

# Primjena spektrometrije NMR u analizi biomolekula

---

Županović, Tin

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:576130>

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

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



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Tin Županović

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **PRIMJENA SPEKTROSKOPIJE NMR U ANALIZI BIOMOLEKULA**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Tomislav Jednačak

Zagreb, 2021. godina.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

3. svibnja 2021.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

10. rujna 2021.

Mentor rada: doc. dr. sc. Tomislav Jednačak

Potpis:



## Sadržaj

§ SAŽETAK.....	1
§ 1. UVOD.....	2
§ 2. METODE NMR ZA ANALIZU BIOMOLEKULA .....	5
2.1. Metode karakterizacije malih molekula spektroskopijom NMR .....	5
2.2. Metode NMR za određivanje strukture velikih molekula.....	6
2.3. Proučavanje interakcija receptora i liganada metodama NMR.....	7
§ 3. ODREĐIVANJE VEZNIH EPITOPA MAKROLIDA U INTERAKCIJI S ALBUMINOM IZ GOVEĐEG SERUMA METODOM STD NMR.....	11
3.1. Eksperimentalni dio.....	12
3.2. Rezultati i rasprava.....	13
§ 4. STRUKTURA DVOLANČANOG KOMPLEKSA PNA-DNA U OTOPINI.....	16
4.1. Eksperimentalni dio.....	17
4.2. Rezultati i rasprava.....	17
§ 5. ISTRAŽIVANJE VEZANJA LIGANADA NA PROTEIN HINT1.....	21
5.1. Eksperimentalni dio.....	21
5.2. Rezultati i rasprava.....	23
§ 6. ZAKLJUČAK .....	30
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	31



## § Sažetak

Spektroskopija nuklearne magnetne rezonancije (NMR) jedna je od najvažnijih suvremenih analitičkih metoda. Koristi se za identifikaciju i strukturnu karakterizaciju molekula te nalazi primjenu u različitim granama kemije i znanosti općenito. Nezamjenjiva je metoda strukturne analize počevši od identifikacije produkata sinteze pa sve do analize biomolekula *in vivo*. Najvažnija prednost spektroskopije NMR u analizi biomolekula je mogućnost određivanja njihove strukture, konformacije i interakcija pri fiziološkim uvjetima u otopini. Suvremenim metodama NMR mogu se promatrati načini na koje se ligand veže za receptor te se na temelju dobivenih podataka mogu dizajnirati novi i učinkovitiji lijekovi.

Ovaj rad sadrži pregled najvažnijih suvremenih tehnika NMR za određivanje strukture i interakcija biomolekula te prikazuje njihovu primjenu na reprezentativnim primjerima.



## § 1. UVOD

Spektroskopija nuklearne magnetne rezonancije (NMR) je spektroskopska metoda koja se koristi za određivanje strukture anorganskih, organskih i bioloških molekula.<sup>1</sup> Da bi se mogla proučavati pomoću spektroskopije NMR, molekula mora imati spin različit od nule. Dvije važne vrijednosti koje posjeduje svaka jezgra su kvantni broj nuklearnog spina, koji se označava s  $I$ , te magnetni spinski kvantni broj, koji se označava s  $m_I$ . Spinska kutna količina gibanja,  $P$ , je povezana s kvantnim brojem nuklearnog spina relacijom:

$$P = \sqrt{I(I + 1)}\hbar \quad (1.1.)$$

dok je z komponenta vektora spinske kutne količine gibanja povezana s magnetnim spinskim kvantnim brojem relacijom:

$$P_z = m_I \hbar \quad (1.2.)$$

Magnetni moment jezgre ( $\mu$ ) računa se kao:

$$\mu = \gamma P \quad (1.3.)$$

pri čemu je  $\gamma$  žiromagnetni omjer koji je karakteristika svake jezgre. Nadalje, pomoću navedenih veličina može se izračunati energija određenog spinskog stanja u magnetnom polju  $B$  prema relaciji:

$$E = -\mu \cdot B \quad (1.4.)$$

Jezgra u spinskom stanju niže energije apsorbiranjem fotona prelazi u stanje više energije. Energija fotona potrebna za navedeni proces odgovara razlici energija ( $\Delta E$ ) dvaju promatranih spinskih stanja.

Frekvencija fotona koji ima potrebnu energiju za postizanje rezonancije naziva se Larmorova frekvencija,  $\nu_L$ .

$$\Delta E = m_I \hbar \gamma B_0 \quad (1.5.)$$

$$\nu_L = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (1.6.)$$

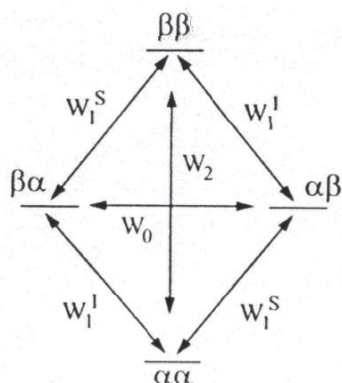
Kvantni broj nuklearnog spina,  $I$ , ovisi o masenom i atomskom broju jezgre koju promatramo. Ako jezgra ima parni maseni i parni atomski broj, njen kvantni broj nuklearnog spina iznosi nula pa se takva jezgra ne može detektirati spektroskopijom NMR. Nadalje, ako jezgra ima neparni maseni broj, njen kvantni broj nuklearnog spina će imati polucjelobrojnu vrijednost ( $n/2$ ), neovisno o atomskom broju. S druge strane, kvantni broj spina  $I$  za jezgre s parnim masenim i neparnim atomskim brojem imat će cjelobrojnu vrijednost ( $n$ ) različitu od nule.

Interakcije spinova u spektroskopiji NMR dijelimo na električne i magnetne. Električne interakcije uključuju kvadrupolno sprezanje spinova s kvantnim brojem većim od  $1/2$ , dok su magnetne interakcije prisutne kod svih jezgri koje su aktivne u spektroskopiji NMR te se dalje dijele na kemijski pomak i sprezanje spin-spin.

Važnu ulogu u interakcijama spinova jezgri ima i nuklearni Overhauserov efekt (NOE) koji se definira kao promjena intenziteta rezonancije određenog spina zbog promjena u ravnotežnoj napučenosti druge jezgre ako su procesi povezani mehanizmom križne relaksacije. Ravnotežna napučenost se može promijeniti zasićenjem pojedine rezonancije. Efekt NOE je koristan jer se pomoću njega može skratiti vrijeme snimanja heteronuklearnih spektara zbog povećanja intenziteta signala. Primjenom efekta NOE, mijenjaju se intenziteti signala promatrane jezgre prema formuli:

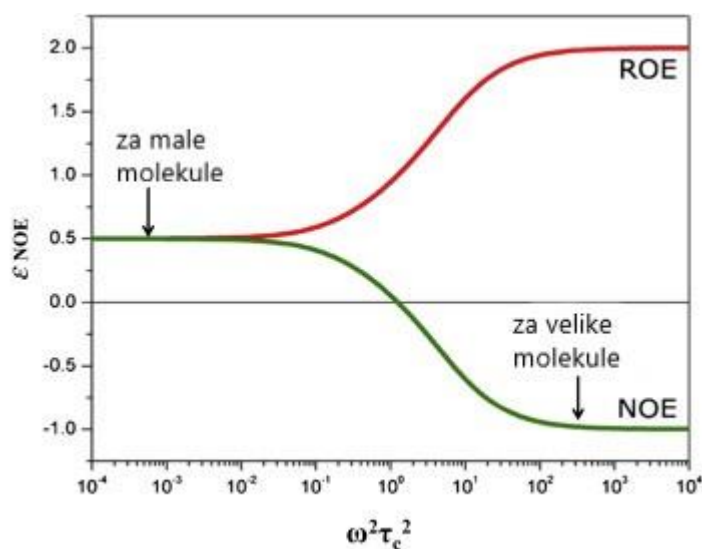
$$I_{NOE} = I_0 \left( 1 + \frac{\gamma_I}{2\gamma_S} \right) \quad (1.7.)$$

gdje je  $\gamma_I$  žiromagnetni omjer jezgre s promijenjenom ravnotežnom napučenosti. Pritom je  $I$  obično jezgra s velikim žiromagnetnim omjerom, dok je  $S$  jezgra s malim žiromagnetnim omjerom.



Slika 1. Mogući prijelazi između spinova jezgri s velikim (I), odnosno malim  $\gamma$  (S).<sup>2</sup>

Prema izbornim pravilima, zabranjeni su prijelazi kod kojih se mijenja orijentacija oba spina ( $W_0$  i  $W_2$ ), no do navedenih prijelaza može doći mehanizmom križne relaksacije. Tako križna relaksacija mehanizmom  $W_2$  dovodi do povećanja, a križna relaksacija mehanizmom  $W_0$  dovodi do smanjenja intenziteta signala. Poznato je da porast efekta NOE ( $\epsilon_{\text{NOE}}$ ) ovisi o korelacijskom vremenu ( $\tau_c$ ). Na slici 2. može se uočiti da je NOE pozitivan za molekule male molekulske mase, negativan za velike molekule, dok je za molekule srednje veličine približno nula. Zato se kod analize srednje velikih molekula koristi tehnika ROESY jer je kod nje NOE uvijek pozitivan.<sup>1</sup>



Slika 2. Ovisnost porasta efekta NOE ( $\epsilon_{\text{NOE}}$ ) o korelacijskom vremenu ( $\tau_c$ ).<sup>3</sup>

## § 2. METODE NMR ZA ANALIZU BIOMOLEKULA

### 2.1. Metode karakterizacije malih molekula spektroskopijom NMR

Struktura malih molekula može se odrediti kombinacijom jedno- (1D) i dvodimenzijskih (2D) tehnika NMR.

Najjednostavnija 1D tehnika je  $^1\text{H}$  NMR. U toj tehnici se promatraju signali neekvivalentnih protona u molekuli te se na osnovi dobivenih signala mogu odrediti mjesta u molekuli na koja su vezani pojedini protoni. Sljedeća važna 1D tehnika je APT (eng. *attached proton test*) kojom se određuju multipliciteti heterojezgri (npr.  $^{13}\text{C}$ ).

Kod analize malih molekula koriste se sljedeće 2D tehnike NMR:

Tehnika COSY (eng. *correlation spectroscopy*) je homonuklearna 2D tehnika koja se koristi za dobivanje informacija o povezanosti protona preko skalarne sprege najčešće kroz dvije ili tri kemijske veze.

Tehnika TOCSY (eng. *total correlation spectroscopy*) pomaže utvrditi korelacije između svih protona koji su dio istog spinskog sustava uz uvjet da postoji neprekinuti lanac spregnutih spinova A–B–C–D–... pri čemu se A spreže s B, B s C i tako dalje.

Tehnika HSQC (eng. *heteronuclear single quantum coherence*) se koristi za detekciju heteronuklearne sprege kroz jednu vezu između protona i heterojezgri (npr.  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$ ).

Tehnika HMBC (eng. *heteronuclear multiple bond correlation*) omogućava uvid u korelacije protona s C-atomima preko dvije, tri ili četiri kemijske veze te povezivanje pojedinih spinskih sustava. Pomoću ove tehnike mogu se opaziti korelacije između protona i kvarternih C-atoma.

Tehnika NOESY (eng. *nuclear Overhauser effect spectroscopy*) se temelji na križnoj relaksaciji spinova koji su u dipolnoj sprezi pomoću koje se dobivaju informacije o njihovoj međusobnoj udaljenosti.

Tehnika ROESY (eng. *rotating frame Overhauser effect spectroscopy*) slična je tehnici NOESY s razlikom da efekt NOE nastaje u ravnini xy, a ne uzduž osi z, a korelacije dobivene tehnikom ROESY ekvivalentne su korelacijama dobivenima tehnikom NOESY. Nedostatak tehnike ROESY je pojava korelacija tipa TOCSY-ROESY i ROESY-TOCSY koje su iste faze kao i direktni ROESY signal. Takvi signali su lažno pozitivni pa ih je stoga potrebno pažljivo analizirati i interpretirati kako bi se izbjegle pogreške pri asignaciji. Uz navedene korelacije, spektar ROESY može sadržavati i negativne te antifazne signale.<sup>1</sup>

## 2.2. Metode NMR za određivanje strukture velikih molekula

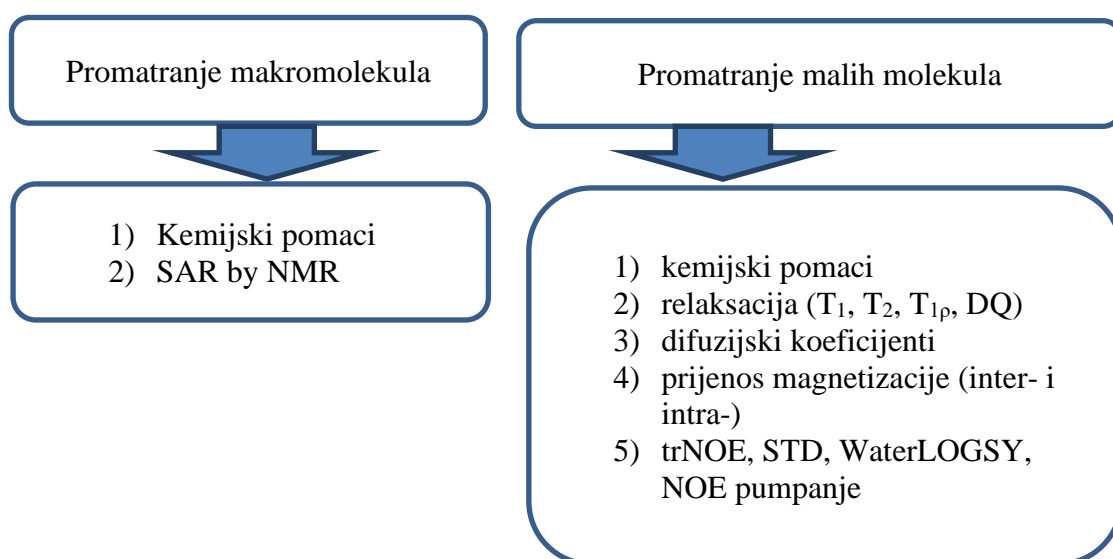
Za analizu bioloških makromolekula mogu se koristiti homo- i heteronuklearne tehnike NMR. Homonuklearne tehnike temelje se na identifikaciji spinskih sustava protona zasebnih dijelova makromolekule te njihovim povezivanjem pomoću efekta NOE. Kod tih tehnika može doći do problema kod asignacije signala i određivanja strukture jer dolazi do višestrukih preklapanja signala. Danas se ove tehnike rjeđe koriste od heteronuklearnih tehnika.

Heteronuklearne tehnike promatraju prijenos magnetizacije s protona na ostale jezgre, poput  $^{13}\text{C}$  ili  $^{15}\text{N}$ . Jedna od prvih tehnika koja se koristi za određivanje strukture proteina je [ $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ ] HSQC. Protein se označi izotopom dušika  $^{15}\text{N}$  te se snimi spektar koji pokazuje korelaciju između  $^{15}\text{N}$  i protona. Asignacijom spektra dobivaju se informacije o strukturi i konformaciji proteina. Tehnika HNCA je trodimenzijska tehnika u kojoj se magnetizacija prenosi s protona vezanog za dušik u peptidnoj vezi na  $\alpha$ -ugljikov atom aminokiseline kojoj ta NH skupina pripada (eng. *intra-residual pathway*) i  $\alpha$ -ugljikov atom prethodne aminokiseline (eng. *inter-residual pathway*). Iz dobivenog spektra mogu se dobiti korelacije  $\alpha$ -ugljikovih atoma susjednih aminokiselina te NH skupine za koju je vezan proton. S druge strane, tehnika HN(CO)CA uključuje samo prijenos magnetizacije s protona NH skupine peptidne veze na  $\alpha$ -ugljikov atom prethodne aminokiseline. Kombinacijom tehnika HNCA i HN(CO)CA moguće je razlikovati i asignirati kemijske pomake intra- i inter-rezidualnog  $\alpha$ -ugljikovog atoma. Alternativno se mogu koristiti tehnike HNCO i HN(CA)CO kod kojih se koristi kemijski pomak karbonilne skupine, no kod te tehnike se mogu pojaviti preklapanja signala zbog male razlike u kemijskim pomacima karbonilnih skupina. Za bolje opisivanje okosnice proteina u obzir se može uzeti i kemijski pomak  $\beta$ -ugljikovog atoma. Zbog još jednog koraka prijenosa magnetizacije postupak traje dulje te opada osjetljivost, no dobivamo važne informacije koje pomažu pri određivanju strukture proteina. Jedna od navedenih tehnika je CBCA(CO)NH, koja povezuje kemijske pomake  $\alpha$ - i  $\beta$ -ugljikovog atoma susjedne aminokiseline s atomima NH skupine referentne aminokiseline.<sup>4</sup>

Za strukturnu karakterizaciju nukleinskih kiselina najviše se koriste tehnike TROSY-HCN i MQ-HCN. Tehnika TROSY-HCN (eng. *transverse relaxation-optimized spectroscopy*) omogućava uvid u korelacije unutar dušičnih baza. S druge strane, tehnika MQ-HCN (eng. *multiple quantum*) pruža informacije o korelaciji šećera i dušičnih baza. Navedene tehnike mogu se kombinirati u MQ-TROSY-HCN pulsni slijed koji istovremeno daje gore navedene podatke.

### 2.3. Proučavanje interakcija receptora i liganada metodama NMR

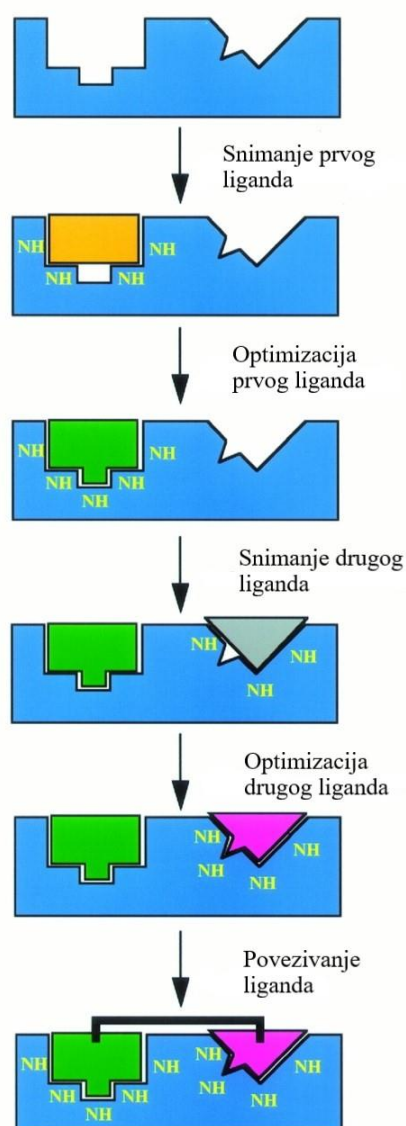
Spektroskopijom NMR mogu se promatrati interakcije između receptora i liganada. Za makromolekule se najčešće koristi metoda SAR by NMR (eng. *structure-activity relationship by nuclear magnetic resonance*), kojom se detektiraju kemijski pomaci receptora, dok se kod malih molekula (liganada) najčešće detektiraju njihovi kemijski pomaci, vremena relaksacije, difuzijski koeficijenti te prijenos magnetizacije. Dvije često korištene tehnike za proučavanje vezanja temeljene na detekciji liganada su STD (eng. *saturation transfer difference*) i trNOE (eng. *transferred nuclear Overhauser enhancement*).<sup>5</sup>



Slika 3. Parametri NMR korišteni za proučavanje interakcija između liganada i receptora.

#### 2.3.1. Metode koje se temelje na promatranju receptora

Za proučavanje interakcija liganada i receptora mogu se koristiti i metode temeljene na detekciji kemijskih pomaka receptora, poput SAR by NMR. Navedena metoda temelji se na opažanjima promjena u heteronuklearnim spektrima NMR, poput  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  ili  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spektara, nakon dodavanja smjese komponenti u otopinu makromolekule receptora. Kako bi se pomaci mogli detektirati, vrlo je važno da makromolekule budu obogaćene izotopima  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$ .

Slika 4. Shematski prikaz tehnike SAR by NMR.<sup>6</sup>

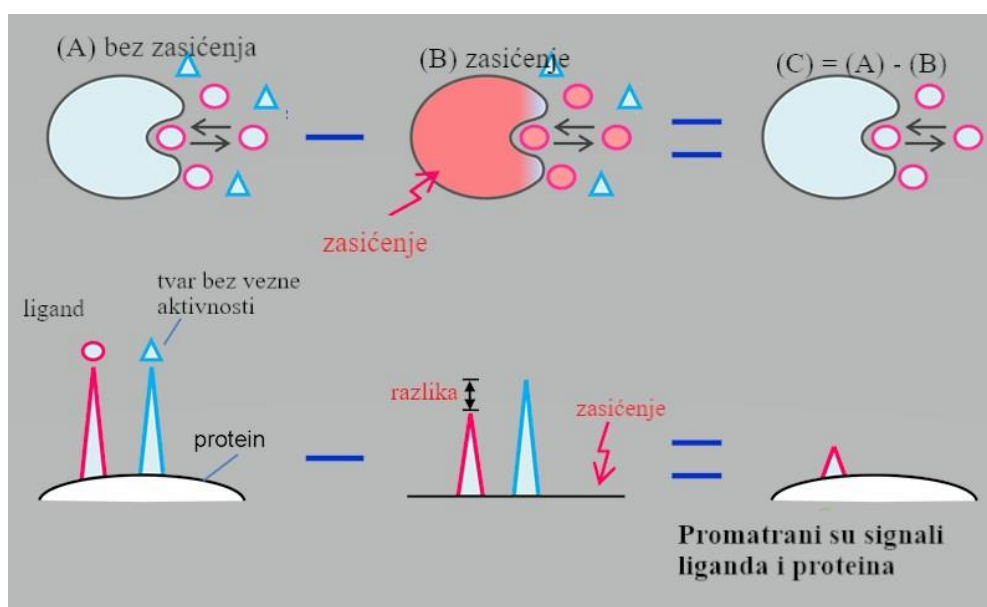
Prvi korak SAR by NMR obuhvaća pretragu potencijalnih liganada kako bi se pronašli oni koji se vežu na receptor. Usporedbom  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  ili  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spektara biomolekule prije i nakon dodatka liganda ili smjese liganada mogu se opaziti promjene u kemijskim pomacima. Vezanjem liganda mijenjaju se kemijski pomaci onih skupina u biomolekuli koje se nalaze u blizini veznog mjesta. Nakon što je prvi ligand optimiziran, dodaje se drugi ligand za koji se pretpostavlja da se veže u neposrednoj blizini prvog liganda. Pritom se promatra utjecaj drugog liganda na kemijske pomake molekule receptora. Na kraju se ligandi, koji se nalaze u neposrednoj prostornoj blizini, međusobno povezuju kako bi tvorili ligande visokog afiniteta vezanja na biomolekulu (slika 4).<sup>5</sup>

### 2.3.2. Metode koje se temelje na promatranju liganda

Za određivanje načina vezanja liganda na receptor mogu se koristiti i tehnike NMR koje se temelje na promatranju liganda. Prednost ovih metoda je širok izbor parametara NMR koji se mogu koristiti u analizi i osjetljivost njihove detekcije. Navedene tehnike mogu se razvrstati u tri glavne kategorije: tehnike temeljene na NOE, tehnike temeljene na relaksaciji i tehnike temeljene na difuziji.

Prilikom vezanja liganda na receptor dolazi do promjene NOE koja se može detektirati spektroskopijom prijenosnog nuklearnog Overhauserovog efekta (eng. *transferred nuclear Overhauser effect spectroscopy*, trNOESY). Male molekule liganda imaju kratko korelacijsko vrijeme te je njihov NOE mali i pozitivan ili jednak nuli, dok makromolekule pokazuju negativne signale NOE velikog intenziteta. Ligand se prilikom vezanja na receptor počinje ponašati kao makromolekula što rezultira pojavom jakih i negativnih signala NOE. Tehnikom trNOESY mogu se dobiti važni podaci za određivanje konformacije vezanog liganda.

Još jedna metoda koja se temelji na efektu NOE je metoda razlike prijenosa zasićenja (engl. *saturation transfer difference*, STD). STD NMR je zbog svoje brzine i točnosti jedna od najkorištenijih metoda za opis veznih interakcija između liganada i receptora. Ovaj pristup temelji se na prijenosu zasićenja s receptora na vezani ligand uz smanjenje intenziteta signala skupina u interakciji.



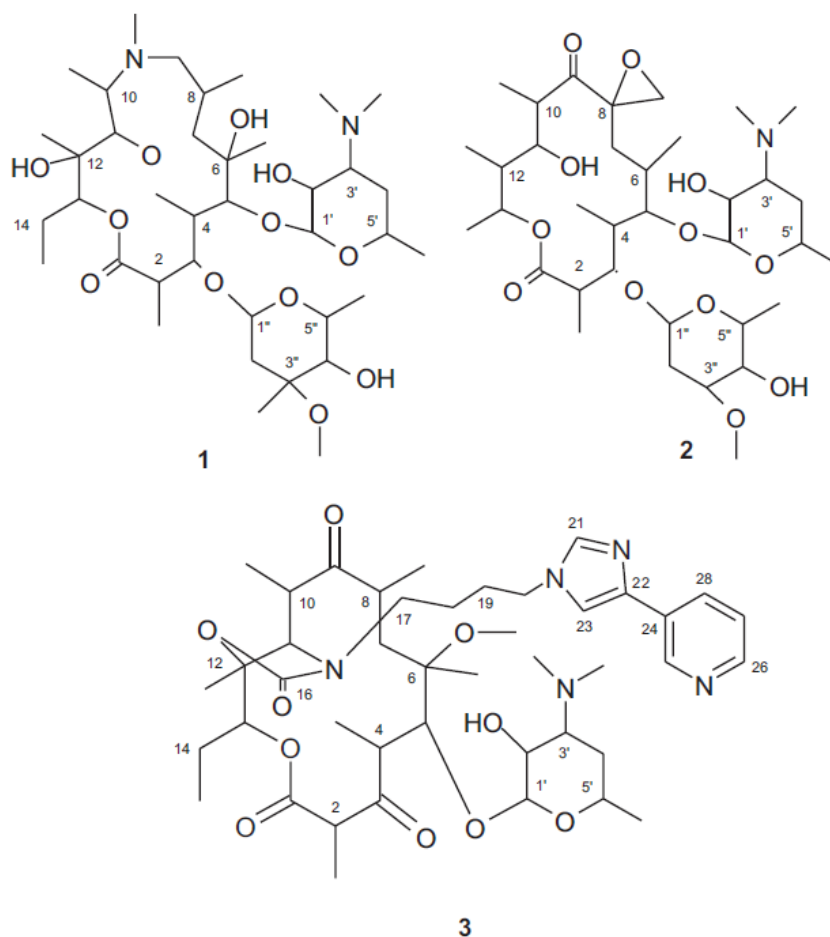
Slika 5. Shematski prikaz metode STD NMR.<sup>7</sup>



Metoda STD NMR obuhvaća dva odvojena eksperimenta. U prvom eksperimentu (*on-resonance*) receptor je selektivno zasićen pri čemu se magnetizacija širi kroz cijeli receptor i na kraju prelazi na vezani ligand. Kemijskom izmjenom ligand prelazi u otopinu i detektiraju se karakteristični signali odnosno njihovi intenziteti. Zatim se snimi referentni (*off-resonance*) spektar, tako da se frekvencije zračenja postave izvan područja rezonancije bilo kojeg signala. Oduzimanjem referentnog spektra od spektra uz zasićenje dobiva se spektar STD koji sadrži informacije o smanjenju intenziteta signala uslijed zasićenja. Najveće smanjenje intenziteta opaža se kod signala onih skupina liganda koje su u blizini veznog mjesta receptora. Važna primjena ove metode je određivanje veznih epitopa, što se može provesti neovisno o veličini liganda i receptora. Nadalje, STD NMR se može kombinirati s ostalim pulsним tehnikama, poput TOCSY ili HSQC, što može pružiti bolji uvid u način vezanja.<sup>5</sup> Odabrani primjeri primjene metoda NMR za analizu bioloških molekula i njihovih interakcija opisani su u sljedećim poglavljima.

### § 3. ODREĐIVANJE VEZNIH EPITOPA MAKROLIDA U INTERAKCIJI S ALBUMINOM IZ GOVEĐEG SERUMA METODOM STD NMR

P. Novak i sur.<sup>8</sup> proučavali su vezne epitope makrolidnih antibiotika (makrolida) u interakciji s albuminom iz goveđeg seruma pomoću metode STD NMR. Albumini su proteini u krvnoj plazmi koji mogu reverzibilno reagirati s lijekovima te služe kao prenositelji lijekova. Autori su koristili albumin iz goveđeg seruma te su pratili vezanje azitromicina, oleandomicina i telitromicina.



Slika 6. Strukture i brojanje atoma azitromicina (1), oleandomicina (2) i telitromicina (3).<sup>8</sup>

### 3.1. Eksperimentalni dio

#### 3.1.1. Priprema uzorka

Albumin iz goveđeg seruma nabavljen je u obliku liofiliziranog praha od proizvođača Sigma-Aldrich, dok su deuterirani tris(hidroksimetil)aminometan (Tris- $d_{11}$ ) i voda ( $D_2O$ ) nabavljeni od Cambridge Isotope Laboratories. Za eksperimente STD NMR pripravljene su otopine makrolida azitromicina, oleandomicina i telitromicina koncentracije  $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ . Otopine su priređene otapanjem uzorka u Tris- $d_{11}$  (pH 7,4) koncentracije  $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  uz kalijev klorid koncentracije  $60 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ . Zatim je u otopinu titriran albumin iz goveđeg seruma do postizanja konačne koncentracije proteina u otopini koja je iznosila  $280 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ . Ukupni volumen smjese je iznosio 700  $\mu\text{L}$ , pri čemu je omjer proteina i liganda iznosio 1:100.

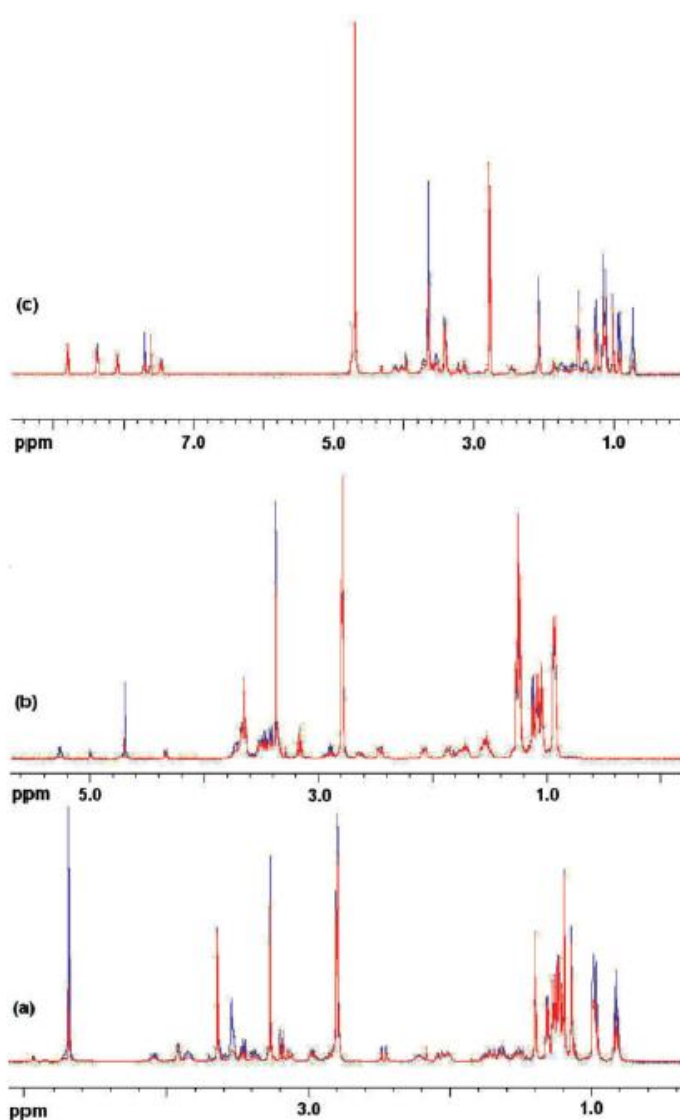
#### 3.1.2. Snimanje spektara NMR i molekularno modeliranje

Spektri NMR snimljeni su na spektrometrima Bruker Avance DRX500 i DPX300 opremljenima sa  $z$ -gradijentima. Uzorci su mjereni pri 298 K u NMR cjevčicama promjera 5 mm s natrijevom soli deuterirane 3-(trimetilsilil)propanske kiseline (TSP- $d_{11}$ ) kao unutarnjim standardom. Prije provođenja tehnike STD, asignirani su protoni u puferu Tris- $d_{11}$  koristeći dvodimenzijske homo- (COSY) i heteronuklearne (HSQC i HMBC) tehnike. Protonski spektri su snimljeni uz korištenje 8–16 snimaka i primjenu pulsno slijeda WATERGATE za supresiju otapala. Spektralna širina iznosila je 6200 Hz uz razlučivanje od 0,9 Hz po točki. U eksperimentu COSY korišteno je 2046 točaka u  $f_2$  dimenziji i 512 inkremenata u  $f_1$  dimenziji, pri čemu je za svaki inkrement primijenjeno 8 snimaka uz spektralnu širinu od 4007 Hz. Razlučivanje u  $f_2$  dimenziji iznosilo je 1,97 Hz, a u  $f_1$  7,82 Hz po točki. Jednodimenzijski spektar STD NMR snimljen je sa 16 000 točaka, 16–64 snimaka i spektralnom širinom od 15 ppm. Selektivno zasićenje albumina iz goveđeg seruma provedeno je pomoću 50 ms E-BURP pulsa, a vrijeme zasićenja iznosilo je 2 sekunde. Frekvencija zasićenja je zatim promijenjena iz *on-resonance* (–1 ppm) u *off-resonance* (35 ppm). Radi uklanjanja signala HDO korišten je pulsni slijed WATERGATE, a primjenom  $T_{1\rho}$  filtera, uklonjeni su signali proteinskog ostatka.

Konformacije antibiotika u otopini određene su metodama molekularnog modeliranja. Pritom je korišten program Insight II te moduli: Builder, Discover i Analysis verzija 2000.1 na platformi SGI Origin 3400. Korištena je metoda cvff polja sila.

### 3.2. Rezultati i rasprava

Asignacija kemijskih pomaka protona u puferu Tris- $d_{11}$  provedena je pomoću jedno- i dvodimenzijskih (COSY, HSQC i HMBC) tehnika NMR. Sva tri makrolida su pokazala signale u spektru STD NMR, što potvrđuje da se azitromicin, oleandomicin i telitromicin vežu za albumin iz govedeg seruma. Vrijednost efekta STD izračunata je na temelju razlike intenziteta signala u spektrima *off-resonance* i *on-resonance*.



Slika 7. Spektri STD NMR azitromicina (a), oleandomicina (b) i telitromicina (c). Crveni signali predstavljaju spektar *on-resonance*, a plavi signali spektar *off-resonance*.<sup>8</sup>

Tablica 1. Vezni epitopi za azitromicin (**1**), oleandomicin (**2**) i telitromicin (**3**) prikazani kao postotak prijena zasićenja pri čemu 100% odgovara najvećem efektu STD<sup>8</sup>

Atom	A <sub>STD</sub> / %	A <sub>STD</sub> / %	A <sub>STD</sub> / %	Atom	A <sub>STD</sub> / %	A <sub>STD</sub> / %	A <sub>STD</sub> / %
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
2-H	31	97	32	18a-H	–	–	76
2-CH <sub>3</sub>	3	50	49	18b-H	–	–	76
3-H	44	28	–	19a-H	–	–	23
4-H	15	4	32	19b-H	–	–	56
4-CH <sub>3</sub>	53	3	53	20a-H	–	–	32
5-H	6	58	40	20b-H	–	–	37
6-H	–	77	–	21-H	–	–	82
6-CH <sub>3</sub>	4	2	33	23-H	–	–	29
6-OCH <sub>3</sub>	–	–	53	25-H	–	–	–8
7a-H	44	30	45	26-H	–	–	34
7b-H	31	13	44	27-H	–	–	25
8-H	24	–	28	28-H	–	–	26
8a-CH	–	28	–	1"-H	64	79	–
8b-CH	–	34	–	2"a-H	44	28	–
8-CH <sub>3</sub>	52	–	63	2"b-H	39	13	–
9a-H	17	–	–	3"-H	–	32	–
9b-H	29	–	–	3"-CH <sub>3</sub>	5	–	–
9-NCH <sub>3</sub>	12	–	–	3"-OCH <sub>3</sub>	29	53	–
10-H	6	18	51	4"-H	36	22	–
10-CH <sub>3</sub>	15	4	84	5"-H	56	28	–
11-H	6	72	*	5"-CH <sub>3</sub>	3	0	–
12-H	–	8	–	1'-H	84	52	34
12-CH <sub>3</sub>	16	4	71	2'-H	60	52	32
13-H	<b>100</b>	<b>100</b>	11	3'-H	60	52	28
13-CH <sub>3</sub>	–	2	–	3'-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	22	21	15
14a-H	38	–	74	4'a-H	28	36	29
14b-H	26	–	60	4'b-H	28	13	35
15-CH <sub>3</sub>	54	–	<b>100</b>	5'-H	66	71	44
17a-H	–	–	43	5'-CH <sub>3</sub>	3	0	55
17b-H	–	–	43				

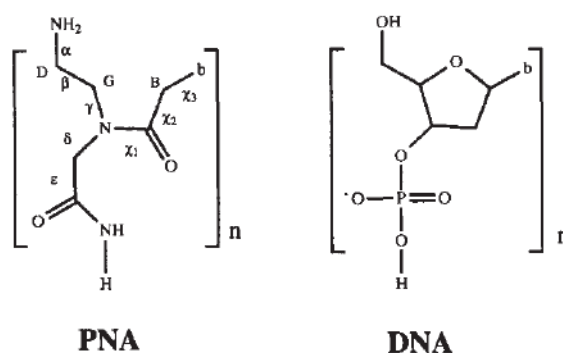
Kod azitromicina je prijenos zasićenja bio najizraženiji za proton u položaju 13 koji je postavljen kao referentni. Prijenos zasićenja izražen je i za protone u desozaminskom prstenu (1'-H, 2'-H, 3'-H i 5'-H) pri čemu je najizraženiji bio 1'-H. Protoni 1"-H i 5"-H su pokazali srednje izražen efekt STD. S druge strane, u spektru STD NMR oleandomicina najintenzivniji su bili signali protona u položajima 2 i 13. Srednji stupanj zasićenja su pokazali protoni 1"-H, 11-H i 6-H, dok su niži stupanj zasićenja pokazali protoni desozaminskog prstena. Ostali protoni su pokazali mali stupanj zasićenja. Spektar STD NMR telitromicina pokazao je da najviši stupanj zasićenja imaju protoni metilne skupine 15-CH<sub>3</sub>, dok nešto manje zasićenje od navedenog protona imaju protoni metilne skupine 10-CH<sub>3</sub> te imidazolni proton 21-H.

Za razliku od azitromicina i oleandomicina, desozaminski protoni telitromicina ne pokazuju značajno zasićenje. Mapiranjem veznih epitopa azitromicina, oleandomicina i telitromicina otkriveno je da su protoni 13-H azitromicina i oleandomicina te proton 15-H telitromicina najbliže površini albumina iz goveđeg seruma. Na temelju podataka iz tablice 1. može se zaključiti da su vezni epitopi azitromicina i oleandomicina za pojedine atome slični, dok za neke pokazuju odstupanja. Primjerice, najveći stupanj zasićenja nalazi se na istom H atomu u položaju 13, dok se veće razlike mogu opaziti kod signala protona 2-H, 6-H, 11-H i 1'-H (tablica 1.).

Protoni 2-H, 6-H i 11-H pokazuju vrlo nizak intenzitet u slučaju azitromicina, dok kod oleandomicina pokazuju visoke vrijednosti zasićenja. Obrnuti slučaj je s protonom 1'-H, koji kod azitromicina pokazuje intenzivni efekt STD, dok je kod oleandomicina prijenos zasićenja puno manji. Vezni epitopi telitromicina značajno se razlikuju od veznih epitopa azitromicina i oleandomicina. Primjerice, kod prva dva makrolida, desozamin najvjerojatnije interagira s albuminom, dok te interakcije kod telitromicina izostaju. S druge strane, telitromicin stvara interakcije sa svojim akilil-heteroarilnim lancem (položaj 11 i 12 na slici 6.). Zaključeno je da makrolidi različito interagiraju s albuminom iz goveđeg seruma, što je vjerojatno posljedica različite strukture makrolida, te da je način na koji interagiraju s albuminom moguće odrediti pomoću tehnike STD NMR.

## § 4. STRUKTURA DVOLANČANOG KOMPLEKSA PNA-DNA U OTOPINI

M. Eriksson i P. E. Nielsen<sup>9</sup> su proučavali strukturu i konformacije dvolančanog kompleksa PNA-DNA u otopini. Peptidna nukleinska kiselina, PNA (eng. *peptide nucleic acid*), je nukleinska kiselina koja oponaša svojstva DNA, pri čemu je okosnica DNA, koja se sastoji od šećera deoksiriboze i fosfata, zamijenjena strukturno homomorfnim pseudopeptidnim lancem koji se sastoji od *N*-(2-aminoetil)glicinskih jedinica (slika 8.). Posljedica takve strukture je da okosnica PNA nema kiralne centre te ne nosi nikakav naboj, za razliku od okosnice DNA koja je negativno nabijena. Dušične baze koje se pojavljuju u molekuli DNA pojavljuju se i u PNA. Molekula PNA prepoznaje baze te može tvoriti Watson-Crick-ove i Hoogsteen-ove parove baza s DNA ili RNA. Kompleksi DNA (ili RNA) s PNA su vrlo stabilni, a njihova termička stabilnost je iznad vrijednosti za uobičajene komplekse nukleinskih kiselina. Homopirimidinski oligomeri PNA tvore izvanredno stabilne komplekse dvolančane PNA s homopurinskim (deoksi)ribonukleinskim kiselinama, (PNA)<sub>2</sub>-DNA tj. (PNA)<sub>2</sub>-RNA. Zbog strukture svoje okosnice PNA je izrazito stabilna u staničnom okruženju jer ne može biti pocijepana proteazama i endonukleazama, a istovremeno posjeduje mnogo potrebnih svojstava koja su važna da bi PNA bila korištena kao ligand za različite biološke mete.



Slika 8. Strukturna jedinica okosnice PNA i DNA.<sup>9</sup>

## 4.1. Eksperimentalni dio

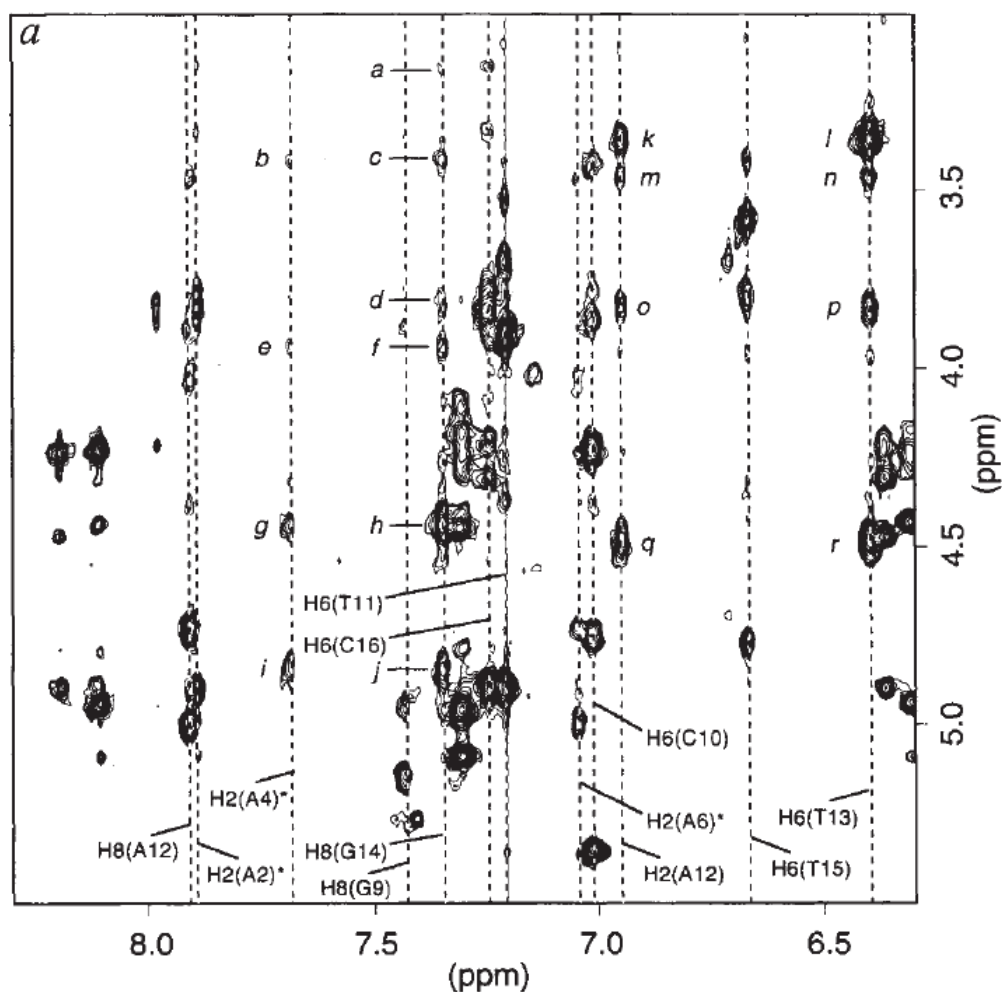
Molekula PNA sintetizirana je na prethodno opisan način<sup>10</sup>, a DNA je nabavljena od Symbicom AB. Uzorak, u kojem je koncentracija kompleksa iznosila približno  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$ , sadržavao je  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  natrijeva klorida,  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  fosfatnog pufera (pH 6,5) te  $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$  EDTA. Spektri NMR su snimljeni na Varian Unity Plus spektrometru frekvencije 600 MHz opremljenim gradijentnom sondom. Spektri NOESY su snimani s vremenom odgode od 2 sekunde, a zatim je provedena Fourierova transformacija koristeći programski paket Varian Vnmr te analiza programom Felix (ver. 2.3.0., Biosym) te su uklonjene smetnje u spektrima posebnim procesima. Planarna geometrija peptidne veze je postavljena pomoću diedarskih ograničenja. U molekularnom modeliranju je korišteno X-PLOR polje sila. Pritom je korištena simulacija u kojoj se sustav zagrijao s 10 K na 800 K tijekom 2 ps te je sustav zadržan na postignutoj temperaturi tijekom 34 ps (prve 4 ps su iskorištene za namještanje NOE udaljenosti i diedarskih ograničenja) da bi uslijedilo hlađenje na 300 K tijekom 5 ps te na kraju promatranje na krajnjoj temperaturi u vremenskom rasponu od 6 ps. Dobivene strukturne koordinate su spremljene u Brookhaven Protein Dana Bank pod kodom 1PDT.

## 4.2. Rezultati i rasprava

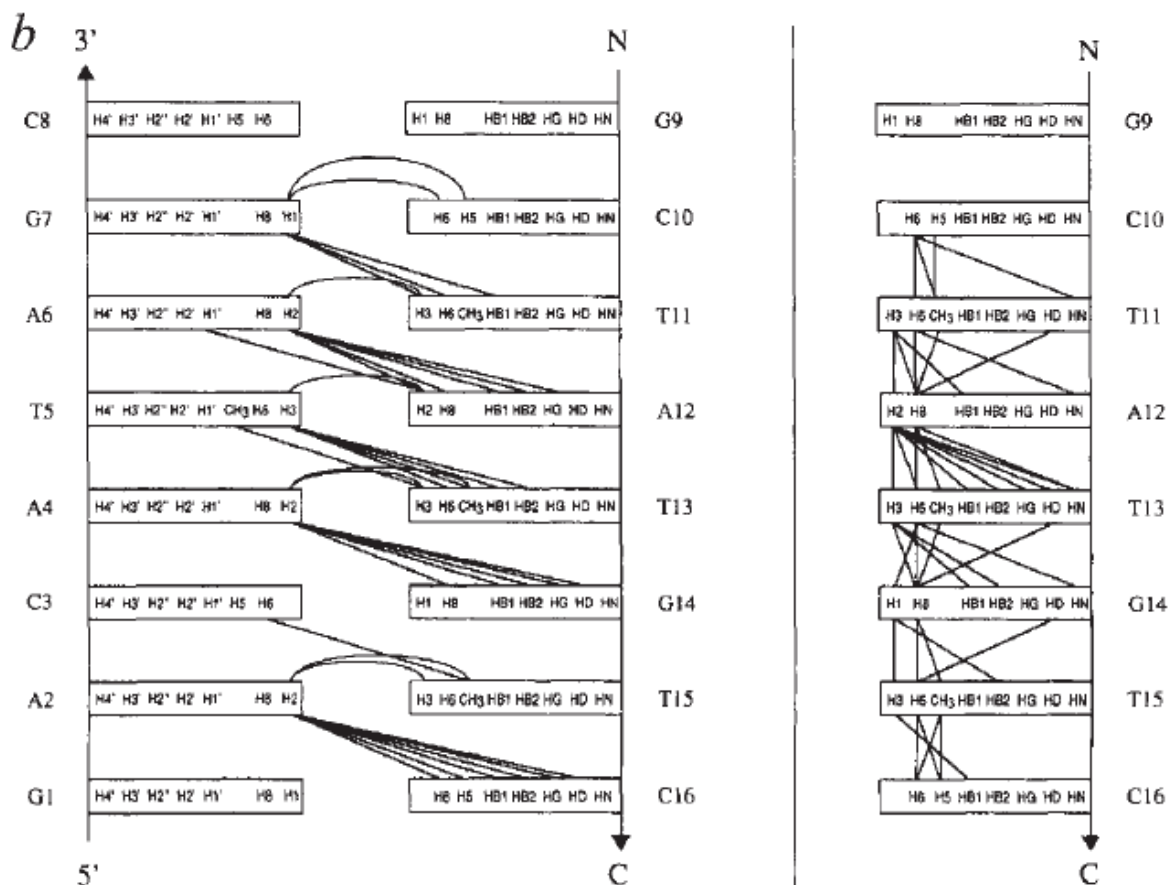
### 4.2.1. NMR eksperiment

Uzorku antiparalelne dvolančane PNA, strukture H-GCTATGTC-NH<sub>2</sub> (od N-kraja prema C-kraju) i komplementarne DNA, strukture 5'd(GACATAGC) snimljeni su <sup>1</sup>H i višedimenzijski NMR spektri u D<sub>2</sub>O pri 21 °C.





Slika 9. Aromatsko-metilenska područja spektra NOESY dvolančanog kompleksa PNA i DNA u D<sub>2</sub>O pri 21°C uz vrijeme miješanja od 200 ms. Označeni su signali protona pri čemu se brojevi unutar zagrade odnose na vrstu dušične baze i njen položaj u kompleksu. Brojevima 1–8 numerirane su baze PNA redom od N-kraja prema C-kraju, dok su brojevima 9–16 označene baze DNA od 5' kraja prema 3' kraju. Zvjezdicom su označeni aromatski protoni PNA i H2 protoni DNA. Signali metilenskih protona su označeni slovima: a HD(G14); b,c HG(G14); d HD(G14); e,f HG(G14); g,h HB1(G14); i,j HB2(G14); k,l HB1(T13); m,n HG(T13); o,p HG(T13); q,r HB2(T13).<sup>9</sup>

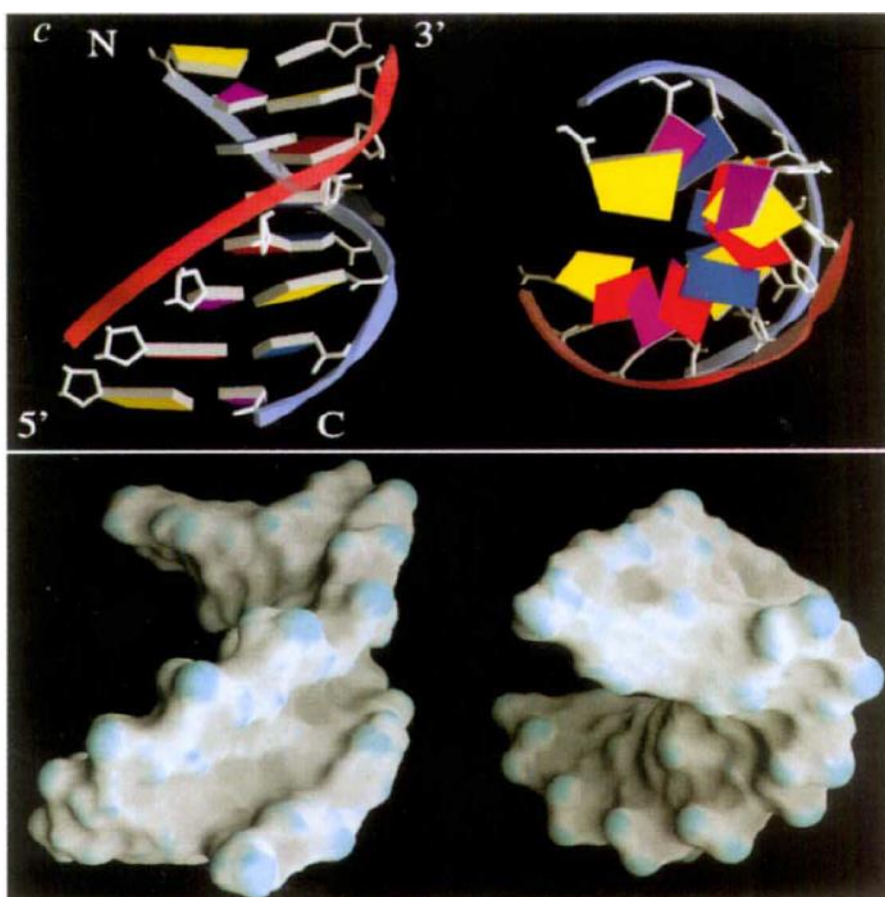


Slika 10. Promatrani NOE kod dvolančanog kompleksa PNA-DNA. Lijevo su prikazane interakcije između DNA i PNA, desno su prikazane interakcije unutar PNA.<sup>9</sup>

Aromatski H6 i H8 protoni vezani za baze PNA pokazuju NOE s metilnim skupinama timidina i H5 protonima citozina. Svaki aromatski proton PNA pokazuje višestruke signale NOE s metilenskim protonima HB, HG i HD (slika 9.). Pri kratkom vremenu miješanja od 60 ms mogu se primijetiti samo dva signala NOE po ostatku, pri čemu je jedan jači od drugog. Ti signali su pridruženi metilenskim parovima protona HB. Prvotne strukture pokazale su da je HB1 bliži atomu H6/H8 od HB2, što je na kraju dovelo do specifične asignacije signala HB paru metilenskih protona. Metilenske skupine HD i HG identificirane su pomoću skalarnih sprega s amidnim protonima koristeći spektar TOCSY. Nadalje, promatrani su signali NOE između protona H2 adenina iz DNA (A2, A4 i A6) i metilenskih protona iz PNA (C16, G14 i A12). Iz tih podataka je određeno da zavojnica posjeduje desnu orijentaciju.

#### 4.2.2. Struktura dvolančanog kompleksa PNA-DNA

Na osnovi dobivenih podataka određeno je da dvolančani kompleks PNA-DNA posjeduje desno orijentiranu dvostruku zavojnicu. Visina zavoja iznosila je 42 Å, promjer 23 Å, a kut zakretanja između parova baza 28°. Ekstrapolacijom navedenih parametara za šest središnjih parova baza izračunate su vrijednosti i geometrija za 13 parova baza, pri čemu je određen oblik velikog i malog utora. Veliki utor obuhvaća približno polovinu širine zavojnice. Veliki utor je širok i dubok, dok je mali utor očekivano plitak i sužen. Uspoređivanjem strukture kompleksa PNA-DNA sa standardnim A-DNA i B-DNA konformerima pokazuje da je razmještaj parova baza sličan kao kod A-DNA, dok je geometrija okosnice slična B-DNA.<sup>11,12</sup> Isto tako, uočeno je da se primarne amidne veze u okosnici PNA nalaze u *trans*- položaju. Proučavanjem strukture PNA i njenog spektra NMR te usporedbom s DNA dokazano je da se struktura PNA može prilagoditi onoj molekule DNA kako bi nastao dvolančani kompleks PNA-DNA.



Slika 11. Struktura zavojnice kompleksa PNA-DNA. Crveni lanac predstavlja DNA, dok plavi lanac predstavlja PNA.<sup>9</sup>

## § 5. ISTRAŽIVANJE VEZANJA LIGANADA NA PROTEIN HINT1

Protein HINT1 (eng. *histidine triad nucleotide binding protein 1*) pripada skupini proteina s histidinskom trijadom te kao i ostali članovi ove skupine sadrži slijed aminokiselina His- $\phi$ -His- $\phi$ -His- $\phi\phi$ , pri čemu  $\phi$  označava hidrofobnu aminokiselinu. Prvotno se mislilo da HINT1 interagira s protein kinazom C (PKC), no ta aktivnost nije potvrđena. Protein HINT1 se nalazi unutar stanice, u jezgri i citoplazmi, a poznato je da se veže za purinske mononukleotide i da je prisutan u mnogim tkivima, posebice u mozgu, jetri i bubrezima. Zbog svoje evolucijske očuvanosti među različitim vrstama pretpostavlja se da HINT1 ima vrlo važnu ulogu u staničnoj biologiji. Istraživanja su pokazala i da ovaj protein igra ulogu u suzbijanju tumora te u poremećajima poput shizofrenije i bipolarnog poremećaja, što ga čini potencijalnom metom lijekova za ublažavanje navedenih poremećaja.<sup>13</sup>

Makromolekula HINT1 se sastoji od 126 aminokiselina. Protein ima strukturu homodimera koji sadrži  $\beta$ -nabrani list sastavljen od 10 antiparalelnih lanaca, pri čemu svaki monomer doprinosi s 5 lanaca. Ovaj protein u svojoj strukturi sadrži dva identična vezna mjesta za purinske baze i ribozu. Polarni ostatci aminokiselina, uključujući i His 110 te His 112 stvaraju vezno mjesto za  $\alpha$ -fosfat. Istraživanja *in vitro* su pokazala da ljudski HINT1 može vezati različite nukleotide, među kojima i AMP, ADP te diadenozinpolifosfate Ap3A i Ap4A. Istraživanja G. Bai *et al.*<sup>13</sup> bavila su se proučavanjem ovog proteina te su pokušali objasniti kako HINT1 stupa u kontakt s potencijalnim proteinima koji se mogu vezati za HINT1. Nadalje, provedena su i prva NMR istraživanja navedenog proteina koja daju informacije o njegovoj strukturi.

### 5.1. Eksperimentalni dio

Protein HINT1 obilježen izotopima <sup>13</sup>C i <sup>15</sup>N pripremljen je već prije opisanim metodama<sup>14</sup>, dok su akadezin (AIKAR), fosforilirani akadezin i GMP nabavljeni od proizvođača Sigma-Aldrich.

### 5.1.1. Snimanje spektara NMR

Uzorci za NMR titraciju ligandom sadržavali su 0,2 mmol dm<sup>-3</sup> HINT1 označenog s <sup>15</sup>N, 50 mmol dm<sup>-3</sup> natrijeva fosfata, 50 mmol dm<sup>-3</sup> natrijeva klorida u 90% H<sub>2</sub>O i 10% D<sub>2</sub>O pri čemu je pH iznosio 7,3. Zatim je stvoren kompleks HINT1-ligand dodavanjem sve većih količina liganda počevši od 50 mmol dm<sup>-3</sup> za gvanozin-monofosfat (GMP) te 20 mmol dm<sup>-3</sup> za akadezin<sup>15</sup> (AIKAR) u 0,2 mmol dm<sup>-3</sup> otopinu HINT1. Nakon svakog dodatka titranta snimljeni su <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spektri, a signali su asignirani na temelju HNCACB spektra uzorka dvostruko obilježenog proteina HINT1 koncentracije 0,5 mmol dm<sup>-3</sup> i 4 mmol dm<sup>-3</sup> GMP. Spektri NMR snimljeni su pri 25°C na spektrometru tvrtke Bruker frekvencije protona 600 MHz. Dobiveni podatci su obrađeni i analizirani koristeći NMRPipe i NMRDraw softverske pakete.

Uzorcima neoznačenog HINT1 proteina koncentracije 0,1 mmol dm<sup>-3</sup> uz dodatak 2 mmol dm<sup>-3</sup> GMP i AIKAR snimljeni su spektri STD NMR. Kontrolni uzorak nije sadržavao protein, već samo 4 mmol dm<sup>-3</sup> GMP i 4 mmol dm<sup>-3</sup> AIKAR. Spektar STD NMR snimljen je na spektrometru Varian AS500 sa 32 000 točaka i 128 snimaka uz selektivno zasićenje proteinskih rezonancija pri 0,8 ppm za zasićeni spektar te 10 ppm za referentni spektar koristeći niz od 60 Gaussovih pulseva u ukupnom trajanju zasićenja od 3 sekunde. Intenzitet navedenih pulseva odgovara jakosti polja od 90 Hz.

### 5.1.2. Fluorescencija

Afinitet vezanja GMP i AIKAR za HINT1 promatran je gašenjem unutrašnje fluorescencije triptofana pročišćenog proteina HINT1. Za mjerenja je korišten fluorimetar (Photon Counting Spectrofluorimeter, ISS) s valnom duljinom pobude koja je iznosila 295 nm i emisijskom valnom duljinom 375 nm. Određivanje konstante disocijacije  $K_D$  provedeno je koristeći nelinearnu regresiju (softver GraphPad Prism4, GraphPad Software Inc.) i jednadžbu:

$$\left(\frac{\Delta F}{F_0} \times 100\right) = \frac{[S] \times \left(\frac{\Delta F_{max}}{F_0} \times 100\right)}{K_D + [S]} \quad (5.1.)$$

gdje je  $(\Delta F/F_0 \times 100)$  postotak gašenja fluorescencije,  $[S]$  koncentracija dodanog liganda i  $K_D$  konstanta disocijacije.

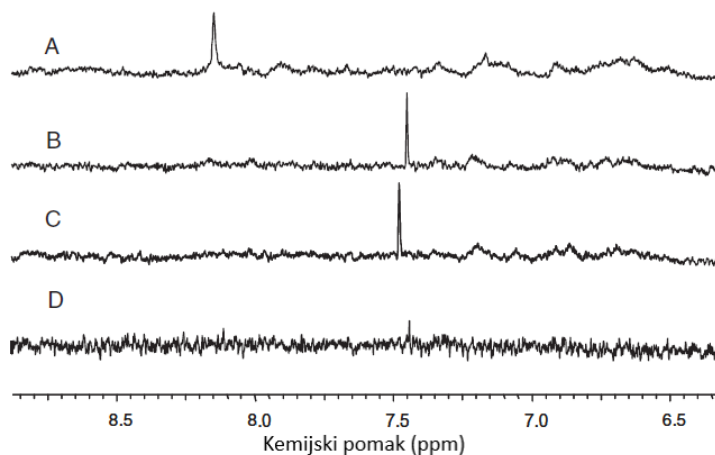
Unutrašnja fluorescencija Trp proteina HINT1 je mjerena pri 25 °C, u 0,5 ml Tris-HCl pufera koncentracije 50 mmol dm<sup>-3</sup> pri pH 7,5 uz dodatak EDTA koncentracije 1 mmol dm<sup>-3</sup>, DTT koncentracije 1 mmol dm<sup>-3</sup> i 5% glicerola u mikrokiveti optičkog puta duljine 5 mm. Koncentrirani ligand je postupno titriran u otopinu HINT1. Provedena je korekcija titracije jednake količine liganda korištene u prethodno navedenom postupku u 0,5 μmol dm<sup>-3</sup> otopinu *N*-acetil-triptofanamida.

### 5.1.3. Rendgenska kristalografija

Uvjeti u kojima će protein HINT1 kristalizirati određeni su postupkom *sparse matrix screening* koristeći Nextal Classics II zaslon za kristalizaciju od dobavljača Qiagen. Ishodna otopina volumena 100 nL pomiješana je s 200 nL od 300 nL HINT1/AIKAR koristeći Oryx Nano proizvođača Douglas Instruments. Za krio zaštitu kristali su preneseni na kap otopine natrijeva malonata koncentracije 2,5 mol dm<sup>-3</sup> i pH 7,5 uz dodatak 0,3 mmol dm<sup>-3</sup> AIKAR. Nakon kratke inkubacije kristali su brzo smrznuti u tekućem dušiku. Struktura proteina je određena koristeći HINT1/*N*-etilsulfamoiladenozin kompleks kao model. Promatrane su tri asimetrične jedinice, a u sučelju nije uočeno vezno mjesto.

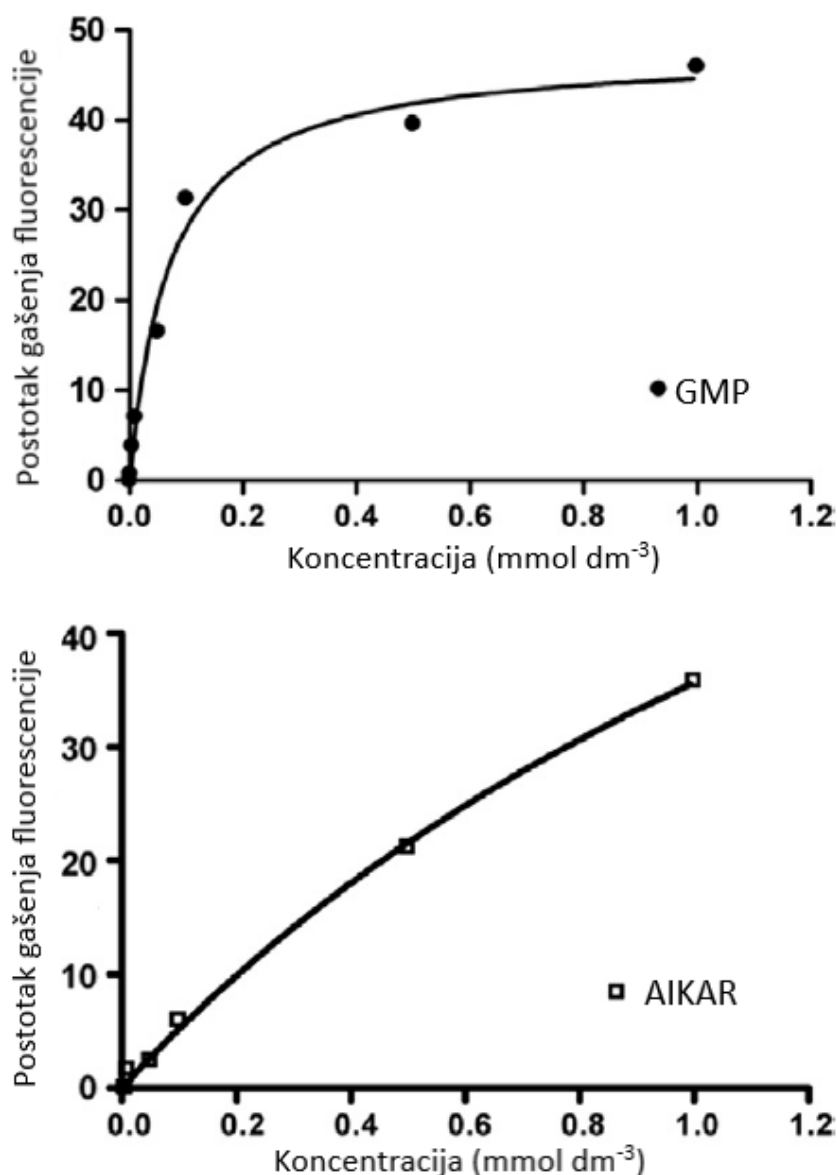
## 5.2. Rezultati i rasprava

Vezanje liganada na HINT1 provjereno je metodom STD NMR. Kako je GMP otprije poznat ligand koji se veže za HINT1, snimanjem njegovog spektra provjereno je može li se vezanje detektirati pomoću STD NMR. Vezanje liganda je promatrano u prisutnosti rezidualnog NMR signala, primjerice za GMP je  $\delta = 8,18$ . Slični STD rezultati dobiveni su i za AIKAR ligande.



Slika 12. Spektri STD NMR vezanog liganda GMP (A), AIKAR (B) i fosforiliranog AIKAR (C) na HINT1 te smjese liganada GMP-a i AIKAR-a (D).<sup>13</sup>

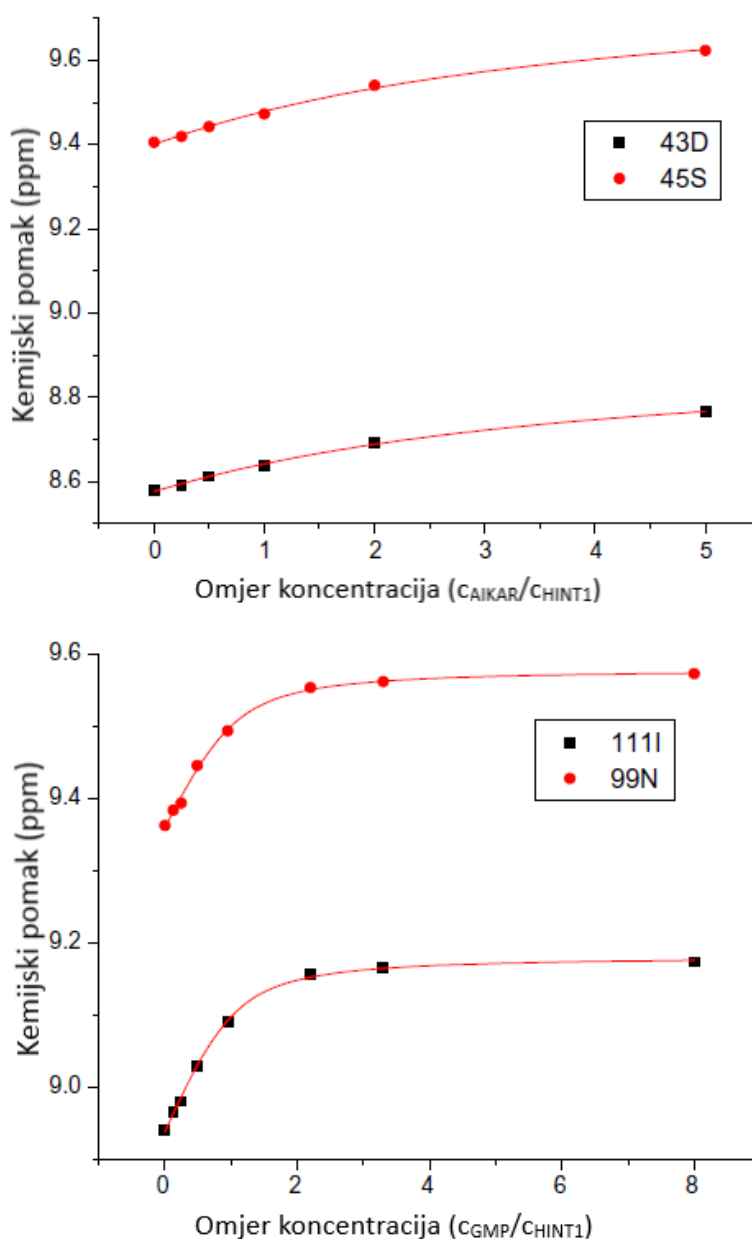
Vežanje liganda potvrđeno je gašenjem fluorescencije (slika 13.). Iz podataka su izračunate konstante disocijacije  $1,1 \pm 0,7 \text{ mmol dm}^{-3}$  za AIKAR odnosno  $67 \pm 7,9 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$  za GMP. Vežno mjesto na HINT1 okarakterizirano je na temelju korelacija u  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektru izotopno obilježenog proteina. Na isti način snimljeni su i asignirani  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektri kompleksa HINT1 s ligandima GMP, odnosno AIKAR.



Slika 13. Gašenje fluorescencije HINT1 uz GMP i AIKAR. Podatci su ugođeni pomoću jednadžbe (5.1.).<sup>13</sup>





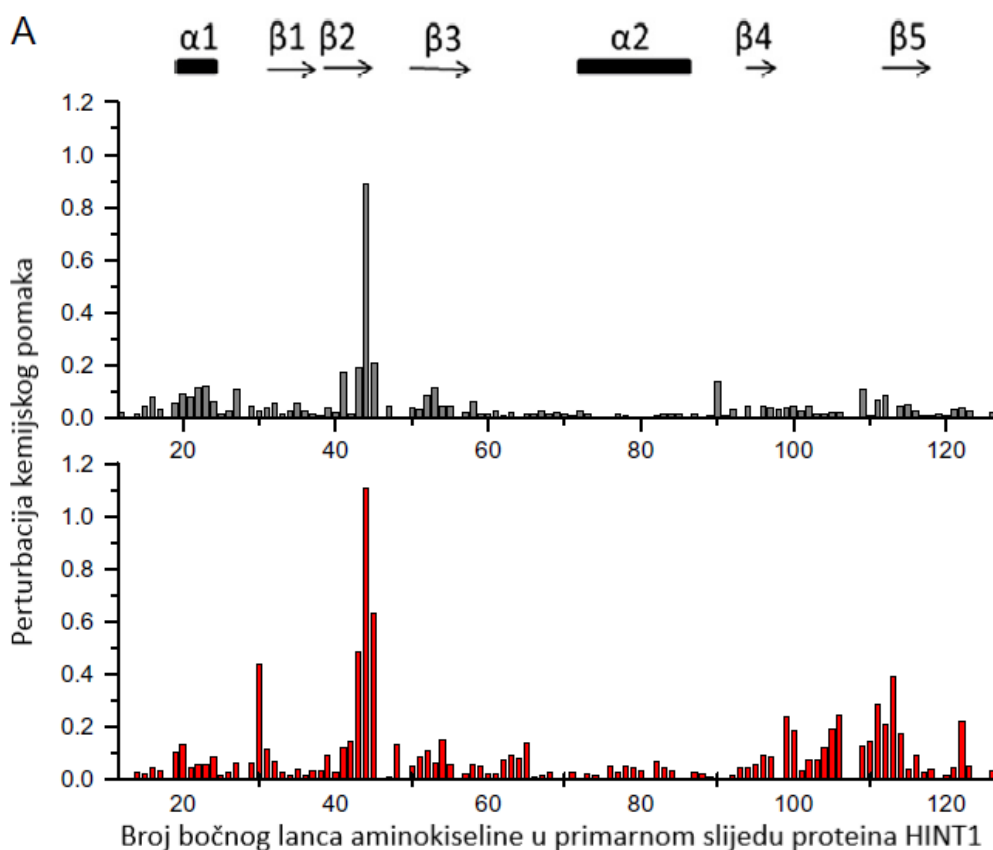


Slika 15. Ovisnost kemijskog pomaka amidnih protona o omjeru koncentracija liganda i proteina. Gornji graf prikazuje ovisnost za ligand AIKAR, dok donji graf prikazuje ovisnost za ligand GMP. Pomoću prikazane ovisnosti izračunata je konstanta disocijacije.<sup>13</sup>

Pomoću ovisnosti prikazane na slici 15. određene su konstante disocijacije za AIKAR i GMP. Konstanta disocijacije za AIKAR je iznosila  $1,2 \pm 0,4 \text{ mmol dm}^{-3}$ , dok je konstanta disocijacije za GMP iznosila  $60 \pm 10 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ . Vrijednosti konstanti disocijacije dobivene spektroskopijom NMR u skladu su s onima dobivenima gašenjem fluorescencije.

Radi bolje usporedbe i objašnjenja veznog mjesta, razlika kemijskih pomaka HINT1 s ligandima je uspoređena s proteinskim slijedom HINT1, pri čemu se na prikazu uočavaju perturbacije kemijskih pomaka  $\Delta\delta$  u obje dimenzije ( $^{15}\text{N}$  i  $^1\text{H}$ ) izračunate jednadžbom:

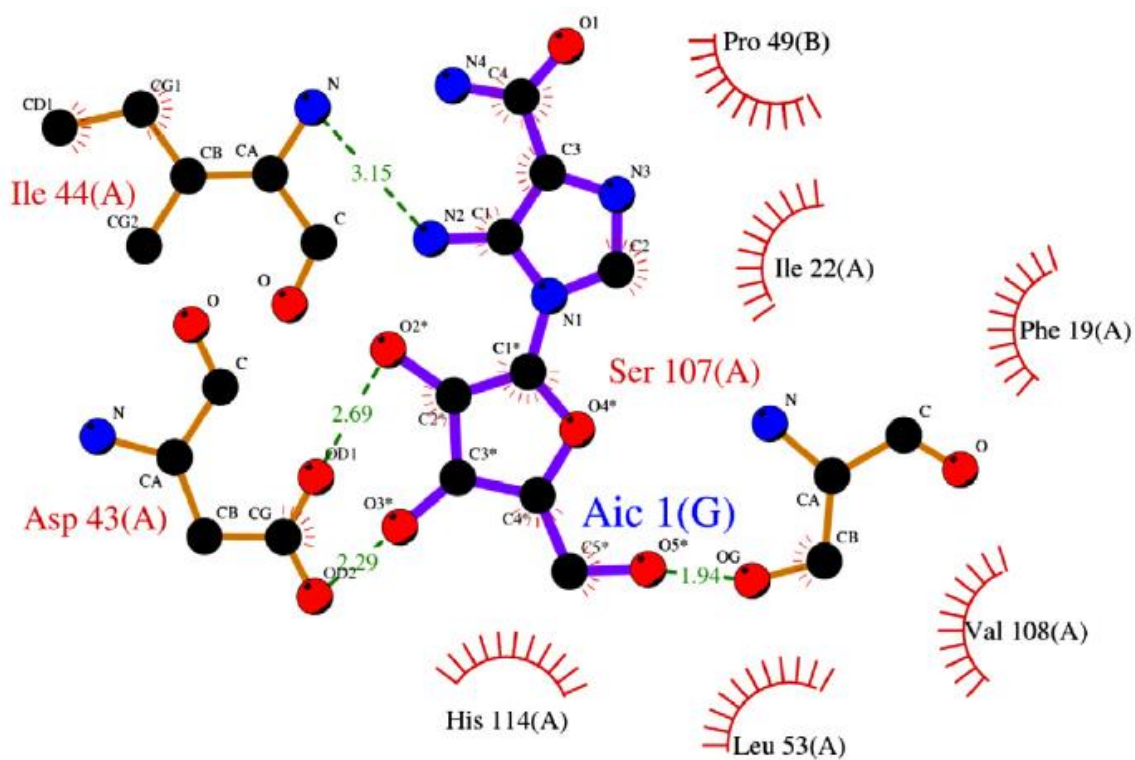
$$\Delta\delta = \sqrt{(\Delta\delta_{\text{H}})^2 + (0,154\Delta\delta_{\text{N}})^2} \quad (5.2.)$$



Slika 16. Perturbacije kemijskog pomaka NMR za AIKAR (gore) i GMP (dolje) u ovisnosti o primarnom slijedu aminokiselina u proteinu HINT1.<sup>13</sup>

Kako je STD NMR osjetljiva metoda, njenim korištenjem je moguće promatrati čak i vrlo slabe ligande koji se vežu za HINT1 pa je stoga promatranje vezanja AIKAR-a vrlo dobro opisano. Za razliku od promatranja fluorescencije, na STD signale puno manje utječu moguće interferencije. Kako su bile poznate rezonancije okosnice proteina, pomoću  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektra pronađena su mjesta vezanja liganda. Primijećene su promjene u spektru  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC proteina HINT1 u vidu proširenja signala usprkos relativno maloj molekularnoj masi.

Iz eksperimentalnih podataka je zaključeno da perturbacija kemijskog pomaka uvelike ovisi o omjeru koncentracija AIKAR/HINT1. Spektar kompleksiranog liganda GMP pružio je više informacija od spektra kompleksiranog AIKAR-a zbog većih promjena kemijskog pomaka jer se pojavio veći broj pikova. Kako bi se potvrdila vrsta i slijed aminokiselina, snimljen je HNCACB spektar. Na temelju podataka dobivenih rendgenskom strukturnom analizom primijećeno je da su bočni lanci aminokiselina, koje tvore klaster, jako osjetljivi na vezanje nukleotida, što se može primijetiti na slici 16. Ostatci 30 i 43–45 pokazuju jako veliku perturbaciju kemijskog pomaka, što bi ukazivalo da se ti ostatci aminokiselina nalaze u veznom džepu gdje se vežu gvanin i šećer iz GMP-a. Asp 43 je vjerojatno vezan dvjema vodikovim vezama za šećer GMP-a što bi objasnilo jako veliku perturbaciju tog signala. Velika perturbacija uočena je i za His 42 koji se vjerojatno veže za  $-NH_2$  skupinu gvanina. Aminokiselina Ile 44 pokazuje najveću perturbaciju kemijskog pomaka, što se može objasniti činjenicom da se nalazi u samoj blizini liganda. Nadalje, ostatci 99, 106, 109–114 pokazuju perturbaciju kemijskog pomaka koja se opisuje interakcijama između šećera i 5'-fosfatnih skupina GMP-a. Vezivanje liganda AIKAR je slično vezivanju GMP-a, što potvrđuju slične vrijednosti perturbacije kemijskih pomaka. Najveća razlika opažena je zbog vodikove veze koju ostatak Ile 44 tvori s amino skupinom AIKAR-a. Kod liganda AIKAR u vezivanju ne sudjeluje His 42, što potvrđuju male perturbacije kemijskog pomaka te uključenost Ile 22 i Ile 23 u hidrofobni kontakt s ligandom. Općenito, informacije dobivene perturbacijom kemijskog pomaka poklapaju se s onima dobivenima rendgenskom kristalografijom, no ipak postoje aminokiselinski ostatci koji odstupaju. Primjerice, Ser 45 nije izravno povezan s vezanjem liganda i proteina, a istovremeno posjeduje relativno veliku perturbaciju kemijskog pomaka. Pretpostavlja se da su uzrok toj pojavi sekundarne interakcije sa susjednim bočnim lancem Ile 44, no razlog odstupanja može biti i različitost struktura u čvrstom stanju i otopini koje ne moraju nužno biti jednake. Ovim istraživanjem dobivene su informacije koje pomažu shvatiti interakcije između liganda i proteina HINT1 te mogu naći primjenu u dizajnu lijekova. Molekula GMP i njezini derivati su loši kandidati za lijekove jer sadrže fosfatne skupine, dok su AIKAR i slični spojevi dobri kandidati jer nemaju fosfatne skupine, a vežu se za isto vezno mjesto kao i GMP.



Slika 17. Interakcijska mapa veznog mjesta HINT1 i AIKAR dobivena rendgenskom kristalografijom.<sup>13</sup>

## § 6. ZAKLJUČAK

Spektroskopija NMR je iznimno važna metoda za određivanje strukture bioloških molekula. Jedna od prednosti spektroskopije NMR je mogućnost strukturne karakterizacije u otopini. Na taj način mogu se dobiti podaci o strukturi biomolekula i vezanju liganada pri fiziološkim uvjetima, što je ključno za objašnjenje mehanizama različitih staničnih procesa.

Rezultati su pokazali da je kombinacijom metoda NMR moguće odrediti strukturu makromolekulskog kompleksa, poput PNA-DNA. Nadalje, tehnika STD NMR omogućuje određivanje veznih epitopa liganda, primjerice azitromicina u interakciji s albuminom. Ako je poznata NMR struktura makromolekule, na temelju perturbacija kemijskih pomaka mogu se identificirati skupine u interakciji s ligandom.

Opisani primjeri pokazuju da spektroskopija NMR pruža detaljan uvid u strukturu bioloških molekula, liganada i njihovih kompleksa, kao i u fizikalno-kemijske parametre važne za opis mehanizama proučavanih interakcija. Dobivene spoznaje se dalje mogu primijeniti za dizajn novih i učinkovitijih lijekova.

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA Tiskara Varaždin, 2013, str. 5–49.
2. Dostupni materijal kolegija Analitička kemija 2, smjer Kemija - istraživački, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
3. <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/cross-relaxation> (datum pristupa 18.06.2021.)
4. O. Zerbe, *BioNMR in Drug Research*, Wiley-VCH, 2003, str. 79–87.
5. P. Novak, T. Jednačak u Z. Mandić (ur.), *Physico-Chemical methods in Drug discovery*, IAPC, Zagreb, 2011, str. 189–231.
6. [science.sciencemag.org/content/274/5292/1531/tab-figures-dana](http://science.sciencemag.org/content/274/5292/1531/tab-figures-dana) (datum pristupa 03.05.2021.)
7. [jeol.co.jp/en/applications/detail/1615.html](http://jeol.co.jp/en/applications/detail/1615.html) (datum pristupa 03.05.2021.)
8. P. Novak, P. Tepeš, V. Lazić, *Croat. Chem. Acta* **80** (2) (2007) 211–216
9. M. Eriksson, P. E. Nielsen, *Nat. Struct. Biol.* **3** (5) (1996) 410–413
10. L. Christensen *et al.*, *J. Peptide Sci.* **3** (1995) 175–183
11. [en.wikipedia.org/wiki/Helix](http://en.wikipedia.org/wiki/Helix) (datum pristupa 02.05.2021.)
12. [en.wikipedia.org/wiki/DNA](http://en.wikipedia.org/wiki/DNA) (datum pristupa 02.05.2021.)
13. G. Bai *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **18** (2010) 6756–6762
14. G. Bai, B. Feng, J. B. Wang, K. M. Varney, M. Shapiro, *M. Biomol. NMR Assign.* (2009) **3**, 57.
15. [www.chemspider.com](http://www.chemspider.com) (datum pristupa 30.04.2021.)