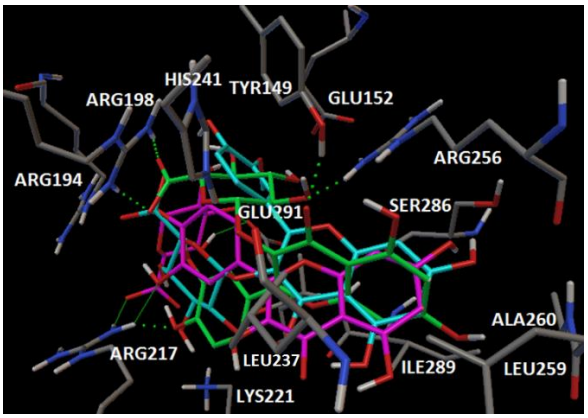
Dok je za ljudski albumin predviđeno najpovoljnije vezanje 3'-*O*-sulfata (tablice 9 i 10), za goveđi albumin najpovoljnija energija vezanje je predviđena za 7-*O*-sulfat i njegove oksidirane kvinonske oblike koji su zadržali isti način vezanja kao i neoksidirani oblik (tablice 17 i 18). Najmanji afiniteti vezanja za BSA, manji od aglikona, kada se normira energija vezanja s brojem „teških“ atoma, predviđeni su za 3-*O* izomer. Deprotonacija OH grupa snižava energiju vezanja, naročito za kvercetin-3'-*O*-sulfat.



Slika 41. Predviđeni načini vezanja sulfata kvercetina u strukturi BSA 4OR0 a) s najpovoljnijom energijom vezanja i b) najzastupljeniji za kvercetin-3'-*O*-sulfat -cijan, kvercetin-3-*O*-sulfat –zelena i kvercetin-7-*O*-sulfat - ružičasta.

Od svih promatranih metabolita kvercetina jedino za glukuronide nije predviđeno vezanje u procjep, nego unutar VM1 BSA (tablice 17 i 18). Za sva tri glukuronida COO^- grupa glukuronskog fragmenta tvori interakcije s argininskim ostacima Arg217, Arg194 i Arg198. Kromanonski dio A/C i prsten B su smješteni u skladu s tim dominantnim interakcijama (slika 42).

Kao i u slučaju ostalih metabolita, deprotonacija 3'-OH ili 4'-OH grupe te njihova oksidacija u kvinonski oblik povećavaju afinitet vezanja 3-*O*-glukuronida na BSA. Za razliku od humanog albumina, prema dobivenim rezultatima 4'-*O*-glukuronid se veže na goveđi albumin i to unutar VM1.



Slika 42. Predviđeni načini vezanja glukuronida kvercetina (Marvin_AD) u strukturu BSA 4OR0. Kvercetin-3-*O*-glukuronid (zelena) vezan je na način Va, a 3'-*O*-metil-kvercetin-3-*O*-glukuronid (cijan) i kvercetin4'-*O*-glukuronid (ružičasta) na način Vb.

3.6.3. Molekulsko uklapanje katehina i njihovih metabolita

Za uklapanje katehina i njihovih metabolita u strukturu BSA 4OR0 korištene su početne strukture generirane programom Marvin, s parc. at. nabojima izračunatim u AutoDocku. Rezultati uklapanja ovih struktura prikazani su u tablici 19.

3.6.3.1. Vezanje EGCG-a i njegovih metabolita

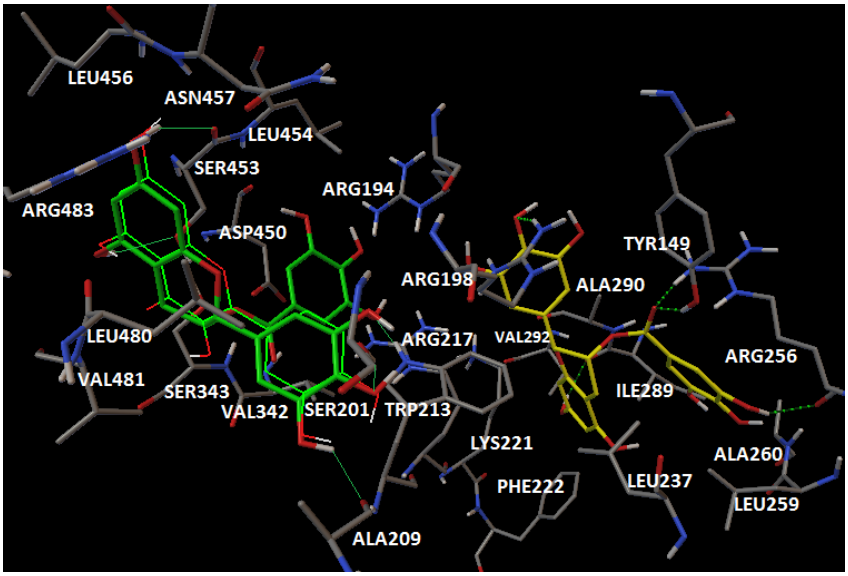
Za EGCG je molekulskim uklapanjem u albumin BSA predviđeno vezanje izvan VM1, u načinu vn1, vrlo malim postotkom konformacija, ali s vrlo povoljnom energijom vezanja (tablica 19). Taj način vezanja u BSA jedan je od predviđenih i za kvercetin, pri čemu ova dva polifenola mogu ostvarivati slične interakcije s BSA (slika 43). U tom načinu vezanja galoilna grupa D ostvaruje interakcije s Arg194, Arg217 i Asp450, dok 3'-OH grupa galoilnog prstena B ostvaruje H-vezu s Trp213.
No, najzastupljeniji položaj vezanja EGCG-a je unutar VM1, kao i u HSA.
Međutim, i način vezanja EGCG-a u VM1 BSA razlikuje se od onog predviđenog za vezanja u HSA (Va), kao i od načina vezanja kvercetinskih metabolita u VM1 BSA. U njemu je EGCG smješten u VM1 okomito, prstenom B prema gore, pri čemu skupina 4'-OH ostvaruje H-veze s Arg198 (slika 43). Prsten D je smješten u stražnji dio VM tvoreći H-veze s Tyr149 i Arg256.

Deprotoniranje, bilo jedne grupe OH na položaju 4' ili 4'' ili obje te grupe, nije dovelo do promjene mogućeg načina vezanja EGCG-a u BSA, ali je povećalo njegov afinitet za vezanje na BSA zbog povoljnijih ionskih interakcija nastalih fenoksidnih aniona s odgovarajućim argininskim ostacima npr. Arg198 (slika 43, tablica 19).
Međutim, metiliranje skupina 4“-OH i 4'-OH, iako nije promijenilo način vezanja u PVM1, smanjilo je afinitet vezanja EGCG-a na BSA (tablica 19). Za 4'-*O*-sulfat EGCG-a predviđeno je, različito nego za HSA, da se u BSA veže u procjepu na način n, a prema dobivenim energijama vezanja 3'-O i 4“-*O*-glukuronidi EGCG-a se ne vežu na BSA.

Tablica 19. Rezultati molekulskog uklapanja (Marvin_AD) EGCG-a, njegovih anionskih oblika i metabolita, te EGC-a i EC-a i njihovih metabolita, u PVM1 strukture BSA-a 4OR0.

METABOLIT	najpovoljniji			najzastupljeniji			# klastera
	% konf.	Način vezanja	Ev/ kcal/mol	% konf.	Način vezanja	Ev/ kcal/mol	
EGCG	3	vn1	-10,96	41	okomito-u VM1	-8,47	21
EGCG-4'-A	2	vn1	-10,86	60	okomito-u VM1	-9,07	13
EGCG-4''-A	2	vn1	-11,52	61	okomito-u VM1	-8,73	10
EGCG-4',4''-DiA	4	vn1	-11,5	63	okomito-u VM1	-9,36	12
4''-OMe-EGCG	3	vn1	-9,66	24	okomito-u VM1	-7,41	35
4',4''-Di-OMe-EGCG	1	n	-8,74	17	okomito-u VM1	-7,19	39
EGCG-4'-OSulf	1	n	-10,99	14	n	-6,85	31
EGCG-3'-OG	1	djelomično u VM1	-7,14	6	djelomično u VM1	-6,05	53
EGCG-4''-OG	10	djelomično u VM1	-6,62	11	djelomično u VM1	-6,17	47
EGCG-4''-OG-4'-A	6	vn4	-7,86	11	vs/ob	-7,43	40
EGC	35	n	-7,77				11
4'-OMe-EGC	15	n	-7,65	31	Vb*/u VM1	-5,94	13
EC	11	vn1	-8,37	19	n	-8,21	9
3'-OMe-EC	18	vn1	-8,53	33	Vb	-6,64	10
EC-3'-OSulf	6	n	-10,25	53	Vb	-8,66	6
EC-5-OG	3	n	-8,44	24	Vb*/u VM1	-7,01	22
EC-3'-OG	3	Va	-8,29	15	vn4	-7,86	24
3'-OMe-EC-5-OG	2	n*	-8,44	22	Va	-7,25	30
γ-valerolakton-DiOH	13	izvan VM1	-6,66	29	u VM1	-6,06	15
γ-valerolakton-TriOH	13	izvan VM1	-6,46	31	u VM1	-5,99	12

Oznake kao u tablicama 9 i 15.



Slika 43. Predviđeni načini vezanja EGCG-a u PVM1 strukture 4OR0 BSA-a, u procjepu (vn1, zelena) i u VM1 (žuta). Položaj vezanja vn1 kvercetina u BSA u odnosu na naznačen je zelenim linijama, dok je analogan način vezanja EGCG-a prikazan 'štapićima'.

3.6.3.2. Vezanje EGC-a i njegovih metabolita

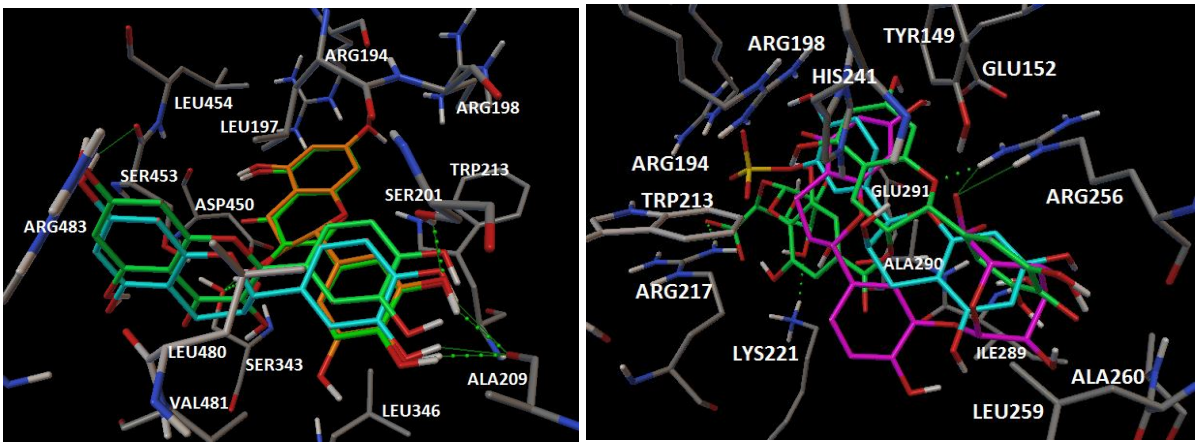
Uklapanjem EGC-a i njegovog metabolita metiliranog na položaju 4', predviđen je način vezanja n izvan VM1, tj. u procjepu albumina, analogno rezultatima dobivenim za kvercetin (tablica 19, slika 44 a). Katehin EGC ostvaruje i gotovo identične interakcije kao kvercetin (poglavlje 3.6.2., slika 38 a). Energije vezanja EGC-a i kvercetina su također slične.

3.6.3.3. Vezanje EC-a i njegovih metabolita

Uklapanjem EC-a i njegovog 3'-O metiliranog metabolita predviđeno je vezanje u procjepu, na način vn1 ili n (tablice 18 i 19, slika 44 a), slično kao i za kvercetin (tablica 10). Energija vezanja EC-a u načinu vn1 povoljnija je od one predviđene za kvercetin (Marvin_AD). Neplanarnost prstena C u flavanalu EC-u, u odnosu na flavonol kvercetin, je omogućila ostvarivanje H-veze njegove grupe 3-OH sa Ser343 BSA (slika 44 a).

Kao i u slučaju kvercetina, sulfatacija EC-a povoljno utječe na njegovo vezanje na BSA. Sulfatna grupa i u načinu vezanja n u procjepu i Vb unutar VM1 ostvaruje interakcije s pozitivno nabijenim aminokiselinama na ulazu u VM1 Arg194, Arg198, Arg217 i Trp213.

Za razliku od sulfatacije, glukuronidacija ovog katehina nije povećala njegov afinitet za vezanje na BSA (tablica 19, slika 44 b).



Slika 44. a) Predviđeni načini vezanja EGC-a (n, narančasta) i EC-a (vn1, cijan) BSA u odnosu na analogne predviđene načine vezanja kvercetina (zelena). b) Predviđeni načini vezanja u unutrašnjosti VM1: EGCG-4''-*O*-glukuronid-4-A (vn4, zelena), EC-3'-*O*-sulfat (Vb, cijan) i EC-3'-*O*-glukuronid (vn4, ružičasta) u VM1 BSA.

3.6.3.4. Vezanje valerolaktona

Za valerolaktone su predviđeni načini vezanja u BSA slični onima u HSA. Zbog njihove male i fleksibilne strukture oni se mogu uklopiti i u procjep i unutar VM1 sa sličnim afinitetom (tablica 19).

RASPRAVA

4. RASPRAVA

Zbog visokog stupnja homologije između aminokiselina koje definiraju VM1 u HSA i BSA, fizikalno-kemijska svojstva tunela, odnosno šupljine tog veznog mjesta u oba serumska albumina vrlo su slična. Ukupni naboj VM1 je općenito pozitivan. Isključenost Lys221 iz VM1 u strukturama BSA uzrok je manjeg ukupnog naboja. VM1 je polarno tj. hidrofilnog karaktera u oba SA (negativan indeks hidropatije), te se može očekivati da će povoljnije vezati ligande sličnih svojstava, osobito one negativno nabijene. To je u skladu s poznatim afinitetom lijekova takvih svojstava prema VM1 (Ghuman i sur. 2005). VM1 u strukturi HSA 2BXD nešto je hidrofobnije nego u ostale tri strukture zbog većeg doprinosa Leu238 i Leu219.
Duljina i širina tunela razlikuju se od strukture do strukture. S obzirom na širinu tunela, apo forme HSA i BSA (1AO6 i 4F5S) su sličnije nego njihove konformacije u kompleksu s ligandima (2BXD i 4OR0), što ukazuje na konformacijske promjene aminokiselinskih ostataka u VM1 prilikom vezanja liganada (Ghuman i sur. 2005). Točke najmanjeg radijusa predstavljaju „usko grlo“, koje se može interpretirati kao mjesto selekcije liganada na temelju mogućnosti prolaska kroz njega. U apo formama, 1AO6 i 4F5S, „usko grlo“ se nalazi na ~4 Å. Slično je i u strukturi 4OR0 gdje je u VM1 vezan di(hidroksietil)eter. Međutim, vezanje 3 molekule liganda naproksena izvan VM1, ali u njegovoj blizini, se odrazilo na konformaciju, tj. širinu VM1 u strukturi 4OR0. U strukturi 2BXD s vezanim varfarinom, profil VM1 je različit, s „uskim grlom“ na ~5 Å, što ukazuje na mogućnost smještanja većih molekula u VM1 te strukture. „Usko grlo“ u strukturi HSA 2BXD čine Lys199, Trp214, Arg218 i Arg222, a u strukturi BSA 4OR0 Arg198, Trp213, Arg217 i Ala290. Dakle, u oba SA, VM1 čine pozitivno nabijeni aminokiselinski ostaci i aromatski triptofanski ostatak što je u skladu s afinitetom tog VM1 za negativno nabijene lipofilne spojeve (Ghuman i sur. 2005, Gleeson 2008). Primjer takvih spojeva su i prirodni polifenoli.

Analiza glavnih komponenti na skupovima polifenola kvercetina i katehina EGCG-a, EGC-a i EC-a te njihovih metabolita je pokazala kako metaboličke modifikacije utječu na fizikalno-kemijska svojstva kvercetina te time i na svojstva ADME.
Glukuronidi, najveći proučavani metaboliti, karakterizirani su i najvećim polarnim i hidrofobnim površinama. Općenito su glukuronidi, i sulfati kao najtopljiviji metaboliti, najhidrofilnije molekule u proučavanom skupu. Prosječne vrijednosti particijskog koeficijenta logP za glukuronide 0.04 i za sulfate 0.31 su znatno manje od logP kvercetina 2.08. Zbog toga je za ove metabolite predviđena najmanja sposobnost prolaska kroz membrane modelnih stanica (CACO2). VolSurf+ je predvidio i da sulfatacija i glukuronidacija značajno smanjuju vezanje na HSA, dok bi kapacitet za prolazak kroz krvno-moždanu barijeru trebao biti značajno manji jedino za glukuronidne konjugate.
Nasuprot njima, najveće vrijednosti particijskog koeficijenta između oktanola i vode (logP), permeabilnosti kroz membrane modelnih stanica (CACO2) i logaritam permeabilnosti kroz krvno-moždanu barijeru (LgBB), uz sam kvercetin, imaju i njegovi metilirani metaboliti kao i njegovi oksidirani kvinonski oblici. Metilacija flavonoida rezultira pojačanim membranskim transportom, što utječe na njihovu apsorpciju i biodostupnost (Walle 2009), te upravo metilirani derivati mogu imati pojačanu aktivnost npr. inhibicije proliferacije stanica raka (Walle i sur. 2007).
Najveće promjene u svojstvima ADME kvercetina i katehina posljedica su uvođenja negativno nabijenih grupa velike molekulske mase, sulfatne ili glukuronatne. S obzirom na izračunate vrijednosti, kvercetin se srednje jako veže na HSA, dok se sulfati i glukuronidi ne

bi trebali vezati. No predviđena vrijednost PB za kvercetin od 60% (srednja) je bliska onoj predviđenoj u ovom radu i značajno podcijenjenoj za varfarin (61.7%, za razliku od eksperimentalne vrijednosti 99.2% (Valko i sur. 2003)). Također, predviđanje da sulfatacija i glukuronidacija znatno smanjuju afinitet promatranih polifenola za vezanje na albumin nije u skladu s eksperimentalnim rezultatima (Janisch i sur. 2004, Xiao i Kai 2012). Dakle, može se očekivati da VolSurf+ podcjenjuje afinitet promatranih spojeva za vezanje na HSA, što je u ovom radu proučavano molekulskim uklapanjem u strukturu 2BXD.

Detaljna analiza rezultata molekulskog uklapanja varfarina, liganda u odabranoj strukturi HSA 2BXD, i ostalih testnih spojeva, omogućila je bolje razumijevanje modela i metoda korištenih za molekulsko uklapanje i analizu rezultata za kvercetin i katehine zelenog čaja, te njihove metabolite, kao i deprotonirane i dvostruko oksidirane oblike.

Vezanje varfarina u VM1 HSA do sada je istraživano računalnim metodama molekulskog uklapanja i molekulske dinamike (Johari i sur. 2014, Deeb i sur. 2010). No detaljna analiza utjecaja početne strukture, ukupnog naboja te parcijalnih atomskih naboja na uklapanje nije opisana. Stoga je u ovom radu ispitan utjecaj ovih faktora na molekulsko uklapanje varfarina u VM1 albumina HSA.

S obzirom na vrijednost negativnog logaritma ravnotežne konstante disocijacije kiseline, pK_a = 5.0 (Hiskey i sur. 1962), skupina 4-OH varfarina je deprotonirana pri pH ~ 7 (ujedno i pH pri kojem su kristalografske strukture njegovih kompleksa s HSA, 2BXD i 1H9Z određene). Budući da je razlog kiselosti te skupine delokalizacija negativnog naboja kroz pironski prsten, istražen je utjecaj aromatičnosti, karakterizirane ravnomjernom raspodjelom parc. at. naboja u početnim strukturama, na reprodukciju kristalografskog načina vezanja *R*-varfarina iz strukture 2BXD molekulskim uklapanjem.

U radu Ibrahim i sur. (2015) pokazano je da priprema struktura u različitim programima također može utjecati na rezultate virtualnog probira spojeva molekulskim uklapanjem. Strukturni parametri koji mogu dovesti do neusklađenosti rezultata su: i) različit odabir protonacijskog i tautomernog stanja liganada i proteina i ii) različita početna 3D konformacija molekula, koja utječe i na odabir parametra polja sila programa za molekulsko uklapanje. Najveće razlike rezultata uklapanja bile su uočene za strukture s najvećom fleksibilnosti, kao što su molekule s većim brojem rotabilnih veza ili mnogočlane prstenaste molekule (Ibrahim i sur. 2015), što je potvrđeno i u ovom radu.

S računskog aspekta, početne konformacije i parc. at. naboji utjecali su na rezultate molekulskog uklapanja AutoDockom kroz broj predviđenih načina vezanja i njihovu napučenost. Vrijednosti predviđenih energija vezanja ovisile su prvenstveno o parc. at. nabojima, što je karakteristika pristupa temeljenih na upotrebi polja sila (Bikadi i Hazai 2009). Iako su u većini slučajeva početne konformacije metabolita izračunate s tri programa bile međusobno slične, parc. at. naboji izračunati različitim programima međusobno su se razlikovali, naročito za anione. Upotreba raznih početnih konformacija i parc. at. naboja omogućila je da se detaljnije i vjerodostojnije istraži utjecaj metaboličkih transformacija na vezanje proučavanih polifenola na serumske albumine.

Usporedba kristalografskih struktura kompleksa HSA s *R*-varfarinom, 2BXD i 1H9Z, sa strukturom kompleksa sa *S*-varfarinom, 1HA2, pokazuje da se oba enantiomera vežu jednako, na isto mjesto i na jednak način. Uklapanjem raznih početnih struktura *R*- i *S*-enantiomera varfarina u vezna mjesta VM1 i PVM1 pomoću AutoDocka predviđeno mjesto vezanja bilo je jednako i odgovaralo je onom eksperimentalno određenom, tj. VM1. Međutim, kristalografski način vezanja nije jednoznačno bio reproduciran.

Bez obzira na početnu konformaciju i vrijednosti at. naboja, način vezanja *R*-varfarina predviđen kao energijski najpovoljniji u ovom radu bio je jednak za sve početne strukture aniona 4-O^-. Također, sa svim početnim strukturama, sa sličnim energijama vezanja je predviđen kristalografski položaj vezanja 2-kromanonske jezgre, no uglavnom s obrnutom orijentacijom u odnosu na onu kristalografsku iz strukture 2BXD, tzv. način vezanja Vb.
Ovi rezultati se razlikuju od onih u radu Johari i sur. (2014), gdje su molekulskim uklapanjem neutralnog varfarina u VM1 strukture 1H9Z, bez molekule vode, pomoću AutoDocka predvidjeli kao položaj vezanja *R*-varfarina onaj kristalografski. Međutim, to VM1 je „nepotpuno“ zbog toga što nedostaje bočni ogranak ključne aminokiseline Lys199.
Kristalografski način vezanja iz strukture 2BXD u našem je radu točno reproduciran, s obzirom i na smještaj i orijentaciju kromanonskog prstena i supstituenata, jedino uklapanjem struktura M2 i OB u strukturu HSA 2BXD. Za razliku od ostalih početnih struktura, u ovima je at. naboj na atomima 2-O i 4-O bio podjednak, što je karakteristika deprotoniranog 4-O^- aniona varfarina. Također, u obje ove strukture orijentacija fenilnog prstena i oksobutilne skupine na atomu 11-C bila je analogna onoj u kristalografskoj strukturi varfarina iz 2BXD. Dodatno, duljina veza strukture OB je bila u skladu s onima *R*-varfarina iz kompleksa 2BXD, što je vjerojatno doprinijelo postizanju interakcija s analognim aminokiselinama albumina kao u kristalografskoj strukturi. Međutim, u radu Ghuman i sur. (2005), autori ističu ekvivalentnost interakcija karbonilnih kisikovih atoma varfarina s aminokiselinama Lys199 i Arg222. Ta ekvivalentnost omogućuje analogan način vezanja R- i S- enantiomera varfarina, te isto tako ne isključuje mogućnost vezanja varfarina na način Vb, u odnosu na Va koji je naveden za strukturu 2BXD.
U bazi PDB-u, osim kompleksa HSA s varfarinom, bile su dostupne i kristalografske strukture kompleksa HSA s ligandima veznog mjesta VM1 indometacinom (2BXM, 2BXK) i salicilnom kiselinom (2I30 i 3B9M) te veznog mjesta VM2 ibuprofenom (2BXG) i oksazepamom (2BXF) (Ghuman i sur. 2005, Yang i sur. 2007, Zhu i sur. 2008), te su i one korištenje za testiranje molekulskog uklapanja AutoDockom. Iako je kristalografski način vezanja točno predviđen molekulskim uklapanjem jedino za ibuprofen (u VM2), za sve testne ligande preferentna mjesta vezanja su uspješno predviđena. Time je opravdano očekivanje uspješnosti AutoDocka i u predviđanju položaja vezanja kvercetina i katehina te njihovih metabolita.
Razlike u vrijednostima parc. at. naboja na ligandima testnog skupa, izračunatim različitim programima, iako nisu znatno utjecale na predviđanje načina vezanja, imale su u nekim slučajevima velik utjecaj na procijenjene energije vezanja. To je ukazalo na važnost njihovog razmatranja prilikom analize rezultata i međusobne usporedbe afiniteta vezanja proučavanih metabolita.
Zbog strukturne sličnosti varfarina i kvercetina, pretpostavljeno je da se kvercetin i njegovi metaboliti, barem oni slične veličine, vežu u isto vezno mjesto, VM1, kao i varfarin. Stoga je molekulsko uklapanje kvercetina i njegovih metabolita provedeno na analogan način kao i za varfarin (i testne spojeve) u prošireno varfarinsko vezno mjesto PVM1. Dobiveni rezultati su potvrdili polaznu pretpostavku. Kvercetin i gotovo svi njegovi metaboliti vezali su se u VM1 u strukturi HSA 2BXD. Međutim, predviđeni načini vezanja nisu u svim slučajevi bili analogni onima za anion varfarina.
U načinu vezanja u unutrašnjosti VM1, vn4, kvercetin je stvarao interakcije s istim aminokiselinskim ostacima kao i *R*-varfarin. Vezani kvercetin je neplanaran, s prstenom B zarotiranim u odnosu na planarni kromanonski dio A/C, u skladu s eksperimentalnim, spektroskopskim podacima (Zsila i sur. 2003). Predviđena energija vezanja kvercetina na način vn4 unutar VM1 HSA, u rasponu -7.21 do -7.25 kcal/mol, je također u skladu s

eksperimentalnim rezultatima u radu Sengupta i Sengupta (2002), u kojem je fluorescencijskom spektroskopijom utvrđeno da se kvercetin veže na HSA u blizini Trp214, s promjenom slobodne energije Δ*G*=-7.20 kcal/mol. Bolli i sur. (2010) također su eksperimentalno odredili sličnu Δ*G* za vezanje kvercetina na HSA -7.46 kcal/mol. U radu Rawel i sur. (2005) određena je Δ*G* za HSA nešto niža, -8.13 kcal/mol, što je sličnije rezultatima dobivenim s parc. at. nabojima iz programa Marvin u istom načinu vezanja, a također je bliže energijama vezanja predviđenim za anione kvercetina. Stoga se može zaključiti da je predviđeni način vezanja kvercetina unutar VM1 u HSA znatno vjerojatniji nego onaj u procjepu između domena II i III, vn1, bez obzira na protonacijsko stanje.

Pri pH ~7.4 kvercetin je prisutan i kao neutralan i kao anion (Stepanić i sur. 2013). Prema našim rezultatima, u oba ionska stanja kvercetin se analogno veže na HSA. Prema rezultatima s parc. at. nabojima iz AutoDocka, anioni kvercetina se vežu u VM1 HSA nešto povoljnije, što je u skladu su s eksperimentalnim rezultatima koji pokazuju da sniženje pH povećava konstantu disocijacije kvercetina (Rawel i sur. 2005, Doufur i Dangles 2005).

Budući da i ostali predviđeni načini vezanja - vn1 u središnjem procjepu HSA, kao i Va, Vb te vs/ob u VM1 koji predstavljaju vezanje promatranih aniona - odgovaraju nekima od lokalnih minimuma energije vezanja, i oni ukazuju na potencijalna mjesta vezanja kvercetina i njegovih derivata. Način vezanja vn1 u središnjem procjepu također može indicirati put ulaska ovih molekula u VM1. Ovi primjeri demonstrirali su da upotreba raznih početnih konformacija i parc. at. naboja u molekulskom uklapanju pruža opširnije i detaljnije rezultate, čime omogućuje precizniju analizu.

Iako ne postoje eksperimentalni podaci za vezanje kratkoživućih kvinonskih oblika kvercetina na albumin, iz rezultata ovog rada može se pretpostaviti da se i ovi dvostruko oksidirani oblici vežu na analogan način i sličnim afinitetom kao i aglikon.

Kvercetin može biti metiliran na jednoj od dvije kateholne skupine, češće 3'-OH (Mullen i sur. 2006). Utjecaj metilacije kvercetina na afinitet prema SA ispitivan je u radu Doufur i Dangles (2005), prema kojem metilacija grupe 3'-OH smanjuje afinitet vezanja kvercetina u BSA, ali nema značajan utjecaj na afinitet vezanja na HSA. Prema našim rezultatima, metiliranje ovih grupa ne utječe značajno na mjesto, način i afinitet vezanja kvercetina na HSA. Deprotoniranje kiselih hidroksilnih grupa (3-OH, 4'-OH ili 7-OH), dvostruka okisidacija u *p*-kvinonski oblik ili metilacija nisu utjecale značajno na položaj i afinitet vezanja. Stoga ovaj rezultat molekulskog uklapanja daje pouzdanu potvrdu poznatih eksperimentalnih rezultata i omogućuje pretpostavku rezultata za koje eksperimentalni rezultati nisu dostupni.

Sulfatacija je, kao i metilacija, moguća na nekoliko položaja, ovisno o enzimima, sulfotransferazama, koje sudjeluju u tom metaboličkom procesu (Mullen i sur. 2006, O'Leary i sur. 2003). Najčešća je sulfatacija kvercetina na položaju 3', a u ovom je radu proučavan i utjecaj sulfatacija na položajima 3 i 7 (Day i sur. 2001, Mullen i sur. 2006, Lee i sur.2012). Najpovoljnije vezanje među sulfatiranim metabolitima predviđeno je za kvercetin-3'-*O*-sulfat, ujedno i najzastupljeniji sulfatirani metabolit kvercetina u krvnoj plazmi.

Eksperimentalno određene konstante vezanja kvercetin-7-*O*-sulfata i kvercetin-3-*O*-sulfata na HSA određene su kao nešto više od one za kvercetin (Doufur i Dangles 2005). I Janisch i sur. (2004) odredili su sličan odnos vrijednosti konstanti 'gašenja' fluorescencije Trp214 ovim metabolitima. Međutim, niže su, i međusobno slične vrijednosti, dobili za kvercetin-3'-*O*-sulfat i aglikon, što odgovara njihovim većim afinitetima za vezanje na HSA.

Budući da su mjesto vezanja, kao i afiniteti vezanja sulfata kvercetina, predviđeni u ovom radu, vrlo slični onima predviđenim za varfarin i ostale lijekove koji se vežu u VM1, korištene

za testiranje uklapanja u strukturu 2BXD, može se pretpostaviti da ovi kvercetinski metaboliti mogu značajnije utjecati na transport i bioraspoloživost lijekova u krvi.
Za razliku od toga, glukuronidacija se nije pokazala toliko povoljnom modifikacijom za vezanje na HSA. U radu Janisch i sur. (2004) određeni su također slabiji afiniteti kvercetin-3-*O*-glukuronida i 3'-*O*-metil-kvercetin-3-*O*-glukuronida za HSA u odnosu na aglikon. Najslabiji je afinitet u tom radu određen za kvercetin-4'-glukuronid, za koji su i molekulskim uklapanjem u ovom radu predviđeni vrlo nepovoljni načini i energije vezanja na HSA. S obzirom na veličinu glukuronida kvercetina, može se zaključiti da njihove interakcije s aminokiselinama u VM1 HSA nisu dovoljno povoljne kako bi se prevladala energetska barijera prilikom vezanja ovih metabolita. To može utjecati na njihovu veću slobodnu koncentraciju u plazmi i bioraspoloživost, ali i dostupnost za daljnje metaboličke modifikacije u jetri ili ciljnim tkivima (Mullen i sur. 2006, O'Leary i sur. 2003).

Rezultati molekuskog uklapanja katehina EGCG-a, EGC-a i EC-a, te njihovih metabolita, provedenog na analogan način kao i za kvercetin i njegove metabolite u PVM1 HSA, su potvrdili polaznu pretpostavku da se katehinski metaboliti također vežu u VM1 (ili djelomično vežu, ovisno o veličini). Predviđene energije vezanja u skladu su s rezultatima dobivenim eksperimentalnim metodama (Ishi i sur. 2011, Xiao i sur. 2010, Zinellu i sur. 2014), koji su pokazali da EGCG ima znatno veći afinitet za vezanje na HSA nego EGC i EC, koji se prema njihovim rezultatima vrlo slabo vežu na HSA. To sugerira važnost galoilne skupine EGCG-a za afinitet vezanja. Interakcije galoilne skupine u načinima vezanja predviđenim u ovom radu potvrdile su se kao vrlo povoljne za vezanje EGCG-a na HSA, kako u odnosu na EGC i EC, tako i u odnosu na kvercetin. Vezanje EGCG-a na protein nosač može imati zaštitnu funkciju za sprječavanje njegove oksidacije u plazmi, pri transportu do svih dijelova organizma i otpuštanja u ciljnim tkivima.
Metilacija je najčešća metabolička modifikacija, iako prisutna na svega 15% plazmatskog EGCG-a. On je uglavnom metiliran na dvije hidroksilne skupine, 4'- i 4''-OH (Sun i Ho 2008). Rezultati molekulskog uklapanja pokazali su da dimetiliranje grupa 4'-OH i 4''-OH ne mijenja ni način ni afinitet vezanja na HSA u odnosu na nemetilirani EGCG. Vezanje EGCG-4'-*O*-sulfata slično je onome kvercetin-3'-*O*-sulfata, sa značajno povoljnijom energijom vezanja. To ide u prilog pretpostavci da sulfatirani metaboliti polifenola mogu najznačajnije kompetirati za vezanje na HSA s lijekovima u plazmi. Glukuronidacija nije česta metabolička modifikacija EGCG-a (Sun i Ho 2008), a molekulsko uklapanje pokazalo je da smanjuje afinitet vezanja EGCG-a na HSA, prvenstveno zbog veličine nastalih metabolita koja onemogućuje njihovo optimalno smještanje u šupljinu VM1 HSA.

Molekulskim uklapanjem u BSA, kako u slučaju kvercetina i njegovih metabolita, tako i za katehine i njihove metabolite, predviđeni su znatno različiti načini vezanja nego u HSA. Razlog tome je prethodno opisana razlika u veličini i aminokiselinskom profilu VM1 u njihovim strukturama. Stoga je za znatan broj liganada s većim afinitetom predviđeno vezanje u procjep BSA.
U radu Rawel i sur. (2005) eksperimentalno je određeno da je Δ*G* vezanje kvercetina za HSA znatno niža (-8.13 kcal/mol) od Δ*G* za BSA (-7.2 kcal/mol), što odgovara rezultatima molekulskog uklapanja u ovom radu. Ipak, važno je napomenuti da dobiveni rezultati molekulskog uklapanja nisu dovoljan pokazatelj za usporedbu relativnih energija vezanja

istog spoja na različite proteine, već jedino za relativne energije vezanja niza različitih molekula na isti protein.
Utjecaj deprotonacije na predviđeni afinitet vezanja kvercetina na BSA u skladu je s eksperimentalnim podacima iz literature. U radu Rawel i sur. (2005) uočeno je da sniženje pH povećava konstantu disocijacije kvercetina s BSA, što sugerira da se i u BSA kvercetin preferentno veže kao anion. U radu Doufur i Dangles (2005) također je uočeno da sniženje pH rezultira značajnim smanjenjem konstante vezanja kvercetina na BSA.
Prema rezultatima u istom radu, vezanje metiliranog metabolita, 3'-*O*-metil-kvercetina, u BSA pokazalo je znatno slabiju promjenu fluorescencije u odnosu na nemetilirani oblik. Budući da energije vezanja izračunate u ovom radu ne sugeriraju slabiji afinitet vezanja metiliranih metabolita na BSA, vjerojatniji je razlog slabije promjene fluorescencije različit preferentni način vezanja metil-etera i aglikona kvercetina u središnji procjep proteina. Slabije interakcije s aminokiselinama na ulazu u VM1, uključujući i Trp213, u načinu vezanja vn1 u odnosu na način n, mogu biti razlog slabije promjene fluorescencije pri vezanju metil-kvercetina, iako su afiniteti vezanja slični.
U radu Doufur i Dangles (2005) također je eksperimentalno određena konstanta vezanja na BSA za kvercetin-7-*O*-sulfat slična onoj kvercetina, dok je za vezanje kvercetin-3-*O*-sulfata na BSA određena manja konstanta vezanja. To potvrđuju naši rezultati molekulskog uklapanja, kojima je i vezanje kvercetin-3'-*O*-sulfata predviđeno sa sličnim afinitetom kao 7-*O*-izomera, iako je predviđen različit način vezanja triju sulfatiranih oblika kvercetina u VM1 BSA.

Kao što je prethodno uočeno pri molekulskom uklapanju u HSA, i u rezultatima uklapanja katehina EGC-a i EC-a u PVM1 BSA uočava se sličnost načina vezanja ovih flavanola s načinima vezanja predviđenima za flavonol kvercetin i njegove metabolite. Stoga se može zaključiti da, u usporedbi s kvercetinom, ni nedostatak keto grupe na položaju 4 i dvostruke veze C2=C3, ni dodatna hidroksilna grupa na fenilnom prstenu, ne utječu znatno na afinitet vezanja u SA.
Jednak redoslijed vezanja kao i na HSA, EGCG>>EGC>EC, ustanovili su i za BSA Zinellu i sur. (2014) afinitetnom kapilarnom elektroforezom. Skrt i sur. (2012) su usporedili konstante vezanja za EGCG i EGC na BSA fluorescencijskim i računalnim metodama te su također potvrdili da EGCG ima značajno veći afinitet za vezanje na ovaj SA nego EGC. U istom radu odredili su i konstante vezanja za kvercetin. Njihove vrijednosti ukazuju na povoljnije vezanje EGCG-a u odnosu na kvercetin, te povoljnije vezanje kvercetina u odnosu na EGC. Ovi su rezultati u skladu s rezultatima molekulskog uklapanja dobivenih u ovom radu, koji predviđaju vezanje EGCG-a u VM1 BSA, a vezanje kvercetina i EGC-a u procjepu u blizini VM1, u veznom načinu koji odgovara naproksenskom u strukturi BSA 4OR0.
U radu Skrt i sur. (2012), spektroskopskim metodama najvjerojatnije mjesto vezanja EGCG-a u BSA određeno je u blizini Trp213. To može odgovarati i VM1 i središnjem procjepu BSA. Li i Hagerman (2014) također su proučavali vezanje EGCG-a i EGC-a u BSA eksperimentalnim i računalnim metodama, te su, uz već utvrđeni odnos njihovih afiniteta, zaključili da se EGC veže na BSA nespecifičnim interakcijama. Za EGCG je predviđeno vezanje u blizini VM1, što ne isključuje vezanje u procijepu. U našem je radu molekulskim uklapanjem pokazano da VM1 BSA može smjestiti ligand EGCG, s povoljnim interakcijama s aminokiselinama veznog mjesta. Za razliku od toga, način vezanja izvan VM1 kvercetina i EGC-a pokazuje manju specifičnost, što odgovara eksperimentalnim rezultatima.

Za razliku od rezultata dobivenih uklapanjem 4'-*O*-sulfata EGCG-a u strukturu HSA 2BXD, koji su predvidjeli da je sulfatacija modifikacija koja povoljno utječe na vezanje EGCG-a na HSA, uklapanje u strukturu BSA 4OR0 je pokazalo da sulfatacija EGCG-a može, ne samo onemogućiti vezanje u VM1 BSA, već i smanjiti afinitet za vezanje u procjep ovog albumina. Također, VM1 u strukturi 4OR0 pokazalo se kao premalo za povoljno vezanje glukuronidiranih metabolita EGCG-a.

No važno je napomenuti da uklapanjem u rigidnu proteinsku strukturu nije moguće predvidjeti konformacijske promjene, koje se mogu dogoditi prilikom vezanja liganada i utjecati na selektivnost i afinitet prema njima. One se mogu simulirati molekulskim uklapanjem u fleksibilnu proteinsku strukturu ili metodama molekulske dinamike.

ZAKLJUČAK

5. ZAKLJUČAK

Analiza glavnih komponenti molekulskih deskriptora izračunatih programom VolSurf+ pokazala je da uvođenje negativno nabijene sulfatne ili glukuronske skupine značajno mijenja fizikalno-kemijska i farmakokinetička svojstva kvercetina i katehina EGCG-a, EGC-a i EC-a u usporedbi s deprotonacijom, metilacijom ili oksidacijom hidroksilnih skupina. Međutim, VolSurf+ je podcijenio utjecaj navedenih modifikacija na afinitet polifenola za vezanje na ljudski serumski albumin.

Molekulsko uklapanje polifenola u ljudski i goveđi serumski albumin AutoDockom pokazalo je da metaboličke transformacije promatranih polifenola različito utječu na njihov način i afinitet vezanja u njihovo prošireno vezno mjesto 1.

Različite početne konformacije i parcijalni atomski naboji liganada, izračunati različitim programima, utjecali su na ukupan broj i zastupljenost predviđenih načina vezanja te vrijednosti energija vezanja izračunatih AutoDockom.

Načini uklapanja kvercetina i njegovih metabolita, te katehina EGCG-a, EGC-a i EC-a i njihovih metabolita u prošireno vezno mjesto 1 su odgovarali onima predviđenim za varfarin – polifenol iz kristalografske strukture kompleksa s HSA, osim za glukuronidne derivate zbog njihove veličine. Načini vezanja aniona, oksidiranih i metiliranih derivata bili su slični onima predviđenim za odgovarajuće aglikone. Način vezanja sulfata i glukuronida bio je određen primarno elektrostatskim interakcijama pripadnih negativno nabijenih grupa s pozitivno nabijenim aminokiselinskim ostacima na ulazu u vezno mjesto 1. Prema našim rezultatima, uvođenje glukuronske skupine ili ne mijenja ili smanjuje afinitet vezanja promatranih spojeva za oba albumina. Sulfatacija se općenito pokazala najpovoljnijom metaboličkom modifikacijom za vezanje polifenola u vezno mjesto 1 oba albumina. Rezultati ukazuju na moguću kompeticiju metabolita polifenola, posebno njihovih sulfatnih konjugata, s lijekovima za vezanje na albumin u plazmi, te ističu važnost ispitivanja farmakokinetičkih svojstava spojeva uzimajući u obzir njihove metaboličke modifikacije.

Rezultati dobiveni za HSA i BSA se, zbog razlike u veličini i aminokiselinskom sastavu proširenog veznog mjesta 1, međusobno značajno razlikuju prema mjestima i afinitetu vezanja metabolita, što znači da goveđi albumin nije povoljan analog ljudskom za istraživanje vezanja polifenola na serumski albumin.

LITERATURA

6. LITERATURA

1. Actis-Goretta L, Lévèques A, Giuffrida F, Romanov-Michailidis F, Viton F, Barron D, Duenas-Paton M, Gonzalez-Manzano S, Santos-Buelga C, Williamson G, Dionisi F (2012) Elucidation of (-)-epicatechin metabolites after ingestion of chocolate by healthy humans. Free Radic Biol Med 53(4):787-95.
2. Amić A, Marković Z, Dimitrić Marković JM, Stepanić V, Lučić B, Amić D. (2014) Towards an improved prediction of the free radical scavenging potency of flavonoids: the significance of double PCET mechanisms. Food Chem 152:578-585.
3. Aparoy P, Reddy KK, Reddanna P (2012) Structure and ligand based drug design strategies in the development of novel 5-LOX inhibitors. Curr Med Chem 19(22): 3763–3778.
4. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE (2000) The Protein Data Bank. Nucleic Acids Res 28: 235-242.
5. Bikadi Z, Hazai E (2009) Application of the PM6 semi-empirical method to modeling proteins enhances docking accuracy of AutoDock. J Cheminform 1:15.
6. Bolli A, Marino M, Rimbach G, Fanali G, Fasano M, Ascenzi P (2010) Flavonoid binding to human serum albumin. Biochem Bioph Res Co 398:444–449.
7. Boudinot FD, Homon CA, Jusko WJ, Ruelius HW (1985) Protein binding of oxazepam and its glucuronide conjugates to human albumin. Biochem Pharmacol 34(12):2115-21.
8. Boulton DW, Walle UK, Walle T (1998) Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. J Pharm Pharmacol 50(2):243-9.
9. Bujacz A (2012) Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. Acta Crystallogr 68: 1278-1289.
10. Bujacz A, Zielinski K, Sekula B (2014) Structural studies of bovine, equine, and leporine serum albumin complexes with naproxen. Proteins 82: 2199-2208.
11. Buttar D, Colclough N, Gerhardt S, MacFaul PA, Phillips SD, Plowright A, Whittamore P, Tam K, Maskos K, Steinbacher S, Steuber H (2010) A combined spectroscopic and crystallographic approach to probing drug-human serum albumin interactions. Bioorg Med Chem 18(21):7486-96.
12. Buxton I (2005) Pharmacokinetics and pharmacodynamics: the dynamics of drug absorption, distribution, action and elimination. U: Brunton L (ur.) Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics, Chicago, McGraw-Hill, str. 1–39.
13. Carter DC, Ho JX (1994) Structure of serum albumin. Adv Protein Chem 45:153-203.
14. Chen L1, Lee MJ, Li H, Yang CS (1997) Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats. Drug Metab Dispos 25(9):1045-50.
15. Chow HHS, Hakim IA (2011) Pharmacokinetic and chemoprevention studies on tea in humans. Pharmacol Res 64(2): 105–112.
16. Cruciani G, Crivori P, Carrupt PA, Testa B (2000) Molecular fields in quantitative structure-permeation relationships: the Volsurf approach. J Mol Struct 503:17-30.
17. Curry S (2009) Lessons from the crystallographic analysis of small molecule binding to human serum albumin. Drug Metab Pharmacokinet 24(4):342-57.
18. D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto, R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R (2007) Polyphenols, dietary sources and bioavailability. Ann Ist Super Sanit`a 43: 348–361.
19. Dangles O, Fargeix G, Dufour C (1999) One-electron oxidation of quercetin and quercetin derivatives in protic and non protic media. J Chem Soc, Perkin Trans 2.7:1387-1396.
20. Dangles O, Dufour C, Manach C, Morand C, Remesy C (2001) Binding of flavonoids to plasma proteins. Methods Enzymol 335:319-33.
21. Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJC, Morgan MRA, Williamson G (1998) Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β-glucosidase activity. FEBS Lett 436(1):71–75.

22. Day AJ, Mellon F, Barron D, Sarrazin G, Morgan MR, Williamson G (2001) Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. Free Radic Res 35(6):941-52.
23. De Santi C, Pietrabissa A, Spisni R, Mosca F, Pacifici GM (2000) Sulphation of resveratrol, a natural compound present in wine, and its inhibition by natural flavonoids. Xenobiotica 30(9):857-66.
24. Deeb O, Rosales-Hernández MC, Gómez-Castro C, Garduño-Juárez R, Correa-Basurto J (2010) Exploration of human serum albumin binding sites by docking and molecular dynamics flexible ligand–protein interactions. Biopolymers 93(2):161–170.
25. Deng F, Dong C, Liu Y, Yu Y (2013) Study on the interaction between trimethoprim and human serum albumin by spectroscopic and molecular modeling methods. Spectrosc Lett 46(1):13-20.
26. Di Bari L, Ripoli S, Pradhan S, Salvadori P (2010) Interactions between quercetin and warfarin for albumin binding: A new eye on food/drug interference. Chirality 22(6):593-6.
27. Dockal M, Carter DC, Rüker F (1999) The three recombinant domains of human serum albumin Structural characterization and ligand binding properties. J Biol Chem 274:29303-29310.
28. Dufour C, Dangles O (2005) Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. Biochim Biophys Acta 1721(1-3):164-73.
29. Eriksson L, Andersson PL, Johansson E, Tysklind M (2006) Megavariate analysis of environmental QSAR data. Part I – A basic framework founded on principal component analysis (PCA), partial least squares (PLS), and statistical molecular design (SMD). Mol Divers 10(2):169-186.
30. Fantini M, Benvenuto M, Masuelli L, Frajese GV, Tresoldi I, Modesti A, Bei R (2015) *In vitro* and *in vivo* antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: perspectives on cancer treatment. Int J Mol Sci 16(5):9236-9282.
31. Ferreira LG, dos Santos RN, Oliva G Andricopulo AD (2015) Molecular docking and structure-based drug design strategies. Molecules 20(7):13384-13421.
32. Gasteiger J, Marsili M (1980) Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges. Tetrahedron 36(22):3219–3228.
33. Ghosh S, Nie A, An J, Huang Z (2006) Structure-based virtual screening of chemical libraries for drug discovery. Curr Opin Chem Biol 10(3):194-202.
34. Ghuman J, Zunszain PA, Petitpas I, Bhattacharya AA, Otagiri M, Curry S (2005) Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. J Mol Biol 353(1):38-52.
35. Gleeson MP (2008) Generation of a set of simple, interpretable ADMET rules of thumb. J Med Chem 51(4):817-34.
36. Hein KL, Kragh-Hansen U, Morth JP, Jeppesen MD, Otzen D, Moller JV, Nissen P (2010) Crystallographic analysis reveals a unique lidocaine binding site on human serum albumin. J Struct Biol 171(3):353-60.
37. Hiskey CF, Bullock E, Whitman G (1962) Spectrophotometric study of aqueous solutions of warfarin sodium. J Pharm Sci 51:43-6 .
38. Hollman PCH, van Trijpa JMP, Buysmana MNCP, v.d. Gaagb MS, Mengelersa MJB, de Vriesb JHM, Katan MB (1997) Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. FEBS Lett 418(1–2):152–156.
39. http://www.chemaxon.com
40. http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LIGPLOT
41. http://www.molecular-networks.com
42. Huey R, Morris GM, Olson AJ, Goodsell DS (2007) A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. J Comput Chem 28:1145-1652.
43. Ibrahim TM, Bauer MR, Boeckler FM (2015) Applying DEKOIS 2.0 in structure-based virtual screening to probe the impact of preparation procedures and score normalization. J Cheminform 7: 21.

44. Ishii T, Ichikawa T, Minoda K, Kusaka K, Ito S, Suzuki Y, Akagawa M, Mochizuki K, Goda T, Nakayama T (2011) Human serum albumin as an antioxidant in the oxidation of (-)-epigallocatechin gallate: participation of reversible covalent binding for interaction and stabilization. Biosci Biotechnol Biochem 75(1):100-6.
45. Janisch KM, Williamson G, Needs P, Plumb GW (2004) Properties of quercetin conjugates: modulation of LDL oxidation and binding to human serum albumin. Free Radic Res 38(8):877-84.
46. Johari A, Moosavi-Movahedi AA, Amanlou M (2014) Computational investigation of inhibitory mechanism of flavonoids as bovine serum albumin anti-glycation agents. Daru 22:79-91.
47. Khan MK, Rakotomanomana N, Dufour C, Dangles O (2011) Binding of citrus flavanones and their glucuronides and chalcones to human serum albumin. Food Funct 2(10):617-26.
48. Kim HS, Hage DS (2005) Chromatographic analysis of carbamazepine binding to human serum albumin. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 816(1-2):57-66.
49. Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J (2004) Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. Nat Rev Drug Discov 3:935-949.
50. Kratochwil NA, Huber W, Müller F, Kansy M, Gerber PR (2002) Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach. Biochem Pharmacol 64(9):1355-74.
51. Lee J, Ebeler SE, Zweigenbaum JA, Mitchell AE (2012) UHPLC-(ESI)QTOF MS/MS profiling of quercetin metabolites in human plasma post consumption of apple sauce enriched with apple peel and onion. J Agric Food Chem 60(34):8510-20.
52. Lee MJ, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc FY, Prabhu S, Lambert G, Mohr S, Yang CS (2002) Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 11:1025–32.
53. Lejon S, Cramer JF, Nordberg P (2008) Structural basis for the binding of naproxen to human serum albumin in the presence of fatty acids and the GA module. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 64(2):64-9.
54. Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM, Li HB (2014) Resources and biological activities of natural polyphenols. Nutrients 6(12): 6020-47.
55. Li M, Hagerman AE (2014) Role of the flavan-3-ol and galloyl moieties in the interaction of (-)-epigallocatechin gallate with serum albumin. J Agric Food Chem 62(17):3768-75.
56. Lu H, Meng X, Yang CS (2003) Enzymology of methylation of tea catechins and inhibition of catechol-O-methyltransferase by (-)-epigallocatechin gallate. Drug Metab Dispos 31(5):572-9.
57. Maciążek-Jurczyk M (2014) Phenylbutazone and ketoprofen binding to serum albumin. Fluorescence study. Pharmacol Rep 66(5):727–31.
58. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr 79(5):727-47.
59. Männistö PT, Kaakkola S (1999) Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. Pharmacol Rev 51(4):593-628.
60. Mayo SL, Olafson BD,. Goddard WA (1990) DREIDING: a generic force field for molecular simulations. J Phys Chem 94 (26):8897–8909.
61. Mennen LI, Walker R, Bennetau-Pelissero C, Scalbert A (2005) Risks and safety of polyphenol consumption. Am J Clin Nutr 81 (1): 326S-329S.
62. Molecular Networks GmbH (2014) 3D structure generator CORINA generation of high-quality three-dimensional molecular models. Ver 3.6.
63. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson AJ (1998) Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and and empirical binding free energy function. J Comput Chem 19:1639-62.
64. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. J Comput Chem 30: 2785-91.

65. Mullen W, Edwards CA, Crozier A (2006) Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. Brit J Nutr 96: 107–116.
66. O'Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, Hutchison GR (2011) Open Babel: an open chemical toolbox. J Cheminform 3:33.
67. O'Leary KA, Day AJ, Needs PW, Mellon FA, O'Brien NM, Williamson G (2003) Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an *in vitro* hepatic model: the role of human beta-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. Biochem Pharmacol 65(3):479-91.
68. Pandey KB, Rizvi SI (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxid Med Cell Longev 2(5): 270–278.
69. Perry AH (2014) Influence of COMT genotype polymorphism on plasma and urine green tea catechin levels in postmenopausal women. Preuzeto iz digitalne baze Sveučilišta Minnesota, http://hdl.handle.net/11299/167308.
70. Petitpas I, Bhattacharya AA, Twine S, East M, Curry S (2001) Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin: anatomy of drug site I. J Biol Chem 276(25):22804-9.(a)
71. Petitpas I, Grüne T, Bhattacharya AA, Curry S (2001) Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. J Mol Biol 314(5):955-60.(b)
72. Petitpas I, Petersen CE, Ha CE, Bhattacharya AA, Zunszain PA, Ghuman J, Bhagavan NV, Curry S (2003) Structural basis of albumin-thyroxine interactions and familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia. Proc Natl Acad Sci USA 100(11):6440-5.
73. Radominska-Pandya A, Little JM, Pandya JT, Tephly TR, King CD, Barone GW, Raufman JP (1998) UDP-glucuronosyltransferases in human intestinal mucosa. Biochim Biophys Acta 1394(2-3):199-208.
74. Rawel HM, Meidtner K, Kroll J (2005) Binding of selected phenolic compounds to proteins. J Agric Food Chem 53:4228-4235.
75. Rodriguez SK, Guo W, Liu L, Band MA, Paulson EK, Meydani M (2006) Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate, inhibits vascular endothelial growth factor angiogenic signaling by disrupting the formation of a receptor complex. Int J Cancer 118(7):1635-44.
76. Ross JA, Kasum CM (2002) Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. Annu Rev Nutr 22:19-34.
77. Russo GL, Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Bilotto S, Iannitti R, Palumbo R (2014) Quercetin: a pleiotropic kinase inhibitor against cancer. Cancer Treat Res 159 185-205.
78. Sadowski J, Gasteiger J, Klebe G (1994) Comparison of automatic three-dimensional model builders using 639 X-ray structures. J Chem Inf Comp Sci 34:1000-1008.
79. Scalbert A, Morand C, Manach C, Rémésy C (2002) Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. Biomed Pharmacother 56(6):276-82.
80. Schrödinger, LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Ver 1.1eval.
81. Sehnal D, Svobodová Vareková R, Berka K, Pravda L, Navrátilová V, Banáš P, Ionescu CM, Otyepka M, Koca J (2013) MOLE 2.0: advanced approach for analysis of biomacromolecular channels. J Cheminform 5:39.
82. Sekula B, Zielinski K, Bujacz A (2013) Crystallographic studies of the complexes of bovine and equine serum albumin with 3,5-diiodosalicylic acid. Int J Biol Macromol 60:316-24.
83. Sengupta B, Sengupta PK (2002) The interaction of quercetin with human serum albumin: a fluorescence spectroscopic study. Biochem Bioph Res Co 299:400–403.
84. Shortle D, Simons KT, Baker D (1988) Clustering of low-energy conformations near the native structures of small proteins. Proc Natl Acad Sci USA 95(19):11158-62.
85. Skinner MK (2015) Environmental epigenetics and a unified theory of the molecular aspects of evolution: a neo-Lamarckian concept that facilitates neo-Darwinian evolution. Genome Biol Evol 7(5): 1296–1302.

86. Skrt M, Benedik E, Podlipnik C, Ulrih NP (2012) Interactions of different polyphenols with bovine serum albumin using fluorescence quenching and molecular docking. Food Chem 135(4):2418-24.
87. Stepanić V, Gall Trošelj K, Lučić B, Marković Z, Amić D (2013) Bond dissociation free energy as a general parameter for flavonoid radical scavenging activity. Food Chem 141(2):1562-1570.
88. Stepanić V, Novak Kujundžić R, Gall Trošelj K (2014) Epigenome, cancer prevention and flavonoids and curcumin, epigenetics and epigenomics, U: Payne CJ (ur.) Biochemistry, genetics and molecular biology. Dostupno na: http://www.intechopen.com/books/epigenetics-and-epigenomics/epigenome-cancer-prevention-and-flavonoids-and-curcumin.
89. Stouten PFW, Frömmel C, Nakamura H, Sander C (1993) An effective solvation term based on atomic occupancies for use in protein simulations. Molecular Simulation 10(2-6): 97-120.
90. Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN (1975) The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. Mol Pharmacol 11: 824-32.
91. Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN (1976) Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. Mol Pharmacol 12: 1052-61.
92. Sun T, Ho CT, Shahidi F (2009) Bioavailability and metabolism of tea catechins in human subjects. U: Ho CT, Lin JK, Shahidi F (ur.) Tea and tea products: chemistry and health-promoting propeties. CRC Press, str. 111-127.
93. Tesseromatis C, Alevizou A (2008) The role of the protein-binding on the mode of drug action as well the interactions with other drugs. Eur J Drug Metab Pharmacokinet 33(4):225-30.
94. The Open Babel Package 2.3.1 http://openbabel.org.
95. Trnavská Z, Trnavský K (1984) Plasma protein binding and interaction studies with piroxicam. Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 327(1):81-85.
96. Valko K, Nunhuck S, Bevan C, Abraham MH,. Reynolds DP (2003) Fast gradient HPLC method to determine compounds binding to human serum albumin. Relationships with octanol/water and immobilized artificial membrane lipophilicity. J Pharm Sci 92: 2236–48.
97. Varshney A, Ansari Y, Zaidi N, Ahmad E, Badr G, Alam P, Khan RH (2014) Analysis of binding interaction between antibacterial ciprofloxacin and human serum albumin by spectroscopic techniques. Cell Biochem Biophys 70(1):93-101.
98. Wallace A C, Laskowski R A, Thornton J M (1996). LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. Protein Eng 8:127-134.
99. Walle T (2009) Methylation of dietary flavones increases their metabolic stability and chemopreventive effects. Int J Mol Sci 10(11): 5002–19.
100. Walle T, Browning AM, Steed LL, Reed SG, Walle UK (2005) Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. J Nutr 135(1):48-52.
101. Walle T, Ta N, Kawamori T, WenX, Tsuji PA, Walle UK (2007) Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable flavonoids -methylated versus unmethylated flavones. Biochem Pharmacol 73(9): 1288–96.
102. Wang P, Aronson WJ, Huang M, Zhang Y, Lee RP, Heber D, Henning SM (2010) Green tea polyphenols and metabolites in prostatectomy tissue: implications for cancer prevention. Cancer Prev Res (Phila) 3(8): 985–93.
103. Wilson GL, Lill MA (2011) Integrating structure-based and ligand-based approaches for computational drug design. Future Med Chem 3(6):735-50.
104. www.rcsb.org
105. Xiao J, Cao H, Wang Y, Zhao‖ J, Wei X (2009) Glycosylation of dietary flavonoids decreases the affinities for plasma protein. J Agric Food Chem 57(15):6642–48.
106. Xiao J, Kai G (2012) A review of dietary polyphenol-plasma protein interactions: characterization, influence on the bioactivity, and structure-affinity relationship. Crit Rev Food Sci Nutr 52(1):85-101.

107. Yang F, Bian C, Zhu L, Zhao G, Huang Z, Huang M (2007) Effect of human serum albumin on drug metabolism: Structural evidence of esterase activity of human serum albumin. J Struct Biol 157:348-55.
108. Yang F, Zhang Y, Liang H (2014) Interactive association of drugs binding to human serum albumin. Int J Mol Sci 15(3): 3580–95.
109. Zhu, L, Yang, F, Chen, L, Meehan, EJ, Huang, M (2008) A new drug binding subsite on human serum albumin and drug-drug interaction studied by X-ray crystallography. J Struct Biol 162: 40-49.
110. Zinellu A, Sotgia S, Scanu B, Forteschi M, GiordoR, Cossu A, Posadino AM, Carru C, Pintus G (2015) Human serum albumin increases the stability of green tea catechins in aqueous physiological conditions. PLoS One 10(7): e0134690.
111. Zsila F, Bikadi Z, Malik D, Hari P, Pechan I, Berces A, Hazai E (2011) Evaluation of drug-human serum albumin binding interactions with support vector machine aided online automated docking. Bioinformatics 27(13):1806-13.
112. Zunszain PA, Ghuman J, Komatsu T, Tsuchida E, Curry S (2003) Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid. BMC Struct Biol 3:6.
113. Zunszain PA, Ghuman J, McDonagh AF, Curry S (2008) Crystallographic analysis of human serum albumin complexed with 4Z,15E-bilirubin-IXalpha. J Mol Biol 381(2):394-406.

ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime Sara Matić
Adresa Rendićeva 6, 10000 Zagreb, Republika Hrvatska
Telefon +385911638740
Elektronička pošta sara.maticx@gmail.com
Državljanstvo hrvatsko
Datum rođenja 09.07.1991.

OBRAZOVANJE

Diplomski studij molekularne biologije

Datum 26.09.2013. –
Mjesto Zagreb, Hrvatska
Ustanova Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Preddiplomski studij molekularne biologije

Datum 12.07.2010 – 13.09.2013.
Mjesto Zagreb, Hrvatska
Ustanova Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Zvanje Sveučilišna prvostupnica (baccalaurea) molekularne biologije

USAVRŠAVANJE

Istraživanje interakcija ionskih tekućina s makromolekulama računalnim metodama (ERASMUS+ traineeship)

Datum 01.11.2015. – 01.04.2016.
Mjesto Nove Hrady, Czech Republic
Ustanova Center for Nanobiology and Structural Biology

3rd Summer School in Molecular Biophysics and Systems Biology

Datum 06.07.2015. – 26.07.2016.
Mjesto Nove Hrady, Czech Republic
Ustanova Center for Nanobiology and Structural Biology

JEZICI

Materinji jezik Hrvatski

Drugi jezici

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
Engleski	C2	C2	C2	C1	C2
Njemački	B1	A2	A2	A1	A2

Sažeci u zbornicima znanstvenih skupova

Matić Sara, Minofar Babak, Řeha David (2016) Computational study of specific ion effect on the graphene oxide surface. Abstracts of XIV Discussions in Structural Molecular Biology. (poster, sažetak)