Interakcije 9a-aminopropil derivata azitromicina i ribosoma izoliranog iz bakterije Esherichia coli

Kušec, Iva

Master's thesis / Diplomski 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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:529671

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-01**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Iva Kušec

Interakcije 9a-aminopropil derivata azitromicina i ribosoma izoliranog iz bakterije *Escherichia coli*

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistre kemije

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Predraga Novaka i neposrednim voditeljstvom mag. chem. Ivane Mikulandre.

Rad je izrađen u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom Makrozoni, novi konjugati makrolidnih antibiotika: Dizajn, priprava i interakcije (IP-2018-01-8098).

Zahvale

Prvenstveno se zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Predragu Novaku na pruženoj prilici za izradu ovog diplomskog rada. Zahvaljujem Vam na svakom savjetu, svakoj konstruktivnoj kritici te ugodnoj radnoj atmosferi. Neizmjerno hvala mojoj neposrednoj voditeljici Ivani Mikulandri, na ugodnoj i poticajnoj radnoj sredini. Hvala ti za sve savjete i pomoć u asignaciji spektara. Hvala doc. dr. sc. Tomislavu Jednačku prilikom snimanja STD spektara te na svim savjetima i pomoći.

Veliko hvala svim mojim ljudima (posebno mojim M. i L.) koji su me okruživali svih ovih pet godina. Hvala vam za svaki slobodan trenutak ispunjen smijehom i novim avanturama. Hvala vam što ste me uvijek gurali naprijed.

Na kraju, veliko hvala mojim roditeljima i mojem bratu. Bez vas ovo ne bi bilo moguće. Hvala vam na neizmjernoj podršci i vjeri u mene. ♡

Sadržaj

SAŽETAK ..... **IX**
ABSTRACT ..... **XII**
§ 1. UVOD **1**
§ 2. LITERATURNI PREGLED **2**
2.1. Makrolidni antibiotici **2**
2.1.1. Podjela makrolida *2*
2.1.2. Trodimenzijska struktura makrolida *4*
2.1.3. Mehanizam djelovanja makrolida *5*
2.1.4. Mehanizmi rezistencije bakterija *8*
2.2. Interakcije makrolida i njihovih bioloških meta **10**
2.2.1. Interakcije makrolida i proteina *11*
2.2.2. Interakcije makrolida i membrane *13*
2.2.3. Interakcije makrolida i žučnih kiselina *16*
2.3. Spektroskopija NMR **17**
2.3.1. Tehnike NMR za određivanje interakcija ligand-receptor *18*
2.3.1.1. Tehnika STD *19*
2.3.1.2. Tehnika trNoesy *21*
2.4. Ostale metode za karakterizaciju interakcija makrolid-ribosom **22**
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO **25**
3.1. Materijali i kemikalije **25**
3.2. Snimanje spektara NMR **25**
3.2.1. Tehnike NMR za karakterizaciju strukture 9a-aminopropil derivata azitromicina *25*
3.2.2. Tehnike NMR za određivanje konformacije 9a-aminopropil derivata azitromicina *27*
3.2.3. Tehnika NMR za određivanje epitopa vezanja 9a-aminopropil derivata azitromicina *28*
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA **29**
4.1. Karakterizacija prekursora 9a-aminopropil derivata azitromicina **29**
4.2. Konformacija 9a-aminopropil derivata azitromicina u slobodnom i vezanom stanju **33**
4.3. **Određivanje epitopa vezanja 9a-aminopropil derivata azitromicina u interakciji s ribosomom bakterije *Escherichia coli*** **43**
§ 5. ZAKLJUČAK **47**
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI) **48**
§ 7. LITERATURNI IZVORI **49**

§ 8. DODATAK XV
§ 9. ŽIVOTOPIS XVI

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

INTERAKCIJE 9A-AMINOPROPIL DERIVATA AZITROMICINA I RIBOSOMA IZOLIRANOG IZ BAKTERIJE *ESCHERICHIA COLI*

Iva Kušec

Makrolidni antibiotici koriste se u posljednjih 60 godina najčešće za liječenje infekcija gornjih i donjih dišnih puteva. Djelovanje makrolidnih antibiotika temelji se na inhibiciji sinteze bakterijskih proteina vezanjem antibiotika na 50S podjedinicu bakterijskog ribosoma. Povećanje bakterijske rezistencije na postojeće makrolidne antibiotike dovelo je do potrebe za otkrićem i razvojem novih antibiotika. Za potpuno razumijevanje bioaktivnosti makrolidnog antibiotika, potrebno je odrediti konformacije u slobodnom i vezanom stanju te istražiti interakcije s bakterijskim ribosomom. U ovom radu okarakteriziran je 9a-aminopropil derivat azitromicina, prekursor u sintezi makrozona, pomoću jedno- i dvodimenzijskih tehnika NMR. Makrozoni su konjugati azitromicina i tiosemikarbazona. Pomoću tehnike NOESY određena je konformacija prekursora u slobodnom stanju. Konformacija prekursora u vezanom stanju određena je pomoću tehnike trNOESY, dok su interakcije prekursora s ribosomom izoliranim iz bakterije *Escherichia coli* istražene pomoću tehnike STD.

(49 stranica, 27 slika, 10 tablica, 27 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: azitromicin, interakcije, makrolidni antibiotici, makrozoni, ribosom spektroskopija NMR, tehnika NOESY , tehnika STD,

Mentor: prof. dr. sc. Predrag Novak
Neposredni voditelj: Ivana Mikulandra, mag. chem.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Predrag Novak
2. izv. prof. dr. sc. Ivana Biljan
3. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Zamjena:

Datum diplomskog ispita: 23. rujan 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

INTERACTIONS OF 9A-AMINOPROPYL DERIVATE OF AZITHROMYCIN AND RIBOSOME ISOLATED FROM THE BACTERIA *ESCHERICHIA COLI*

Iva Kušec

Macrolide antibiotics have been used over the past 60 years, to treat upper and lower respiratory tract infections. Macrolides inhibit bacterial protein synthesis by binding to the 50S subunit of the bacterial ribosome. Increasing bacterial resistance to existing macrolide antibiotics has speed up the process of discovery of new antibiotics. To fully understand bioactivity of macrolide antibiotics, it is necessary to determine structure and conformation in the free and bound states and to investigate the interactions with the bacterial ribosome. In this paper, the structure of 9a-aminopropyl derivate of azithromycin, a precursor in the synthesis of the corresponding macrozone, was characterized by using one- and two-dimensional NMR spectroscopy. Macrozones are conjugates of azithromycin and thiosemicarbazones. The conformation of the precursor in the free and bound states was determined by NOESY and transferred NOESY spectral analysis, while the interactions with the ribosome isolated from *Escherichia coli* were investigated using the STD technique.

(49 pages, 27 figures, 10 tables, 27 references, original in croatian])

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: azithromycin, interactions, macrolide antibiotics, macrozone, NMR spectroscopy, NOESY technique, ribosome, STD technique

Mentor: Dr. Predrag Novak, Full Professor with tenure
Assistant mentor: Ivana Mikulandra, mag. chem.

Reviewers:

1. Dr. Predrag Novak, Full Profesor with tenur
2. Dr. Ivana Biljan, Assistant Professor
3. Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor

Substitute:

Date of exam: September 23th, 2021

§ 1. UVOD

Makrolidi su skupina antibiotskih lijekova[1] koji vezanjem na 50S podjedinicu bakterijskog ribosoma inhibiraju biosintezu proteina i tako sprječavaju rast bakterija.[2] Struktura makrolida se sastoji od makrolaktonskog prstena na kojem su najčešće vezane dvije saharidne podjedinice kladinoza i desozamin. Postoje ukupno četiri generacije makrolidnih antibiotika. Četrnaesteročlani makrolid eritromicin je predstavnik prve generacije. Petnaesteročlani makrolidni antibiotik azitromicin predstavnik je druge generacije. Azitromicin je pripravljen iz eritromicina uvođenjem atoma dušika u makrolaktonski prsten. Predstavnici treće i četvrte generacije su ketolidi telitromicin i solitromicin. Telitromicin i solitromicin razvijeni su zbog sve većeg porasta rezistencije bakterija na makrolidne antibiotike. Glavni mehanizmi bakterijske rezistencije su: inaktivacija antibiotika, modifikacija mete ribosoma i izbacivanje antibiotika iz stanice (efluks).[3,4]

Porast broja bakterijskih rezistentnih sojeva danas predstavlja ozbiljnu prijetnju za ljudsko zdravlje zbog čega postoji velika potreba za otkrićem novih, djelotvornijih antibiotika.[3] U posljednje vrijeme cilj istraživača je razviti nove makrolidne antibiotike koji će pokazati poboljšano biološko djelovanje s naglaskom na bakterijski rezistentne sojeve.[5] Tijekom razvoja novih lijekova od iznimne je važnosti utvrditi njihove interakcije s ribosomom i drugim biološkim metama koje sudjeluju u transportu lijekova kroz organizam i u izlučivanju lijekova iz organizma.

Cilj ovog diplomskog rada je istražiti interakcije 9a-aminopropil derivata azitromicina s ribosomom izoliranog iz bakterije *Escherichia coli*. 9a-aminopropil azitromicin je prekursor u sintezi novih derivata makrolidnih antibiotika, makrozona.[3] Struktura prekursora makrozona bit će određena jedno- i dvodimenzijskim tehnikama spektroskopije NMR. Interakcije prekursora s ribosomom bit će istražene pomoću tehnika NMR: tehnika razlike prijenosa zasićenja (engl. *saturation transfer difference*, STD) i trNOESY (engl. *transferred nuclear Overhauser enhancements*). Također, proučit će se konformacija prekursora u slobodnom i vezanom stanju pomoću tehnik NOESY (engl. *nuclear Overhauser effect spectroscopy*).

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Makrolidni antibiotici

Makrolidni antibiotici visoko su učinkoviti i sigurni terapijski lijekovi koji se koriste za liječenje infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama. U kliničke svrhe upotrebljavaju se posljednjih 60 godina.[4] Sastoje se od 14-članog do 16-članog makrolaktonskog prstena povezanog glikozidnim vezama sa šećernim podjedinicama, kladinozom i desozaminom.[6]

Makrolidne antibiotike osim antibakterijskog djelovanja karakterizira i antitumorsko, antiupalno i antimalarijsko djelovanje.[7] Najčešće se prepisuju za infekcije dišnih puteva koje uzrokuju mikroorganizmi *Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pygeenes, Haemophilus influenzae, Moraxella cattharalis, Chlamydia pneumoniae i Mycoplasma pneumoniae*. No, makrolidi se koriste i za liječenje infekcija kože i mekog tkiva te spolno prenosivih infekcija uzrokovanih bakterijama kao što je *Chlamydia trachomatis*.[8]

2.1.1. Podjela makrolida

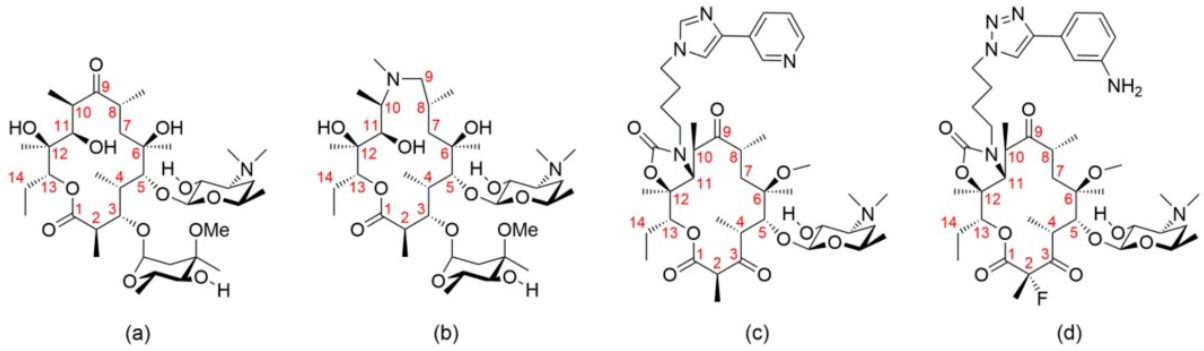
Makrolidni antibiotici mogu se podijeliti u četiri generacije. Predstavnik prve generacije te ujedno i prvi makrolidni antibiotik eritromicin, otkriven je 1952. godine izolacijom iz mikroorganizma *Saccharopolyspora erythrea* (slika 1a).[8] Eritromicin se zbog svog spektra djelovanja koristio za liječenje upala dišnih puteva te upala uzrokovanih od strane patogena *Hemophilus influenzae*. Nedostaci eritromicina u primjeni su niz nuspojava kao što su primjerice: gorak okus, slaba oralna bioraspoloživost, mučnina i bol koja se javlja pri unosu lijeka injekcijom. Dodatni nedostatak eritromicina je njegova nestabilnost u kiselim uvjetima koji su karakteristični za želudac. Rezistencija na eritromicin povećala se 70-tih i 80-tih godina prošlog stoljeća.[9] Porastom bakterijske rezistencije počela je utrka za otkrivanjem novih, djelotvornijih makrolidnih antibiotika sa širokim spektrom upotrebe.

Azitromicin, 15-člani makrolidni antibiotik, predstavnik je druge generacije makrolidnih antibiotika (slika 1b). Otkriven je 80-tih godina prošlog stoljeća od strane tvrtki Plive i Pfizera. Azitromicin se dobiva iz eritromicina u četiri reakcijska koraka.[10] Beckmannovom pregradnjom uvodi se atom dušika u makrolaktonski prsten.[9] Dodatak atoma dušika u makrolaktonski prsten poboljšava stabilnost makrolida u kiselim uvjetima te povećava prodiranje antibiotika u tkiva.[11]

Azitromicin u usporedbi sa svim ostalim makrolidnim antibioticima pokazuje najvišu razinu akumulacije u tkivima sisavaca.[9] Nadalje, azitromicin karakterizira i poboljšana gastrointestinalna podnošljivost te duže vrijeme poluživota.[8] Budući da azitromicin ima izvrsna farmakokinetička svojstva, postao je jedan od najprodavanijih antibiotika. Međutim, nedostatak azitromicina je nedovoljno širok spektar antibakterijskog djelovanja zbog porasta broja rezistentnih bakterijskih sojeva.[9]

Predstavnik treće generacije makrolidnih antibiotika te prvi ketolid je telitromicin (slika 1c). Telitromicin sadrži alkil-arilni lanac vezan na makrolaktonski prsten te sadrži ketonsku skupinu umjesto šećera kladinoze. Iako telitromicin pokazuje aktivnost na neke rezistentne sojeve, povučen je s tržišta nakon što su otkrivene nuspojave njegova korištenja.[6] Nuspojave koje se javljaju korištenjem telitromicina su: sinkopa, poremećaji vida, pogoršanje već postojeće bolesti *miastenija gravis*, hepatoksičnost te zatajenje jetre.[9]

Predstavnik četvrte generacije, solitromicin, strukturno je sličan telitromicinu (slika 1d). Makrolaktonski prsten solitromicina supstituiran je s atomom fluora što značajno povećava njegovu aktivnost prema rezistentnim patogenima.[6] Atom fluora na poziciji 2, čini osnovnu strukturnu razliku između telitromicina i solitromicina. Atoma fluora sudjeluje u vezanju solitromicina na bakterijski ribosom što ukazuje na njegovu važnost. Budući da je solitromicin strukturno sličan telitromicinu, Američka agencija za hranu i lijekove (eng. *U.S. Food and Drug Administration*, FDA) do danas nije odobrila solitromicin za upotrebu u kliničke svrhe.



Slika 1. Struktura makrolida a) eritromicina, b) azitromicina, c) telitromicina i d) solitromicina[6]

Zbog porasta broja rezistentnih patogena intenzivno se radi na razvoju novih antibiotika. Makrozoni, konjugati azitromicina i tiosemikarbazona, razvijeni su sa svrhom borbe protiv bakterijske rezistencije.[3] Pri dizajnu makrozona odabrani su 15-člani makrolidi (azitromicin),

radi svojih povoljnih farmakoloških karakteristika. Nadalje, tiosemikarbazoni su odabrani kao bočni lanci zbog svojeg širokog spektra aktivnosti koji uključuje i antibakterijsku aktivnost. Naime, utvrđeno je za konjugate tiosemikarbazida da interferiraju s mehanizmom rezistencije u kojem dolazi do izbacivanja antibiotika (efluks) iz rezistentnih bakterijskih stanica patogena *Staphylococcus aureus*.[3]

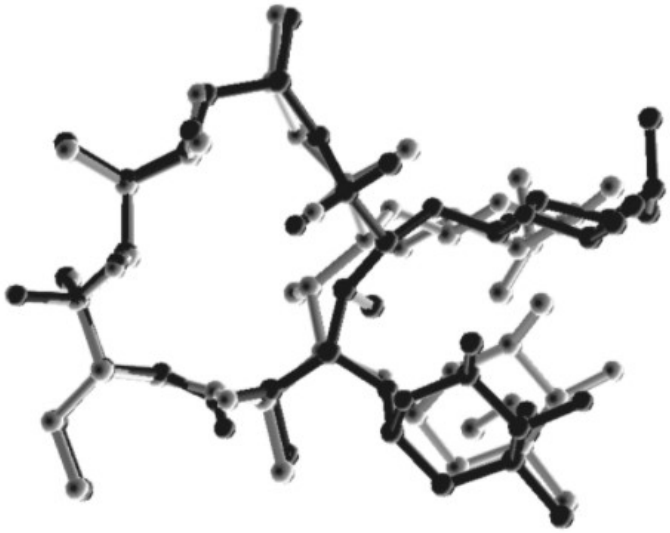
2.1.2. Trodimenzijska struktura makrolida

Dosadašnja istraživanja su pokazala da 14-člani i 15-člani makrolidi mogu postojati u dvije osnovne konformacije, izvrnutoj (eng. *folded-out*) koja je energijski povoljnija[7] i uvrnutoj (eng. *folded-in*) (slika 2). Razlika u konformacijama odnosi se na savijanje fragmenta C3-C5 makrolaktonskog prstena prema van odnosno prema unutra. Obje konformacije moguće su u otopini i u čvrstom stanju. Izvrnutu konformaciju karakterizira bliski kontakt između H4 i H11 atoma te H5 atoma s metilnom skupinom na poziciji 6 dok uvrnutu konformaciju karakterizira bliski kontakt između atoma H3 i H11 te metilne skupine vezane na C6 i atoma H4.[6] Nadalje, utvrđena je i razlika u vicinalnim konstantama sprege ^{3}J(H2-H3) između dvije konformacije.[7] Vicinalna sprega između ^{1}H ovisi o diedarskom kutu. Za izvrnutu konformaciju utvrđeno je da vrijednost diedarskog kuta ($\omega_{H2\text{-}C2\text{-}C3\text{-}H3}$) iznosi ~160° dok za uvrnutu ~90°-100°. Stoga je vicinalna konstanta sprege u slučaju izvrnute konformacije veća i iznosi ~10 Hz dok za uvrnutu konformaciju iznosi ~2-3 Hz.[7,12]

Proučavanjem vezanja makrolida za ribosom utvrđeno je da su vezane konformacije makrolida vrlo slične konformacijama slobodnih makrolida. Tehnikom NMR utvrđeno je da u otopini dominira izvrnuta konformacija.[6] U otopinama može biti prisutna i uvrnuta konformacija, što ovisi o polarnosti otapala i temperaturi pri kojoj se izvodi eksperiment. Rendgenskom kristalografijom utvrđeno je da u veznom stanju makrolidi dominantno zauzimaju izvrnutu konformaciju.[6]

Za 15-člane makrolide utvrđeno je da pokazuju veću konformacijsku fleksibilnost od 14-članih makrolida. Naime, 15-člani makrolidi u vezanom i slobodnom stanju mogu poprimiti i treću konformaciju, to jest 3-*endo-folded-out* koja je energijski najpovoljnija. 3-*endo-folded-out* konformacija posjeduje strukturne karakteristike izvrnute i uvrnute konformacije.[6] Vrijednost diedarskog kuta ($\omega_{H2\text{-}C2\text{-}C3\text{-}H3}$) za 3-*endo-folded-out* konformaciju iznosi ~122° dok konstanta sprege iznosi 4–5 Hz.[7]

Novak i suradnici su pomoću spektroskopije NMR i molekulskog modeliranja utvrdili da se konformacija 14-članog makrolida oleandomicina mijenja s promjenom otapala i zagrijavanjem. Oleandomicin u deuteriranom dimetilsulfoksidu zauzima dominantno uvrnutu konformaciju. No, zagrijavanjem dolazi do povećanja udjela izvrnute konformacije. Nadalje, oleandomicin u otapalima kao što je deuterirana voda, kloroform i aceton-d_6, zauzima obje konformacije, dakle uvrnutu i izvrnutu.[13] Nadalje, utvrđeno je da derivat oleandomicina (oleandomicin-9-oksim) zauzima dominantno izvrnutu konformaciju u otapalima DMSO-d_6, $CDCl_3$ i acetonu-d_6 za razliku od derivata oleandomicina (10,11-anhidrooleandomicin) koji zauzima obje konformacije u navedenim otapalima.[12]



Slika 2. Superpozicija uvrnute (sivo) i izvrnute (crno) konformacije azitromicina[4]

2.1.3. Mehanizam djelovanja makrolida

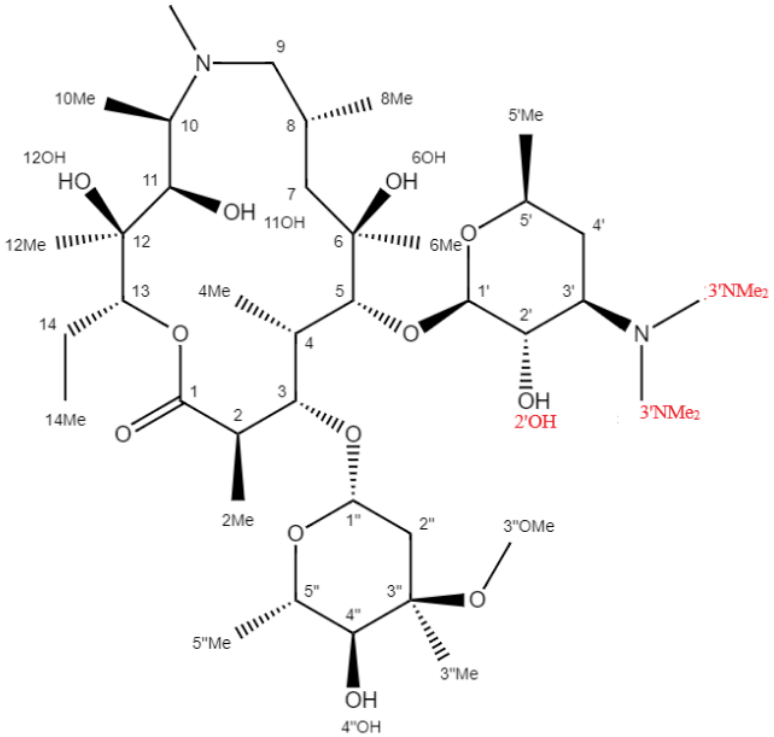
Makrolidni antibiotici inhibiraju sintezu proteina vezanjem na bakterijski ribosom. Bakterijski ribosom (70S) sastoji se od 30S i 50S podjedinica. Mala podjedinica sastoji se od 16S rRNA dok se velika podjedinica sastoji od 23S i 5S rRNA. Ostatak mase ribosoma otpada na ribosomske proteine. U 30S podjedinici se očitava genetska informacija u molekuli mRNA, dok je 50S podjedinica odgovorna za formiranje peptidne veze.[6]

Sintetizirani polipeptidni lanac izlazi iz ribosoma kroz peptidni tunel. Peptidni tunel duljine 100 Å i promjera 10–20 Å nalazi se u većoj 50S podjedinici ribosoma. Prostire se od peptidil-

transferaznog centra (PTC) na sučelju 30S-50S podjedinica do citoplazme koja okružuje ribosom u stanici. Tunel je građen od ribosomske RNA i ribosomskih proteina L4 i L22.[8]

Većina makrolida veže se reverzibilno za 23S rRNA u 50S podjedinici između peptidil-transferaznog centra i suženja kojeg formiraju ribosomski proteini L4 i L22 (slika 4). Kristalne strukture visokog razlučivanja pokazale su da makrolaktonski prsten leži ravno uza zid peptidnog tunela. Hidrofobna strana prstena okrenuta je prema hidrofobnom području koje se sastoji od nukleotidnih baza A2058, A2059 i C2611 23 S rRNA.[8] Hidroksidne skupine makrolaktonskog lanca 6-OH, 11-OH i 12-OH tvore vodikove veze s pirimidinskim bazama molekule 23 S rRNA.[4]

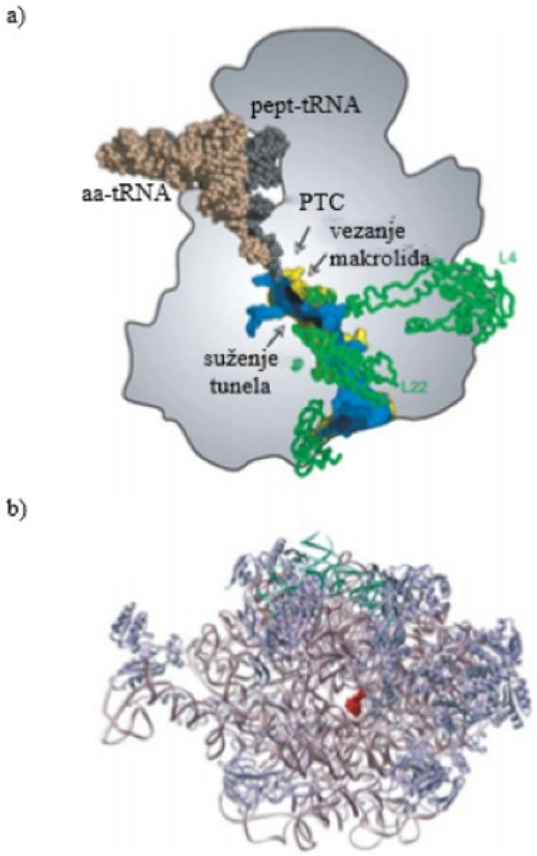
Ključne interakcije makrolida i ribosoma nastaju između nukleotidnih baza rRNA A2058 i A2059 te 2'-OH i 3'-N-dimetilamino skupine desozamina (slika 3). Između 2'-OH skupine i atoma dušika u nukleotidnim bazama A2058 i A2059 nastaju vodikove veze. Pravilno vezanje desozamina iznimno je važno budući da se jedan od mehanizama rezistencije temelji na modifikaciji nukleotida A2058. Gubitak ili modifikacija 2'-OH skupine makrolida, inaktivira 14-, 15- i 16-člane makrolide. Vezna energija makrolida proizlazi iz interakcije s rRNA. Vodikove veze i hidrofobne interakcije između desozamina i rRNA doprinose polovici ukupne vezne energije makrolida.[8]



Slika 3. Struktura azitromicina s označenim atomima ključnim za interakciju s ribosomom

Šećer kladinoza orijentira se paralelno s desozaminom pri interakciji s ribosomom. Kladinoza tvori interakciju s pirimidinskom bazom na poziciji 2509 23S rRNA te je izložena lumenu peptidinog tunela što ju čini dostupnom za interakciju s novonastalim peptidnim lancem.

Telitromicin, predstavnik četvrte generacije makrolida, sadrži alkil-arilni lanac čime se povećava njegova aktivnost i afinitet prema ribosomu. Alkil-arilni lanac ketolida telitromicina proteže se niz peptidni tunel i dolazi u blisku interakciju s ribosomskim proteinima L22 i L4. Ketolidni antibiotici za aktivnost i vezanje, iako tvore dodatne interakcije s ribosomom, moraju interagirati s ribosomom i preko šećera desozamina. [8]



Slika 4. Vezanje makrolida za peptidni tunel 50S ribosomske podjedinice: a) presjek 50S ribosomske podjedinice, b) makrolid eritromicin (crveno) u veznom mjestu 50S ribosomske podjedinice bakterije *Deinococcus radiodurans*[8]

Makrolidni antibiotici inhibiraju biosintezu proteina na četiri načina:

1. inhibicijom nastanka peptidne veze
2. indukcijom disocijacije peptidil-tRNA s ribosoma
3. inhibicijom elongacije polipeptidnog lanca
4. inhibicijom povezivanja 30S i 50S ribosomske podjedinice.[8]

Neki od navedenih mehanizama mogu biti objašnjeni modelom makrolida kao čepa koji sterički blokira napredovanje novonastalog peptida kroz peptidni tunel. No, neka istraživanja *in vitro* su pokazala da je ribosom u prisutnosti makrolida eritromicina u mogućnosti sintetizirati lanac od sedam do osam aminokiselina. Stoga se smatra da je navedeni model prejednostavan za potpuno objašnjenje djelovanja makrolida. U istraživanjima izvedenima *in vitro* i *in vivo* pokazan je mehanizam disocijacije peptidil-tRNA s ribosoma. Za 16-člane makrolide koji sadrže šećere mikaminozu i mikarozu utvrđeno je da djeluju kao inhibitori peptidil-transferaze odnosno inhibiraju nastanak peptidne veze. Mehanizam inhibicije povezivanja 30S i 50S podjedinice predložio je Champney i suradnici.[8] Primijećeno je da kod stanica koje su tretirane eritromicinom i drugim makrolidima, dolazi do akumulacije nepotpuno sklopljenih ribosomskih podjedinica. Prema predloženom modelu makrolidi se ne vežu za isto mjesto kao i u zrelom ribosomu. Hidrolitički enzim razgradi nepotpuno sklopljene intermedijere.[8]

2.1.4. Mehanizmi rezistencije bakterija

Otkrićem antibiotika spašeni su milijuni života u svijetu. Budući da su antibiotici godinama prepisivani u krive svrhe i u prevelikim količinama došlo je do porasta bakterijske rezistencije. Tako je bakterijska rezistencija na eritromicin identificirana već 1962. godine, dakle samo deset godina od samog otkrića. Porast bakterijske rezistencije na antibiotike danas predstavlja problem na globalnoj razini, stoga postoji velika potreba za razvojem novih antibiotika kojima bi se pobijedila rezistencija. Nažalost, razvoj antibiotika danas nije prioritet farmaceutske industrije, jer se smatra ekonomski neisplativom investicijom. Problem predstavlja i odobravanje antibiotika od strane Američke agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA). U 2015. godini samo je jedan od 45 lijekova koje je odobrila Američka agencija za hranu i lijekove bio antibakterijski. Nadalje, još je više zabrinjavajuća činjenica da je u posljednjih deset godina odobreno samo devet novih antibiotika.[14]

Identificirana su četiri mehanizma bakterijske rezistencije na makrolidne antibiotike:

1. modifikacija ribosomske mete (nukleotid A 2058)
2. izbacivanje antibiotika iz stanice (efluks)
3. inaktivacija antibiotika
4. mutacije u 23S rRNA i ribosomskim proteinima L4 i L22.[3,4]

Erm rezistencija jedan je od najčešćih mehanizama rezistencije patogenih bakterija.[14] Temelji se na metilaciji ili dimetilaciji A2058 nukleotida 23S rRNA od strane enzima *N*-metiltransferaze koja je kodirana *erm* genom.[8,15,16] *N*-metiltransferaza odgovoran je za nastanak rezistencije bakterija na makrolide, linkozamide i streptogramine (MLS rezistencija). Prisutnost metilne skupine na nukleotidu A2058 23S rRNA, fizički ometa vezanje makrolidnog antibiotika. Opseg metilacije nukleotida A2058 ne ovisi samo o aktivnosti Erm gena u domaćinu, već ovisi i o brzini sklapanja bakterijskog ribosoma to jest podjedinica 50S i 30S.[8]

Danas je identificirano više od 40 gena *erm* koji su podijeljeni u sveukupno 21 razred. Gene *erm* najčešće nose plazmidi ili transpozoni. Klinički najvažniji geni *erm* su: *erm*A, *erm*B, *erm*C i *erm*TR. Pronađeni su u različitim patogenima kao što su *Escherichia coli, Streptococcus pneumoniae* i *Staphylococcus aureus*.[8]

Istraživanjima je utvrđeno da mehanizam rezistencije MLS može biti inducibilni (i-MLS) i konstitutivni (c-MLS). Konstitutivni karakterizira metilazna aktivnost koja je neovisna o prisutnosti makrolida u domaćinu dok je kod inducibilnog mehanizma metilazna aktivnost inducirana pojavom makrolida.[8]

Domaćini koje karakterizira inducibilni mehanizam rezistencije (i-MLS), rezistentni su na eritromicin i njegove derivate druge generacije, azitromicin i klaritromicin. Takvi domaćini ne pokazuju rezistenciju na 16-člane makrolide ili ketolide.[8]

Bakterije koje sadrže konstitutivne gene *erm* su rezistentne na sve 14-člane i 16-člane makrolidne antibiotike. Sojevi c-MLS *Staphylococci* rezistentni su na telitromicin dok sojevi c-MLS *Streptococcus pneumoniae* nisu rezistentni na navedeni ketolid.[8]

Drugi važni mehanizam rezistencije je izbacivanje antibiotika iz stanice, to jest efluks. Prvi put je identificiran 1980. godine. Do smanjenja nakupljanja antibiotika u stanici dolazi zbog MefA, skupine transportnih proteina odnosno pumpi. Skupina proteina MefA kodirana je genom *mefA*. Transkripcija gena *mefA* inducirana je 14-članim i 15-članim makrolidnim antibioticima. Energija za efluks dobiva se iz energije pohranjene u gradijentu protona.[8]

Najrjeđi mehanizam rezistencije je inaktivacija makrolidnog antibiotika. Mehanizam se temelji na hidrolitičkoj inaktivaciji 14-članih i 15-članih makrolida od strane enzima esteraze. Geni koji kodiraju esteraze nazivaju se *ere*. Geni *ere* izolirani su iz plazmida bakterije *Escherichia coli*. Nadalje, postoji još jedan mehanizam modifikacije makrolidnih antibiotika koji se temelji na enzimu fosfotransferazi. Fosfotransferaza prenosi fosfatnu skupinu nukleozid-trifosfata na 2'-OH skupinu 14- , 15- i 16-članih makrolida te ih tako inaktivira budući da 2'-OH skupina tvori interakciju s A2058 nukleotidom 23S rRNA. Enzim fosfotransferaza kodirana je genom pod nazivom *mph* čija ekspresija može biti inducirana ili konstitutivna. Mehanizam je otkriven u bakteriji *Escherichia coli*.[15]

Makrolidi tvore interakcije s nukleotidima A2058 i A2059 23S rRNA. Mutacije u tim nukleotidima utvrđene su kod patogenih bakterija rodova *Mycobacterium, Brachyspira, Helicobacter* i *Treponema*. Nadalje, kod patogena *Streptococcus pneumoniae* utvrđene su mutacije u nukleotidima A2059, G2057 i C2611, zatim mutacije u A2058 i C2611 kod *Streptococcus pyogenes*. Mutacije u nukleotidima A2058 i A2059 su najčešće.[15]

Mutacije u genima ribosomskih proteina L4 i L22 utvrđene su kod patogena *Escherichia coli* i *Streptococcus pneumoniae*. U genu za ribosomski protein L4 mutacije su pronađene unutar očuvanog slijeda. Mutacije u genu za L4 protein nastaju insercijom, delecijom i zamjenom nukleotida. Kod gena koji kodira protein L22 utvrđene su mutacije koja kodira karboksi-terminalno dio proteina.[15]

Mutacije u 23S rRNA i u ribosomskim proteinima mogu se zajedno kombinirati čime se povećava rezistencija na makrolid. Takav slučaj je primijećen kod rezistencije patogena *Streptococcus pneumoniae* na antibiotik treće genereacije, telitromicin.[15]

2.2. Interakcije makrolida i njihovih bioloških meta

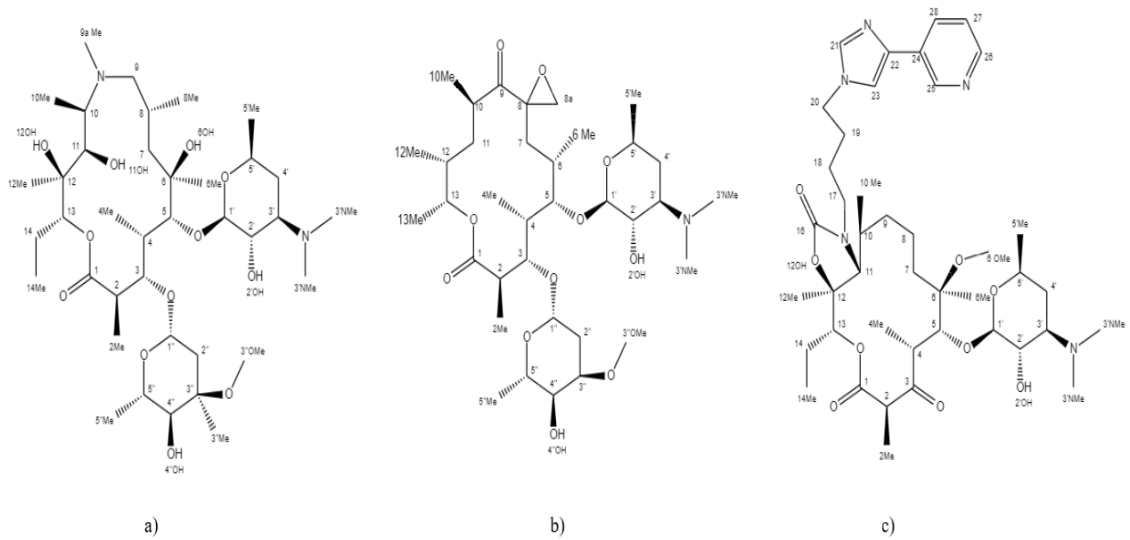
Istraživanja interakcija između makrolida i bioloških meta daju bolji uvid u bioaktivnost makrolidnih antibiotika. Primarna meta antibiotika je bakterijski ribosom, ali antibiotici u našem tijelu tvore interakcije i s drugim biološkim metama kao što su membrane, proteini i žučne kiseline. Za potpuno razumijevanje bioaktivnosti makrolida potrebno je istražiti interakcije i s ostalim biološkim metama.[6] Način vezanja makrolida za ribosom opisan je u potpoglavlju 2.1.3.

2.2.1. Interakcije makrolida i proteina

Albumini su najzastupljeniji proteini u krvnoj plazmi. Albumini imaju veliki kapacitet vezanja liganada te stoga utječu na metabolizam lijekova. Albumini reverzibilno intereagiraju s makrolidnim antibioticima te mogu poslužiti kao transportni sustav za makrolidne antibiotike.[17]

Poznavanje skupina koje su odgovorne za vezanje makrolida od iznimne je važnosti za dizajniranje novih lijekova ili inhibitora s boljim svojstvima. Tijekom dizajniranja novih lijekova potrebno je optimirati i fizikalno-kemijska svojstva kao što su apsorpcija, raspodjela, metabolizam, toksičnost i izlučivanje lijeka (engl. *Absorption*, *Distribution*, *Metabolism*, *Excretion*, *Toxicity*, ADMET).[4] Budući da se makrolidi reverzibilno vežu za albumine važno je identificirati te interakcije kako bi se procijenila bioraspoloživost makrolida.[6]

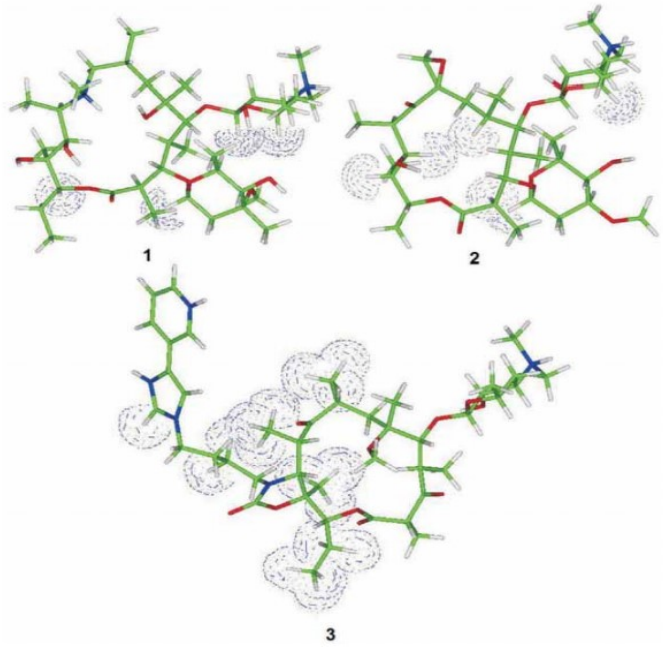
Istraživanjima je potvrđeno da se makrolidi azitromicin, oleandomicin i telitromicin vežu za albumin izoliran iz goveđeg seruma (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA) (slika 6). Potvrda vezanja dobivena je iz eksperimenata STD NMR (engl. *saturation transfer difference*). Pomoću tehnike STD utvrđeni su atomi koji se nalaze u bliskom kontaktu sa serumskim albuminom, to jest epitopi vezanja. Najveći intenzitet signala u spektru STD utvrđen je za atom 13H kod azitromicina i oleandomicina. Protoni vezani na ugljik 1', 5', 3' i 2' kod azitromicina i oleandomicina na desozaminu pokazuju interakciju s albuminom dok kod telitromicina nisu pronađeni bliski kontakti između navedenih protona i albumina. Kod telitromicina utvrđena je jaka interakcija između protona metilne skupina na poziciji 15. Nadalje, veliki intenzitet STD primijećen je i kod metilne skupine na poziciji 10 i protona na poziciji 21. Za oleandomicin utvrđena je uz jaku interakciju protona 13H i jaka interakcija protona 2H s albuminom. Zaključno, za azitromicin i oleandomicin najbliži proton goveđem serumskom albuminu nalazi se na poziciji 13 dok se kod telitromicina radi o protonu na poziciji 15 (slika 5).



a) b) c)

Slika 5. Strukture makrolida a) azitromicina , b) oleandomicina i c) telitromicina

Epitopi utvrđeni za oleandomicin i azitromicin su slični dok to nije slučaj s epitopima utvrđenima za telitromicin (slika 6). Razlike u vezanju su pripisane različitim strukturama navedenih makrolida. Naime, za razliku od druga dva navedena makrolida, telitromicin sadrži alkil-arilni lanac koji tvori dodatne hidrofobne interakcije s BSA. Rezultati upućuju na različite načine vezanja tri navedena makrolidna antibiotika. Slični rezultati dobiveni su i metodom rendgenske kristalografije.[18]



Slika 6. Epitopi utvrđeni STD tehnikom za 1) azitromicin 2) oleandomicin 3) telitromicin[18]

2.2.2. Interakcije makrolida i membrane

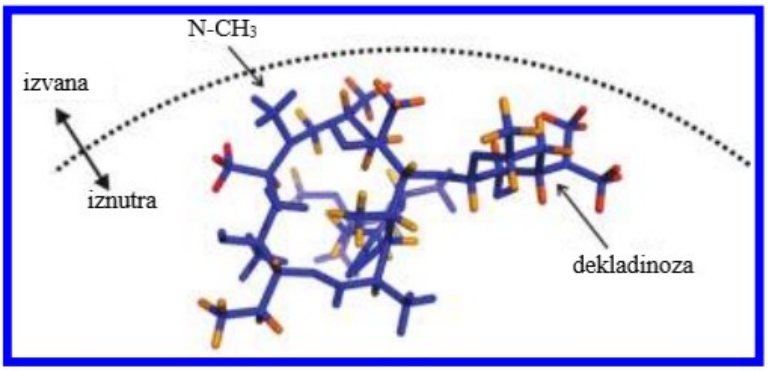
Makrolidni antibiotici stvaraju interakcije s bakterijskim membranama. Bakterijske membrane sastoje se od proteina i lipida. Fosfolipidi su glavna vrsta lipida u bakterijskim membranama. Fosfolipidi se sastoje od alkilnog lanca i polarne glave koja može biti nabijena.[19]

Važno je razumjeti interakcije makrolidnih antibiotika i membrana kako bi se mogla procijeniti biološka svojstva prilikom dizajna novih derivata makrolida. Kosol i suradnici istraživali su interakcije makrolidnih antibiotika (azitromicin, eritromicina A, dekladinozil azitromicin, azahomoeritromicin, klaritromicin, aglikon azitromicina, derivati klaritromicina) i modela membrana. Kao model membrane koristili su micele dodecilfosfokolina (engl. *DodecyphosphoColine*, DPC) i natrijevog dodecilsulfata (engl. *Sodium DodecylSulphate*, SDS).[20]

Istraživanjem je primijećeno je da derivati klaritromicina nisu topljivi u vodi te se ne otapaju ni u otopinama DPC-a i SDS-a. Utvrđeno je da se makrolidi koji sadrže pozitivno nabijene amino skupine (azitromicin, eritromicina A, dekladinozil azitromicin, azahomoeritromicin, klaritromicin, aglikon azitromicina) vežu za micele dodecilfosfokolina i natrijevog dodecilsulfata dok se makrolidi koji ne sadrže protonirane dušikove atome ne vežu za modele membrane (derivati klaritromicina). Stoga je zaključeno da protonirani dušikovi atomi imaju

ključnu ulogu u vezanju makrolida za bakterijske membrane. Nadalje, difuzijskim eksperimentima potvrđeno je vezanje ostalih makrolida za micele SDS-a i DPC-a tako što se pratila promjena vrijednosti difuzijskih koeficijenta makrolida. Utvrđeno je da se makrolidi jače vežu za negativno nabijene micele SDS-a naspram micela DPC-a.[20]

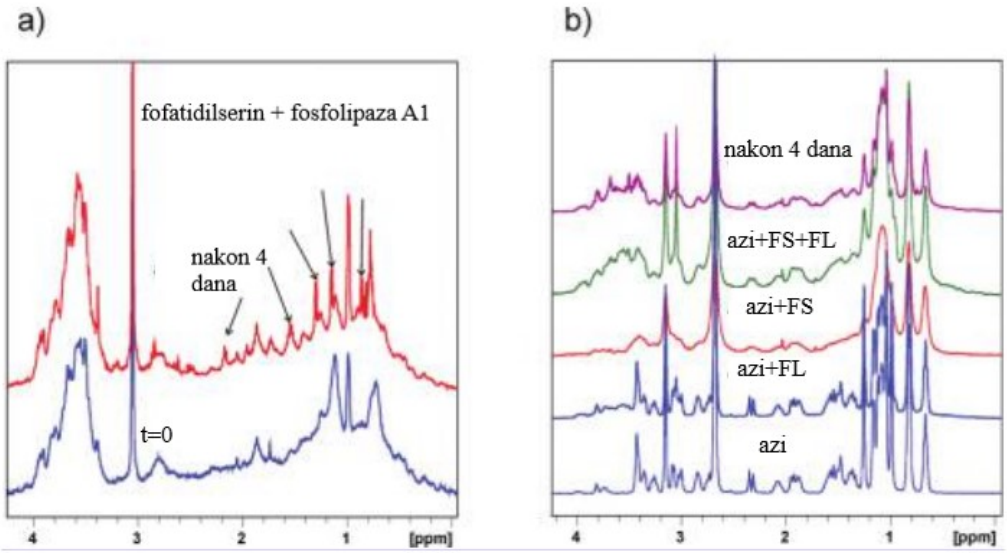
Za istraživanje orijentacije i lokalizacije makrolida u membranama provedeni su relaksacijski eksperimenti NMR (engl. *paramagnetic relaxation enhancements,* PRE). Provedena je titracija s paramagnetskim agensom otopine koja sadrži makrolid vezan za micele dodecilsfosfokolina. Titracijom s paramagnetnim agensom otapalo oko micele postaje paramagnetično. Što su atomi makrolida udaljeniji od otapala to će njihova relaksacija tijekom eksperimenta NMR biti sporija i obrnuto. Stoga je usporedbom vrijednosti PRE utvrđeno da se pozitivno nabijena amino skupina i susjedni atomi nalaze najbliže površini micele. Nadalje, šećer desozamin nalazi se bliže membrani od šećera kladinoze. Za protone na poziciji 2, 3 i 4 utvrđeno je da prodiru u micele. Posljedično tome, protoni vezani za ugljikove atome na poziciji 8, 9 i 10 (slika 5) nalaze se bliže površini micele (slika 7). Zaključno, makrolidi su orijentirani tako da pozitivno nabijene amino skupine tvore elektrostatske interakcije s negativno nabijenim fosfatima iz polarne glave fosfolipida.[20]



Slika 7. Trodimenzijski prikaz orijentacije azitromicina u DPC micelama[20]

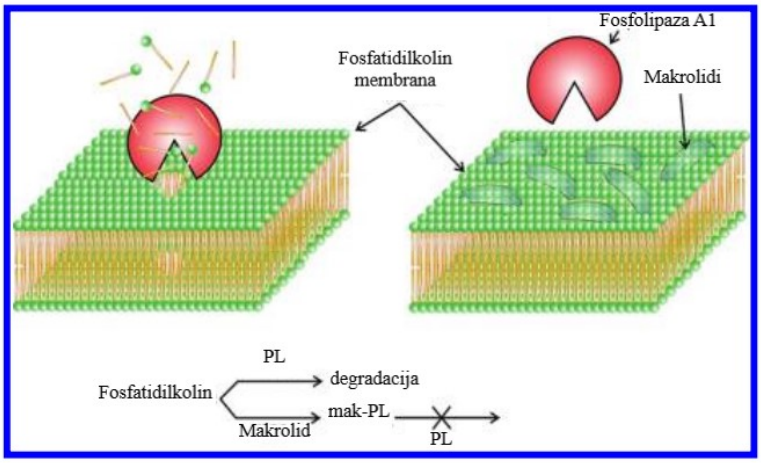
Makrolidi induciraju fosfolipidozu, odnosno poremećaj kojeg karakterizira prekomjerno nakupljanje fosfolipida u tkivu.[4,6,20] Fosfolipaza A1 (engl. *phospholipase* A1, PL) je enzim koji je odgovoran za degradaciju fosfolipida u uvjetima bez makrolidnih antibiotika. Pomoću tehnike ^{1}H NMR proučavane su interakcije između fosfolipaze A1 s fosfatidilserinom u prisutnosti i bez prisutnosti azitromicina. U spektru ^{1}H NMR fosfatidilserina prije dodatka

fosfolipaze A1, vidljivi su široki i slabi signali što potvrđuje nastanak micela. Dodatkom fosfolipaze A1 ne nastaju odmah promjene u spektru ^{1}H NMR, no nakon četiri dana vidljivi su oštri signali što ukazuje da dolazi do razgradnje lipida (slika 8a). Dodatkom lipida u otopinu azitromicina, dolazi do širenja signala u spektru ^{1}H NMR što ukazuje na vezanje azitromicina za micele (slika 8b). Iz spektra ^{1}H NMR vidljivo je da ne dolazi do razgradnje lipida niti nakon četiri dana. Mehanizam zaštite lipida temelji se na indirektnoj inhibiciji enzima fosfolipaze A1 što rezultira višim koncentracijama nerazgrađenih lipida koji se shodno tome akumuliraju unutar stanice.



Slika 8. a) Spektar ^{1}H NMR fosfatidilserina (FS) i fosfolipaze A1, b) spektar ^{1}H NMR slobodnog azitromicina (azi) i u otopini s fosfatidilserinom (FS) i/ili fosfolipazom A1 (FL)[20]

Pokazano je da između enzima fosfolipaze A1 i makrolida ne dolazi do izravne interakcije kao što se pretpostavljalo. Pomoću relaksacijskih eksperimenata utvrđeno je da se makrolidi vežu blizu površine membrane. Posljedično tome zaključeno je da makrolidi zapravo djeluju tako da štite lipide od djelovanja enzima fosfolipaze A1 pri čemu ne dolazi do njihove degradacije (slika 9). Fosfolipidoza je primijećena pri većim koncentracijama makrolida.[4,6,20]

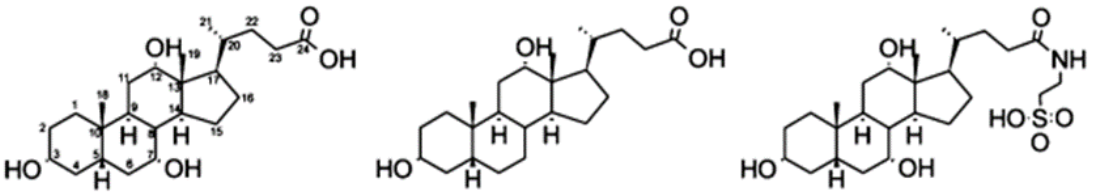


Slika 9. Predloženi mehanizam zaštite lipida membrane od strane makrolida što dovodi fosfolipidoze (PL = fosolipaza A1, mak = makrolid)[20]

2.2.3. Interakcije makrolida i žučnih kiselina

Oko 60–70 % makrolida izlučuje se putem žuči. Stoga je za potpuno razumijevanje bioaktivnosti makrolida važno odrediti interakcije između žučnih kiselina i makrolida.

Žučne kiseline su amfifilne molekule koje se sastoje od četiri hidrofobna prstena. Na hidrofobne prstene vezane su hidrofilne hidroksidne skupine s jedne strane. S druge strane vezan je na peteročlani prsten alkilni lanac koji sadrži karboksilnu skupinu. Žučne kiseline stvaraju micele pri malim koncentracijama, a pri visokima stvaraju vezikule. Glavna zadaća žučnih kiselina je otapanje i prijenos lipida te interakcija s vitaminima i lijekovima koji su topivi u lipidima.[21]



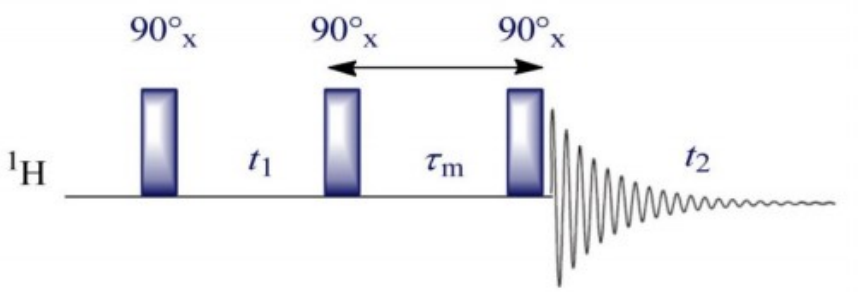
Slika 10. Strukture žučnih kiselina[21]

Glanzer i suradnici istražili su interakcije makrolida i micela žučnih kiselina pomoću spektroskopije NMR, to jest relaksacijskih, titracijskih i difuzijskih ekspertimenata. Titracijskim eksperimentima NMR potvrđeno je vezanje makrolida za micele žučne kiseline što se očituje u promjeni kemijskog pomaka i širenju linija u spektru ^{1}H NMR nakon dodatka micela žučne kiseline. Nadalje, pomoću difuzijskih eksperimenata određena je jačina vezanja makrolida za micele. Za hidrofobne makrolide kao što su azitromicin i klaritromicin primijećeno je jače vezanje za micele. Dakle, ako želimo smanjiti brzinu izlučivanja makrolidnih antibiotika potrebno je koristiti manje hidrofobne makrolide što je od posebne važnosti ako se neki makrolidni antibiotik koristi duže vrijeme za liječenje. Jako vezanje hidrofobnih makrolida je poželjno kada je potrebna brza aktivnost antibiotika na mjestu infekcije. Naime, jako vezanje povećava brzinu prijenosa do mjesta infekcije, ali i povećava brzinu izlučivanja. Pomoću relaksakcijskih eksperimenata dobivene su informacije o orijentaciji makrolida. Budući da žučne kiseline za razliku od već navedenih lipida ne pokazuju jasno odvajanje između hidrofobne i polarne regije te su stoga nasumično orijentirane u micelama, makrolidi se vežu bez preferirane orijentacije na površinu micela kiselina.[21]

2.3. Spektroskopija NMR

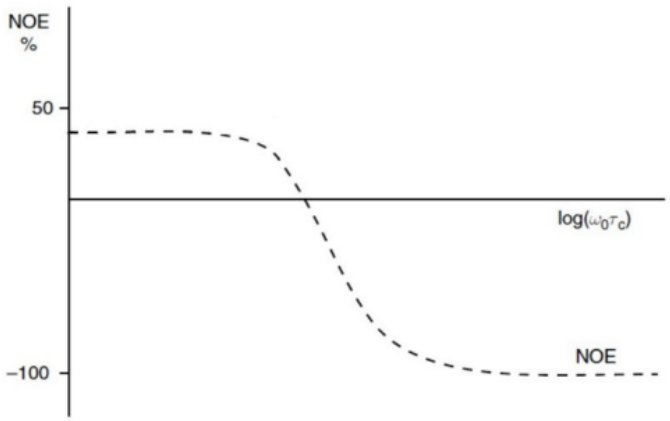
Spektroskopija NMR analitička je tehnika za određivanje strukture organskih, anorganskih i bioloških molekula. Ujedno je spektroskopija NMR neophodna metoda za proučavanje interakcija između bioloških receptora i lijekova.

Tehnika NOESY (engl. *nuclear Overhauser effect spectroscopy*) je dvodimenzijska tehnika NMR koja se temelji na križnoj relaksaciji dipolno spregnutih spinova, to jest na efektu NOE (engl. *nuclear Overhauser effect*) (slika 11). Dipolno sprezanje obuhvaća interakciju dva spina preko prostora. Pomoću tehnike NOESY dobivaju se informacije o udaljenosti spinova. Jačina efekta NOE ovisi o udaljenosti spinova. Naime, intenzitet efekta NOE pada sa šestom potencijom udaljenosti između spinova *r*.



Slika 11. Pulsni slijed NOESY tehnike[22]

Tehnika NOESY može se koristiti za određivanje trodimenzijske strukture makromolekula kao što su nukleinske kiseline, proteini i ugljikohidrati. Efekt NOE pozitivan je za male molekule koje karakterizira kratko korelacijsko vrijeme (vrijeme koje je potrebno molekuli da se zaokrene za kut od jednog radijana) dok je za velike molekule negativan. Za molekule srednje veličine kao što su makrolidi (M_r(azitromicin) = 774 Da), vrijednost NOE-a je mala ili jednaka nuli (slika 12).[22]



Slika 12. Ovisnost intenziteta NOESY signala o umnošku korelacijskog vremena i frekvencije vanjskog polja[22]

2.3.1. Tehnike NMR za određivanje interakcija ligand-receptor

Postoji nekoliko tehnika spektroskopije NMR kojima se mogu proučavati interakcije ligand-receptor. Tehnike se s obzirom na korištene parametre za proučavanje interakcija mogu podijeliti na titracijske, difuzijske i relaksacijske eksperimente te tehnike koje se temelje na efektu NOE.

Titracijskim eksperimentima NMR može se potvrditi vezanje liganda za receptor, što se očituje promjenom kemijskog pomaka i širenjem linija u spektru ^{1}H NMR.

Nadalje, dodatne informacije o vezanju i jakosti vezanja liganda dobivaju se eksperimentima koji se temelje na pojavi translacijske difuzije. Difuzijskim eksperimentima, odnosno tehnikom DOSY (engl. *diffusion-ordered NMR spectroscopy*) mogu se odrediti difuzijski koeficijenti slobodnog i vezanog liganda. Vezanjem liganda za receptor, ligand poprima pokretna svojstva receptora čime dolazi do promjene difuzijskog koeficijenta liganda.

Pomoću relaksacijskih eksperimenata detektira se vezanje liganda za receptor mjerenjem logitudinalnog i transverzalnog vremena relaksacije.

Najčešće korištene tehnike NMR za proučavanje interakcija ligand-receptor temelje se na efektu NOE, a to su: tehnika razlike prijenosa zasićenja (engl. *saturation transfer difference*, STD) te tehnike NOESY (engl. *nuclear Overhauser effect spectroscopy*) i trNOESY (engl. *transferred nuclear Overhauser enhancements*).[23] Pomoću tehnike STD mogu se odrediti epitopi vezanja liganda, dok tehnike NOESY i trNOESY omogućuje određivanje slobodne i vezane konformacije liganda.[6]

Vezanje makrolida za ribosom odvija se u dva alosterička koraka[4]. Prvi korak uključuje prepoznavanje ciljnog mjesta. Dolazi do slabog vezanja liganda i brze izmjene između slobodnog i vezanog stanja. Drugi korak uključuje jako vezanje makrolida za aktivno mjesto ribosoma te je taj korak odgovoran za inhibiciju sinteze bakterijskih proteina. Za korištenje tehnika STD i trNOESY bitan preduvjet je slabo vezanje liganda za receptor (K_d = μM do mM),[24] odnosno brza izmjena između slobodnog i vezanog stanja. Stoga su navedene tehnike prikladne za proučavanje vezanja makrolida.[4,6]

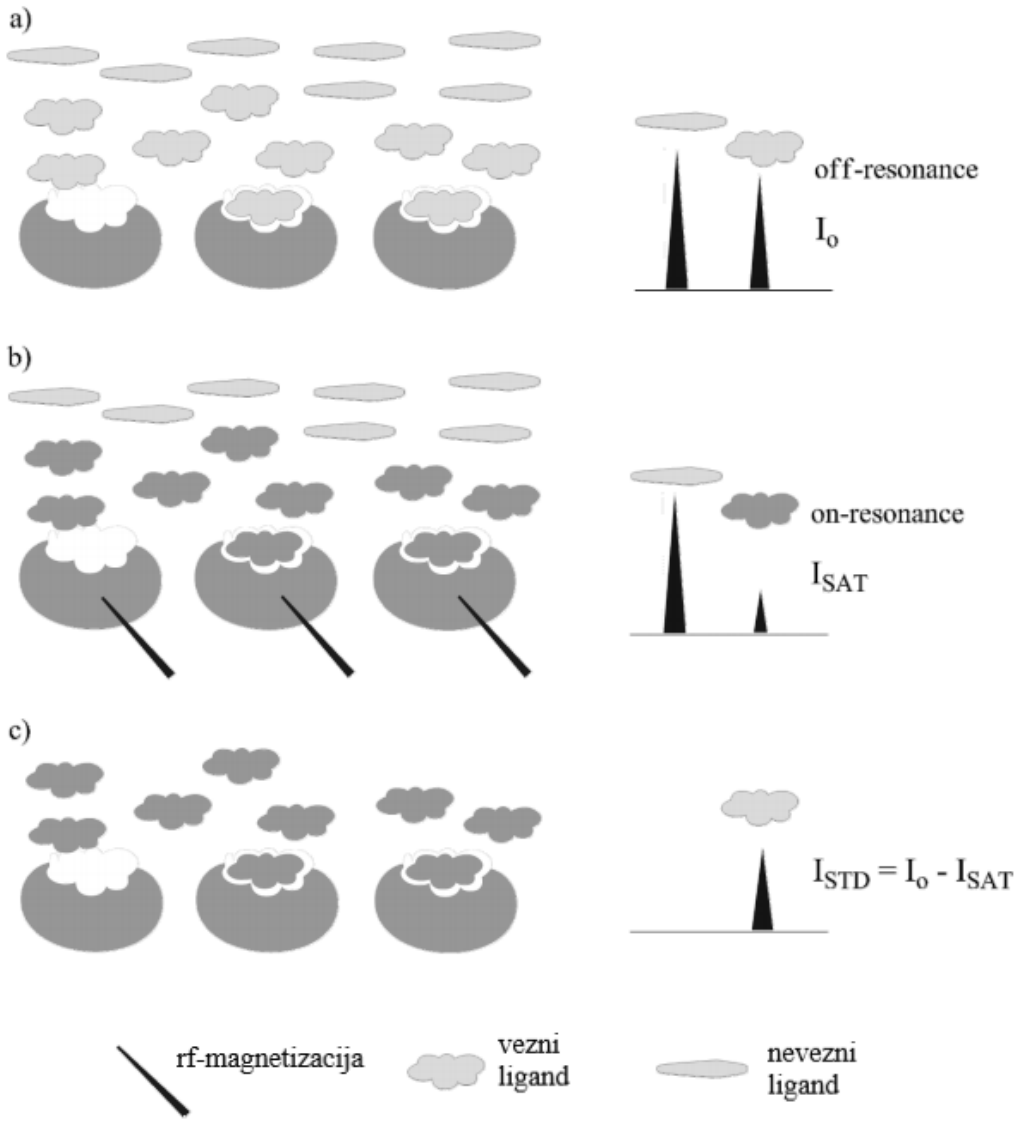
2.3.1.1. Tehnika STD

Tehnika STD temelji se na selektivnom zasićenju protona receptora i prijenosu magnetizacije s receptora na vezani ligand.

Spektar STD je razlika spektara koji se dobiju eksperimentima *on-resonance i off-resonance* (slika 13). Spektar *off-resonance* snima se pri frekvencijama zračenja pri kojima ne dolazi do selektivne pobude protona receptora ili liganda. Spektar *on-resonance* dobiva se selektivnim zasićenjem signala receptora, što se postiže korištenjem selektivnih pulseva. Magnetizacija se prenosi mehanizmom spinske difuzije na protone vezanog liganda. Stupanj zasićenja protona liganda, odnosno intenziteti signala u spektru STD ovise o njihovoj prostornoj udaljenosti od

receptora i o kinetici vezanja, to jest o vremenu koje ligand provede u veznom mjestu receptora budući da se prilikom disocijacije liganda magnetizacija prenosi u otopinu.

Na protone koji se nalaze u bliskom kontaktu s receptorom prenosi se više magnetizacije, dok se na protone koji nisu u bliskom kontaktu prenosi manje magnetizacije. Zbog toga se u spektru *on-resonance* ne smanjuju intenziteti signala protona na koje se ne prenosi magnetizacija, dok se smanjuju intenziteti signala protona koji tvore interakciju s receptorom.[25] Tehnikom STD mogu se detektirati vezajući ligandi čije su konstante disocijacije K_d u rasponu od 10^{-2} do 10^{-8} mol/dm^3.[23,25]

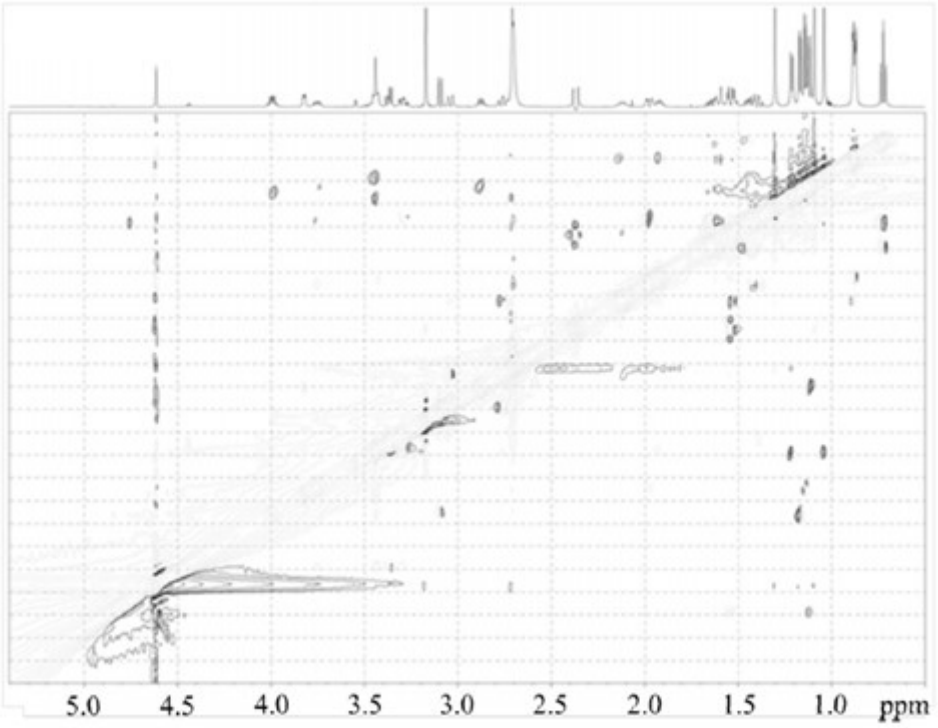


Slika 13. a) Prikaz eksperimenta *off-resonance*, b) eksperimenta *on-resonance* i c) razlike spektara *on-resonance* i *off-resonance* to jest spektra STD[23]

2.3.1.2. Tehnika trNoesy

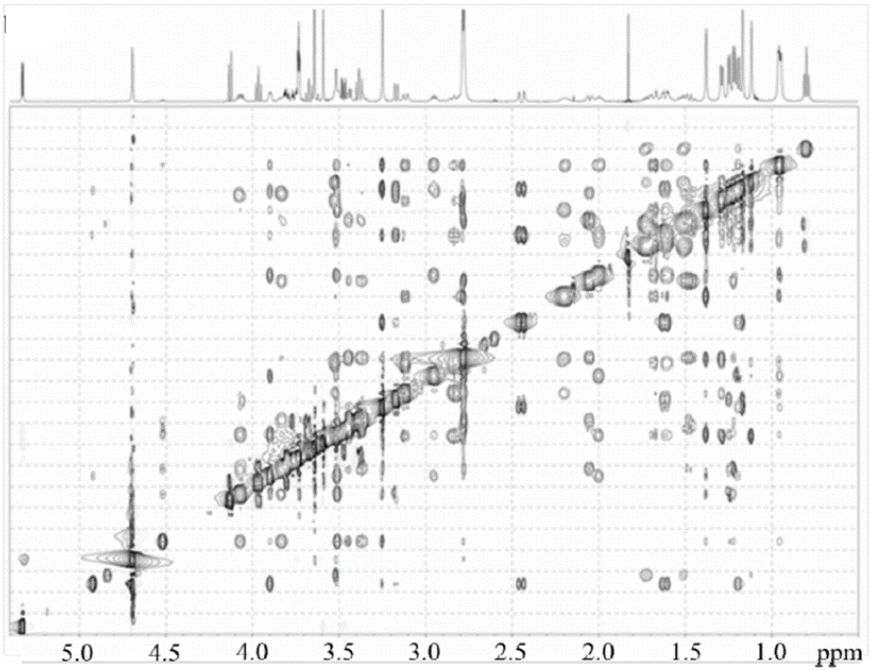
TrNoesy (engl. *transferred nuclear Overhauser enhancements*) je tehnika NMR koja omogućava procjenu trodimenzijske konformacije makrolida u vezanom stanju.[6] Tehnika se temelji na efektu NOE, odnosno na promijeni predznaka signala NOE vezanjem male molekule liganda na receptor. Efekt NOE se temelji na križnoj relaksaciji dipolno spregnutih spinova. Dipolno sprezanje temelji se na interakciji dvaju spinova preko prostora. Na predznak i vrijednost signala NOE utječe udaljenost spinova i korelacijsko vrijeme. Korelacijsko vrijeme je prosječno vrijeme koje je potrebno molekuli da se zarotira za kut od jednog radijana. Korelacijsko vrijeme ovisi o veličini molekule i o viskoznosti otapala. Manje molekule se brže vrte od velikih, stoga imaju kraća korelacijska vremena. Za male molekule signali NOE su ili pozitivni ili jednaki nuli, dok su za velike molekule negativni. Vezanjem male molekule liganda na receptor, ligand poprimi svojstva makromolekule što se očituje u negativnim signalima NOE u spektru.

Prilikom snimanja eksperimenta trNOESY potrebno je imati suvišak liganda 10 do 100 puta kako u spektru ne bi bili vidljivi signali molekule receptora.[23]



Slika 14. NOESY spektar azitromicina u tris-puferu[23]

U spektru NOESY azitromicina (M_r = 774 Da) u tris-puferu može se uočiti samo nekoliko izvandijagonalnih pozitivnih signala NOE. Makrolidni antibiotici su molekule srednje veličine te za njih vrijedi da je umnožak korelacijskog vremena i frekvencije vanjskog magnetnog polja približno jednak 1 (slika 12). Stoga su vrijednosti NOE-a vrlo male ili jednake nuli (slika 14). Dodatkom 70S ribosoma izoliranog iz bakterije *E. coli*, primjećuju se negativni signali trNOE jačeg inteziteta (slika 15). Takav slijed događaja ukazuje na vezanje azitromicina na ribosom.[23]



Slika 15. Spektar trNOESY azitromicina nakon dodatka 70S ribosoma bakterije *Escherichia coli* u tris-puferu[23]

2.4. Ostale metode za karakterizaciju interakcija makrolid-ribosom

Uz spektroskopiju NMR postoji još metoda za istraživanje interakcija ligand-receptor. Fluorescencijska spektroskopija (engl. *fluorescence spectroscopy*), kapilarna elektroforeza (engl. *capillary electrophoresis*), ravnotežna dijaliza (engl. *equilibrium dialysis*), analiza otiska stopa RNA (engl. *RNA footprinting*), kalorimetrija te ultrafiltracija samo su neke od tehnika koje se koriste za proučavanje interakcija ligand-receptor. No, uz spektroskopiju NMR najviše se koriste metode rendgenske kristalografije i krio-elektronske mikroskopije.

Rendgenska kristalografija je moćna i često korištena metoda za karakterizaciju molekularnih i strukturnih interakcija kojom se dobivaju vrijedne informacije na atomskoj razini. Zajedno sa spektroskopijom NMR, jedna je od najčešće korištenih metoda za

karakterizaciju interakcija ligand-receptor. Spektroskopija NMR i rendgenska kristalografija smatraju se komplementarnim metodama.[4] Glavni nedostatak rendgenske spektroskopije je što se njome dobiva statička struktura koja ne odgovara dinamičkim procesima koji se događaju u otopini. Nadalje, potrebno je kokristalizirati makrolidne antibiotike s ribosomom kako bi se uopće mogla koristiti ova tehnika.

Do danas je na temelju istraživanja koja su koristila tehniku rendgenske kristalografije dobiveno najmanje 14 Nobelovih nagrada.[26] Nobelova nagrada 2009. godine dobivena je za otkriće trodimenzijske strukture ribosoma. Dio istraživanja za koje je dobiva Nobelova nagrada odnose se na strukturu kompleksa makrolida eritromicina i telitromicina s 50S ribosomskom podjedinicom bakterije *D. radiodurans* te kompleksa makrolida azitromicina, karbomicina, spiramicina te tilozina s 50S podjedinicom ribosoma arheje *H. marismortui*.[6]

Iako je pomoću kristalografije rasvijetljen općeniti način djelovanja makrolida, interakcije s ribosomom su utvrđene većinom za klinički nevažne bakterije.

Proučavanjem kompleksa azitromicina s ribosomima različitih bakterija (*H. martismortui*, *T. thermophilus*, *D. radiodurans*) utvrđene su razlike u kristalnim strukturama. Naime, primijećene su različite orijentacije i konformacije laktonskog prstena azitromicina vezanog na navedene prokariotske ribosome. Istraživanjem kompleksa azitromicina i 50S ribosomske podjedinice vrsta *T. thermophilus* i *H. marismortui*, opažene su ranije navedene interakcije između makrolida i nukleotida A2058 i A2059.

Tablica 1. Usporedba udaljenosti atoma eritromicina i azitromicina u slobodnom stanju i vezanom stanju s bakterijskim ribosomom[6]

Kompleks	**Udaljenost/Å**					
	C3-C11	C4-C11	C4-C6Me	C5-C6Me	C3-C8	C8-C11
Eritromicin, folded out	4,69	4,33	3,90	2,52	5,50	3,65
Eritromicin, *H. marismortui* 50S	4,85	4,55	3,99	2,61	5,64	3,59
Eritromicin, *T. thermophilus ribosom*	4,85	4,55	3,99	2,61	5,64	3,59
Azitromicin, folded out	4,86	4,60	3,92	2,50	5,74	4,80
Azitromicin, *H. marismortui* 50S	4,80	5,01	4,03	2,59	5,76	4,62
Azitromicin, *T. thermophilus ribosom*	4,80	5,01	4,03	2,59	5,76	4,62

Krio-elektronska mikroskopija doprinijela je u istraživanjima ribosoma i njihovih interakcija s inhibitorima, supstratima i regulacijskim molekulama. Pomoću tehnike jednostanične analize određena je struktura 70S ribosoma bakterije *Mycobacterium smegmatis. Mycobacterium smegmatis* je bliska ljudskom patogenu *Mycobacterium tuberculosis* koji uzrokuje tuberkulozu. Tuberkuloza je jedan od vodećih uzroka smrti u svijetu koja postaje sve veći problem zbog razvoja rezistencije na antibiotike. [27]

Sličan pristup korišten je za karakterizaciju kompleksa makrolida i ribosoma. Određene su specifične interakcije između makrolida diritromicina i ribosoma bakterije *E. coli* pomoću kojih se može objasniti bolja aktivnost diritromicina naspram makrolida eritromicina.[6]

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i kemikalije

- 9a-aminopropil azitromicin, *Fidelta d.o.o.*, Hrvatska
- azitromicin, *Fidelta d.o.o.,* Hrvatska
- tris-d_{11} pufer, 98 % D, *Cambridge Isotope Laboratories, Inc.*, Ujedinjeno Kraljevstvo
- acetonitril-d_3, 99,80 % D, *Eurisotop*, Ujedinjeno Kraljevstvo
- deuterirana voda, 99,90 % D, *Eurisotop*, Ujedinjeno Kraljevstvo
- ribosom A u deuteriranom tris-puferu, pH = 7,4, Dr. Kalju Vanatalu, Tallinn, Estonija
- ribosom B u deuteriranom fosfatnom puferu, pH = 7,4,Dr. Kalju Vanatalu, Tallinn, Estonija

3.2. Snimanje spektara NMR

Instrumenti korišteni za karakterizaciju strukture i određivanje interakcija prekursora 9a-aminopropil derivata azitromicina s deuteriranim ribosomom navedeni su u tablici 2.

Tablica 2. Instrumenti korišteni u svrhu izrade rada.

Instrument	Proizvođač
NMR spektrometar Bruker Avance III HD 600 MHz/54mm Ascend	Bruker
NMR spektrometar Bruker Avance III HD 400 MHz54mm Ascend	

3.2.1. Tehnike NMR za karakterizaciju strukture 9a-aminopropil derivata azitromicina

Za potrebe karakterizacije strukture prekursora snimljeni su spektri NMR u deuteriranim otapalima: acetonitrilu (CD_3CN) i tris-d_{11} puferu. Svi snimljeni spektri i korišteni broj pulseva prikazani su u tablici 3. Korišteni pulsni programi unutar programskog paketa *Top spin* 4.0.9. za svaku tehniku prikazani su u tablici 4. Snimljeni spektri obrađeni su i analizirani pomoću programa *Top spin* 4.0.9.

Tablica 3. Prikaz korištenih tehnika NMR te broja pulseva za pojedinu tehniku

	Tehnika NMR	**Broj pulseva**		**Tehnika NMR**	**Broj pulseva**
Tris-pufer	^{1}H	256	**Acetonitril**	^{1}H	16
	COSY	3		COSY	18
	HSQC	64		HSQC	40
	HMBC	140		HMBC	70
	-	-		DEPT-Q	14336

Tablica 4. Pulsni programi unutar progamskog paketa *Top spin* 4.0.9. koji su korišteni u izradi rada

Tehnika NMR	**Pulsni program**
^{1}H	*zg30*
COSY	*cosygpppqf*
HSQC	*hsqcedetgpsp.3*
HMBC	*hmbcgpndqf*
DEPT-Q	*deptqgpsp*

Volumeni otapala i mase prekursora 9a-aminopropil derivata azitromicina potrebni za pripravu uzorka prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Popis masa prekursora 9a-aminopropil derivata azitromicina i volumena otapala

otapalo	***V*(otapalo) / µL**	***m*(prekursor) / mg**
tris-pufer	550	2
acetonitril	550	10

3.2.2. Tehnike NMR za određivanje konformacije 9a-aminopropil derivata azitromicina

Za određivanje konformacije prekursora 9a-aminopropil derivata azitromicina u slobodnom i vezanom stanju korištene su tehnike NOESY i trNOESY. Spektar NOESY snimljen je u dvama deuteriranim otapalima: tris-d_{11} puferu i acetonitrilu-d_3. Za potrebe snimanja spektara u acetonitrilu-d_3 otopljeno je 10 mg prekursora u 550 μL otapala, dok je za potrebe snimanja spektara u tris-d_{11} puferu otopljeno 2 mg prekursora u 550 μL (tablica 5.).

Eksperimenti trNOESY snimljeni su u tris-puferu s dva uzorka ribosoma pohranjena u različitim deuteriranim otapalima (ribosom A i ribosom B) pri čemu je omjer prekursora 9a-aminopropil derivata azitromicina i ribosoma bio 3500:1. Za potrebe snimanja eksperimenata s ribosomom pohranjenom u deuteriranom tris-puferu (ribosom A) (46,5 μL; c_0(ribosom A) = $1{,}55\text{x}10^{-5}$ mol dm^{-3}) otopljeno je 2 mg prekursora u 550 μL tris-d_{11} puferu dok je za potrebe snimanje eksperimenta s ribosomom pohranjenom u fosfatnom puferu (ribosom B) (68,8 μL; c_0(ribosom B) = $7{,}86\text{x}10^{-6}$ mol dm^{-3}) otopljeno 1,5 mg prekursora.

Parametri i pulsna sekvenca koji su korišteni za snimanje eksperimenata NOESY i trNOESY prikazani su u tablici 6. Eksperiment trNOESY s ribosomom A snimljen je sa supresijom signala otapala dok za trNOESY eksperiment s ribosomom B nije korištena pulsna sekvenca sa supresijom signala otapala.

Tablica 6. Parametri tehnika NOESY i trNOESY korišteni za određivanje konformacije u slobodnom i vezanom stanju 9a-aminopropil derivata azitromicina

Otapalo	**Tehnika**	**Pulsna sekvenca**	**Broj pulseva**	**Vrijeme zasićenja (D1) / s**	**Vrijeme miješanja (D8) / ms**
Tris-pufer-d_{11}	NOESY	*noesyphpr*	50	2	400
	trNOESY	*noesygpphps*	80	2	75
	trNOESY	*noesyphpr*	70	2	75
Acetonitril-d_3	NOESY	*noesyphpr*	80	2	400

3.2.3. Tehnika NMR za određivanje epitopa vezanja 9a-aminopropil derivata azitromicina

Za određivanje epitopa vezanja korištena je tehnika STD. Neposredno prije snimanja eksperimenta STD potrebno je u otopinu 9a-aminopropil derivata azitromicina dodati deuterirani ribosom bakterije ribosom A u tris-puferu ((46,5 μL, c_0(ribosom A) = 1,55 x 10^{-5} mol dm^{-3}) i ribosom B u fosfatnom puferu (68,8 μL; c_0(ribosom B) = 7,86 x 10^{-6} mol dm^{-3})) *Escherichia coli* tako da omjer prekursora i ribosoma iznosi 3500:1.

Primijenjena je pulsna sekvenca sa supresijom signala otapala (*stddiffesgp.3*.) i bez supresije signala otapala (*stddiffesgp*). Prije korištenja sekvence sa supresijom signala snimljen je spektar ^{1}H te su označeni signali koje je potrebno suprimirati.

Isprobano je više vrijednosti frekvencija pri kojima su snimani spektri zasićenja (*on resonance*: -0,5 ppm i 8 ppm) i referentni spektri (*off-resonance:* 35 ppm i 50 ppm). Eksperimenti su provedeni s 256 pulseva, a vrijeme zasićenja *D1* iznosilo je 3 sekunde.

Za proučavanje vezanja na ribosom pohranjen u tris-puferu (ribosom A) snimljeno je deset STD eksperimenata korištenjem sekvence sa supresijom signala pri frekvencijama *on-resonance* 8 ppm i *off-resonance* 50 ppm. Snimljena su po dva *off-resonance* eksperimenta za svaki STD eksperiment. Nakon snimanja eksperimenata, razlika dva *off-resonance* spektra oduzme se od razlike *on-resonance* i *off-resonance* spektra. Postupak se ponovi za svih deset zadanih STD eksperimenata. Nakon obrade STD eksperimenata, deset dobivenih spektara se zbroji.

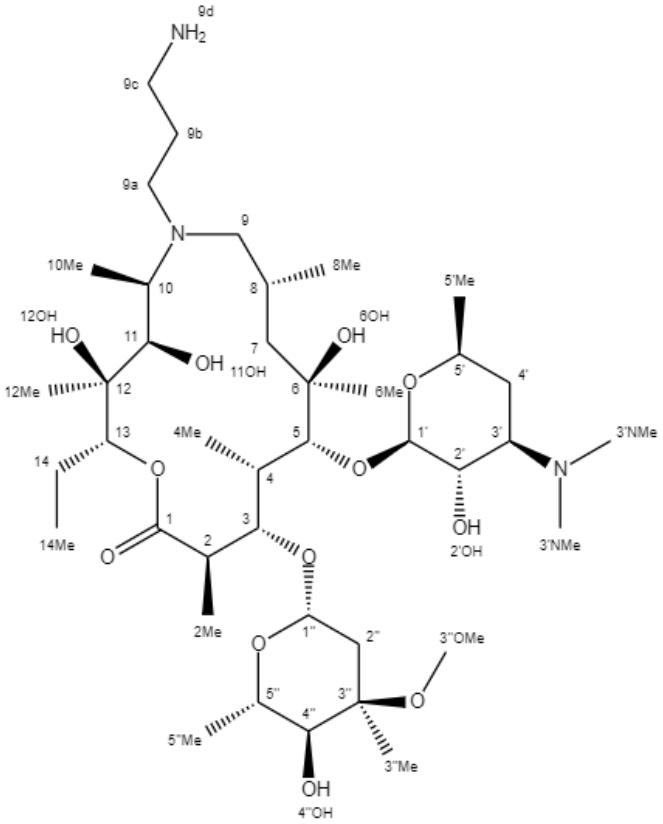
Za određivanje epitopa vezanja korištena je i pulsna sekvenca bez supresije signala otapala (*on-resonance* 8 ppm i *off-resonance* 50 ppm). Snimljeno je sveukupno šest STD eksperimenata. Spektri se obrade na način da se oduzmu *on-resonance* i *off-resonance* spektri te se zatim dobiveni spektri razlike zbroje.

Nadalje, snimljeni su i eksperimenti STD s ribosomom pohranjenim u fosfatnom puferu (ribosom B). Korištena je pulsna sekvenca bez supresije signala otapala. Ukupno je snimljeno trinaest eksperimenata (*on-resonance* 8 ppm i *off-resonance* 50 ppm). Dobiveni spektri razlike na kraju se zbroje.

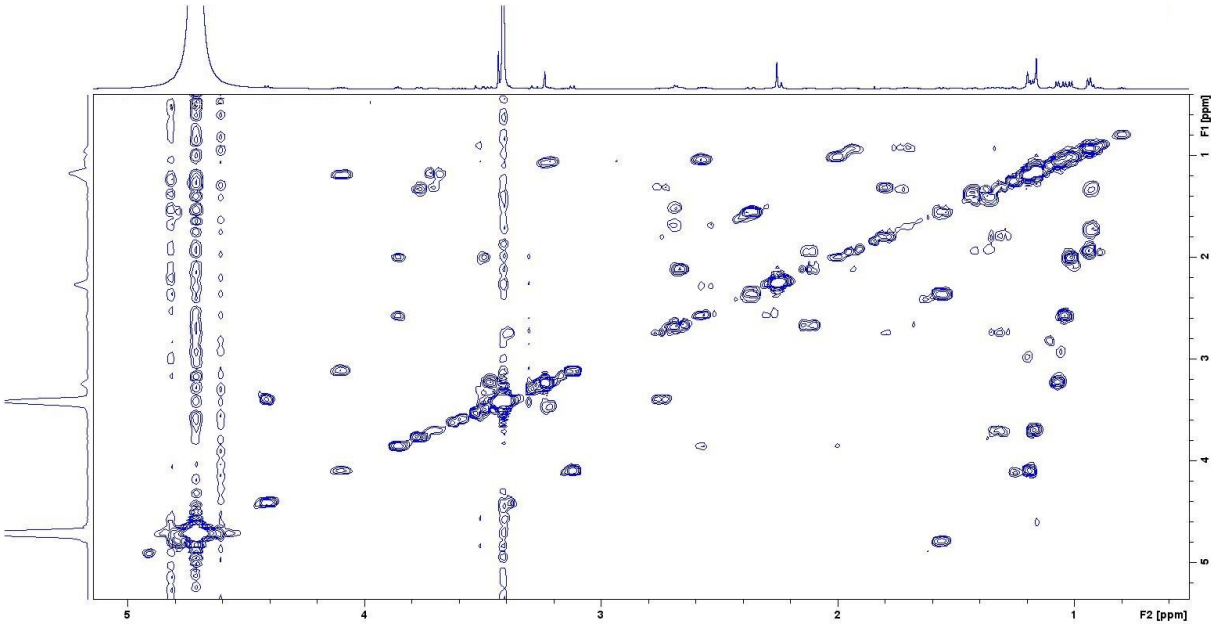
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Karakterizacija prekursora 9a-aminopropil derivata azitromicina

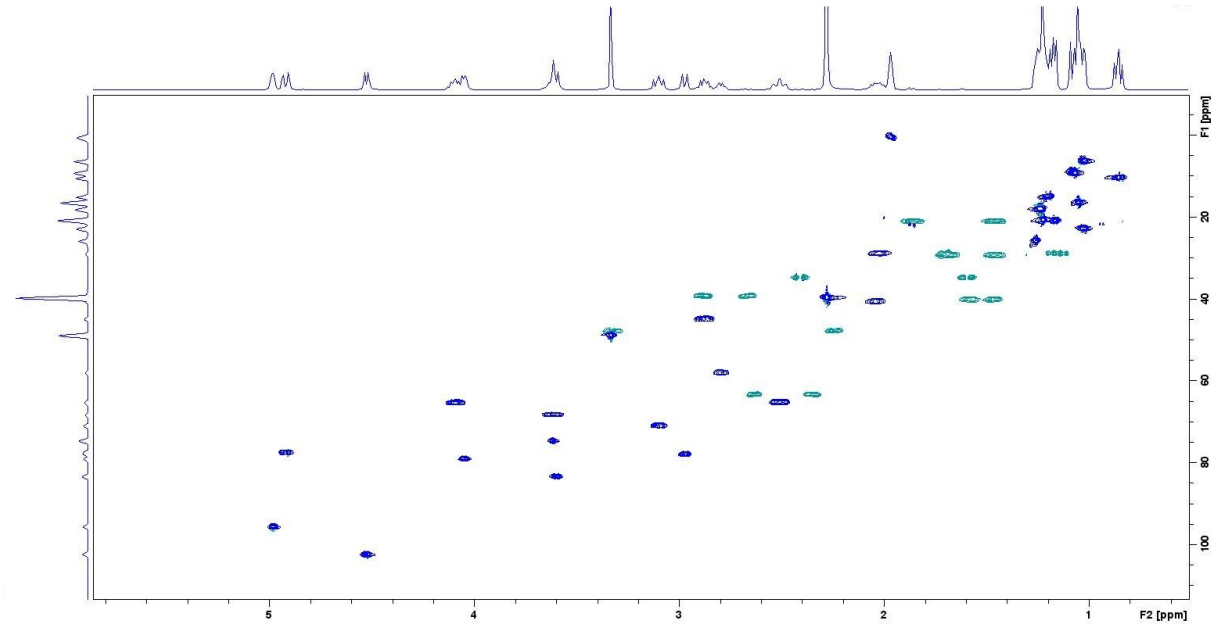
Struktura prekursora makrozona, 9a-aminopropil derivata azitromicina (slika 16), okarakterizirana je pomoću jedno- i dvodimenzijskih tehnika NMR (^{1}H, COSY, HSQC, HMBC). Na slikama 17 i 18 prikazani su spektri COSY i HSQC, a preostali spektri se nalaze u dodatku. Analizom snimljenih spektara provedena je potpuna asignacija ugljikovih i vodikovih atoma u tris-d_{11} puferu i acetonitrilu-d_3 (tablice 7 i 8).



Slika 16. Struktura prekursora makrozona, 9a-aminopropil derivata azitromicina s označenim lokantima



Slika 17. Spektar COSY 9a-aminopropil derivata azitromicina u tris-d_{11} puferu pri 298 K



Slika 18. Editirani spektar HSQC 9a-aminopropil derivata azitromicina u acetonitrilu-d_3 pri 298 K

Tablica 7. Asignacija kemijskih pomaka ^{1}H i ^{13}C NMR 9a-aminopropil derivata azitromicina u tris-d_{11} puferu.

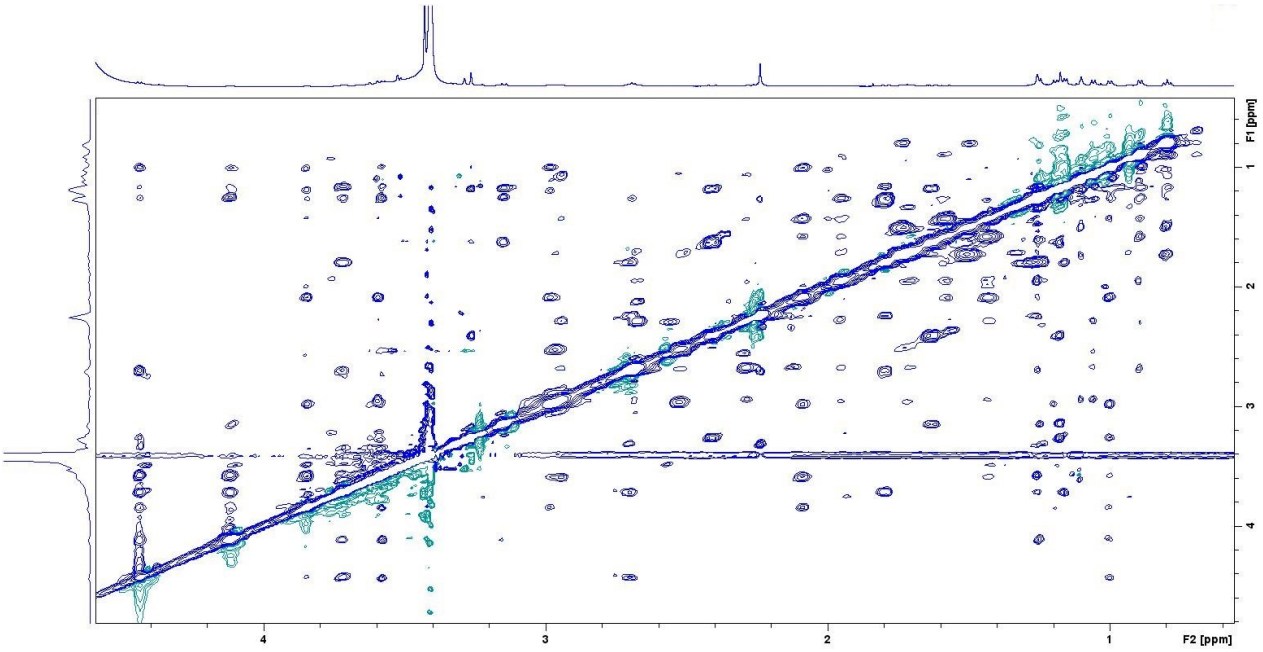
9a-aminopropil derivat azitromicina					
Atom	**$\delta(^{1}H)$ / ppm**	**$\delta(^{13}C)$ / ppm**	**Atom**	**$\delta(^{1}H)$ / ppm**	**$\delta(^{13}C)$ / ppm**
1	**-**	179,09	**12Me**	1,10	12,68
2	2,98	44,41	**12OH**	–	-
2Me	1,19	14,80	**13**	4,88	-
3	3,85	83,20	**14eq ; 14 ax**	1,73;1,49	23,70
4	2,10	38,20	**14Me**	0,80	10,30
4Me	1,00	9,76	**1'**	4,43	102,70
5	3,50	85,78	**2'**	3,34	70,90
6	**-**	76,40	**2'OH**	–	-
6Me	1,19	22,03	**3'**	2,68	63,30
6OH	–	-	**3'NMe_2**	2,23	39,60
7eq ; 7ax	1,43; 1,58	43,14	**4'eq; 4'ax**	1,80; 1,26	31,29
8	1,93	26,00	**5'**	3,69	69,80
8Me	0,89	21,50	**5'Me**	1,16	20,40
9eq ; 9ax	2,65; 2,12	58,70	**1''**	4,92	97,90
9a	2,55;2,28	46,30	**2''eq; 2''ax**	2,41; 1,56	34,90
9b	1,49;1,67	28,50	**3''**	-	73,5
9c	2,68	38,44	**3''Me**	1,19	17,46
9d	–	-	**3''OMe**	3,25	48,80
10	2,93	57,2	**4''**	3,15	77,30
10Me	1,07	9,05	**4''OH**	–	-
11	3,59	74,80	**5''**	4,12	65,03
11OH	–	-	**5''Me**	1,25	17,70
12	**-**	74,30			

Tablica 8. Asignacija kemijskih pomaka ^{1}H i ^{13}C NMR 9a-aminopropil derivata azitromicina u acetonitrilu-d_3

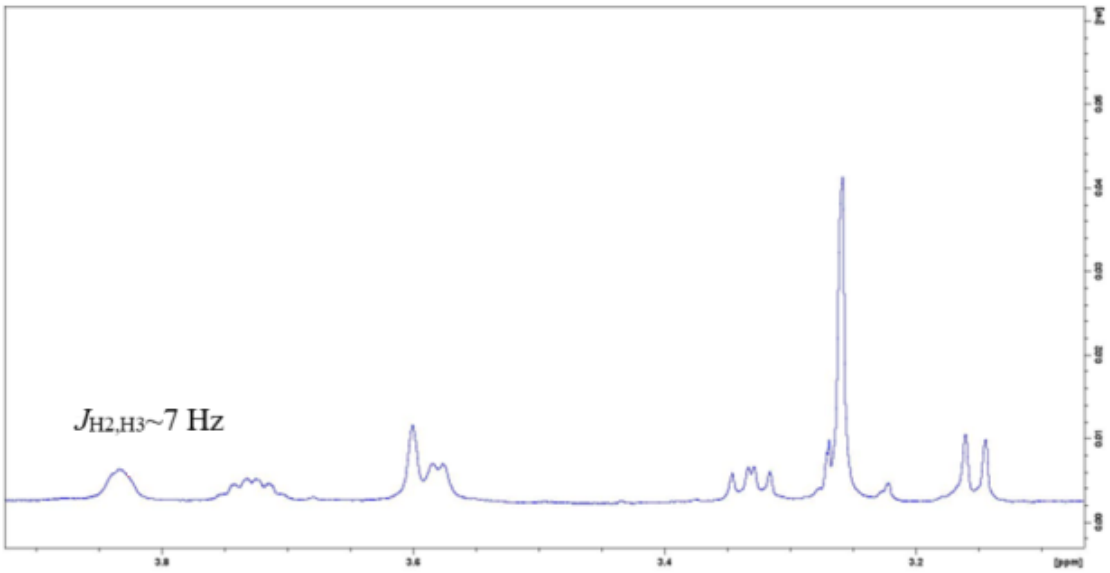
9a-aminopropil derivat azitromicina					
Atom	**$\delta(^{1}H)$ / ppm**	**$\delta(^{13}C)$ / ppm**	**Atom**	**$\delta(^{1}H)$ / ppm**	**$\delta(^{13}C)$ / ppm**
1	**-**	177,20	**12Me**	1,05	16,36
2	2,87	44,84	**12OH**	–	
2Me	1,20	15,01	**13**	4,92	77,53
3	4,05	79,10	**14eq ; 14 ax**	1,86; 1,49	21,06
4	2,03	40,55	**14Me**	0,85	10,36
4Me	1,08	9,21	**1'**	4,53	102,48
5	3,59	83,43	**2'**	3,08	70,98
6	**-**	74,10	**2'OH**	–	-
6Me	1,26	25,71	**3'**	2,51	65,19
6OH	–	-	**3'NMe_2**	2,28	39,73
7eq ; 7ax	1,48 ; 1,57	40,17	**4'eq; 4'ax**	1,72; 1,17	28,94
8	2,03	28,99	**5'**	3,62	68,31
8Me	1,02	22,76	**5'Me**	1,16	20,92
9eq ; 9ax	2,63; 2,35	63,43	**1''**	4,98	95,75
9a	2,25 ; 3,32	47,87	**2''eq; 2''ax**	2,41; 1,61	34,79
9b	1,46; 1,69	29,17	**3''**	-	72,82
9c	2,67; 2,88	39,29	**3''Me**	1,22	20,63
9d	–	-	**3''OMe**	3,33	48,78
10	2,79	58,02	**4''**	2,97	77,95
10Me	1,02	6,29	**4''OH**	–	-
11	3,61	74,69	**5''**	4,09	65,37
11OH	–	-	**5''Me**	1,24	18,07
12	**-**	74,56			

4.2. Konformacija 9a-aminopropil derivata azitromicina u slobodnom i vezanom stanju

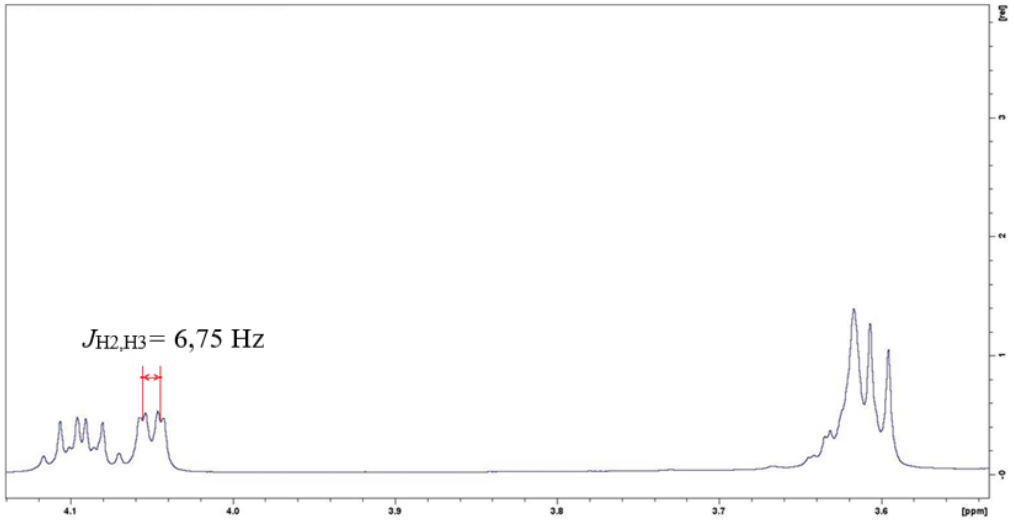
Pomoću tehnike NOESY procijenjena je konformacija prekursora u slobodnom stanju. Usporedbom snimljenog spektra NOESY (slika19) s literaturnim podacima utvrđeno je da prekursor zauzima konformaciju 3-endo-*folded-out* u tris-d_{11} puferu i acetonitrilu-d_3 (slika 22). To je utvrđeno na temelju vrijednosti izmjerene za konstantu sprege $J_{H2,H3}$ u iznosu od ~7 Hz u tris-d_{11} puferu te 6,75 Hz u acetonitrilu-d_3 (slike 20 i 21). Vrijednosti konstante sprege potvrđuju da prekursor 9a-aminopropil derivat azitromicina u slobodnom stanju zauzima konformaciju *3-endo-folded-out*. Usporedbom podataka dostupnih u literaturi za već istražene makrolide, uočene su određene razlike i sličnosti u konformacijama koje zauzimaju u slobodnom stanju. Konformaciju *folded-out* u slobodnom stanju također zauzima jedan od derivata oleandomicina u otapalima DMSO-d_6, acetonu-d_6 te u $CDCl_3$ dok oleandomicin zauzima pretežno *folded-in* konformaciju u DMSO-d_6, ali u otapalima kao što su aceton-d_6, D_2O i $CDCl_3$ zauzima mješavinu *folded-in* i *folded-out* konformacije.[12] Povećanjem temperature, oleandomicin u DMSO-d_6 otapalu zauzima veći udio *folded-out* konformacije dok derivat oleandomicina zauzima veći udio *folded-in* konformacije. Derivati homoeritromicina bez šećera kladinoze također zauzimaju *folded-out* konformaciju.[2] Za derivate homoeritromicina koji sadrže šećer kladinozu te za azitromicin utvrđeno je da zauzimaju *3-endo-folded-out* konformaciju u slobodnom stanju.[7]



Slika 19. Spektar NOESY 9a-aminopropil derivata azitromicina u tris-d_{11} puferu pri 298 K



Slika 20. Uvećani spektar ^{1}H 9a-aminopropil derivata azitromicina u tris-d_{11} puferu s označenom konstantom sprege $J_{H2,H3}$

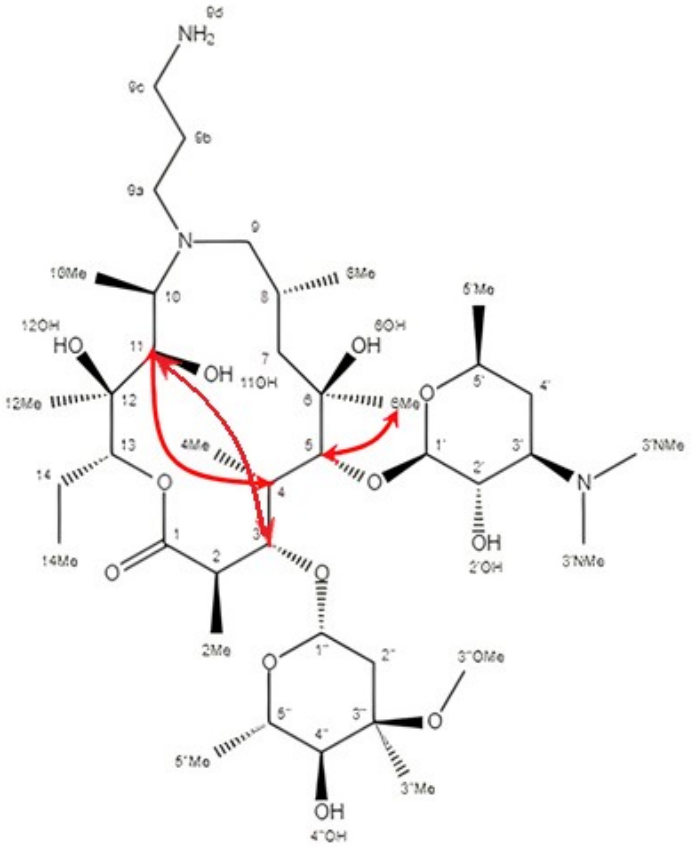


Slika 21. Uvećani spektar ^{1}H 9a-aminopropil derivata azitromicina u acetonitrilu-d_3 s označenom konstantom sprege $J_{H2,H3}$

Tablica 9. Asignacija spektra NOESY NMR snimljenog u tris-puferu-d_{11} pri 298 K. (A-signali jakog intenziteta, B-signali srednjeg intenziteta, C-signali slabog intenziteta)

Atom	**2**	**2 Me**	**3**	**4**	**4 Me**	**5**	**6 Me**	**7 eq; ax**	**8**	**8Me**	**9 eq; ax**	**9a**	**9b**	**9c**	**10**	**10Me**	**11**	**12 Me**	**13**	**14 eq; ax**	**14 Me**	**1'**	**2'**	**3'**	**3' NMe**	**4' eq; ax**	**5'**	**5' Me**	**1''**	**2'' eq; ax**	**3'' Me**	**3'' OMe**	**4''**	**5''**	**5'' Me**
2		A	A	A	A	A																							B						
2Me	A																																		
3	A	A		A	B	A		B									B												A						
4	A		A		A	A		A									A																		
4Me	A		A	A		B																B			C							C			
5			B	A			A															A												B	B
6Me						A																													
7 eq; ax				A	B	A			A	A					B		B																		
8						B	A	A							B											B									
8Me								A	A					C																					
9 eq; ax									A		A	A				B																			
9a											A		A	A	A	A																			
9b																		A																	
9c																																			
10						A		B	B			A		B		A	A																		
10Me											B	B			B																				
11															A			A																	
12Me																																			
13																																			
14 eq; ax																					A														
14Me																				A															
1'			A	C	B		B																A	A	B	B	A	A					A	A
2'																																			

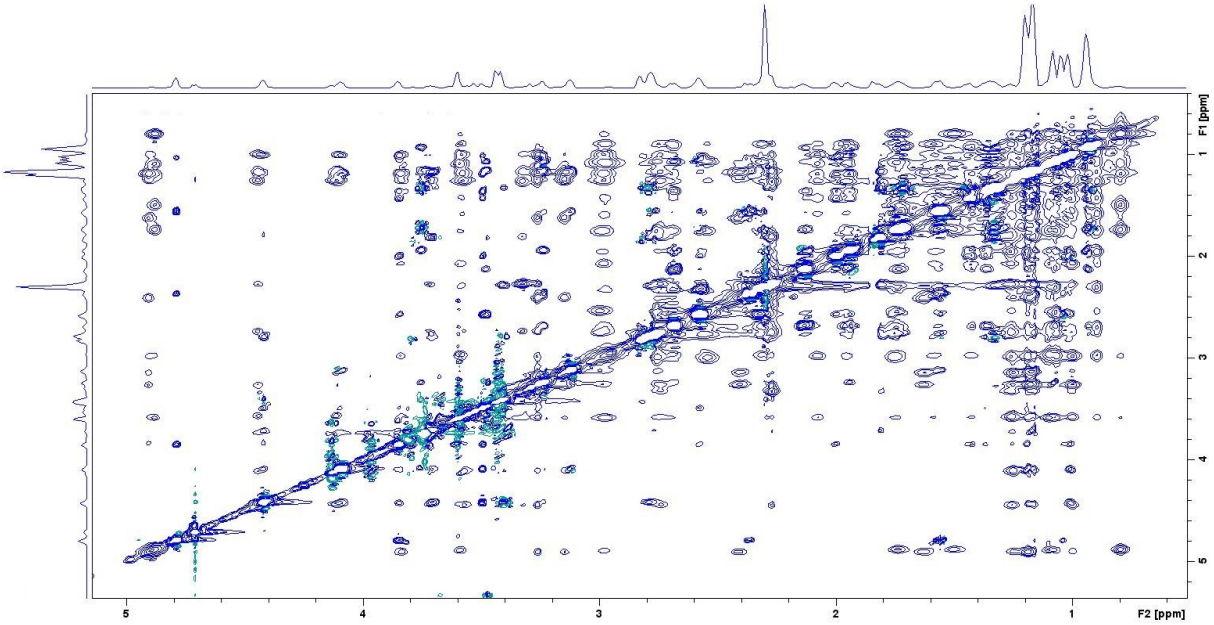
Atom	2	2 Me	3	4	4 Me	5	6 Me	7 eq; ax	8	8Me	9 eq; ax	9a	9b	9c	10	10Me	11	12 Me	13	14 eq; ax	14 Me	1'	2'	3'	3' NMe	4' eq; ax	5'	5' Me	1''	2'' eq; ax	3'' Me	3'' OMe	4''	5''	5'' Me
3'																						A	A				A								
3' NMe_2																							A	A											
4'eq; ax																							B		A	A	A								
5'																						A			B			A						A	A
5' Me																											B								
1''																																			
2'' eq; ax																													A		A	A	A		
3'' Me																														A		A	A		
3'' OMe					C																									B					
4''																														C	B			C	A
5''			A		B		A																								A	B	A		A
5'' Me																											B	B					B	A	



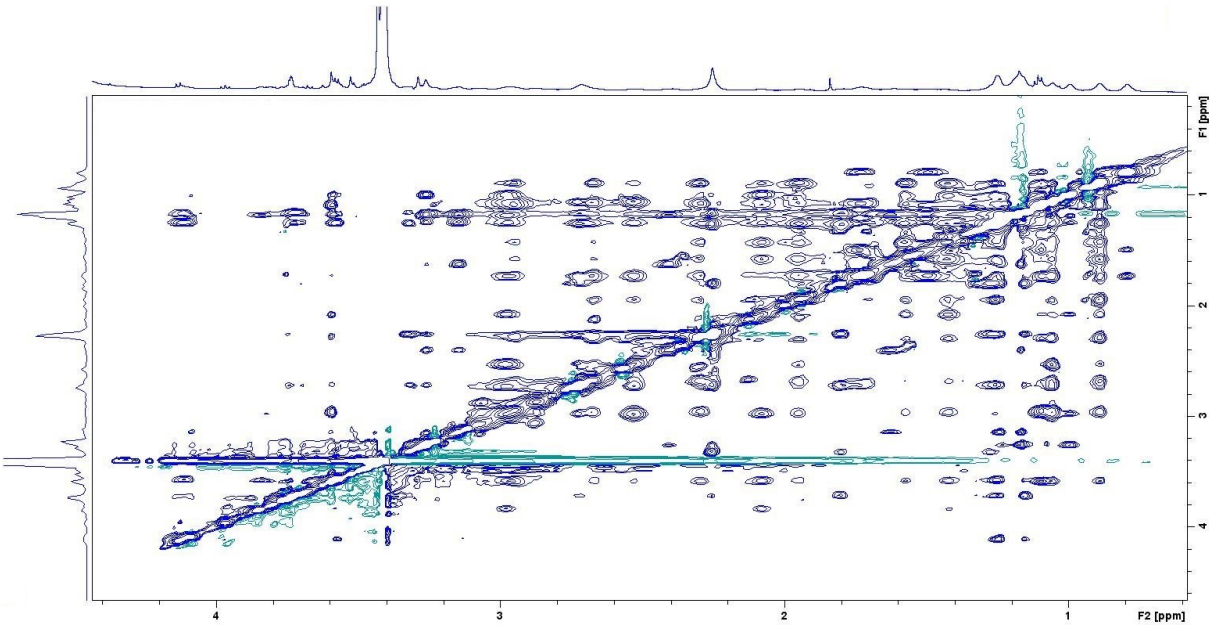
Slika 22. Struktura 9a-aminopropil derivata azitromicina s označenim ključnim kontaktima NOE za konformaciju 3-endo-*folded-out* u slobodnom stanju

Za određivanje konformacije prekursora u vezanom stanju korištena je tehnika trNOESY. Za snimanje spektra trNOESY korišten je deuterirani ribosom u tris-d_{11} puferu (A) i deuterirani ribosom u fosfatnom puferu (B). Budući da su signali otapala u kojima se čuva ribosom A ometali asignaciju spektra, bilo je potrebno suprimirati te signale. U tu svrhu je korišten poseban pulsni slijed za supresiju signala tris-pufera u kojem se čuva ribosom A. Usporedbom snimljenih spektara trNOESY (slike 23 i 24) s literaturnim podacima utvrđeno je da prekursor u vezanom stanju zauzima konformaciju 3-endo-*folded-out*. Konstantu sprege $J_{H2,H3}$ nije bilo moguće odrediti iz spektra ^{1}H snimljenog nakon dodatka ribosoma budući da dolazi do

značajnog širenja signala što ukazuje na vezanje prekursora za ribosom. Dakle, utvrđeno je da prekursor 9a-aminopropil derivat azitromicina zauzima konformaciju 3-endo-*folded-out* i u slobodnom i u vezanom stanju što je i u skladu s literaturnim podacima u kojima je pokazano da makrolidi u slobodnom i u vezanom stanju zauzimaju slične konformacije.[6]



Slika 23. Spektar trNOESY 9a-aminopropil derivata azitromicina u tris-d_{11} puferu nakon dodatka ribosoma A izoliranog iz bakterije *E. Coli* pri 298 K

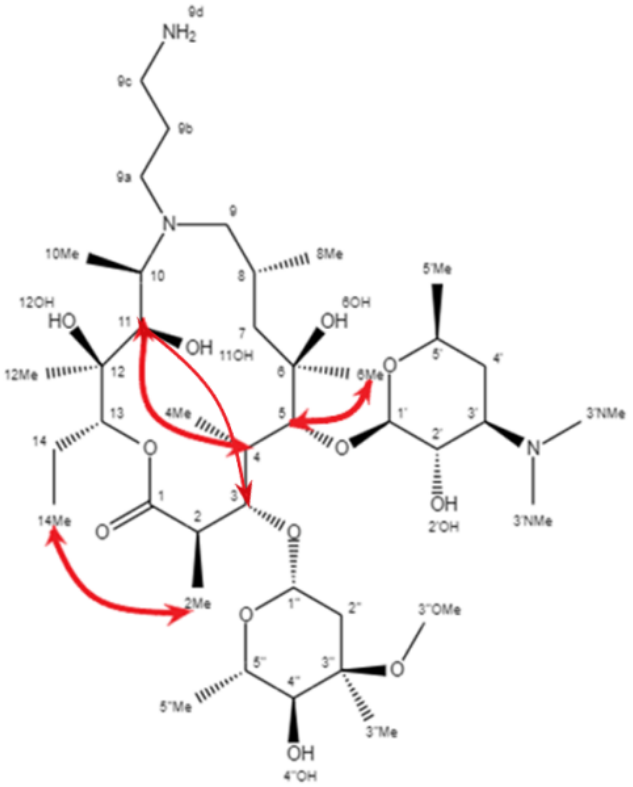


Slika 24. Spektar trNOESY 9a-aminopropil derivata azitromicina u tris-d_{11} puferu nakon dodatka ribosoma B izoliranog iz bakterije *E. Coli* pri 298 K

Tablica 10. Asignacija spektra trNOESY NMR snimljenog u tris-pufer-d_{11} s ribosomom B pri 298 K. (A-signali jakog intenziteta, B-signali srednjeg intenziteta, C-signali slabog intenziteta)

Atom	**2**	**2 Me**	**3**	**4**	**4 Me**	**6 Me**	**7 eq; ax**	**8**	**8Me**	**9 eq; ax**	**9a**	**9b**	**9c**	**10**	**10Me**	**11**	**12 Me**	**14 eq; ax**	**14 Me**	**2'**	**3'**	**3' NMe**	**4' eq; ax**	**5'**	**5' Me**	**2'' eq; ax**	**3'' Me**	**3'' OMe**	**4''**	**5''**
2		A	A	A	A													A												
2Me																														
3	B	A				A										B														
4	A	B	A		A		A		B							A	A													
4Me	B			B				C											C											
5						B																								
6Me																														
7 eq; ax			C	A	B			A	A	B	A			B		B														
8							A		A	A	A			A	A	B														
8Me				A			A	A		A	B	B		A	A	A														
9 eq; ax							A		A			B		A	A	B														
9a							B	A	B			A	A	B	A	B														
9b											C			B																
9c																														
10							A	A	A		A	A	A		A	A														
10Me				B				B			A		A	A																
11				A	B		C				B			A			A												C	
12Me				B								B		B		A			B											
13																														
14 eq; ax	B																		A											
14Me																		A												
1'																														
2'																						A	C		B					

Atom	2	2 Me	3	4	4 Me	6 Me	7 eq; ax	8	8Me	9 eq; ax	9a	9b	9c	10	10Me	11	12 Me	14 eq; ax	14 Me	2'	3'	3' NMe	4' eq; ax	5'	5' Me	2'' eq; ax	3'' Me	3'' OMe	4''	5''
3'																						A	B	B		B				
3' NMe_2																				A	A		A	B	B					
4'eq; 4' ax																				B	A	A		B	A					
5'																					B		C		A					B
5' Me																					B	B	A	A						
1''																														
2'' eq; ax																										A		A	A	
3'' Me																										B		A	B	
3'' OMe				A																	B	B				A	A			
4''																					B					B	A			
5''																					C	C					A		B	
5'' Me																					A			A					A	A



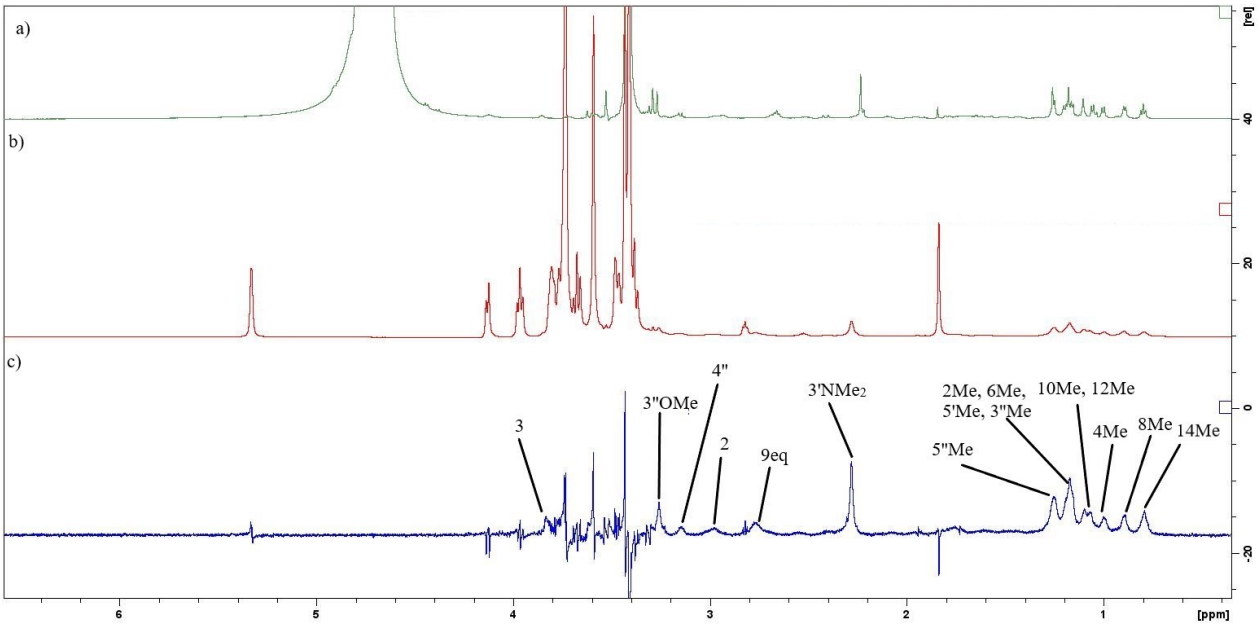
Slika 25. Struktura 9a-aminopropil derivata azitromicina s označenim ključnim kontaktima NOE za konformaciju 3-endo-*folded-out* u vezanom stanju

4.3. Određivanje epitopa vezanja 9a-aminopropil derivata azitromicina u interakciji s ribosomom bakterije *Escherichia coli*

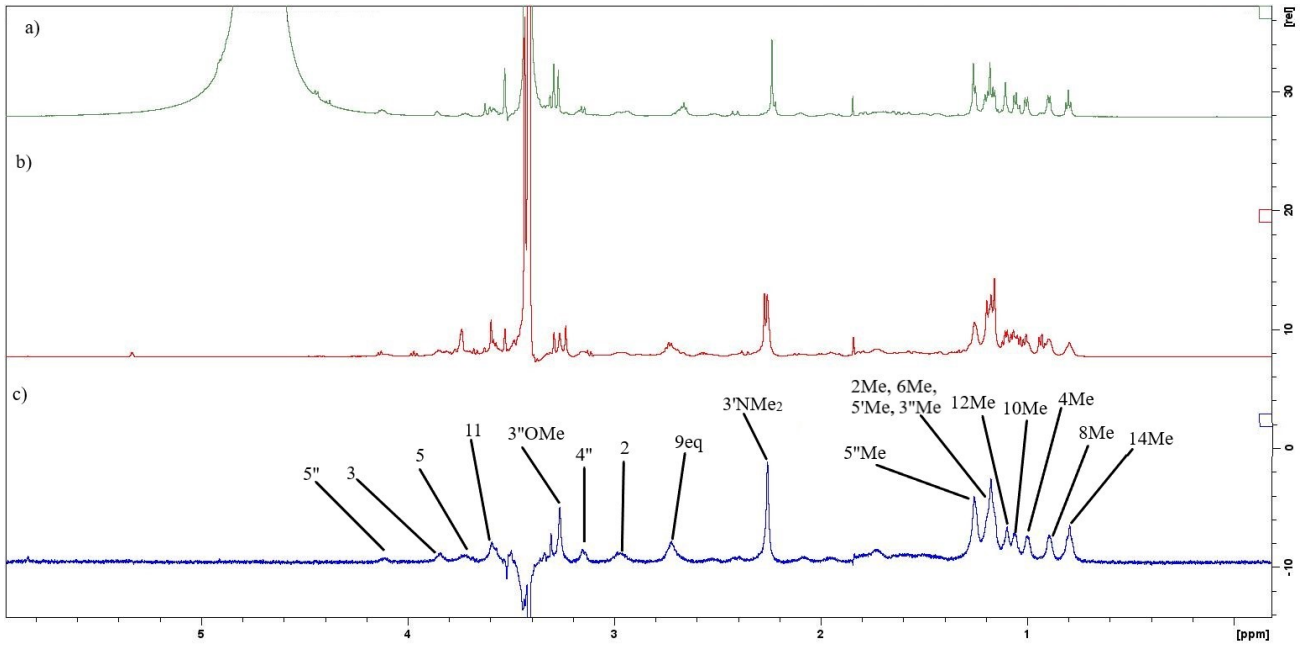
Epitopi vezanja 9a-aminopropil derivata azitromicina određeni su pomoću tehnike STD. U eksperimentalnom dijelu rada navedeni su uvjeti eksperimenata koji su provedeni s različitim pulsnim slijedovima te različitim frekvencijama za snimanje referentnog spektra i spektra zasićenja. Najbolji rezultati dobiveni su korištenjem frekvencija *on-resonance* od 8 ppm i *off-resonance* od 50 ppm. Za snimanje eksperimenata koristili su se deuterirani ribosomi pohranjeni u dva različita deuterirana otapala, to jest ribosom A u tris-puferu i ribosom B u fosfatnom puferu. Budući da su asignaciju spektra ometali signali otapala u kojem je čuvan ribosom A, za taj eksperiment korištena je pulsna sekvenca sa supresijom signala otapala (slika 26).

Obradom snimljenih spektara, sveukupno su dobiveni spektri razlike, to jest spektri STD i referentni spektri. Usporedbom spektra razlike (slika 26c) i spektra ^{1}H (slika 26a) prekursora 9a-aminopropil derivata azitromicina, određeni su epitopi vezanja. Isti postupak je ponovljen i

za određivanje epitopa vezanja s ribosomom B (slika 27). Na slikama 26 i 27 nalaze se asignirani spektri razlike, to jest označeni su signali atoma koji su u bliskom kontaktu s bakterijskim ribosomom. U spektru razlike najveći intezitet imaju atomi najbliži receptoru, to jest ribosomu izoliranom iz bakterije *Escherichia coli*. Na spektru razlike prikazanom na slici 27 bolje su vidljivi signali atoma pri kemijskim pomacima od 3,2 ppm do 4,2 ppm budući da ih signali otapala ne prekrivaju. Za snimanje navedenog spektra korišten je ribosom B izoliran iz bakterije *Escherichia coli* koji je pohranjen u fosfatnom otapalu.



Slika 26. Spektri 9a-aminopropil derivata azitromicina a) ^{1}H NMR prije dodatka ribosoma A, b) spektar *off-resonance* nakon dodatka ribosoma u tris-puferu (50 ppm) i c) spektar razlike, (STD) u tris-d_{11} puferu pri 298 K



Slika 27. Spektri 9a-aminopropil derivata azitromicina a) spektar ^{1}H NMR prije dodatka ribosoma B, b) spektar *off-resonance* nakon dodatka ribosoma u fosfatnom puferu (50 ppm) i c) spektar razlike (STD) u tris-d_{11} puferu pri 298 K

Usporedbom dobivenih spektara STD prekursora 9a-aminopropil derivata azitromicina s već istraženim spojevima azitromicinom, derivatima azitromicina, oleandomicina i njegovih derivata te derivatima homoeritromicina, uočene su određene razlike. Epitopi vezanja 9a-aminopropil derivata azitromicina prikazani su na slikama 26 i 27. Azitromicin i 9a-aminopropil derivat azitromicina imaju pet zajedničkih epitopa vezanja: 14Me, 2Me, 3'NMe_2, 3"OMe te 4".[4] 4-aminopropil derivat azitromicina s prekursorom dijeli također pet zajedničkih epitopa vezanja. Radi se o 14Me, 8Me, 4Me, 3'NMe_2 te 4" atomu.[6] Nadalje, za 15-člane makrolide određena su tri područja u bliskom kontaktu s ribosomom: šećeri kladinoza i desozamin te metilna skupina na položaju 14. Šećer desozamin zajednička je strukturna jedinica makrolida koja je važna u njihovom vezanju za ribosom.[6] Za oleandomicin, 14-člani makrolid, i njegove derivate određene su tri regije koje su u bliskom kontaktu s bakterijskim ribosmom. Radi se o šećeru desozaminu te regijama C3-C6 i C10-C14 na laktonskom prstenu.[12] Dakle zajednički kontakt olenadomicina i njegovih derivata s prekursorom 9a-aminopropil derivatom azitromicina je 3'NMe_2 skupina. Nadalje, derivati homoeritromicina te prekursor 9a-

aminopropil derivat azitromicina dijele četiri zajednička epitopa vezanja: 2Me, 8Me, 3'NMe_2 te 3''OMe.

§ 5. ZAKLJUČAK

U sklopu ovog diplomskog rada uspješno je okarakterizirana struktura prekursora makrozona, 9a-aminopropil derivata azitromicina pomoću jedno- i dvodimenzijskih tehnika spektroskopije NMR. Nadalje, određene su i konformacije prekursora u slobodnom i u vezanom stanju te epitopi vezanja za bakterijski ribosom.

Konformacija prekursora u slobodnom stanju određena je pomoću tehnike NOESY u organskom i vodenom otapalu. Pomoću literaturnih podataka zaključeno je da prekursor u slobodnom stanju zauzima tzv. konformaciju *3-endo-folded-out* u vodenom i organskom otapalu. Konformacija u vezanom stanju procijenjena je pomoću tehnike trNOESY. Analiza križnih signala NOE upućuje na konformaciju *3-endo-folded-out* kao dominantnu konformaciju i u vezanom stanju.

Pomoću eksperimenata STD utvrđeno je da se 9a-aminopropil derivat azitromicina veže za ribosom *E. coli*. Analizom spektara STD određeni su epitopi vezanja. Nadalje, utvrđene su skupine atoma koje su u bliskom kontaktu s ribosomom i uspoređene s onima određenim za azitromicin, oleandomicin te neke derivate homoeritromicina. One uključuju skupine 3'NMe_2 na šećeru desozaminu, metilnu skupinu na položaju 14, 3"OMe, 2Me te 8Me kao ključne za vezanje.

Rezultati dobiveni obradom eksperimenata koji su provedeni u sklopu ovog diplomskog rada, koristit će u daljnjem razvoju i istraživanju derivata azitromicina u svrhu razvoja novih generacija makrozona, konjugata tiosemikarbazona i azitromicina.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (prema potrebi)

ADMET – Apsorpcija, Distribucija, Metabolizam, Izlučivanje, Toksičnost

BSA – goveđi serumski albumin

COSY – korelacijska spektroskopija

cryo-ET – kriogena elektronska tomografija

DEPT – engl. distortionless enhancement by polarisation transfer

DMSO – dimetil-sulfoksid

DOSY – engl. diffusion-ordered NMR spectroscopy

DPC – dodecilfosfokolin

FDA – Američka Agencija za hranu i lijekove

HMBC – engl. heteronuclear multiple bond correlation

HSQC – engl. heteronuclear single quantum coherence

MLS – makrolidi, linkozamidi, streptogramin

NMR – nuklearna magnetna rezonancija

NOE – nuklearni Overhauserov efekt

NOESY – engl. nuclear Overhauser effect spectroscopy

PRE – engl. paramagnetic relaxation enhancements

RNA – ribonukleinska kiselina

rRNA – ribosomska ribonukleinska kiselina

SDS – natrijev dodecilsulfat

SPA – engl. single-particle analysis

STD – engl. saturation transfer difference

trNOESY – engl. transferred nuclear Overhauser effect spectroscopy

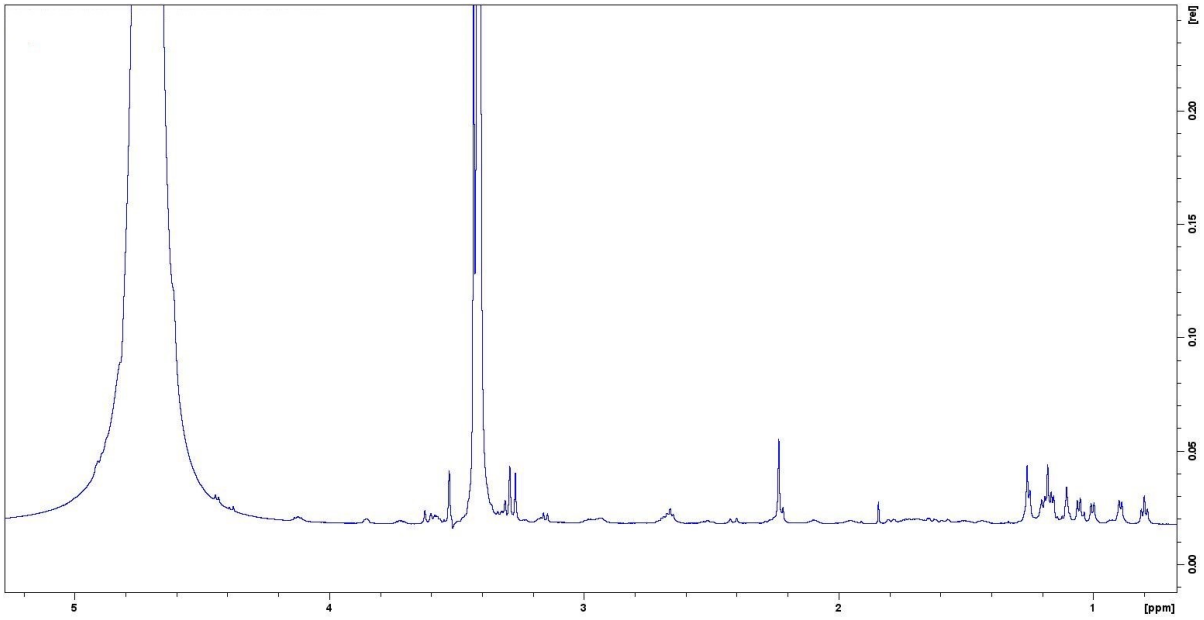
tRNA – engl. transfer ribonukleinska kiselina

§ 7. LITERATURNI IZVORI

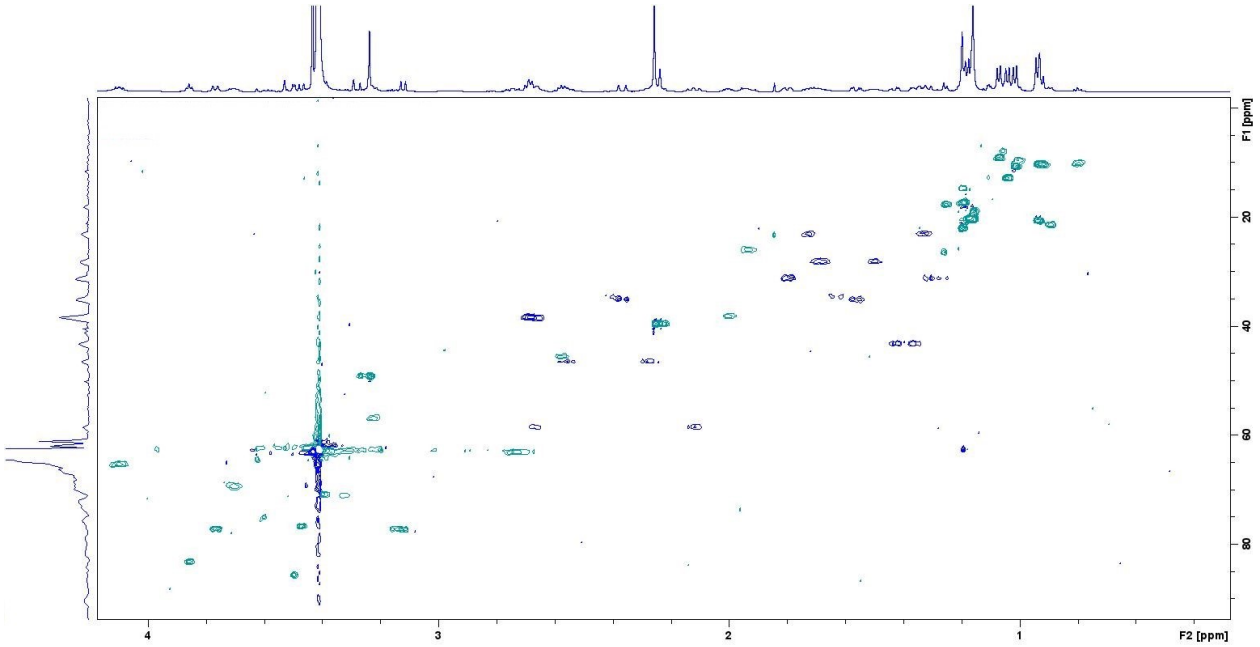
1. T. Sugimoto, T. Tanikawa, K. Suzuki, Y. Yamasaki, *Bioorg. Med. Chem*. **20** (2012) 5787–5801.
2. P. Novak, J. Barber, A. Čikoš, B. Arsic, J. Plavec, G. Lazarevski, P. Tepeš, N. Košutić Hulita, *Bioorg. Med. Chem*. **17** (2009) 5857–5867.
3. I. Grgičević, I. Mikulandra, M. Bukvić, M. Banjanac, V. Radovanović, I. Habinovec, B. Bertoša, P. Novak, *Int. J. Antimicrob. Agents*. **56** (2020) 106147.
4. B. Arsić, J. Barber, P. Novak, *Macrolides: Properties, Synthesis and Applications*, De Gruyter, Berlin, 2018.
5. M. Bukvić Krajačić, P. Novak, M. Dumić, M. Cindrić, H. Čipčić Paljetak, N. Kujundžić, Eur. *J. Med. Chem*. **44** (2009) 3459–3470.
6. T. Jednačak, I. Mikulandra, P. Novak, *Int. J. Mol. Sci.* **21** (2020) 1–26.
7. A. Janas, P. Przybylski, *Eur. J. Med. Chem*. **182** (2019) 1–73.
8. L. Katz, A.S. Mankin T. Schmidt (ur.), *Encyclopedia of Microbiology*, Academic Press, Massachusetts, 2009 str. 529–558.
9. P. Fernandes, D. Pereira, P. B. Watkins, D. Bertrand, *J. Med. Chem.***63** (2019) 6462–6473.
10. I. B. Seiple, Z. Zhang, P. Jakubec, A. Langlois-Mercier, P. M. Wright, D. T. Hoh, K. Yabu, S. Rao Allu, T. Fukuzaki, P. N. Carlsen, Y. Kitamur, X. Zhou, M. L. condakes, F. T. Szczypinski, W. D. Green, A. G. Myers, *Nature* **533** (2016) 338.
11. Y. Kohno S. Omura (ur.), *Macrolide Antibiotics*, Academic press, Massachusetts, 2002, str. 327–361.
12. P. Novak, I. Tatić, P. Tepeš, S. Koštrun, J. Barber, *J. Phys. Chem. A* **110** (2006) 572–579.
13. P. Novak, Z. Banić Tomišić, P. Tepeš, G. Lazarevski, J. Plavec, G. Turkalj, *Org. Biomol. Chem*. **39** (2005) 3.
14. C. Lee Ventola, *Pharm. & Their*. **40** (2015) 4.
15. C. Fyfe, T. H. Grossman, K. Kerstein, J. Sutcliffe, *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* **10** (2016).
16. M. R. Schroeder, D. S. Stephens, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **6** (2016) 98.
17. G. Fanali, A. di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, *Mol. Aspects Med.* **33** (2012) 209–290.

18. P. Novak, P. Tepeš, V. Lazić, *Croat. Chem. Acta* **80** (2007) 211–216.
19. H. Strahl, J. Errington, *Annu. Rev. Microbiol.* **71** (2017) 519–538.
20. S. Kosol, E. Schrank, M. Bukvić, G. E. Wagner, N. H. Meyer, C. Göbl, K. Zangger, P. Novak, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 5632–5636.
21. S. Glanzer, S. A. Pulido, S. Tutz, G. E. Wagner, M. Kriechbaum, N. Gubensäk, J. Trifunović, M. Dorn, W. M. F. Fabian, P. Novak, J. Reidl, K. Zangger, *Chem. Eur. J.* **21** (2015) 4350–4358.
22. P. Novak, T. Jednačak, Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama, TIVA Tiskara Varaždin, Varaždin, 2013, str. 5–57.
23. P. Novak, T. Jednačak, u Z. Mandić (ur.), *Physico-chemical methods in drug discovery*, IACP, Zagreb, 2011, str. 191–220.
24. A. Walpole, S. Monaco, R. Nepravishta, J. Angulo, *Methods in Enzymology*, Elsevier B.V., 2019, str. 423–451.
25. T. Haselhorst , A.C. Lamerz , M. von Itzstein*, Methods in Molecular Biology, Glycomics: Methods and Protocols*, Humana Press, 2008. str. 375–396.
26. Y. Shi*, Cell*, **159** (2014) 995–1014.
27. J. Hentschel, C. Burnside, I. Mignot, M. Leibundgut, D. Boehringer, N. Ban, *Cell*, **20** (2017) 149–160.

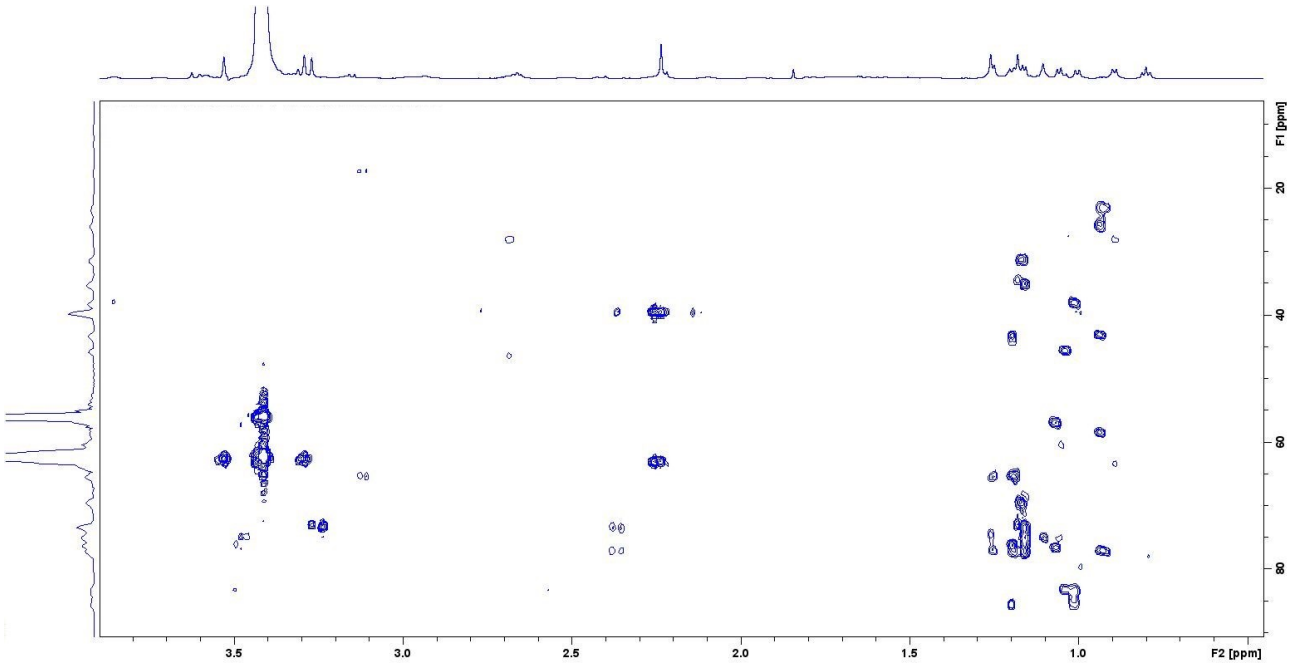
§ 8. DODATAK



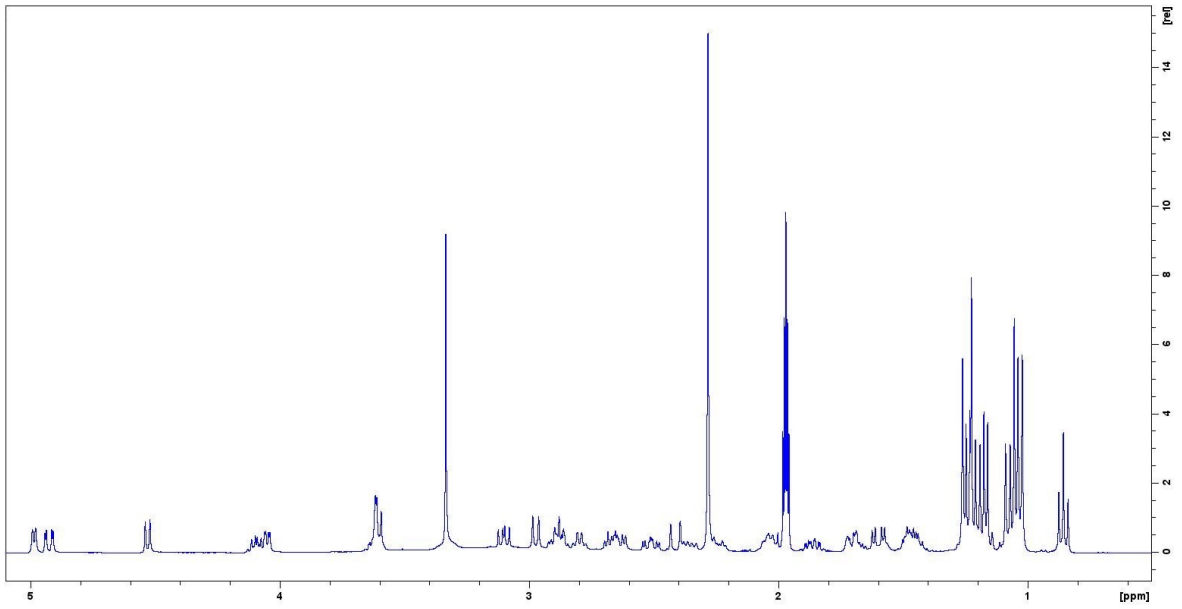
Slika D1. Spektar ^{1}H 9a-aminopropil derivata azitromicina u tris-d_{11} puferu pri 298 K



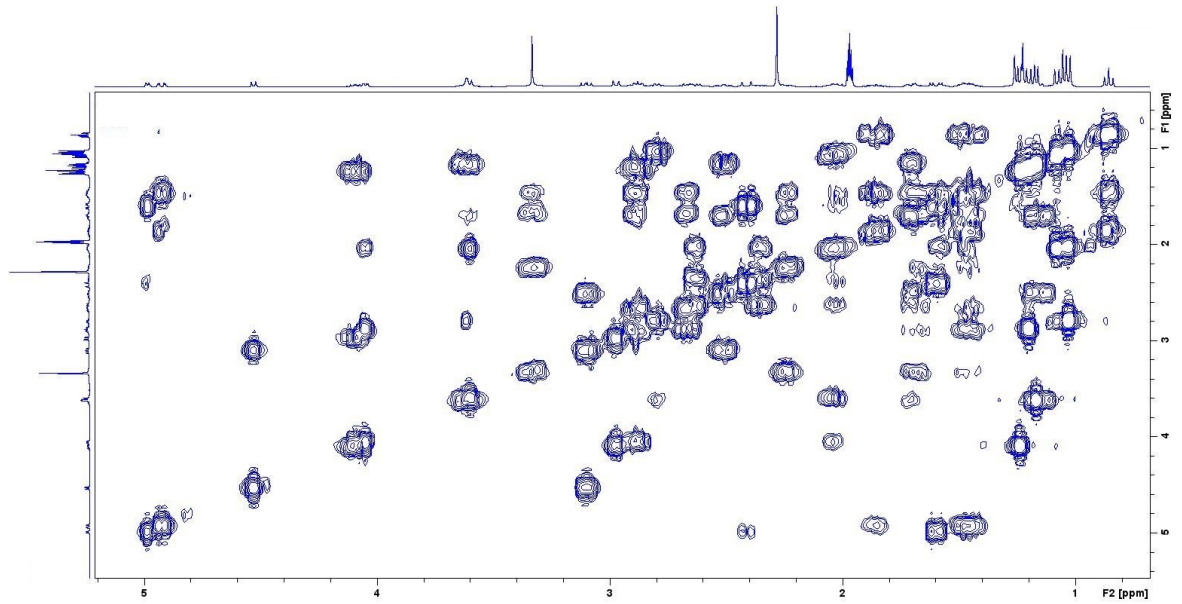
Slika D2. Spektar HSQC 9a-aminopropil derivata azitromicina u tris-d_{11} puferu pri 298 K



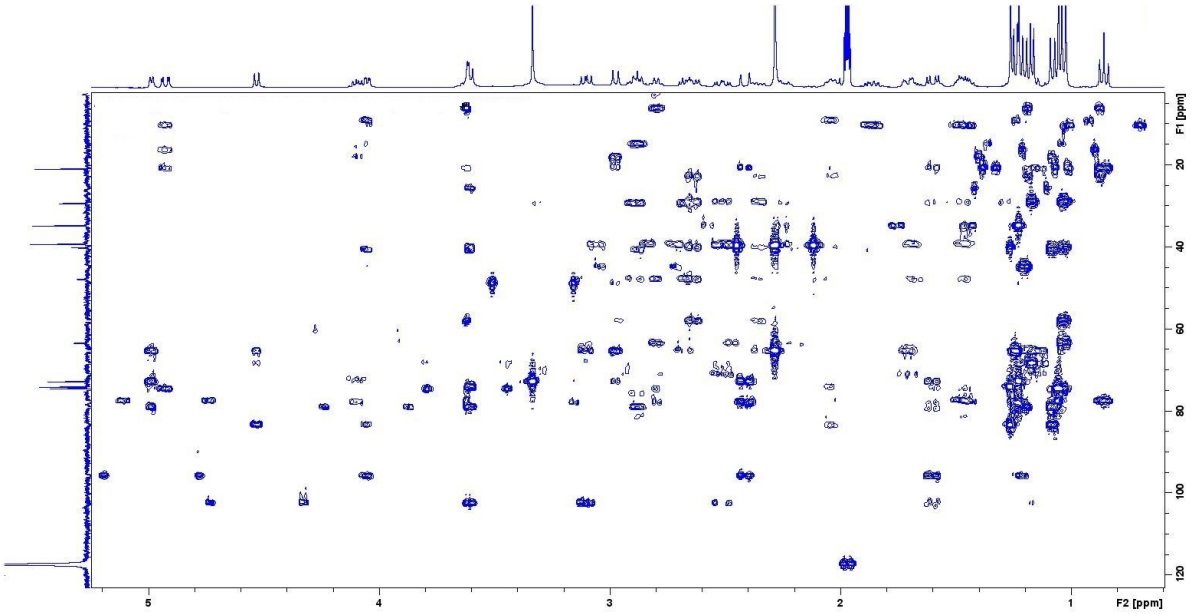
Slika D3. Spektar HMBC 9a-aminopropil derivata azitromicina u tris-d_{11} puferu pri 298 K



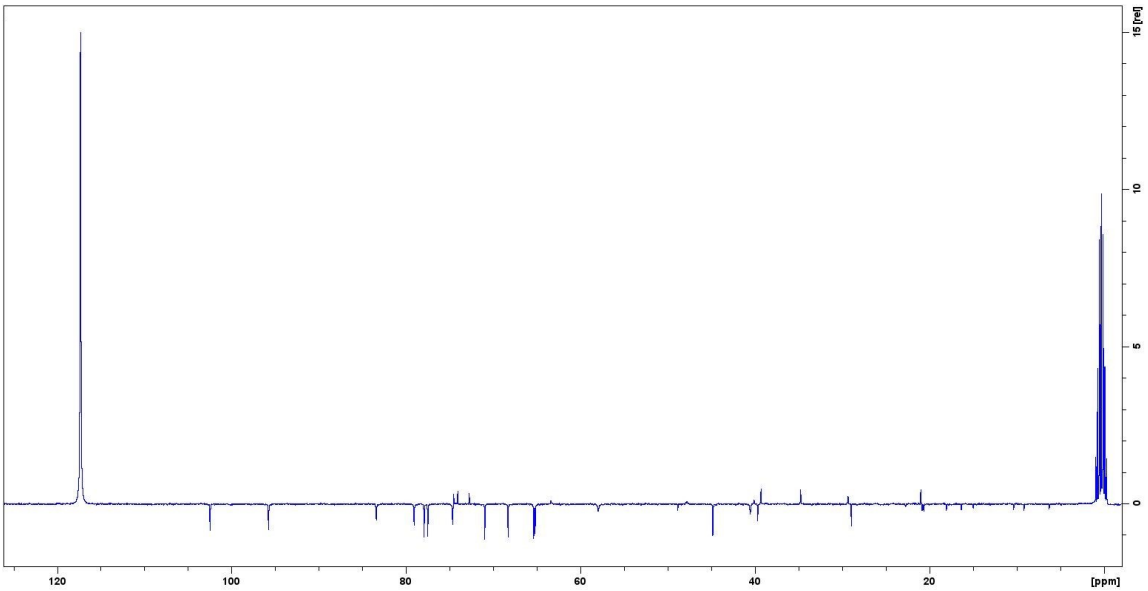
D4. Spektar ^{1}H 9a-aminopropil derivata azitromicina u acetonitrilu-d_3 pri 298 K



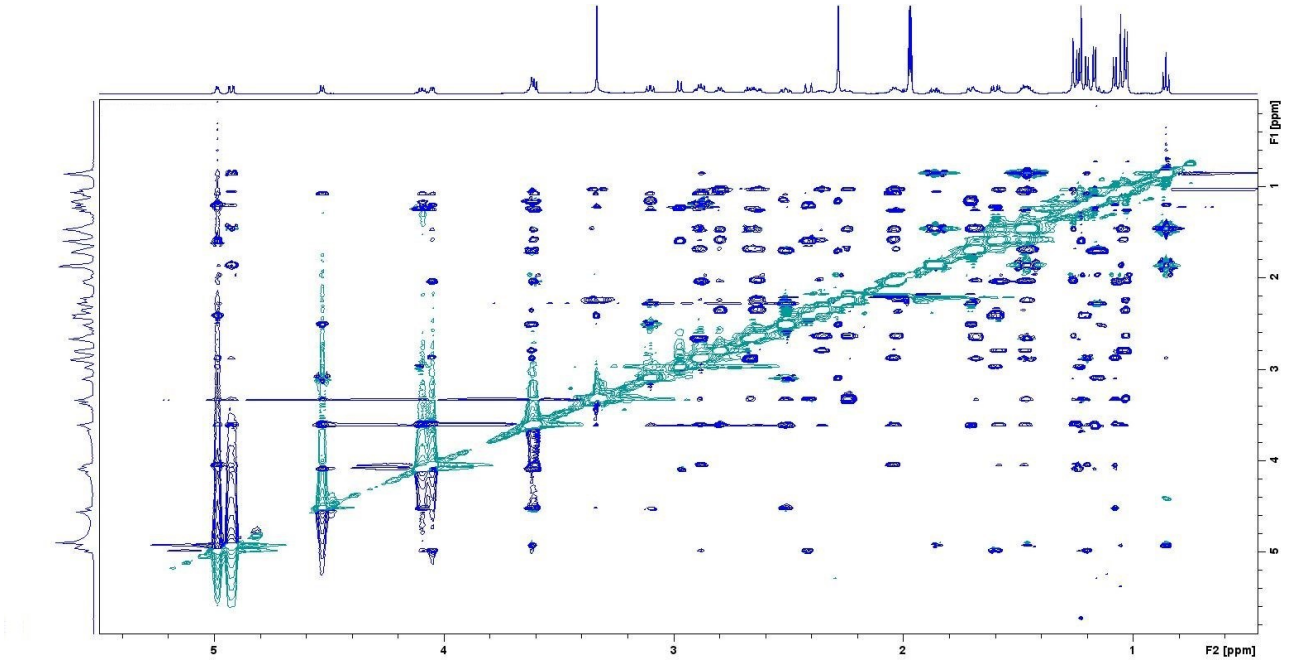
D5. Spektar COSY 9a-aminopropil derivata azitromicina u acetonitrilu-d_3 pri 298 K



D6. Spektar HMBC 9a-aminopropil derivata azitromicina u acetonitrilu-d_3 pri 298 K



D7. Spektar DEPT 9a-aminopropil derivata azitromicina u acetonitrilu-d_3 pri 298 K



Slika D8. Spektar NOESY 9a-aminopropil derivata azitromicina u acetonitrilu-d_3 pri 298 K

Tablica D9. Asignacija spektra NOESY NMR snimljenog u acetonitrilu-d_3 pri 298 K. (A-signali jakog intenziteta, B-signali srednjeg intenziteta, C-signali slabog intenziteta)

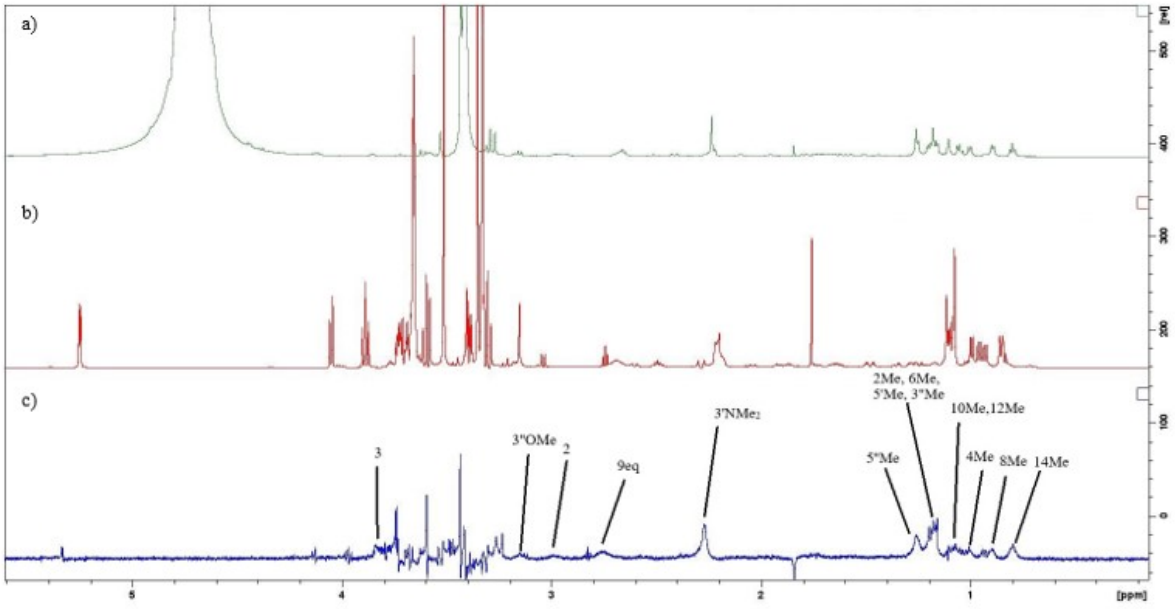
Atom	**2**	**2 Me**	**3**	**4**	**4 Me**	**5**	**6 Me**	**7 eq; ax**	**8**	**8Me**	**9 eq; ax**	**9a**	**9b**	**9c**	**10**	**10Me**	**11**	**12 Me**	**13**	**14 eq; ax**	**14 Me**	**1'**	**2'**	**3'**	**3' NMe**	**4' eq; ax**	**5'**	**5' Me**	**1''**	**2'' eq; ax**	**3'' Me**	**3'' OMe**	**4''**	**5''**	**5'' Me**
2		A	B	A	A																C								B						
2Me	A		B		B																B								A						
3	A	B		A	C	B		C									B												A						
4	A		A		A	A											A															B			
4Me	A	B	C	A		B																B											C		
5			A	A	A		A	B														A											A		
6Me						A				A	B																								
7 eq; ax			C	B		B	B								B																				
8							A	A		A	B	B	B		B																				
8Me							B	A	B						B																				
9 eq; ax									A	A	A	A			A	A	C																		
9a											A	A				A																			
9b									B		C	A	A	B			A																		
9c													A	A			B		C																
10								B	B		A		B			A	B	A																		
10Me											B	B																							
11											B			B	A			A	A																
12Me															A		B		B	B															
13																	A	B		A	A														
14 eq; ax																		C	A		A*														
14Me	B	B																	A	A															
1'					A																			A			A				B		B	

Atom	2	2 Me	3	4	4 Me	5	6 Me	7 eq; ax	8	8Me	9 eq; ax	9a	9b	9c	10	10Me	11	12 Me	13	14 eq; ax	14 Me	1'	2'	3'	3' NMe	4' eq; ax	5'	5' Me	1''	2'' eq; ax	3'' Me	3'' OMe	4''	5''	5'' Me
2'							C															B		B	A	A	B									
3'																						A	A		A	A	A					A			
3' NMe_2																							A	B		A	B								
4'eq; 4' ax																								A	A										
5'																								A		A			B						
5' Me																							A				A								
1''		B	A			A																			C					A		A	A		
2'' eq; ax																													A	A		A	A		B
3'' Me																														A			A		
3'' OMe					B																	C								B	A			
4''																													C	A				B	A
5''					C	A																A							B			B	B		A
5'' Me																													C			A		A	

Tablica D10. Asignacija spektra NOESY NMR snimljenog u acetonitrilu-d_3 pri 298 K. (A-signali jakog intenziteta, B-signali srednjeg intenziteta, C-signali slabog intenziteta)

Atom	**2**	**2 Me**	**3**	**4**	**4 Me**	**6 Me**	**7 eq; ax**	**8**	**8Me**	**9 eq; ax**	**9a**	**9b**	**9c**	**10**	**10Me**	**11**	**12 Me**	**14 eq; ax**	**14 Me**	**2'**	**3'**	**3' NMe**	**4' eq; ax**	**5'**	**5' Me**	**2'' eq; ax**	**3'' Me**	**3'' OMe**	**4''**	**5''**	**5'' Me**
2		A	A	A	A													A													
2Me																															
3	B	A				A										B														
4	A	B	A		A		A		B							A	A													
4Me	B			B				C											C											
5						B																								
6Me																															
7 eq; ax			C	A	B			A	A	B	A			B		B														
8							A		A	A	A			A	A	B														
8Me				A			A	A		A	B	B		A	A	A														
9 eq; ax							A		A			B		A	A	B														
9a							B	A	B			A	A	B	A	B														
9b											C			B																
9c																														
10							A	A	A		A	A	A		A	A														
10Me				B				B			A		A	A																
11				A	B		C				B			A			A												C		
12Me				B								B		B		A			B											
13																															
14 eq; ax	B																		A											
14Me																		A													
1'																															

Atom	2	2 Me	3	4	4 Me	6 Me	7 eq; ax	8	8Me	9 eq; ax	9a	9b	9c	10	10Me	11	12 Me	14 eq; ax	14 Me	2'	3'	3' NMe	4' eq; ax	5'	5' Me	2'' eq; ax	3'' Me	3'' OMe	4''	5''	5'' Me
2'																						A	C		B						
3'																						A	B	B		B					
3' NMe_2																				A	A		A	B	B						
4'eq; 4' ax																				B	A	A		B	A						
5'																					B		C		A					B	
5' Me																					B	B	A	A							
1''																															
2'' eq; ax																										A		A	A		
3'' Me																										B		A	B		
3'' OMe				A																	B	B				A	A				B
4''																					B					B	A				A
5''																					C	C					A		B		A
5'' Me																					A			A					A	A	



Slika D11. Spektri 9a-aminopropil derivata azitromicina a) ^{1}H NMR prije dodatka ribosoma A, b) spektar *off-resonance* nakon dodatka ribosoma u tris-puferu (50 ppm) i c) spektar razlike, (STD) u tris-d_{11} puferu pri 298 K

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Iva Kušec

Datum rođenja: 17. svibnja 1997.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2004–2012	Osnovna škola Bedenica
2012–2016	Srednja škola Dragutina Stražimira
2016–2019	Preddiplomski studij kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2019-	Diplomski studij kemije, smjer; analitička kemija i biokemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2019.	Otvoreni dan Kemijskog odsjeka (Dan i noć na PMF–u)

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. M. Tkalčević, I. Kušec, T. Jednačak, I. Mikulandra, N. Bregović, P. Novak, Study of interactions of clarithromycin and azithromycin derivatives with ribosome isolated from *Escherichia coli*, 5th Adriatic NMR Conference, Primošten, 2021., Book of abstracts p. 52

Publikacije

I. I. Mikulandra, T. Jednačak, B.Bertoša, J. P. Vuković, I. Kušec, P. Novak, *Interactions of Aminopropyl-Azithromycin Derivates, Precursors in the Synthesis of Bioactive Macrozones, with E. coli Ribosome: NMR and Docking Studies,* Materials - postupak publiciranja

Radno iskustvo

2021. Rad u laboratoriju u Globalni analitički servisi laboratorij, PLIVA HRVATSKA d.o.o.