

Spektroskopija NMR u proučavanju interakcija bioaktivnih molekula

Lelas, Karlo

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:431248>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-10**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Karlo Lelas

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Spektroskopija NMR u proučavanju interakcija bioaktivnih molekula

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: Prof.dr.sc. Predrag Novak

Neposredni voditelj rada: Prof.dr.sc. Predrag Novak

Zagreb, 2024. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

4. srpnja 2024.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

12. rujna 2024.

Mentor rada: Prof.dr.sc. Predrag Novak

Potpis:

SADRŽAJ:

Contents

SAŽETAK	1
1. UVOD.....	2
1.1. Spektroskopija NMR	2
2. INTERAKCIJE LIGAND-PROTEIN	8
2.1. Praktična primjena spektroskopije NMR u interakcijama protein-ligand.....	9
3. INTERAKCIJE LIGAND-DNA, LIGAND-RNA I LIGAND-MEMBRANSKE.....	11
3.1. Interakcije Ligand-DNA	12
3.1.1. Praktična primjena spektroskopije NMR u interakcijama ligand-DNA.....	13
3.2. Interakcije Ligand-RNA	13
3.2.1. Praktična primjena spektroskopije NMR u interakcijama ligand-RNA.....	14
3.3. Ligand-membranske interakcije.....	16
3.3.1. Praktična primjena spektroskopije NMR u interakcijama ligand-membrana.....	17
4. STRUKTURNA ANALIZA LIGANDA I PROTEINA.....	18
4.1. Praktična primjena spektroskopije NMR za strukturnu analizu liganda i proteina	19
5. INTERAKCIJE MAKROLIDA I RIBOSOMA.....	20
6. LITERATURNI IZVORI.....	23

SAŽETAK

Spektroskopija NMR (nuklearne magnetske rezonancije) je ključna tehnika za proučavanje interakcija bioaktivnih molekula u suvremenom dizajnu lijekova jer omogućuje neinvazivno istraživanje strukture i dinamike molekula te njihovih interakcija s biološkim receptorima. Ovaj rad daje pregled o osnovnim principima spektroskopije NMR, ističući njezine prednosti i nedostatke u usporedbi s drugim tehnikama. Razmatraju se interakcije ligand-protein, gdje se NMR koristi za mapiranje epitopa i određivanje afiniteta vezanja liganda na proteine. Također se proučavaju interakcije liganda s DNA, RNA i membranskim receptorima, koristeći tehnike poput PFG NMR i trNOESY. Opisuje se strukturna analiza liganda koja obuhvaća određivanje trodimenzijske strukture pomoću spektroskopije ^1H NMR i drugih metoda. Nadalje, opisuje se analiza peptida i proteina, ističući uporabu podataka NOESY i drugih tehnika NMR za proučavanje struktura proteina koji služe kao receptori za ligande. Zaključno, naglašava se važnost spektroskopije NMR kao moćnog alata u istraživanju bioaktivnih molekula, koji daje bitan doprinos razumijevanju molekularnih mehanizama i razvoju učinkovitih lijekova.

1. UVOD

Ovaj rad dati će pregled o spektroskopskim tehnikama NMR vezanih za interakciju bioaktivnih molekula temeljen na knjizi *NMR spectroscopy for studying interactions of bioactive molecules*, autora *Predraga Novaka i Tomislava Jednačka* [1]. Jedan od glavnih preduvjeta za uspješan dizajn bioaktivnih molekula i lijekova je razjašnjavanje trodimenzijske strukture malih molekulskih liganda, receptora i njihovih kompleksa. Ključni koraci u ovom procesu uključuju identifikaciju strukturnih elemenata i skupina odgovornih za bioaktivnost. Sposobnost dizajniranja novih kandidata za lijekove jednostavno iz visokorezolucijskih struktura biomolekula još uvijek je ograničena. Od presudne je važnosti bolje razumijevanje molekulskih mehanizama i dinamike uključenih u interakciju liganda s makromolekulama. Postoje brojne tehnike za istraživanje interakcija ligand-receptor, kao što su ravnotežna dijaliza, fluorescencijska spektroskopija, kapilarna elektroforeza, ultrafiltracija, itd. Općenito, ove tehnike zahtijevaju dugotrajne korake odjeljivanja koji mogu utjecati na ravnoteže vezanja ili korake derivatizacije analita koji mogu promijeniti aktivnost liganda. Spektroskopija NMR ističe se kao vrlo korisna metoda za karakterizaciju interakcija ligand-receptor budući da može pružiti mnoštvo informacija bez kemijskih modifikacija uzorka. Ovaj završni rad nudi pregled glavnih tehnika NMR za proučavanje interakcija bioaktivnih molekula s njihovim biološkim receptorima uz njihove glavne prednosti i nedostatke.

1.1. Spektroskopija NMR

Spektroskopija NMR jedna je od najmoćnijih i najvrijednijih metoda u suvremenom otkrivanju i razvoju lijekova. Postoji mnoštvo jedno- i višedimenzijских tehnika razvijenih u posljednjih nekoliko godina, za proučavanje struktura biološki važnih molekula kao što su proteini i nukleinske kiseline te njihove interakcije s drugim makromolekulama ili malim molekulama, potrebne za dizajniranje učinkovitih lijekova. Otkrivanje lijekova obično uključuje nekoliko ključnih faza, tj. generiranje pogodaka, optimizaciju i predklinički razvoj. Iako znanje o 3D strukturama kompleksa ligand-receptor može donekle ubrzati potragu za molekulama s većom aktivnošću, optimizacija fizikalno-kemijskih svojstava koja diktiraju učinkovitost *in vivo* također igra važnu ulogu. Ta svojstva uključuju topljivost, apsorpciju, distribuciju, metabolizam, izlučivanje i toksičnost, poznata kao ADMET (*eng. Adsorption-distribution-metabolism-excretion-toxicity*). Glavni doprinos spektroskopije NMR dizajnu

lijekova uključivao je određivanje trodimenzijske strukture bioloških molekula i mnogo truda je uloženo od strane bioloških grupa NMR u razvoj različitih dvodimenzijskih i višedimenzijskih tehnika za tu svrhu.

Danas, određivanje strukture proteina spektroskopijom NMR obično uključuje izotopno označavanje prekomjerno eksprimiranog proteina u genetski modificiranim bakterijama [2]. Stoga, dostupnost proteina obogaćenih izotopima ^{13}C , ^{15}N i ^2H , u kombinaciji s brojnim višedimenzijskim eksperimentima NMR, omogućuje određivanje strukture u otopini proteina ili kompleksa protein-ligand do veličine od 82 kDa. Nedavno razvijene sekvence koje smanjuju transverzalnu relaksaciju, kao što je spektroskopija optimizirana za transverzalnu relaksaciju (TROSY, eng. Transverse relaxation-optimised spectroscopy), omogućile su snimanje visokorezolucijskih spektara NMR makromolekula s masama do 100 kDa i više [3,4].

Međutim, čak i za manje proteine s dobrom disperzijom signala i uskim linijama, proces određivanja strukture može biti vrlo dugotrajan. Nove tehnike NMR-a u čvrstom stanju pojavile su se kao snažan alat za proučavanje proteina koje nije moguće direktno mjeriti u otopini. To je omogućilo proučavanje integralnih membranskih proteina, proteinskih agregata i vlaknastih proteina, bez obzira na karakteristike čvrstog stanja proučavanog sustava, što je jedan od glavnih preduvjeta za analizu rendgenskom difrakcijom gdje su potrebni kristalni uzorci. U suvremenom otkrivanju lijekova, NMR pruža mnogo više od određivanja trodimenzijske strukture makromolekula, budući da je našao široku primjenu u generiranju pogodaka, metabonomici i analizi složenih smjesa[5-7].

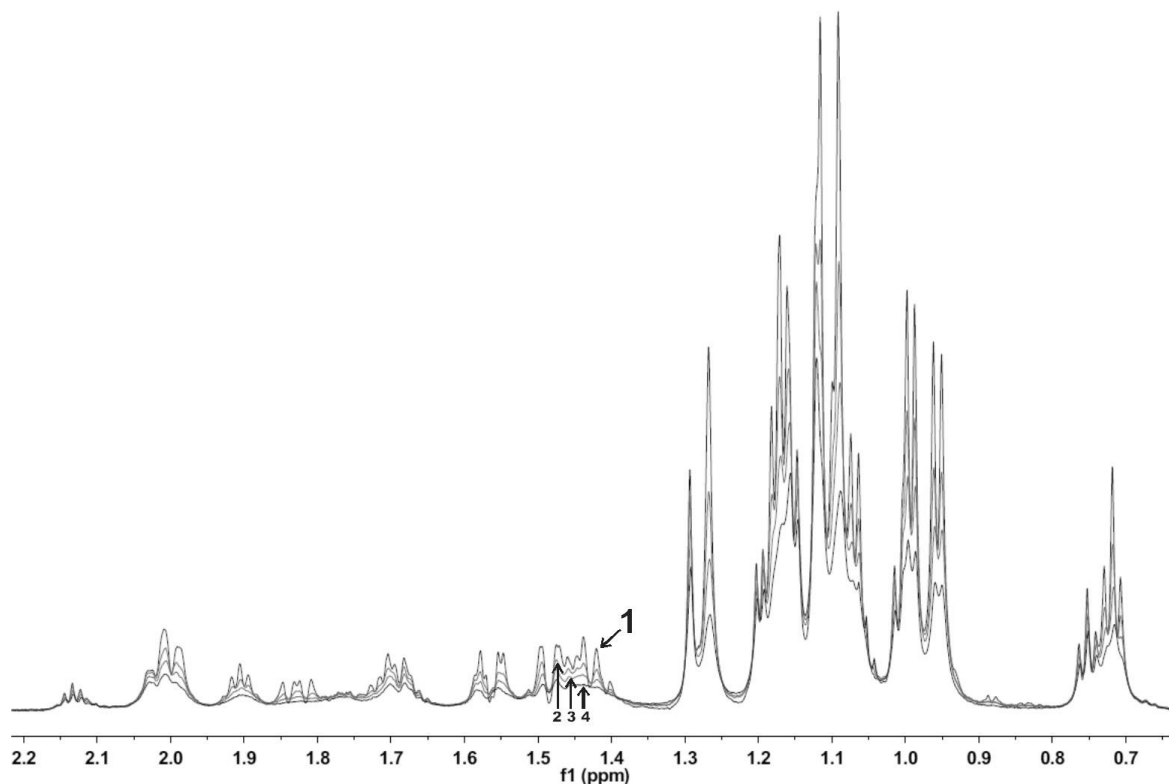
Osim strukturnih informacija o makromolekulskom cilju u procesu dizajna lijekova, ključno je razumjeti principe interakcije određenih bioloških receptora s molekulom nalik na lijek. To je jedan od preduvjeta za otkrivanje liganda visokog afiniteta za biološki važne ciljeve proteina. Upotreba spektroskopije NMR može se koristiti i u razjašnjavanju ostalih fenomena interakcije receptor-ligand, kao što su razjašnjavanje slobodnih i vezanih konformacija liganda, pokretljivost liganda, receptora i njihovog kompleksa, određivanje konstanti vezanja, određivanje reaktivnih skupina odgovornih za vezanje te pružanje informacija o orijentaciji ili dubini uranjanja liganda u svoj cilj.

Tehnike razvijene za dobivanje informacija o interakcijama između bioloških meta i malih molekula koje služe kao potencijalne ciljne molekule mogu se podijeliti u dvije glavne skupine: tehnike temeljene na ligandu i tehnike temeljene na receptoru. Teoretski, svi NMR parametri su osjetljivi na procese vezanja i mogu se koristiti za proučavanje interakcija ligand-receptor. Najčešće su korišteni oni koji se lako dobivaju i imaju najveću osjetljivost, a uključuju kemijske pomake, koeficijente translacijske difuzije, vremena relaksacije i nuklearni Overhauserov efekt (NOE). Neki od tih parametara jednostavno se koriste za indicaciju vezanja, dok drugi pružaju informacije o lokaciji mjesta vezanja liganda i značajkama mapiranja površine te određuju konstante vezanja i promjene u pokretljivosti kompleksa ligand-receptor.

Izvršna metoda temeljena na receptoru nazvana „odnos strukture i aktivnosti (SAR, eng. Structure activity relationship) pomoću NMR-a“ razvijena je od strane istraživača Hajduk, Meadows, Fesik i Shuker [8,9]. Metoda se temelji na perturbacijama u spektru ^1H - ^{15}N ili ^1H - ^{13}C -HSQC (heteronuclear single quantum coherence) proteina nakon dodavanja smjese spojeva. Zahtijeva izotopno obogaćivanje proteina s ^{15}N ili ^{13}C . U prvom koraku, biblioteka malih molekula se provjerava kako bi se identificirale one koje se vežu na ciljni protein. Vezanje se detektira usporedbom dvodimenzijskih spektra ^1H - ^{15}N ili ^1H - ^{13}C -HSQC proteina prije i nakon dodavanja liganda ili smjese liganda kako bi se detektirale promjene u kemijskim pomacima pri vezanju. Ligandi koji se vežu na jedan ili više džepova u prostornoj blizini identificiraju se, optimiziraju i povezuju zajedno kako bi se proizveli ligandi visokog afiniteta. Od prve primjene ove metode na protein FKBP, ova metoda korištena je za otkrivanje mnogih liganada visokog afiniteta za druge terapijski relevantne proteine.

Za eksperimente koji se oslanjaju na promatranje molekula liganda, izbor NMR parametara je raznovrsniji. Visoka osjetljivost parametara liganda na vezanje omogućila je razvoj brojnih vrijednih tehnika za bolje razumijevanje procesa vezanja na molekulskoj razini i identifikaciju novih bioaktivnih spojeva. Pri vezanju male molekule liganda na ciljnu makromolekulu, kemijski pomaci i rezonancije cilja su perturbirani. Stoga, za detekciju vezanja liganda, u slučaju dobro razdvojenih signala, dovoljno je provesti jednostavne titracijske eksperimente i promatrati promjene u kemijskim pomacima protona i širini linija. To je prikazano na Slici 1. u slučaju vezanja antibiotika azitromicina na ribosom. Konstanta disocijacije također se može procijeniti nelinearnim prilagođavanjem krivulje kemijskih

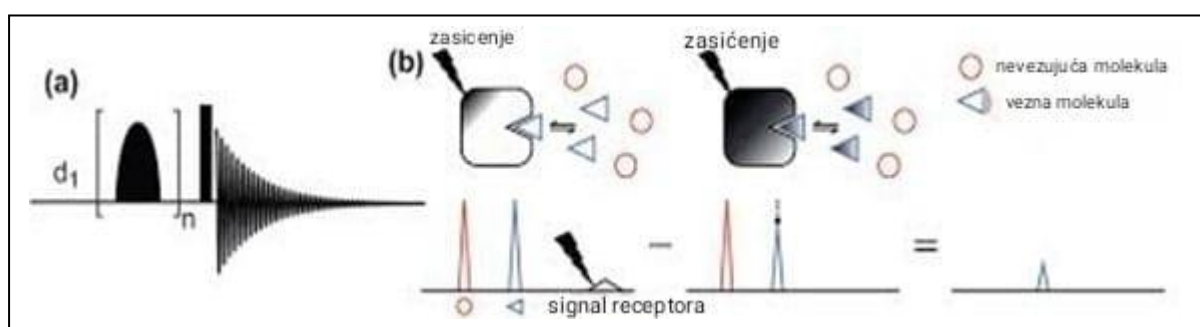
pomaka u odnosu na koncentraciju. Druge metode za identifikaciju i karakterizaciju interakcija ligand-receptor općenito se mogu podijeliti na metode temeljene na NOE, metode temeljene na relaksaciji i metode temeljene na difuziji.



Slika 1. Protonska spektar azitromicina (linija 1) i protonski spektra azitromicina nakon dodavanja ribosoma *E. coli* (linije 2, 3 i 4) snimljena na 700 MHz.

efekti NOE ili prenesena nuklearna Overhauserova pojačanja (trNOE) proizlaze iz različitih vremena korelacije, τ_c , slobodnih i vezanih molekula. Mali molekularni ligandi imaju kratka vremena korelacije i obično daju pozitivne efekte NOE ili ih nema. S druge strane, velike makromolekule pokazuju jake negativne efekte NOE. Ako se mala molekula veže, ponaša se kao makromolekula i pokazuje jake negativne efekte trNOE, pod režimom brze izmjene vezanih i slobodnih stanja. Nedavno je razvijen niz tehnika NMR temeljenih na efektu NOE. Dobro je poznato da su efekti NOE neprocjenjivi alati za određivanje struktura 3D malih molekula i biomolekula. Pri vezanju molekule liganda za njezin biološki receptor, efekti NOE prolaze kroz značajne promjene što dovodi do opažanja prenesenih efekata NOE.

Danas vrlo popularna i brza metoda koja se oslanja na efekt NOE je spektroskopija NMR razlike prijenosa zasićenja (STD), koju je predložio Mayer [10,11]. Metoda je postala jedna od najčešće korištenih metoda NMR za karakterizaciju interakcija liganda i receptora. Temelji se na prijenosu zasićenja s receptora na vezani ligand koji se zatim izmjenom prenosi u otopinu i detektira. Kao što je prikazano na Slici 2. STD uzima razliku između dva eksperimenta. U prvom eksperimentu (on-resonance) selektivno se ozračuju ili zasićuju samo rezonancije receptora koristeći selektivne pulseve. Zasićenje se propagira na sve protone receptora putem mreže učinkovitog intramolekulskog procesa križne relaksacije proton-proton, poznatog kao difuzija spina.



Slika 2. (a) osnovni pulsni slijed STD-a, (b) shematski prikaz eksperimenta STD: eksperiment izvan rezonancije ili referentni eksperiment uključuje rf-ozračivanje izvan rezonancije od liganda i protona receptora dajući intenzitet I_0 , eksperiment u rezonanciji primjenjuje rf-ozračivanje za selektivno zasićenje rezonancija receptora što proizvodi zasićeni intenzitet I_{SAT} i spektar STD koji daje samo rezonancije vezanih spojeva (rezonancije receptora su obično nevidljive zbog niskih koncentracija ili filtriranja relaksacije).

Kao što je prikazano na Slici 2. spojevi koji se vežu na receptor također postaju zasićeni putem intermolekulske križne relaksacije proton-proton. Zasićenje se zatim prenosi u otopinu putem procesa izmjene i detektira se. Nakon toga se snima referentni spektar s frekvencijom ozračivanja postavljenom daleko od bilo kojeg signala, što rezultira spektrom izvan rezonancije. Oduzimanjem spektra u rezonanciji od spektra izvan rezonancije dobiva se razlika u spektru, prikazujući samo rezonancije koje su doživjele zasićenje. Stupanj zasićenja liganda ovisi o vremenu zadržavanja liganda u veznom džepu receptora. Kada se disocira s receptora, zasićenje se prenosi u otopinu gdje slobodni ligand daje signale s uskim linijama.

Postoji nekoliko prednosti metode STD:

- STD nema ograničenja u pogledu veličine receptora i idealan je za velike proteine receptora, pa čak i cijele ribosome.

-
- Zahtijeva male količine receptora (obično u mikromolarnom rasponu).
 - Koristi prednost činjenice da samo vezani ligandi pokazuju signale u spektru i stoga je vrlo pogodan za svrhe probira vezajućih spojeva

Tipični jednodimenzijski slijed pulseva STD je prikazan na slici 2.

2. INTERAKCIJE LIGAND-PROTEIN

Autori Novak i Jednačak [1] navode da su interakcije liganda i proteina ključne za mnoge biološke procese i imaju veliku važnost u području biokemije i farmakologije. Ligandi su molekule koje se vežu na specifična mjesta na proteinima, izazivajući strukturne promjene koje mogu modulirati funkciju proteina. Ove interakcije mogu biti vrlo specifične, ovisno o kemijskoj komplementarnosti liganda i veznog mjesta na proteinu.

Interakcije između proteina i liganda uključuju enzimsku katalizu, signalizaciju i regulaciju gena. Ove interakcije često uključuju specifične vezne džepove na proteinima gdje se ligandi vežu putem različitih kemijskih veza, uključujući vodikove veze, ionske interakcije, hidrofobne interakcije i Van der Waalsove sile. Detaljno razumijevanje ovih interakcija može značajno doprinijeti razvoju novih lijekova i terapijskih sredstava. Proteini, kao makromolekule, imaju složene trodimenzijske strukture koje omogućuju specifično prepoznavanje i vezanje liganda. Struktura proteina može biti podijeljena u primarnu, sekundarnu, tercijarnu i kvaternarnu razinu, od kojih svaka igra ulogu u oblikovanju veznog mjesta. Ligandi, s druge strane, mogu biti male molekule, peptidi ili čak drugi proteini. Njihova sposobnost da se vežu na proteine ovisi o njihovoj komplementarnosti s veznim mjestom, što uključuje prostornu orijentaciju i distribuciju električnih naboja.

spektroskopija NMR jedna je od najmoćnijih tehnika za proučavanje interakcija ligand-protein. Ona omogućuje detaljno istraživanje strukturnih promjena i dinamike koje nastaju prilikom vezanja liganda. Metoda razlike prijenosa zasićenja (STD NMR) posebno je korisna za karakterizaciju ovih interakcija jer omogućuje identifikaciju specifičnih mjesta vezanja liganda na protein, kao i određivanje afiniteta vezanja. Razumijevanje načina na koji se lijekovi vežu na svoje ciljne proteine omogućuje znanstvenicima da optimiziraju njihove strukturne karakteristike za bolju učinkovitost i specifičnost. Na primjer, kompetitivni titracijski eksperimenti STD mogu se koristiti za rangiranje liganda prema njihovim afinitetima vezanja, što je važno za identifikaciju potencijalnih kandidata za lijekove.

Osim NMR-a, druge tehnike poput rendgenske kristalografije i krio-elektronske mikroskopije također pružaju važne strukturne informacije o interakcijama ligand-protein. Međutim,

spektroskopija NMR je jedinstvena po svojoj sposobnosti da proučava dinamiku ovih interakcija u otopini, pružajući tako uvid u ponašanje molekula u blizini njihovih fizioloških uvjeta. Kao što je već spomenuto, tehnike NMR temeljene na ligandu korisni su alati za istraživanje takvih interakcija.

2.1. Praktična primjena spektroskopije NMR u interakcijama protein-ligand

Bandorowicz-Pikula i sur. [12] navode kako je Spektroskopija STD NMR korištena za istraživanje svojstava vezanja kaveznog nukleotida guanozin 5'-O-(3-tio)trifosfata, P 3(S)-(1-(4,5-dimetoksi-2-nitrofenil)etil) estera (DMNPE-GTP- γ -S) i adenozin 5'-difosfata, P2-(1-(2-nitrofenil)etil) estera (NPE-ADP) na kreatin kinazu mišića zeca (RMCK) i humani aneksin A6 (hAnxA6). Dobiveni rezultati ukazali su na snažno vezanje nukleotida na istraživane proteine. Slično, Blume i sur. [13] koristili su istu tehniku za proučavanje interakcije epitopijskog mjesta bifunkcijskog enzima UDP-N-acetilglukozamin-2-epimeraza/N-acetilmannozamin kinaza s njegovim prirodnim supstratom, UDP-N-acetilglukozaminom (UDP-GlcNAc) i derivatima. STD NMR omogućio je mapiranje epitopa liganda i određivanje afiniteta vezanja liganda. Epitopi uridinskih molekula UMP-a, UDP-a, UDP-GalNAc-a i UDP-GlcNAc-a bili su slični, što sugerira da je način vezanja molekule UDP isti u svim slučajevima. Međutim, male razlike u epitopima heksopiranoznih jedinica UDP-GlcNAc-a i UDP-GalNAc-a odražavale su nesposobnost enzima da obradi UDP-GalNAc. Rezultati titracija STD pokazali su da UDP ima najveći afinitet vezanja na epimerazno mjesto enzima.

Nadalje Bai, i sur. [14] govore o korisnosti kombinacije eksperimenata STD-NMR i ^1H - ^{15}N HSQC koja je korištena za istraživanje vezanja 5-aminoimidazol-4-karboksamid-ribonukleozida (AICAR) i guanozin monofosfata (GMP) na nukleotidno vezujući protein histidinske triade (HINT1). Prisutnost vezanja liganda provjerena je korištenjem spektroskopije STD NMR. Mjesto vezanja liganda utvrđeno je iz perturbacija kemijskih pomaka ^1H i ^{15}N . Vezanje AICAR-a za HINT1 otkrilo je značajnu sličnost perturbacije kemijskih pomaka s GMP-om, što ukazuje na to da se dva liganda vjerojatno vežu na isto osnovno mjesto.

Ji i sur. [15] primijenili su spektroskopiju STD NMR za mapiranje epitopa skupina i mjerenje konstante disocijacije specifičnih interakcija između L-triptofana (Trp) i humanog serumskog albumina (HSA). spektri STD snimljeni u otopinama liganda i proteina sa i bez inhibitora naproksena ukazivali su na interakciju između Trp i HSA. spektar STD u odsutnosti inhibitora odražavao je specifično kao i nespecifično vezanje Trp. Međutim, u prisutnosti naproksena, specifična mjesta bila su zauzeta inhibitorom. Stoga je rezultirajući spektar STD odražavao samo nespecifične doprinose interakciji Trp i HSA. Blume i sur. [16] su spektroskopiju STD NMR koristili za uvid u interakcije enzima i liganda u izoformi PII kvasne hekokinaze pod fiziološkim uvjetima. Kompetitivni titracijski eksperimenti STD omogućili su rangiranje liganda prema njihovim afinitetima vezanja .

Goncalves i sur. [17] istraživali su vezanje sintetskog antagonista receptora sličnog Tollu (TLR4) na antigen za diferencijaciju klastera CD14 pomoću STD NMR-a. Rezultati su ukazali na to da je vezanje uglavnom posredovano lipidnim lancima sintetskog spoja. Ovi nalazi snažno sugeriraju da se aktivacija TLR4 inhibira kompetitivnim zauzimanjem CD14. Nadalje, metoda kompetitivnog STD-a uspješno je primijenjena za detekciju prisutnosti visokog afiniteta liganda, diazepama, u smjesi spojeva smanjenjem signala STD liganda niskog afiniteta, enzima β -mjesta za cijepanje prekursorskog proteina amiloida 1.

Prema Houlistonu i sur., [18]. eksperimenti STD omogućuju istraživanje interakcija antitijela i liganda u ciljanim ganglio-oligosaharidima koji su dodani izravno u serume pacijenata, bez frakcioniranja antitijela. Vrlo snažan prijenos zasićenja uočen je u jednoj trećini rezonancija glikana nakon dodavanja ganglio-oligosaharida u serume pacijenata; ovo je odredilo područje kontakta sa serumskim antitijelima.

Assadi-Porter i sur. [19] demonstrirali su korištenje eksperimenata STD i STDD NMR za praćenje specifičnog vezanja liganda na ljudske receptore za okus tipa 1, 2 i 3 (T1R2 + T1R3). Oduzimanjem spektara STD snimljenih u prisutnosti i odsutnosti receptora za slatko, dobiveni su dvodimenzijски spektri ^1H - ^{15}N HSQC STDD koji sadrže signale samo od specifičnog vezanja. Rezultati su pokazali da mutirani receptor (T1R2 + T1R3(D535Q)) veže ligand brazzein mnogo slabije nego divlji tip receptora (T1R2 + T1R3) .

3. LIGAND-DNA, LIGAND-RNA i LIGAND-MEMBRANSKE INTERAKCIJE

Napredak u spektroskopiji NMR za proučavanje interakcija bioaktivnih molekula prikazan je u sljedećim podacima. Fielding [20] je nedavno opisao metode NMR za određivanje konstanti disocijacije protein-ligand (K_D). Protein i ligand u termodinamičkoj ravnoteži karakterizirani su konstantom disocijacije, K_D . U najjednostavnijem slučaju proteina s jednim veznim mjestom, K_D je definiran kao:

$$K_D = \frac{[P][L]}{[PL]}$$

gdje su $[P]$, $[L]$ i $[PL]$ ravnotežne koncentracije proteina, liganda i kompleksiranog stanja. Objekt mjerenja NMR može biti ligand ili protein.

Stoga, kada se promatra ligand, eksperiment NMR mora biti sposoban razlikovati ligand u slobodnim i vezanim stanjima, tako da se $[L]$ i $[PL]$ mogu kvantificirati. Za sustav u brzoj izmjeni, promatrani odgovor NMR (M_{obs}) liganda je molarno frakcijski ponderirani prosjek parametara NMR slobodnih i vezanih stanja:

$$M_{\text{obs}} = X_{L(\text{free})}M_{L(\text{free})} + X_{L(\text{bound})}M_{L(\text{bound})}$$

gdje su $X_{L(\text{free})}$ i $X_{L(\text{bound})}$ molarne frakcije slobodnog i vezanog liganda, a $M_{L(\text{free})}$ i $M_{L(\text{bound})}$ NMR parametri liganda u slobodnim i vezanim stanjima.

Alternativno, kada se promatra protein, eksperiment NMR mora razlikovati i kvantificirati $[P]$ i $[PL]$. Za promatranje proteina, promatrani odgovor NMR definiran je kao:

$$M_{\text{obs}} = X_{P(\text{free})}M_{P(\text{free})} + X_{P(\text{bound})}M_{P(\text{bound})}$$

gdje su X_P i M_P sada molarne frakcije i NMR karakteristike nevezanog i vezanog proteina.

3.1. Ligand-DNA interakcije

Autori Novak i Jednačak [1] navode kako su interakcije liganda i DNA ključne za mnoge biološke procese, uključujući regulaciju gena, replikaciju DNA i popravak DNA. Ligandi koji se vežu za DNA mogu biti male organske molekule, proteini ili ioni, a njihove interakcije mogu značajno utjecati na strukturu i funkciju DNA. Informacije o ovim interakcijama imaju veliki značaj za razvoj lijekova, posebno u području kemoterapije gdje mnogi lijekovi ciljaju DNA u svrhu inhibicije rasta stanica raka.

Jedan od glavnih načina na koji ligandi interagiraju s DNA je kroz interkalaciju, gdje se planarno strukturirani ligandi ubacuju između baza DNA. Ove interakcije su stabilizirane Van der Waalsovima silama i interakcijama π - π između aromatičnih prstena liganda i baza DNA. Interkalatori često uzrokuju strukturne promjene u DNA, uključujući elongaciju i savijanje heliksa, što može inhibirati funkciju DNA polimeraza i drugih enzima uključenih u replikaciju i transkripciju. Drugi način interakcije je putem vezača za utore DNA. DNA ima dva utora - veliki i mali - gdje se ligandi mogu specifično vezati putem vodikovih veza, hidrofobnih interakcija i elektrostatskih sila. Ligandi koji se vežu za veliki utor često oponašaju prirodne faktore transkripcije, dok se oni koji se vežu za mali utor mogu koristiti za specifično ciljanje sekvenci DNA. Na primjer, distamicin je poznati ligand koji se veže za mali utor DNA, prepoznajući specifične AT-bogate sekvence.

Elektrostatske interakcije vrlo su važne u ligand-DNA vezanju, posebno za katione i polikatione koji neutraliziraju negativni naboj fosfatne okosnice DNA. Ovi ligandi mogu stabilizirati određene konformacije DNA ili promicati formiranje superstrukture poput kvadrupleksa, koji su važni u telomerima i genskoj regulaciji.

Spektroskopija NMR i rendgenska kristalografija ključne su tehnike za proučavanje ovih interakcija. NMR omogućuje promatranje promjena u kemijskim pomacima i dinamici DNA i liganda pri vezanju, dok rendgenska kristalografija pruža strukture visoke rezolucije kompleksa ligand-DNA. Kombinacija ovih tehnika omogućuje istraživačima da razumiju kako ligandi prepoznaju specifične sekvence DNA, kako vezanje utječe na strukturu DNA i kako se ove interakcije mogu iskoristiti za terapijske svrhe.

3.1.1. Praktična primjena spektroskopije NMR u interakcijama ligand-DNA

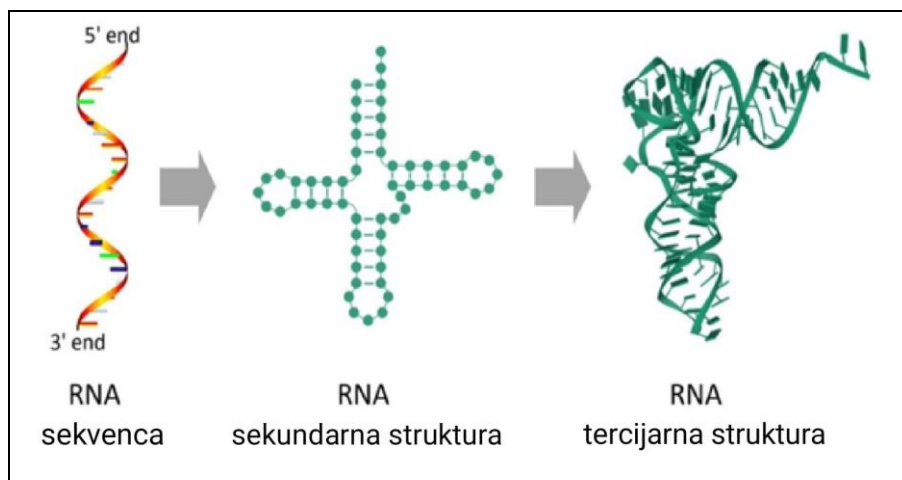
Di Micco i sur., [21] demonstrirali su pristup temeljen na dva paralelna seta eksperimenata STD, u kojima je zasićenje izazvano ozračivanjem na prikladnoj frekvenciji odabranoj iz specifičnih DNA rezonancija za karakterizaciju različitih DNA liganada. Omjeri signal-šum svih protona koji pokazuju efekte STD uspoređeni su s referentnim spektrom STD. Rezultati su sugerirali da ligandi koji stvaraju neposredne kontakte s aromatičnim baznim protonima primaju više zasićenja pri ozračivanju aromatičnih protona DNA, dok su vanjski ligandi više pogođeni ozračivanjem u regiji deoksiriboze.

Nadalje, kompleksi ligand-DNA proučavani su metodama difuzije. Ramalho i sur. [22] koristili su kombinaciju pulsno polje gradientne NMR (PFG NMR) spektroskopije, analize stope relaksacije spin-rešetke i dokiranja za istraživanje interakcije 5-nitroimidazolskih radiosenzitizera s dupleksnom DNA. Intenzitet interakcija radiosenzitizera i makromolekule uspješno je procijenjen koristeći PFG NMR i podatke dokiranja. Nadalje, mjerenja selektivnih stopa relaksacije spin-rešetke predstavljala su moćan alat za istraživanje afiniteta vezanja liganda prema receptoru.

3.2. interakcije Ligand-RNA

Interakcije liganda i RNA važne su za mnoge biološke procese, uključujući gensku ekspresiju, translaciju i regulaciju RNA. RNA, kao ključni igrač u staničnoj biologiji, nudi nekoliko ciljeva za vezanje liganda, uključujući ribosomske RNA, prijenosne RNA (tRNA), glasničke RNA (mRNA) i različite ne-kodirajuće RNA molekule.

Jedan od glavnih načina na koji ligandi interagiraju s RNA je specifično vezanje na sekundarne i tercijarne strukture RNA (Slika 3.). Ove strukture uključuju petlje, stabla, pseudočvorove i druge složene formacije koje mogu pružiti specifična vezna mjesta za male molekule liganda. Na primjer, aminoglikozidni antibiotici kao što je streptomycin vežu se na ¹⁶S rRNA podjedinice ribosoma, sprječavajući pravilno čitanje mRNA i inhibirajući sintezu proteina.



Slika 3. Opći prikaz RNA sekvence, sekundarne i tercijske strukture RNA.

Interkalacija je još jedan važan mehanizam interakcije, gdje planarno strukturirani ligandi ulaze između baznih parova RNA. Interkalatori često utječu na funkciju ribozima ili drugih katalitičkih RNA molekula, što može biti korisno za moduliranje biološke aktivnosti RNA. Elektrostatske interakcije također igraju ključnu ulogu u vezanju ligand-RNA jer je RNA polianionska vrsta zbog svoje fosfatne okosnice, stoga kationi i polikationi mogu neutralizirati negativni naboj i stabilizirati vezne komplekse. Ove interakcije su posebno važne za ligande koji ciljaju virusne RNA, gdje neutralizacija naboja može inhibirati replikaciju virusa.

Spektroskopija NMR temeljena na pulsним gradijentima magnetnog polja, osim STD i HSQC spektroskopije, također se koriste za proučavanje difuzijskih svojstava kompleksa RNA-ligand, omogućujući istraživačima da mjere promjene u veličini i obliku kompleksa tijekom vezanja. Ove informacije mogu pružiti uvid u način na koji ligandi mijenjaju konformaciju RNA i kako te promjene utječu na biološku funkciju RNA. Rendgenska kristalografija i krio-elektronska mikroskopija također su korisne za dobivanje visoko rezolucijskih struktura RNA-ligand kompleksa, omogućujući vizualizaciju interakcija na atomskom nivou. Kombinacija ovih tehnika s NMR-om pruža sveobuhvatan pristup za razumijevanje mehanizama ligand-RNA interakcija.

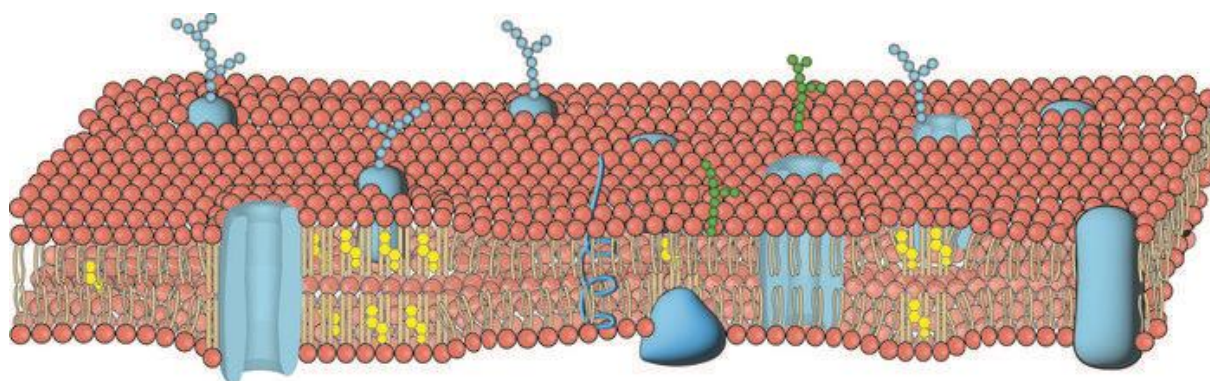
3.2.1. Praktična primjena spektroskopije NMR u interakcijama ligand-RNA

Kreutz i sur. [23, 24] primijenili su spektroskopiju ^{19}F NMR za identifikaciju specifičnih mjesta vezanja liganda na RNA. Pristup se oslanjao na specifično označavanje RNA s 2'-deoksi-

2'-fluoro (2'-F) nukleozidima, čime se zamjenjuje 2'-hidroksi skupina s atomom fluora. Pomak fluorinske rezonancije u spektru NMR-a prema dolje pri vezanju liganda i jasno smanjenje širine linije ukazivali su na to da RNA ima rigidniju strukturu u vezanom stanju. Nadalje, Foloppe i suradnici kombinirali su spektroskopiju NMR i fluorescencijski rezonantni energetski transfer (FRET) test vezanja kako bi identificirali ligande za aminoacil-tRNA akceptorsko mjesto (A-mjesto). Spojevi koji su pokazali afinitet za A-mjesto u testu FRET vezanja dalje su istraživani korištenjem spektroskopije NMR. Međumolekulski efekti NOE potvrdili su vezanje ovih spojeva na RNA.

3.3. Ligand-membranske interakcije

Interakcije liganda i membrana ključne su za mnoge biološke procese, uključujući signalizaciju, transport tvari i staničnu komunikaciju. Membrane su složene strukture sastavljene od lipidnog dvosloja koji pruža barijeru i platformu za integrirane proteine i druge molekule (Slika 4.). Ligandi koji se vežu za membrane mogu biti mali organski molekuli, peptidi ili proteini, a njihovo vezanje može izazvati značajne promjene u strukturi i funkciji membrane.



Slika 4. Presjek fosfolipidnog dvosloja (membrane) stanice sa integriranim proteinima

Jedan od glavnih načina na koji ligandi interagiraju s membranama je putem hidrofobnih interakcija. Lipidni dvosloj membrane ima hidrofobne repove okrenute prema unutra, što omogućuje hidrofobnim ligandima da se lako integriraju u membranu. Ove interakcije mogu utjecati na fluidnost membrane, debljinu dvosloja i organizaciju lipidnih domena. Na primjer, steroidi kao što je kolesterol mogu se umetnuti između lipidnih molekula, mijenjajući fizikalna svojstva membrane i utječući na funkciju membranskih proteina. Fosfolipidi koji čine membranu često imaju naboj na svojim polariziranim glavama, što omogućuje kationskim ligandima ili proteinskim domenama bogatim pozitivnim nabojem da se vežu za površinu membrane i te elektrostatske interakcije mogu biti ključne za lokalizaciju proteina na membranu, kao što je slučaj s mnogim signalnim proteinima koji se vežu za membranu samo u prisutnosti specifičnih fosfolipida.

Peptidi i proteini također mogu interagirati s membranama putem specifičnih aminokiselinskih sekvenci koje prepoznaju određene lipidne komponente membrane. Na primjer, mnogi

antimikrobni peptidi posjeduju amfipatičke strukture koje omogućuju njihovo umetanje u lipidni dvosloj, gdje mogu poremetiti membranu stvaranjem pora i izazvati smrt stanice.

Spektroskopija NMR i fluorescencijski testovi su najčešće korišteni za proučavanje ovih interakcija. Fluorescencijski testovi, poput fluorescencijskog rezonantnog energetskog transfera (FRET), mogu pružiti informacije o udaljenostima između molekula i promjenama u konformaciji membrane tijekom interakcije s ligandima. Krio-elektronska mikroskopija i rendgenska kristalografija također mogu biti korisne za dobivanje visoko rezolucijskih struktura membranskih kompleksa, omogućujući vizualizaciju kako se ligandi vežu za membranu i kako to vezanje utječe na strukturu membrane.

3.3.1. Praktična primjena spektroskopije NMR u interakcijama ligand-membrana

Proučavanje interakcija ligand-membrana pomoću kombinacije NMR spektroskopije i drugih eksperimentalnih ili računskih tehnika nedavno je privuklo posebnu pozornost kako bi se razumjeli metabolički putevi i razvili lijekovi s željenim svojstvima.

Melo i sur. [25] proučavali su interakciju fuzijskog peptida virusa denge (DV) i različitih modela membrana pomoću fluorescencije i spektroskopije NMR. Interakcija je bila najsnažnija u dodecilsfosfokolin i anionskim fosfatidilkolin/fosfatidilglicerol vezikulama, koje su bile jedine vezikule koje je DV fuzijski peptid uspio spojiti. Trodimenzijska struktura DV fuzijskog peptida vezan za dodecilsfosfokolin micelle i anionske fosfatidilkolin / fosfatidilglicerol vezikule riješen je pomoću transferred NOESY (trNOESY) i homonuklearne spektroskopije NMR u otopini. Većina trNOE križnih signala bila je iz hidrofobne triade, potvrđujući strukturu vezanu za dodecilsfosfokolin.

Follet i sur. [26] koristili su kombinaciju elektronske spin rezonancije (ESR) i spektroskopije NMR u otopini, kao i spektroskopije NMR u čvrstom stanju, za istraživanje fizikalno-kemijskih svojstava i interakcija s membranama anti-apoptotskih 2-(4-fluorofenil)-3-(piridin-4-il)imidazo[1,2-a]piridinskih derivata s različitim duljinama i konformacijama bočnih lanaca. Rezultati su ukazivali na to da se poboljšana topljivost u biološkim medijima može

postići odabirom duljine bočnog lanca od šest atoma te da se poboljšanje interakcija/prodiranja u membrane može postići hidroksilnim supstitucijama na C6 bočnom lancu.

Cabeça i sur. [27] primijenili su simulacije molekulske dinamike (MD) i spektroskopiju NMR kako bi istražili interakciju neutralnih i protoniranih vrsta lokalnog anestetika prilokaina (PLC) s fosfatidilkolinskim (PC) dvoslojevima. Eksperimenti difuzijski uređene spektroskopije 2D NMR (DOSY) pokazali su da neutralni PLC ima veći afinitet prema okruženju liposoma. Nadalje, rezultati STD otkrili su da je interakcija molekula prilokaina s dvoslojem ovisna o pH vrijednosti. Rezultati su bili u skladu sa simulacijama MD-a.

4. STRUKTURNA ANALIZA LIGANDA I PROTEINA

Strukturalna analiza omogućuje istraživačima da vizualiziraju trodimenzijske strukture molekula i identificiraju specifična mjesta vezanja prilikom proučavanja interakcija bioaktivnih molekula.

Transferr NOESY (trNOESY) i spektroskopija heteronuklearne jednostruke kvantne koherencije (HSQC) su među najčešće korištenim tehnikama NMR za proučavanje interakcija ligand-protein. Rendgenska kristalografija je još jedna moćna tehnika koja pruža slike visoke rezolucije kristaliziranih proteina i liganda. Ova metoda omogućuje detaljno mapiranje atomske strukture, što je korisno za identifikaciju specifičnih interakcija na molekularnom nivou. Na primjer, rendgenska kristalografija može otkriti kako se lijekovi vežu za aktivna mjesta enzima, pružajući uvid u mehanizme inhibicije. Krio-elektronska mikroskopija (cryo-EM) sve više postaje važna tehnika za proučavanje velikih proteinskih kompleksa koji se teško kristaliziraju. Cryo-EM omogućuje vizualizaciju biomolekula u njihovom prirodnom stanju, pružajući informacije o strukturi i funkciji na gotovo atomskom nivou.

Kombinacija ovih tehnika pruža sveobuhvatan uvid u strukturne značajke liganda i proteina, omogućujući istraživačima da bolje razumiju molekularne mehanizme koji su temelj bioloških procesa.

4.1. Praktična primjena spektroskopije NMR za strukturnu analizu liganda i proteina

Modarresi-Alam i sur. [28] koristili su varijabilnu temperaturnu spektroskopiju ^1H NMR za proučavanje ograničene S–N rotacije u aril-N-(arilsulfonil)-N-(trifenilfosforaniliden) imidokarbamatima. Dubleti arilnih supstituenata korišteni su za određivanje barijera rotacije na temperaturi koalescencije. Pokazano je da promjena supstituenata na kisiku, sulfonilu i dušiku imidoilne skupine nije imala značajan utjecaj na opaženu barijeru rotacije

Zhuang i sur. [29] koristili su NMR podatke temeljene na paramagnetizmu, uključujući inducirane RDC-ove (residual dipolar couplings) i pseudo-kontaktne pomake (PCS-ove) za određivanje strukture galektin-3-ugljikohidrata. Paramagnetski Dy^{3+} ion bio je kompleksiran s peptidom, što je omogućilo opažanje RDC-ova kao i PCS-ova za protein i ligand. Utvrđena struktura bila je u skladu s kristalnom strukturom galektin-3-N-acetilaktosamin kompleksa.

Tiziani i sur. [30] primijenili su difuzijski poredanu spektroskopiju NMR (DOSY) za procjenu mogućih interakcija između daidzeina i daidzein sojinog proteina te karotenoida. Rezultati su pokazali da je afinitet između daidzeina i izolata sojinog proteina bio veći u usporedbi s daidzeinom otopljenim u istom modelnom sustavu. Pomak specifičnih protonskih signala NMR ukazivao je na dva glavna doprinosa interakcijama fitokemikalija i proteina: vodikove veze iz hidroksilnih skupina i hidrofobne interakcije.

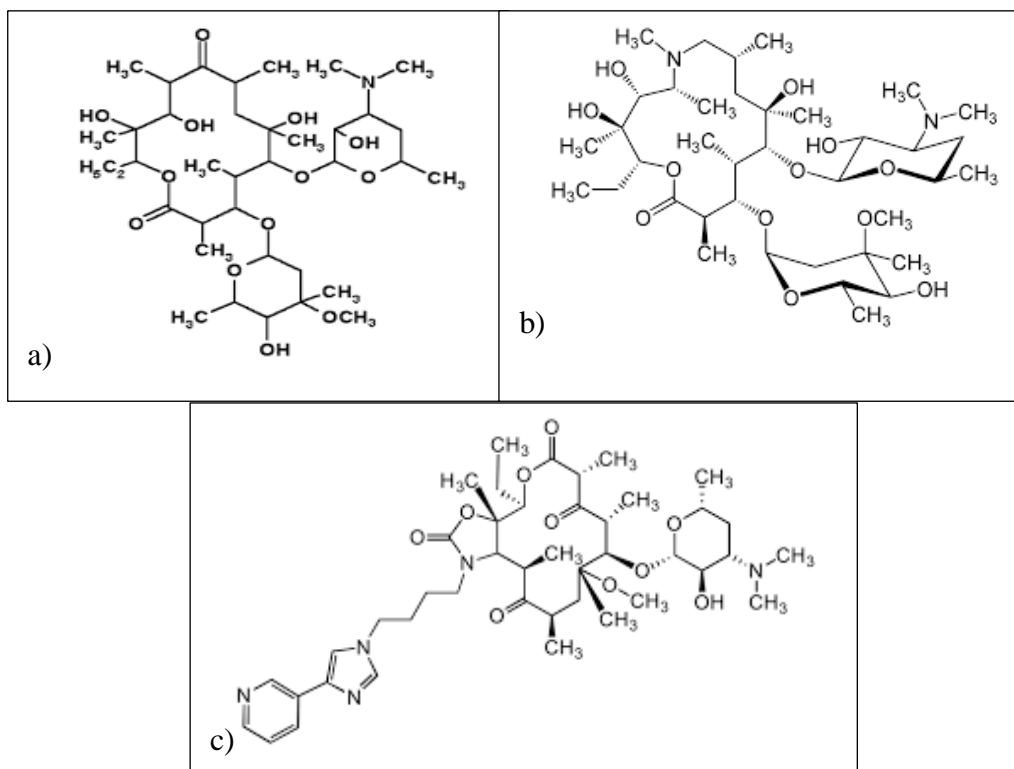
Arroyo i Mayo [31] razjasnili su strukturu angiostatskog peptida anginexa koristeći NMR strukturne studije u dodecilsulfokolin micelarnom okruženju. Konformacijsko modeliranje provedeno je koristeći podatke iz NOESYspektra. Rezultati su pokazali da anginex formira trostruko anti-paralelnu β -plaštu konformaciju u dodecilsulfokolin micelarnoj otopini.

Daly i sur. [32] karakterizirali su strukturu nekoliko ciklotida (cikličkih peptida), koji sadrže od glave do repa ciklizirani peptidni kostur i zamršeni raspored tri disulfidne veze. Izvrсна disperzija signala u spektrima NMR čini spektroskopiju NMR najčešće korištenom tehnikom za proučavanje struktura ciklotida. spektar NOESY ciklotida kalata B1 otkrio je kontinuirani ciklus sekvencijalnih križnih signala, koji su obuhvatili svih 29 aminokiselina u sekvenci i pružili dokaz

za njegov ciklički kostur. Nadalje, analiza NMR kalata B1 i kalata B7 u prisutnosti dodecilsfosfokolin micela ilustrirala je njihovo vezanje na membranu u različitim orijentacijama.

5. INTERAKCIJE MAKROLIDA I RIBOSOMA

Autori Novak i Jednačak [1] ističu kako su makrolidni antibiotici, kao što su eritromicin, azitromicin i telitromicin (Slika 5.), učinkoviti su terapijski agensi za liječenje zaraznih bolesti. Oni su još uvijek u središtu interesa mnogih istraživačkih grupa i farmaceutskih kompanija, a veliki napori usmjereni su prema otkrivanju novih makrolidnih antibiotika kemijskom modifikacijom postojećih klasa prirodnih derivata. Cilj je dobiti nove terapijske agense s poboljšanim ukupnim biološkim profilom, s posebnim naglaskom na rezistentne bakterijske sojeve. Stalna pojava multirezistentnih bakterijskih sojeva predstavlja ozbiljnu prijetnju zdravstvenoj zajednici i pojačava potragu za novim i učinkovitijim agensima kako bi se prevladao ovaj problem. Posebno su zanimljivi azalidi, polusintetski derivati eritromicina A, za koje je utvrđeno da pokazuju široki antimikrobni spektar i sposobnost nakupljanja unutar stanica domaćina s visokim akumulacijskim omjerima.

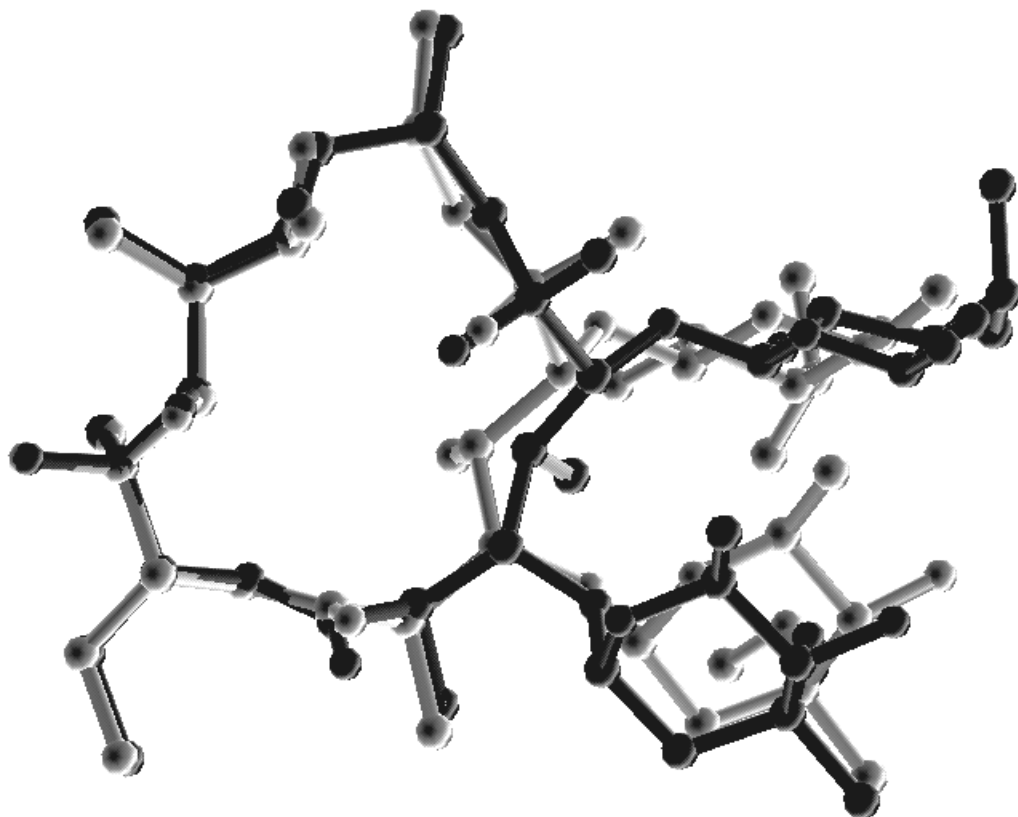


Slika 5. Kemijske structure: a) eritromicina, b) azitromicina i c) talitromicina

Postoje dva glavna mehanizma rezistencije na makrolide, npr. modifikacije ciljnih mjesta metilacijom koje sprječavaju vezanje antibiotika na ribosome (kodirane erm genom) i mehanizmi izbacivanja (efluks), posredovani *mef* (*streptococci*) i *msr* (*staphylococci*) genima. Metilacija ribosomskih rRNA baza dovodi do križne rezistencije na makrolide (M), linkozamide (L) i streptogramin B (SB), tzv. MLSB fenotip.

Makrolidi djeluju na način da se vežu na bakterijsku 50S ribosomsku podjedinicu na, ili blizu, peptidil-transferaznog centra i tako inhibiraju rast novonastalog peptidnog lanca. Kao što je već spomenuto, rezistencija na antibiotike postala je globalni problem i mnogo se truda sada ulaže u razvoj novih i potentnijih klasa lijekova. Učinkovit pristup za prevladavanje ovog problema je razumjeti principe kako ti lijekovi interagiraju s ribosomom. Nedavno su kristalne strukture nekih kompleksa ribosom-makrolid otkrile mehanizme vezanja makrolida za ribosome i tako pružile dobru osnovu za racionalni dizajn novih liganda i inhibitora. Međutim, pri analizi struktura u čvrstom stanju kompleksa ribosom-makrolid, treba imati na umu neke nrazlike između struktura dobivenih za halofilnu bakteriju *H. Marismortui* i *D. radiodurans*. Predloženi modeli se razlikuju iako ribosomske podjedinice 50S ove dvije bakterije imaju mjesta vezanja lijekova čije su sekvence visoko očuvane. Nadalje, kristalografski podaci dobiveni do sada na kompleksima makrolida s ribosomima izoliranim iz klinički nerelevantnih bakterija ne objašnjavaju sve učinke makrolida na različite patogene sojeve [33-35].

Novak i sur. [36-40] pokazali su da sustavni pristup koji kombinira NMR i račune molekuskog modeliranja može biti primjenjiv za konformacijske studije slobodnih i vezanih makrolida te njihovih interakcija s ribosomima. Njihovi rezultati pokazali su da makrolidi pripadaju dvijema glavnim konformacijskim obiteljima: "folded-out" i "folded-in", što se odnosi na vanjsko i unutarnje savijanje fragmenta prstena 3C-5C (Slika 6.).



Slika 6. Superpozicija dvije glavne konfiguracije azitromicina : ~folded-in (crna) i folded-out (siva)

Autori su zaključili da su vicinalne konstante sprega $^3J_{H_2H_3}$ i NOE kontakti proton-proton, kao što su H3-H11 i H4-H11, dobri pokazatelji savijanja aglikona. Nadalje, vicinale konstante $^3J_{CH}$ preko glikozidnih veza mogu pružiti informacije o položaju i pokretljivosti jedinica šećera u odnosu na laktonski prsten. Longitudinalna relaksacija metilnih protona također može biti korisna za istraživanje gibanja metilnih skupina koje odražavaju savijanje aglikonskog prstena. Dodatno, primjenom eksperimenata trNOESY i STD NMR, bilo je moguće karakterizirati interakcije makrolida i ribosoma.

6. LITERATURNI IZVOR

1. Predrag Novak i Tomislav Jednačak, NMR spectroscopy for studying interactions of bioactive molecules (2012) 191-220.
2. H. Patzelt, N. Goto, H. Iwai, K. Lundstrom, E. Fernholz. Modern Methods for the Expression of Proteins in Isotopically Enriched Form. In O. Zerbe (Ed.), *BioNMR in Drug Research*, Wiley-VCH, 2003 pp. 1-38
3. K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich. Attenuated T2 Relaxation by Mutual Cancellation of Dipole-dipole Coupling and Chemical Shift Anisotropy Indicates an Avenue to NMR Structures of Very Large Biological Macromolecules in Solution. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **94**(23) (1997) 12366-12371
4. K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wütrich. Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy (TROSY) for NMR Studies of Aromatic Spin Systems in ¹³C-Labeled Proteins. *Journal of American Chemical Society* **120**(25) (1998) 6394-6400
5. P. Novak, P. Tepeš, M. Cindrić, M. Ilijaš, S. Dragojevic, K. Mihaljevic. Combined Use of Liquid Chromatography-nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Liquid Chromatography-mass Spectrometry for the Characterization of an Acarbose Degradation Product. *Journal of Chromatography A* **1033**(2) (2004) 299-303
6. P. Novak, M. Cindrić, P. Tepeš, S. Dragojević, M. Ilijaš, K. Mihaljević. Identification of Impurities in Acarbose by Using an Integrated Liquid Chromatography-nuclear Magnetic Resonance and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Approach. *Journal of Separation Science* **28**(13) (2005) 1442-1447
7. P. Novak, P. Tepeš, I. Fistrić, I. Bratoš, V. Gabelica. The Application of LC-NMR and LC-MS for the Separation and Rapid Structure Elucidation of an Unknown in 5-aminosalicylic Acid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **40**(5) (2006) 1268-1272
8. P.J. Hajduk, R.P. Meadows, S.W. Fesik. One-dimensional Relaxation- and Diffusion-edited NMR Methods for Screening Compounds that Bind to Macromolecules. *Journal of American Chemical Society* **119**(50) (1997) 12257-12261
9. S.B. Shuker, P.J. Hajduk, R.P. Meadows, S.W. Fesik. Discovering High-Affinity Ligands for Proteins: SAR by NMR. *Science* **274**(5292) (1996) 1531-1534

-
10. M. Mayer, B. Meyer. Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition* **38**(12) (1999) 1784-1788
 11. M. Mayer, B. Meyer. Group Epitope Mapping by Saturation Transfer Difference NMR To Identify Segments of a Ligand in Direct Contact with a Protein Receptor. *Journal of American Chemical Society* **123**(25) (2001) 6108-6617
 12. J. Bandorowicz-Pikula, R. Buchet, F.J. Cañada, M. Clémancey, P. Groves, J. Jiménez-Barbero, J.M. Lancelin, O. Marcillat, S. Pikula, A. Sekrecka-Belniak, A. Strzelecka-Kiliszek. Characterization of Caged Compounds Binding to Proteins by NMR Spectroscopy. *Biochemical Biophysical Research Communications* **400**(3) (2010) 447-451
 13. A. Blume, A.J. Benie, F. Stolz, R.R. Schmidt, W. Reutter, S. Hinderlich, T. Peters. Characterization of Ligand Binding to the Bifunctional Key Enzyme in the Sialic Acid Biosynthesis by NMR. *Journal of Biological Chemistry* **279**(53) (2004) 55715- 55721
 14. G. Bai, B. Feng, J.B. Wang, E. Pozharski, M. Shapiro. Studies on Ligand Binding to Histidine Triad Nucleotide Binding Protein 1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **18**(18) (2010) 6756-6762
 15. Z. Ji, Z. Yao, M. Liu. Saturation Transfer Difference Nuclear Magnetic Resonance Study on the Specific Binding of Ligand to Protein. *Analytical Biochemistry* **385**(2) (2009) 380-382
 16. A. Blume, M. Fitzen, A.J. Benie, T. Peters. Specificity of Ligand Binding to Yeast Hexokinase PII Studied by STD-NMR. *Carbohydrate Research* **344**(12) (2009) 1567-1574
 17. M. Piazza, L. Yu, A. Teghanemt, T. Gioannini, J. Weiss, F. Peri. Evidence of a Specific Interaction between New Synthetic Antisepsis Agents and CD14. *Biochemistry* **48**(51) (2009) 12337-12344
 18. R.S. Houlston, B.C. Jacobs, A.P. Tio-Gillen, J.J. Verschuuren, N.H. Khieu, M. Gilbert, H.C. Jarrel. STD-NMR Used to Elucidate the Fine Binding Specificity of Pathogenic Anti-ganglioside Antibodies Directly in Patient Serum. *Biochemistry* **48**(2) (2009) 220-222
 19. F.M. Assadi-Porter, M. Tonelli, E.L. Maillet, J.L. Markley, M. Max. Interactions Between the Human Sweet-sensing T1R2–T1R3 Receptor and Sweeteners Detected by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* **1798**(2) (2010) 82-86
 20. L. Fielding. NMR methods for the Determination of Protein–ligand Dissociation Constants. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **51**(4) (2007) 219-242

-
21. S. Di Micco, C. Bassarello, G. Bifulco, R. Riccio, L. Gomez-Paloma. Differential- Frequency Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy Allows the Detection of Different Ligand-DNA Binding Modes. *Angewandte Chemie International Edition* **45**(2) (2006) 224-228
22. T.C. Ramalho, T.C.C. França, W.A. Cortopassi, A.S. Gonçalves, A.W.S. da Silva, E.F.F. da Cunha. Topology and Dynamics of the Interaction Between 5-nitroimidazole Radiosensitizers and Duplex DNA Studied by a Combination of Docking, Molecular Dynamic Simulations and NMR Spectroscopy. *Journal of Molecular Structure* **992**(1) (2011) 65-71
23. C. Kreutz, H. Kählig, R. Konrat, R. Micura. A General Approach for the Identification of Site-specific RNA Binders by ¹⁹F NMR Spectroscopy: Proof of Concept. *Angewandte Chemie International Edition* **45**(21) (2006) 3450-3453
24. N. Foloppe, I.J. Chen, B. Davis, A. Hold, D. Morley, R. Howes. A Structure-Based Strategy to Identify New Molecular Scaffolds Targeting the Bacterial Ribosomal Asite. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **12**(5) (2004) 935-947
25. M.N. Melo, F.J.R. Sousa, F.A. Carneiro, M.A.R.B. Castanho, A.P. Valente, F.C.L. Almeida, A.T. Da Poian, R. Mohana-Borges. Interaction of the Dengue Virus Fusion Peptide with Membranes Assessed by NMR: The Essential Role of the Envelope Protein Trp101 for Membrane Fusion. *Journal of Molecular Biology* **392**(3) (2009) 736-746
26. S. Follot, J.C. Debouzy, D. Crouzier, C. Enguehard-Gueiffier, A. Gueiffier, F. Nachon, B. Lefebvre, F. Fauvelle. Physicochemical Properties and Membrane Interactions of Anti-apoptotic Derivatives 2-(4-fluorophenyl)-3-(pyridin-4-yl)imidazo[1,2-a]pyridine Depending on the Hydroxyalkylamino Side Chain Length and Conformation: an NMR and ESR Study. *European Journal of Medicinal Chemistry* **44**(9) (2009) 3509-3518
27. L.F. Cabeça, M. Pickholz, E. De Paula, A.J. Marsaioli. Liposome-prilocaine Interaction Mapping Evaluated Through STD NMR and Molecular Dynamics Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B* **113**(8) (2009) 2365-2370
28. A.R. Modarresi-Alam, F. Khamooshi, M. Rostamizadeh, H. Keykha, M. Nasrollahzadeh, H.R. Bijanzadeh, E. Kleinpeter. Dynamic ¹H NMR Spectroscopic Study of the Restricted SN Rotation in Aryl-N-(arylsulfonyl)-N-(triphenylphosphoranylidene)imidocarbamates. *Journal of Molecular Structure* **841**(1) (2007) 61-66

-
29. T. Zhuang, H.S. Lee, B. Imperiali, J.H. Prestegard. Structure Determination of a Galectin-3–carbohydrate Complex Using Paramagnetism-based NMR Constraints. *Protein Science* **17**(7) (2008) 1220-1231
30. S. Tiziani, S.J. Schwartz, Y. Vodovotz. Intermolecular Interactions in Phytochemical Model Systems Studied by NMR Diffusion Measurements. *Food Chemistry* **107**(2) (2008) 962-969
31. M.H. Arroyo, K.H. Mayo. NMR Solution Structure of the Angiostatic Peptide Angiex. *Biochimica et Biophysica Acta –Proteins & Proteomics* **1774**(5) (2007) 645-651
32. N.L. Daly, K.J. Rosengren, D.J. Craik. Discovery, Structure and Biological Activities of Cyclotides. *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**(11) (2009) 918-930
33. N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P.B. Moore, T.A. Steitz. The Complete Atomic Structure of the Large Ribosomal Subunit at 2.4 Å Resolution. *Science* **289**(5481) (2000) 905-920
34. F. Schlünzen, R. Zarivach, J. Harms, A. Bashan, A. Tocilj, R. Albrecht, A. Yonath, F. Franceschi. Structural Basis for the Interaction of Antibiotics with the Peptidyl Transferase Centre in Eubacteria. *Nature* **413**(6858) (2001) 814-821
35. J.L. Hansen, J.A. Ippolito, N. Ban, P. Nissen, P.B. Moore, T.A. Steitz. The Structures of Four Macrolide Antibiotics Bound to the Large Ribosomal Subunit. *Molecular Cell* **10**(1) (2002) 117-128
36. P. Novak, I. Tatić, P. Tepeš, S. Koštrun, J. Barber. Systematic Approach to Understanding Macrolide-ribosome Interactions: NMR and Modeling Studies of Oleandomycin and its Derivatives. *The Journal of Physical Chemistry A* **110**(2) (2006) 572-579
37. P. Novak, Z. Banić Tomišić, P. Tepeš, G. Lazarevski, J. Plavec, G. Turkalj. Conformational Analysis of Oleandomycin and its 8-methylene-9-oxime Derivative by NMR and Molecular Modeling. *Organic & Biomolecular Chemistry* **3**(1) (2005) 39-47
38. P. Novak, J. Barber, A. Čikoš, B. Arsić, J. Plavec, G. Lazarevski, P. Tepeš, N. Košutić-Hulita. Free and Bound state Structures of 6-*O*-methyl Homoerythromycins and Epitope Mapping of their Interactions with Ribosomes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **17**(16) (2009) 5857-5867
39. N. Košutić-Hulita, D. Matak-Vinković, M. Vinković, P. Novak, G. Kobrehel, G. Lazarevski. Conformational Behaviour of 11-*O*-methylazithromycin in the Solid and Solution State. *Croatica Chemica Acta* **74**(2) (2001) 327-341

-
40. M.B. Krajačić, M. Dumić, P. Novak, M. Cindrić, S. Koštrun, A. Fajdetić, S. Alihodžić, K. Brajša, N. Kujundžić. Discovery of Novel Ureas and Thioureas of 3-decladinosyl-3- hydroxy 15-membered Azalides Active Against Efflux-Mediated Resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters* **21**(2) (2011) 853-856