

Istraživanje interakcija klaritromicina i ribosoma izoliranog iz bakterije *Escherichia coli* spektroskopijom NMR

Tkalčević, Mateja

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:714511>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-11**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Mateja Tkalčević

**Istraživanje interakcija klaritromicina i
ribosoma izoliranog iz bakterije *Escherichia coli*
spektroskopijom NMR**

Diplomski rad

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

Zagreb, 2021. godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc.
Tomislava Jednačka.

Rad je izrađen u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod naslovom "Makrozoni, novi
konjugati makrolidnih antibiotika: Dizajn, priprava i interakcije" (IP-2018-01-8098) voditelja
prof. dr. sc. Predraga Novaka

Zahvale

Hvala prof. dr. sc. Predragu Novaku na pruženoj prilici da izradim svoj diplomski rad na ovom projektu. Hvala Vam na upornosti, vjerovanju u mene i svim utješnim razgovorima.

Veliko hvala mojem mentoru, doc. dr. sc. Tomislavu Jednačku, što je bio uz mene svaki korak tijekom izvođenja i pisanja diplomskog rada. Hvala na prenesenom znanju i na divnoj atmosferi u laboratoriju.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Nikoli Bregoviću na pomoći oko izvođenja eksperimentalnog dijela te poticajnoj i ugodnoj radnoj atmosferi.

Od srca hvala mojim curama: Ani, Pauli, Marini, Karli, Luciji i Marti – mojim vječnim motivatoricama. Hvala što ste uvijek bile tu kad je trebalo.

Hvala mojem Tinu na savjetima jednog kroatologa te na pruženoj podršci i ljubavi.

Najveće hvala mojim roditeljima i obitelji! Vi ste moja krila i izvor moje snage.

Sadržaj

SAŽETAK.....	X
ABSTRACT	XII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Biosinteza proteina.....	2
2.1.1 Prijenosna RNA i aminoacil-tRNA-sintetaza	2
2.1.2 Ribosom.....	4
2.2. Makrolidni antibiotici.....	6
2.2.1 Azitromicin.....	7
2.2.2 Klaritromicin.....	8
2.2.3 Mehanizam djelovanja makrolidnih antibiotika	9
2.2.4 Rezistencija	11
2.2.5 Makrozoni	12
2.3. Spektroskopija NMR za proučavanje makrolida	13
2.3.1 STD ili metoda razlike prijenosa zasićenja.....	14
2.3.2 Metoda trNOESY.....	16
2.4. Ostale tehnike proučavanja interakcija makrolida i ribosoma	19
2.4.1 Izotermna titracijska kalorimetrija	19
2.4.1.1. Princip izotermne titracijske kalorimetrije	19
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	23
3.1. Izotermna titracijska kalorimetrija - materijali i metode	23
3.2. Spektroskopija NMR - materijali i metode	25
3.2.1 Određivanje vrijednosti pH otopine klaritromicina.....	25
3.2.2 Uvjeti snimanja spektara NMR.....	27
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. Proučavanje interakcija derivata azitromicina s ribosomom iz bakterije <i>E.coli</i> pomoću izotermne titracijske kalorimetrije.....	29
4.2. Strukturna karakterizacija klaritromicina pomoću spektroskopije NMR	31
4.2.1 Struktura i konformacija klaritromicina u acetonitrilu- d_3	31
4.2.2 Struktura i konformacija klaritromicina u D_2O	36
4.2.3 Struktura i konformacija klaritromicina u puferu tris- d_{11}	41

4.3. Proučavanje interakcija klaritromicina s ribosomom iz bakterije <i>E.coli</i> pomoću spektroskopije NMR	43
4.3.1 Spektar ^1H NMR klaritromicina nakon dodatka ribosoma	43
4.3.2 Istraživanje vezanja i konformacije klaritromicina metodom trNOESY	44
4.3.3 Optimiranje eksperimenta STD za sustav makrolid-ribosom	48
4.3.4 Određivanje veznih epitopa metodom STD	48
§ 5. ZAKLJUČAK	52
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	53
§ 7. LITERATURNI IZVORI	XV
§ 8. DODATAK	XV
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXIV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

ISTRAŽIVANJE INTERAKCIJA KLARITROMICINA I RIBOSOMA IZOLIRANOG IZ BAKTERIJE *ESCHERICHIA COLI* SPEKTROSKOPIJOM NMR

Mateja Tkalčević

Klaritromicin je predstavnik druge generacije makrolidnih antibiotika, u koju spada i poznatiji azitromicin. Makrolidni antibiotici (makrolidi) se koriste u liječenju infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama. Vezanjem za veliku podjedinicu bakterijskog ribosoma makrolidi inhibiraju translaciju proteina čime ubijaju bakterijske stanice. Učestalom primjenom makrolida bakterije su razvile različite mehanizme otpornosti na njihovo djelovanje. Stoga je interes znanosti preusmjeren na razvoj novih makrolidnih antibiotika. Za uspješan dizajn novog makrolida važno je razumjeti njegove interakcije s bakterijskim ribosomom. Stoga je cilj ovog rada okarakterizirati strukturu i interakcije klaritromicina s ribosomom izoliranim iz bakterije *Escherichia coli* u otopini primjenom jedno- i dvodimenzijskih tehnika NMR. Tehnikama NOESY (engl. *nuclear Overhauser effect spectroscopy*) i ROESY (engl. *rotating frame Overhauser effect spectroscopy*) određena je konformacija klaritromicina u slobodnom stanju, a pomoću prijenosnog NOESY određena je konformacija vezanog klaritromicina. Nadalje, metodom STD (engl. *saturation transfer difference*) proučene su interakcije klaritromicina s ribosomom iz bakterije *E. coli* i određeni su vezni epitopi.

(80 stranica, 40 slika, 10 tablica, 43 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: interakcije, klaritromicin, makrolidi, ribosom, spektroskopija NMR

Mentor: doc. dr. sc. Tomislav Jednačak

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Tomislav Jednačak.
 2. doc. dr. sc. Nikola Bregović.
 3. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec.
- Zamjena: izv. prof. dr. sc. Ivana Biljan

Datum diplomskog ispita: 28. rujna 2021.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

STUDY OF INTERACTIONS BETWEEN CLARITHROMYCIN AND RIBOSOME ISOLATED FROM *ESCHERICHIA COLI* BY NMR SPECTROSCOPY

Mateja Tkalčević

Clarithromycin is a representative of the second generation of macrolide antibiotics, which includes better-known azithromycin. Macrolides are used for treating infections caused by Gram-positive and Gram-negative bacteria. Binding of macrolides to a large subunit of the bacterial ribosome inhibits protein translation and kills bacterial cells. Due to a frequent use of macrolides, bacteria have developed different resistance mechanisms. For this reason, the interest of science has been redirected to the development of new macrolide antibiotics. For a successful design of a new macrolide, it is important to understand its interactions with the bacterial ribosome. Therefore, the purpose of this study is to characterize the structure and interactions of clarithromycin with ribosome isolated from *Escherichia coli* in solution using one- and two-dimensional NMR techniques. Conformational studies of clarithromycin in the free-state were carried out using NOESY and ROESY techniques, while the bound-state conformation was determined from trNOESY correlations. Furthermore, the interactions of clarithromycin with the *E. coli* ribosome were studied by STD method, which allowed the assessment of binding epitopes.

(80 pages, 40 figures, 10 tables, 43 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: clarithromycin, interactions, NMR spectroscopy, macrolides, ribosome

Mentor: Dr. Tomislav Jednačak, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Tomislav Jednačak, Assistant Professor
 2. Dr. Nikola Bregović, Assistant Professor
 3. Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Ivana Biljan, Associate Professor

Date of exam: September 28th 2021.

§ 1. UVOD

Makrolidni antibiotici (makrolidi) su makrociklički spojevi sastavljeni od 12–16 ugljikovih atoma. Pripadaju najvećoj klasi antibiotika, u široj su kliničkoj primjeni već više od 50 godina, a primarno se koriste za liječenje infekcija gornjih i donjih dišnih puteva.^{1,2} Mogu se podijeliti u četiri generacije čiji se predstavnici razlikuju po svojim strukturnim obilježjima. Predstavnik prve generacije je eritromicin A, dok su klaritromicin i azitromicin najpoznatiji predstavnici druge generacije makrolida.³ Kako bi se poboljšala fizičko-kemijska svojstva i bioaktivnost makrolidnih antibiotika, razvijeni su predstavnici treće i četvrte generacije od kojih su najpoznatiji telitromicin i solitromicin.³ Mehanizam djelovanja makrolida temelji se na inhibiciji procesa biosinteze proteina: vezanjem za veliku (50 S) podjedinicu bakterijskog ribosoma inhibiraju proces translacije čime ubijaju bakterijske stanice.⁴

Učestalom primjenom makrolidnih antibiotika bakterije su razvile različite mehanizme otpornosti na njihovo djelovanje. Mikrobiološka rezistencija danas je globalni problem i predstavlja veliku opasnost za zdravlje ljudi. Stoga je pristup znanstvenika usmjeren prema istraživanju i razvoju novih makrolidnih antibiotika. Za uspješan dizajn novog makrolida važno je razumjeti interakcije između lijeka i biološke mete, odnosno bakterijskog ribosoma. U tu svrhu koriste se različite metode, od kojih je jedna od najvažnijih spektroskopija NMR.

Cilj ovog rada je istražiti interakcije klaritromicina i ribosoma izoliranog iz bakterije *Escherichia coli* koristeći spektroskopiju NMR. Struktura klaritromicina u acetonitrilu, vodi i tris puferu okarakterizirat će se asignacijom jedno- i dvodimenzijskih spektara NMR, a interakcije klaritromicina s ribosomom proučit će se metodama STD i trNOESY. Navedenim metodama odredit će se epitopi vezanja, odnosno konformacija klaritromicina vezanog za ribosom.

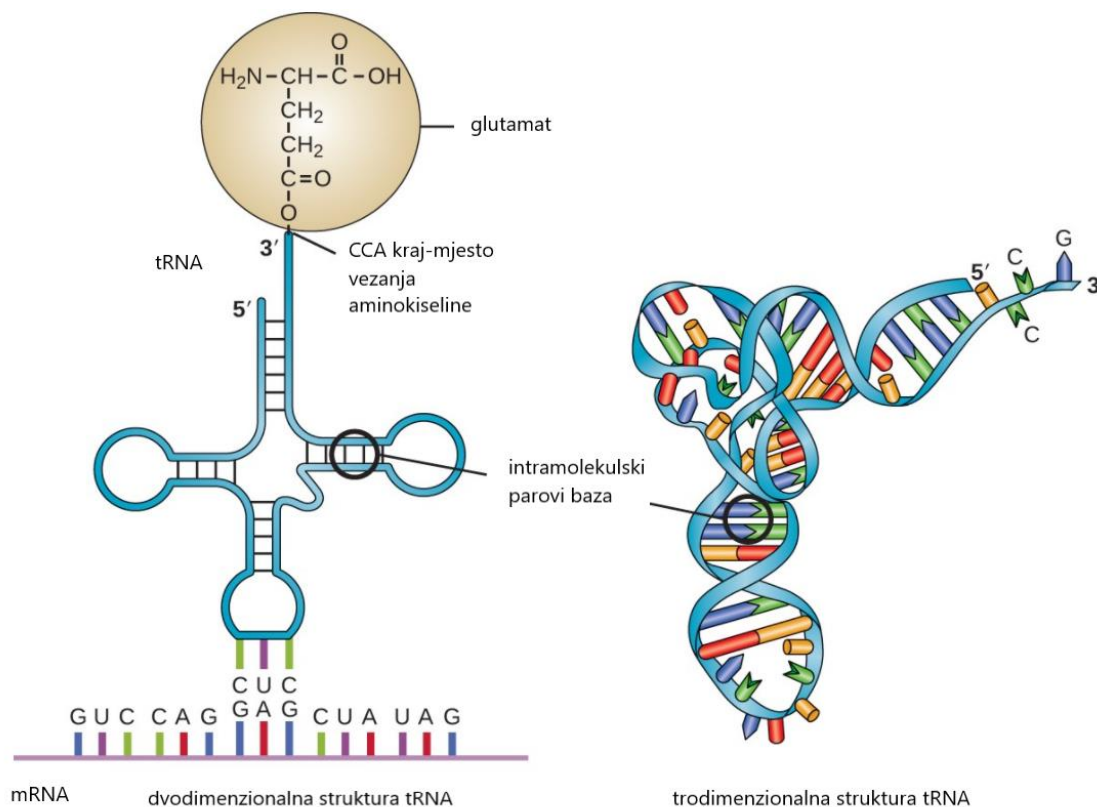
§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Biosinteza proteina

Za normalno funkcioniranje organizma potrebna je sinergija svih makronutrijenata, od kojih se upravo proteini smatraju primarnim nutrijentima. Poznato je da proteini imaju ključnu ulogu u kontroli nastanka (diferencijacije) i rasta stanica, kao gradivni elementi živih bića te u raznim metaboličkim procesima kao biokatalizatori. Nadalje, vrlo su bitni za stanični prijenos i imunološki odgovor organizma. Stoga je od velike važnosti da ih organizam svakodnevno sintetizira u dovoljnoj količini kako bi mogao održavati stanje homeostaze, neophodno za normalno funkcioniranje živih bića. Biosinteza proteina ili translacija je prevođenje nukleotidnog slijeda molekule mRNA u aminokiselinski slijed. Složenost procesa proizlazi iz međudjelovanja velikog broja makromolekula poput mRNA, više vrsta tRNA, raznih proteina i ribosoma na kojem se odvija sam proces biosinteze proteina. S obzirom na važnost procesa, ovaj niz reakcija je strogo reguliran i postoje mehanizmi za popravak pogrešaka koje pritom nastaju.

2.1.1 Prijenosna RNA i aminoacil-tRNA-sintetaza

U translaciji sudjeluju molekule prijenosnih RNA ili tRNA (eng. *transfer* RNA, tRNA) koje na ribosom donose aktivirane oblike aminokiselina koje se ugrađuju u polipeptidni lanac. Molekula tRNA sadrži antikodon koji je komplementaran kodonu mRNA koji kodira aminokiselinu vezanu na molekuli tRNA. Kao model za opisivanje opće strukture i svojstava ovih molekula koristi se kvaščeva alanil-tRNA. Radi se o jednolančanoj molekuli RNA koja se sastoji od ukupno 76 nukleotida od kojih je gotovo polovica sparena.⁵ Dijelovi sparenih nukleotida čine dvolančane zavojnice, dok preostali nesporeni nukleotidi tvore tzv. petlje (akceptorska petlja, antikodonska petlja, TΨC petlja, DHU-petlja te varijabilni dio-ekstraruka).⁵



Slika 1. Opća struktura tRNA u dvodimenzijском i trodimenzijском prikazu.⁶

Biosinteza proteina odvija se u nekoliko koraka. Slobodne aminokiseline su termodinamički stabilnije od polipeptida⁵ koji nastaju njihovim povezivanjem pa je stoga nastajanje peptidne veze između pojedinih aminokiselina termodinamički nepovoljno. Stoga je prvi korak reakcije aktivacija aminokiselina u kojem glavnu ulogu ima enzim aminoacil-tRNA-sintetaza.

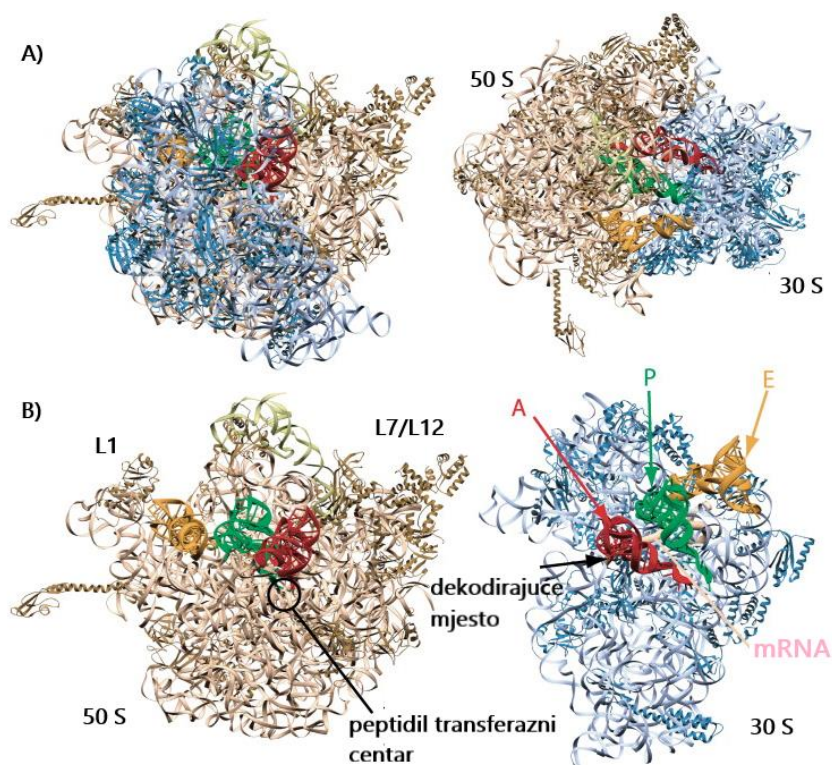
Aminoacil-tRNA-sintetaza je vrlo specifičan enzim koji prepoznaje određenu aminokiselinu i njoj pripadnu tRNA te uz aktivno mjesto sadrži dodatno mjesto za popravak pogreške. U prvom koraku enzim aktivira odgovarajuću aminokiselinu pomoću molekule ATP. U reakciji nastaje aktivirani oblik aminoacil-AMP te se oslobađa molekula pirofosfata čijom je hidrolizom osigurana ireverzibilnost reakcije.

U sljedećem koraku aminoacilna skupina se prenosi na pripadnu molekulu tRNA i nastaje aminoacil-tRNA uz oslobađanje AMP. Aminokiseline se povezuju s tRNA esterskom vezom između karbonilne skupine aminokiseline te 3'-hidroksilne skupine adenozienskog ostatka molekule tRNA.

Odabir točne aminokiseline uvjetovan je strukturom aktivnog mjesta enzima, ali i dodatnim mjestom za popravak pogreške koji omogućuje razlikovanje i vrlo sličnih aminokiselina.

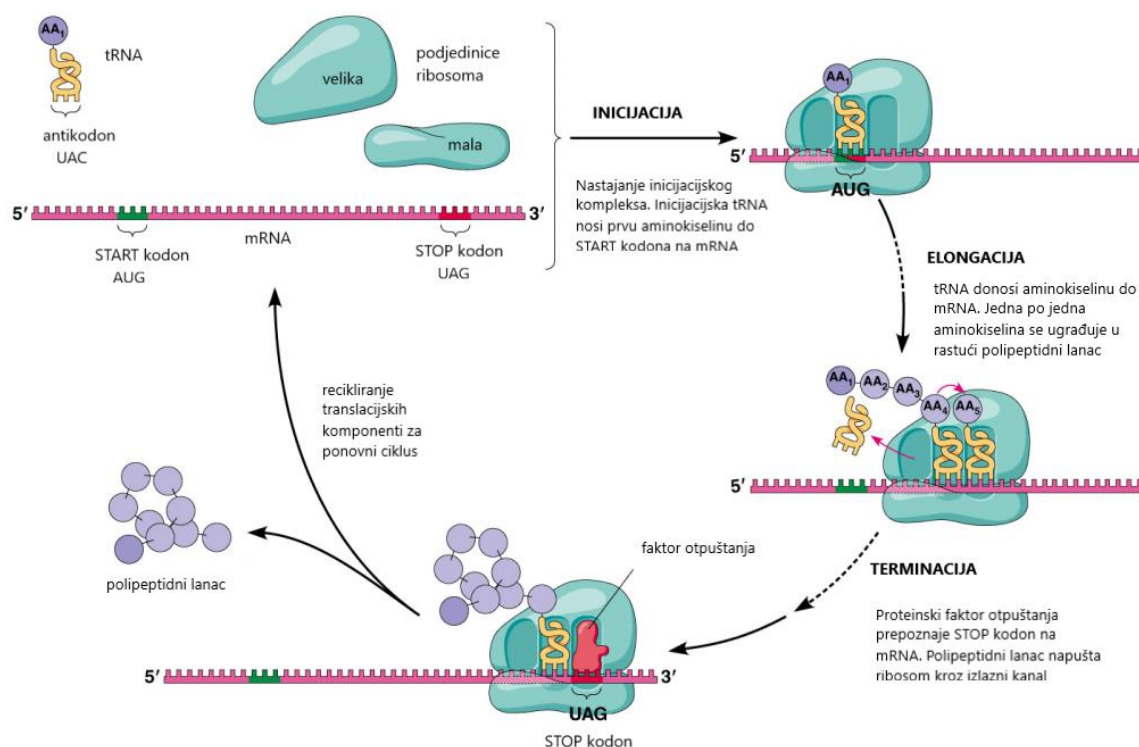
2.1.2 Ribosom

Ribosom je ribonukleoproteinska čestica građena od proteina i ribonukleinskih kiselina. U prokariotskim stanicama ribosomi čine $\frac{1}{4}$ ukupne stanične mase, a u stanici se nalaze vezani za endoplazmatski retikulum ili slobodni u citosolu. Prokariotski (70 S) ribosomi sastoje se od velike (50 S) i male (30 S) podjedinice. U ribosomima prokariota podjedinica 50 S je građena od 34 različita proteina koje označavamo s L1 do L34 te molekula 23 S rRNA i 5 S rRNA. Podjedinica 30 S sastoji se od 21 različitog proteina (S1 do S21) i od molekule 16 S rRNA.⁵ Godine 2000. riješena je kristalna struktura ribosoma iz bakterija *Haloarcula marismortui* i *Thermus thermophilus* te je dokazano da je aktivno mjesto ribosoma (peptidil-transferazni centar) građeno od ribonukleinske kiseline i da ribosom ima ulogu ribozima.⁷



Slika 2. Struktura prokariotskog (70 S) ribosoma građenog od dvije podjedinice: 50 S (ružičaste boje) i 30 S (plave boje). A) Prikaz strukture ribosoma 70 S s gornje (lijevo) i bočne strane (desno) u kompleksu s tRNA i mRNA. B) Detaljniji prikaz strukture uz istaknuto katalitičko mjesto ribosoma (lijevo) te tri vezna mjesta A, P i E na koja su vezane odgovarajuće tRNA (desno).⁸

Ribosom sadrži tri vezna mjesta za molekule tRNA. Aminoacilno vezno mjesto (A) veže aminoaciliranu tRNA, peptidilno vezno mjesto (P) veže peptidil-tRNA, odnosno molekulu tRNA na koju je vezan polipeptidni lanac, a E mjesto veže deaciliranu tRNA koja disocira s ribosoma. Mehanizam biosinteze proteina sastoji se od tri koraka: inicijacija, elongacija i terminacija.



Slika 3. Mehanizam biosinteze proteina.⁹

Proces translacije proteina započinje vezanjem male podjedinice na Shine-Dalgarnov slijed mRNA. Molekula formilmetionil-tRNA^{fMet} (tRNA_f) veže se na početni kodon te dolazi do povezivanja velike i male podjedinice ribosoma uz nastanak kompleksa ribosoma, mRNA i inicijacijske tRNA_f. Inicijacijska tRNA vezana je na P mjesto ribosoma, a nadolazeća aminoacilirana tRNA veže se na A mjesto temeljem komplementarnosti antikodona i kodona. Stvaranje peptidne veze između dvije aminokiseline katalizirano je pomoću 23 S rRNA koja gradi peptidil-transferazni centar ribosoma.⁵ Nakon prijenosa aminokiseline na rastući polipeptidni lanac, deacilirana tRNA se pomiče u izlazno mjesto (E) te napušta ribosom, a peptidil-tRNA dolazi u P-mjesto. Proces elongacije ponavlja se do terminacije translacije.

Terminacija nastupa kada proteinski faktor otpuštanja prepozna STOP kodon na molekuli mRNA, što dovodi do hidrolize esterske veze u peptidil-tRNA. Novonastali polipeptidni lanac zatim napušta ribosom kroz izlazni kanal koji se nalazi u podjedinici 50 S i prenosi se do odgovarajućih staničnih odjeljaka u organizmu.

Razumijevanje mehanizma biosinteze proteina od velike je važnosti za razvoj novih lijekova. Naime, mnogi antibiotici inhibiraju biosintezu proteina i upravo na tom mehanizmu temelji se njihova aktivnost. Primjerice, tetraciklini se vežu za malu podjedinicu ribosoma i sprječavaju elongaciju, dok većina makrolida vezanjem za veliku podjedinicu onemogućuje translokaciju rastućeg polipeptida.¹⁰ Detaljniji mehanizam djelovanja makrolida opisan je u poglavlju 2.2.2.

2.2. Makrolidni antibiotici

Makrolidni antibiotici su antibiotici širokog spektra djelovanja, učinkoviti protiv većine Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Termin makrolidi prvi put spominje R. B. Woodward 1957.,¹¹ a odnosi se na makrolaktonske spojeve (veličine prstena 12–16 atoma) supstituirane polarnim ili nepolarnim skupinama, a na koje su vezane jedna ili više šećernih jedinica.⁴ Makrolidi se dijele u podskupine, ovisno o broju atoma koji čine laktonski prsten. Posebno su zanimljivi oni sastavljeni od 14 do 16 atoma jer osim antimikrobnog djelovanja posjeduju protuupalna, antitumorska i antimalarijska svojstva.¹² S obzirom na iznimnu učinkovitost i dobra farmakokinetička svojstva, upotreba makrolidnih antibiotika od njihova otkrića ubrzano raste. Primjena makrolidnih antibiotika u kliničkom liječenju je raznovrsna. Koriste se u liječenju respiratornih infekcija (uzrokovanih bakterijama *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* i dr.), u liječenju spolno prenosivih bolesti poput gonoreje (*Neisseria gonorrhoeae*) i klamidije (*Chlamydia trachomatis*) kao i protiv kožnih oboljenja uzrokovanih bakterijama *Propionobacter acne* i *Streptococcus pyogenes*.¹¹

Makrolidi se mogu podijeliti u četiri generacije čiji se predstavnici razlikuju po svojim strukturnim obilježjima.⁴

Najpoznatiji predstavnik prve generacije makrolida, eritromicin A, izoliran je iz bakterije *Saccharopolyspora erythraea*^{4,11} i koristi se u kliničkoj praksi od 1950-ih godina. Eritromicin je sastavljen od četrnaesteročlanog makrolaktonskog prstena na koji su vezane dvije ugljikohidratne jedinice. Na položaju C3 vezan je šećer kladinoza, a na položaju C5 desozamin. Desozamin na položaju C5 karakterističan je za sve četrnaesteročlane makrolide osim za lankamicin koji sadrži kalkozu.¹² Razlika u četrnaesteročlanim makrolidima vidljiva je u supstituentima na položajima C3 i C13.

Farmakokinetička svojstva prvih makrolidnih antibiotika nisu bila na visokoj razini kao danas. Eritromicin se morao unositi više puta dnevno zbog ograničene kemijske stabilnosti u organizmu, posebice u kiselim uvjetima kakvi su prisutni u području želuca. Nadalje, ovaj antibiotik nije bio djelotvoran u liječenju infekcija uzrokovanih Gram-negativnim bakterijama iz rodova *Enterococcus* i *Pseudomonas* zbog nemogućnosti prodiranja u unutarnju membranu bakterija ili zbog brzog izbacivanja iz stanice.¹²

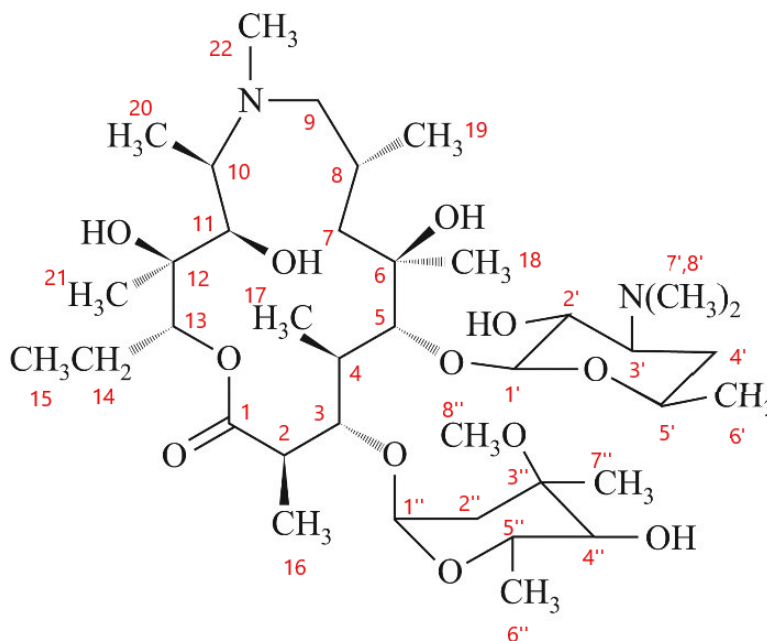
Stoga su započeta brojna istraživanja i uloženi veliki naponi u proizvodnju makrolidnih antibiotika druge i treće generacije s poboljšanim farmakokinetičkim svojstvima. Neki od predstavnika druge generacije makrolida koji su zamijenili eritromicin u kliničkom liječenju su azitromicin i klaritromicin.

2.2.1 Azitromicin

Azitromicin, komercijalnog naziva Sumamed, najpoznatiji je derivat eritromicina otkriven od strane hrvatskih znanstvenika iz farmaceutske tvrtke PLIVA. Sintetiziran je postupkom Beckmannove pregradnje kojim se u četrnaesteročlani makrolaktonski prsten eritromicina ugrađuje atom dušika.¹³ Azitromicin je tako prvi petnaesteročlani predstavnik makrolidne podskupine azalida koja je dobila ime po atomu dušika ugrađenom u makrolaktonski prsten.

Farmakološka svojstva azitromicina puno su bolja u odnosu na eritromicin, posebice stabilnost u kiselom mediju. Primarno se koristi za suzbijanje respiratornih infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama. Protonirana amino-skupina azitromicina omogućuje vezanje azitromicina na stanične membrane te doprinosi iznimnoj sposobnosti prodiranja lijeka u stanice i makrofage.¹²

Istraživanja su pokazala da je količina azitromicina akumuliranog u stanicama ljudske jetre 1500 puta veća od količine akumulirane u krvnoj plazmi.¹¹ Sposobnost prodiranja azitromicina u makrofage omogućava prijenos lijeka do mjesta infekcije gdje se može akumulirati u velikoj količini.

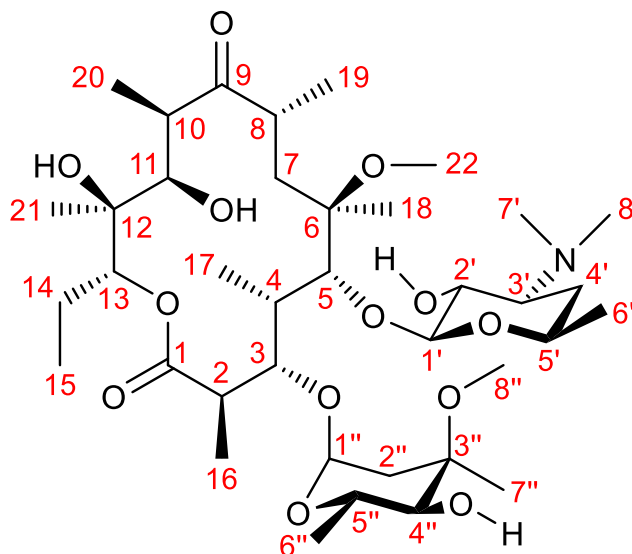


Slika 4. Struktura azitromicina s brojanjem atoma.¹⁴

U odnosu na eritromicin koji se primjenjivao 3–4 puta dnevno, azitromicin i klaritromicin su visoko djelotvorni i pri jednodnevnoj primjeni. Razlog tome jest supstratna specifičnost enzima CYP3A4 prema eritromicinu. Enzim CYP3A4 je monooksigenaza iz obitelji enzima P450 koji je uključen u metabolizam raznih lijekova, među kojima je i eritromicin.¹⁵ Djelovanje ovog enzima potiče razgradnju eritromicina u organizmu i smanjuje njegovu učinkovitost. S druge strane, klaritromicin, azitromicin i ostali predstavnici druge generacije makrolida slabiji su supstrati enzima CYP3A4 te se dulje zadržavaju u organizmu.¹⁵

2.2.2 Klaritromicin

Klaritromicin ili 6-O-metileritromicin je najjednostavniji polusintetski derivat eritromicina A. Riječ je o četrnaesteročlanom makrolidnom antibiotiku koji je dobiven metilacijom OH skupine u položaju 6 laktonskog prstena eritromicina (slika 5).¹¹

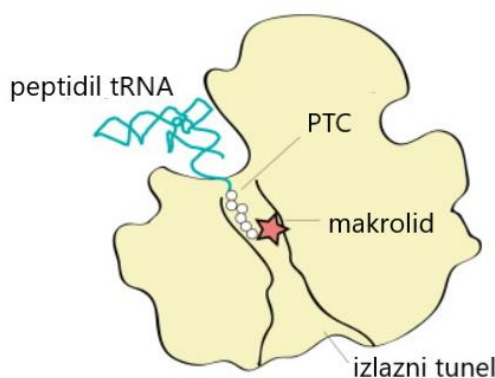
Slika 5. Struktura klaritromicina s brojanjem atoma.¹⁶

Zahvaljujući toj strukturnoj razlici klaritromicin je stabilan u kiselim uvjetima te pokazuje veću antibakterijsku aktivnost u odnosu na eritromicin.¹⁷ Klaritromicin se nakon unosa u organizam većim dijelom metabolizira u jetri uz pomoć enzima iz obitelji P450 citokroma pri čemu nastaju 14 (S)- i 14 (R)-hidroksiklaritromicin.¹¹ Aktivni metabolit 14 (R)-hidroksiklaritromicin pokazuje sinergijski učinak kada se primjenjuje u kombinaciji s prekursorom klaritromicinom.¹⁷ Klaritromicin općenito pokazuje veću aktivnost protiv Gram-pozitivnih bakterija, poput *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* i *Streptococcus pyogenes*, ali je djelotvoran i u liječenju infekcija uzrokovanih pojedinim aerobnim Gram-negativnim bakterijama, kao što su *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae* i *Moraxella catarrhalis*.¹⁸

2.2.3 Mehanizam djelovanja makrolidnih antibiotika

Mehanizam djelovanja makrolidnih antibiotika temelji se na inhibiranju procesa biosinteze proteina.⁴ Postoje četiri načina kojima se opisuje djelovanje makrolidnih antibiotika: blokiranje napredovanja rastućeg peptida kroz izlazni tunel, sprječavanje nastanka peptidne veze, poticanje disocijacije peptidil-tRNA s ribosoma te narušavanje kompleksa ribosomskih podjedinica (ili interferiranje s velikom podjedinicom ribosoma).¹¹

Vežanje makrolida na ribosom je alosteričko i odvija se u dva koraka.⁴ Prvi korak je brz i karakterizira ga slabo vežanje makrolida na ribosom u svrhu prepoznavanja veznog mjesta. U drugom, sporijem koraku, makrolid se na ribosom veže puno jačim interakcijama što je nužno za postizanje bolje aktivnosti makrolida. Dakle, makrolidi se uglavnom vežu na veliku podjedinicu ribosoma u izlaznom tunelu te tako ometaju proces translacije. Izlazni tunel (duljine 100 Å i promjera 10–20 Å) sastavljen je pretežito od 23 S rRNA i nastavlja se na peptidil-transferazni centar (PTC). Izbočenja dvaju ribosomskih proteina L4 i L22 čine suženje u izlaznom kanalu na približnoj udaljenosti 25 Å od peptidil-transferaznog centra.¹¹ Većina makrolida se veže upravo u području između PTC i suženja u izlaznom tunelu prikazanom na slici 6.



Slika 6. Položaj makrolida u izlaznom tunelu velike podjedinice ribosoma.¹⁹ Makrolidi svojim vežanjem u ili blizu PTC-a onemogućuju izlazak nastalog peptidnog lanca iz ribosoma te tako inhibiraju biosintezu proteina i rast bakterijskih stanica.

Vežanjem makrolida u izlaznom tunelu ribosoma onemogućen je prolazak nastalog peptida kroz izlazni tunel pa dolazi do terminacije elongacije lanca. Eksperimentalno je dokazano da je u prisutnosti eritromicina *in vitro* sintetiziran peptid od 7 ili 8 aminokiselina.¹¹ Pritom nastaju manji peptidi, no ne nastaju funkcionalni proteini te se time inhibira rast bakterija.

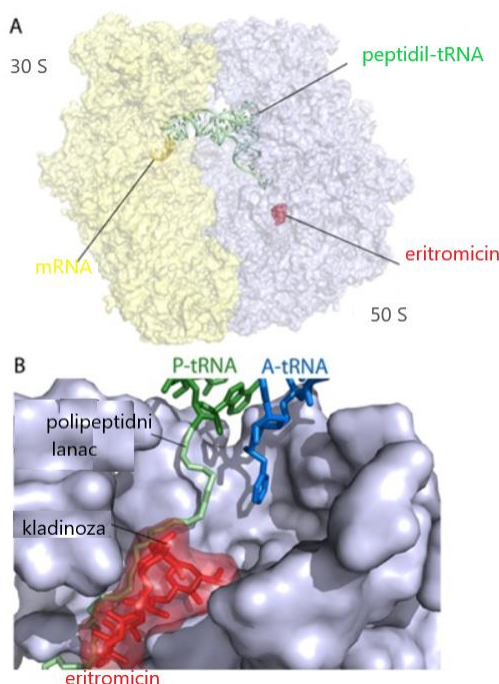
Proučavanjem kristalnih struktura ribosoma u kompleksu s određenim četrnaesteročlanim i šesnaesteročlanim makrolidima ustanovljeno je da pri vežanju makrolida za ribosom glavnu ulogu imaju interakcije nukleotida A2058 i A2059 s 2'-OH i 3'-N-dimetilamino skupinama u desozaminu ili mikaminozi.¹¹

Desozamin i mikaminoza orijentirani su prema PTC. Mikaminoza zbog svoje veličine može interferirati sa stvaranjem peptidne veze u PTC, dok je desozamin nedovoljne veličine da bi

dosegnuo mjesto nastajanja peptidne veze.¹¹ Taj način djelovanja karakterističan je za šesnaesteročlane makrolide koji sadrže disaharid mikaminoza-mikaroza te mogu inhibirati biosintezu proteina već na samom početku elongacije.

Model koji opisuje disocijaciju peptidil-tRNA s ribosoma ili peptidil-tRNA *drop-off* podrazumijeva raspad kompleksa ribosom-mRNA-peptidil-tRNA u trenutku kada rastući polipeptidni lanac naiđe na makrolid u izlaznom tunelu. Ustanovljeno je da makrolidi aktivno ubrzavaju disocijaciju peptidil-tRNA iz aminoacilnog i peptidilnog veznog mjesta ribosoma čak nekoliko puta u odnosu na zastoj translacije uzrokovan nekim drugim čimbenicima.¹¹

Četvrti način inhibicije temelji se na nemogućnosti nastajanja potpunog ribosomskog kompleksa zbog vezanja makrolida na slobodnu veliku podjedinicu ribosoma. Vezanje sterički sprječava povezivanje velike i male podjedinice te dovodi do nakupljanja velikih podjedinica u citoplazmi stanice koje razgrađuju hidrolitički enzimi prisutni u citosolu. Ovaj način inhibicije otkrio je Champney sa svojim suradnicima.²⁰



Slika 7. Prikaz vezanja eritromicina u 70 S ribosomu iz bakterije *E. coli*. A) Eritromicin je vezan u izlaznom tunelu u 50 S podjedinici. B) Uvećani prikaz veznog mjesta eritromicina (eritromicin je prikazan crvenom bojom) u prisutnosti peptidil-tRNA i aminoacil-tRNA.

Kladinoza je orijentirana prema mjestu nastanka peptidne veze.²⁰

2.2.4 Rezistencija

Široka upotreba makrolidnih antibiotika uzrokovala je pojavu velikog broja rezistentnih bakterijskih sojeva. Mikrobiološka rezistencija na antibiotike postala je globalni medicinski problem i predstavlja veliku opasnost za zdravlje ljudi. Bakterijska rezistencija na antibiotike može biti aktivna ili pasivna.²¹

Aktivna rezistencija rezultat je evolucijske prilagodbe koja se manifestira specifičnim mehanizmom usmjerenim protiv određenog antibiotika ili klase antibiotika. S druge strane, ako je proces prilagodbe općenit i nepovezan s pojedinom skupinom lijekova, govorimo o pasivnoj rezistenciji.²¹ Postoji pet osnovnih mehanizama aktivne bakterijske rezistencije: razgradnja antibiotika djelovanjem enzima u stanici, modifikacija antibiotika u neaktivne oblike, izbacivanje (efluks) antibiotika iz stanice, zaštita ribosoma pomoću proteina ABC-F (engl. *ATP-binding cassette F*) i stvaranje biofilmova. Sve se češće pojavljuju i sojevi bakterija sa sinergijskim mehanizmima otpornosti na antibiotike.^{21,22,23–27}

2.2.5 Makrozoni

Uslijed širenja višestruke rezistencije patogenih bakterija na dosad poznate lijekove, promijenjen je pristup istraživanjima makrolidnih antibiotika. Dotadašnja znanja o makrolidnim antibioticima iskorištena su za razvoj nove hibridne skupine spojeva nazvanih makrozoni.

Makrozoni su konjugati makrolidnih antibiotika nastali povezivanjem azitromicina i derivata tiosemikarbazona, spojeva s iznimnim biološkim svojstvima i antibakterijskim djelovanjem.²⁸ Povezivanjem dvije bioaktivne skupine spojeva i pažljivim odabirom bočnih ogranaaka tiosemikarbazona dobiveni su lipofilni i nabijeni spojevi koji mogu učinkovito prolaziti kroz stanične membrane.²⁸ Očekivan je sinergijski učinak i antibakterijsko djelovanje nove klase spojeva.

Molekulskim modeliranjem pokazano je da makrozoni ostvaruju interakcije s tri vezna mjesta ribosoma. Makrolaktonski prsten nalazi se na istom položaju u AZI-1 primarnom veznom mjestu kao i u slučaju eritromicina, no uočene su dodatne van der Waalsove interakcije koje makrolaktonski prsten ostvaruje s nukleotidima G2061, A2062, A2451, A2503, G2505, A2508, A2509, U2584, U2585, U2586, U2609, C2610 i C2611.²⁸

Uz van der Waalsove interakcije opažene su i vodikove veze između tiosemikarbazonskog bočnog lanca i odgovarajućih nukleotida.²⁸ Tiosemikarbazonski bočni ogranak omogućuje dodatne vodikove veze i π - π interakcije te na taj način doprinosi vezanju makrozona za ribosom.

Bočni lanac tiosemikarbazona postoji u dvije konformacije: svijenoj i ispruženoj. Rezultati dobiveni molekularnim modeliranjem su pokazali da je potencijal stvaranja vodikovih veza i π - π interakcija veći u slučaju ispružene konformacije bočnog lanca.²⁸

Na temelju ispitivanja *in vitro* koja su uključila Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterijske sojeve dokazana je antibakterijska aktivnost makrozona. Provedeni su standardni mikrodilucijski testovi određivanja minimalne inhibicijske koncentracije (MIC) dovoljne za inhibiciju mikroorganizama u uvjetima *in vitro*. Većina sintetiziranih makrozona pokazala je aktivnost jednaku ili bolju od aktivnosti azitromicina, posebice u djelovanju na sojeve bakterija *S. pneumoniae* i *S. pyogenes*.²⁸ Isto tako, pokazana je dobra aktivnost određenih derivata makrozona na bakterijski soj *S. aureus* rezistentan na azitromicin.²⁸

2.3. Spektroskopija NMR za proučavanje makrolida

Spektroskopija NMR jedna je od najvažnijih metoda za proučavanje interakcija u biološkim sustavima. Može se uspješno primijeniti za istraživanje vezanja makrolida ili prekursora makrolida na njihove biološke mete, poput ribosoma, albumina i žučnih kiselina.²⁹ Ova spektroskopska metoda u kombinaciji s molekulskim modeliranjem omogućuje proučavanje slobodnih i vezanih konformacija bioloških molekula u otopini i čvrstom stanju te karakterizaciju načina vezanja makrolida na ribosom.

Kako bi se objasnili mehanizmi djelovanja makrolida i drugih biološki aktivnih molekula, važno je odrediti njihove konformacije u otopini, s obzirom da se u stanici nalaze u sličnom okruženju. Za određivanje konformacije molekula u slobodnom i vezanom stanju koriste se dvodimenzijske tehnike NOESY i ROESY.

Za strukturnu karakterizaciju makrolida koriste se jedno- (^1H NMR, DEPTQ i APT ^{13}C NMR) i dvodimenzijske (COSY, HSQC, HMQC, HMBC, NOESY) tehnike NMR. Osim analize u tekućem stanju, moguće je provesti analizu NMR u čvrstom stanju kojom se također mogu dobiti korisne informacije o strukturi makrolida.

Prilikom snimanja slabo topljivih uzoraka u otopini veliki problem predstavljaju signali otapala koje je potrebno umanjiti ili potpuno ukloniti. U tu svrhu koriste se tehnike supresije otapala koje znatno olakšavaju detekciju i karakterizaciju uzoraka niskih koncentracija.

Everett i sur. su pomoću spektroskopije NMR proveli konformacijsku analizu eritromicina te pokazali da može postojati u dvije glavne konformacije: *folded-in* i *folded-out*.⁴ Nadalje, uočili su i postojanje treće konformacije *3-endo-folded-out* kod petnaesteročlanih makrolida.⁴ Konformaciju *folded-in* karakterizira vicinalna spreaga između susjednih vodikovih atoma $J_{H2,H3}$ u iznosu od 2–3 Hz, s torzijskim kutom od 100° i NOESY korelacijama između atoma H3 i H11 te H4 i H18.³⁰ S druge strane, konformaciju *folded-out* karakteriziraju veći torzijski kutevi između atoma H2 i H3 (približno 180°), vicinalna spreaga $^3J_{H2,H3}$ u iznosu od ≈ 10 Hz te bliski kontakti između atoma H4 i H11, odnosno H5 i H18, na što ukazuju odgovarajući NOE križni signali.^{30,31} Treća poznata konformacija, *3-endo-folded-out* ima obilježja *folded-in* i *folded-out* konformera.

Na udio konformera *folded-in* i *folded-out* utječu izbor otapala i temperatura.³¹ Pokazano je da isti spojevi, ovisno o otapalu, mogu postojati u različitim konformacijama, a promjenom temperature mijenja se i vrijednost $^3J_{H2,H3}$ te posljedično raste i udio pojedinog konformera.³¹

Osim za određivanje konformacije molekula, spektroskopija NMR se može primijeniti za proučavanje interakcija između molekula liganda i receptora. Metode koje se najčešće koriste u tu svrhu su STD i prijenosni NOESY, temeljene na efektu NOE.⁴

2.3.1 STD ili metoda razlike prijenosa zasićenja

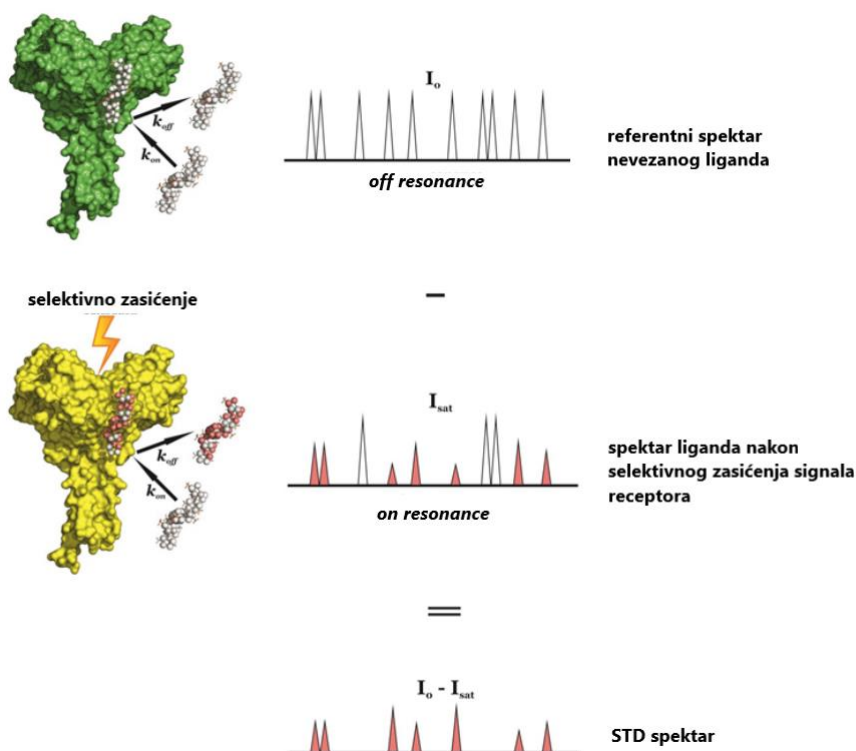
STD ili metoda razlike prijenosa zasićenja je brza i osjetljiva metoda koja se koristi za određivanje veznih epitopa liganda prilikom vezanja na receptor.^{32,33} Metoda se temelji na selektivnom zasićenju rezonancije receptora i brzom prijenosu magnetizacije na signale vezanog liganda mehanizmom spinske difuzije.^{32,33} Stupanj zasićenja pojedinih protona na molekuli liganda ovisi o prostornoj udaljenosti liganda od površine receptora i o kinetici vezanja. Faktor uvećanja (amplifikacijski faktor) signala STD definiran je izrazom:

$$A_{STD} = \frac{I_0 - I_{sat}}{I_0} = \frac{I_{STD}}{I_0} \quad (1)$$

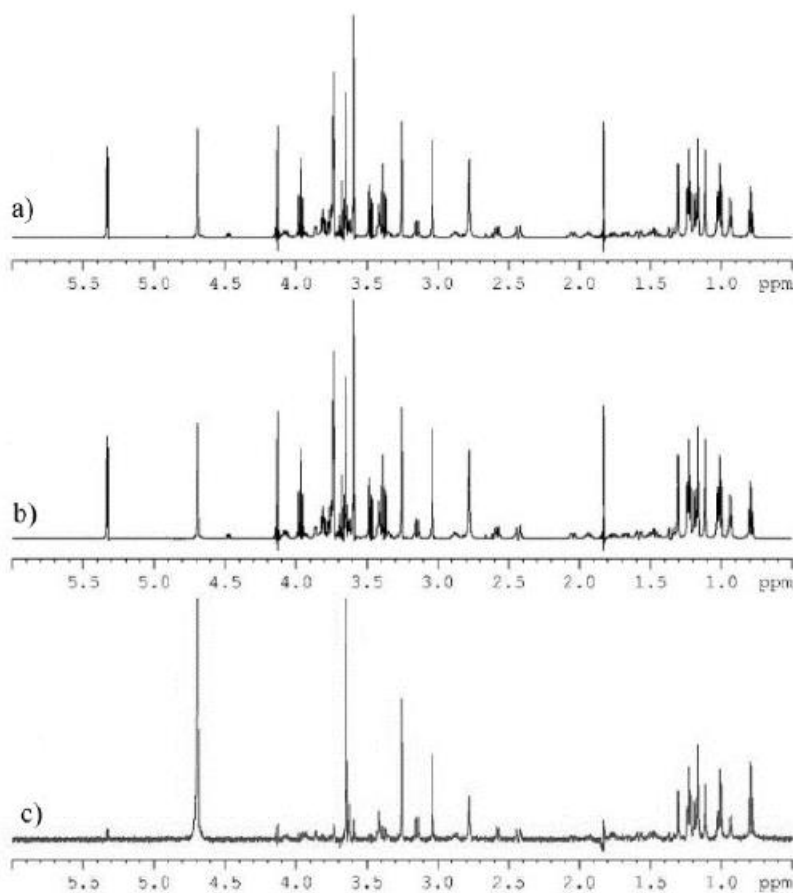
gdje I_0 označava intenzitet signala u spektru *off-resonance* (bez selektivne pobude protona receptora), a I_{sat} intenzitet signala u spektru *on-resonance* (uz selektivnu pobudu protona receptora).³²

Spektar *off-resonance* je referentni spektar koji prikazuje signale liganda u vezanom i nevezanom stanju (frekvencija zasićenja je postavljena daleko od frekvencije rezonancije bilo kojeg signala). Spektar *on-resonance* dobiven je selektivnom pobudom protona receptora koja dovodi do brzog širenja selektivnog zasićenja kroz molekulu proteina spinskom difuzijom. Brzom izmjenom između slobodnih i vezanih stanja liganda dolazi do prijenosa magnetizacije (intermolekulski efekt NOE) s receptora na protone liganda koji su vezani za površinu receptora pri čemu dolazi do smanjenja intenziteta njihovih signala. Razlika ovih dvaju spektara daje spektar STD (slika 8 i 9), odnosno odgovara količini zasićenja koje je preneseno s receptora na ligand.

Spektar STD prikazuje samo signale vezanih liganda, a njihovi intenziteti ovise o prostornoj udaljenosti protona od molekule receptora. Protoni liganda koji se nalaze najbliže veznom mjestu receptora imaju najveći A_{STD} i dat će najintenzivnije signale, a najudaljeniji protoni signale najslabijeg intenziteta.



Slika 8. Princip eksperimenta STD NMR i dobivanje spektra STD oduzimanjem spektra *on-resonance* od spektra *off-resonance*. A) Spektar *off-resonance* prikazuje signale liganda u bez selektivne pobude protona receptora. B) Spektar *on-resonance* dobiven uz selektivnu pobudu protona receptora. C) Razlika daje spektar STD gdje su prisutni signali samo vezanih liganda, a njihov intenzitet ovisi o prostornoj udaljenosti od veznog mjesta receptora.³⁴



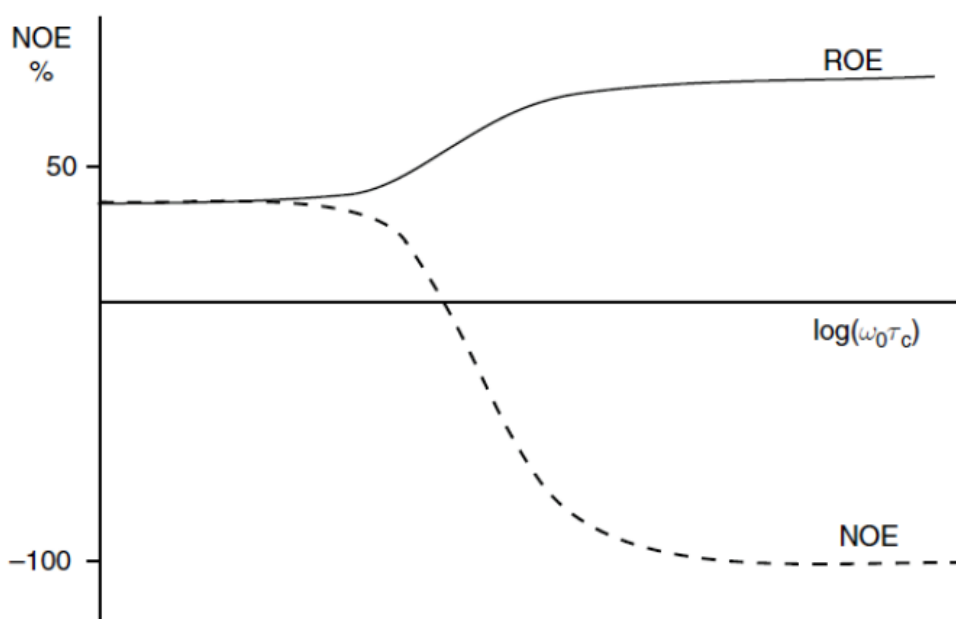
Slika 9. a) Spektar *on-resonance* oleandomicina b) spektar *off-resonance* oleandomicina nakon dodatka ribosoma (50 ppm) c) spektar STD oleandomicina u puferu tris- d_{11} pri 25 °C.²

2.3.2 Metoda *trNOESY*

Prijenosni NOESY (engl. *transferred nuclear Overhauser effect spectroscopy*, *trNOESY*) je brza i robusna dvodimenzijaska tehnika koja daje informacije o međusobnoj udaljenosti spinova promatranih jezgara. Temelji se na efektu NOE, odnosno na križnoj relaksaciji spinova koji su u dipolnoj sprezi, a nalaze se na udaljenosti manjoj od 5 Å.³⁵ Metodom *trNOESY* moguće je odrediti konformaciju liganda u slobodnom i vezanom stanju pa se stoga koristi za određivanje konformacije makrolida vezanih za ribosom.

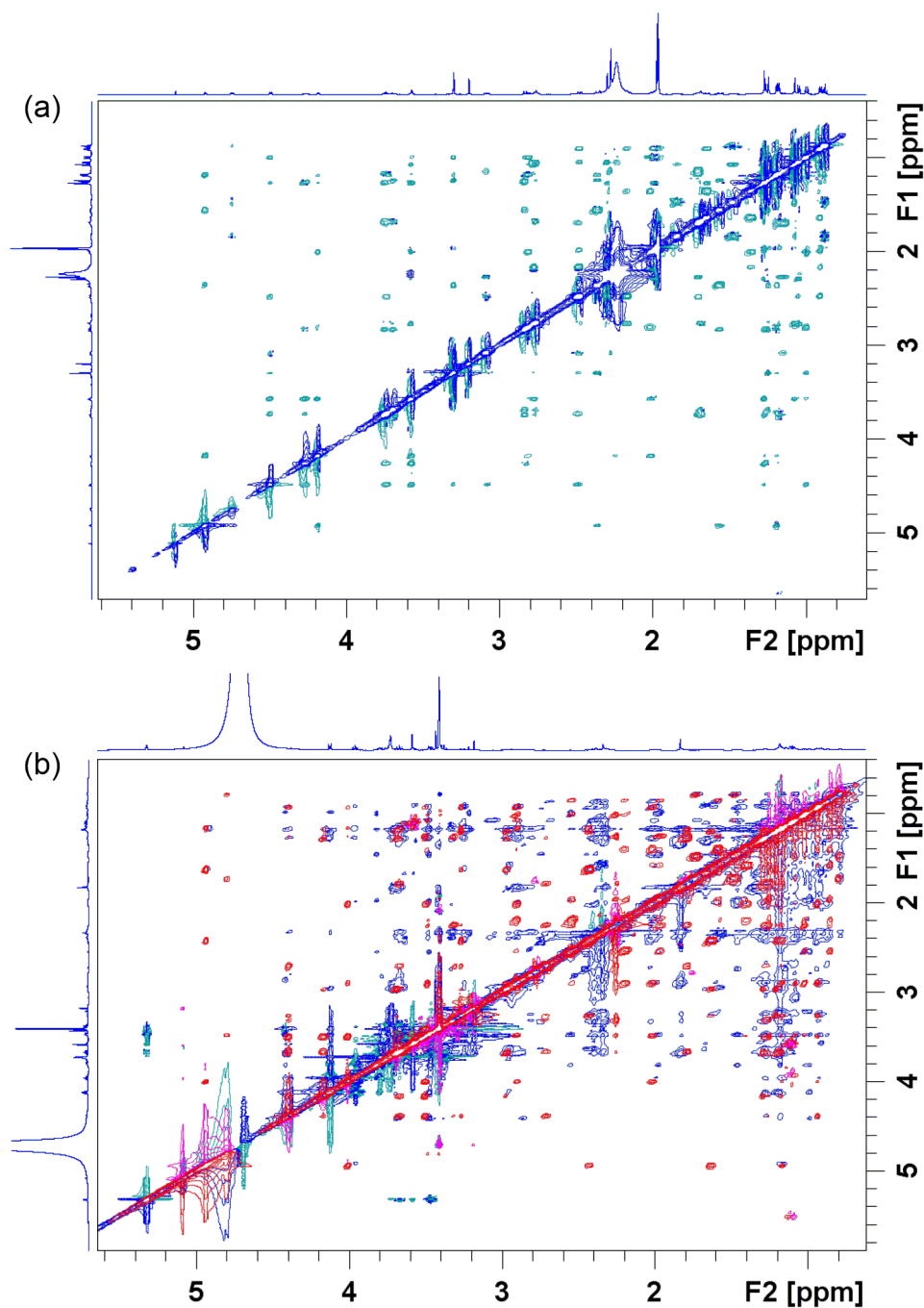
U spektru NOESY svake molekule postoje karakteristični signali NOE čiji predznak i intenzitet ovise o veličini molekule, viskoznosti otapala i brzini kretanja molekule kroz otapalo. Molekule manje od 1000 Da daju pozitivne vrijednosti signala NOE zbog kratkih korelacijskih vremena i brzog kretanja kroz medij.³⁵

Za veće molekule korelacijsko vrijeme je veće i brzina kretanja molekula kroz medij manja pa se u NOESY spektru pojavljuju negativni signali. Ovisnost intenziteta o korelacijskom vremenu prikazana je na slici 10. Makrolidi su molekule srednje veličine te njihovi signali NOE mogu biti pozitivni, negativni ili jednaki 0, ovisno o viskoznosti odabranog otapala. Vezanjem za ribosom makrolidi poprimaju svojstva receptora (ribosoma) pa se postižu puno dulja korelacijska vremena, što se u spektru NOESY manifestira pojavom negativnih signala NOE.^{4,36}



Slika 10. Ovisnost intenziteta signala NOESY i ROESY o logaritmu umnoška frekvencije vanjskog polja i korelacijskog vremena.³⁵

Metoda trNOESY se često primjenjuje u kombinaciji s molekularnim modeliranjem i rendgenskom strukturnom analizom. Jedan od primjera primjene ove metode jest određivanje konformacije derivata makrolida u kompleksu s ribosomom izoliranim iz *E. coli* (slika 10).⁴ Vezanjem za ribosom makrolidi poprimaju svojstva velike molekule što se očituje pojavom negativnih signala u spektru trNOESY. Takvim pristupom pokazano je da makrolidi vezani za ribosom imaju sličnu konformaciju kao u slobodnom stanju u otopini.⁴



Slika 11. a) Spektar NOESY 4''-aminopropil-azitromicina u acetonitrilu- d_3 prije dodatka ribosoma iz *E. coli*; b) spektar NOESY (ružičasti i crveni signali) i trNOESY (plavi i zeleni signali) istog spoja u puferu tris- d_{11} prije odnosno nakon dodatka ribosoma iz *E. coli*.⁴

2.4. Ostale tehnike proučavanja interakcija makrolida i ribosoma

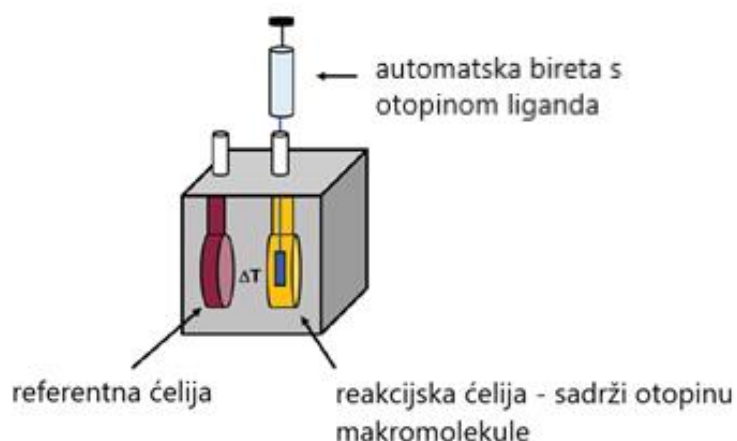
2.4.1 Izotermna titracijska kalorimetrija

Izotermna titracijska kalorimetrija (engl. *isothermal titration calorimetry*, ITC) je metoda koja se koristi za određivanje termodinamičkih parametara reakcije vezanja liganada i receptora u otopini. Metoda ITC se temelji na mjerenju izmijenjene topline tijekom kemijske reakcije i ima mnogo prednosti pred spektrofotometrijskim i fluorimetrijskim metodama, poput mogućnosti analize heterogenih i neprozirnih otopina bez kromofora i fluorofoara pri biološki relevantnim uvjetima (temperatura, pH, ionska jakost). Uz poznate biokemijske i strukturne podatke ITC pruža cjelovit uvid u mehanizam djelovanja antibiotika i drugih lijekova.^{37,38}

Primjenom ove metode može se dobiti kvantitativni opis termodinamike i kinetike vezanja liganda (npr. makrolida) na receptor uz korištenje malih količina uzorka (1–50 μM). Dobiveni podaci mogu doprinijeti boljem razumijevanju mehanizama djelovanja bioaktivnih liganada i utjecati na razvoj novih lijekova.

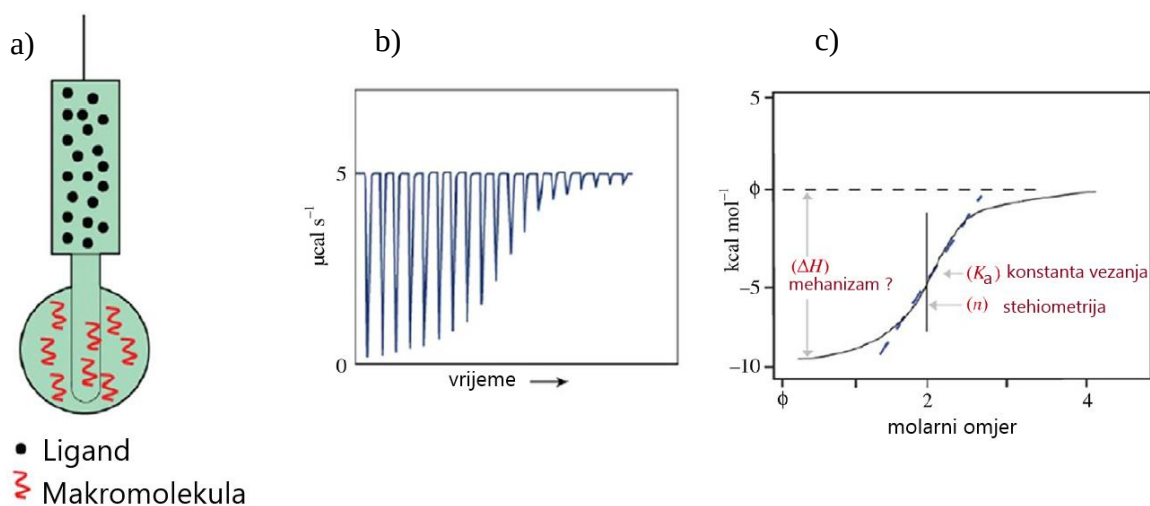
2.4.1.1. Princip izotermne titracijske kalorimetrije

Kalorimetar u kojem se odvija reakcija obavljen je adijabatskom stijjenkom koja onemogućuje izmjenu topline između sustava i okoline. Sustav za hlađenje i grijač simultanim djelovanjem održavaju stalnu temperaturu unutar kalorimetra. Sam kalorimetar se sastoji od dvije ćelije: referentne i reakcijske. Referentna ćelija obično sadrži otapalo ili pufer, dok je u reakcijskoj otopina receptora u odgovarajućem puferu. Otopine liganda i receptora moraju biti pripremljene u puferu jednakog sastava i vrijednosti pH. Pritom se otopina liganda dodaje u reakcijsku ćeliju kroz injekcijsku štrcaljku u odgovarajućim vremenskim intervalima.



Slika 12. Shematski prikaz izoternnog titracijskog kalorimetra.³⁹ autom bireta

Kemijskom reakcijom (npr. nastanka kompleksa makrolid-ribosom) dolazi do oslobađanja ili trošenja topline, ovisno o tome je li reakcija egzotermna ili endotermna. Kalorimetar tada primjenjuje snagu potrebnu za održavanje jednake temperature u reakcijskoj i referentnoj ćeliji. Rezultat mjerenja je termogram koji prikazuje vremensku ovisnost primijenjene snage (slika 13). Integriranjem primijenjene snage ($dP/\mu\text{cal s}^{-1}$) po vremenu dobiva se titracijska krivulja, odnosno prikaz ovisnosti promjene reakcijske entalpije o molarnom omjeru liganda i receptora.



Slika 13. a) Shematski prikaz receptora u reakcijskoj ćeliji i molekula liganda u injekcijskoj štrcaljci. b) Termogram: dijagram ovisnosti primijenjene snage o vremenu i c) titracijska krivulja. Parametri K_a , n i ΔH mogu se izravno očitati iz titracijske krivulje.³⁷

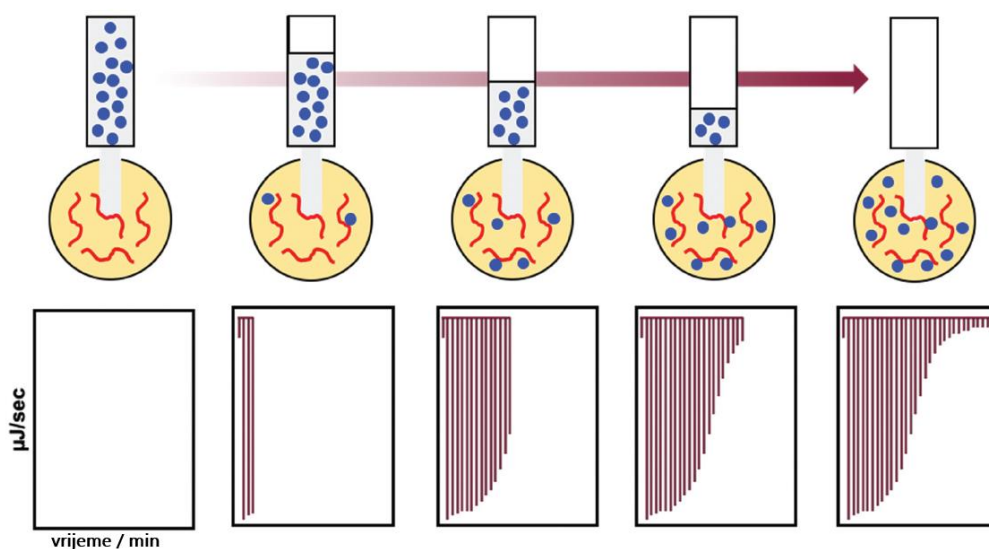
Toplina izmijenjena u reakciji vezanja makromolekule i liganda definirana je izrazom:

$$Q = \frac{V_o \Delta H_b [M_u] \{K_a [L]\}}{1 + K_a [L]} \quad (2)$$

pri čemu je Q toplina izmijenjena u reakciji, V_o volumen reakcijske ćelije, ΔH_b entalpija vezanja po molu liganda, $[M]_u$ ukupna koncentracija makromolekule u reakcijskoj ćeliji, K_a konstanta vezanja liganda i $[L]$ koncentracija nevezanog liganda.³⁷

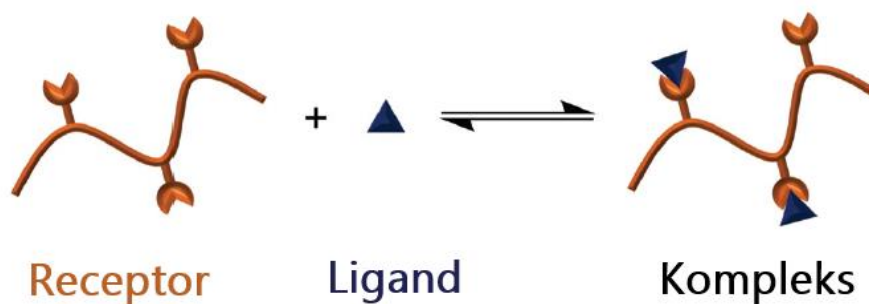
Iz izmjerene topline dobivamo važne termodinamičke parametre koji karakteriziraju reakciju vezanja liganda i receptora. Vrijednosti promjene entalpije ΔH , konstante vezanja K_a i stehiometrije reakcije n mogu se odrediti iz titracijske krivulje kao što je prikazano na slici 13. Nagib sigmoidne krivulje povezan je s konstantom K_a , okomica na os x koja prolazi kroz točku infleksije odgovara vrijednosti n , a iz oblika titracijske krivulje može se odrediti i reakcijska entalpija procesa vezanja.

Na početku reakcije dobivaju su veće vrijednosti promjene entalpije s obzirom da postoji puno slobodnih makromolekula na koje se mogu vezati molekule liganda. Napredovanjem reakcije postupno dolazi do zasićenja, smanjuje se broj slobodnih makromolekula što posljedično vodi slabijim signalima u termogramu i manjim vrijednostima promjene entalpije. Na kraju reakcije dobivene vrijednosti entalpije odgovaraju entalpiji razrjeđenja.³⁷



Slika 14. Izgled termograma u ovisnosti o tijeku reakcije.³⁹

Tipični model vezanja receptora i liganda prikazan je na slici 15. U ovom primjeru naglašena je komplementarnost oblika veznog mjesta receptora i liganda kao preduvjet za nastanak kompleksa. Metodom ITC se tako na temelju jednog eksperimenta dobiva ukupni termodinamički profil reakcije vezanja makromolekule i odgovarajućeg liganda.



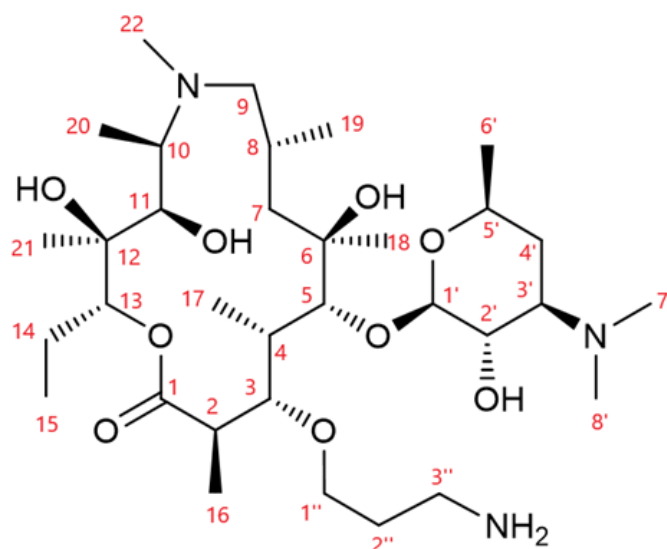
Slika 15. Prikaz vezanja receptora (nukleotidi u 23 S rRNA velike ribosomske podjedinice) i liganda (makrolida).³⁹

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Izotermna titracijska kalorimetrija - materijali i metode

Vezanje prekursora makrozona 3-O-aminopropil-azitromicina (slika 16) na ribosom iz *E. coli* proučavano je metodom ITC. Otopina ribosoma i kompetitora (peptid PrAMP, engl. *proline-rich antimicrobial peptide*) titrirana je otopinom 3-O-aminopropil-azitromicina pri čemu 3-O-aminopropil-azitromicin istiskuje vezani PrAMP zbog jačeg afiniteta vezanja za ribosom. Mjerene su entalpije vezanja prekursora makrozona i ribosoma u MOPS (3-(*N*-morfolino) propansulfonska kiselina) puferu. Pri pripremi uzoraka korišteni su sljedeći materijali:

- magnezijev klorid heksahidrat, Merck ($\geq 95\%$)
- kalijev klorid, LachNer ($\geq 99,5\%$)
- amonijev klorid, Alkaloid Skoplje ($\geq 99,8\%$)
- MOPS, Sigma Aldrich ($\geq 99,5\%$)
- PrAMP, GeneCust ($\geq 95\%$)
- 3-O-aminopropil-azitromicin, pripremljen na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Zagreb
- nedeuterirani 70 S ribosom iz bakterije *E. coli*, 620 U/mL, K. Vanatalu, Tallinn, Estonija



Slika 16. Struktura 3-O-aminopropil-azitromicina s brojanjem atoma.

Pufer je pripravljen na način opisan u tablici 1., a otopina makrolida otapanjem izvagane mase u odgovarajućem volumenu pufera.

Tablica 1. Priprema pufera za izotermnu titracijsku kalorimetriju.

Komponenta	<i>m</i> /mg	<i>c</i> /mmol L ⁻¹
Magnezijev klorid	16,7	7
Kalijev klorid	55,9	30
Amonijev klorid	93,6	70
MOPS	261,6	50

U otopinu pufera dodano je 1,75 µL otopine ditiotreitola (DTT) množinske koncentracije 1 mmol L⁻¹ i 1,25 mL otopine glicerola masenog udjela 5%. Svi navedeni sastojci otopljeni su u 25 mL D₂O. Izmjerena je i vrijednost pH pufera te je podešena na vrijednost pH ribosoma koja je iznosila 7,37.

Otopina 3-*O*-aminopropil-azitromicina množinske koncentracije 135 µmol L⁻¹ pripravljena je otapanjem 0,44 mg u 5 mL MOPS pufera. Otopina peptida PrAMP (*c*= 200 µmol L⁻¹) pripremljena je otapanjem 0,95 mg peptida u 2 mL MOPS pufera. Vrijednosti pH svih otopina su podešene na pH ribosoma koji je iznosio 7,37.

Za mjerenje je korišten instrument Malvern MicroCal Peaq-ITC. Parametri korišteni za mjerenje navedeni su u tablici 2.

Tablica 2. Uvjeti eksperimenta izotermne titracijske kalorimetrije.

<i>V</i> _{čelija} / mL	<i>g</i> / °C	<i>P</i> _{ref.} / µW	Broj točaka po eksperimentu	Vrijeme između dodataka / s
0,2048	30	30	30	300

3.2. Spektroskopija NMR - materijali i metode

Za pripremu uzoraka korištene su sljedeće kemikalije:

- klaritromicin, nabavljen iz PLIVA d.o.o., Hrvatska
- pufer tris-d₁₁, 98% D, *Cambridge Isotope Laboratories, Inc.*, Ujedinjeno Kraljevstvo
- acetonitril-d₃, 99,80 % D, *Eurisotop*, Ujedinjeno Kraljevstvo
- deuterirana voda, 99,90% D, *Eurisotop*, Ujedinjeno Kraljevstvo
- deuterirani 70 S ribosom iz bakterije *E. coli* u deuteriranom fosfatnom puferu, 330 U/mL, K. Vanatalu, Tallinn, Estonija

Uzorci su pripravljeni otapanjem klaritromicina u odgovarajućim otapalima čije su odvage i volumeni navedeni u tablici 3. Cjevčice s uzorcima uronjene su u ultrazvučnu kupelj kako bi se klaritromicin što bolje otopio.

Tablica 3. Odvage i volumeni uzoraka za snimanje spektara NMR.

otapalo	<i>m</i> (klaritromicin) / mg	<i>V</i> (otapalo) / μ L
acetonitril-d ₃	2,6	600
deuterirana voda (D ₂ O)	1,87	500
tris-d ₁₁ pufer	1,87	500

Za snimanje spektara STD i trNOESY otopini klaritromicina dodano je 9 μ L otopine deuteriranog 70 S ribosoma iz bakterije *E. coli* koncentracije 1,43 mmol L⁻¹ u deuteriranom fosfatnom puferu pri čemu je omjer koncentracija klaritromicina i ribosoma iznosio 3500:1.

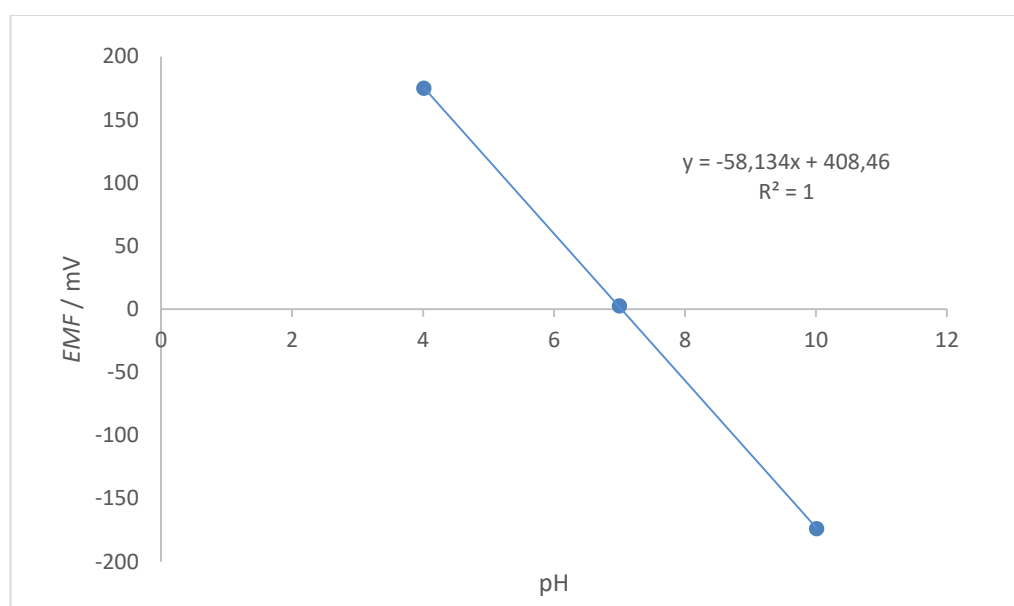
3.2.1 Određivanje vrijednosti pH otopine klaritromicina

Pripravljena je otopina klaritromicina u deuteriranoj vodi (D₂O) te joj je određena vrijednost pH. Kalibracija pH-metra provedena je pomoću tri pufera vrijednosti pH 4,01, 7,00 i 10,01, a

izmjerene elektromotivnosti prikazane su u tablici 4. Konstruiran je baždarni pravac prikazan na slici 17.

Tablica 4. Kalibracija pH-metra pomoću tri pufera različitih vrijednosti pH.

pH	EMF / mV
4,01	174,9
7,00	2,4
10,01	-173,9
x	-128,9



Slika 17. Ovisnost elektromotivnosti o vrijednosti pH otopine.

Iz jednadžbe baždarnog pravca određene su vrijednosti nagiba $a = -58,134$ i odsječka na y osi $b = 408,46$. Izmjerena je elektromotivnost otopine klaritromicina u D₂O od -128,9 mV i vrijednost pH 7,41. Točnost kalibracije provjerena je preko jednažbe pravca.

3.2.2 Uvjeti snimanja spektara NMR

Određivanje strukture, konformacije i istraživanje interakcija klaritromicina s ribosomom u otopini provedeni su pomoću jedno- (^1H , DEPTQ i STD) i dvodimenzijskih (COSY, HSQC, HMBC, NOESY, ROESY i trNOESY) tehnika NMR. Spektari su snimljeni u acetonitrilu- d_3 , deuteriranoj vodi i puferu tris- d_{11} na spektrometru Bruker Avance Neo 600 opremljenom z-gradijentima i inverznom krio-probom Prodigy pri konstantnom magnetnom polju od 14,1 T.

Za snimanje spektara ^1H NMR korištena je spektralna širina 11904,72 Hz. Broj snimaka je 16–128, broj točaka u vremenskoj domeni iznosio je 32 K, a digitalno razlučivanje 0,36 Hz po točki. Vrijeme akvizicije iznosilo je 2,75 s. Korišten je pulsni program *zg30*.

DEPTQ spektar snimljen je uz spektralnu širinu 38461 Hz s vremenom akvizicije 0,917 s. Broj snimaka iznosio je 8192, broj točaka u vremenskoj domeni 32 K, a digitalno razlučivanje 1,17 Hz po točki. Korišten je pulsni program *deptqgppsp*.

Za snimanje spektara COSY korišteno je 2048 točaka u F2 dimenziji i 256 inkremenata u F1 dimenziji. Za svaki inkrement primijenjene su 3–4 snimke. Spektralno područje iznosilo je 6250–9090 Hz u F2 dimenziji te 6002–9002 Hz u F1 dimenziji. Korišten je pulsni program *cosygppppqf*.

Za snimanje spektara HSQC korišteno je 4096 točaka u F2 dimenziji i 256 inkremenata u F1 dimenziji. Za pojedini inkrement primijenjeno je 42–96 snimaka uz relaksacijsko vrijeme odgode 1,5 s. Spektralno područje iznosilo je 5882–915 Hz u F2 dimenziji i 27166–27166 Hz u F1 dimenziji. Korišten je pulsni program *hsqcedetgppsp.3*.

Spektari HMBC snimljeni su u području 6250–9090 Hz u F2 dimenziji i 33204–37882 Hz u F1 dimenziji. Primijenjeno je 4096 točaka u F2 dimenziji i 256 inkremenata u F1 dimenziji uz pulsni program *hmbcgpndqf*.

Za snimanje spektara NOESY korišteno je 2048 točaka u F2 dimenziji te 512 inkremenata u F1 dimenziji. Primijenjen je pulsni program *noesyphpr*. Spektralna širina iznosila je 5882–9615 Hz u F2, odnosno 6001–9602 Hz u F1 dimenziji. Relaksacijsko vrijeme odgode iznosilo je 2 s, a vrijeme miješanja 0,400 s.

Spektar ROESY je snimljen uz spektralnu širinu 5882 Hz u F2 dimenziji te 6001 Hz u F1 dimenziji pomoću pulsnog programa *roesyphpp*.2. Korišteno je 2048 točaka u F2 dimenziji i 256 inkremenata u F1 dimenziji. Relaksacijsko vrijeme odgode iznosilo je 1,85 s.

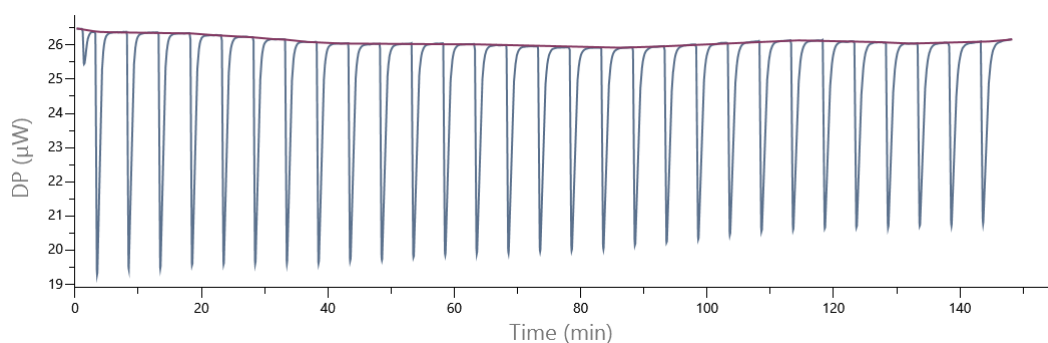
Za snimanje spektra trNOESY korišteno je 2048 točaka u F2 dimenziji i 512 inkremenata u F1 dimenziji. Korišten je pulsni program *noesyphpr*. Spektralna širina iznosila je 9615 Hz u F2, odnosno 9602 Hz u F1 dimenziji. Relaksacijsko vrijeme odgode iznosilo je 2 s, a vrijeme miješanja 0,075 s.

Spektri STD NMR snimljeni su pri frekvencijama *on-resonance* od 4,8 kHz (8 ppm) i *off-resonance* od 30,0 kHz (50 ppm) uz dodatak 70 S ribosoma u deuteriranom fosfatnom puferu. Korišten je pulsni slijed *stdiffesgp*, broj snimaka iznosio je 512, a vrijeme zasićenja 3 s. Snimljen je veći broj spektara koji su zbrojeni s ciljem poboljšanja omjera signala i šuma.

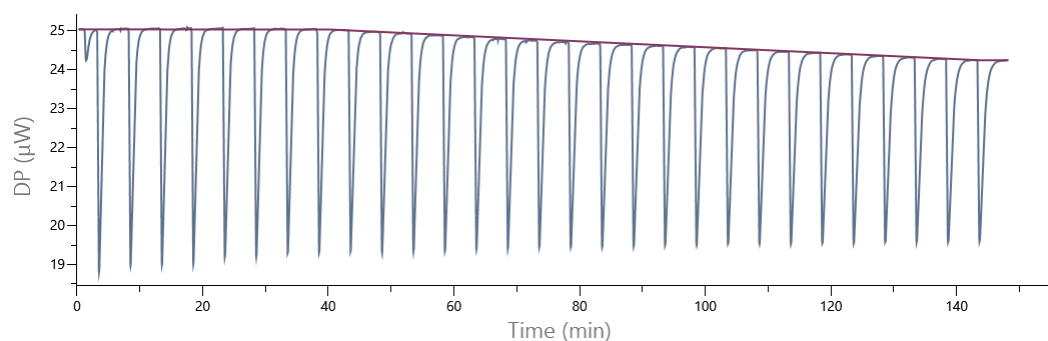
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Proučavanje interakcija derivata azitromicina s ribosomom iz bakterije *E. coli* pomoću izotermne titracijske kalorimetrije

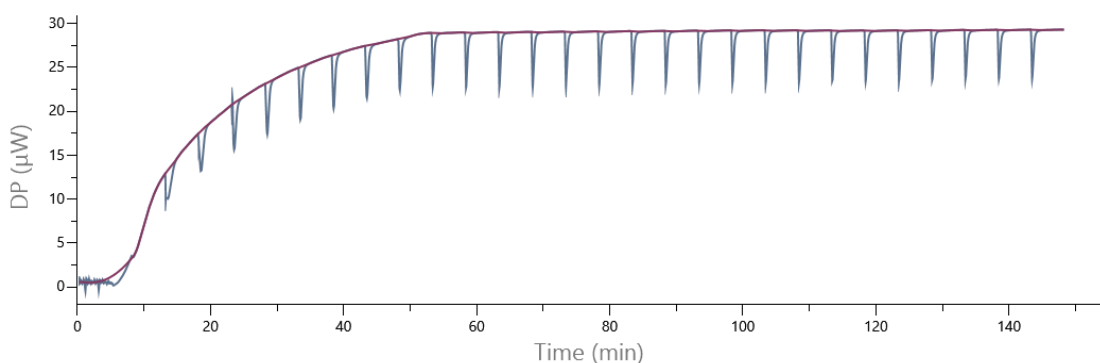
Interakcije 3-*O*-aminopropil-azitromicina i ribosoma proučavane su metodom ITC. Cilj ovih eksperimenata bio je kvantitativno opisati vezanje 3-*O*-aminopropilnog prekursora makrozona na ribosom iz bakterije *E. coli* mjerenjem snage (μW) proporcionalne oslobođenoj ili utrošenoj toplini. Provedeno je više eksperimenata s otopinama ribosoma različitih koncentracija ($14,8 \mu\text{mol L}^{-1}$, $12,3 \mu\text{mol L}^{-1}$, $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ i $3,33 \mu\text{mol L}^{-1}$). Međutim, entaplije vezanja bile su preniske za kvalitetnu kvantifikaciju interakcija što je vidljivo iz termograma koji nisu karakterističnog sigmoidnog oblika.



Slika 18. Termogram dobiven titracijom otopine ribosoma ($c = 14,8 \mu\text{mol L}^{-1}$) i peptida PrAMP ($c = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$) otopinom 3-*O*-aminopropil-azitromicina ($c = 135 \mu\text{mol L}^{-1}$).



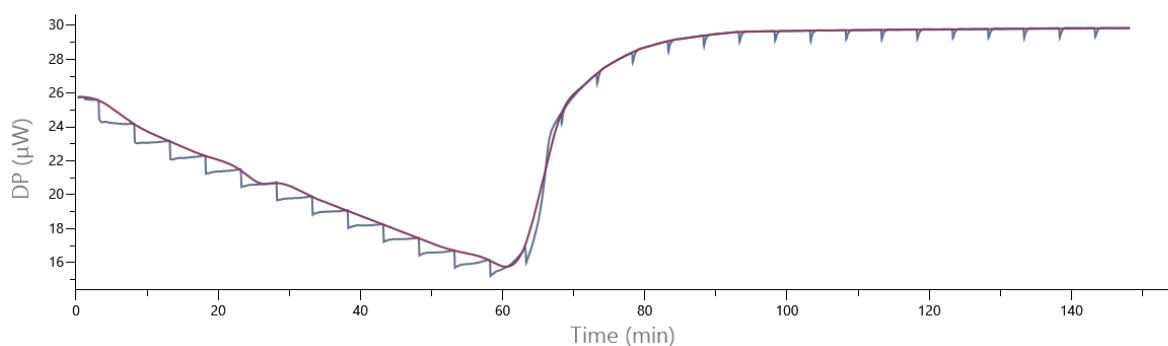
Slika 19. Termogram dobiven titracijom otopine ribosoma ($c = 12,3 \mu\text{mol L}^{-1}$) i peptida PrAMP ($c = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$) otopinom 3-*O*-aminopropil-azitromicina ($c = 135 \mu\text{mol L}^{-1}$).



Slika 20. Termogram dobiven titracijom otopine ribosoma ($c = 4 \mu\text{mol L}^{-1}$) i peptida PrAMP ($c = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$) otopinom 3-*O*-aminopropil-azitromicina ($c = 135 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Titracijom smjese otopina ribosoma ($c = 4 \mu\text{mol L}^{-1}$) i peptidnog kompetitora PrAMP ($c = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$) otopinom 3-*O*-aminopropil-azitromicina ($c = 135 \mu\text{mol L}^{-1}$) dobiven je blagi skok (slika 20), ali entalpije su i dalje bile preniske za kvantifikaciju vezanja.

Zatim je promijenjen pristup tako da je otopina 3-*O*-aminopropil-azitromicina titrirana smjesom otopina ribosoma i PrAMP, pri čemu je ribosom korišten kao titrant. U ovom slučaju uočen je određeni skok u titracijskoj krivulji (slika 21), ali on i dalje nije odgovarao profilu jednostavnog vezanja. Stoga iz dobivenih rezultata nije bilo moguće dobiti kvantitativni opis vezanja 3-*O*-aminopropil-azitromicina.



Slika 21. Termogram dobiven titracijom otopine 3-*O*-aminopropil-azitromicina ($c = 1,35 \mu\text{mol L}^{-1}$) i peptida PrAMP ($c = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$) otopinom ribosoma ($c = 14,8 \mu\text{mol L}^{-1}$).

4.2. Strukturna karakterizacija klaritromicina pomoću spektroskopije NMR

Struktura klaritromicina u acetonitrilu- d_3 , deuteriranoj vodi i puferu tris- d_{11} okarakterizirana je primjenom jedno- i dvodimenzijskih tehnika spektroskopije NMR. Zbog bolje topljivosti klaritromicina, u acetonitrilu- d_3 i D_2O je postignut veći omjer signala i šuma u odnosu na pufer tris- d_{11} .

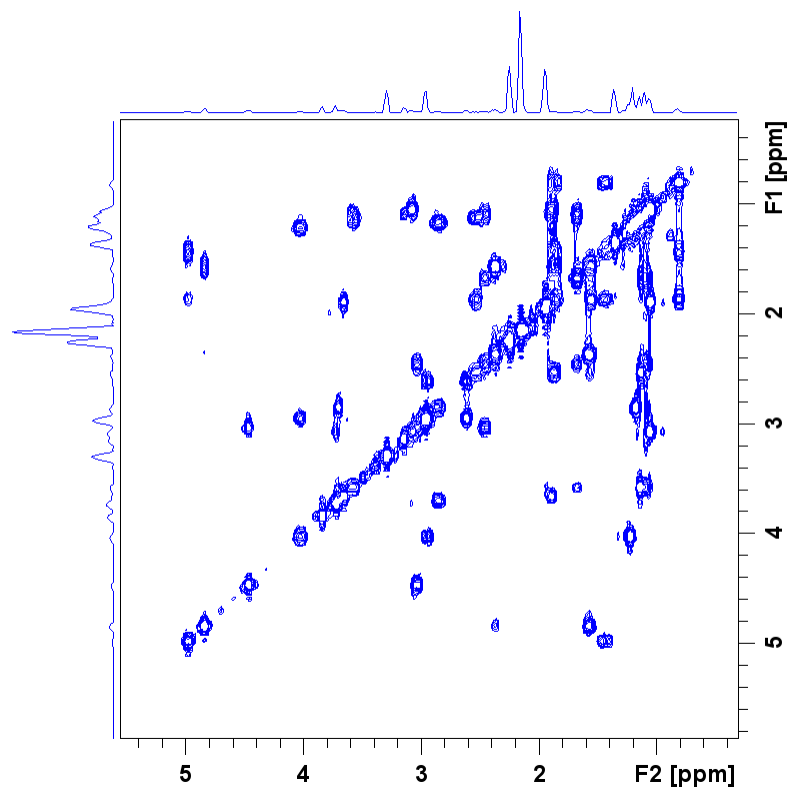
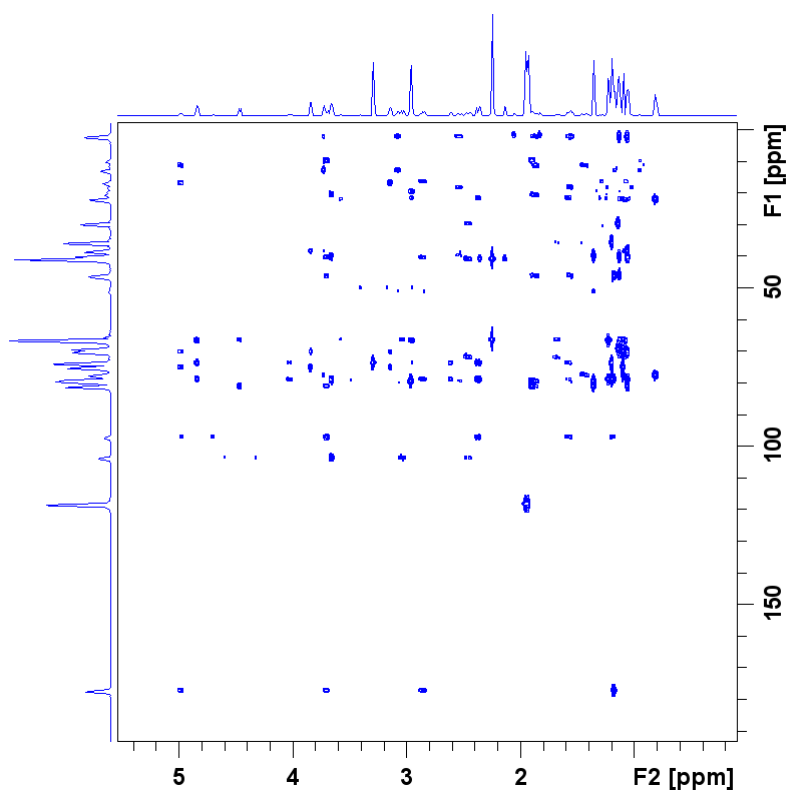
4.2.1 Struktura i konformacija klaritromicina u acetonitrilu- d_3

Kemijski pomaci klaritromicina u acetonitrilu- d_3 asignirani su na temelju 1H NMR, DEPTQ, HSQC, HMBC i COSY spektara.

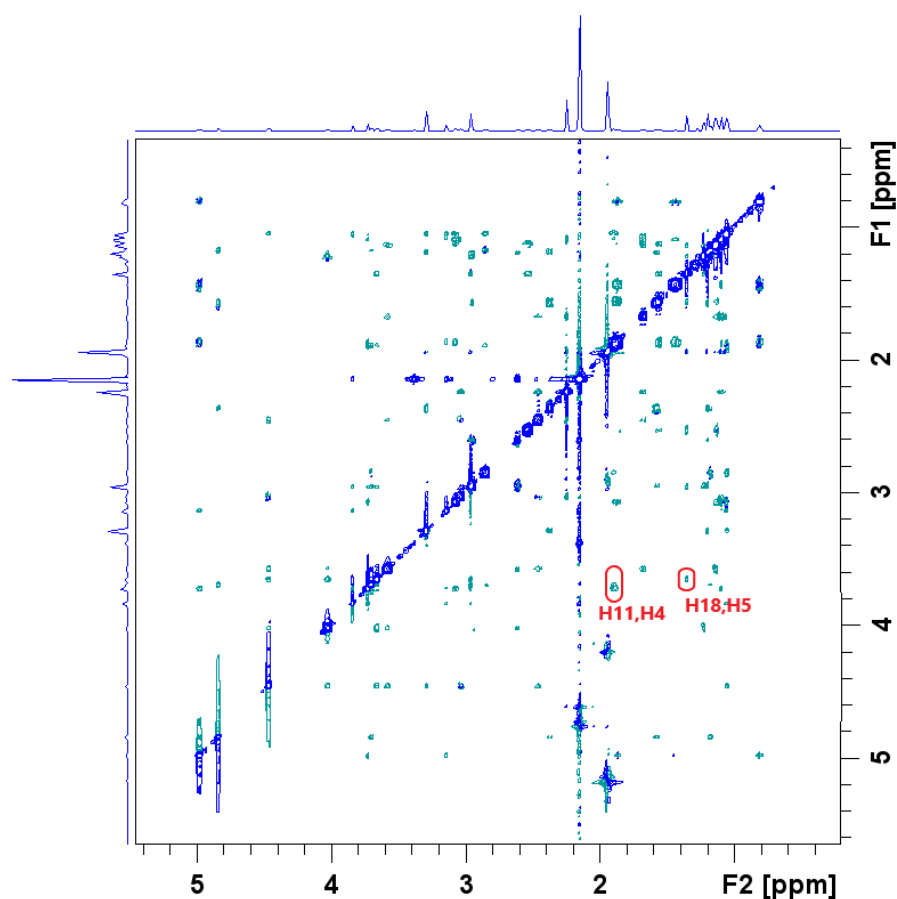
Pomoću spektra DEPTQ asignirani su ugljikovi atomi, pri čemu su CH i CH_3 skupine negativne faze, a C i CH_2 pozitivne faze. Na temelju HSQC korelacija asignirani su protoni direktno vezani na odgovarajuće ugljikove atome. Analizom spektra HMBC i spektra COSY provjerene su korelacije kroz više kemijskih veza te spinski sustavi što je olakšalo asignaciju pojedinih 1H i ^{13}C kemijskih pomaka. Asignacije 1H i ^{13}C kemijskih pomaka klaritromicina u acetonitrilu- d_3 prikazane su u tablici 5. Iz spektra COSY (slika 22) može se uočiti da je proton 12-OH u korelaciji s metilnom skupinom na položaju 21 (21Me), dok 11-OH, koji je udaljen za jednu vezu više od metilne skupine 21, nije u korelaciji s istom metilnom skupinom. Na temelju navedenog podatka asignirani su protoni skupina 11-OH i 12-OH. Korelacija kroz tri kemijske veze između skupina 12-OH i 21Me potvrđena je i u spektru HMBC (slika 23), dok korelacija između 11-OH i 21Me nije prisutna. Nadalje, u spektru HMBC mogu se uočiti korelacije između skupine 4"-OH i 3" te 4"-OH i 4" pri čemu se 4"-OH cijepa u dublet te korelacije između skupina 1' i 2' koje su potvrđene analizom COSY spektra.

Tablica 5. Asignacija ^1H i ^{13}C NMR kemijskih pomaka klaritromicina u acetonitrilu- d_3 .

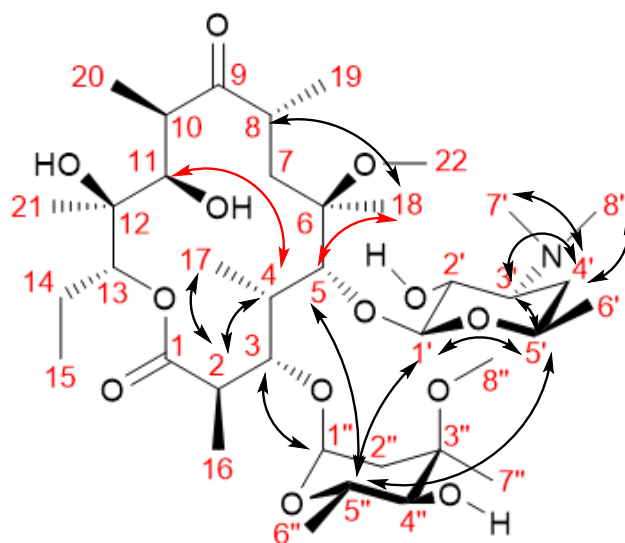
Atom	$\delta(^1\text{H})$ / ppm	$\delta(^{13}\text{C})$ / ppm	Atom	$\delta(^1\text{H})$ / ppm	$\delta(^{13}\text{C})$ / ppm
1		177,65	19	1,13	18,47
2	2,85	46,46	20	1,06	13,06
3	3,70	79,11	21	1,09	17,01
4	1,89	40,69	22	2,96	51,40
5	3,66	81,40	1'	4,47	103,97
6		79,73	2'	3,03	72,25
7eq; 7ax	1,88; 1,56	40,22	3'	2,46	66,64
8	2,53	46,39	4'eq; 4'ax	1,68; 1,10	29,93
9		222,42	5'	3,58	69,54
10	3,08	38,61	6'	1,14	22,27
11	3,72	70,51	7'; 8'	2,24	40,98
11OH	3,84		1''	4,84	97,40
12		75,45	2''eq; 2''ax	2,37; 1,58	35,89
12OH	3,14		3''		74,00
13	4,98	77,80	4''	2,95	79,22
14eq; 14ax	1,86; 1,43	22,29	4''OH	2,61	
15	0,81	11,48	5''	4,03	66,89
16	1,17	16,63	6''	1,22	19,70
17	1,05	10,04	7''	1,19	21,91
18	1,35	20,80	8''	3,29	50,22

Slika 22. Spektar COSY klaritromicina u acetonitrilu-d₃.Slika 23. Spektar HMBC klaritromicina u acetonitrilu-d₃.

Konformacija klaritromicina u slobodnom stanju u acetonitrilu- d_3 određena je tehnikama NOESY i ROESY. Analizom spektra NOESY u acetonitrilu- d_3 (slika 24) određeno je da klaritromicin u slobodnom stanju zauzima konformaciju *folded-out*, što potvrđuju i korelacije u spektru ROESY. Pronađeni su NOE kontakti (slika 25) između H4-H11 i H5-Me18 koji ukazuju na prostornu blizinu navedenih protona karakterističnu za konformaciju *folded-out*.

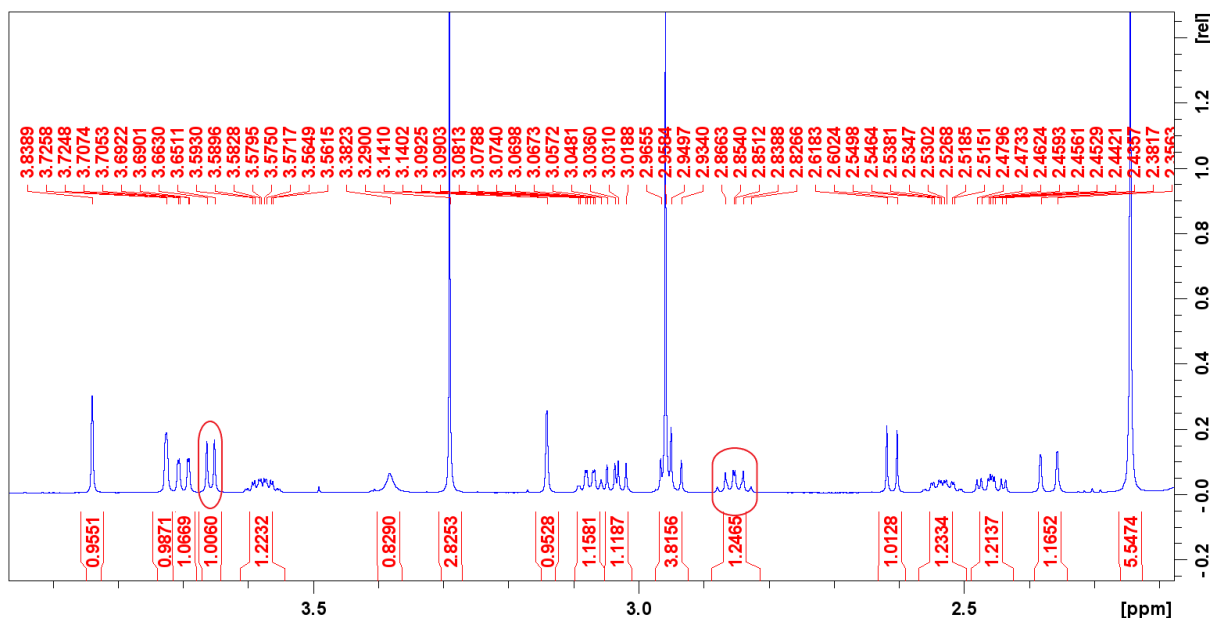


Slika 24. Spektar NOESY klaritromicina u acetonitrilu- d_3 . NOE kontakti karakteristični za konformaciju *folded-out* zaokruženi su i označeni crvenom bojom.



Slika 25. NOE kontakti klaritromicina u acetonitrilu- d_3 . NOE kontakti H4-H11 i H5-H18 označeni su crvenom bojom.

Rezultate analize NOESY i ROESY korelacija potvrđuje i vrijednost konstante skalarne sprege između protona u položajima 2 i 3, koja iznosi približno 9,4 Hz i odgovara vrijednosti dobivenoj za konformaciju *folded-out*.²⁵



Slika 26. Uvećani dio spektra ^1H NMR klaritromicina snimljenog u acetonitrilu- d_3 . Crvenom bojom označeni su signali protona u položajima 2 i 3 sa spregom karakterističnom za konformaciju *folded-out*.

4.2.2 Struktura i konformacija klaritromicina u D₂O

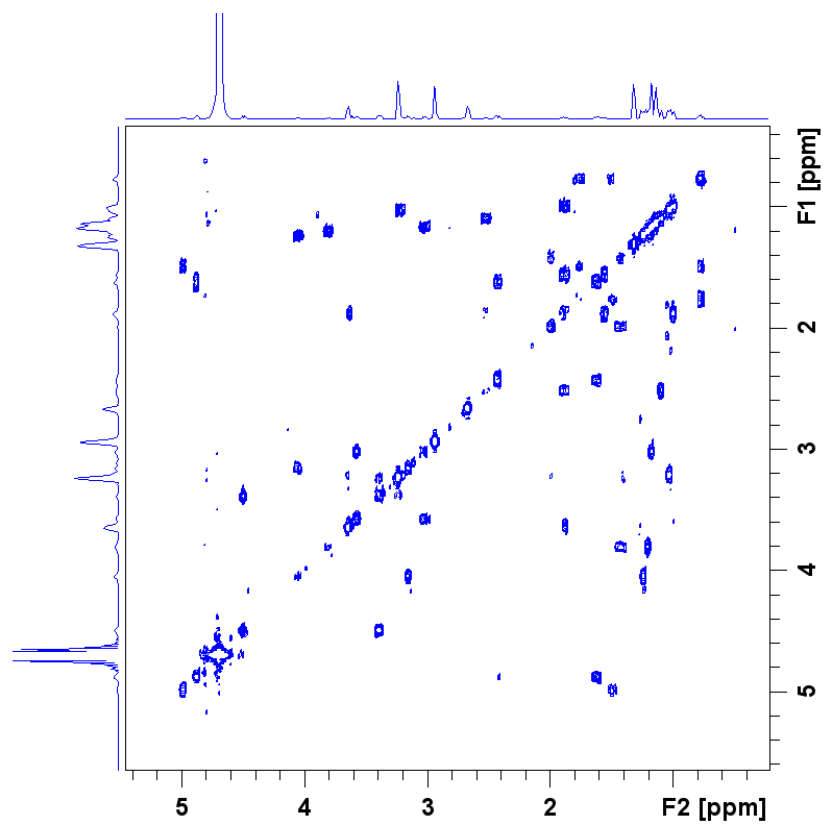
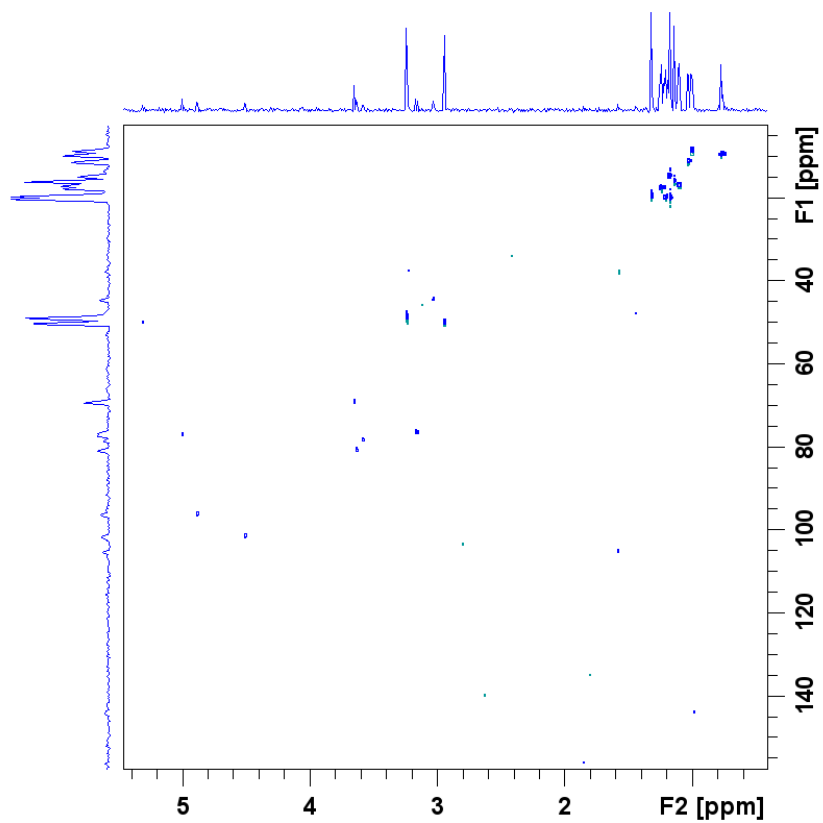
Analizom spektara ¹H NMR, COSY, HSQC i HMBC asignirani su ¹H i ¹³C kemijski pomaci klaritromicina u D₂O (tablica 6). Otopini klaritromicina u D₂O izmjeren je i podešen pH na 7,41 kako bi što bolje odgovarao fiziološkim uvjetima.

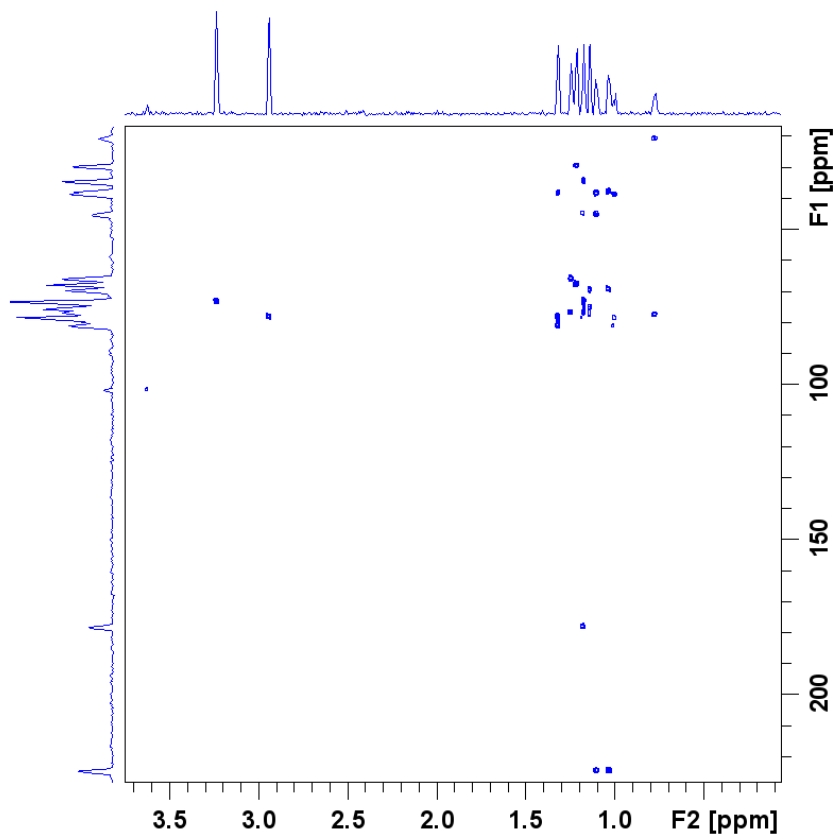
U spektru COSY (slika 27) uočene su korelacije između susjednih protona saharidnih jedinica makrolaktonskog prstena. Na temelju HSQC korelacija asignirani su protoni direktno vezani na odgovarajuće ugljikove atome. Analizom spektra HSQC (slika 28) pronađen je signal protona na položaju 3' koji nije vidljiv u ostalim spektrima, a vezan je na C-atom čiji se kemijski pomak nalazi pri 64,37 ppm. Pomoću spektra HMBC (slika 29) identificirane su skupine 19Me i 20Me te je pronađena skupina 16Me koja je dublet djelomično prekriven singletom protona 7". Signal pri ≈ 225 ppm odgovara ketonu, iz čega se može zaključiti da postoji korelacija između keto- skupine 9 makrolaktonskog prstena i skupina 19Me i 20Me kroz 2 veze. Skupina 16Me je u korelaciji sa skupinom 1 makrolaktonskog prstena, dok je skupina 7" u korelaciji sa skupinama 3" i 4". Na temelju tih korelacija razlikuju se skupine 16Me i 7" koje su u spektrima djelomično prekrivene.

Dobiveni podaci su u dobrom slaganju s asignacijama klaritromicina u fosfatnom puferu iz rada J. Barber i sur.¹² Mala odstupanja kemijskih pomaka u fosfatnom puferu od vrijednosti navedenih u tablici 6 mogu se objasniti razlikama u sastavu i svojstvima otapala.

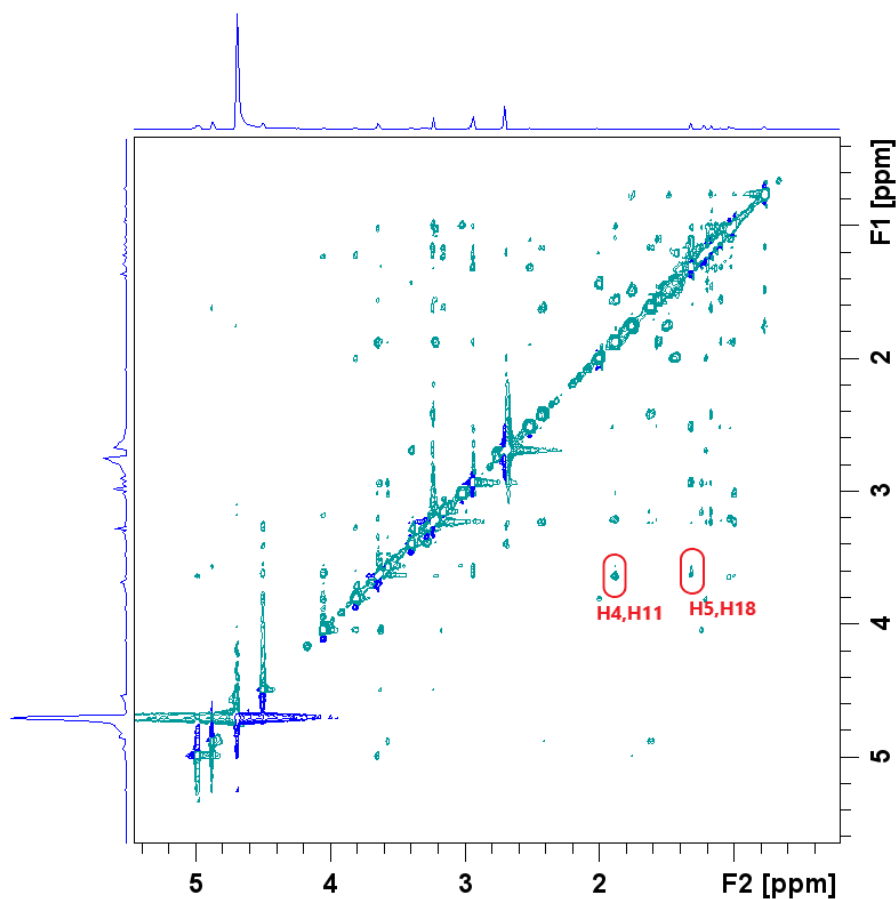
Tablica 6. Asignacija ^1H i ^{13}C NMR kemijskih pomaka klaritromicina u D_2O .

Atom	$\delta(^1\text{H})$ / ppm	$\delta(^{13}\text{C})$ / ppm	Atom	$\delta(^1\text{H})$ / ppm	$\delta(^{13}\text{C})$ / ppm
1		178,21	19	1,10	16,98
2	3,02	44,63	20	1,03	11,25
3	3,63	80,97	21	1,14	16,01
4	1,88	38,80	22	2,94	50,21
5	3,57	78,52	1'	4,51	101,68
6		81,13	2'	3,41	69,29
7eq; 7ax	1,88; 1,56	38,17	3'	3,25	64,37
8	2,52	45,08	4'eq; 4'ax	2,02; 1,44	29,49
9		224,72	5'	3,82	67,67
10	3,22	37,57	6'	1,21	20,02
11	3,65	69,23	7'; 8'		
11OH			1''	4,89	96,33
12		75,45	2''eq; 2''ax	2,43; 1,62	34,31
12OH			3''		73,30
13	5,00	77,31	4''	3,16	76,77
14eq; 14ax	1,76; 1,49	20,56	4''OH		
15	0,77	9,58	5''	4,05	65,75
16	1,18	14,83	6''	1,24	17,65
17	1,00	8,61	7''	1,17	20,21
18	1,32	19,54	8''	3,24	48,90

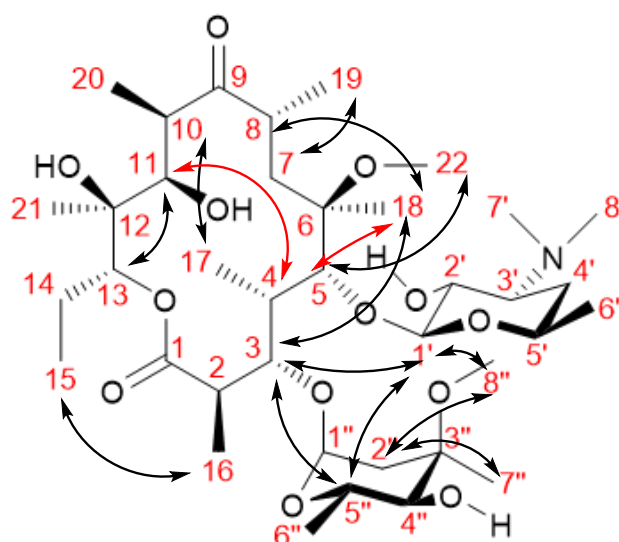
Slika 27. Spektar COSY klaritromicina u D₂O.Slika 28. Spektar HSQC klaritromicina u D₂O.

Slika 29. Spektar HMBC klaritromicina u D₂O.

Konformacija klaritromicina u slobodnom stanju u D₂O određena je tehnikom NOESY. Analizom spektra NOESY u D₂O (slika 30) određeno je da klaritromicin u slobodnom stanju zauzima konformaciju *folded-out*, što je pokazano i u acetonitrilu-d₃. Pronađeni su NOE kontakti koji ukazuju na prostornu blizinu protona na položajima 4 i 11, odnosno 5 i 18, što odgovara konformaciji *folded-out*. Važniji NOE kontakti između protona klaritromicina u D₂O označeni su na slici 31.



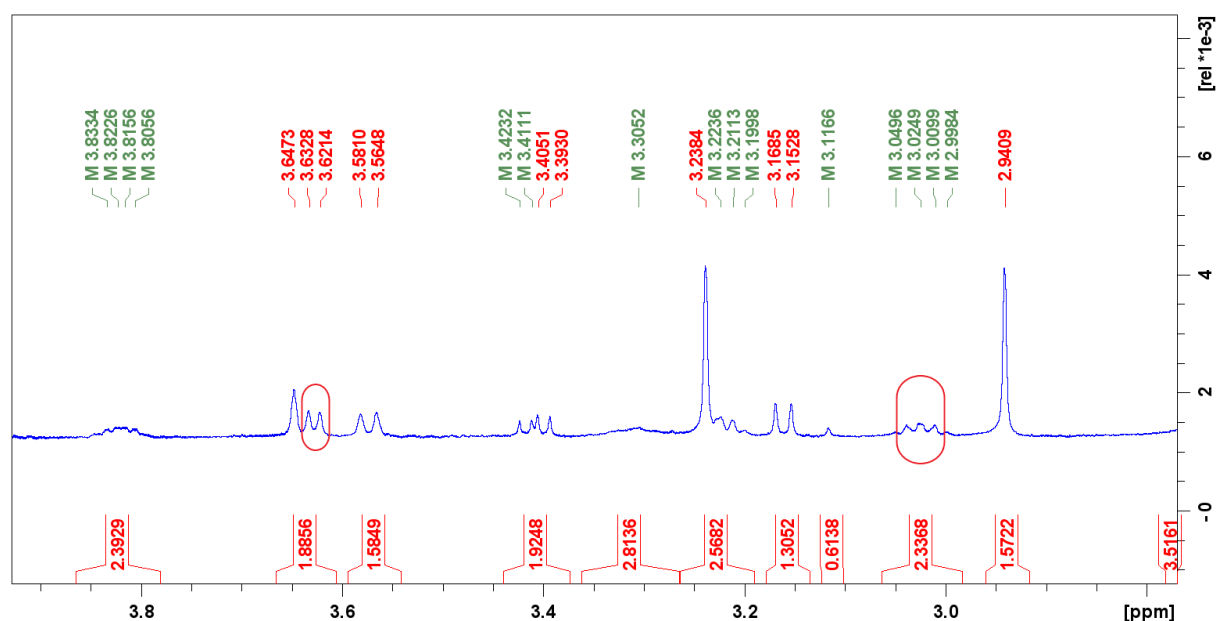
Slika 30. Spektar NOESY klaritromicina u D₂O. NOE kontakti karakteristični za konformaciju *folded-out* zaokruženi su i označeni crvenom bojom.



Slika 31. NOE kontakti klaritromicina u D₂O. Crvenom bojom označeni su NOE kontakti između protona H4-H11 i H5-H18.

Prisutnost konformacije *folded-out* potvrđena je na temelju konstante skalarne sprege između protona u položajima 2 i 3 koja iznosi 8,2 Hz. Navedena vrijednost manja je u odnosu na rezultat dobiven u acetonitrilu- d_3 , ali je i dalje bliža vrijednostima karakterističnima za konformaciju *folded-out*, što je u skladu s podacima objavljenima u radu J. Barber i sur.¹⁶

U radu I. Miroshnyk i sur.⁴⁰ objavljena je konformacija klaritromicina u čvrstom stanju određena rendgenskom strukturnom analizom. Na temelju prostorne blizine atoma H4 i H11 te velikog torzijskog kuta H2-C2-C3-H3 zaključeno je da se radi o konformaciji *folded-out*.⁴⁰



Slika 32. Uvećani dio ^1H NMR spektra klaritromicina snimljenog u D_2O . Crvenom bojom označeni su signali protona u položajima 2 i 3 sa spregom karakterističnom za konformaciju *folded-out*.

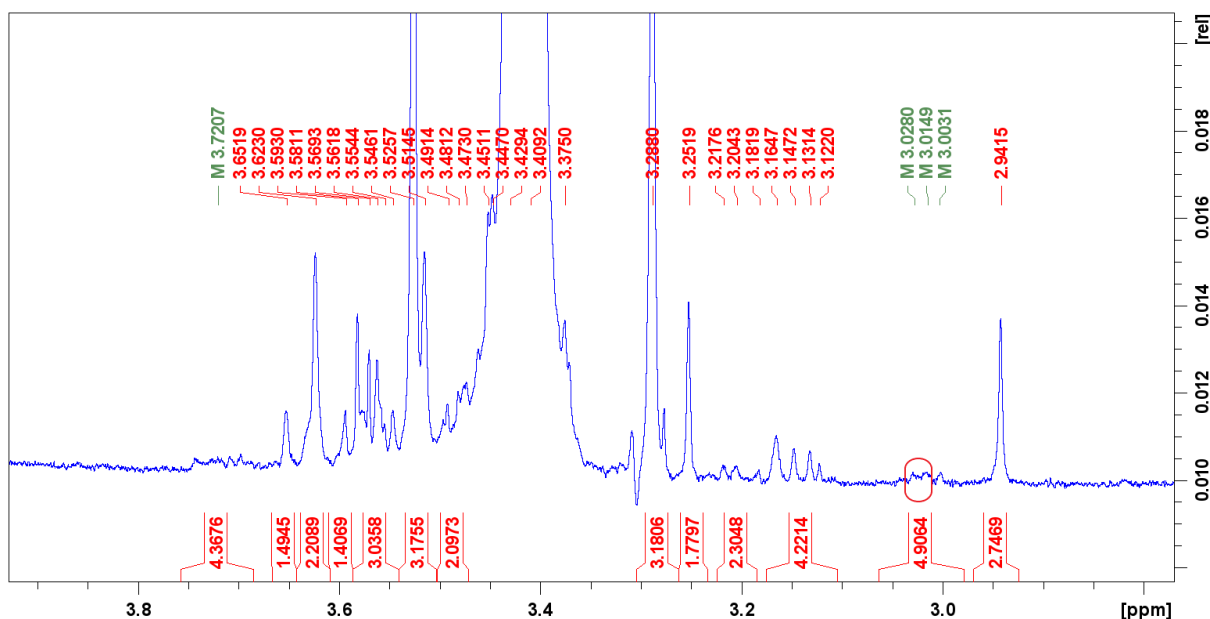
4.2.3 Struktura i konformacija klaritromicina u puferu tris- d_{11}

Zbog slabe topljivosti klaritromicina u puferu tris- d_{11} , asignacija ^1H NMR kemijskih pomaka provedena je djelomično, usporedbom s podacima dobivenima u acetonitrilu- d_3 i D_2O . Asignacije ^1H kemijskih pomaka klaritromicina u puferu tris- d_{11} prikazane su u tablici 7. U puferu tris- d_{11} vidljivi su signali skupina 7' i 8' koji izostaju u spektrima snimljenima u acetonitrilu- d_3 i D_2O . Izostanak signala u navedenim otapalima može se objasniti mogućnošću razgradnje istih skupina u D_2O ili zbog relaksacijskih svojstava molekule klaritromicina.

Tablica 7. Asignacija ^1H NMR kemijskih pomaka klaritromicina u puferu tris- d_{11} .

Atom	$\delta(^1\text{H})$ / ppm	Atom	$\delta(^1\text{H})$ / ppm
1		19	1,10
2	3,01	20	1,04
3	3,62	21	1,14
4	1,87	22	2,94
5	3,58	1'	
6		2'	
7eq; 7ax	1,84; 1,58	3'	
8	2,52	4'eq; 4'ax	2,09; 1,44
9		5'	3,72
10	3,21	6'	1,21
11	3,65	7'; 8'	2,24
11OH		1''	
12		2''eq; 2''ax	2,43; 1,62
12OH		3''	
13		4''	3,16
14eq; 14ax	1,77; 1,49	4''OH	
15	0,78	5''	4,10
16	1,18	6''	1,25
17	1,01	7''	1,18
18	1,32	8''	3,25

Konstanta $J_{\text{H}_2, \text{H}_3}$ izračunata iz spektra ^1H NMR iznosi 7,5 Hz, što ukazuje da klaritromicin i u puferu tris- d_{11} zauzima konformaciju *folded-out*. Mala odstupanja izračunate konstante od rezultata kojeg su objavili A. Awan i sur.⁴¹ mogu se objasniti utjecajem niskog omjera signala i šuma na preciznost mjerenja.

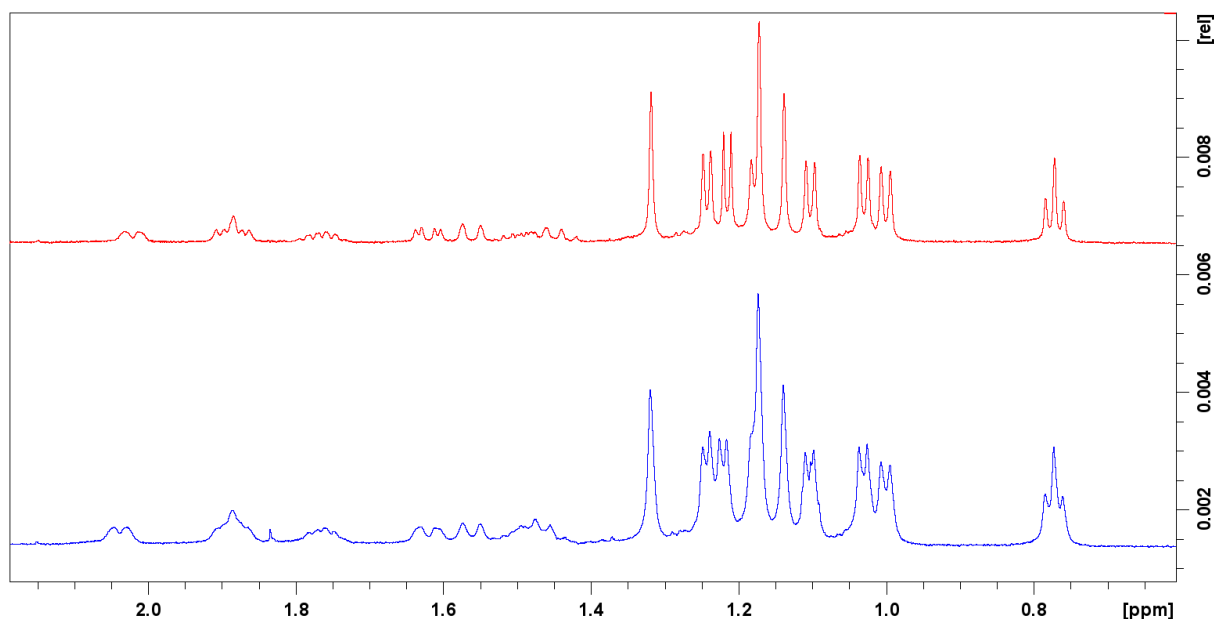


Slika 33. Uvećani dio ^1H NMR spektra klaritromicina snimljenog u puferu tris- d_{11} . Crvenom bojom označeni su signali protona u položajima 2 i 3 sa spregom karakterističnom za konformaciju *folded-out*.

4.3. Proučavanje interakcija klaritromicina s ribosomom iz bakterije *E. coli* pomoću spektroskopije NMR

4.3.1 Spektar ^1H NMR klaritromicina nakon dodatka ribosoma

Usporedbom spektara ^1H NMR klaritromicina prije i nakon dodatka ribosoma može se uočiti širenje pojedinih signala (slika 34). Makrolid vezanjem za ribosom poprima svojstva velike molekule što dovodi do promjene vremena relaksacije i posljedično širenja signala u spektru. Širenje signala nakon dodatka ribosoma je prva indikacija da dolazi do vezanja klaritromicina za ribosom. Nadalje, uočen je pad vrijednosti konstante sprege $J_{\text{H}_2, \text{H}_3}$ nakon dodatka ribosoma zbog širenja signala. Kako bismo dobili više podataka o konformaciji klaritromicina i veznim epitopima, interakcije s ribosomom su detaljnije proučene metodama trNOESY i STD.



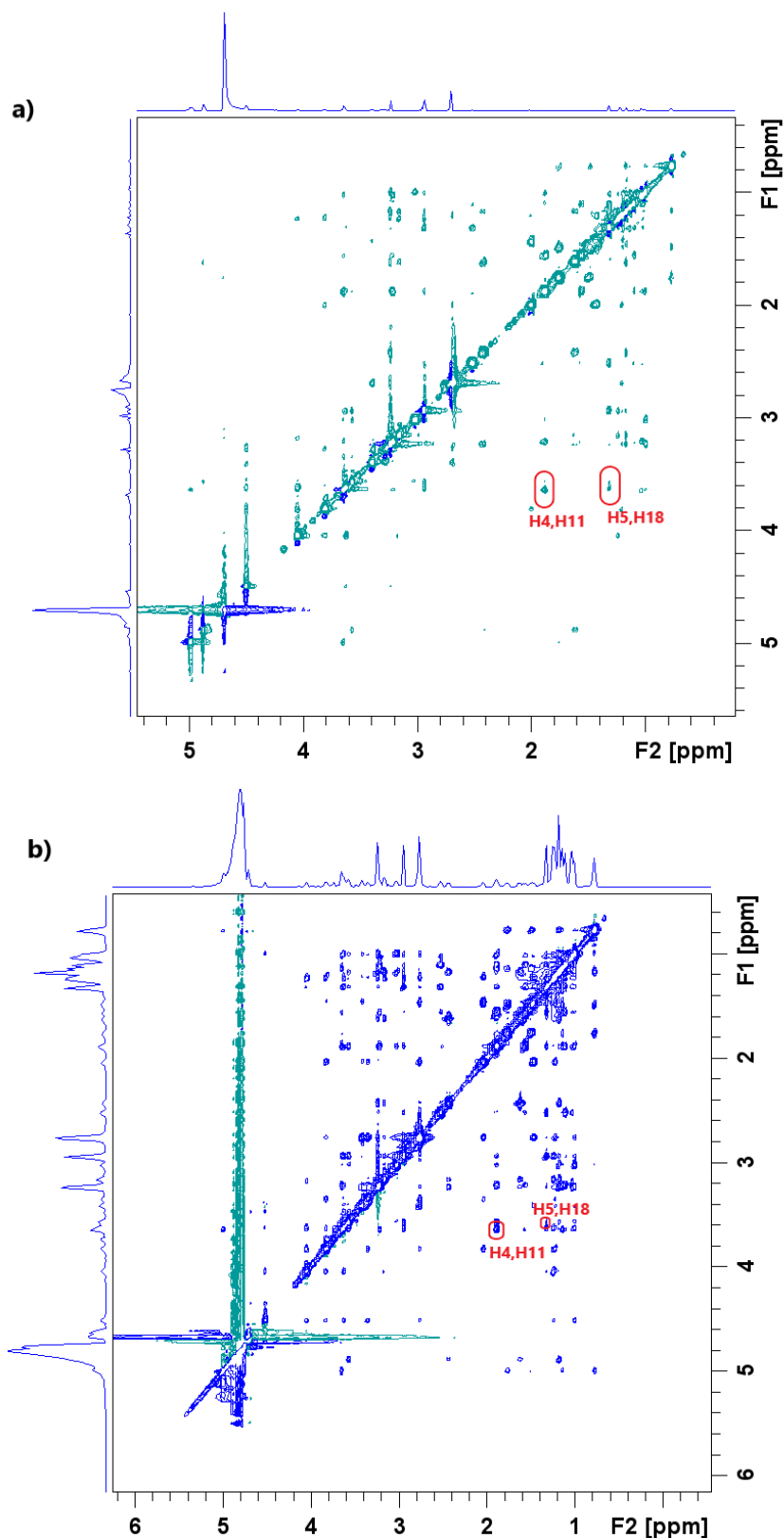
Slika 34. Uvećani prikaz dijela spektra (0–2,0 ppm) ^1H NMR klaritromicina u D_2O prije (crveno) i nakon dodatka ribosoma (plavo).

4.3.2 Istraživanje vezanja i konformacije klaritromicina metodom trNOESY

Metodom trNOESY istraženo je vezanje klaritromicina na ribosom te je određena njegova konformacija u vezanom stanju. Dobiveni spektar trNOESY klaritromicina u D_2O uspoređen je sa spektrom NOESY klaritromicina u D_2O (slika 35) te je uočeno da dolazi do pojave novih korelacija, povećanja intenziteta i promjene predznaka signala NOE. Takav spektar ukazuje na nastanak kompleksa klaritromicin-ribosom.

Na spektru trNOESY (slika 35b) označeni su kontakti H4-H11 te H5-H18 koji ukazuju da klaritromicin vezanjem za ribosom ostaje u konformaciji *folded-out*. Ostali važniji kontakti između protona klaritromicina u vezanom stanju prikazani su na slici 36 i u tablici 8.

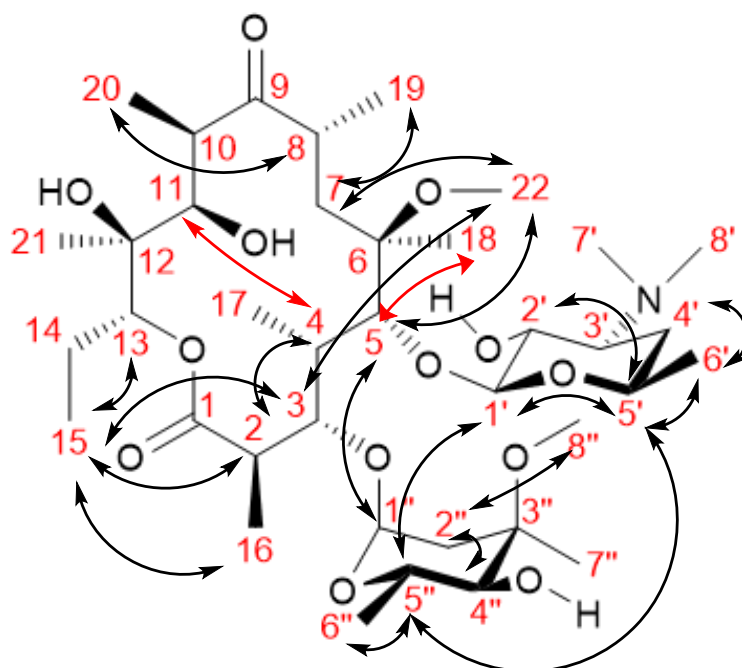
Dobiveni podaci u skladu su s rezultatima konformacijske analize klaritromicina vezanog za ribosom iz bakterije *E. coli* u fosfatnom puferu metodama trNOESY i molekulskog modeliranja, što potvrđuje konformaciju *folded-out* u vezanom stanju.⁴²



Slika 35. a) Spektar NOESY klaritromicina prije dodatka ribosoma; b) spektar trNOESY klaritromicina nakon dodatka ribosoma. NOE kontakti karakteristični za *folded-out* konformaciju zaokruženi su i označeni crvenom bojom.

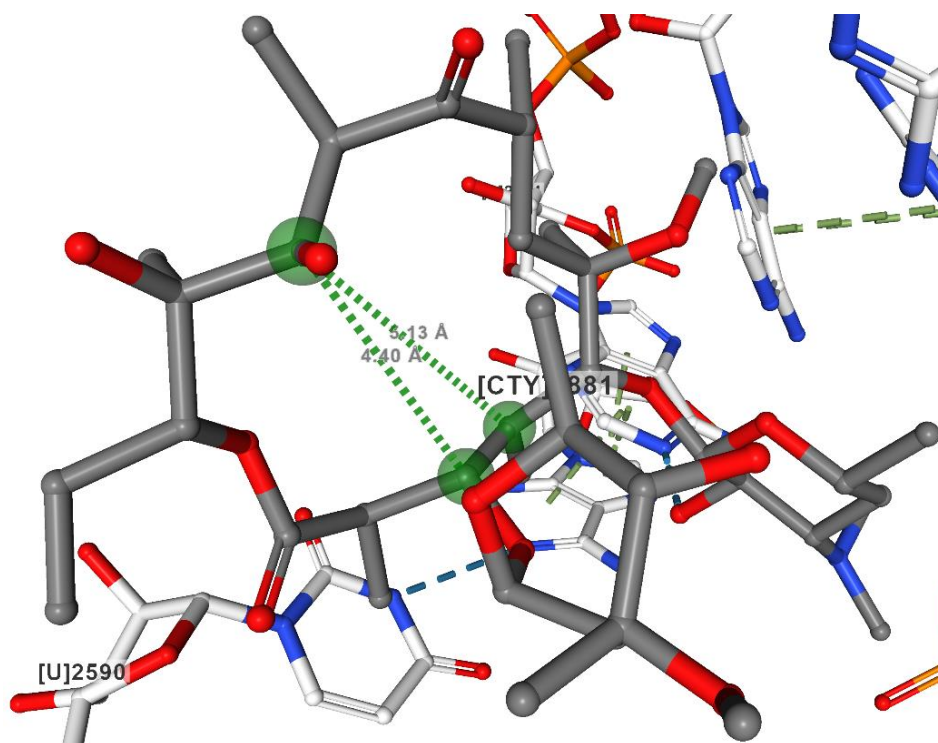
Tablica 8. Važniji NOE kontakti asignirani iz spektra trNOESY klaritromicina u D₂O. Crvenom bojom označeni su signali H4-H11 i H5-H18 važni za određivanje konformacije klaritromicina u otopini, a crnom bojom ostali NOE kontakti.

Atom	2	3	4	5	7	10	11	13	15	16	18	19	20	22	1'	2'	4'	5'	6'	1''	2''	4''	5''	6''	8''
2			x						x																
3									x		x			x	x										
4	x						x																		
5											x									x					
7						x						x	x	x											
10					x																				
11			x																						
13									x																
15	x	x						x		x															
16									x																
18		x		x																					
19					x																				
20					x																				
22		x			x																				
1'		x																					x		
2'																		x							
4'																			x						
5'																x			x				x		
6'																	x	x							
1''				x																					
2''																						x			x
4''																					x				
5''															x			x					x		
6''																						x			
8''																					x				



Slika 36. NOE kontakti klaritromicina u vezanom stanju u D₂O.

Konformacija klaritromicina u kompleksu s ribosomom određena je i u radu F. Schlünzen i sur.⁴³ primjenom rendgenske strukturne analize. Na slici 37 prikazane su udaljenosti između atoma H3-H11 te H4-H11 klaritromicina pri čemu se atomi H3-H11 nalaze bliže nego H4-H11. Ovaj podatak ukazuje da bi klaritromicin vezan za ribosom iz bakterije *Deinococcus radiodurans* mogao zauzimati konformaciju *folded-in*. Razlika u dobivenim rezultatima može se objasniti primjenom različitih metoda i bioloških sustava (ribosomi izolirani iz različitih bakterija).



Slika 37. Udaljenosti atoma H3-H11 (4,40 Å) i H4-H11 (5,13 Å) klaritromicina vezanog za podjedinicu 50 S ribosoma iz bakterije *D. radiodurans* određene rendgenskom strukturnom analizom (PDB kôd: 1J5A). Sivom bojom označena je molekula klaritromicina, bijelom bojom nukleotidi molekule 23 S rRNA, crvenom bojom atomi kisika, a plavom bojom atomi dušika.⁴³

4.3.3 Optimiranje eksperimenta STD za sustav makrolid-ribosom

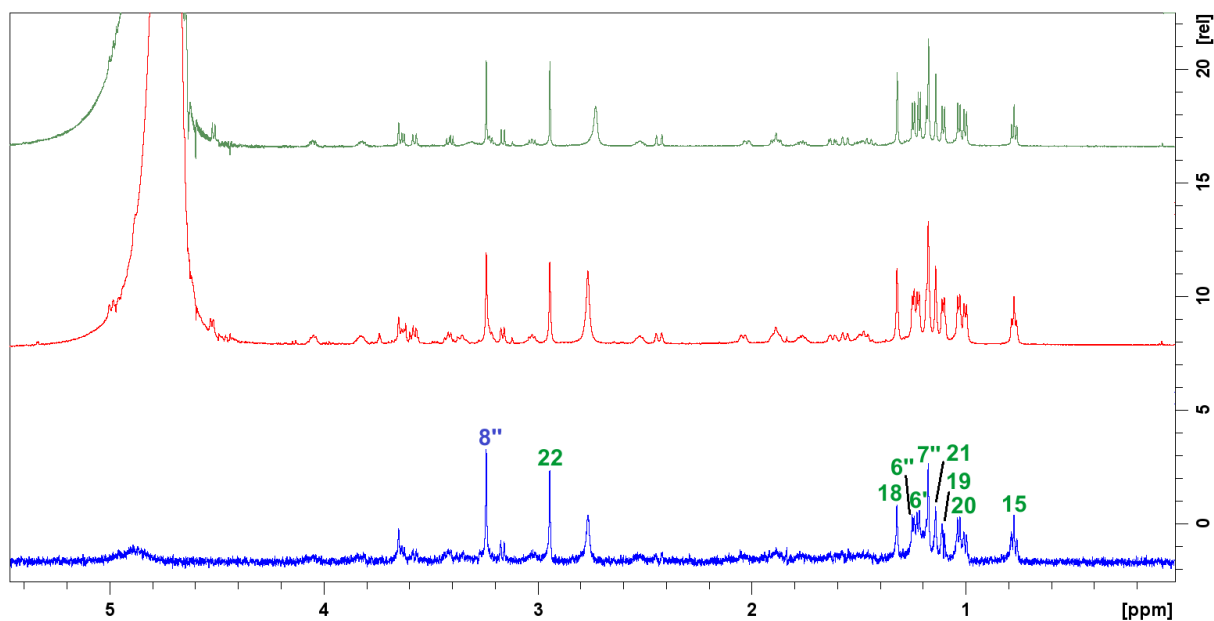
Prilikom snimanja spektara STD korišteni su optimirani parametri za proučavanje interakcija makrolida i ribosoma preuzeti iz prethodnih eksperimenata STD na makrolidima. Snimani su spektri STD s različitim brojem snimaka kako bi se poboljšao omjer signala i šuma. Snimljeni spektri STD su zbrojeni naredbom *adsu* radi postizanja veće osjetljivosti i boljeg razlučivanja.

4.3.4 Određivanje veznih epitopa metodom STD

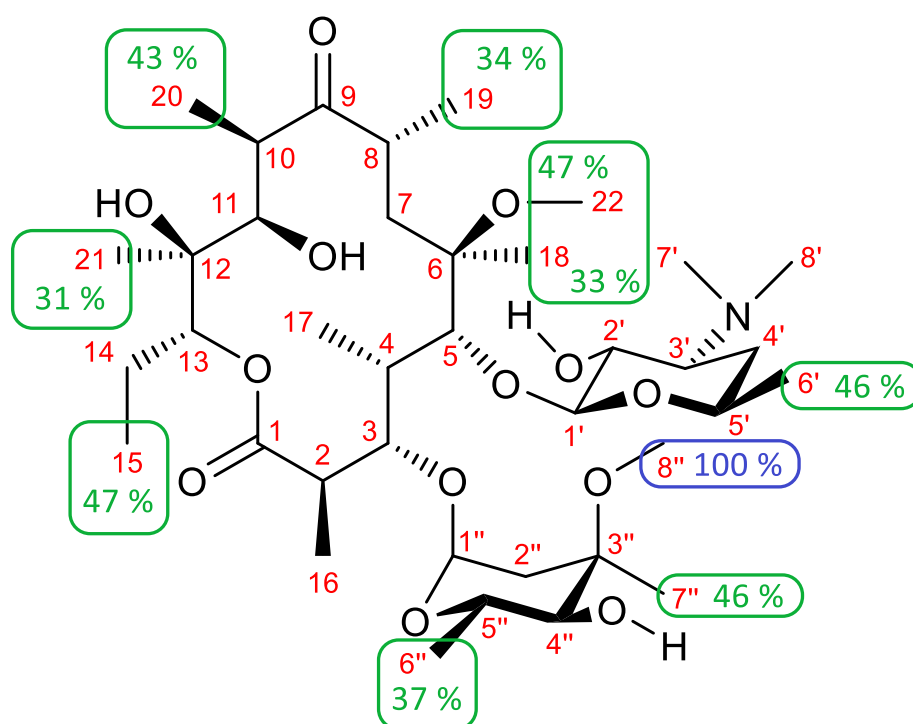
Metodom STD proučene su interakcije klaritromicina i ribosoma iz bakterije *E. coli* te su određeni epitopi vezanja klaritromicina. Na temelju dobivenih i obrađenih spektara STD zaključeno je da dolazi do vezanja klaritromicina za ribosom.

Prilikom vezanja klaritromicina za ribosom dolazi do prijenosa magnetizacije s ribosoma na one skupine klaritromicina koje su stupile u interakciju s ribosomom te su signali tih skupina vidljivi u spektru STD (slika 38). Signali skupina koje su u bliskom kontaktu s ribosomom prikazani su na slici 38c. Signali najvećih intenziteta odgovaraju skupinama koje su najbliže ribosomu. Vezni epitopi klaritromicina s pridruženim pojačanjima signala STD označeni su na slici 39. Istaknute su skupine klaritromicina na položajima 22, 6, 19, 20, 21 i 15 na markolaktonskom prstenu, zatim metilna skupina desosaminskog prstena na položaju 6' te metilne skupine kladinoznog prstena na položajima 6'', 7'' i 8''. Navedene skupine prema dobivenim pojačanjima signala STD ostvaruju interakcije s odgovarajućim nukleotidima 50 S ribosomske podjedinice bakterije *E. coli*. Dobiveni podaci mogu se usporediti s rezultatima objavljenima u radu F. Schlünzen i sur.⁴³ gdje su proučavane kristalne strukture makrolida (eritromicina, klaritromicina i roksitromicina) u kompleksu s 50 S ribosomskom podjedinicom iz bakterije *D. radiodurans*. Autori su istaknuli interakcije skupine 2'-OH makrolida s atomima N6 i N1 nukleotida A2041 te N6 nukleotida A2042. Navedene su i interakcije skupine 6-OH (kod eritromicina i roksitromicina), odnosno metoksi skupine na položaju 22 klaritromicina s nukleotidom A2045 te skupina 11OH i 12OH s kisikom O4 nukleotida U2588. S druge strane, nisu pronađene interakcije između skupina kladinoznog prstena i 50 S podjedinice ribosoma iz bakterije *D. radiodurans*. Navedene razlike u rezultatima mogu se objasniti primjenom različitih uvjeta analize, metoda i bioloških sustava (ribosomi izolirani iz različitih bakterija). Pritom je važno istaknuti da se makrolidi pri fiziološkim uvjetima nalaze u otopini, dok su F. Schlünzen i sur.⁴² proučavali komplekse makrolida i ribosoma u čvrstom stanju. Spektroskopija NMR u tom smislu ima veliku prednost jer omogućuje određivanje strukture pri uvjetima u otopini te dobivanje realnijeg i potpunijeg opisa interakcija u biološkim sustavima.

Za usporedbu, snimljeni su i spektri STD u puferu tris-d₁₁. Kao što se može uočiti na slici 40, STD pojačanja su se mogla izračunati za manji broj skupina, zbog niskog omjera signala i šuma uzrokovanog slabijom topljivošću klaritromicina u puferu tris-d₁₁ u odnosu na D₂O.



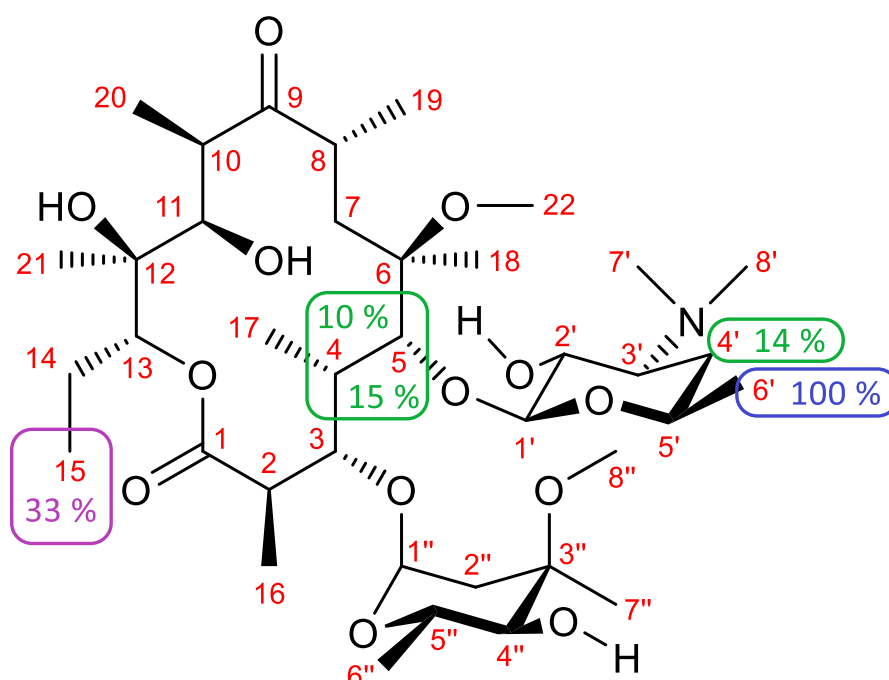
Slika 38. Interakcije klaritromicina i ribosoma u D_2O proučavane tehnikom STD: a) spektar ^1H NMR klaritromicina prije dodatka ribosoma te spektri b) *off resonance* i c) STD klaritromicina nakon dodatka ribosoma s označenim skupinama.



Slika 39. Epitopi vezanja klaritromicina u D_2O izračunati iz spektara STD.

Tablica 9. Odnos pojačanja signala STD klaritromicina prilikom vezanja za ribosom i udaljenosti od ribosoma u D₂O.

$I_{STD} / \%$	$d / \text{Å}$
50–100	3,0–3,3
30–50	3,3–4,0



Slika 40. Epitopi vezanja klaritromicina u puferu tris-d₁₁ izračunati iz spektra STD.

Tablica 10. Odnos pojačanja signala STD klaritromicina prilikom vezanja za ribosom i udaljenosti od ribosoma u puferu tris-d₁₁.

$I_{STD} / \%$	$d / \text{Å}$
50–100	3,0–3,3
30–50	3,3–4,0
10–30	4,0–6,0

§ 5. ZAKLJUČAK

Struktura, konformacija i interakcije makrolida klaritromicina s ribosomom izoliranim iz bakterije *Escherichia coli* uspješno su okarakterizirane jedno- i dvodimenzijskim tehnikama spektroskopije NMR.

Kvantitativni opis vezanja makrolida 3-O-aminopropil-azitromicina na ribosom iz *E. coli* pokušao se dobiti kalorimetrijskim mjerenjima. Međutim, zbog preniskih vrijednosti entalpija vezanja, kvantifikacija ovih interakcija metodom ITC nije bila moguća.

Konformacija klaritromicina u slobodnom stanju određena je pomoću tehnika NOESY i ROESY te mjerenjem konstante sprege $^3J_{H2,H3}$ iz 1H NMR spektra. Dobiveni rezultati ukazuju da klaritromicin u acetonitrilu- d_3 , deuteriranoj vodi i puferu tris- d_{11} zauzima konformaciju *folded-out*. Konformacija klaritromicina u vezanom stanju određena je tehnikom trNOESY. Pojava većeg broja signala i pad njihova intenziteta u odnosu na spektre NOESY i ROESY ukazali su na nastanak kompleksa s ribosomom. Na temelju analize spektara NMR zaključeno je da konformacija klaritromicina vezanog za ribosom iz *E. coli* ostaje ista kao u slobodnom stanju. Rezultati dobiveni metodom STD potvrdili su vezanje klaritromicina za ribosom i dali su korisne informacije o skupinama koje su odgovorne za vezanje, načinima vezanja i veznim epitopima.

Istraživanja su pokazala da se struktura, konformacija i interakcije klaritromicina u otopini mogu pouzdano i učinkovito odrediti kombinacijom tehnika spektroskopije NMR. Dobiveni podaci se mogu dalje primijeniti za procjenu odnosa strukture i aktivnosti te dizajn novih derivata makrolida poboljšanih bioloških svojstava.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AMP – adenzin-monofosfat

ATP – adenzin-trifosfat

CCA – kodon citozin-citozin-adenin

CD₃CN – acetonitril-d₃

COSY – engl. *correlation spectroscopy*

CYP3A4 – enzim citokrom P450 3A4

δ – kemijski pomak

DEPT – engl. *distortionless enhancement by polarisation transfer*

DHU – dihidrouracil

D₂O – deuterirana voda

FDA – engl. *Food and Drug Administration*

HMBC – engl. *heteronuclear multiple bond correlation*

HSQC – engl. *heteronuclear single quantum coherence*

INEPT – engl. *insensitive nuclei enhanced by polarisation transfer*

ITC – izotermna titracijska kalorimetrija

MIC – minimalna inhibicijska koncentracija

MLS_B – makrolid-linkozamid-streptogramin B

MOPS – 3-(N-morfolino)propansulfonska kiselina

mRNA – engl. *messenger RNA* (glasnička RNA)

NMR – nuklearna magnetna rezonancija

NOE – nuklearni Overhauserov efekt

NOESY – engl. *nuclear Overhauser effect spectroscopy*

ORF – engl. *open reading frame* (otvoreni okvir čitanja)

PLIVA – Proizvodnja lijekova i vakcina

PTC – peptidil-transferazni centar

RNA – ribonukleinska kiselina

ROE – engl. *rotating-frame Overhauser effect*

ROESY – engl. *rotating frame Overhauser effect spectroscopy*

STD – *saturation-transfer difference*

tRNA – *transfer* RNA (prijenosna RNA)

tRNA_f – formilmetionil-tRNA

trNOESY – *transfer nuclear Overhauser effect spectroscopy*

γ – magnetožirni omjer

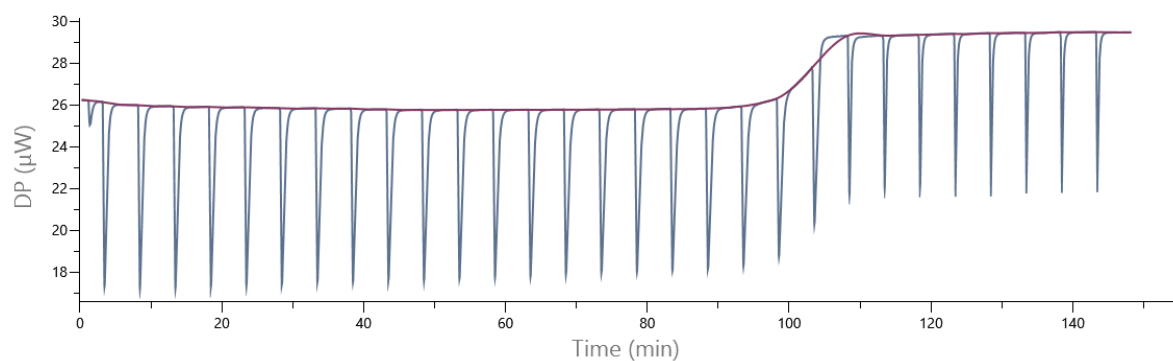
§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. J. Retsema, W. Fu, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **18** (2001) 3-10.
2. B. Arsić, P. Novak, J. Barber, M. G. Rimoli, G. Kragol, F. Sodano, *Macrolides: properties, synthesis and applications*, Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston, 2018.
3. P. Fernandes, D. Pereira, P. B. Watkins, D. Bertrand, *J. Med. Chem* **63** (2020) 6462–6473.
4. T. Jednačak, I. Mikulandra, P. Novak, *Int. J. Mol. Sci.* **21** (2020) 1–26.
5. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013. str. 857–888.
6. <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/structure-and-function-of-rna/> (datum pristupa 19. 02. 2021.)
7. P. Nissen, J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* **289** (2000) 920–929.
8. V. Ramakrishnan, *Cell* **108** (2002) 557–572.
9. <https://alevelbiology.co.uk/notes/translation-protein-synthesis/> (datum pristupa 16. 02. 2021.)
10. B. Bedenić, *Medicinska mikrobiologija*, Selma Uzunović-Kamberović, Zenica, 2009. str. 221–252.
11. L. Katz, A. S. Mankin, *Encyclopedia of Microbiology*, Academic Press, Oxford, 2009. str. 529–558.
12. S. Kosol, E. Schrank, M. Bukvić Krajačić, G. E. Wagner, N. Helge Meyer, C. Göbl, G. N. Rechberger, K. Zangger, P. Novak, *J. Med. Chem* **55** (2012) 5632–5636.
13. Z. Banić Tomišić, *Kem. Ind.* **60** (2011) 603–617.
14. <https://en.wikipedia.org/wiki/Azithromycin> (datum pristupa 29. 03. 2021.)
15. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1576> (datum pristupa 21. 02. 2021.)
16. P. Fernandes, D. Pereira, P. B. Watkins, D. Bertrand, *J. Med. Chem* **63** (2020), 6462–6473.
17. M. LeBel, *Can J Infect Dis.* **4** (1993) 148–152.
18. <https://go.drugbank.com/drugs/DB01211> (datum pristupa 23.05. 2021.)
19. K. Kannan, N. Vázquez-Laslop, A. S. Mankin, *Cell* **151** (2012) 508–520.
20. G. P. Dinos, *Br. J. Pharmacol.* **174** (2017) 2967–2983.
21. G. D. Wright, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57** (2005) 1451–1470.
22. J.-C. Pechère, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **18** (2001) 25–28.

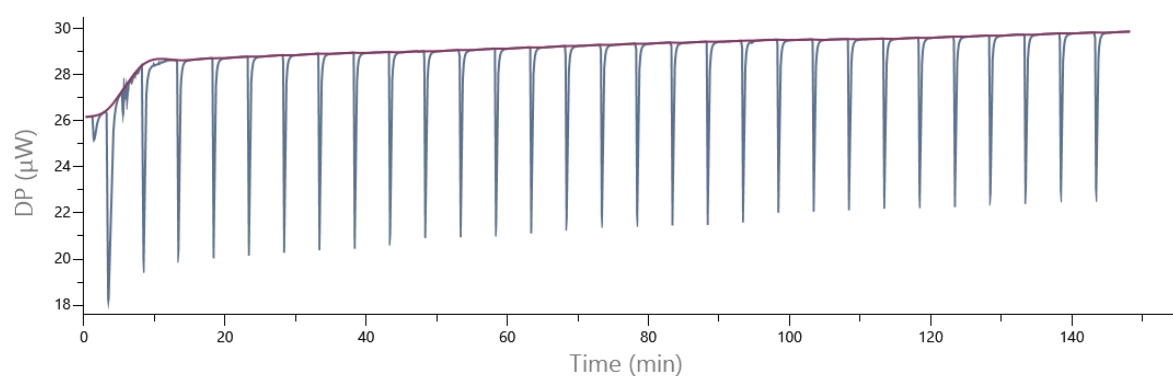
23. M. Gaynor, A. S. Mankin, *Curr. Top. Med. Chem.* **3** (2003) 949–960.
24. J. M. A. Blair, M. A. Webber, A. J. Baylay, D. O. Ogbolu, L. J. V. Piddock, *Nat. Rev. Microbiol* **13** (2015) 42–51.
25. W. Su, V. Kumarc, Y. Ding, R. Ero, A. Serraa, B. S. T. Lee, A. S. W. Wong, J. Shi, S. K. Sze, L. Yang, Y-G. Gao, *PNAS*, **115** (2018) 5157–5162.
26. G. di Bonaventura, A. Pompilio, M. Monaco, F. P. de Araujo, L. Baldassarri, A. Pantosi, G. Gherardi, *J. Med. Microbiol.* **68** (2019) 148–160.
27. J. Parra-Ruiz, C. Vidaillac, M. J. Rybak, *Rev. Esp. Quimioter*, **25(1)** (2012) 10–16.
28. I. Grgičević, I. Mikulandra, M. Bukvić, M. Banjanac, V. Radovanović, I. Habinovec, B. Bertoša, P. Novak, *Int. J. Antimicrob. Agents* **56** (2020) 1–5.
29. S. Glanzer, S. A. Pulido, S. Tutz, G. E. Wagner, M. Kriechbaum, N. Gubensäk, J. Trifunovic, M. Dorn, W. M. F. Fabian, P. Novak, J. Reidl, K. Zangger, *Chem. Eur. J.* **21** (2015) 1–10.
30. P. Novak, J. Barber, A. Čikoš, B. Arsić, J. Plavec, G. Lazarevski, P. Tepeš, N. Košutić-Hulita, *Bioorg. Med. Chem.* **17** (2009) 5857–5867.
31. P. Novak, Z. Banić Tomišić, P. Tepeš, G. Lazarevski, J. Plavec, G. Turkalj, *Org. Biomol. Chem.* **3** (2005) 39–47.
32. P. Novak, I. Tatić, P. Tepeš, S. Koštrun, J. Barber, *J. Phys. Chem. A.* **110** (2006) 572–579.
33. P. Novak, T. Jednačak (2011) NMR Spectroscopy for studying interactions of bioactive molecules; u: Zoran Mandić (ur.), *Physico-chemical methods in drug discovery and development*. Zagreb: IAPC Publishing, str. 1–62.
34. <https://www.glycopedia.eu/e-chapters/NMR-for-Structural-Glycoscience-35/Saturation-Transfer-Difference> (datum pristupa 01. 04. 2021.)
35. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA Tiskara Varaždin, Varaždin, 2013.
36. P. Tepeš, P. Novak, *Kem. Ind.* **57** (2008) 165–173.
37. V. K. Srivastava, R. Yadav, *Data Processing Handbook for Complex Biological Data*, Elsevier Inc. (2019) 125–136.
38. E. Schenckbecher, B. Meyer, E. Ennifar, *Microcalorimetry of Biological Molecules*, Springer Nature, 2019, str. 89–97.
39. W. R. Archer, M. D. Schulz, *R. Soc. Chem.* **16** (2020) 8760–8774.

40. I. Miroshnyk, S. Mirza, P. M. Zorky, J. Heinämäki, J. Yil-Kauhahuoma, J. Yliruusi, *Bioorg. Med. Chem.* **16** (2008) 232–239.
41. A. Awan, J. Barber, R. J. Brennan, *Magn. Reson. Chem* **30** (1992) 1241–1246.
42. B. Arsic, A. Awan, R. J. Brennan, J. A. Aguilar, R. Ledder, A. J. McBain, A. C. Regan, J. Barber, *Med. Chem. Commun.* **5** (2014) 1347–1354.
43. F. Schlünzen, R. Zarivach, J. Harms, A. Bashan, A. Tocilj, R. Albrecht, A. Yonath, F. Franceschi, *Nature* **413** (2001) 814–821.

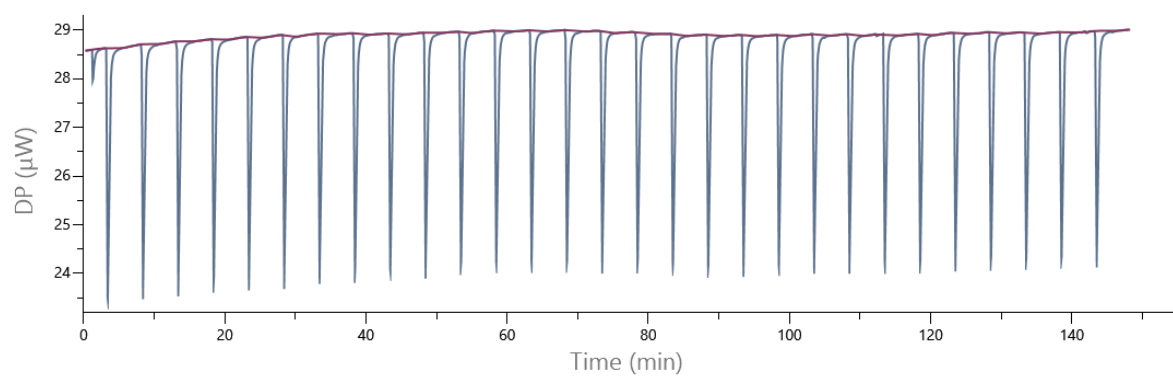
§ 8. DODATAK



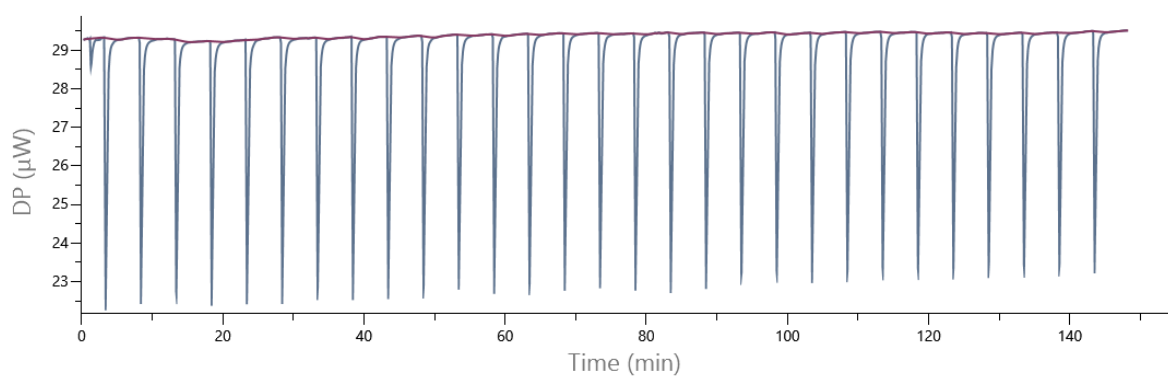
Slika D1. Termogram razrjeđenja ribosoma ($c = 14,8 \mu\text{mol L}^{-1}$) otopinom MOPS pufera.



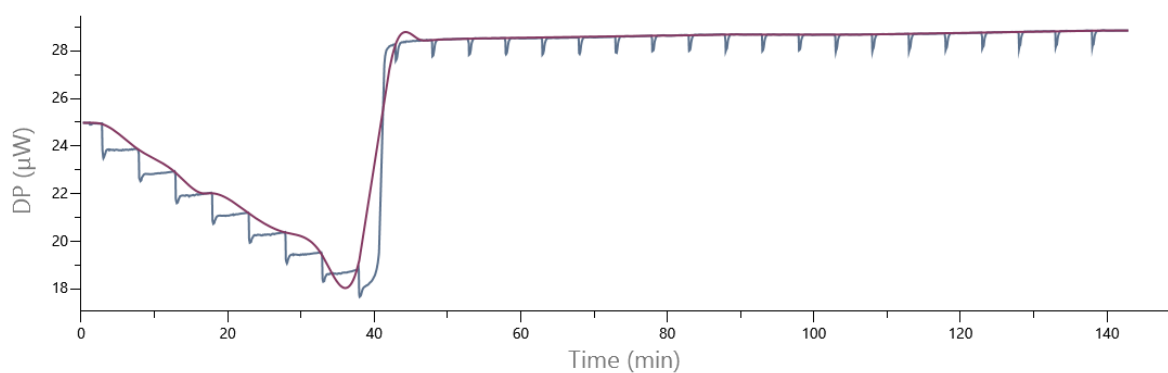
Slika D2. Termogram razrjeđenja ribosoma ($c = 12,3 \mu\text{mol L}^{-1}$) otopinom MOPS pufera.



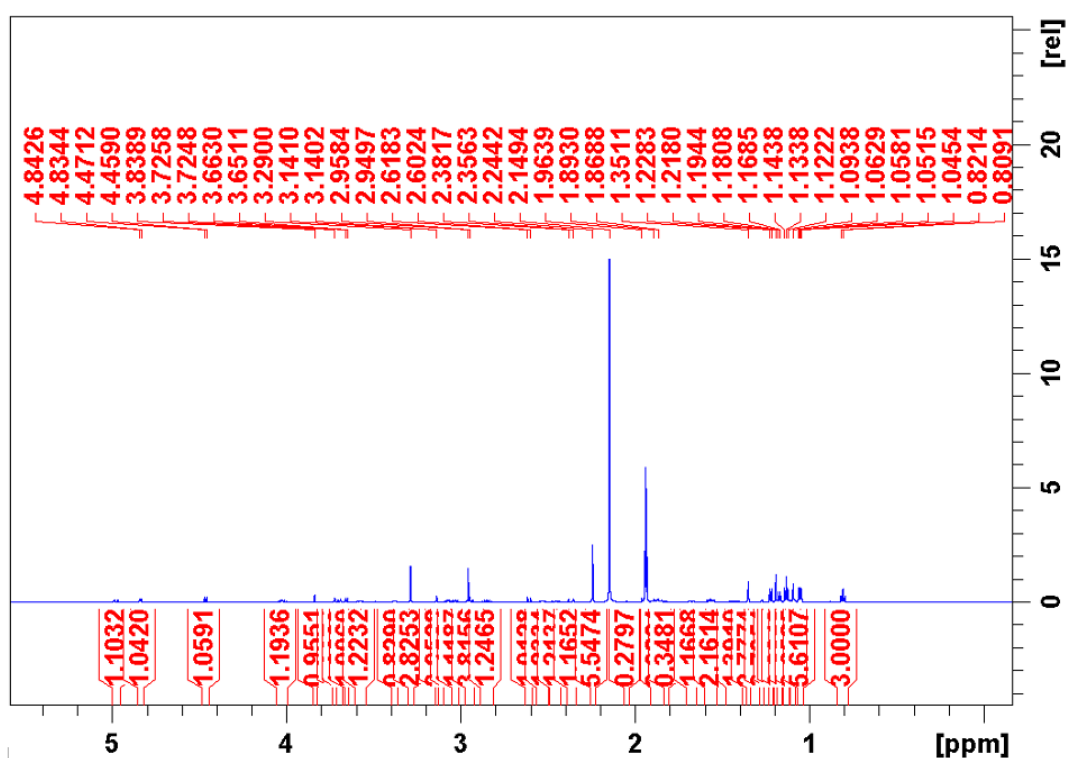
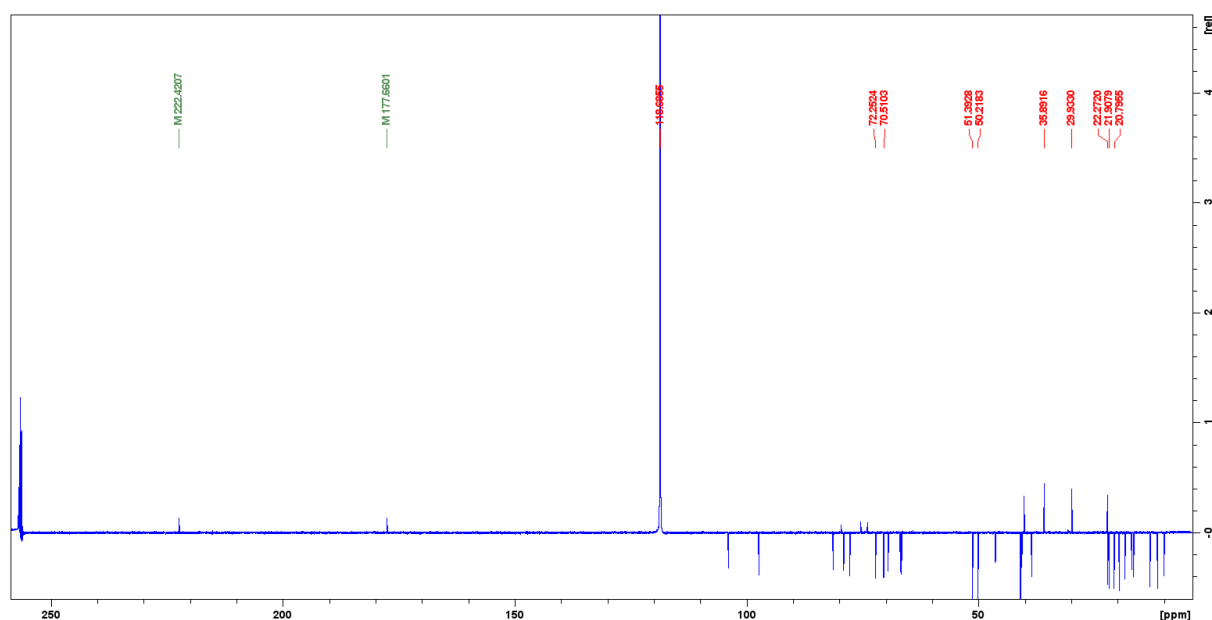
Slika D3. Termogram razrjeđenja ribosoma ($c = 4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) otopinom MOPS pufera.

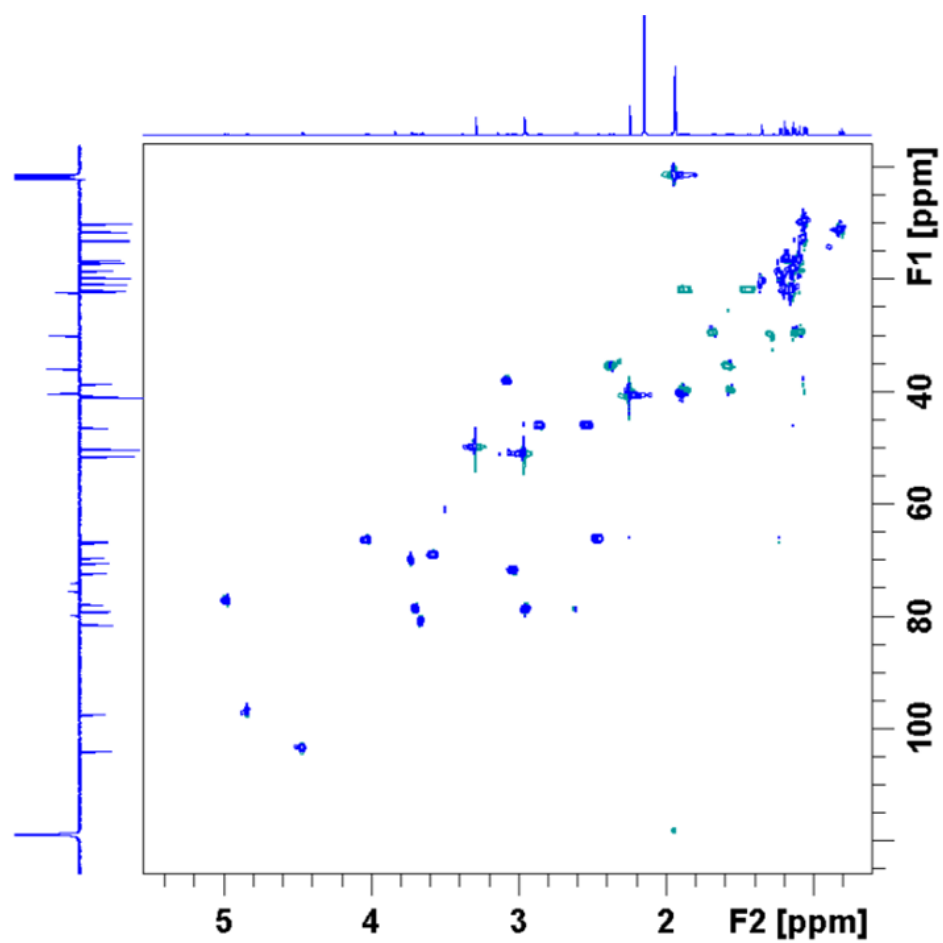


Slika D4. Termogram razrjeđenja ribosoma ($c = 3,33 \mu\text{mol L}^{-1}$) otopinom MOPS pufera.

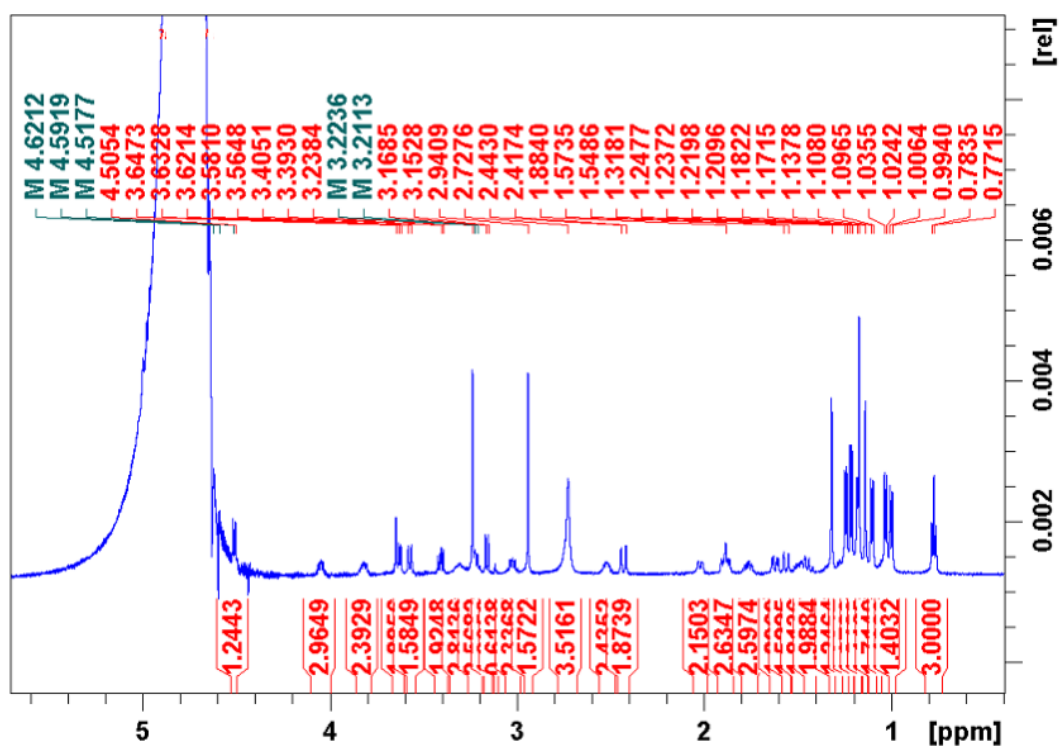
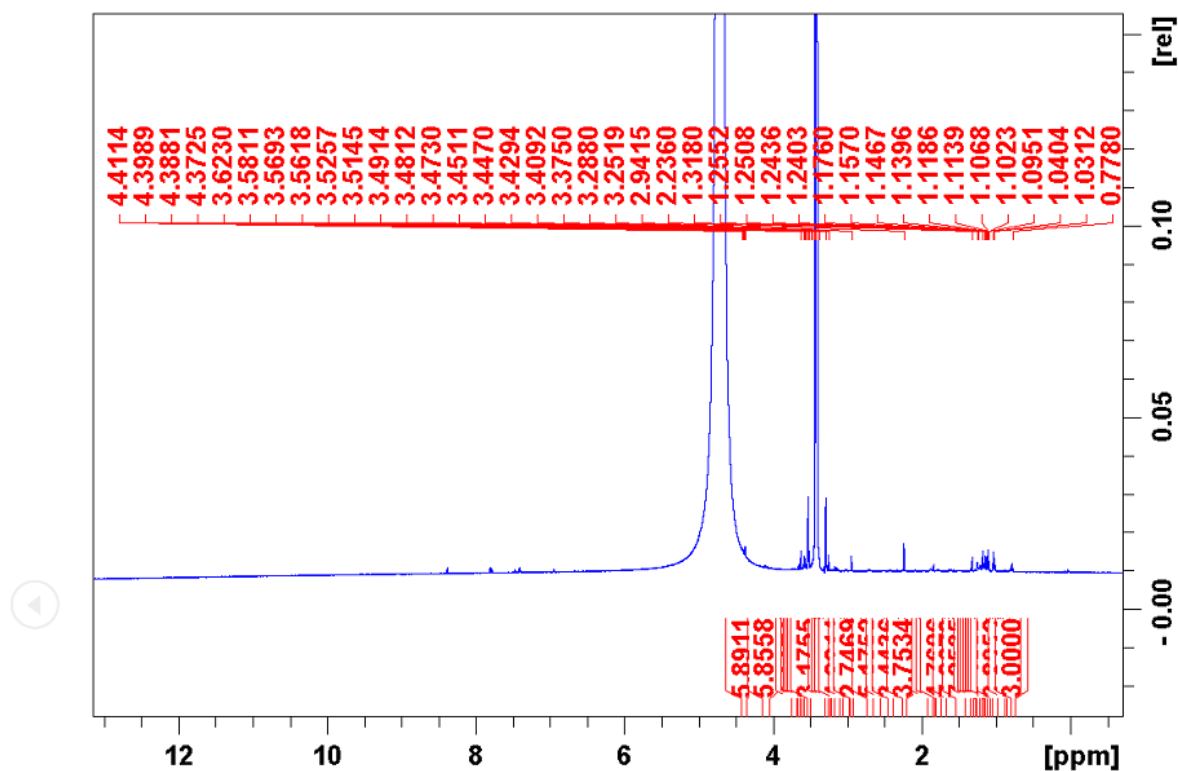


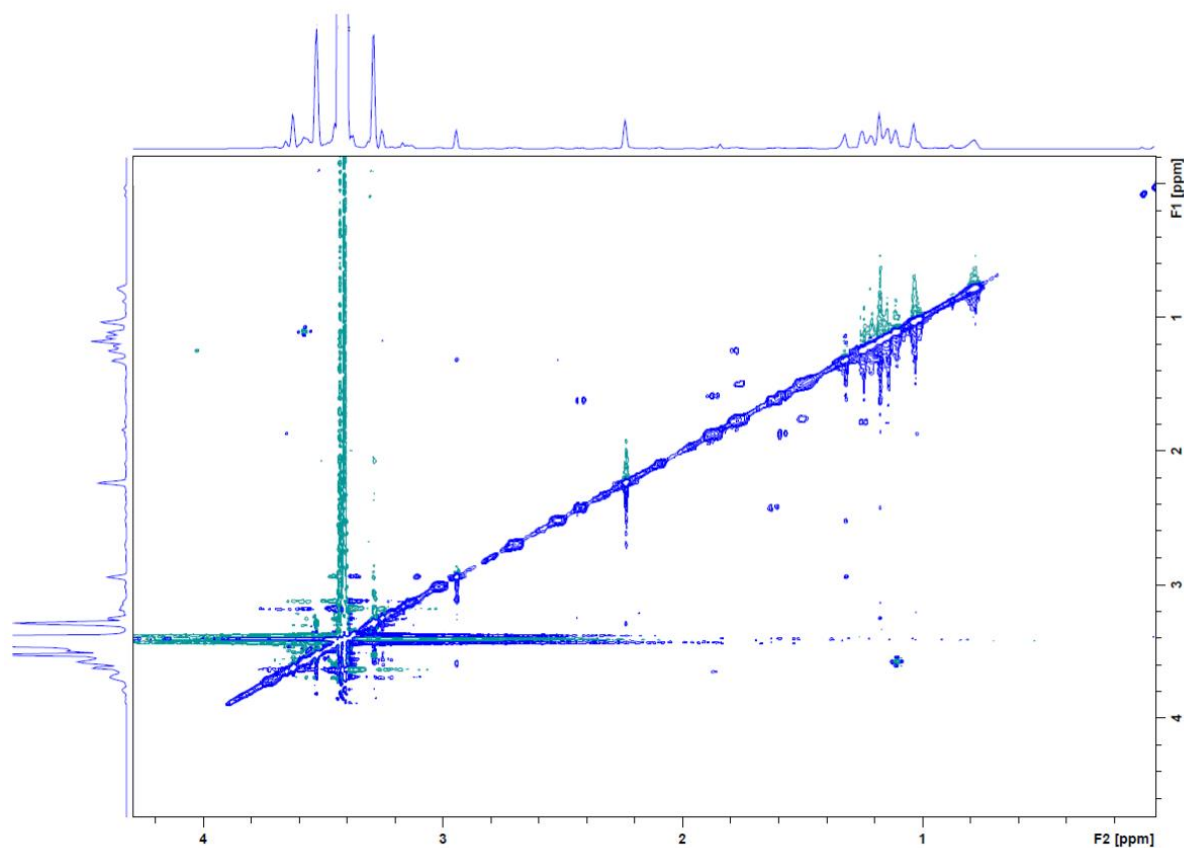
Slika D5. Termogram razrjeđenja ribosoma ($c = 14,8 \mu\text{mol L}^{-1}$) kao titranda otopinom MOPS pufera.

Slika D6. Spektar ¹H NMR klaritromicina u acetonitrilu-d₃.Slika D7. Spektar DEPT-Q klaritromicina u acetonitrilu-d₃.

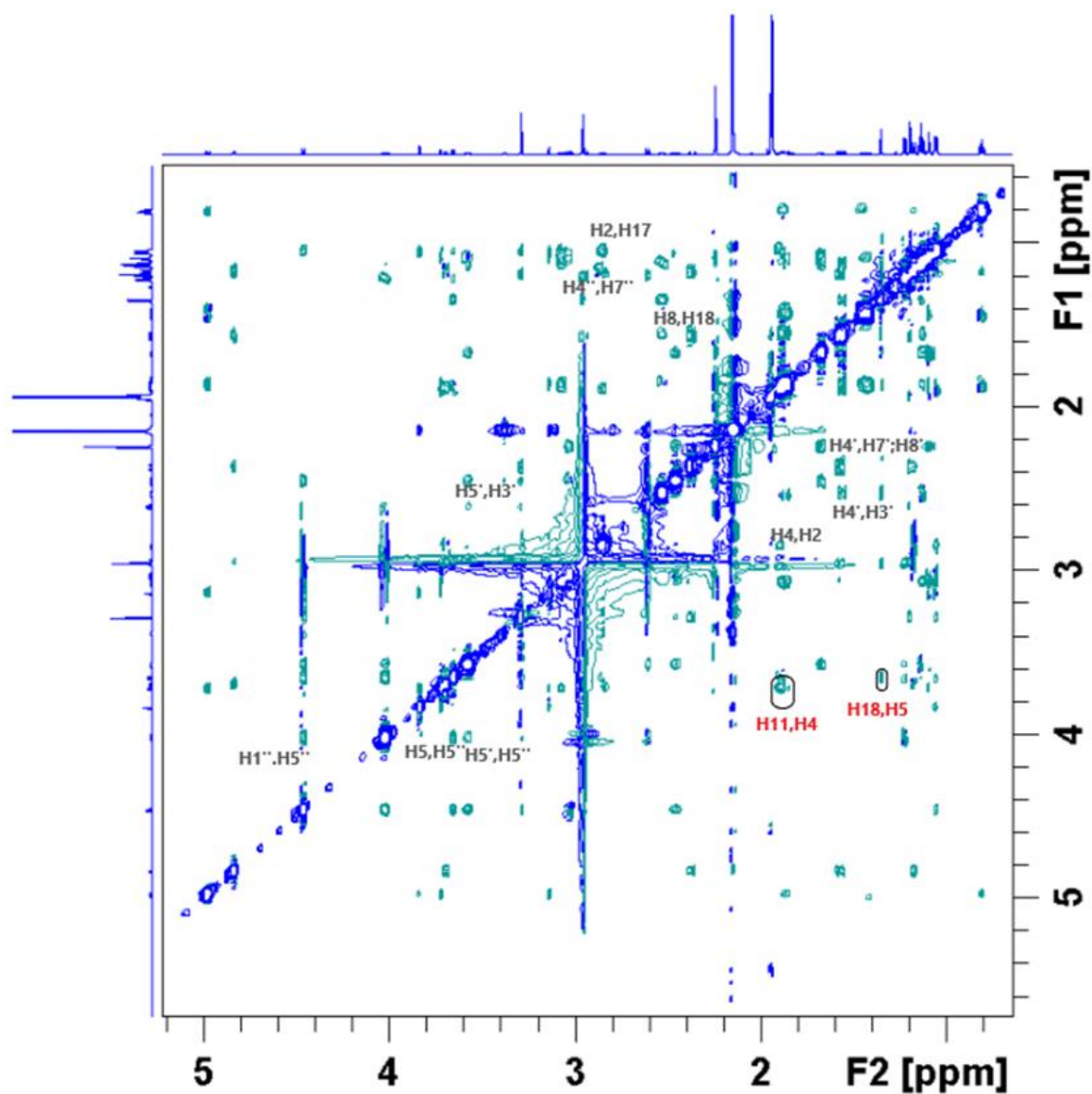


Slika D8. Spektar HSQC klaritromicina u acetonitrilu- d_3 .

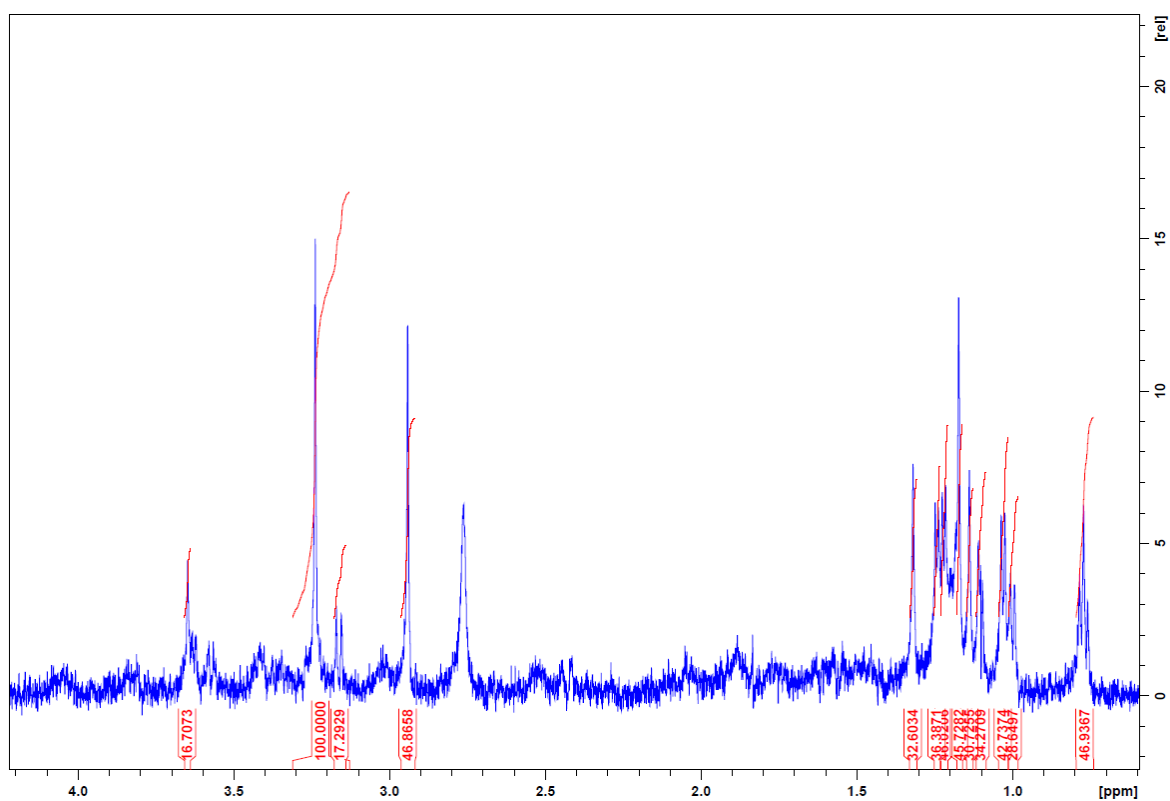
Slika D9. Spektar ^1H NMR klaritromicina u D_2O .Slika D10. Spektar ^1H NMR klaritromicina u puferu tris- d_{11} .



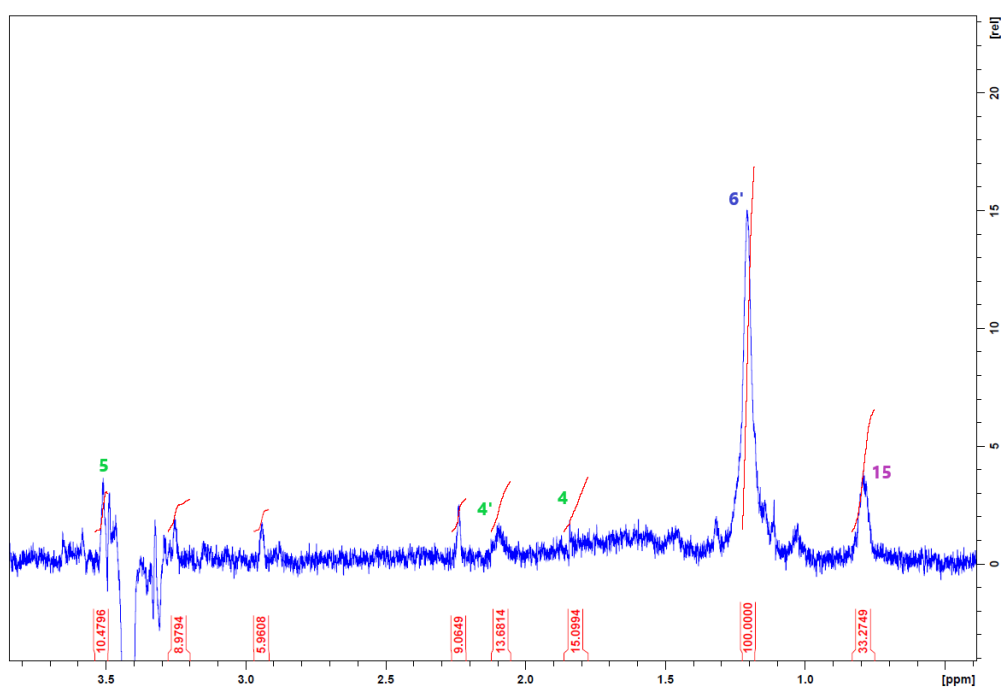
Slika D11. Spektar NOESY klaritromicina u puferu tris-d₁₁.



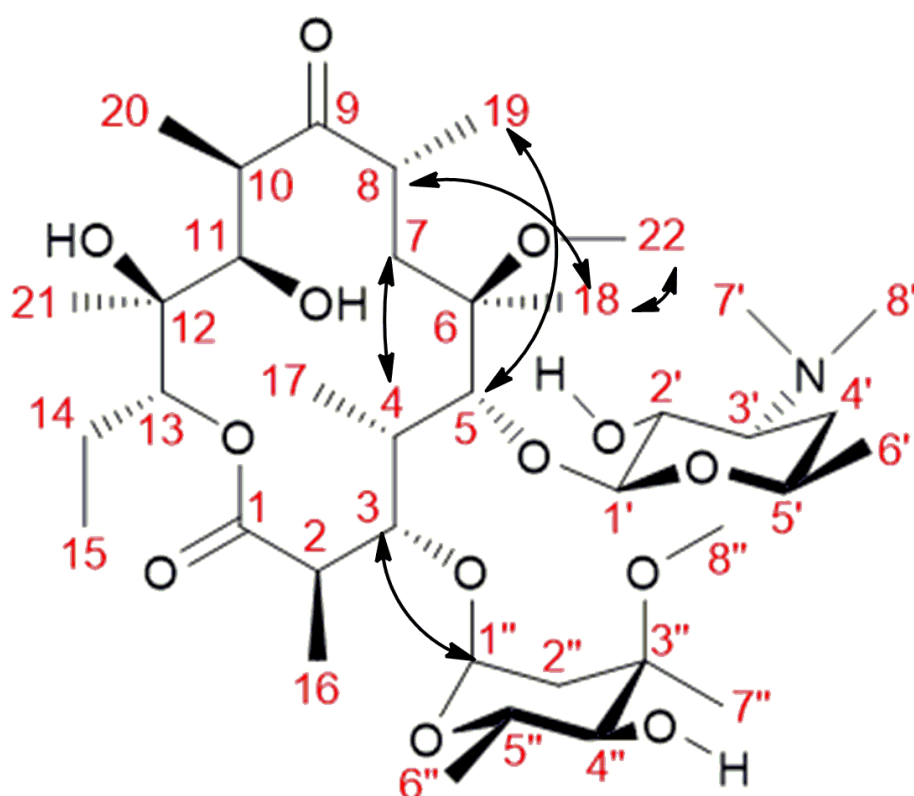
Slika D12. Spektar ROESY klaritromicina u acetonitrilu- d_3 . ROE kontakti karakteristični za konformaciju *folded-out* zaokruženi su i označeni crvenom bojom.



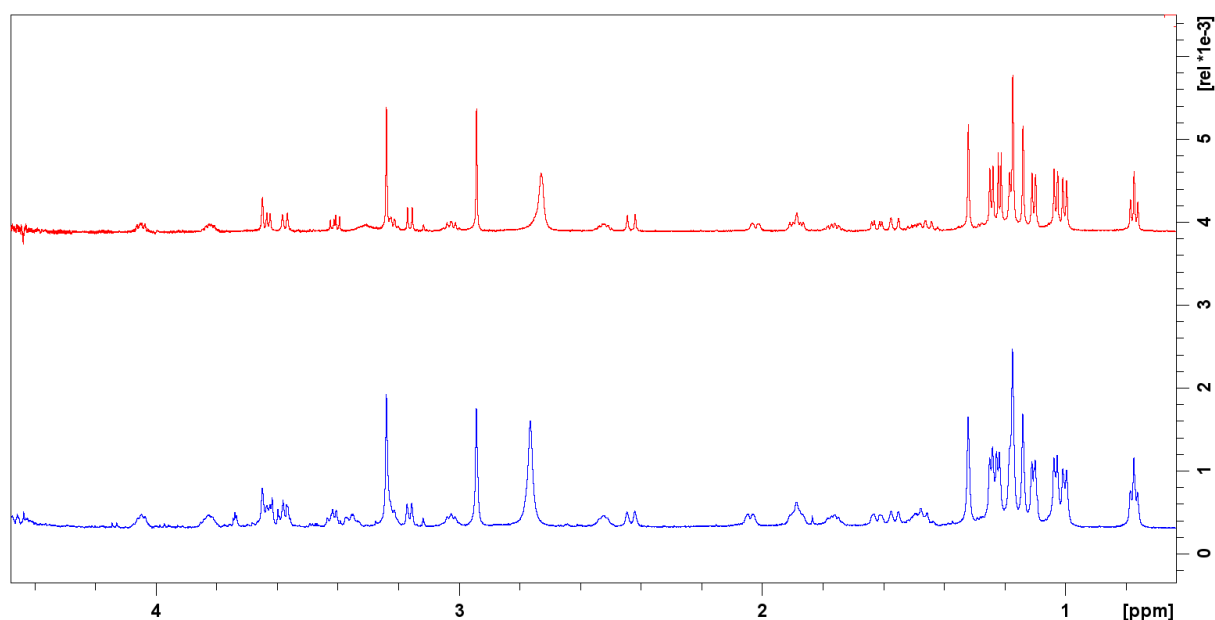
Slika D13. Spektar STD NMR klaritromicina u D_2O s navedenim vrijednostima integrala.



Slika D14. Spektar STD NMR klaritromicina u puferu tris- d_{11} s navedenim vrijednostima integrala i označenim skupinama.



Slika D15. NOE kontakti klaritromicina u puferu tris- d_{11} .



Slika D16. Uvećani prikaz dijela spektra (0–4,0 ppm) ^1H NMR klaritromicina u D_2O prije (crveno) i nakon dodatka ribosoma (plavo).

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Mateja Tkalčević

Datum rođenja: 19. siječnja 1998.

Mjesto rođenja: Zabok

Obrazovanje

2004.–2012. Osnovna škola Bedekovčina, Bedekovčina

2012.–2016. Gimnazija Antuna Gustava Matoša, Zabok

2016.–2019. Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2019.- Diplomski studij kemije, smjer: analitička kemija i biokemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. Mateja Tkalčević, Iva Kušec, Tomislav Jednačak, Ivana Mikulandra, Predrag Novak, Nikola Bregović, *Study of interactions between clarithromycin and azithromycin derivative and ribosome isolated from Escherichia coli*, Adriatic NMR Conference, 13.–15. rujna 2021., Primošten, Hrvatska.