

# Analiza biomolekula spektroskopijom NMR

---

**Kopljar, Katarina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

*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:217:625569>

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

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



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Katarina Kopljar

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **ANALIZA BIOMOLEKULA SPEKTROSKOPIJOM NMR**

**Završni rad**

Rad je izrađen na Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Tomislav Jednačak

Zagreb, 2018.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

9. travnja 2018.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

21. rujna 2018.

Mentor rada: doc. dr. sc. Tomislav Jednačak

Potpis:



# Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. SPEKTROSKOPIJA NMR U ANALIZI BIOMOLEKULA .....	3
2.1. STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA MALIH MOLEKULA.....	3
2.2. STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA MAKROMOLEKULA .....	3
2.3. PROUČAVANJE INTERAKCIJA LIGANADA I RECEPTORA .....	4
2.3.1. Detekcija kemijskih pomaka liganada .....	4
2.3.2. Detekcija kemijskih pomaka receptora .....	7
§ 3. SPECIFIČNOST VEZANJA LIGANADA NA KVAŠČEVU HEKSOKINAZU .....	9
3.1. Priprema uzoraka i eksperimentalna izvedba.....	9
3.1.1. Čišćenje proteina .....	9
3.1.2. Izvedba eksperimenta NMR.....	9
3.2. Rezultati .....	10
§ 4. PROMJENA KEMIJSKOG POMAKA I ANALIZA RELAKSACIJE DOMENE SH3 VINEKSINA KORIŠTENJEM GENETSKI KODIRANE AMINOKISELINE OBILJEŽENE S <sup>15</sup> N I <sup>19</sup> F.....	15
4.1. Eksperimentalna izvedba .....	15
4.1.1. Sinteza trifluormetil-fenilalanina obilježenog izotopom <sup>15</sup> N.....	15
4.1.2. Konstrukcija slijeda aminokiselina .....	16
4.1.3. Ugradnja trifluormetil-fenilalanina obilježenog izotopima <sup>15</sup> N i <sup>19</sup> F u domenu SH3 proteina vineksina čovjeka .....	xvi
4.1.4. Čišćenje proteina .....	17
4.1.5. Izvedba eksperimenata NMR.....	17
4.2. Rezultati .....	18
§ 5. STRUKTURA DVOLANČANE PNA U OTOPINI .....	22
5.1. Priprema uzoraka i eksperimentalna izvedba.....	22
5.2. Rezultati .....	23
§ 6. ZAKLJUČAK .....	28
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	29



## § Sažetak

Strukturna karakterizacija liganada, receptora i njihovih kompleksa u otopini od ključne je važnosti za uspješan dizajn bioaktivnih molekula i lijekova. Ovaj proces obuhvaća određivanje trodimenzijske strukture, funkcijskih skupina i strukturnih elemenata odgovornih za bioaktivnost, te mjesta i načina vezanja liganada na makromolekule. Interakcije liganada i receptora mogu se ispitivati različitim metodama, poput elektroforeze na gelu, vibracijske i spektroskopije NMR, kalorimetrije, kromatografije i mikroskopije.<sup>1</sup> U ovom radu pobliže će biti opisane suvremene tehnike spektroskopije NMR koje se najviše koriste za karakterizaciju biomolekula i njihovih interakcija. Na konkretnim primjerima bit će prikazano kako se primjenom tehnika NMR mogu odrediti strukture liganada, makromolekula i njihovih veznih mjesta te dobiti uvid u konformacijske promjene, specifičnost i afinitet vezanja.



## § 1. UVOD

Spektroskopija nuklearne magnetne rezonancije (engl. *nuclear magnetic resonance spectroscopy*, NMR) je analitička tehnika koja se koristi za strukturnu karakterizaciju organskih, anorganskih i bioloških molekula.<sup>2</sup> Spektroskopijom NMR proučavaju se jezgre sa spinom različitim od nule, poput <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>31</sup>P, <sup>19</sup>F i <sup>15</sup>N. Dobiveni spektri se asigniraju na temelju kemijskih pomaka i multiplentnosti signala te iznosa konstanti sprege između spinova.

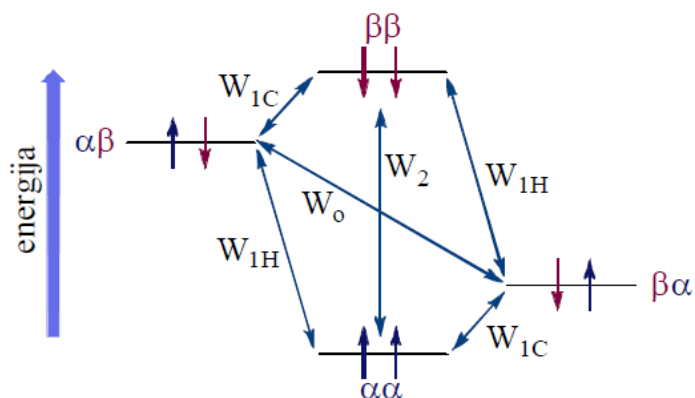
Prva struktura proteina u otopini određena je pomoću spektroskopije NMR prije više od 30 godina.<sup>3</sup> Strukturna karakterizacija proteina suvremenim tehnikama NMR uključuje izotopno obilježavanje uz prekomjernu ekspresiju u genetski modificiranim bakterijama. Mogućnost izotopnog obilježavanja proteina i razvoj višedimenzijjskih pulsni tehnika NMR omogućili su određivanje strukture proteina i njihovih kompleksa veličine do preko 82 kDa. Nedavno razvijeni pulsni sljedovi koje smanjuju brzinu transverzalne relaksacije kao što je TROSY (engl. *transverse relaxation optimized spectroscopy*) omogućuju snimanje spektara NMR visokog razlučivanja za makromolekule od 100 kDa i veće. Spektroskopija NMR je korisna metoda za karakterizaciju interakcija između liganada i receptora te može pružiti mnogo informacija bez potrebe za uništavanjem uzorka.<sup>1</sup> Analizom spektara NMR mogu se odrediti strukture i konformacije malih organskih liganada i makromolekula u otopini, što je ključno za razumijevanje njihove biološke uloge.

Podatke o trodimenzijskoj strukturi i konformaciji molekule mogu se dobiti tehnikama koje se temelje na nuklearnom Overhauserovom efektu (NOE). Ovaj efekt definiran je kao promjena intenziteta rezonancije određenog spina zbog promjena u ravnotežnoj napučenosti spinova druge jezgre uz uvjet da su procesi povezani mehanizmom tzv. križne relaksacije (Slika 1). Ravnotežna napučenost može se promijeniti zasićenjem pojedine rezonancije, izjednačavanjem napučenosti višeg i nižeg energijskog stanja ili inverzijom napučenosti.

Pritom se intenzitet signala promatrane jezgre (S) mijenja prema jednadžbi:

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

gdje je  $\gamma_I$  magnetožirni omjer jezgre s promijenjenom ravnotežnom napučenosti spinova. Pritom jezgra I (primjerice proton) ima veliki magnetožirni omjer, dok je on za jezgru S (primjerice <sup>13</sup>C) puno manji. Zbog razlike u magnetožirnim omjerima, energija prijelaza spinova <sup>13</sup>C atoma bit će manja od energije potrebne za prelazak protona u više stanje. Izborna pravila spektroskopije NMR dopuštaju mijenjanje orijentacije samo jednog spina ( $W_{1H}$  i  $W_{1C}$ ).



Slika 1. Mogući prijelazi spinova jezgri  $^{13}\text{C}$  i protona.<sup>2</sup>

Prijelazi koji uključuju istovremenu promjenu orijentacije oba spina su zabranjeni, ali do njih ipak može doći mehanizmima križne relaksacije,  $W_2$  i  $W_0$  (Slika 1). Rezultat križne relaksacije  $W_2$  je porast intenziteta signala i pozitivni efekt NOE, dok relaksacija mehanizmom  $W_0$  rezultira smanjenjem intenziteta signala i negativnim efektom NOE.<sup>2</sup>

## § 2. SPEKTROSKOPIJA NMR U ANALIZI BIOMOLEKULA

### 2.1. STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA MALIH MOLEKULA

Struktura malih molekula može se odrediti kombinacijom jedno- i dvodimenzijskih tehnika NMR. U ovom poglavlju navedene su neke od najčešće korištenih tehnika NMR za strukturnu karakterizaciju malih organskih liganada.

- Tehnika  $^1\text{H}$  NMR
- Ovom tehnikom asigniraju se signali protona u spoju, a njegovu strukturu određujemo na temelju opaženih kemijskih pomaka i konstanti sprege spin-spin.
- Tehnika APT
- APT (engl. *attached proton test*) je višepulsna jednodimenzijska tehnika kojom je moguće odrediti multiplicitet heterojezgri (najčešće  $^{13}\text{C}$ ). Pravilnim odabirom vremena evolucije može se odrediti broj protona vezanih na pojedini ugljik.
- Tehnika COSY  
COSY (engl. *correlation spectroscopy*) je homonuklearna dvodimenzijska tehnika pomoću koje dobivamo informacije o skalarnoj sprezi između protona preko dvije, tri ili više kemijskih veza.
- Tehnika HSQC  
Tehnika HSQC (engl. *heteronuclear single quantum coherence*) koristi se za detekciju heteronuklearne sprege kroz jednu vezu između protona i heterojezgri ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ).
- Tehnika HMBC  
Tehnikom HMBC (engl. *heteronuclear multiple bond correlation*) dobiva se uvid u korelacije protona s ugljikovim atomima preko dvije, tri ili četiri kemijske veze. Opažaju se korelacije između protona i kvarternih ugljikovih atoma te omogućava povezivanje pojedinih molekulskih fragmenata.<sup>2</sup>
- Tehnika NOESY  
NOESY (engl. *nuclear Overhauser effect spectroscopy*) je dvodimenzijska tehnika NMR koja se temelji na križnoj relaksaciji spinova koji su u dipolnoj sprezi. Ovom tehnikom dobivaju se informacije o korelacijama kroz prostor i međusobnoj udaljenosti spinova.<sup>2</sup>

### 2.2. STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA MAKROMOLEKULA

Za strukturnu karakterizaciju makromolekula se, uz jedno- i dvodimenzijske tehnike, koriste i tehnike trostruke rezonancije, koje sadrže dodatnu, treću frekvencijsku dimenziju. Na taj način povećava se razlučivanje signala makromolekule koji su preklopljeni u jedno- i dvodimenzijskim spektrima. Ove tehnike temelje se na heteroatomnom sprezanju i prijenosu magnetizacije, a daju informacije o slijedu aminokiselina u okosnici peptida.

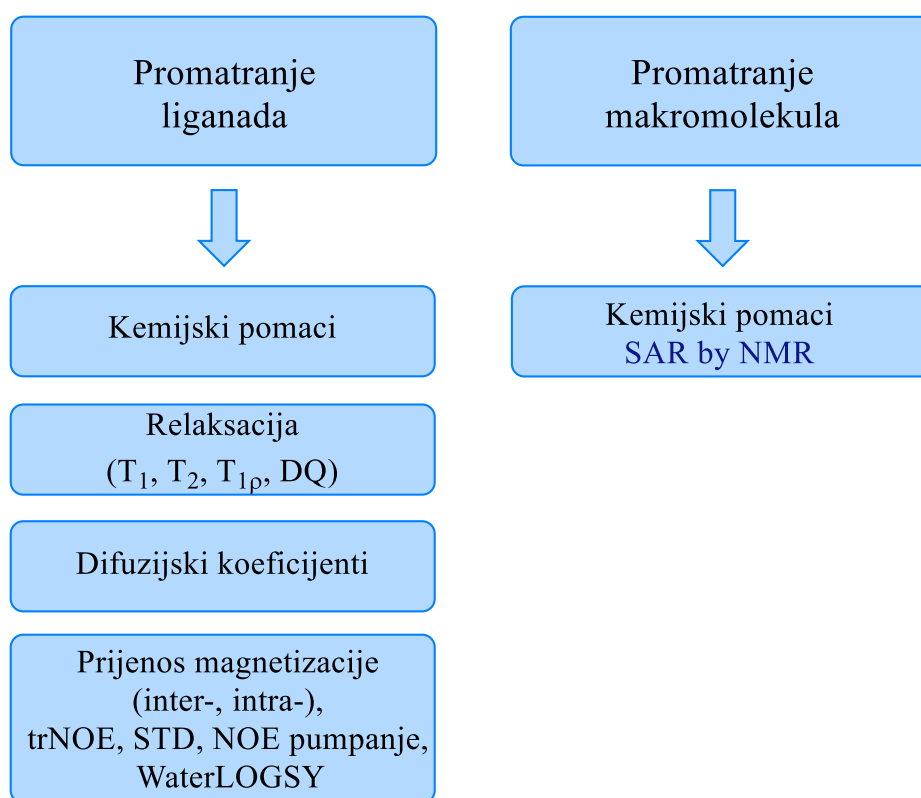
Kod eksperimenta HNCA magnetizacija se prenosi s amidnog protona peptidne veze na pripadni dušik i  $\alpha$ -C atome. Ovim eksperimentom dobivaju se korelacije NH protona i  $\alpha$ -C atoma prethodne aminokiseline te  $\alpha$ -C atoma pripadne. S druge strane, spektar HN(CO)CA pokazuje samo korelaciju amidnog protona s  $\alpha$ -C atomom prethodne aminokiseline u slijedu.

Slične informacije dobivamo pomoću eksperimenta HNCACB, koji korelira amidni proton s  $\alpha$ - i  $\beta$ -C atomima pripadne aminokiseline te prethodne susjedne. S druge strane, spektar HN(CO)CACB pokazuje korelacije amidnog protona s  $\alpha$ - i  $\beta$ -C atomima prethodne aminokiseline. Korelacije amidnog protona s karbonylnim C-atomima prethodne i pripadne aminokiseline mogu se dobiti analizom spektra HN(CA)CO, dok se na temelju spektra HNCO mogu dobiti samo korelacije NH protona s karbonylnom skupinom prethodne aminokiseline.<sup>4</sup>

### 2.3. PROUČAVANJE INTERAKCIJA LIGANADA I RECEPTORA

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

Tablica 1. NMR parametri za proučavanje interakcija liganada i receptora<sup>1</sup>

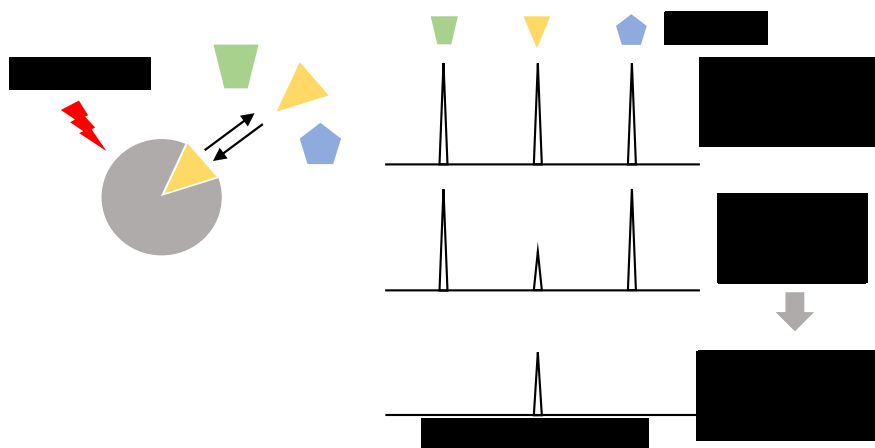


#### 2.3.1. Detekcija kemijskih pomaka liganada

Tehnike opisane u ovom poglavlju mogu se koristiti za promatranje slabog do srednje jakog vezanja liganada na receptor. Osnovni uvjet za njihovu primjenu je da sustav mora biti u režimu brze izmjene, odnosno da konstanta disocijacije kompleksa liganada i receptora bude veća od 10  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ .

- Tehnika STD

Vrlo popularna i brza tehnika koja se oslanja na efekt NOE je spektroskopija STD (engl. *saturation transfer difference*) NMR. Ova tehnika se temelji na prijenosu magnetizacije s receptora na vezani ligand koji se izmijeni u otopini, a zatim detektira. Spektar STD je rezultat dvaju eksperimenata.<sup>1</sup>



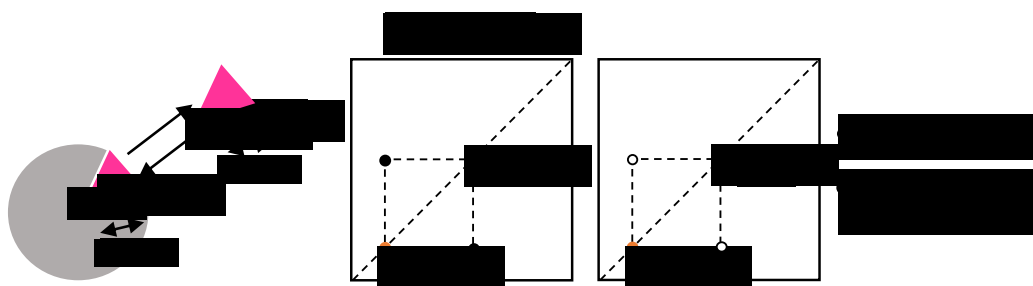
Slika 2. Shematski prikaz eksperimenta STD.<sup>5</sup>

U prvom eksperimentu (u rezonanciji) su pomoću selektivnih pulseva zasićene samo rezonancije receptora. Magnetizacija se potom prenosi na sve protone receptora pomoću intramolekulskog postupka križne relaksacije među protonima poznatog kao spinska difuzija. Istim procesom postaju zasićeni i protoni vezanog liganda koji se izmjenjuje u otopini. Nakon prijenosa magnetizacije, detektiraju se umanjeni signali slobodnog liganda koji je u interakciji s receptorom. Zatim se referentni spektar zabilježi uz frekvenciju zračenja postavljenu daleko od bilo kojeg drugog signala (izvan rezonancije). Oduzimanjem spektra u rezonanciji od spektra izvan rezonancije nastaje spektar razlika, koji sadrži signale samo onih skupina koje se vežu na receptor. Stupanj zasićenosti magnetizacije liganda ovisi o vremenu zadržavanja liganda na veznom mjestu receptora.<sup>1</sup>

Tehnika STD je pogodna za velike receptore jer nema ograničenja u molekularnoj masi receptora. Nadalje, ona ne zahtijeva veliku količinu receptora, što proizlazi iz činjenice da signali u spektru odgovaraju samo ligandima u interakciji. Spektroskopija STD NMR može se primijeniti za identifikaciju skupina koje su u izravnom kontaktu s receptorom jer one podliježu najvećem stupnju zasićenja. Navedena informacija se može koristiti za određivanje strukturnih dijelova važnih za vezanje liganda, kao i za mapiranje epitopa.<sup>1</sup>

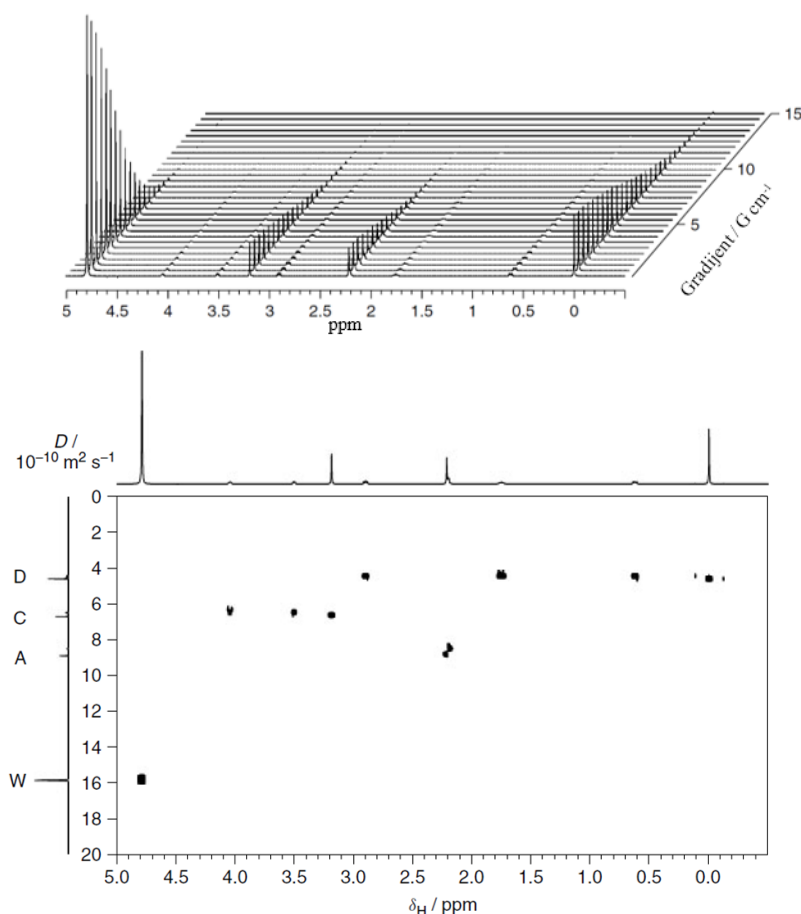
- Tehnika trNOE

Druga tehnika koja se oslanja na efekt NOE je trNOE (engl. *transferred nuclear Overhauser effect*). Prilikom vezanja spoja na receptor, dolazi do značajnih promjena u vrijednostima NOE, koje proizlaze iz različitih korelacijskih vremena slobodnih i vezanih liganada. Naime, poznato je da male molekule pokazuju mali i pozitivan efekt NOE, a velike negativan s velikom apsolutnom vrijednošću. Međutim, ako se mala molekula (ligand) veže na receptor, ona se ponaša poput makromolekule te se može uočiti promjena u predznaku i vrijednostima efekta NOE (Slika 3). Tehnika trNOE je vrlo osjetljiva, te je potrebna vrlo mala količina makromolekule u usporedbi s ligandom.<sup>5,6</sup>

Slika 3. Shematski prikaz tehnike trNOE.<sup>5</sup>

#### - Tehnika DOSY

DOSY (engl. *diffusion ordered spectroscopy*) je tehnika koja omogućava odvajanje pojedinih komponenti kompleksne smjese prema njihovom difuzijskom koeficijentu. Spektar DOSY snima se uz promjenu snage gradijentnog pulsa, što omogućava izračunavanje difuzijskih koeficijenata. Na taj način dobiva se pseudo-dvodimenzijski spektar, koji uz frekvencijsku sadrži i dimenziju difuzijskog koeficijenta (Slika 4).



Slika 4. Spektri  $^1\text{H}$  NMR smjese acetona (A), kolina (C) i DSS (D) u  $\text{D}_2\text{O}$  snimljeni pri 500 MHz uz povećanje snage gradijenta (gore) te pripadni spektar DOSY (dolje). Signal označen slovom W odgovara otapalu.<sup>8</sup>

### 2.3.2. Detekcija kemijskih pomaka receptora

Interakcije liganda i receptora mogu se proučavati i na temelju promjena kemijskih pomaka makromolekule. Najviše korištene tehnike NMR koje detektiraju signale receptora su CSP i SAR by NMR.

- Tehnika CSP

Za izvođenje eksperimenta CSP (engl. *chemical shift perturbation*) potrebna je izotopno obilježena makromolekula i neobilježeni ligand, koji može biti manja molekula ili druga makromolekula. Receptor se titrira otopinom liganda i pritom se u svakoj točki titracije snima spektar  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC. Ako se proučavaju interakcije između dviju makromolekula, eksperiment se može provoditi u dva dijela, uz izotopno obilježavanje jedne odnosno druge molekule. Nadalje, interakcije između različitih proteina mogu se proučavati u samo jednom koraku, ako su oni obilježeni različitim izotopima. Međutim, ovaj pristup je danas moguće primijeniti samo za manji broj sustava.

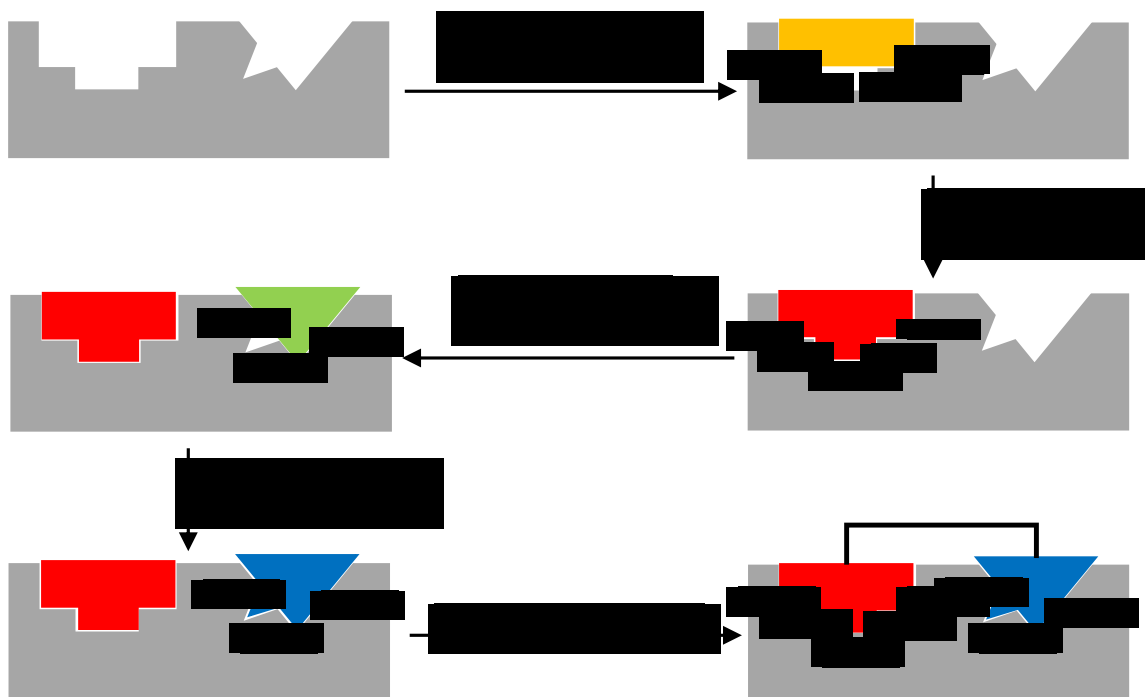
Kemijski pomaci makromolekule vrlo su osjetljivi na promjene u strukturi i mogu se precizno izmjeriti, što znači da se svaki sustav u kojem se ligand veže na makromolekulski receptor može proučavati eksperimentom CSP. Analiza spektara je jednostavna, a mjere se kemijski pomaci i promjene intenziteta signala tijekom titracije. Signali čiji se kemijski pomaci najviše mijenjaju najvjerojatnije odgovaraju atomima na mjestu vezanja proučavanog liganda. Nadalje, iz titracijske krivulje može se izvesti vrijednost konstante disocijacije,  $K_d$ . CSP je jedina tehnika pomoću koje se informacije o veznom mjestu i konstanti disocijacije liganda mogu dobiti iz samo jednog eksperimenta. Pritom je bitno da se tijekom titracije eksperimentalni uvjeti ne mijenjaju, što znači da je važno pripremati otopine liganda i proteina u istom puferu, jer male promjene pH ili ionske jakosti mogu dovesti do pogrešaka. Isto tako, ako je ligand topljiv samo u organskom otapalu poput DMSO (dimetil sulfoksid), tada se titracija mora postaviti tako da koncentracija DMSO-a bude konstantna.

Ova tehnika se često koristi za potvrdu vezanja liganda na receptor, pri čemu nije nužno asignirati spektar. Zbog svoje točnosti, tehnika CSP se koristi tijekom procesa razvoja lijekova. Nadalje, CSP se može koristiti za dobivanje vrijednosti  $K_d$  proučavajući promjene kemijskih pomaka u eksperimentima s različitim ligandima i tako potvrditi vežu li se oni na isto mjesto ili ne. Još detaljnije informacije o vezanju mogu se dobiti uz prethodno asignirane spektre.

Jedna od prednosti tehnike CSP je i ta što se može koristiti kako za snimanje uzoraka u otopini, tako i za čvrste uzorke. Na temelju dobivenih podataka može se pouzdano odrediti mjesto na kojem dolazi do interakcije liganda i receptora ili dvije makromolekule, pod uvjetom da je poznata kristalna struktura makromolekule i asigniran njezin spektar. Upravo ta saznanja su ključna za proučavanje interakcija liganada i receptora te njihovih konformacija prilikom vezanja.<sup>9</sup>

## - Tehnika SAR by NMR

Ova tehnika je korisna za otkrivanje liganada koji se velikim afinitetom vežu na receptor. Metoda se naziva SAR by NMR jer se proučava odnos strukture i aktivnosti (engl. *structure-activity relationships*) molekule pomoću NMR-a.<sup>10</sup>



Slika 5. Shematski prikaz eksperimenta SAR by NMR.<sup>10</sup>

Princip ove metode shematski je prikazan na Slici 5. U prvom koraku pretpostavljaju se oblik i funkcijske skupine prvog fragmenta, te se promatraju promjene kemijskih pomaka  $^{15}\text{N}$  ili amidnog  $^1\text{H}$  snimanjem spektra  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC prilikom vezanja liganda na izotopno obilježenu makromolekulu. Pomoću dobivenih podataka optimizira se prvi ligand, tj. fragment. Treći korak uključuje pretpostavljanje oblika drugog fragmenta, koji se optimizira pomoću signala i korelacija asigniranih iz novog spektra  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC. Njihov položaj i orijentacija u kompleksu eksperimentalno se određuje spektroskopijom NMR ili rendgenskom difrakcijom. S tim saznanjem može se krenuti u sintezu takvog liganda koji se velikim afinitetom veže na receptor pravilno povezujući te fragmente.

Jedna od prednosti tehnike SAR by NMR je upotreba spektara  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC za detektiranje vezanja malih liganada koji se slabo vežu na protein označen izotopom  $^{15}\text{N}$ . Druga prednost korištenja spektara  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC je mogućnost brzog određivanja različitih mjesta vezanja fragmenata, što je ključno za interpretaciju odnosa strukture i aktivnosti, te za sintezu liganada. Nadalje, metoda SAR by NMR značajno smanjuje vrijeme potrebno za sintezu i otkriće liganda visokog afiniteta, što je vrlo korisno prilikom istraživanja lijekova.<sup>10</sup>



## § 3. SPECIFIČNOST VEZANJA LIGANADA NA KVAŠĆEVU HEKSOKINAZU

A. Blume *et al.* proveli su istraživanje specifičnosti vezanja glukoze i derivata glukoze na heksokinazu PII iz kvasca.<sup>11</sup> Heksokinaza (EC 2.7.1.1) je prvi enzim glikolitičkog puta, koji katalizira prijenos  $\gamma$ -fosfatne skupine ATP-a na 6-hidroksi skupinu D-glukoze time nastaje D-glukoza-6-fosfat i ADP. Pokazano je da u kvascu postoje dva izozima heksokinaze, PI i PII. U ovom radu proučavana je heksokinaza PII jer kvasac pretežno sadrži taj izozim.

### 3.1. Priprema uzoraka i eksperimentalna izvedba

#### 3.1.1. Čišćenje proteina

Za eksperimente  $^1\text{H}$  NMR bili su potrebni deuterirani puferi. Zato je 4,3 mg liofilizata otopljeno i dijalizirano dva puta u 500  $\mu\text{L}$   $\text{D}_2\text{O}$  tijekom jednog sata kako bi se uklonile sve nedeuterirane tvari i otapala. Dijalizirani protein je zatim stavljen na PD-10 kolonu (Pharmacia) i eluiran pomoću 5 mL 50 mM natrijevog fosfata, 100 mM natrijevog klorida otopljenog u  $\text{D}_2\text{O}$  pri pH 7,5. Skupljene su frakcije od 5 kapi i određena je koncentracija proteina Bradfordovom metodom. Za određivanje načina vezanja liganada u odsutnosti i prisutnosti  $\text{Mg}^{2+}$ , koristio se pufer koji je sadržavao 50 mM Tris-HCl- $\text{d}_{11}$ .

#### 3.1.2. Izvedba eksperimenta NMR

Spektri STD NMR snimljeni su pri temperaturi od  $5^\circ\text{C}$  na spektrometru Bruker DRX 500 s tri kanala i z-gradijentima. Uzorci su sadržavali 15  $\mu\text{M}$  proteina i koncentraciju liganda od 1 mM. Za dobivanje spektara STD NMR upotrijebljen je 1D pulsni slijed koji uključuje  $T_{1\rho}$  filtar. Zračenje u rezonanciji provedeno je pri  $-1$  ppm, a izvan rezonancije pri 20 ppm. Zračenje je obavljeno korištenjem 50 Gaussovih pulseva uz 1% gašenja, trajanja 49 ms uz odgodu od 1 ms kako bi se dobilo ukupno vrijeme zasićenja od 2 s. Trajanje filtra  $T_{1\rho}$  bilo je 15 ms. Sve rezonancije protona liganda asignirane su na temelju spektara  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC i  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC snimljenih u istim uvjetima kao i STD NMR.

Da bi se odredila veličina efekta STD, promatrani intenziteti signala uspoređeni su s odgovarajućim protonskim signalom u referentnom spektru. Efekt STD od 100% je definiran kao signal u oba spektra koji imaju isti intenzitet. Za mapiranje veznih epitopa, STD signali iz svih protona jednog liganda su normirani prema najjačem promatranom protonskom STD signalu liganda. Najjačem signalu je dodijeljena vrijednost 100%, a ostali su normirani na ovaj signal.

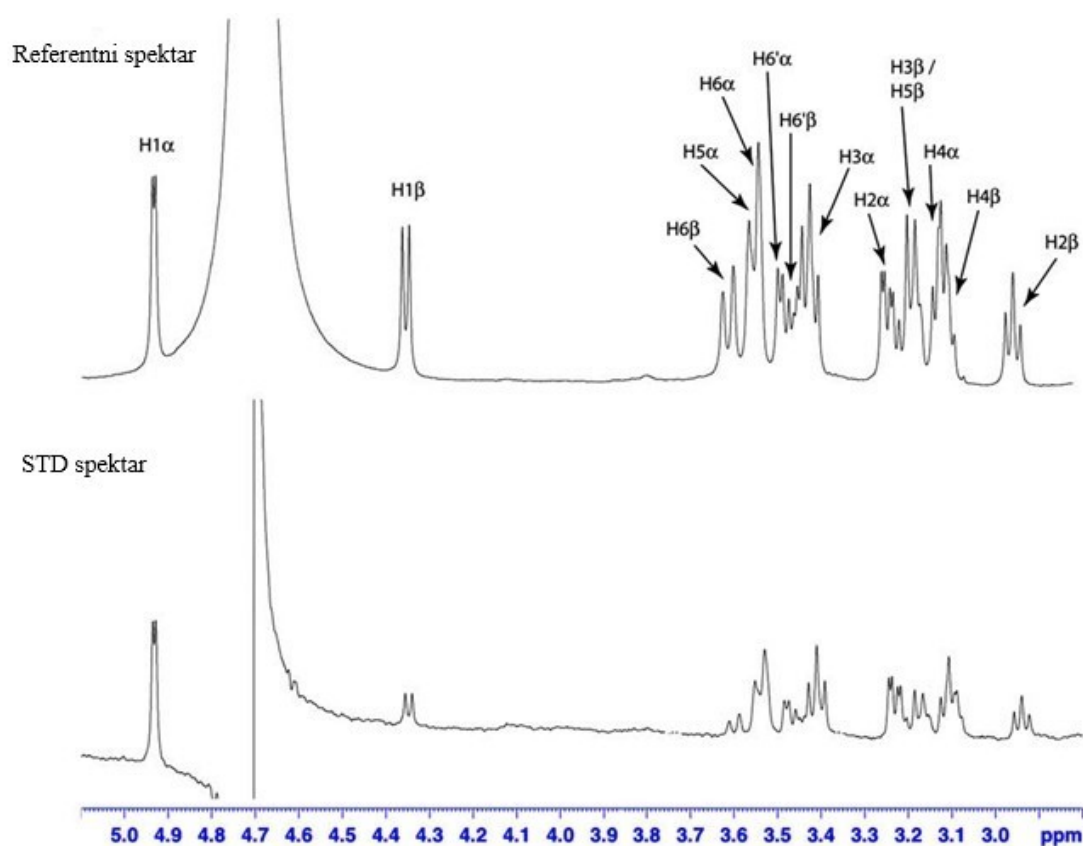
Titracije za određivanje afiniteta vezanja pojedinih liganada provedene su pod gore opisanim uvjetima snimanjem spektara STD u odsutnosti i uz dodatak drugog liganda u molarnom omjeru od 1: 1 u odnosu na prvi ligand. Uočeni signali STD su potom uspoređeni kako bi se odredilo koji ligand ima veći afinitet.

Za ispitivanje enzimске aktivnosti izmjereni su uzorci s 1,3  $\mu\text{M}$  kvašćeve heksokinaze PII i 5 mM glukoze i 5 mM ATP-a u prisutnosti i odsutnosti 0,1 mM  $\text{MgCl}_2$ .

### 3.2. Rezultati

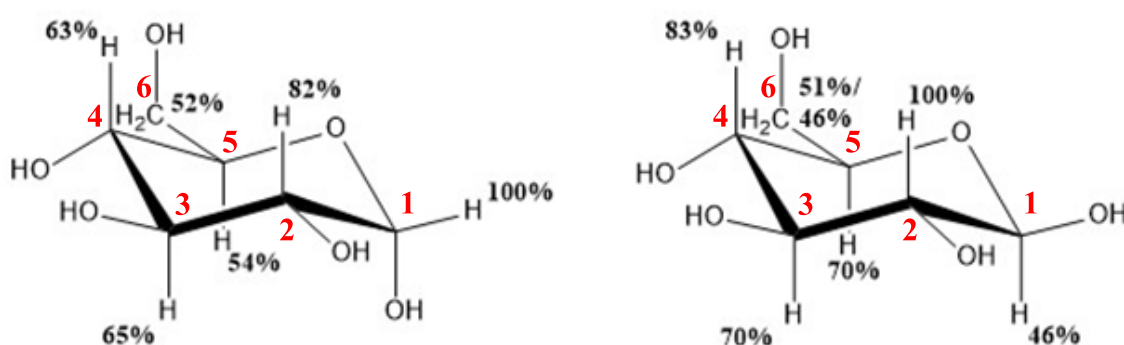
Čista heksokinaza otopljena je u deuteriranom fosfatnom puferu pri fiziološkom pH. Prije provedbe eksperimenta STD NMR s kvaščevom heksokinazom PII uklonjene su sve nedeuterirane tvari proteinskog uzorka korištenjem metoda poput ultrafiltracije, dijalize i kromatografije isključenjem. Glukoza je prirodni supstrat heksokinaze PII iz kvasca i enzimski se fosforilira u prisustvu ATP-a te nastaje glukoza-6-fosfat.

Spektar STD NMR snimljen u odsutnosti ATP-a, ukazuje da se glukoza veže na heksokinazu PII i u odsutnosti nukleotidnog fosfata. Spektar pokazuje i da se na enzim vežu oba anomera D-glukoze (Slika 6). Titracijom otopinom glukoze u koncentracijskom rasponu 200–1000  $\mu\text{M}$  dobivena je asimptotska korelacija između koncentracije supstrata i povećanja intenziteta signala STD, što ukazuje da se vezanje D-glukoze na heksokinazu PII iz kvasca događa na određenom mjestu enzima. Iz toga se može zaključiti da se glukoza specifično veže na heksokinazu PII. Za potvrdu aktivnosti heksokinaze PII u eksperimentalnim uvjetima snimljen je spektar  $^1\text{H}$  NMR glukoze u prisutnosti heksokinaze i ATP-a. Nastajanje produkta D-glukoza-6-fosfata i ADP-a potvrdilo je aktivnost heksokinaze u uvjetima eksperimenta. Pojava novih signala u spektrima  $^1\text{H}$  NMR ukazala je da pretežno nastaje  $\alpha$ -D-glukoza-6-fosfat. Nakon nekoliko sati mutarotacijom postiže se ravnotežni omjer  $\alpha$ -D-glukoza-6-fosfata i  $\beta$ -D-glukoza-6-fosfata koji iznosi 1:2.



Slika 6. Referentni spektar  $^1\text{H}$  NMR D-glukoze u prisutnosti heksokinaze i ATP-a (gore) i spektar STD NMR D-glukoze (dolje). Signali u spektru STD NMR odgovaraju protonima  $\alpha$ - i  $\beta$ -D-glukoze.<sup>11</sup>

Saznanje da se na heksokinazu vežu oba anomera D-glukoze potaknulo je autore na određivanje veznih epitopa pojedinog anomera. Za određivanje veznih epitopa izračunali su relativne efekte STD na pojedinom anomeru pomoću podataka iz spektra STD. Dobivene vrijednosti odražavaju relativnu količinu zasićenja koja se prenosi s proteina na ligand. Pretpostavlja se da je proton s većom vrijednošću STD bliže površini proteina od onog s manjom vrijednošću. Vezni epitopi  $\alpha$ - i  $\beta$ -D-glukoze su otprilike isti (Slika 7), što ukazuje na činjenicu da se oba šećera vežu na sličan način. Kod  $\alpha$ -anomera, proton vezan za ugljikov atom u položaju 1 (C-1) pokazuje najveći kontakt s površinom proteina, dok je u slučaju  $\beta$ -anomera površini proteina najbliže proton na atomu C-2. Nadalje, protoni na atomima C-4 i C-5 pokazuju različite količine zasićenja.

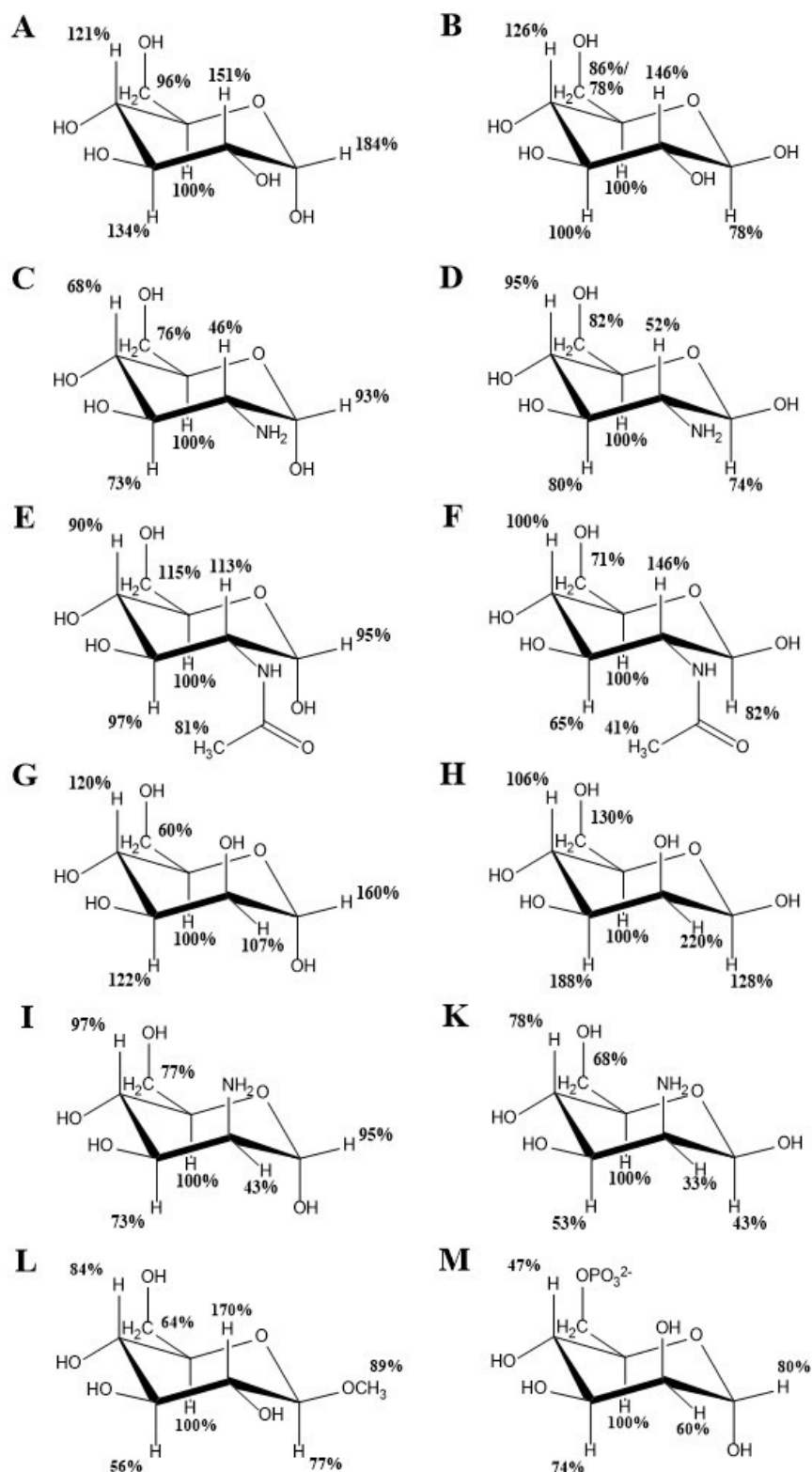


Slika 7. Brojanje atoma i vezni epitopi određeni spektroskopijom STD NMR za  $\alpha$ -D-glukožu (lijevo) i  $\beta$ -D-glukožu (desno). Postoci su dobiveni normiranjem prema protonu s najvećim efektom STD.<sup>11</sup>

Kako bi se bolje okarakteriziralo vezanje liganda na heksokinazu PII, provedeni su eksperimenti s različitim derivatima glukoze. Prvo su proučavani glukozamin i *N*-acetil-D-glukozamin (GlcNAc). Vezanje amino- ili acetamido- skupine na atom C-2 drastično mijenja vezne epitope za  $\alpha$ -anomere, dok epitopi  $\beta$ -anomera i dalje imaju vrijednosti usporedive s  $\beta$ -D-glukozom (Slika 8). U slučaju  $\beta$ -anomera razlikuju se samo relativni intenziteti signala STD protona na C-2. S druge strane, kod  $\alpha$ -anomera, relativni efekti STD svih protona razlikuju se od onih za  $\alpha$ -D-glukožu. Iz dobivenih podataka može se zaključiti da dodavanje amino ili acetamido skupine na atom C-2 mijenja način vezanja  $\alpha$ -, ali ne i  $\beta$ -anomera.

Na različito vezanje  $\alpha$ - i  $\beta$ -anomera ukazuje i usporedba epitopa glukoze i njezina C-2 epimera (manoze) (Slika 8). Umetanje dodatne amino skupine dodatno mijenja vezne epitope.  $\beta$ -D-manozamin ne pokazuje nikakve sličnosti s epitopima D-manoze, D-glukozamina ili D-glukoze. Relativni efekti STD  $\alpha$ -D-manozamina razlikuju se od onih D-manoze i D-glukoze, osim protona na atomu C-6 D-manoze. Međutim, vezni epitop  $\alpha$ -D-manozamina bio je sličan onome  $\alpha$ -glukozamina, s najvećom varijacijom na protonu vezanom na C-4, što upućuje na sličan način vezanja tih dviju molekula.

U daljnjim eksperimentima STD NMR analizirani su slijedeći produkti reakcije heksokinaze PII: D-glukoza-6-fosfat, D-glukozamin-6-fosfat i D-manoza-6-fosfat. Razlike u relativnim efektima STD  $\alpha$ -D-manoze-6-fosfata u odnosu na  $\alpha$ -D-manozu ukazuju da se način vezanja šećera znatno mijenja prilikom fosforilacije (Slika 8).



Slika 8. Vezni epitopi derivata glukoze određeni spektroskopijom STD NMR:  $\alpha$ -D-glukoza (A),  $\beta$ -D-glukoza (B),  $\alpha$ -D-glukozamin (C),  $\beta$ -D-glukozamin (D),  $\alpha$ -D-GlcNAc (E),  $\beta$ -D-GlcNAc (F),  $\alpha$ -D-manoza (G),  $\beta$ -D-manoza (H),  $\alpha$ -D-manozamin (I),  $\beta$ -D-manozamin (K),  $\beta$ -D-O-metil glukozid (L) i  $\alpha$ -D-manoza-6-fosfat (M). Postoci su dobiveni u odnosu na vrijednost STD efekta protona na C-5.<sup>11</sup>

Nadalje, ispitano je vezanje metil glikozida  $\alpha$ - i  $\beta$ - D-glukoze. Za  $\alpha$ -D-O-metilglukozid nisu zabilježeni signali STD, dok  $\beta$ -oblik pokazuje vezni epitop sličan onome  $\beta$ -D-glukoze, uz manje razlike u intenzitetima signala (Slika 8). Ovaj podatak upućuje da se  $\beta$ -D-glukoza i  $\beta$ -D-O-metilglukozid vežu na isto mjesto. Rezultati su pokazali i da heksokinaza PII u opisanim uvjetima fosforilira  $\beta$ -D-O-metil glukozid, dok je isti enzim neaktivan u slučaju  $\alpha$ -anomera kao supstrata.

Da bi se dobili relativni afiniteti vezanja različitih šećera u odnosu na D-glukozu, provedene su kompetitivne titracije STD. Kako se može uočiti na Slici 9., najveći relativni afinitet vezanja imala je D-manoza, zatim redom  $\alpha$ -N-acetil-D-glukozamin, D-glukoza i glukozamin,  $\beta$ -N-acetil-D-glukozamin, manozamin, te galaktoza. Na isti način je utvrđeno da 6-fosfati imaju znatno manji afinitet od odgovarajućih šećernih supstrata.

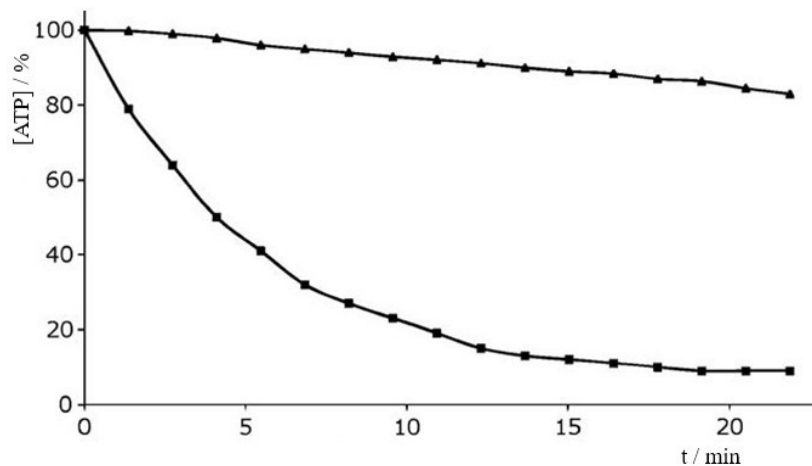
relativni afinitet vezanja

Man >>  $\alpha$ -GlcNAc > Glc = glukozamin >  $\beta$ -GlcNAc > manozamin >> Gal

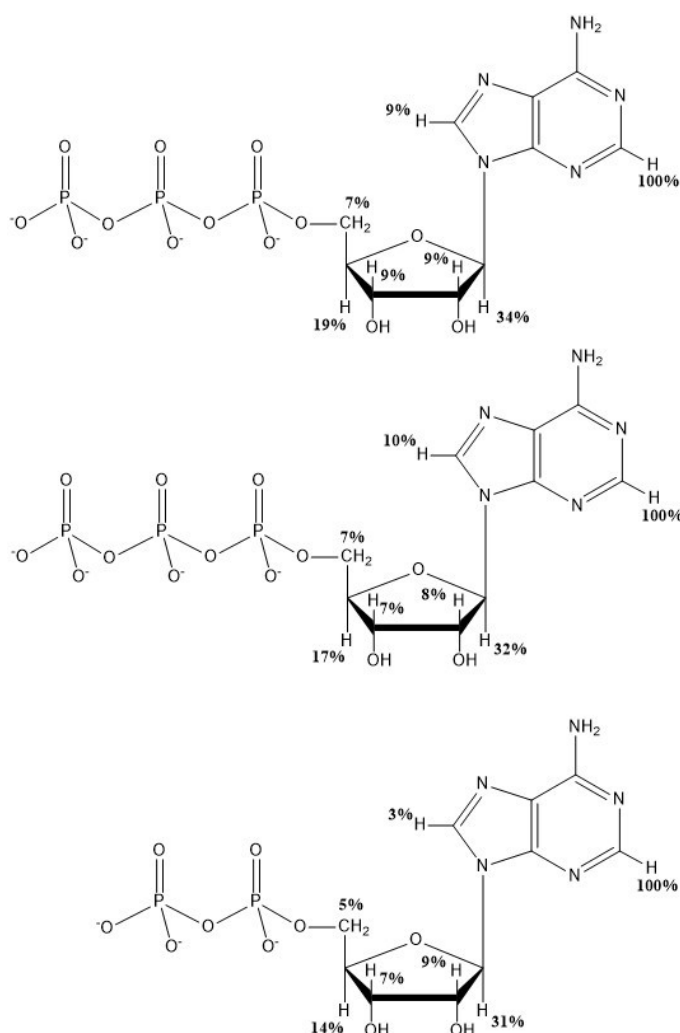
Slika 9. Shematski prikaz relativnog afiniteta vezanja D-glukoze i njenih derivata dobiveno kompetitivnom titracijom.<sup>11</sup>

Za mnoge kinaze je poznato da je ion  $Mg^{2+}$  neophodan za njihovu enzimsku aktivnost. Autori su pokazali da heksokinaza PII iz kvasca posjeduje enzimsku aktivnost i u odsutnosti  $Mg^{2+}$ . Utjecaj  $Mg^{2+}$  na enzimsku aktivnost heksokinaze ispitan je pomoću spektroskopije  $^1H$  NMR. Prisutnost 0,1 mM  $MgCl_2$  u uzorku uzrokovalo je značajno povećanje enzimske aktivnosti u usporedbi s uzorkom koji nema  $Mg^{2+}$  (Slika 10). Primjerice, za 50% pretvorbe D-glukoze u D-glukoza-6-fosfat u odsutnosti  $Mg^{2+}$ , bilo je potrebno oko 1 h, dok je u prisutnosti 0,1 mM  $Mg^{2+}$ , 50% pretvorbe postignuto nakon 4 min pa je reakcija završena unutar 20 min. Ovo pokazuje da brzina reakcije znatno ovisi o koncentraciji  $Mg^{2+}$ .

Uz pretpostavku da  $Mg^{2+}$  utječe na vezanje ATP-a na heksokinazu, snimljeni su spektri STD NMR u odsutnosti i prisutnosti iona  $Mg^{2+}$ . Dobiveni epitopi za ATP su bili vrlo slični (Slika 11), što upućuje da  $Mg^{2+}$  nema značajan utjecaj na način vezanja ATP-a. Štoviše, ovi podaci pokazuju da se ATP veže na heksokinazu čak i u odsutnosti glukoze. Isto tako, do vezanja ADP može doći i u odsutnosti šećernog liganda. S obzirom da nisu zabilježene značajne razlike za vezne epitope ADP-a i ATP-a, može se zaključiti da se nakon fosforilacije ne mijenja način vezanja nukleotida. Kako bi se spriječilo stvaranje netopljivog magnezijevog fosfata, za pokuse je korišten pufer Tris- $d_{11}$ . Pokus je napravljen i u natrij fosfatnom puferu te su dobiveni usporedivi rezultati, što ukazuje da pufer nema utjecaja na način vezanja. Kompetitivne titracije pokazale su da se u odsustvu  $Mg^{2+}$  ADP slabije veže za heksokinazu od ATP-a. Razlog tome je vjerojatno manji negativni naboj difosfata.



Slika 10. Promjena intenziteta signala ATP u prisustvu glukoze i heksokinaze PII u vremenu. Gornja krivulja označena trokutima odgovara eksperimentu bez  $Mg^{2+}$ , a donja krivulja označena kvadratićima odgovara eksperimentu u kojem ima 0,1 mM  $Mg^{2+}$ .<sup>11</sup>



Slika 11. Vezni epitopi određeni tehnikom STD NMR: ATP bez prisutnosti  $Mg^{2+}$  (gore), ATP u prisutnosti  $Mg^{2+}$  (sredina), ADP bez prisutnosti  $Mg^{2+}$  (dolje).<sup>11</sup>

## § 4. PROMJENA KEMIJSKOG POMAKA I ANALIZA RELAKSACIJE DOMENE SH3 VINEKSINA KORIŠTENJEM GENETSKI KODIRANE AMINOKISELINE OBILJEŽENE S $^{15}\text{N}$ I $^{19}\text{F}$

P. Shi *et al.*<sup>12</sup> proučavali su transversalnu i longitudinalnu relaksaciju te promjenu kemijskog pomaka okosnice i bočnih ogranaka SH3 domene ljudskog vineksina koristeći genetički kodiranu neprirodnu aminokiselinu obilježenu izotopima  $^{15}\text{N}$  i  $^{19}\text{F}$ .

Proteini su intrinzično fleksibilni i dinamični sustavi, što je važno za obavljanje njihovih bioloških funkcija. Spektroskopija NMR se pokazala kao koristan alat za opisivanje promjena konformacija i veznog mjesta proteina. Razvoj novih pulsničkih sljedova NMR omogućio je proučavanje unutarnje mobilnosti okosnice i bočnih lanaca proteina.

Neprirodne aminokiseline su prvi put ugrađene u protein prije otprilike dvadeset godina, korištenjem para ortogonalne amber tRNA/tRNA sintetaze.<sup>13</sup> Ovom se metodom neprirodne aminokiseline mogu specifično ugraditi u protein na stop kodonu (TAG) u slijedu DNA koja kodira protein, što je dobar mehanizam za uvođenje NMR aktivnog spina na određeno mjesto u proteinu. Za analizu spektroskopijom NMR, u proteine se mogu ugraditi različite neprirodne aminokiseline obilježene stabilnim izotopima.

SH3 je sveprisutna proteinska domena koja omogućava interakcije između proteina. Na nekoliko specifičnih mjesta domene SH3 ljudskog vineksina se visokim afinitetom veže peptid bogat prolinom (GEVPPRPPPPEE, P868). Dosadašnji podaci su pokazali da se aminokiseline Phe7 i Tyr51 nalaze u veznom džepu SH3, dok se ostatak Tyr26 nalazi izvan džepa za vezanje. U ovom radu, neprirodna aminokiselina, trifluorometil-fenilalanin označena s  $^{15}\text{N}$  i  $^{19}\text{F}$  ( $^{15}\text{N}/^{19}\text{F}$ -tfmF) ugrađena je umjesto Phe7, Tyr26 ili Tyr51 u strukturu SH3. Kemijski pomak i analiza  $T_1$  i  $T_2$  relaksacije amida okosnice ( $^{15}\text{N}$ ) $^1\text{H}$  ili spina  $^{19}\text{F}$  bočnog ogranka na navedena tri mjesta proučavani su u prisutnosti i odsutnosti peptidnog liganda P868.

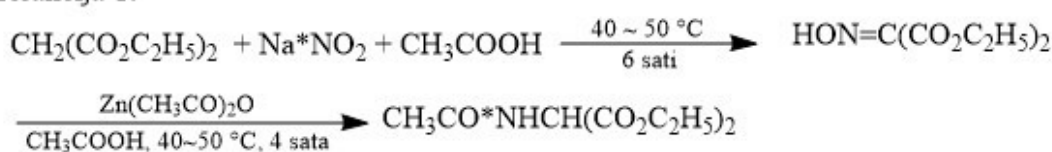
### 4.1. Eksperimentalna izvedba

#### 4.1.1. Sinteza trifluorometil-fenilalanina obilježenog izotopom $^{15}\text{N}$

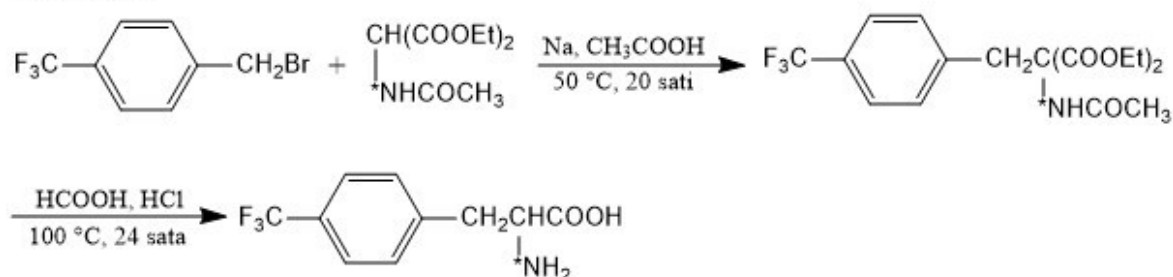
Aminokiselina trifluorometil-fenilalanin obilježena izotopom  $^{15}\text{N}$  pripravljena je iz međuprodukta dietil-acetaminomalonata. Smjesa  $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$  (8,75 g), dietil-malonata (16 ml) i vode (0,75 ml) otopljena je u 24 mL toluena. Reakcijska smjesa je ohlađena u ledenoj kupelji. Nakon postupnog dodatka 10 mL ledene octene kiseline, smjesa je zagrijana na 40–50°C i refluksirana 6 h. Organski sloj koji sadrži dietil-oksiminomalonat i ledenu octenu kiselinu je zatim odvojen pomoću lijevka za odjeljivanje. Odvojenom sloju dodano je 22 g cinkovog praha, te ja smjesa zagrijana na 40–50°C i refluksirana 4 h uz miješanje. Prekristalizacijom iz vode dobiven je bijeli produkt, dietil-acetaminomalonat obilježen s  $^{15}\text{N}$ .

Trifluorometil-fenilalanin obilježen izotopom  $^{15}\text{N}$  sintetiziran je iz dobivenog dietil-acetaminomalonata i 4-trifluorometilbenzil bromida. Otopina dietil-acetamidomalonata (10,0 g) pripravljena u bezvodnom etanolu (125 mL) dodana je u otopinu natrijevog etoksida. Dobivena smjesa je refluksirana 1,5 h pri  $50^\circ\text{C}$ . Reakcijskoj smjesi je postupno dodavano 11,0 g 4-trifluorometilbenzil bromida tijekom 20 h. Smjesa je zatim ohlađena na sobnu temperaturu te je talog odvojen filtracijom i dodan u smjesu 98% mravlje kiseline (50 mL) i koncentrirane HCl (50 mL). Dobivena smjesa je refluksirana 24 h pri  $100^\circ\text{C}$  prije nego što je osušen konačni produkt, trifluorometil-fenilalanin (tfmF) obilježen izotopom  $^{15}\text{N}$ .

Reakcija 1:



Reakcija 2:



Slika 12. Sinteza trifluorometil-fenilalanina obilježenog izotopom  $^{15}\text{N}$ .<sup>12</sup>

#### 4.1.2. Konstrukcija slijeda aminokiselina

Fragment DNA koji kodira domenu SH3 ljudskog vineksina dobiven je pomoću reakcije PCR iz odgovarajućeg ekspresijskog plazmida. Dobiveni fragment umetnut je u vektor pBAD (Invitrogen Co.) između mjesta NcoI i XhoI. Dobiveni slijed aminokiselina sadržavao je His<sub>6</sub>-oznaku vezanu na N kraj rekombinirane domene SH3.

#### 4.1.3. Ugradnja trifluorometil-fenilalanina obilježenog izotopima $^{15}\text{N}$ i $^{19}\text{F}$ u domenu SH3 proteina vineksina čovjeka

U plazmidu pBAD-His<sub>6</sub>-SH3, kodoni koji odgovaraju aminokiselinama Phe7, Tyr26 i Tyr51 domene SH3 mutirani su u amber stop kodon TAG postupkom mutageneze (Stratagene Co.). Plazmidi pBAD, koji kodira mutiranu domenu SH3 i pDule-tfmF, koji sadrži sljedove DNA koje kodiraju tRNA<sub>CUA</sub> i tfmF-specifičnu aminoacil-tRNA sintetazu, dobiveni su od strane dr. R.A. Mehl (Department of Chemistry, Franklin i Marshall College, Pennsylvania, USA), te su transformirani u *E. coli* stanice domaćina TOP10 u prisutnosti 15 μg/mL tetraciklina i 100 μg/mL ampicilina. Transformirane bakterije inkubirane su preko noći u LB mediju, a zatim prebačene u svježi 2 x YT medij koji je sadržavao 1 mM  $^{15}\text{N}/^{19}\text{F}$ -tfmF pri  $37^\circ\text{C}$ . Ekspresija proteina inducirana je dodatkom 0,2% arabinoze.



#### 4.1.4. Čišćenje proteina

Stanice su sakupljene centrifugiranjem pri 6000 okretaja u minuti tijekom 8 minuta pri 4°C. Dobiveni talog stanica suspendiran je u 40 mL pufera za razlaganje (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 3 mM imidazola, pH 8,0). Suspenzije stanica u puferu za razlaganje sonificirane su ukupno 10 minuta na ledu pomoću sonde (VC500, Sonics i Materials, Danbury, CT) pri snazi od 30%, pulsu od 2,0 s i impulsu od 4,0 s. Dobiveni lizat je zatim centrifugiran pri 16000 okretaja u minuti tijekom 20 minuta pri 4°C. Uzet je supernatant, te je pomiješan s 5 mL  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA smole (QIAGEN, Valencia, CA). Smjesa je rotirana pri 4°C tijekom 20 minuta prije nanošenja na kolonu. Nečistoće su isprane s kolone uz dodatak 50 mL pufera za ispiranje (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 20 mM imidazola, pH 8,0). Proteini su eluirani pomoću pufera za eluiranje (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 250 mM imidazola, pH 8,0).

Pročišćeni rekombinirani proteini analizirani su denaturirajućom elektroforezom na gelu (SDS-PAGE) i ukoncentrirani pomoću uređaja Amicon Ultra 15 mL (5000 MWCO, Millipore). Napravljena su dva kruga ukoncentriravanja i razrjeđenja u puferu za NMR koji je sadržavao 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  pri pH 6,5, u svrhu uklanjanja imidazola i izmjene pufera. Konačna koncentracija otopine za analizu NMR postignuta je dopunjavanjem s  $\text{D}_2\text{O}$ .

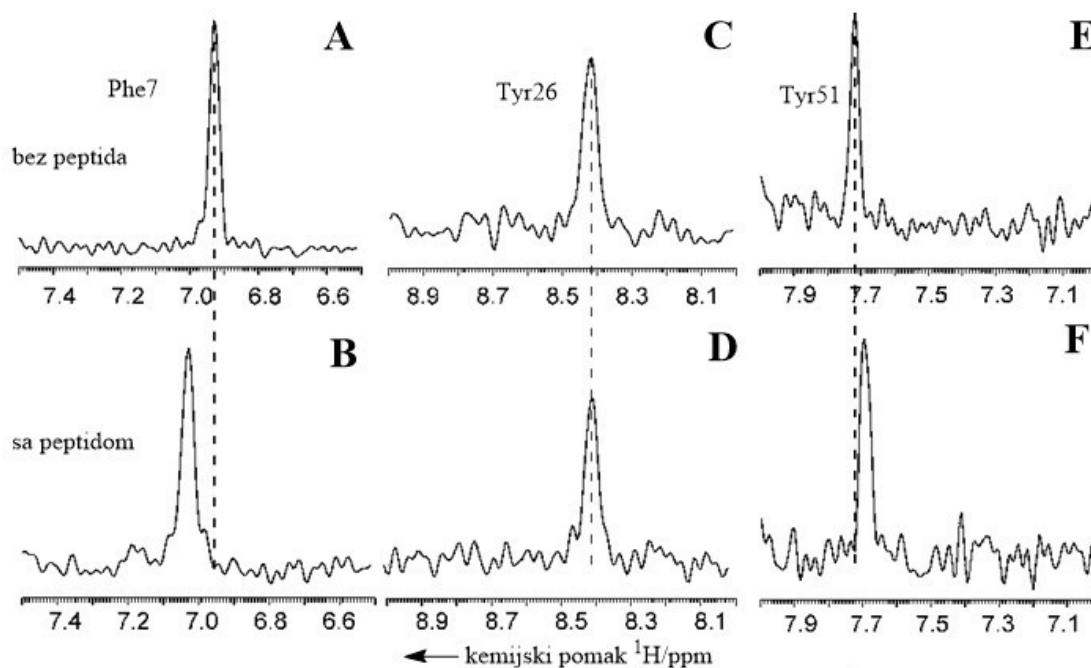
#### 4.1.5. Izvedba eksperimenata NMR

Svi jednodimenzijski spektri  $^1\text{H}$  NMR filtrirani za  $^{15}\text{N}$  dobiveni su pri 298 K pomoću Bruker Avance 500 MHz spektrometra opremljenog s trokanalnom krio-sondom. Pulsni slijed HSQC primijenjen je za filtriranje  $^{15}\text{N}$  magnetizacije. Prvi FID (engl. *free-induction decay*) podaci s 2048 točaka za eksperiment HSQC prikupljeni su i obrađeni eksponencijalnom funkcijom (širenje linija = 10 Hz) pomoću programa Top Spin tvrtke Bruker. Podaci za  $T_1$  i  $T_2$  amidnih  $^{15}\text{N}$  atoma okosnice proteina dobiveni su primjenom standardnog pulsnog slijeda na istom spektrometru. Vrijednosti intenziteta signala od ukupno sedam longitudinalnih relaksacija (61,33; 141,6; 242,0; 362,42; 523,0; 753,82 i 1145,2 ms) mjereni su i obrađeni kao eksponencijalna funkcija za  $T_1$  relaksaciju, dok su intenziteti šest transverzalnih signala (17,6; 35,2; 52,8; 70,4; 105,6 i 140,8 ms) izmjereni i obrađeni za  $T_2$  relaksaciju amidnih protona okosnice u tfmF-SH3 koristeći program Origin (OriginLab, Co.).

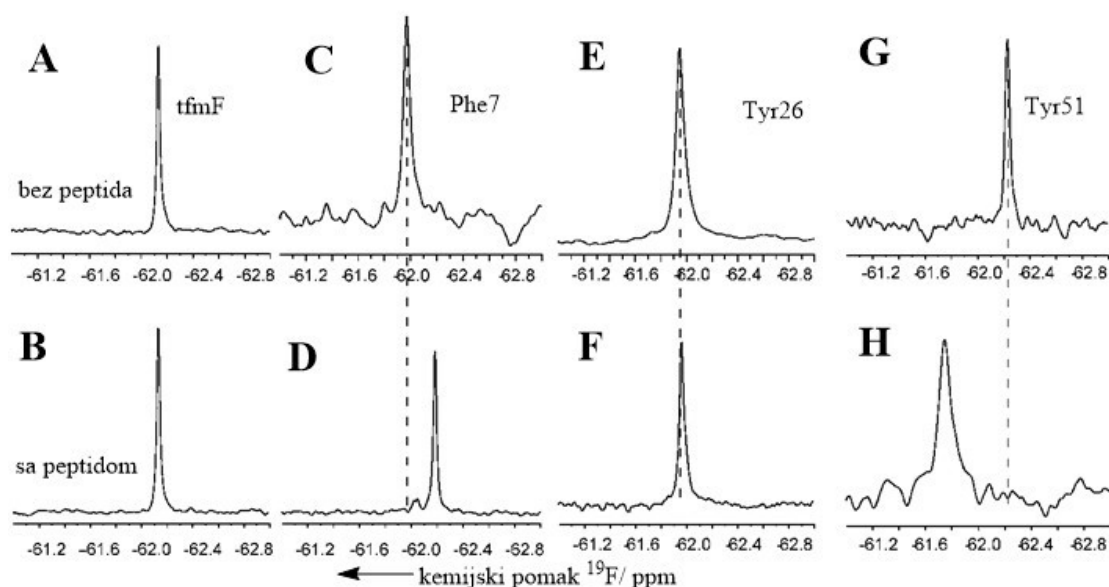
Svi jednodimenzijski spektri  $^{19}\text{F}$  NMR snimljeni su pri 298 K na Bruker Avance 400 MHz spektrometru opremljenom širokopojasnom dvokanalnom sondom, a promatrani kanal bio je podešen na  $^{19}\text{F}$  (376 MHz). Spektri su dobiveni uz 16384 kompleksnih točaka korištenjem jednostavnog pulsa i obrađeni eksponencijalnom funkcijom (širenje linija = 10 Hz) pomoću programa Top Spin tvrtke Bruker. Podaci o relaksaciji  $T_1$  za  $^{19}\text{F}$  na okosnici, prikupljeni su s osam longitudinalnih perioda relaksacije (50, 100, 200, 500, 800, 1000, 1500 i 2000 ms) koristeći standardni IR (engl. *inversion recovery*) pulsni slijed. Podaci o relaksaciji  $T_2$  za  $^{19}\text{F}$  okosnice, prikupljeni su s osam transverzalnih relaksacijskih perioda (100, 150, 200, 400, 600, 800, 1200 i 1600 ms) uz korištenje standardnog pulsnog slijeda Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG).

## 4.2. Rezultati

Budući da je  $^{15}\text{N}/^{19}\text{F}$ -tfmF specifično uveden na tri različita mjesta, u svakom spektru  $^1\text{H}$  NMR filtriranom za  $^{15}\text{N}$  i  $^{19}\text{F}$  (Slike 13 i 14) zabilježen je samo po jedan signal. Na spektrima filtriranim za  $^{15}\text{N}$  (Slika 13) i  $^{19}\text{F}$  spektrima (Slika 14), pojedinačni pikovi odgovaraju aminokiselinama  $^{15}\text{N}/^{19}\text{F}$ -tfmF supstituiranim na mjestima Phe<sup>7</sup>, Tyr<sup>26</sup> i Tyr<sup>51</sup>.



Slika 13. Spektar  $^1\text{H}$  NMR aminokiseline  $^{15}\text{N}/^{19}\text{F}$ -tfmF filtriran za izotop  $^{15}\text{N}$  u odsutnosti (A, C, E) i prisutnosti peptidnog (B, D, F) liganda P868.<sup>12</sup>



Slika 14. Spektar  $^{19}\text{F}$  NMR bočnog ogranka  $^{15}\text{N}/^{19}\text{F}$ -tfmF u odsutnosti (A, C, E, G) i prisutnosti (B, D, F, H) peptidnog liganda P868.<sup>12</sup>

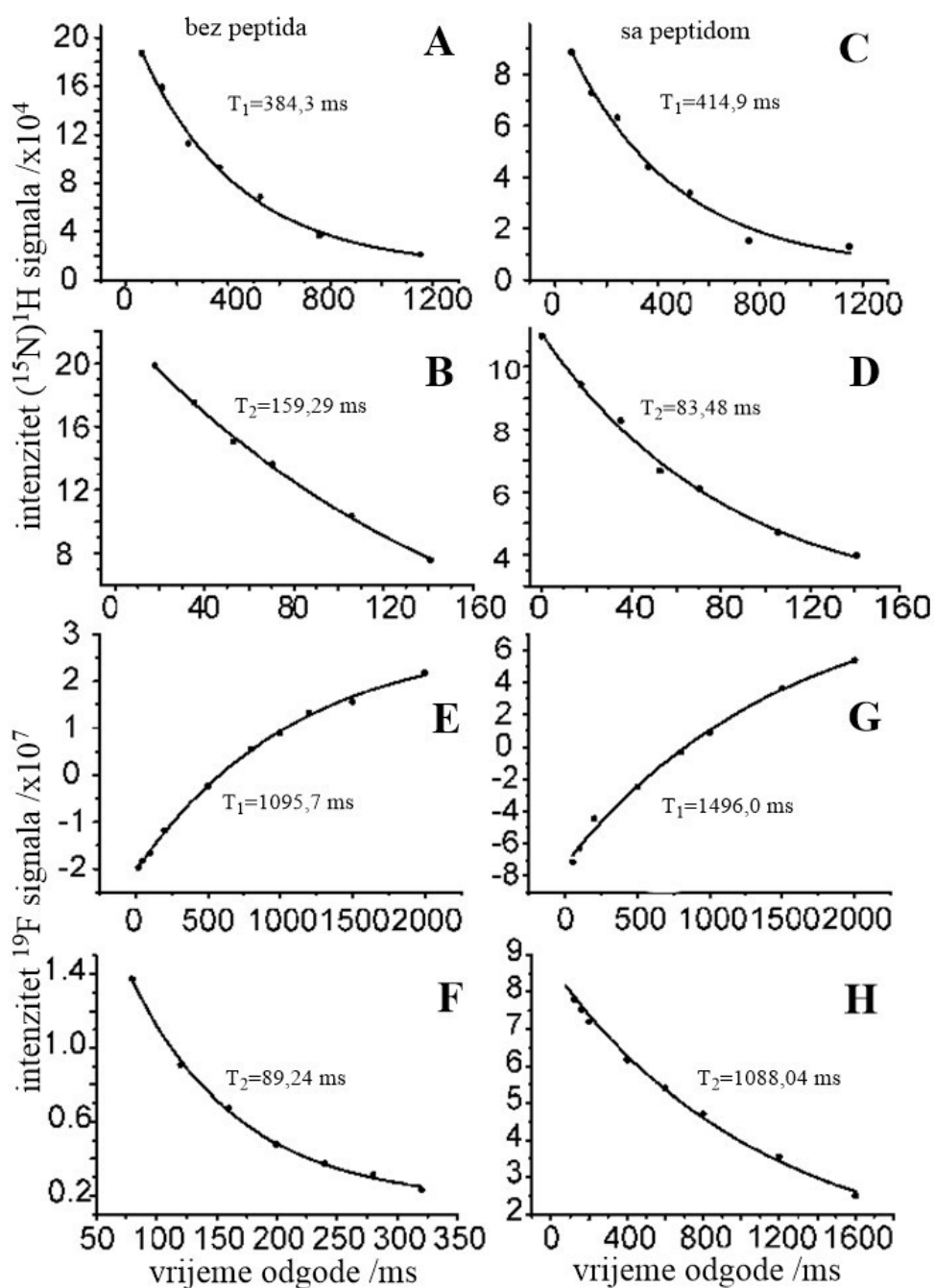
Istodobno se mogu vidjeti promjene kemijskog pomaka aminokiseline  $^{15}\text{N}/^{19}\text{F}$ -tfmF ugrađene umjesto Phe7 i Tyr51 u odsutnosti i prisutnosti peptidnog liganda P868. S druge strane, nikakve promjene nisu uočene prilikom dodatka liganda P868 samoj aminokiselini  $^{15}\text{N}/^{19}\text{F}$ -tfmF niti proteinu s ugrađenom  $^{15}\text{N}/^{19}\text{F}$ -tfmF umjesto Tyr26. Promjene kemijskog pomaka prilikom vezanja liganda P868 potvrđuju prethodno saznanje da se Phe7 i Tyr51 nalaze na veznom mjestu, dok je Tyr26 nalazi udaljen od veznog mjesta. Promjene kemijskih pomaka  $^{19}\text{F}$  nisu zabilježene za aminokiselinu  $^{15}\text{N}/^{19}\text{F}$ -tfmF, bez obzira na prisutnost peptidnog liganda, što isključuje bilo kakvu nespecifičnu interakciju između peptida i obilježenih aminokiselina.

Slika 15. prikazuje rezultate mjerenja vremena longitudinalne ( $T_1$ ) i transverzalne ( $T_2$ ) relaksacije  $^1\text{H}$  i  $^{19}\text{F}$  spinova aminokiseline  $^{15}\text{N}/^{19}\text{F}$ -tfmF prilikom vezanja P868. Podaci odgovaraju signalima amida okosnice proteina odnosno bočnog ogranka na mjestu Phe7. Može se uočiti da je vrijeme relaksacije  $T_2$  za amid prilikom vezanja liganda upola manje od  $T_2$  u odsutnosti P868 (Slika 15 B i D), dok za  $T_1$  nema razlike (Slika 15 A i C). Istodobno, vrijeme relaksacije  $T_2$  bočnog lanca na mjestu Phe7 povećalo se više od 10 puta (Slika 15 F i H), dok se vrijeme relaksacije  $T_1$  prilikom vezanja liganda povećalo 1,5 puta (Slika 15 E i G).

Prema teoriji relaksacije i funkciji spektralne gustoće od  $^{15}\text{N}$  i  $^{19}\text{F}$ , omjer  $T_1/T_2$  funkcija je unutarnje mobilnosti. Povećanjem omjera  $T_1/T_2$  i izražen pad vrijednosti  $T_2$  ukazuje da se mobilnost na tom mjestu smanjuje, dok smanjenje omjera  $T_1/T_2$  i naglašen porast vrijednosti  $T_2$  ukazuju na povećanje mobilnosti tog mjesta. Ovaj podatak dovodi do zaključka da se mobilnost okosnice na mjestu Phe7 smanjuje, dok se mobilnost bočnog ogranka povećava uslijed vezanja peptidnog liganda P868 na domenu SH3 vineksina.

Na isti način provedena je analiza vremena relaksacije  $T_1$  i  $T_2$  uslijed vezanja liganda na mjestima Tyr51 i Tyr26. Kao što se može uočiti u Tablici 2., nije došlo do promjene  $T_1$  i  $T_2$  na mjestu Tyr26, što je u skladu s činjenicom da se Tyr26 nalazi udaljen od mjesta vezanja P868. S druge strane, smanjenje vremena relaksacije  $T_2$  i povećani omjer  $T_1/T_2$  na mjestu Tyr51 ukazuju na smanjenje mobilnosti okosnice i bočnog lanca prilikom vezanja liganda.

Dobiveni rezultati su pokazali da je opisana metoda izotopnog obilježavanja u svrhu detekcije promjena kemijskih pomaka te longitudinalnih i transverzalnih vremena relaksacije vrlo korisna i pouzdana za analizu konformacijskih promjena i interne mobilnosti na biološki zanimljivim mjestima složenih proteina. Biološki zanimljiva mjesta proteina mogu uključivati aktivna mjesta enzima, mjesta vezanja liganda na receptor, ili područje važno za stvaranje protein-protein kompleksa.



Slika 15. Analiza vremena relaksacije  $T_1$  (A, C, E, G) i  $T_2$  (B, D, F, H) okosnice proteina obilježene s  $^{15}\text{N}$  (A-D) i bočnog ogranka (E-H) s aminokiselinom  $^{15}\text{N}/^{19}\text{F}$ -tfmF ugrađenom na mjesto Phe7 u odsutnosti (A,B, E, F) i prisutnosti (C, D, G, H) peptidnog liganda P868.<sup>12</sup>

Tablica 2. Analiza kemijskih pomaka te vremena relaksacije  $T_1$  i  $T_2$  amida okosnice obilježenog s  $^{15}\text{N}$  i bočnog ogranka obilježenog s  $^{19}\text{F}$  aminokiseline  $^{15}\text{N}/^{19}\text{F}$ -tfmF na različitim mjestima (Phe7, Tyr51 i Tyr26).<sup>12</sup>

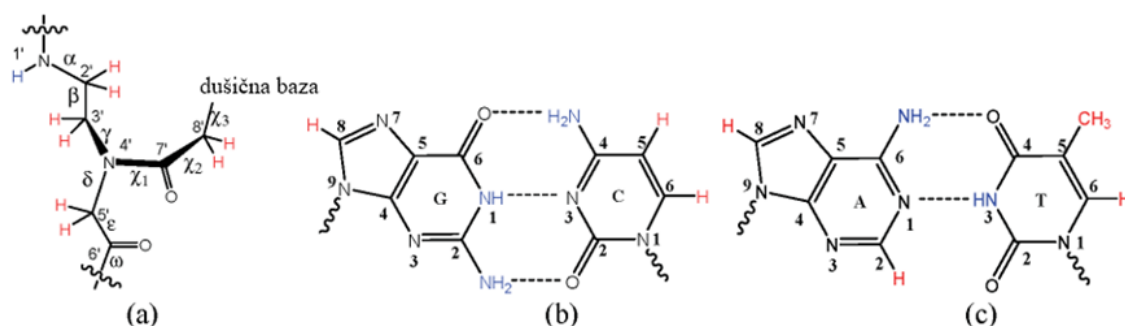
	kemijski pomak amidnog $^1\text{H}$ (ppm)		kemijski pomak $^{19}\text{F}$ (ppm)	
	bez P868	sa P868	bez P868	sa P868
tfmF	n.d.	n.d.	-62,21	n.d.
Phe7	6,93	7,03	-61,97	-62,16
Tyr51	7,72	7,68	-62,22	-61,74
Tyr26	8,42	8,42	-61,94	-61,96
	$T_1$ $^{15}\text{N}$ okosnice (ms)		$T_2$ $^{15}\text{N}$ okosnice (ms)	
	bez P868	sa P868	bez P868	sa P868
tfmF	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phe7	384,3 ± 46,0	414,9 ± 70,5	159,29 ± 33,25	83,48 ± 11,29
Tyr51	329,59 ± 9,89	411,56 ± 7,77	115,55 ± 42,24	69,94 ± 15,09
Tyr26	426,50 ± 102,15	461,10 ± 36,77	95,06 ± 21,36	93,25 ± 11,19
	$T_1$ $^{19}\text{F}$ bočnog ogranka (ms)		$T_2$ $^{19}\text{F}$ bočnog ogranka (ms)	
	bez P868	sa P868	bez P868	sa P868
tfmF	1470,6 ± 62,1	n.d.	969,5 ± 199,4	n.d.
Phe7	1095,7 ± 68,7	1496,0 ± 286,7	89,24 ± 5,84	1088,04 ± 217,47
Tyr51	1039,5 ± 30,5	958,69 ± 105,15	105,24 ± 12,7	8,22 ± 2,29
Tyr26	869,98 ± 20,46	910,40 ± 37,44	78,11 ± 3,75	85,47 ± 4,29

n.d.: nije detektirano

## § 5. STRUKTURA DVOLANČANE PNA U OTOPINI

W. He et al. predstavili su rezultate istraživanja u kojem su proučavali palindromsku dvolančanu molekulu peptidne nukleinske kiseline od 8 parova baza GGCATGCC u deuteriranoj vodi i smjesi  $H_2O:D_2O = 9:1$ .

Peptidna nukleinska kiselina (PNA) je sintetički analog DNA koja ima pseudopeptidnu okosnicu za razliku od okosnice DNA koja je građena od šećera i difosfata. Prva PNA je imala okosnicu baziranu na *N*-(2-aminoetil) glicinu.<sup>15</sup> PNA sadrži sve dušične baze kao i DNA, te stvara homodupleks prema Watson-Crickovom sparivanju (Slika 16).



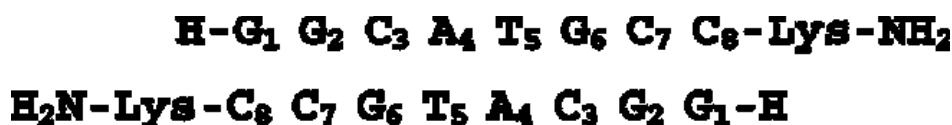
Slika 16. Struktura okosnice PNA (a), GC (b) i AT (c) parovi baza PNA. Plavom bojom označeni su izmjenjivi, a crvenom neizmjenjivi protoni.<sup>14</sup>

Okosnica PNA ne sadrži kiralne centre, pa kiralnost molekule ovisi samo o utjecaju aminokiselinskih ostataka u PNA oligomeru. PNA ima veliku ulogu u razvijanju spojeva za gensku terapiju jer se može selektivno vezati na DNA ili RNA u svrhu stvaranja dvolančanih PNA·DNA i PNA·RNA koji su stabilniji od DNA·DNA i RNA·RNA analoga.<sup>16</sup> Struktura dvolančane PNA ima oblik uzvojnice koja se razlikuje od DNA, a naziva se P-oblik. Ova uzvojnica ima 18 parova baza po jednom zavoju i promjer od 28 Å, dok DNA po zavoju ima 10 do 12 parova baza i promjer od  $\approx 24$  Å za A- i B-DNA te 20 Å za Z-DNA.

### 5.1. Priprema uzoraka i eksperimentalna izvedba

#### 5.1.1. Sinteza monomera i oligomera PNA

Monomeri PNA s bazama A, T, C i G nabavljeni su od Applied Biosystems i korišteni bez dodatnog pročišćavanja. Nemodificirana PNA s osam baza (H-GGCAT-GCC-Lys-NH<sub>2</sub>) sintetizirana je Boc-zaštitnom strategijom.<sup>17</sup> Nakon odcjepljenja, dobivena PNA je istaložena upotrebom dietil-etera i pročišćena pomoću HPLC obrnutih faza na C18 koloni. Apsorbancija je izmjerena na 260 nm pomoću Waters 2996 detektora. Dodatna karakterizacija oligomera provedena je spektrometrijom masa uz ionizaciju MALDI i detektor mase vremena leta.



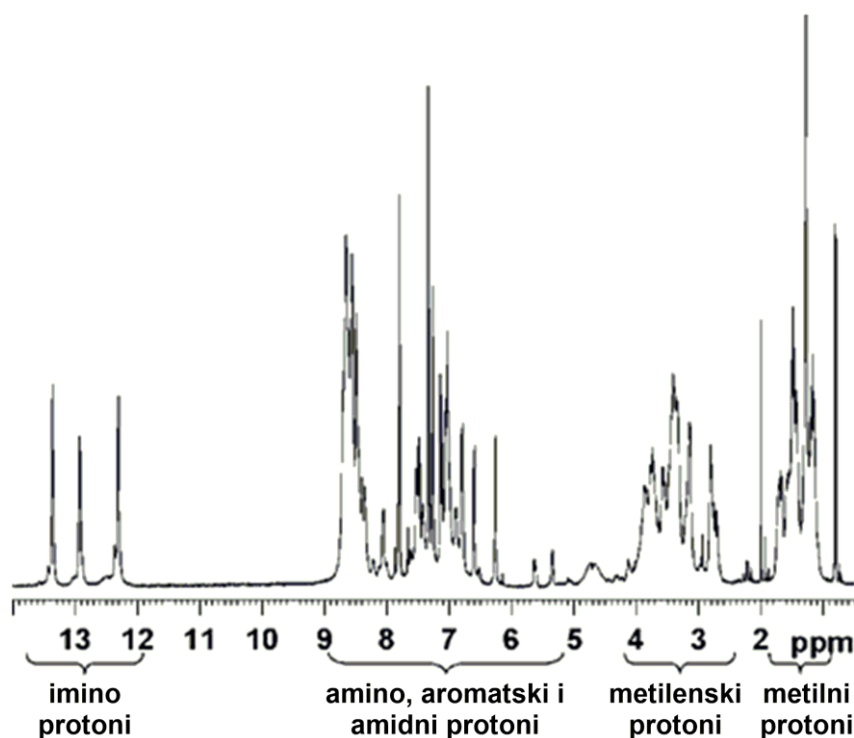
Slika 17. Palindromski slijed dvolančane PNA s osam parova dušičnih baza<sup>14</sup>

### 5.1.2. Izvedba eksperimenata NMR

Jednodimenzijски spektar  $^1\text{H}$  NMR WATERGATE dupleksa PNA snimljen je u  $\text{D}_2\text{O}$  i smjesi  $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}=9:1$ , uz koncentraciju od  $800\ \mu\text{M}$ . Isti uvjeti i koncentracije korištene su za snimanje spektara oktamera. Provedeno je pet eksperimenata NOESY s različitim vremenima miješanja od 50, 100, 150, 200 i 300 ms, uz odgodu od 1,5 s. Svi spektri NMR snimljeni su pri 300 K na spektrometru Bruker Avance DMX-500.

## 5.2. Rezultati

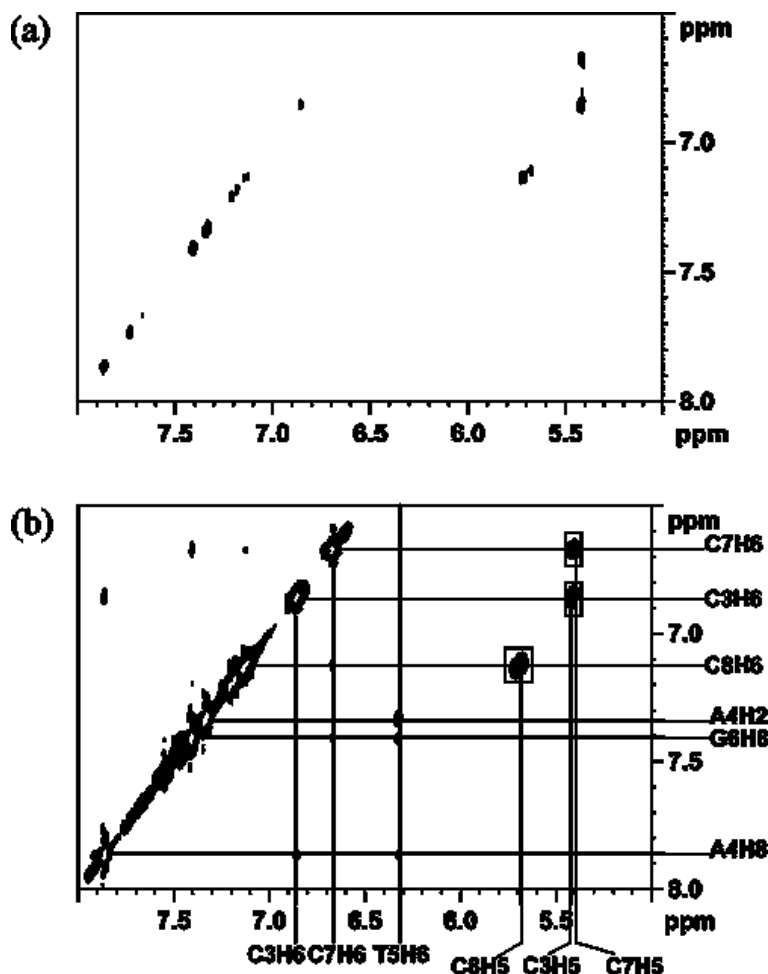
Iz strukture prikazane na Slici 16 može se uočiti da molekula PNA sadrži izmjenjive i neizmjenjive protone. Imino (G-H1 i T-H3) i amino (G-H2N, C-H4N i A-H6N) protoni dušičnih baza te amidni (H1') protoni okosnice mogu se izmjenjivati s otapalom, dok takva izmjena nije moguća kod aromatskih (G-H8, C-H5/6, A-H2/H8 i T-H6) i metilnih protona (T-H5) dušičnih baza te metilenskih protona (H2'/H2'', H3'/H3'', H5'/H5'' i H8'/H8''). Stoga se u jedno- i dvodimenzijским spektrima NMR otopine PNA u  $\text{D}_2\text{O}$  pojavljuju samo signali neizmjenjivih protona, dok se u spektru otopine PNA u  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1) pojavljuju signali svih protona (Slika 18).



Slika 18. Spektar  $^1\text{H}$  NMR dvolančane PNA u  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1), pH 7,0 10mM pufera (natrijev fosfat),  $[\text{PNA}]=0,4\ \text{mM}$ ,  $27^\circ\text{C}$ .<sup>14</sup>

Signali neizmjenjivih aromatskih protona PNA asignirani su na temelju podataka iz jedno- i dvodimenzijških spektara NMR snimljenih u  $\text{D}_2\text{O}$ . Za razliku od DNA, ova sintetska nukleinska kiselina sadrži šest metilenskih protona na svakoj jedinici okosnice, koji imaju slične kemijske pomake jer su relativno daleko od dušičnih baza. Time dolazi do preklapanja signala u rasponu od 2,5 do 4 ppm, što onemogućuje njihovu nedvojbenu asignaciju. Stoga su za asignaciju preostalih protona snimljeni dvodimenzijški spektri.

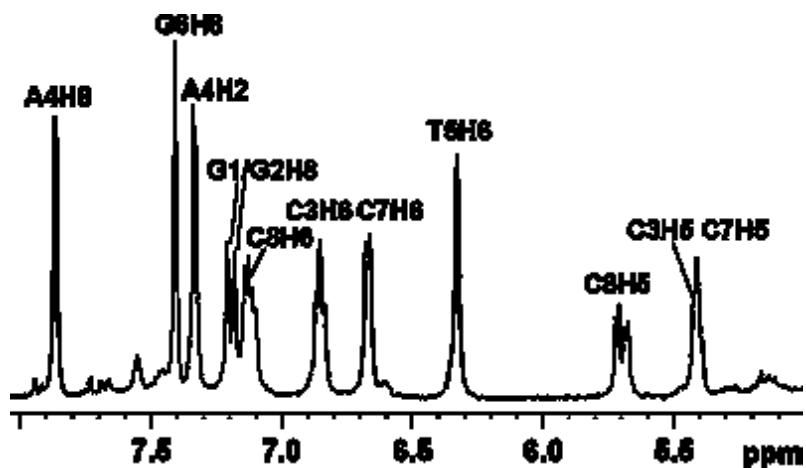
U spektru COSY (Slika 19a) mogu se uočiti korelacije između C-H5 i C-H6 protona citozina C3, C7 i C8 pri 6,67 i 5,41; 6,86 i 5,43 odnosno 7,17 i 5,71 ppm. Izvandijagonalni signali u spektru NOESY pri 7,17 i 6,67 ppm pripadaju susjednim dušičnim bazama, odnosno protonima citozina C7 i C8 u položaju 6 (Slika 19b). Korelacije NOESY se mogu opaziti i kod prostorno bliskih protona C3-H5 i C3-H6 te C3-H6 i A4-H8 pri kemijskim pomacima 6,86 i 5,43 ppm odnosno 6,86 i 7,87 ppm. Nadalje, u spektru NOESY prisutna je i korelacija između C7-H6 i G6-H8 protona pri 6,77 odnosno 7,41 ppm. Istim postupkom asignirani su signali C7-H6 i C8-H6 protona pri 6,67 i 7,17 ppm, kao i signali protona H5 citozina C3, C7 i C8 pri 5,43; 5,41 odnosno 5,71 ppm (Slika 20).



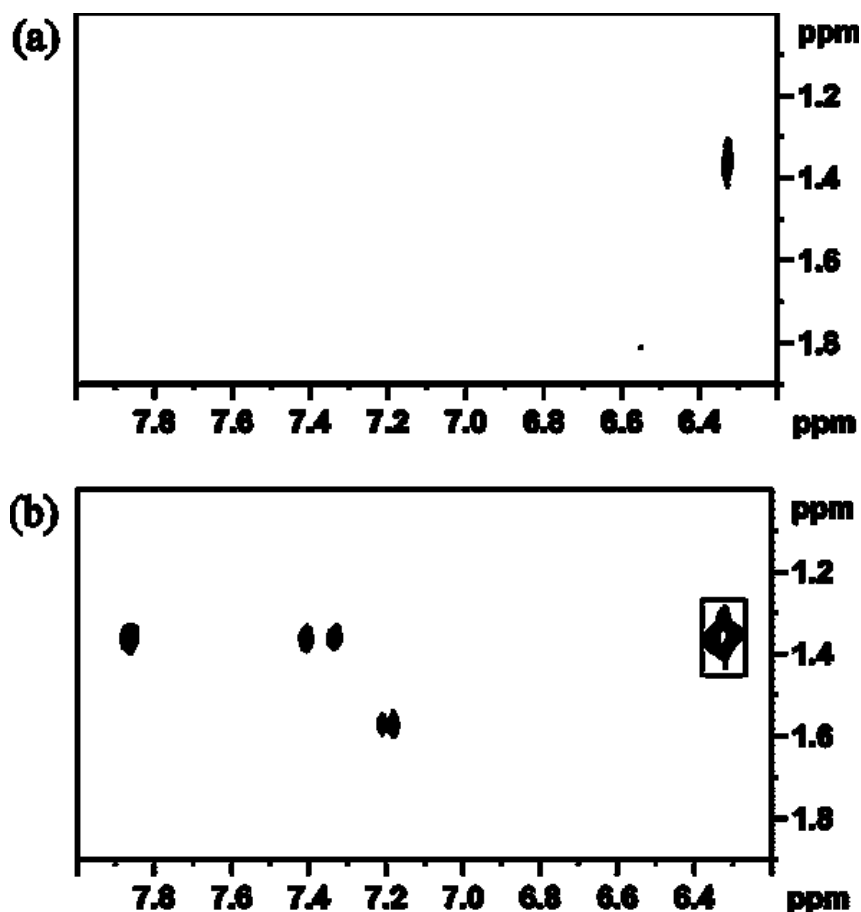
Slika 19. Spektar (a) COSY i (b) NOESY aromatskog područja dvolančane PNA u  $D_2O$ ,  $[PNA]=0,4mM$ ,  $27^{\circ}C$ . Zaokruženi signali odgovaraju korelacijama protona H5-H6 citozina<sup>14</sup>

Singlet pri 6,33 ppm odgovara aromatskim protonima timina u položaju 6 koji su u sprezi s metilnom skupinom pri 1,35 ppm u položaju 5 (Slika 21a). Metilna skupina timina pokazuje i jake korelacije u spektru NOESY s aromatskim protonima koji čine bazne parove A4·T5' i G6·C3'. Signali G6-H8 i A4-H8 protona nalaze se pri 7,41 i 7,87 ppm, a signal A4-H2 pri 7,34 ppm. Preostala dva signala u području 7,2–7,3 ppm pripadaju aromatskim protonima G1-H8 i G2-H8 (Slika 20).



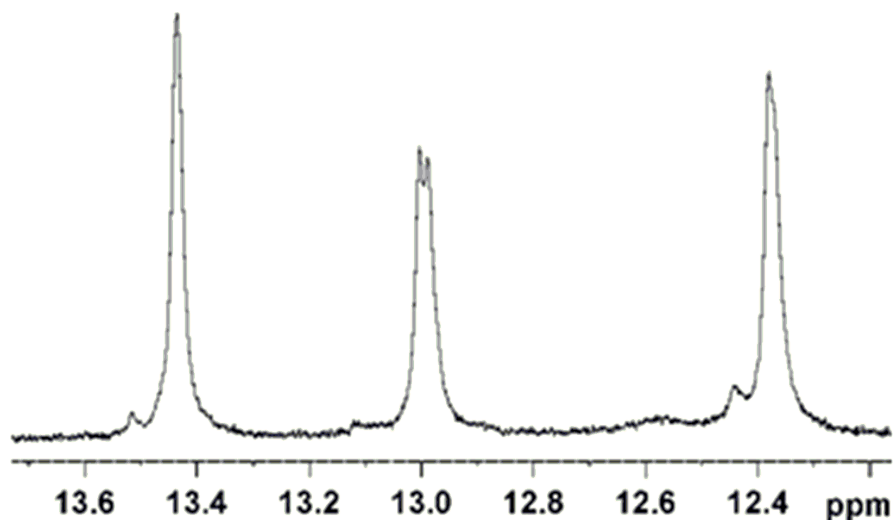


Slika 20. Aromatsko područje spektra  $^1\text{H}$  NMR dvolančane PNA u  $\text{D}_2\text{O}$  ( $[\text{PNA}]=0,4\text{mM}$ ,  $27^\circ\text{C}$ ).<sup>14</sup>



Slika 21. Spektar (a) COSY i (b) NOESY metilnog i aromatskog područja oktamerne dvolančane PNA u  $\text{D}_2\text{O}$  ( $[\text{PNA}]=0,4\text{mM}$ ,  $27^\circ\text{C}$ ). Zaokruženi signal pripada korelaciji aromatskog protona timina u položaju 5 i metilne skupine iste baze.<sup>14</sup>

Palindromska dvolančana PNA sadrži četiri imino protona: G1-H1, G2-H1, T5-H3 i G6-H1. Međutim, u imino području spektra  $^1\text{H}$  NMR uočena su samo tri jaka signala PNA u  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1) pri 13,43; 12,99 i 12,37 ppm (Slike 18 i 22). Četvrti signal nije opažen zbog brze izmjene protona između terminalne G1-H1 i vode. Najodsjenjeniji singlet pri 13,43 ppm odgovara imino protonu timina T5.<sup>18–20</sup>

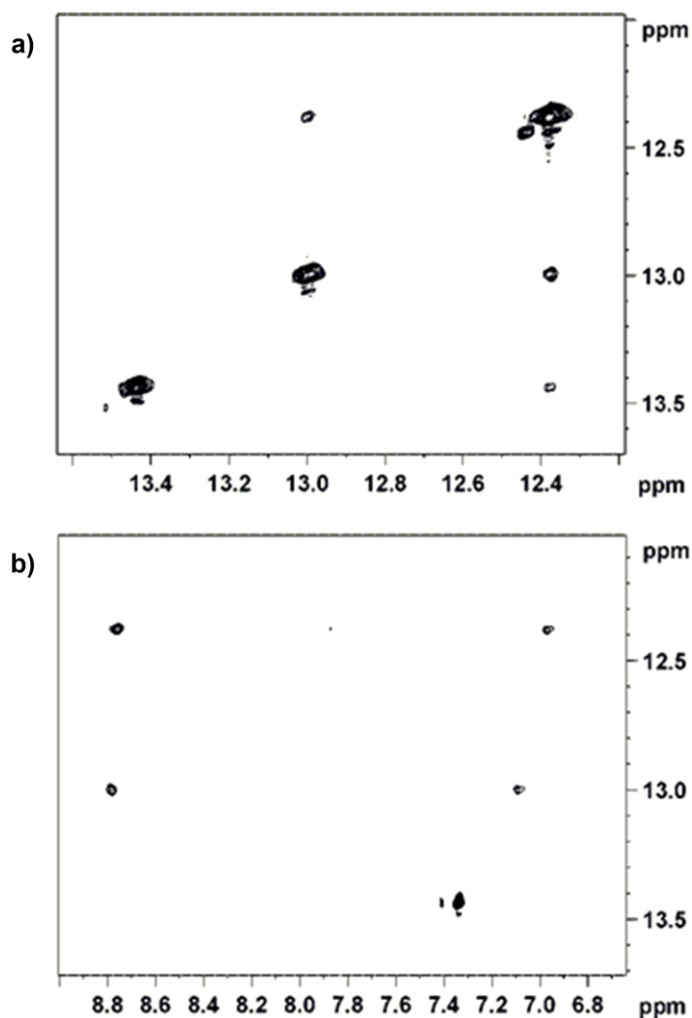


Slika 22. Imino područje spektra  $^1\text{H}$  NMR oktamerne PNA u  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1), pH 7,0 10mM pufer (natrijev fosfat)  $[\text{PNA}]=0,4\text{mM}$ ,  $27^\circ\text{C}$ .<sup>14</sup>

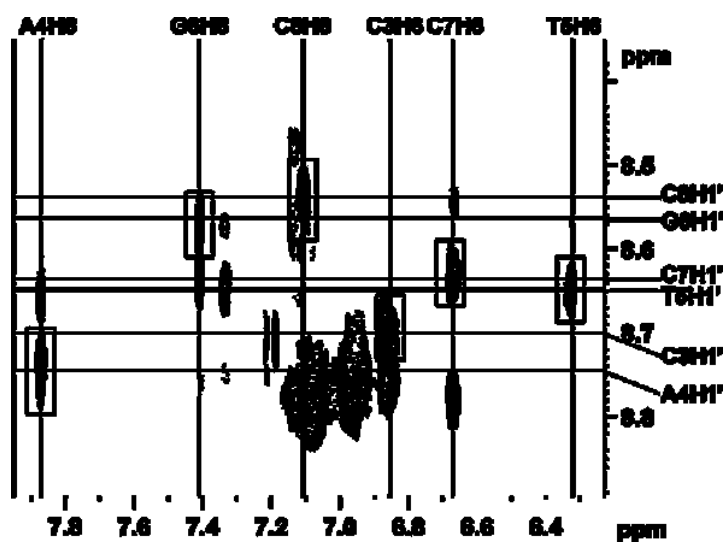
Korelacije između signala pri 13,43 i 12,37 ppm u spektru NOESY (Slika 23a) odgovaraju prostornoj interakciji između susjednih T5-H3 G6-H1 imino-skupina. Slabe korelacije pri 12,99 i 12,37 ppm odgovaraju interakciji između G2-H1 i G6-H1. Nadalje, kod signala C8-H5/H6 i G2-H1 u protonskom spektru NMR (Slike 20 i 22) opaženo je slabo cijepanje koje može biti uzrokovano asimetrijom ili postojanjem dviju različitih konformacija dvolančane PNA.

Imino protoni svakog gvanina prostorno su blizu amino protonima komplementarnih citozina (Slika 23b). Na temelju prikazanih korelacija u spektru NOESY asignirani su signali koji pripadaju su amino protonima C7 i C3. Asignacija amino protona citozina potkrijepljena je opažanjem jakih korelacija NOESY između signala pri 8,78 i 7,08 ppm te 8,76 i 6,96 ppm (Slika 24). Isto tako, imino proton T5 pri 13,43 ppm pokazuje korelaciju s amino protonom komplementarnog adenina A4-H2 pri 7,33 ppm (Slika 23b). Kemijski pomaci amidnih protona okosnice (H1') nalaze se u istom području kao i amino protoni (8,5–8,8 ppm). Stoga se korelacije aromatskih s amidnim i amino protonima nalaze u istom području spektra NOESY (Slika 24).

Na opisan način je analizom spektara  $^1\text{H}$  NMR, COSY i NOESY dvolančane PNA od osam parova baza u  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  i  $\text{D}_2\text{O}$  asignirana većina signala koji odgovaraju protonima dušičnih baza i peptidne okosnice.



Slika 23. (a) Imino-imino (b) i imino-amino korelacije NOESY oktamerne PNA u  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1), pH 7,0 10mM pufer (natrijev fosfat)  $[\text{PNA}]=0,4\text{mM}$ ,  $27^\circ\text{C}$ .<sup>14</sup>



Slika 24. Amidno i aromatsko područje spektra NOESY dvolančane oktamerne PNA u  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1), pH 7,0 10mM pufer (natrijev fosfat)  $[\text{PNA}]=0,4\text{mM}$ ,  $27^\circ\text{C}$ .<sup>14</sup>

## § 6. ZAKLJUČAK

Spektroskopija NMR je jedna od najvažnijih metoda analize malih organskih liganada i bioloških makromolekula. Pravilnim odabirom eksperimentalnih uvjeta i tehnika mogu se identificirati mali organski ligandi, odrediti načini njihovog vezanja na receptore te strukturno okarakterizirati sve vrste biomolekula pri fiziološkim uvjetima u otopini. Nadalje, podaci dobiveni asignacijom spektara NMR olakšavaju dizajn, sintezu i istraživanje novih inhibitora i lijekova.

- Dobiveni rezultati su pokazali da se spektroskopijom NMR u otopini može uspješno odrediti struktura biomolekula, poput dvolančane PNA.
- Vezanje liganda na makromolekulu može se proučavati na temelju detekcije kemijskih pomaka liganada ili receptora.
- Na temelju spektara STD identificirani su ligandi visokog afiniteta prema kvaščevoj heksokinazi i određeni su njihovi vezni epitopi.
- Postupkom analize kemijskih pomaka makromolekule i vremena relaksacije može se proučavati vezanje liganada na pojedine domene proteina, poput SH3 vineksina.
- Kako bismo uspješno proveli proces analize, potrebno je optimirati uvjete pripreve uzoraka i snimanja spektara NMR.
- Kombinacijom različitih jedno- i višedimenzijских tehnika NMR mogu se dobiti podaci o cjelovitoj strukturi i interakcijama biomolekula, što je od ključne važnosti za razumijevanje mehanizama njihovog djelovanja i razvoj novih lijekova.

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. P. Novak i T. Jednačak u Z. Mandić (ur.), *Physico-chemical methods in drug discovery*, IACP, Zagreb, 2011, 189-231.
2. P. Novak i T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA Tiskara Varaždin, Varaždin, 2013.
3. M. P. Williamson, T. F. D. Havel i K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **182**(2) (1985) 295–315.
4. M. Ikura, L.E. Kay i A. Bax, *Biochemistry* **29**(19) (1990) 4659–4667.
5. T. Sugiki, K. Furuuta, T. Fujiwara i C. Kojima, *Molecules* **23**(1)(148) (2018) 1–27.
6. G.M. Clore i A.M. Gronenborn, *J. Magn. Reson.* **48** (1982) 402–417.
7. <https://www.nmr.chemistry.manchester.ac.uk/?q=node/25> (datum pristupa 26. travanj 2018.)
8. G.A. Morris, *Diffusion-Ordered Spectroscopy*, John Wiley & Sons, 2009, 1–13.
9. M. P. Williamson, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **73** (2013) 1–16.
10. S.B. Shuker, P.J. Hajduk, R.P. Meadows, S.W. Fesik, *Science* **274** (1996) 1531–1534.
11. A. Blume, M. Fitzen, A.J. Benie i T. Peters, *Carbohydr. Res.* **344**(12) (2009) 1567–1574.
12. P. Shi, Z. Xi, H. Wang, C. Shi, Y. Xiong i C. Tian, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **402** (2010) 461–466.
13. L. Wang, J. Xie i P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **35** (2006) 225–249.
14. W. He, E. Hatcher, A. Balaeff, D.N. Beratan, R.R. Gil, M. Madrid i C. Achim, *J. Am. Chem. Soc.* **130** (2008) 13264–13273.
15. P.E. Nielsen, M. Egholm, R.H. Berg i O. Buchardt, *Science* **254** (1991) 1497–1500.
16. P.E. Nielsen, *Lett. Pept. Sci.* **10** (2004) 135–147.
17. P.E. Nielsen(ur.), *Peptide Nucleic Acids-Protocol and Applications*, Horizon Bioscience, Wymondham, 2004.
18. M. Eriksson i P.E. Nielsen, *Nat. Struct. Biol.* **3** (1996) 410–413.
19. D.R. Hare, D.E. Wemmer, S.H. Chou, G. Drobny i B.R.J. Reid, *Mol. Biol.* **171** (1983) 319–336.
20. R.M. Scheek, R. Boelens, N. Russo, J.H. Van Boom i R. Kaptein, *Biochemistry* **23** (1984) 1371–1376.