



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Lucia Ema Sekula

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

INTERAKCIJE BIOAKTIVNIH MOLEKULA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za Analitičku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Predrag Novak

Zagreb, 2019. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

30. svibnja 2019.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

20. rujna 2019.

Mentor rada: prof. dr. sc. Predrag Novak

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Bioaktivne molekule.....	1
1.2. Tehnike analize.....	2
1.2.1. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR).....	4
1.2.2. Proučavanje interakcija i njihova detekcija	5
§ 2. INTERAKCIJE BIOAKTIVNIH MOLEKULA	7
2.1. Interakcije protein – ligand.....	7
2.1.1. Interakcije proučavane spektroskopijom STD NMR.....	7
2.1.2. Interakcije proučavane spektroskopijom trNOE.....	9
2.2. Interakcije DNA, RNA – ligand.....	12
2.2.1. Interakcija DNA – protein.....	12
2.2.2. Interakcija RNA – protein.....	14
2.3. Interakcije makrolid – ribosom	15
2.3.1. Istraživanja na makrolidnim antibioticima.....	17
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XIX

§ Sažetak

Proučavanje interakcija bioaktivnih molekula predmet je mnogih istraživanja jer nudi uvid u mnoge biološke procese i općenito funkcioniranje živih organizama. Istraživanja su ponudila velik broj novih informacija na molekulskoj razini, ali su se paralelno razvijale mnoge tehnike kojima se provode analize proučavanih interakcija. Razumijevanje interakcija bioaktivnih molekula i eksperimenata kojima se one potvrđuju vrlo je važno sredstvo u daljnjim istraživanjima vezanim uz područja biologije, kemije i medicine. Na primjerima su opisane neke od interakcija (protein-protein, DNA-protein, RNA-protein te makrolid-ribosom) te prezentirani podaci kojima se potvrđuje pozitivna interakcija i njezino značenje.

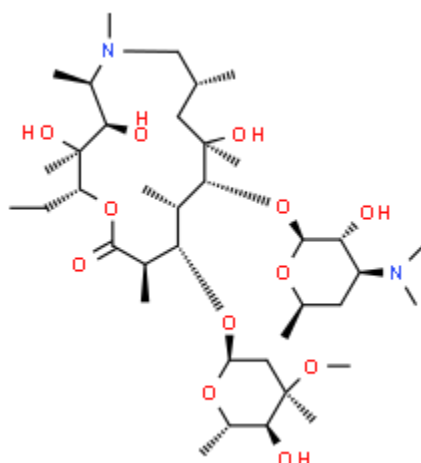
§ 1. UVOD

1.1. Bioaktivne molekule

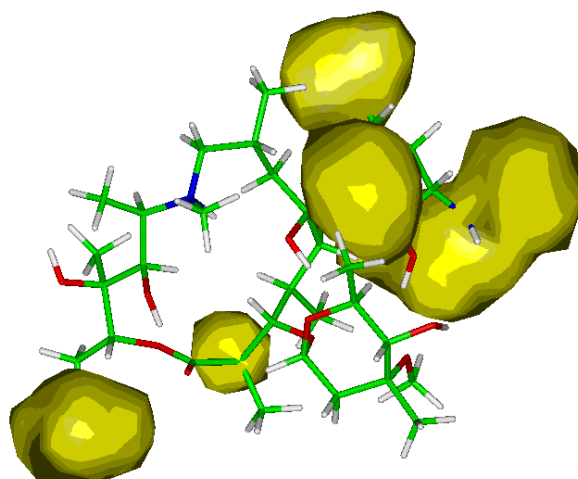
Bioaktivne molekule su farmakološki aktivne molekule najčešće dobivene iz prirodnih izvora i prerađene ili prepravljene postupcima kemijske sinteze. Razvoj takvih molekula jedna je od glavnih poveznica između kemije i medicine (Slika 1).

Jedan od glavnih preduvjeta za uspješno dizajniranje bioaktivnih molekula i lijekova je točno definirati trodimenzijsku strukturu malih molekulskih liganada, receptora i njihovih kompleksa. Ključni koraci u tom procesu uključuju identifikaciju strukturnih elemenata i skupina odgovornih za bioaktivnost, s obzirom da još uvijek postoji veliko ograničenje u smislu dizajna novih lijekova iz struktura biomolekula visoke rezolucije, pa je od velike važnosti što bolje razmjeti, predočiti i definirati molekulske mehanizme i dinamiku interakcija bioaktivnih molekula.¹

Molekulsko prepoznavanje se odnosi na proces u kojem biološke makromolekule međusobno djeluju jedna s drugom ili s različitim malim molekulama putem nekovalentnih interakcija i tvore specifičan kompleks. Takav proces ima dvije bitne karakteristike: specifičnost koja razlikuje ligande prema vrlo specifičnim i manje specifičnim; i afinitet, koji određuje tendenciju vezanja liganda (Slika 2). Najvažnija je činjenica da je molekulsko prepoznavanje proces koji se sastoji od složenog mehanizma. Dakle, djelotvorni lijek ne utječe samo na ciljnu molekulu već i na svojstva drugih biomolekula u organizmu. Uz to, u svrhu prevencije neželjenih popratnih učinaka, lijekovi ne smiju osim djelovanja na svoje ciljne biološke molekule utjecati na svojstva drugih biomolekula u organizmu.²



Slika 1. Azitromicin kao primjer bioaktivne molekule: antibiotik širokog spektra djelovanja, pripada podskupini makrolidnih antibiotika – azalidima.⁵



Slika 2. Vežanje epitopa na azitromicin određeno spektroskopijom STD – NMR.¹

1.2. Tehnike analize

Napretkom tehnologije i novim saznanjima u poljima medicine, kemije, fizike te biologije, paralelno su se razvile i usavršile mnoge tehnike za istraživanje interakcija ligand-receptor, kao što su fluorescencijska polarizacija (engl. *fluorescence polarization*, FP), površinska plazmonska rezonancija (engl. *surface plasmon resonance*, SPR), nuklearna magnetska rezonancija (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR), cirkularni dikroizam (engl. *circular dichroism*, CD), statičko i dinamičko raspršivanje svjetlosti (engl. *static and dynamic light scattering*, SLS i DLS), analitičko ultracentrifugiranje (engl. *analytical ultracentrifugation*, AUC), mikroskalarna termoforeza (engl.

microscale thermophoresis, MST) te kalorimetrijske metode kao što su izotermalna kalorimetrijska titracija (engl. *isothermal titration calorimetry*, ITC) i diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC), ali i mnoge druge.³ Međutim, tijekom raznih istraživanja potvrđeno je da takve tehnike, osim što zahtjevaju dugotrajne postupke odvajanja, mogu utjecati i na ravnotežu proučavanih interakcija koje mogu promijeniti aktivnost liganda. Kao dobra zamjena tim metodama može poslužiti spektroskopija NMR jer pruža velik broj informacija bez uništavanja uzorka što ju čini jednom od najmoćnijih i najvrijednijih metoda u suvremenom otkrivanju i razvoju lijekova. Postoji mnoštvo jedno- i višedimenzijjskih tehnika razvijenih posljednjih godina za proučavanje struktura biološki važnih molekula kao što su proteini i nukleinske kiseline i njihove interakcije s drugim makromolekulama. Iako poznavanje 3D struktura kompleksa ligand-receptora može u određenoj mjeri ubrzati potragu za molekulama s boljom aktivnošću lijeka, optimizacija fizikalno-kemijskih svojstava koja diktiraju učinkovitost *in vivo* također imaju važnu ulogu. Ta svojstva uključuju topljivost, apsorpciju, distribuciju, metabolizam, izlučivanje i toksičnost, poznatije kao ADMET. Danas određivanje strukture proteina spektroskopijom NMR obično uključuje izotopno obilježavanje proteina koji je prekomjerno eksprimiran u genetski modificiranim bakterijama. Prema tome, dostupnost ¹³C, ¹⁵N i ²H izotopno obogaćenih proteina u kombinaciji s brojnim multidimenzijjskim eksperimentima NMR omogućuje sekvencijsku analizu i određivanje strukture proteina ili kompleksa proteina i liganda.¹

Tijekom godina mnoge bioaktivne molekule otkrivene su iz bioloških resursa u cilju komercijalizacije novih proizvoda koji se koriste u mnogim istraživanjima (farmaceutska industrija, nanotehnologija, poljoprivreda...), a proces otkrivanja potpomognut je brzim razvojem tehnika i tehnologije u kemiji i biotehnologiji. Napredak u genetici i računskoj biologiji također je promijenio način na koji se formuliraju hipoteze, kao i strategije za otkrivanje takvih molekula. Od velike važnosti je i način skladištenja i transporta bioaktivnih molekula s ciljem povećanja njihove učinkovitosti i biodostupnosti. Razumijevanje ponašanja i funkcije bioaktivnih molekula pomaže nam predvidjeti ishode bioloških procesa u kojima sudjeluju i okarakterizirati njihovu ulogu u metaboličkim procesima.

1.2.1. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR)

Spektroskopske metode temelje se na interakciji tvari i elektromagnetnog zračenja, a njima pripada i nuklearna magnetska rezonancija. U radiovalnom području spektra apsorpcija zračenja uzrokuje prijelaze među spinskim stanjima, odnosno prijelaze spinova elektrona i jezgri. Nuklearna magnetska rezonancija ili NMR je jedna od najmoćnijih i najsuvremenijih apsorpcijskih tehnika određivanja atomske strukture organskih, anorganskih i bioloških molekula u otopini. NMR se može koristiti za analizu različitih jezgri (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F i ^{31}P) jer se mogu proučavati jezgre koje posjeduju spin različit od nule. Najjednostavniji primjer je jezgra vodika.

Postoje jednodimenzijske i dvodimenzijske tehnike NMR-a. Neke jednodimenzijske tehnike su: ^1H NMR, *off resonance* ^{13}C NMR, APT, INEPT, dok su neke od dvodimenzijskih tehnika: COSY, HMQC, HSQC, NOESY, ROESY i dr. U NMR metodi dolazi do apsorpcije radiofrekvencijskog zračenja pri prijelazu između kvantnih stanja atomskih jezgri. Magnetski aktivne jezgre neke tvari koje apsorbiraju zračenje moraju biti u jakom magnetskom polju. Nuklearni overhauserov efekt (NOE) se definira kao promjena intenziteta rezonancije određenog spina zbog promjena u ravnotežnoj napućenosti spinova druge jezgre. NOE vrijedi ako su navedeni procesi povezani mehanizmom križne relaksacije.⁴ Može skratiti vrijeme snimanja heteronuklearnih spektara i daje korisne informacije o strukturi molekule, može opisati protein:protein interakcije te odrediti cjelokupnu trodimenzijsku strukturu kompleksa. NOE je NMR ekvivalent fluorescentom rezonancijskom prijenosu energije (FRET).³

Metodom NMR se iz dobivenih spektara može dobiti mnogo podataka i parametara o interakcijama molekula: podaci o kutevima i udaljenostima atoma u molekuli, informacije o perturbaciji kemijskog pomaka, strukturi, sprezanju spin-spin ili dinamici same molekule. Radi se i o kvalitativnoj i o kvantitativnoj metodi.⁴ Danas, kao jedna od najsuvremenijih metoda, ima primjenu u svim područjima znanosti: u medicini, farmaciji, poljoprivrednoj i prehrambenoj industriji, a najčešće se koristi u analitičkim laboratorijima, u kontroli kvalitete i autentičnosti te u različitim istraživanjima. Njezina glavna prednost je činjenica da se radi o nedestruktivnoj metodi koja ne oštećuje uzorak prilikom snimanja. Osim što se može koristiti za snimanje spektara velikog broja molekula, koristi se i na različitim temperaturama, a moguće je snimanje spektara uzoraka i u tekućem i u krutom stanju koristeći malu količinu uzorka.

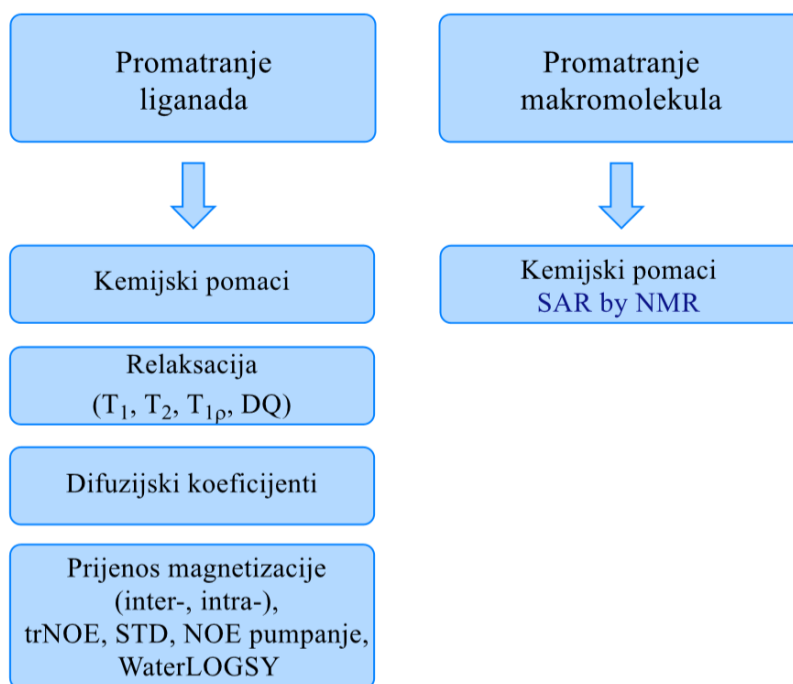
Prednost metode NMR je ta što pruža uvid u strukturu molekula, omogućuje istraživanja interakcija bioloških molekula pri fiziološkim uvjetima *in vivo*. Zanimljivo je da pruža

mogućnost promatranja kako stanica funkcionira na molekularnoj razini u stvarnom vremenu, što je izuzetno korisno za razvoj bioloških molekula. Međutim, tijekom snimanja NMR spektara bioloških molekula, ponekad je potrebno izotopno označavanje proteina, a analiza spektara je zahtjevna i dugotrajna te se radi i o veoma skupoj metodi.

1.2.2. Proučavanje interakcija i njihova detekcija

Interakcije liganada i receptora mogu se promatrati različitim tehnikama koje se mogu temeljiti na detekciji promjena parametara NMR receptora ili liganada uslijed nastanka odgovarajućeg kompleksa (Tablica 1).¹

Tablica 1. NMR parametri za proučavanje interakcija liganada i receptora.¹



Tehnika STD (engl. *saturation transfer difference*) NMR je vrlo popularna i brza tehnika koja se oslanja na efekt NOE. Ova tehnika se temelji na prijenosu magnetizacije s receptora na vezani ligand koji se izmijeni u otopini, a zatim detektira. Spektar STD je rezultat dvaju eksperimenata (off i on-resonance). Tehnika STD je pogodna za istraživanje interakcija malih molekula s receptorima velikih masa, s obzirom da se u spektru opažaju samo signali liganada u interakciji, ne zahtijeva veliku količinu receptora. Spektroskopija STD NMR može se primijeniti za identifikaciju skupina koje su u izravnom kontaktu s receptorom jer one podliježu

najvećem stupnju zasićenja. Navedena informacija se može koristiti za određivanje strukturnih dijelova važnih za vezanje liganda, kao i za mapiranje epitopa.¹ Osim tehnike STD NMR koristi se i tehnika trNOE (engl. *transferred nuclear Overhauser effect*) koja se oslanja na efekt NOE gdje prilikom vezanja spoja na receptor, dolazi do značajnih promjena u vrijednostima NOE, odnosno može se uočiti promjena u predznaku i vrijednostima efekta NOE.

Tehnika SAR by NMR korisna je za otkrivanje liganada koji se velikim afinitetom vežu na receptor. Metoda se naziva SAR by NMR jer se proučava odnos strukture i aktivnosti (engl. *structure-activity relationships*) molekule pomoću NMR-a. Najprije se pretpostave oblik i funkcijske skupine prvog fragmenta, pri čemu se promatraju promjene kemijskih pomaka ¹⁵N ili amidnog ¹H snimanjem spektra ¹H-¹⁵N HSQC tijekom vezanja liganda na izotopno obilježenu makromolekulu te se pomoću dobivenih podataka optimizira prvi ligand, tj. fragment. Zatim se pretpostavi oblik drugog fragmenta, koji se optimizira pomoću signala i korelacija asigniranih iz novog spektra ¹H-¹⁵N HSQC. Njihov stvarni položaj i orijentacija u kompleksu eksperimentalno se određuje spektroskopijom NMR ili rendgenskom difrakcijom. Prednost korištenja spektara ¹H-¹⁵N HSQC je mogućnost brzog određivanja različitih mjesta vezanja fragmenata, što je ključno za interpretaciju odnosa strukture i aktivnosti, te za sintezu liganada. Također, ova metoda značajno smanjuje vrijeme potrebno za sintezu i otkriće liganada visokog afiniteta, a otkriće takvih liganada izrazito je korisno u farmaceutskoj industriji u istraživanju lijekova.⁶

Preduvjet za dublje razumijevanje proteinskih funkcija je temeljito razumijevanje mehanizama odgovornih za interakcije proteina i liganda, za koje su ključni opis, karakterizacija i kvantifikacija interakcija koje omogućuju formiranje kompleksa. Osim toga, korištenjem informacija o strukturnim podacima i mehanizmima vezanja bioaktivnih molekula omogućena je optimizacija procesa pronalaženja novih lijekova i detaljnije razumijevanje prirode molekulskih interakcija. U ovom radu detaljnije će biti predložene neke od interakcija koje se ostvaruju među bioaktivnim molekulama.

§ 2. INTERAKCIJE BIOAKTIVNIH MOLEKULA

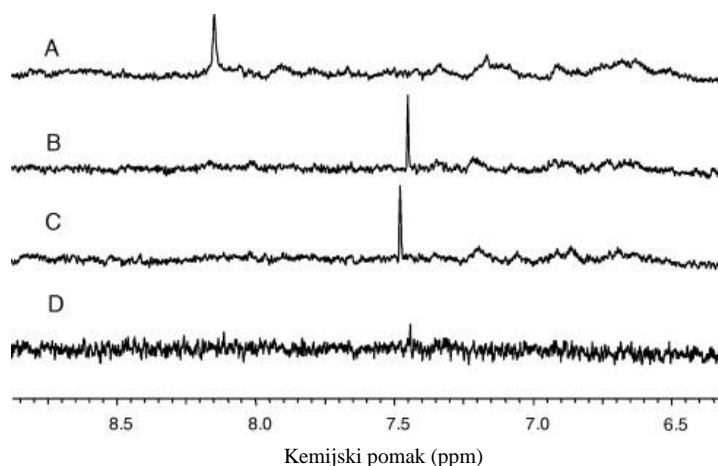
2.1. Interakcije protein – ligand

Proteini su vrlo važna klasa makromolekula jer igraju veliku ulogu u stanici, uključujući strukturne (citoskeletne), mehaničke (mišićne), biokemijske (enzime) i stanične signalne (hormonske) funkcije. U biti, proteini ostvaruju svoje biološke funkcije putem izravne fizičke interakcije s drugim molekulama, uključujući proteine i peptide, nukleinske kiseline, membrane, supstrate i male molekule tj. ligande kao što je primjerice molekula kisika.

2.1.1. Interakcije proučavane spektroskopijom STD NMR

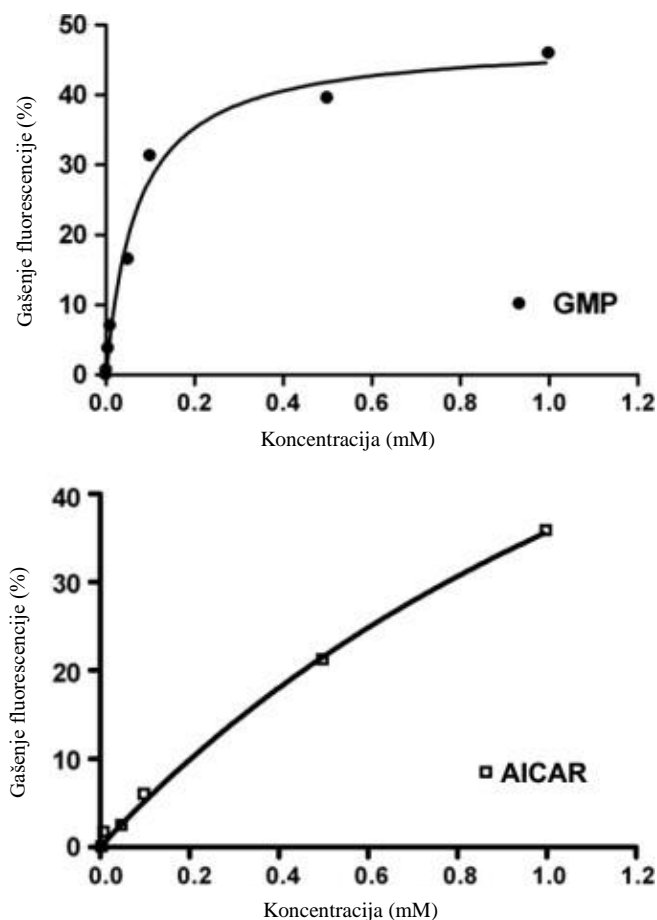
Histidinsko trijadni nukleotidni vezni protein 1 (HINT1) pripada skupini proteina histidinske trijade (HIT) nazvanog prema motivu vezanja nukleotida u slijedu His- ϕ -His- ϕ -His- $\phi\phi$, u kojem je ϕ hidrofobna aminokiselina.⁷

Tehnika spektroskopije STD NMR korištena je za provjeru vezanja nekoliko liganda. S obzirom da je GMP poznati HINT1 ligand s velikim afinitetom vezanja, korišten je za vrednovanje eksperimenta STD. Prikazani su podaci STD za GMP (A) kao i za dva druga liganda nepoznatog afiniteta vezanja: AICAR fosfat (B) i AICAR (C)⁸ (Slika 3.). U eksperimentu je vezanje liganda potvrđeno jakim signalima u spektru: pri $\delta = 8,18$ za GMP te pri oko $\delta = 7,45$ za AICAR ligande.



Slika 3. Spektri STD-NMR GMP (A), AICAR (B) i fosforiliranog AICAR (C) vezanja na HINT1 nakon korekcije. Isti postupak primijenjen je na smjesu GMP-a i AICAR-a u nedostatku proteina kao kontrolna grupa (D).⁸

Vežanje je potvrđeno gašenjem fluorescencije (Slika 4). Izračunata je konstanta disocijacije vežanja $1,1 \pm 0,7$ mM za AICAR i $67 \pm 7,9$ μ M za GMP.⁸



Slika 4. Gašenje fluorescencije HINT1 uz prisutnost GMP – a i AICAR – a.⁸

U potrazi za potencijalnim ligandima u dizajnu lijekova potrebno je osigurati da se spojevi od interesa vežu na protein i da je mjesto vezanja moguće prepoznati. Ustanovljeno je da se NMR spektroskopijom može primijetiti vezanje liganda na HINT1, korištenjem kombinacije STD NMR i drugih tehnika, a kako je ligand AICAR malog afiniteta za HINT1, dokazano je kako je STD NMR izrazito osjetljiva metoda. Za potvrdu ostvarenih interakcija korišteni su podaci dobiveni fluorescencijom, međutim oni nisu toliko „čisti“ tj. mogu se vidjeti odstupanja zbog interferencija koje uzrokuju visoke koncentracije liganda, što u NMR spektrima nije vidljivo jer on ne ovisi o potencijalnim interferencijama.

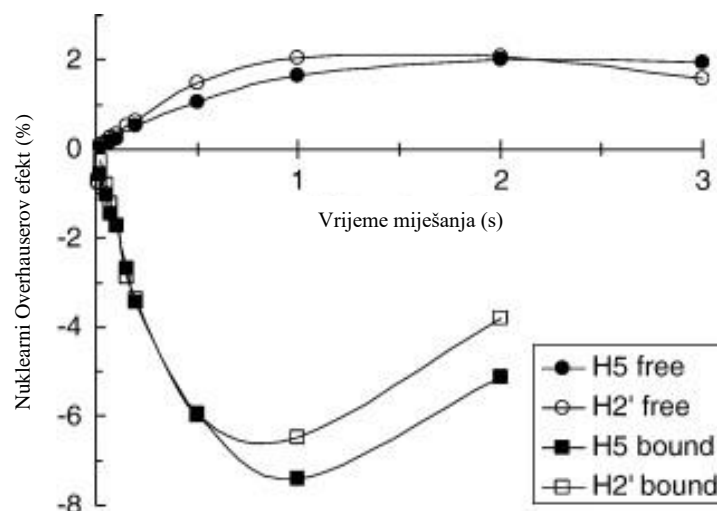
2.1.2. Interakcije proučavane spektroskopijom trNOE

Jednom od dominantnijih metoda za određivanje vezanih konformacija i motiva vezanja supstrata smatra se spektroskopija trNOE, u širokoj je primjeni za ugljikohidrate vezane na proteine.⁹

Spektri dobiveni metodom trNOE dobivaju se korištenjem standardnih 2D NOE pulsni slijedova i koriste se za proučavanje interakcija liganada i biomolekula. Metoda je izrazito povoljna u slučajevima brze izmjene liganda između vezanog i slobodnog oblika.

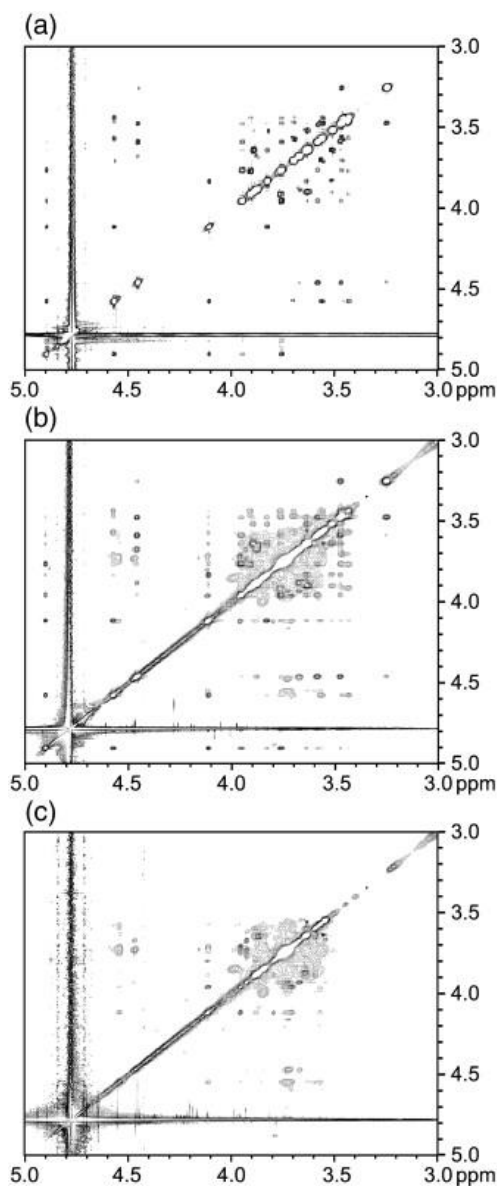
N-acetilglukozaminiltransferaza V (GnT-V) je enzim koji je uključen u biosintezu oligosaharida povezanih asparaginom. On je odgovoran za prijenos N-acetilglukoamina (GlcNAc) s nukleotidnog davatelja šećera, uridin 5'-difosfo-N-acetilglukoamina (UDP-GlcNAc), na šestu poziciju N-vezajućih struktura oligosaharida.

Intramolekulske udaljenosti od 1 H donora do 1 H akceptora odvojeno vezane za GnT-V određene su korištenjem eksperimenata s 1D trNOE i 2D trNOESY. Intenziteti se mogu kvantitativno interpretirati u vidu udaljenosti koristeći spektre 1D NOE u kojima se razlikuju vremena miješanja NOE. Takvi su spektri prikupljeni za slobodni i vezani UDP – GlcNAc¹⁰ (Slika 5).



Slika 5. Krivulje NOE interakcija na uracil-H6 u odsutnosti (slobodni, krugovi) i prisutnosti (vezani, kvadrati) GnT-V-a. Početni nagibi krivulja korišteni su za izračunavanje udaljenosti između uracila-H6 i riboze-H2' u slobodnom i vezanom stanju, koristeći udaljenost između uracil-H6 i -H5 kao referencu.¹⁰

Spektri NOESY (Slika 6.) snimljeni su za akceptor sa i bez GnT-V. GnT-V pozadinski spektar NOESY uspoređuje se s akceptorskim spektrom trNOESY. Analizi donora pokazuju tipični anti-glikozidni torzijski kut za uridinske ogranke i naznake linearne konfiguracije za molekule bez interakcije između GlcNAc i uridina. TrNOE spektri za akceptor kombinirani su sa simuliranim žarenjem (engl. *simulated annealing*) za optimizaciju strukture u kojoj su GlcNAc, Man i Glc prstenovi dobro definirani na aktivnom mjestu GnT-V. Vežući epitopi za analoge donora bili su u skladu s vezanjem glikoziltransferaza na nukleotidne šećere. Vezni epitop akceptora naznačio je bliske kontakte između GlcNAc prstena i GnT-V, u skladu s poznatom aktivnošću supstrata GnT-V i odnosima strukture i aktivnosti akceptorskog analoga sa GnT-V. Napravljen je novi eksperiment koristeći tehniku pojačanja paramagnetskim opuštanjem kako bi se odredila udaljenost i relativna orijentacija supstrata davatelja i akceptora na aktivnom mjestu GnT-V. Iako efekti spinske difuzije sprječavaju kvantitativnu analizu ovih podataka, kvalitativna interpretacija, u kombinaciji s podacima o konformaciji i površinskim kontaktima proteina određenih za dva liganda, može proizvesti model koji je u skladu s proračunima molekuskog modeliranja.



Slika 6. Prošireni spektar NOESY (područje ugljikohidrata) za (a) α -1-6 Man ogranak (b) α -1-6 Man ogranak u prisutnosti GnT-V i (c) pozadinski signal GnT-V. Spektri omogućuju procjenu konformacijskih promjena pri vezanju liganda na GnT-V.¹⁰

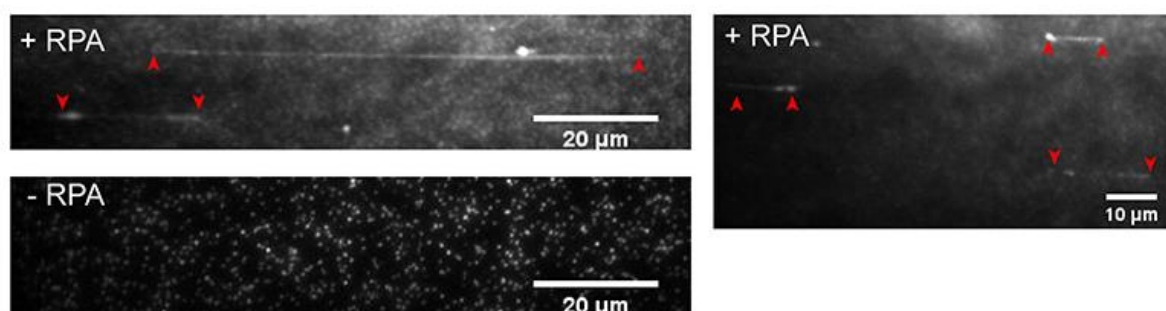
Navedenim eksperimentima dobiven je uvid u strukturnu karakterizaciju vezanih supstrata GnT-V i njihovu interakciju s aktivnim mjestom GnT-V. Podaci iz trNOE-a uspješno su korišteni za određivanje strukturnih karakteristika aktivnog mjesta GnT-V potrebnih za karakterizaciju konformacije liganda i kontaktnih površina ligand-protein.¹⁰ Strukturne informacije dobivene za supstrate na aktivnom mjestu GnT-V mogu biti korisne za oblikovanje inhibitora za GnT-V.

2.2. Interakcije DNA, RNA – ligand

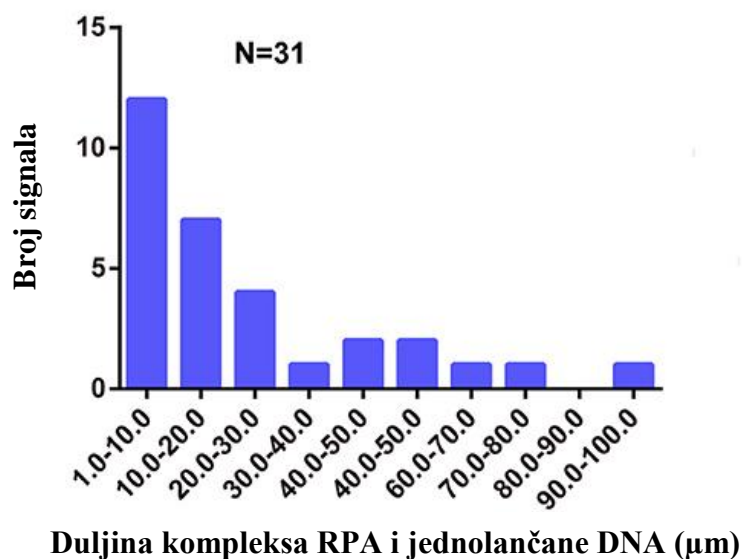
2.2.1. Interakcija DNA – protein

Moguće je promatrati interakcije između replikacijskog proteina A (RPA) označenog kvantnom točkom (Qdot705) i jednolančane DNA koristeći mikrofluidnu protočnu ćeliju i metodu fluorescentne spektroskopske analize potpunom refleksijom rentgenskih zraka. Za proučavanje takve interakcije najprije je bilo potrebno pročititi biotiniziranu RPA tandemskim afinitetnim pročišćavanjem uz pomoć CBP oznake i $3 \times$ oznake iz homogenata kvasaca.¹¹ Takvim pristupom eksperiment je sveden na jednomolekulsku razinu.

Nakon provedenog eksperimenta promatrani su dobiveni spektri u kojima su vidljivi fluorescencijski signali u prisutnosti i odsutnosti RPA (Slika 7) te je analizirana ovisnost broja dobivenih signala o duljini kompleksa RPA i jednolančane DNA (Slika 8).



Slika 7. Spektri dobiveni metodom fluorescentne spektroskopske analize potpunom refleksijom rentgenskih zraka: uz prisutnost 0,1 nM RPA-Qdot705 i bez njega. Crvene strelice označavaju dva kraja kompleksa RPA i jednolančane DNA.¹¹



Slika 8. Duljine kompleksa RPA i jednolančane DNA.¹¹

Mjesta cijepanja DNA su visoko citotoksične lezije u kojima dolazi do pucanja oba lanca fosfodiesterske okosnice u neposrednoj blizini. Neuspjeli popravak takvog prijeloma rezultira gubitkom genetskih podataka, a loš popravak može prouzročiti preuređivanje kromosoma. Homološka rekombinacija glavni je mehanizam popravka bez nastanka pogreške, a oštećenja u ovom procesu povezana su s povećanom mutagenozom i većom mogućnošću pojave raka.^{12,13} Homologna rekombinacija započinje nukleolitičkom razgradnjom 5'-kraja kako bi se stvorio 3' jednolančana DNA, proces nazvan krajnjom resekcijom.¹⁴

Ubacivanjem, tj. uz dodatak RPA-Qdot705 u protočnu ćeliju i inkubacijom, primjećeni su fluorescentni signali RPA-Qdot705 vezanja na jednolančanu DNA. RPA ima prividno veći afinitet prema jednolančanoj DNA u odnosu na dvolančanu, pa se RPA učinkovito veže na jednolančanu DNA.

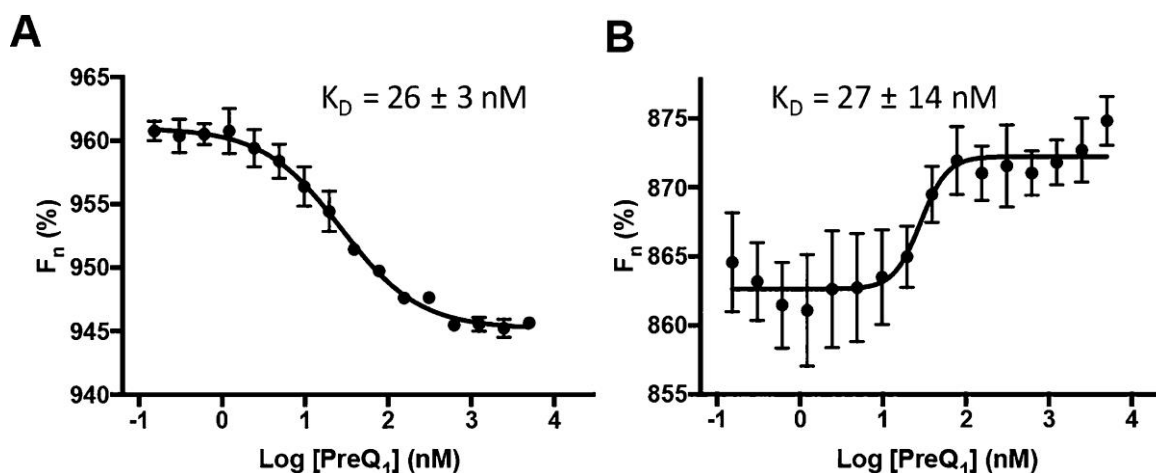
Eksperimentom je vizualiziran kompleks RPA-Qdot705 i jednolančane DNA. Moguće je da će korištenje fluorescentno označene RPA omogućiti izračunavanje točne duljine jednolančane DNA pri replikaciji te ponuditi nova rješenja u metodama popravka oštećenja ili prijeloma DNA.¹¹

2.2.2. Interakcija RNA – protein

Posljednjih godina došlo je do dramatičnog rasta u istraživanjima vezanim uz RNA, molekulu s velikom raznolikošću struktura i funkcija. Postala je sve veći interes mnogih znanstvenih radova uzimajući u obzir njezinu ulogu kao međuprodukt u središnjoj biološkoj dogmi. Kako je rastao broj istraživanja, sve je više i otkrivenih funkcija ove molekule, što je rezultiralo daljnim istraživanjima usmjerenim k potpunom razumijevanju biologije RNA te njezinih interakcija uzimajući u obzir da ona regulira mnoge biološke procese (transkripcija, translacija, prigušivanje gena, inhibicija translacije ili transkripcije...). S obzirom na nedavni napredak biologije RNA, male molekule sposobne modulirati RNA funkciju bile bi potencijalni terapeutici.^{15,16}

Novija tehnologija nazvana mikroskopska termoforeza (MST), koja mjeri usmjerenu migraciju molekule i / ili kompleksa molekula-ligand duž temperaturnog gradijenta, može se koristiti za mjerenje afiniteta vezanja koristeći vrlo male količine uzorka. Visoka osjetljivost ove tehnike omogućuje mjerenje konstanti afiniteta u nanomolarnom i mikromolarnom rasponu.

Riboswitchevi su visoko strukturirani RNA aptameri koji se prirodno javljaju unutar 5' netranslatirane regije mnogih bakterijskih gena, podliježu konformacijskim promjenama nakon vezanja na metabolit što rezultira regulacijom ekspresije gena na transkripcijskoj i translacijskoj razini, među najboljim su primjerima visoko-afinitetnih RNA liganada. Za proučavanje interakcija korištena su dva riboswitcha koja vežu bakterijski metabolit pre-queueosine1 (preQ1): Bs i Tt. Riboswitch-evi Bs i Tt pokazali su jaku interkciju s preQ1, ali je vezanje preQ1 na Bs riboswitch rezultiralo većom promjenom termoforeze u odnosu na Tt riboswitch (Slika 5). Tt riboswitch je pokazao neto negativan termoforetski pokret nakon vezivanja, dok je Bs riboswitch pokazao pozitivnu termoforezu, pružajući daljnje dokaze da dva riboswitcha podliježu različitim promjenama konformacije nakon vezanja s preQ1 (Slika 9).¹⁴

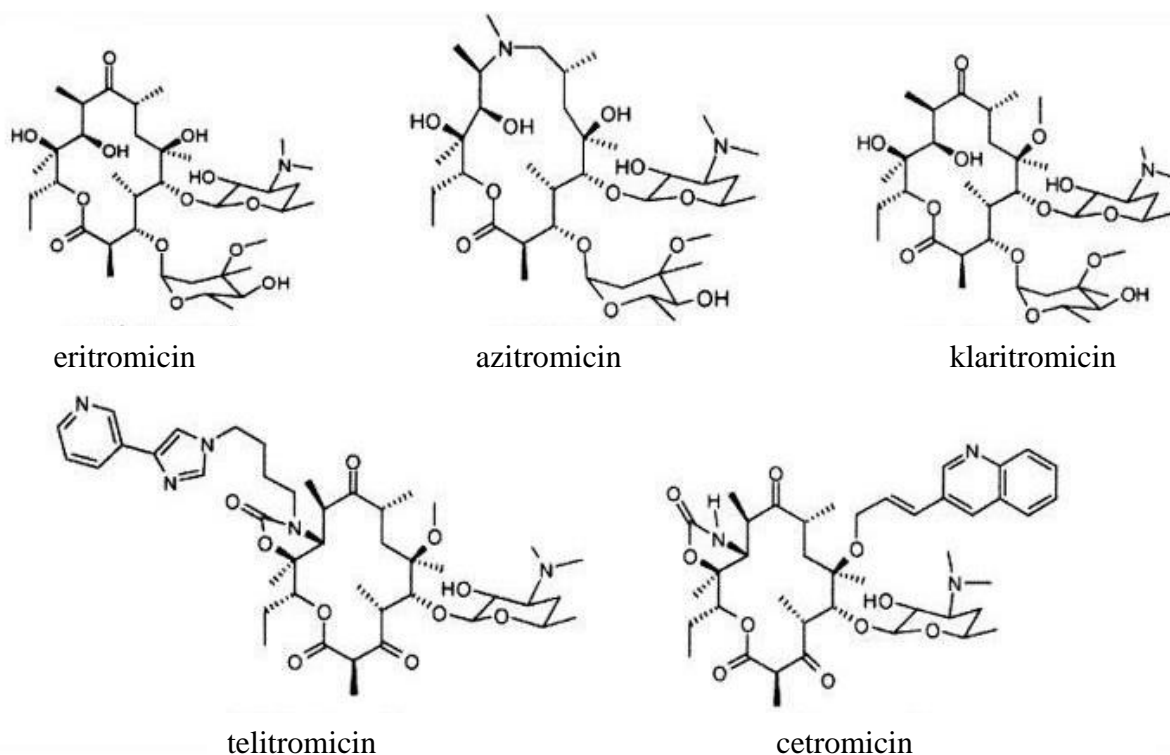


Slika 9. Krivulje vezivanja koje generira MST za vezanje preQ1 na (A) Bs riboswitch i (B) Tt riboswitch. Suprotna promjena termoforetskog ponašanja sugerira da ova dva aptamera prolaze različite konformacijske promjene nakon vezanja liganda.¹⁴

Podaci ovdje navedeni pokazuju da će MST najvjerojatnije biti koristan kao tehnika za analizu sustava u kojima se nakon vezanja liganda događa ili promjena konformacije ili promjena neto naboja, stoga se MST može smatrati vrijednim pristupom za istraživanje interakcija RNA-ligand, uključujući istraživanje vezanja malih molekula.

2.3. Interakcije makrolid – ribosom

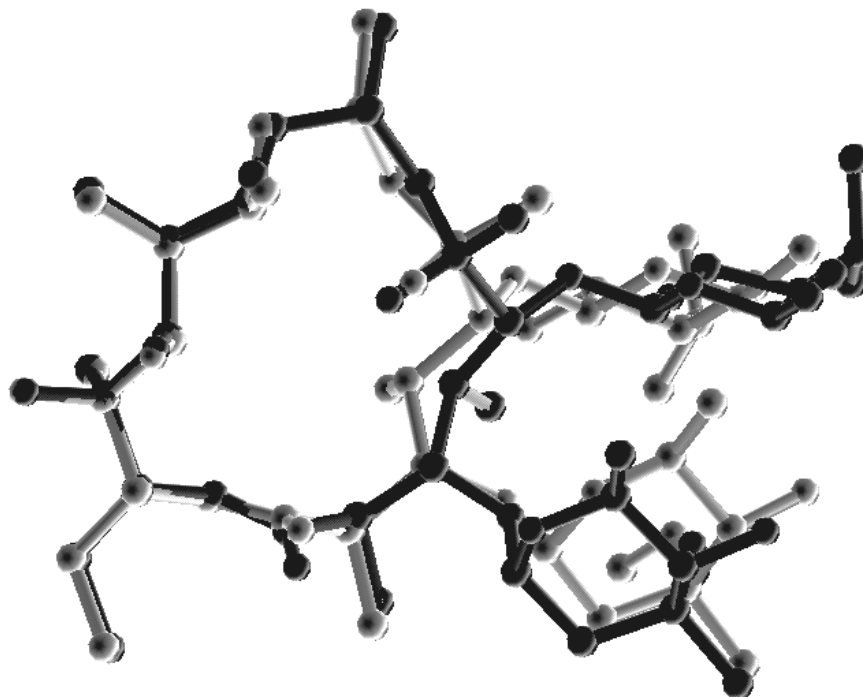
Makrolidni antibiotici, kao što su eritromicin, azitromicin ili telitromicin (Slika 10), poznati su kao djelotvorna terapijska sredstva za liječenje zaraznih bolesti. Kako se mnoge farmaceutske tvrtke koriste tim spojevima, istraživanja vezana uz tu grupu spojeva usmjerena su prema otkrivanju novih makrolidnih antibiotika kemijskom izmjenom postojećih klasa prirodnih derivata. Cilj je dobiti nova terapijska sredstva koja imaju poboljšani sveukupni biološki profil s posebnim naglaskom na rezistentne bakterijske sojeve. Nameće se problem kontinuiranog nastajanja bakterija otpornih na više lijekova što ozbiljno ugrožava zdravstvenu zajednicu i intenzivira potragu za novim i učinkovitijim agensima kako bi se problem rezistencije savladao. Posebno su zanimljivi azalidi, semisintetski derivati eritromicina A, za koje je otkriveno da imaju širok antimikrobni spektar i sposobnost koncentracije unutar stanica domaćina s visokim omjerom akumulacije.

Slika 10. Strukturne formule nekih makrolida.¹⁷

Postoje dva glavna mehanizma otpornosti na makrolide, modifikacije ciljnog mjesta primjerice metilacijom koje sprječavaju vezanje antibiotika na ribosom i modifikacije mehanizma izlučivanja.

Makrolidi pokazuju svoju aktivnost interakcijom s bakterijskom 50S ribosomskom podjedinicom u centru peptidil-transferaze ili blizu njega i na taj način inhibiraju rast nastajućeg peptidnog lanca. Ponovno se nameće problem rezistencije bakterija, danas prepoznata kao globalni problem, što dodatno motivira istraživače u traženju novih i snažnijih klasa lijekova. Kako bi se problem što učinkovitije prevladao, zahtjeva se potpuno razumijevanje principa interakcije ovih lijekova s ribosomom, poznavanjem kristalnih struktura kompleksa ribosoma-makrolida moguće je pretpostaviti mehanizme vezanja makrolida na ribosome te, na temelju toga, ostvariti osnovu za racionalno oblikovanje novih liganda i inhibitora. Međutim, neki od dobivenih podataka o kristalnoj strukturi kompleksa makrolida s ribosomima izoliranim iz klinički nerelevantnih bakterija ne objašnjavaju sve učinke makrolida na različite patogene sojeve, pa je potrebno uzeti u obzir da strukturne značajke kompleksa možda nisu potpuno iste u otopini kao u čvrstom stanju.¹

Pokazano je da bi se sustavni pristup kombiniranjem podataka dobivenih spektroskopijom NMR i molekulskog modeliranja mogao primijeniti na konformacijske studije slobodnih i vezanih makrolida i njihove interakcije s ribosomima. Makrolidi poprimaju dvije glavne konformacije, „folded – in“ i „folded – out“, što se odnosi na vanjsko i unutarnje savijanje fragmenta prstena 3C- 5C (Slika 11).¹



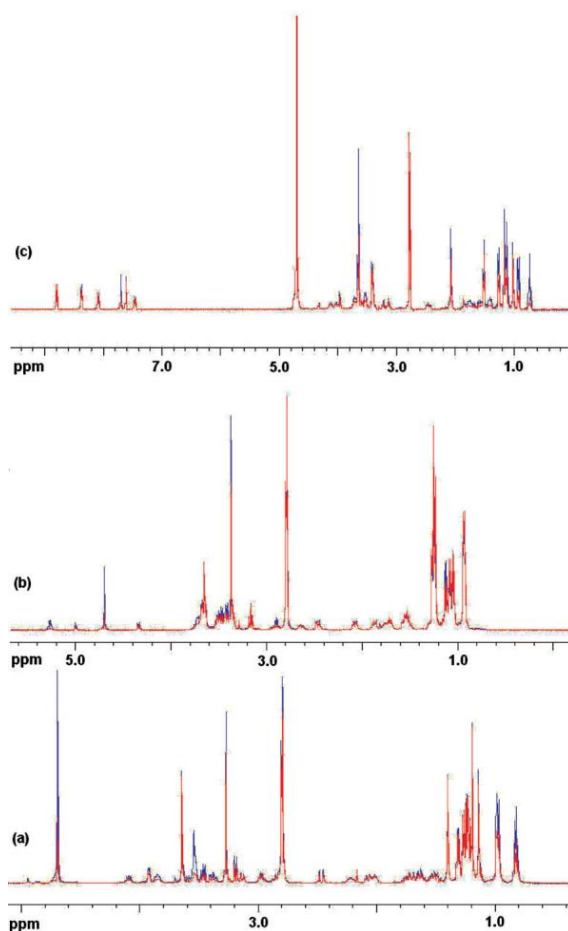
Slika 11: Prikaz superpozicije dvije konformacije azitromicina: unutarnje presavijena (crno) i vanjski presavijena (sivo).¹

2.3.1. Istraživanja na makrolidnim antibioticima

Makrolidni antibiotici su u fokusu interesa mnogih farmaceutskih istraživanja koja zahtjevaju korištenje različitih tehnika NMR poput spektroskopije STD NMR i spektroskopije trNOESY. One su postale važan alat pri karakterizaciji liganda i njihovog vezanja na receptore, a kombiniranjem više tehnika dobiva se bolji uvid u ostvarene interakcije te se dobivene informacije mogu koristiti i u dizajnu potencijalnih novih liganada.

Tako je primjerice spektroskopija STD NMR korištena za karakterizaciju epitopa vezanja makrolidnih antibiotika, azitromicina, oleandomicina i telitromicina koji se vežu na goveđi serum albumin (BSA).¹⁸ Protoni liganda su zasićeni ako su u neposrednoj blizini makromolekule, tj. ukoliko dođe do interakcije. Zasićenje je najveće za one protone koji su najbliži makromolekulskoj površini što se dalje može iskoristiti za mapiranje veznih epitopa.

Sva tri makrolidna antibiotika dala su spektre STD NMR (Slika 12). čime se potvrđuje njihova interakcija s BSA.



Slika 12. Off-resonance (plavo) i on-resonance (crveno) STD NMR spektri a) azitromicina, b) oleandomicina i c) telitromicina.¹⁸

Dobiveni podaci mogu se koristiti u kasnijim istraživanjima u vidu procjene ukupnog biološkog profila makrolida. Općenito, razumijevanje interakcija makrolida i samo ostvarenje interakcije nužan je uvjet za njihovo uspješno djelovanje.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. P. Novak, T. Jednačak, u Z. Mandić (ur.), *Physico-Chemical Methods in Drug Discovery and Development*, Vol. 5, IACP Publishing, Zagreb, 2012, str.189-220.
2. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, i L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013., str. 1001-1003.
3. Mi Zhou, Qing Li, and Renxiao Wang, *ChemMedChem*, **11**, 2016, 738-756 .
4. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA, Varaždin, 2013, 1-30.
5. www.chemspider.com (datum pristupa 20. srpnja 2019.)
6. S.B. Shuker, P.J. Hajduk, R.P. Meadows, S.W. Fesik, *Science* **274** (1996) 1531–1534.
7. M.G. Klein, Y. Yao, E.D. Slosberg, C.D. Lima, Y. Doki, I.B. Weinstein, *Exp. Cell Res.*, **244**, 1998, 26.
8. G. Bai, B. Feng, J.B. Wang, E. Pozharski, M. Shapiro, *Bioorg. Med. Chem.* **18**(18), 2010, 6756-6762.
9. H.C. Siebert, J. Jimenez-Barbero, S. Andre, H. Kaltner, H.J. Gabius, *Methods Enzymol* **362**, 2003, 417-434.
10. M.A. Macnaughtan, M. Kamar, G. Alvarez-Manilla, A. Venot, J. Glushka, J.M. Pierce, J.H. Prestegard, *J. Mol. Biol.* **366**(4), 2007, 1266-1281.
11. Xue H, Bei Y, Zhan Z, Chen X, Xu X and Fu YV, *Front. Microbiol.* **8**, 2017, 2062.
12. Kass EM, Moynahan ME, Jasin M., *Mol. Cell* **62**, 2016, 777–787.
13. Prakash R, Zhang Y, Feng W, Jasin M., *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **7**, 2015, 778–787.
14. Symington LS, Gautier J, *Annu. Rev. Genet.* **45**, 2011, 247–271.
15. Michelle H. Moon, Thomas A. Hilimire, Allix M. Sanders, John S. Schneekloth Jr, *Biochem.* **57**(31), 2018, 4638-4643.
16. Connelly, C. M., Moon, M. H., and Schneekloth, J. S., Jr. *Cell Chem. Biol.* **23**, 2016, 1077–1090.
17. <http://www.antibiotics.tips/2016/04/macrolide-antibiotics-List-Indications-Side-Effects.html> (datum pristupa 20. srpnja 2019.)

18. P. Novak, P. Tepeš, V. Lazić. *Croat. Chem. Acta* **80**(2), 2007, 211-216.