

Konformacijska analiza makrocikličkih molekula metodama spektroskopije NMR i molekuskog modeliranja

Marjanović, Nera

Master's thesis / Diplomski 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:217:619489>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-03**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Nera Marjanović

**Konformacijska analiza makrocikličkih
molekula metodama spektroskopije NMR i
molekulskog modeliranja**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2018. godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je u poduzeću Fidelta d.o.o. za istraživanje i razvoj pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Sanje Koštrun i prof. dr. sc. Predraga Novaka te neposrednim voditeljstvom dr. sc. Ane Čikoš.

Zahvale

Zahvaljujem se mentorima izv.prof. dr. sc. Sanji Koštrun te prof. dr. sc. Predragu Novak na predanom znanju, konstruktivnim savjetima i strpljenju. Posebna zahvala dr. sc. Ani Čikoš koja mi je omogućila izradu ovog diplomskog rada, hvala na ukazanom povjerenju, ugodnoj radnoj atmosferi, prijateljstvu i savjetima za daljnju budućnost.

Hvala mojim roditeljima, Sandri i Željku koji su mi omogućili bezbrižno studiranje svih ovih godina, ostatku obitelji na podršci i razumijevanju u svakom trenutku i prijateljima što su uvijek bili uz mene.

Sadržaj

SAŽETAK.....	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED.....	2
2.1. Osnove spektroskopije NMR	2
2.1.1. Spektrometar NMR.....	6
2.1.2. Jednodimenzijski NMR.....	8
2.1.3. Dvodimenzijski NMR.....	11
2.1.4. Tehnike NOESY i ROESY NMR	13
2.2. Molekulsko modeliranje	19
2.3. Spektrometrija masa.....	21
2.4. Makrocikli.....	22
2.4.1. Ciklosporin A	24
2.4.2. Rifampicin	26
2.4.3. Fidaksomicin.....	28
2.5. Vežanje metalnih iona na makrocikle	29
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	31
3.1. Materijali	31
3.2. Priprema uzorka	31
3.3. Metode.....	32
3.3.1. Spektri za asignaciju	32
3.3.2. Spektri za konformacijsku analizu	33
3.3.3. Eksperimenti s kalcijevim ionima.....	33
3.3.4. Temperaturni eksperimenti	33
3.3.5. Spektrometrija masa kao potvrda nastajanja kompleksa s kalcijem.....	34
3.3.6. Molekulsko modeliranje.....	34
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	35
4.1. Potvrda strukture makrocikala analizom NMR	35

4.2. Konformacijska analiza ciklosporina A	37
4.2.1. <i>Stvaranje kompleksa s ionima kalcija</i>	42
4.2.2. <i>Utjecaj temperature</i>	52
4.3. Konformacijska analiza rifampicina	59
4.3.1. <i>Stvaranje kompleksa s ionima kalcija</i>	64
4.3.2. <i>Utjecaj temperature</i>	70
4.4. Konformacijska analiza fidaksomicina	73
4.4.1. <i>Stvaranje kompleksa s ionima kalcija</i>	76
4.4.2. <i>Utjecaj temperature</i>	78
4.5. Analiza vezanja kalcija na makrocikle spektrometrijom masa	80
§ 5. ZAKLJUČAK	83
§ 6. LITERATURNI IZVORI	85
§ 7. DODATAK	XV
§ 8. ŽIVOTOPIS	XLIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

KONFORMACIJSKA ANALIZA MAKROCIKLIČKIH MOLEKULA METODAMA SPEKTROSKOPIJE NMR I MOLEKULSKOG MODELIRANJA

Nera Marjanović

Da bi se spriječila ili potaknula aktivnost nekog proteina, potencijalni lijek mora ući u stanicu gdje se taj protein nalazi. Permeabilnost predstavlja mjeru sposobnosti lijeka da prođe kroz staničnu membranu. Neki makrociklički lijekovi mogu povećati svoju permeabilnost mijenjajući konformaciju u ovisnosti o sredini u kojoj se nalaze. Jedan od takvih „kameleonskih“ makrocikala je ciklosporin A. U ovom radu istraživani su utjecaj temperature i iona kalcija na konformaciju dva odabrana makrociklička lijeka (rifampicin i fidaksomicin), te su dobiveni rezultati uspoređivani s rezultatima dobivenim za ciklosporin A. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije i molekulsko modeliranje korišteni su za generiranje najvjerojatnijih konformacijskih stanja *in silico*. Kompleksiranje metalnih iona s odabranim makrociklima dodatno je potvrđeno spektrometrijom masa.

(129 stranica, 68 slika, 4 tablica, 46 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: ciklosporin A, fidaksomicin, konformacijska analiza, NMR, molekulsko modeliranje, permeabilnost, rifampicin

Mentori: izv. prof. dr. sc. Sanja Koštrun i prof. dr. sc. Predrag Novak
Neposredni voditelj: dr. sc. Ana Čikoš

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Predrag Novak
 2. doc. dr. sc. Ivana Biljan
 3. izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša
- Zamjena: doc. dr. sc. Tomislav Jednačak

Datum diplomskog ispita: 21.05.2018.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

CONFORMATIONAL ANALYSIS OF MACROCYCLES USING NMR SPECTROSCOPY AND MOLECULAR MODELLING

Nera Marjanović

In order to influence the activity of a target protein, the potential drug needs to enter the cell where that protein is located. Ability of a drug to penetrate cell membranes is called permeability. Some of the macrocyclic drugs can increase their permeability through change in their conformation triggered by different surroundings. One of the macrocycles for which it has been proven to have this “chameleonic” ability is Cyclosporin A. In this research, conformational changes caused by temperature increase and addition of metal ions were investigated for two other macrocyclic drugs (Rifampicin and Fidaxomicin). Final results were compared to the ones of Cyclosporin A. Experiments were performed using nuclear magnetic resonance spectroscopy and molecular modelling to generate most probable conformations *in silico*. Additionally, mass spectrometry was used to confirm the complexation of macrocycles with metal ions.

(129 pages, 68 figures, 4 tables, 46 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: Cyclosporin A, conformational analysis, Fidaxomicin, NMR, molecular modelling, permeability, Rifampicin

Mentors: Dr. Sanja Koštrun, Associate Professor and Dr. Predrag Novak, Professor
Assistant mentor: Dr. Ana Čikoš

Reviewers:

1. Dr. Predrag Novak, Professor
 2. Dr. Ivana Biljan, Assistant Professor
 3. Dr. Branimir Bertoša, Associate Professor
- Substitute: Dr. Tomislav Jednačak, Assistant Professor

Date of exam: 21.05.2018.

§ 1. UVOD

Određeni broj makrocikličkih molekula ima jedinstvenu sposobnost mijenjanja svoje konformacije ovisno o okolini u kojoj se nalaze. Ovo svojstvo, nazvano „kameleonska“ sposobnost, omogućuje molekuli izlaganje polarnih funkcijskih skupina u vodenom (polarnom) okruženju, odnosno promjenu konformacije u svrhu izlaganja nepolarne površine u nepolarnom okruženju. Takvi makrocikli imaju bolju permeabilnost kroz stanične membrane, pri čemu je povećana njihova oralna bioraspoloživost. Jedan od takvih makrocikala je ciklosporin A, imunosupresivni antibiotik za kojeg je prema brojnim istraživanjima dokazana „kameleonska“ sposobnost, zbog čega je odabran kao referentna molekula za ovaj diplomski rad. Pokazano je kako ključnu ulogu kod ovakvih konformacijskih promjena imaju intramolekulske vodikove veze koje nastaju zbog prisustva velike količine amidnih veza u strukturi. Rifampicin i fidaksomicin, makrociklički su antibiotici odabrani za istraživanje ovog svojstva s obzirom da nisu pronađeni literaturni izvori koji opisuju njihovo „kameleonsko“ ponašanje. Konformacijske promjene analizirane su spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije i metodama molekuskog modeliranja prije i nakon dodatka metalnih iona. Strukturne promjene dodatno su istraživane pri različitim temperaturama. Spektrometrija masa korištena je u svrhu provjere kompleksiranja metalnih iona s odabranim makrociklima. Istraživanje promjene konformacije makrocikala u različitoj okolini važno je za daljnji farmaceutski razvoj makrocikličkih spojeva kao potencijalnih lijekova.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Osnove spektroskopije NMR

Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (engl. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, NMR) danas je uz rendgensku kristalografiju i elektronsku mikroskopiju jedina analitička tehnika koja ima mogućnost određivanja trodimenzijske strukture makromolekula na atomskoj razini.¹ Jedinstveno svojstvo spektroskopije NMR je sposobnost određivanja odnosa između točno određenih jezgara unutar i između molekula. Jezgre koje posjeduju spin različit od nule, primjerice ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{19}F , ^{15}N mogu se proučavati spektroskopijom NMR. Eksperimenti NMR sastoje se od pulsnih slijedova, skupova radiofrekventnih (RF) pulseva, kojima se djeluje na nuklearni spin pojedinih atoma za vrijeme dok se jezgre nalaze pod utjecajem jakog magnetskog polja. Osim RF pulseva, koriste se i pulsevi gradijentnog polja. Svaka jezgra posjeduje dva kvantna broja: kvantni broj nuklearnog spina I koji može biti cijeli ili polucijeli broj (npr. 0, 1/2, 1, 3/2, ...) te nuklearni magnetni spinski kvantni broj m_I koji govori o orijentaciji nuklearnog spina u magnetnom polju.² $2I + 1$ je broj mogućih orijentacija. Magnetni moment (μ) određene jezgre se može opisati jednačbom 1:

$$\mu = \gamma P \quad (1)$$

gdje P predstavlja iznos spinske kutne količine gibanja (ovisna o kvantnom broju nuklearnog spina), a γ magnetožirni omjer koji je karakteristika pojedine jezgre. Za prijelaz iz stanja m_I u stanje m_{I+1} potrebna je količina energije koja mora biti jednaka razlici energija između dvaju spinskih stanja opisano jednačbom 2.

$$\Delta E = E(m_{I+1}) - E(m_I) \quad (2)$$

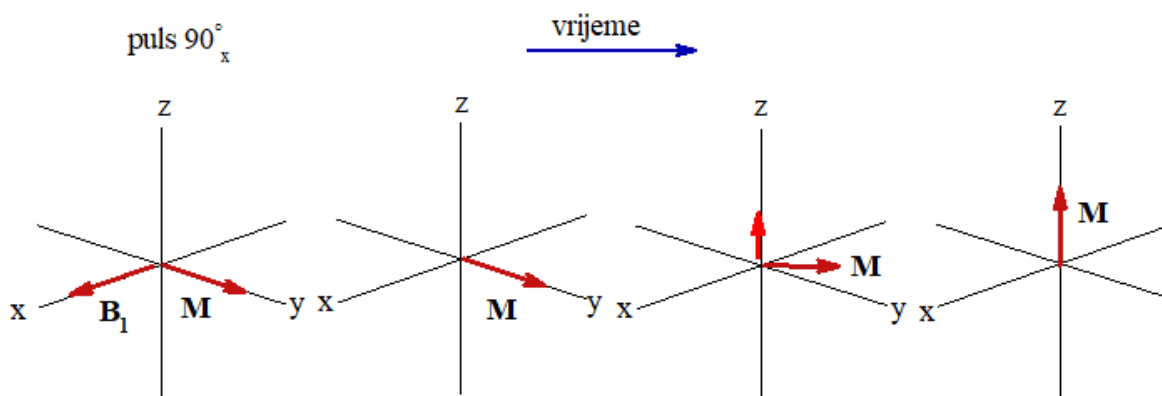
Frekvencija precesije spinova jezgri oko vektora vanjskog magnetnog polja (B_0) naziva se Larmorova frekvencija (ν_L). Prilikom izjednačenja Larmorove i frekvencije zračenja dolazi do rezonancije:

$$\nu_E = \nu_L = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (3)$$

Efekt nuklearne magnetske rezonancije može se objasniti pomoću dva modela: vektorskog modela te kvantnomehanički. Vektorski se model temelji na vektorskom prikazu spinova u

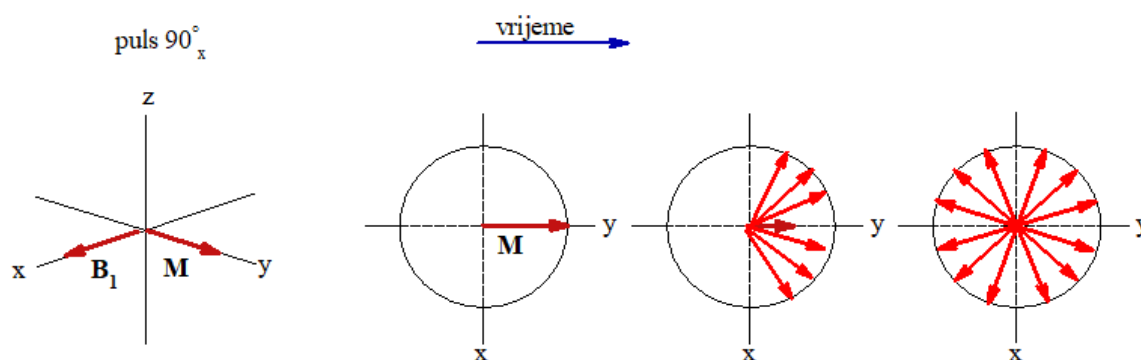
dogovoreno odabranom koordinatnom sustavu. B_0 je vektor koji prema dogovorenom ima smjer osi $+z$, dok spinovi precesiraju oko njega Larmorovom frekvencijom. Kvantnomehanički model se temelji na formalizmu matrica gustoće. Više informacija o ovim modelima nalazi se u odgovarajućoj literaturi.¹

Vrijeme opuštanja ili relaksacije, zasjenjenje jezgre, kemijski pomak i konstanta sprežanja važni su pojmovi za razumijevanje spektroskopije NMR. Vrijeme opuštanja ili relaksacije je vrijeme u kojem spinovi prelaze iz pobuđenog u osnovno stanje. Postoje dvije vrste relaksacije spinova, longitudinalna (relaksacija spin-rešetka, T_1) te transverzalna (relaksacija spin-spin, T_2). Relaksacija spin-rešetka obuhvaća prijenos energije s pobuđenih jezgara na okolinu tijekom kojega se ukupna magnetizacija M vraća na os z (slika 1).



Slika 1. Shematski prikaz vektora ukupne magnetizacije M tijekom procesa longitudinalne relaksacije

Relaksacija spin-spin obuhvaća prijenos energije između spinova koji precesiraju (slika 2).



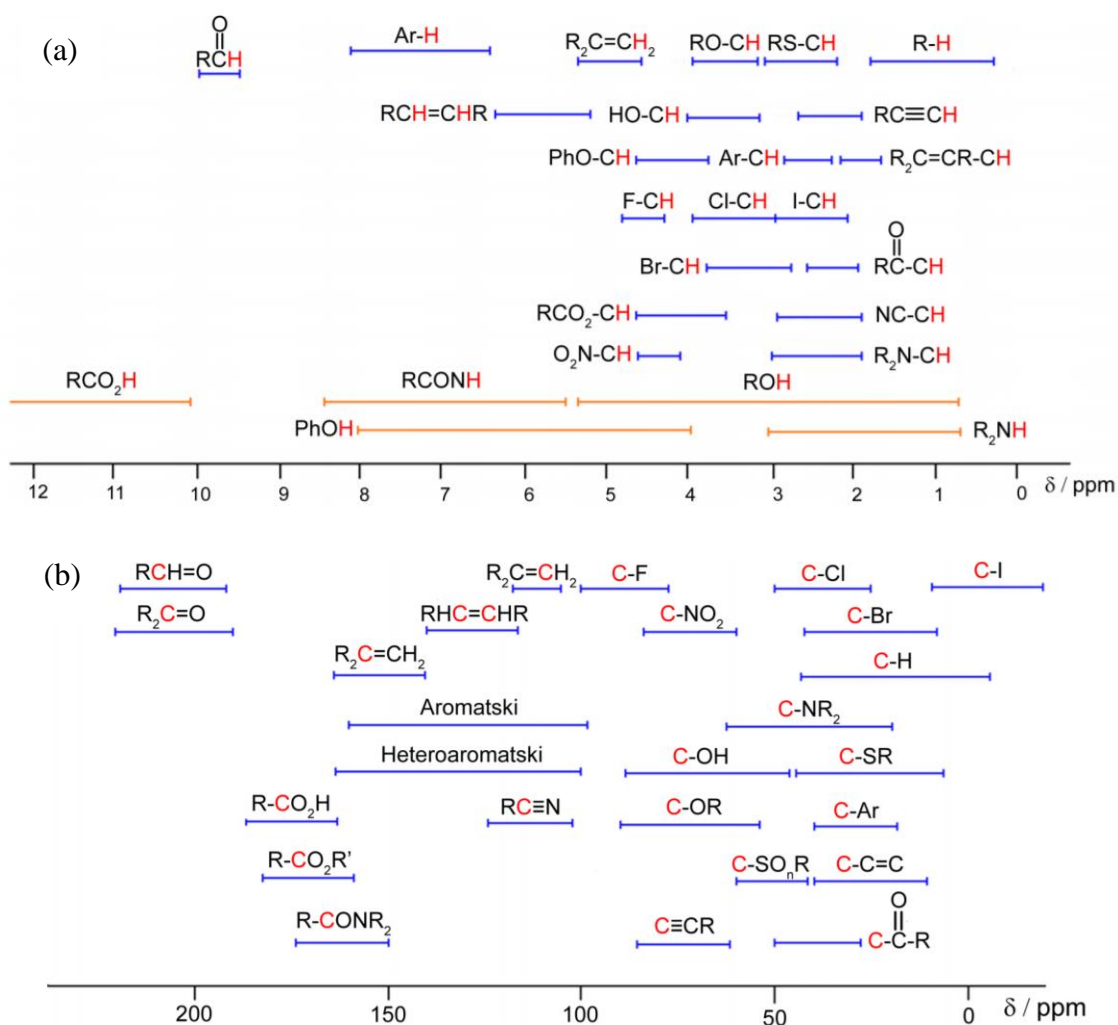
Slika 2. Shematski prikaz vektora ukupne magnetizacije M tijekom transverzalne relaksacije T_1 utječe na intenzitet pojedinih signala, dok je T_2 obrnuto proporcionalno širini signala u spektru. Promatrana jezgra se nalazi u lokalnom magnetskom polju koje tvore okolne jezgre i elektroni pa dolazi do zasjenjenja vanjskog magnetskog polja:

$$B_{eff} = B_0 - B_{lok} = B_0(1 - \sigma) \quad (4)$$

pri čemu je σ konstanta zasjenjenja. U tom slučaju, rezonancija se postiže kod jačeg magnetskog polja. Položaj signala pojedine jezgre u spektru naziva se kemijski pomak, a predstavlja pomak NMR signala jezgre od referentnog signala. Ovisno o proučavanoj jezgri i otapalu upotrebljavaju se različiti referentni signali. Kemijski pomak δ_i jezgre i definira se kao razlika frekvencija proučavanog (ν_i) i referentnog signala (ν_{ref}) podijeljena frekvencijom vanjskog magnetnog polja (ν_0):

$$\delta_i/ppm = \frac{\nu_i - \nu_{ref}}{\nu_0} \times 10^6 \quad (5)$$

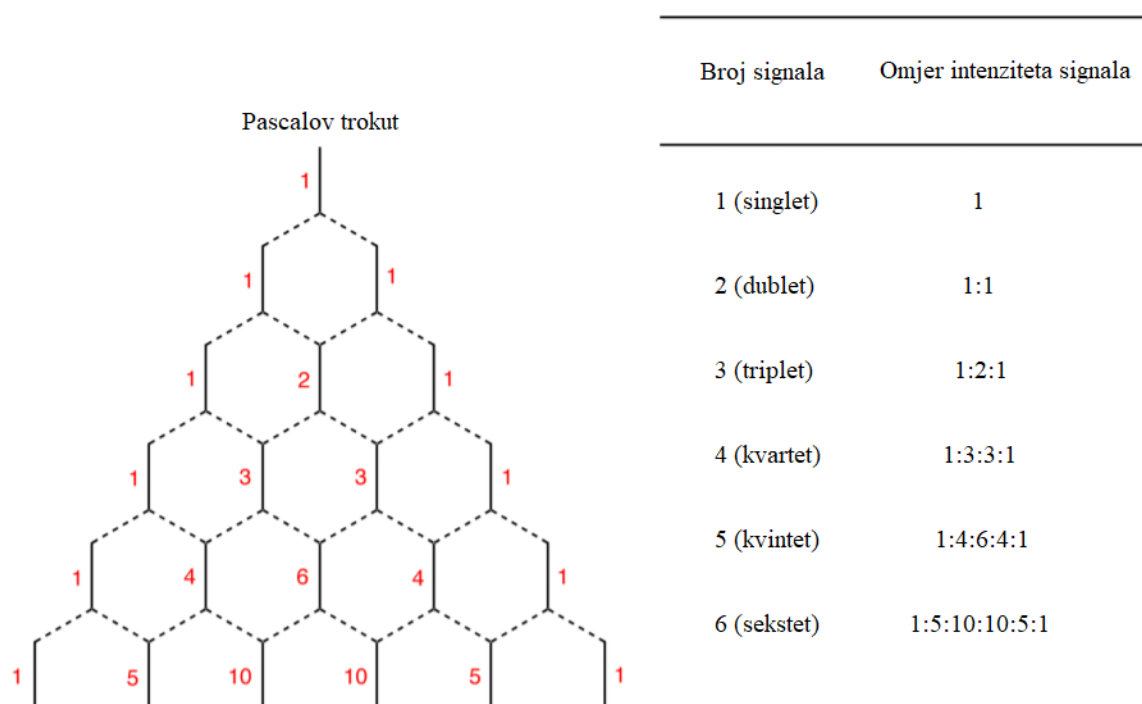
Kemijski pomak izražava se bezdimenzijskom jedinicom ppm (engl. *parts per milion* – dijelovi na milijun). Jezgra koja ima veći kemijski pomak nalazi se pri većoj frekvenciji i na nižem magnetnom polju od jezgre s manjim kemijskim pomakom. Raspon skale za kemijski pomak (slika 3) ovisi o prirodi promatrane jezgre (s, p, d i f elektroni). Kemijski pomak ne ovisi o frekvenciji niti o jakosti primijenjenog magnetskog polja.



Slika 3. Skala kemijskih pomaka za: (a) protone, (b) jezgre ¹³C (ref. 3)

Konstanta sprezanja J izražena u hertzima (Hz) opisuje skalarne interakcije ili interakcije spin-spin koje se mogu opaziti u izotropnom mediju. Kada spinsko stanje susjedne jezgre utječe na energijske razine promatrane jezgre kažemo da su takve jezgre međusobno spregnute preko jedne ili više kemijskih veza. Geminalnim nazivamo sprezanja preko dvije veze, a vicinalne sprege su one preko tri veze. Vicinalna sprezanja ovise o kutu među jezgrama i kao takva omogućuju procjenu molekulske konformacije i dobar su pokazatelj 3D strukture molekule. Ovisno o vrsti jezgre, postoje homonuklearna i heteronuklearna sprezanja. Homonuklearna sprezanja spin-spin su ona između istovrsnih jezgri (npr. protona), dok su heteronuklearne sprege između različitih jezgara (npr. između protona i jezgara ¹³C). Zbog sprezanja sa susjednom jezgrom, signal NMR promatrane jezgre simetrično se cijepa u multiplet s brojem

signala $2nI + 1$, pri čemu je n broj susjednih jezgara, a I spinski kvantni broj jezgre u sprezi. Prema multipletnosti razlikujemo singlet (s), dublet (d), triplet (t), kvartet (q), kvintet, itd. opisano Pascalovim trokutom (slika 4).



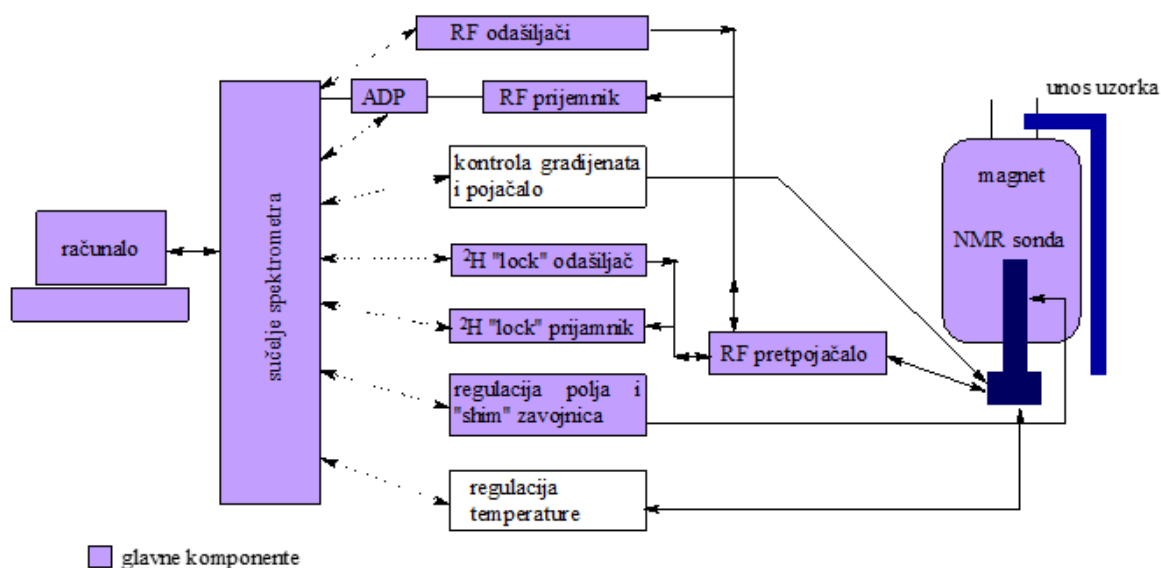
Slika 4. Shematski prikaz Pascalovog trokuta

Tehnike NMR temelje se na:¹

- 1) interakcijama kroz veze: skalarna sprezanja (interakcije spinova preko kemijske veze)
- 2) interakcijama kroz prostor: nuklearni Overhauserov efekt
- 3) kemijskoj izmjeni: fizikalna izmjena spinova na specifičnom mjestu

2.1.1. Spektrometar NMR

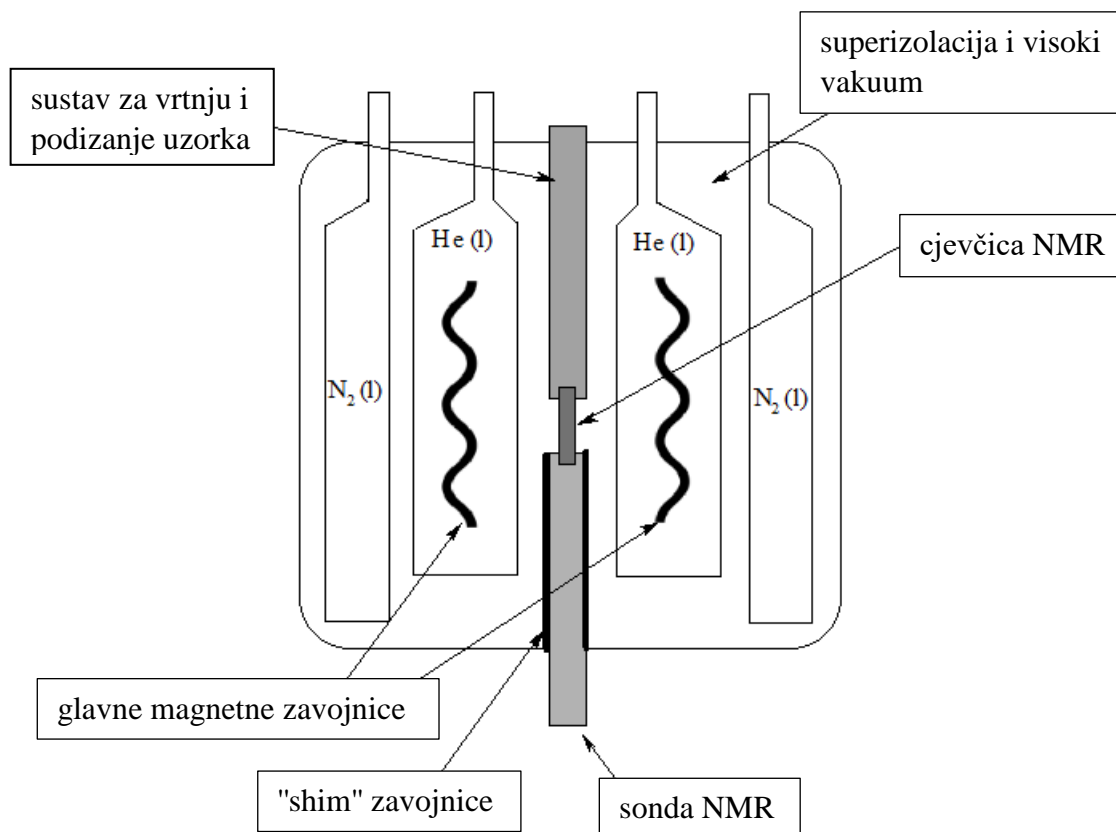
Dijelovi jednog modernog spektrometra NMR prikazani su shematski na slici 5.



Slika 5. Shematski prikaz suvremenog spektrometra NMR²

Ključni dijelovi ovakvog uređaja su statičko homogeno magnetno polje, NMR sonda sa cjevčicom u kojoj se nalazi uzorak te nekoliko vrsta zavojnica i elektronike koja povezuje instrument i sustav za obradu podataka. Supravodljivi magnet se sastoji od zavojnica kroz koje prolazi struja pri čemu se generira magnetno polje. Kako bi se održali supravodljivi uvjeti, zavojnice su smještene u spremnik s tekućim helijem (pri 4 K). Spremnik je okružen tekućim dušikom (pri 77 K) u vakuumskom sustavu.⁴ Shematski prikaz unutrašnjosti magneta prikazan je na slici 7. Homogenost i stabilnost magnetnog polja spektrometra održavaju se korištenjem tzv. ^2H "lock" kanala i "shim" zavojnica. Unutar "shim" zavojnica, u centru magnetskog polja, nalazi se glava sonde. Cjevčica NMR (uobičajenog promjera 5 mm), u kojoj se nalazi uzorak za analizu, povezana je sa sustavom za podizanje i vrtnju uzorka.

Radiofrekventni (RF) odašiljači visoke snage oslobađaju kratke pulseve i time pobuđuju molekule uzorka nakon čega se pomoću RF pretpojačala pojačava intenzitet NMR signala. Dobiveni signal prenosi se RF prijemnikom do analogno-digitalnog pretvornika (ADP) te na kraju do računala.²



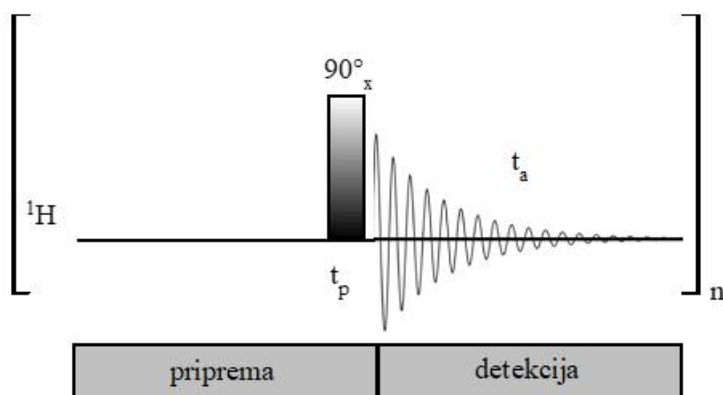
Slika 6. Shematski prikaz unutrašnjosti magneta spektrometra NMR

U spektru ^1H NMR jezgra ^2H nema signala pa se prije snimanja spektra NMR svi uzorci otapaju u pogodnom deuteriranom otapalu kako bi se dobili isključivo signali uzorka u analiziranom spektru. Neki od korištenih deuteriranih otapala su dimetil-sufoksid (DMSO-d_6), kloroform-d, benzen- d_6 , voda- d_2 , metanol- d_4 , aceton- d_6 i tetrahidrofuran- d_8 . S obzirom da odabir otapala uvelike utječe na međumolekulske interakcije u otopini, a samim time i na izgled spektra NMR, treba biti jako oprezan prilikom odabira odgovarajućeg otapala.

2.1.2. Jednodimenzijski NMR

Jednodimenzijski spektar NMR je prikaz signala jezgri čiji su spinovi u rezonanciji s primjenjenom frekvencijom izraženom u obliku kemijskog pomaka.² Na temelju položaja i intenziteta signala može se utvrditi prisutnost određenih fragmenata i funkcionalnih skupina u spoju. Spektar ^1H NMR daje prvi uvid u strukturu spoja na temelju opaženih kemijskih pomaka i konstanti sprežanja spin-spin. Ovom se tehnikom detektiraju signali kemijski neekvivalentnih

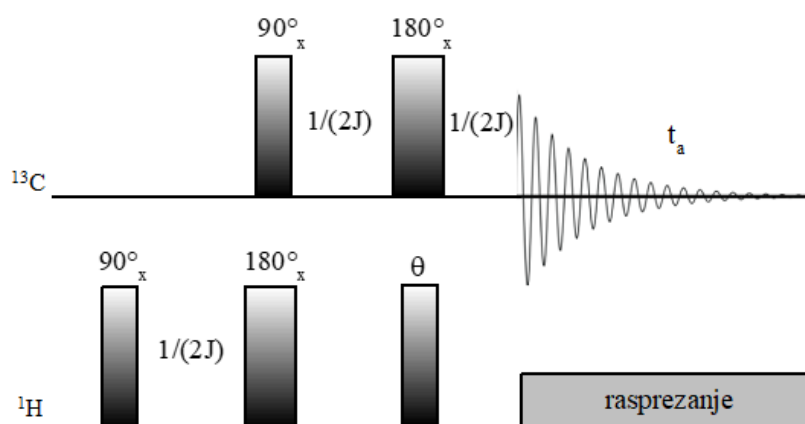
protona u spoju. Broj neekvivalentnih protona proporcionalan je omjeru površina ispod pojedinih signala.



Slika 7. Pulsni slijed tehnike ^1H NMR

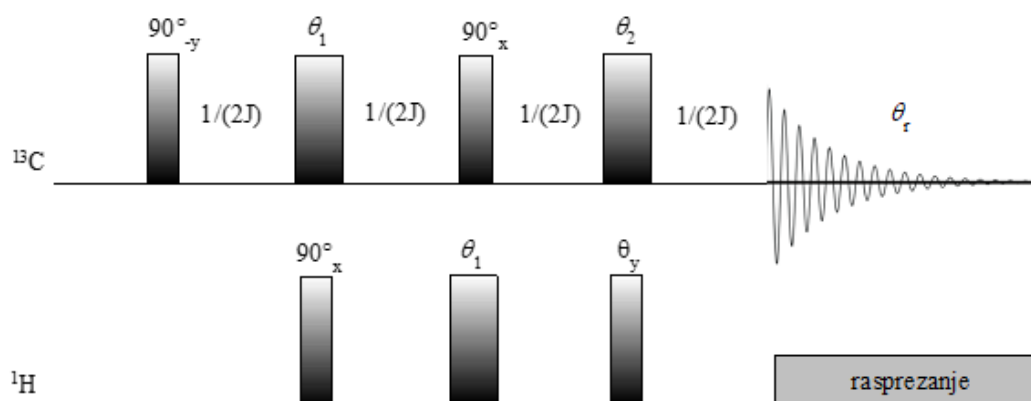
Pulsni slijed tehnike ^1H (slika 7) sastoji se od perioda pripreme i perioda detekcije koje odvaja puls od 90° po osi x u trajanju t_p . Slobodno opadanje magnetizacije bilježi se kada tijekom vremena akvizicije (t_a) zavojnica prima signal.

Tehnika DEPT (engl. *Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer*) omogućuje pojačavanje signala jezgri s malim γ (^{13}C) pomoću prijenosa polarizacije uz editiranje spektra prema multiplicitetu. Pulsni slijed te tehnike prikazan je na slici 8.



Slika 8. Pulsni slijed za tehniku DEPT

Slijed započinje protonskim pulsom od 90°_x nakon čega dolazi do evolucije magnetizacije pod utjecajem CH sprezanja za period $1/(2J)$. Magnetizacija spinova ^1H i ^{13}C evoluiraju koherentno nakon ^{13}C pulsa od 90°_x . To se naziva koherencijom od više kvanata koja se ne može detektirati pa se stoga upotrebljava puls za kut θ po osi y koji je pretvara u detektabilnu magnetizaciju. Posljednji period $1/(2J)$ koristi se za refokusiranje magnetizacije ^{13}C (ref 2). Editiranje spektra ^{13}C NMR prema multiplicitetu izvodi se odabirom pulsog kuta θ . Iznosi pulsog kuta su obično 45° , 90° i 135° , te se pomoću njih može odrediti multiplitetnost pojedinih ugljikovih atoma. Ovom tehnikom ne možemo odrediti signale kvaternih ugljikovih atoma, stoga se češće, pa tako i u ovom radu, koristi modifikacija ove tehnike nazvana DEPTq (*Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer including the detection of quaternary nuclei*). Uključenjem dodatnog elementa u pulsni slijed (slika 9) omogućava se pobuda kvaternih ugljikovih atoma.

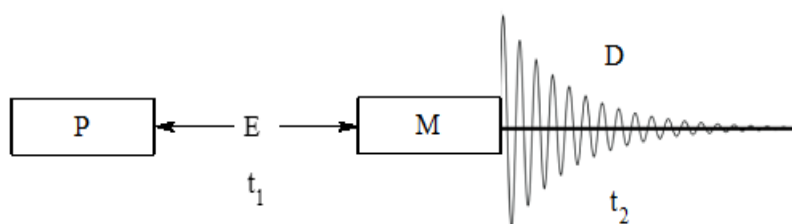


Slika 9. Pulsni slijed za tehniku DEPTq

Osim navedenih, za promatranje ugljikovih jezgri koriste se još tehnike APT (engl. *Attached Proton Test*), višepulsna tehnika 1D za određivanje multipliciteta ^{13}C , kao i INEPT (engl. *Insensitive Nuclei Enhanced by Polarisation Transfer*) i PENDANT (engl. *Polarisation Enhancement Nurtured During Attached Nucleus Testing*) tehnike za pojačavanje intenziteta signala jezgri s malim γ kao što je ^{13}C pomoću prijenosa polarizacije s jezgri s velikim γ (npr. ^1H).

2.1.3. Dvodimenzijski NMR

Jednodimenzijski spektri NMR prikazuju rezonanciju spinova jezgri i primjenjene frekvencije,⁵ dok se dvodimenzijski spektar opisuje s dvije dimenzije koje se najčešće nazivaju F_1 i F_2 , gdje svakoj rezonantnoj liniji pojedine jezgre odgovara određena frekvencija u F_1 odnosno F_2 dimenziji. Svi pulsni slijedovi dvodimenzijskih spektara imaju isti format koji se može podijeliti na četiri definirana perioda: priprema (P), evolucija (E), miješanje (M) i detekcija (D) prikazano na slici 10.⁶



Slika 10. Opći shematski prikaz za bilo koji dvodimenzijski eksperiment NMR

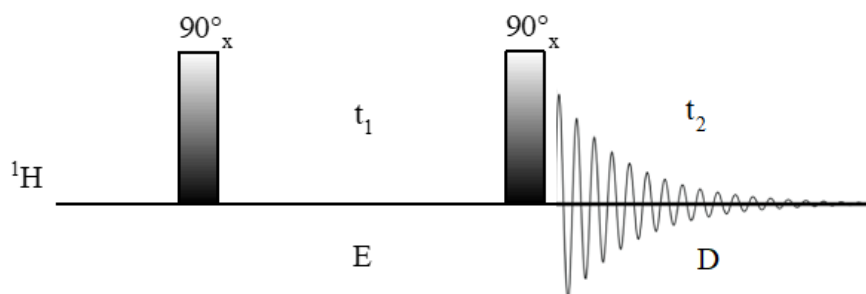
Period pripreme se koristi za pripremanje uzorka, a završava pulsom koji prebacuje magnetizaciju u xy ravninu. Preraspodjela magnetizacije među spinovima događa se za vrijeme perioda miješanja. Do raspodjele može doći pomoću pulseva ili vremenskih intervala. Period detekcije trajanja t_2 analogan je odgovarajućem periodu u jednodimenzijskom NMR eksperimentu, a detektira razvijena magnetizacija i to kao FID signal u vremenskoj domeni. Taj signal se transformira u frekvencijsku domenu pomoću Fourierovih transformacija. Vrijeme evolucije t_1 koji se povećava se za isti iznos u svakom sljedećem ponavljanju pulsog slijeda tijekom evolucijskog perioda čime se generira druga frekvencijska dimenzija. Ovo svojstvo osnovna je razlika između 1D i 2D tehnika.

U dvodimenzijskoj spektroskopiji NMR razlikujemo nekoliko tehnika s heteronuklearnim korelacijama od kojih su editirani HSQC (korelacije kroz jednu kemijsku vezu) i HMBC (korelacije dugog dosega) korištene za potrebe ovog diplomskog rada. HSQC (engl. *Heteronuclear Single Quantum Coherence*) tehnika koristi se za detekciju heteronuklearnih spreznja kroz jednu vezu između protona i heterojezgri (^{13}C , ^{15}N), što znači da signal protona određenog kemijskog pomaka odgovara signalu ugljikovog atoma na koji je direktno vezan. Na osi F_2 se nalaze kemijski pomaci protona, a na osi F_1 kemijski pomaci jezgri

^{13}C . HSQC koristi koherenciju od jednog kvanta koja se generira kroz pulsni slijed INEPT, a prenosi se natrag na protonsku domenu putem sljedećeg, inverznog slijeda INEPT.

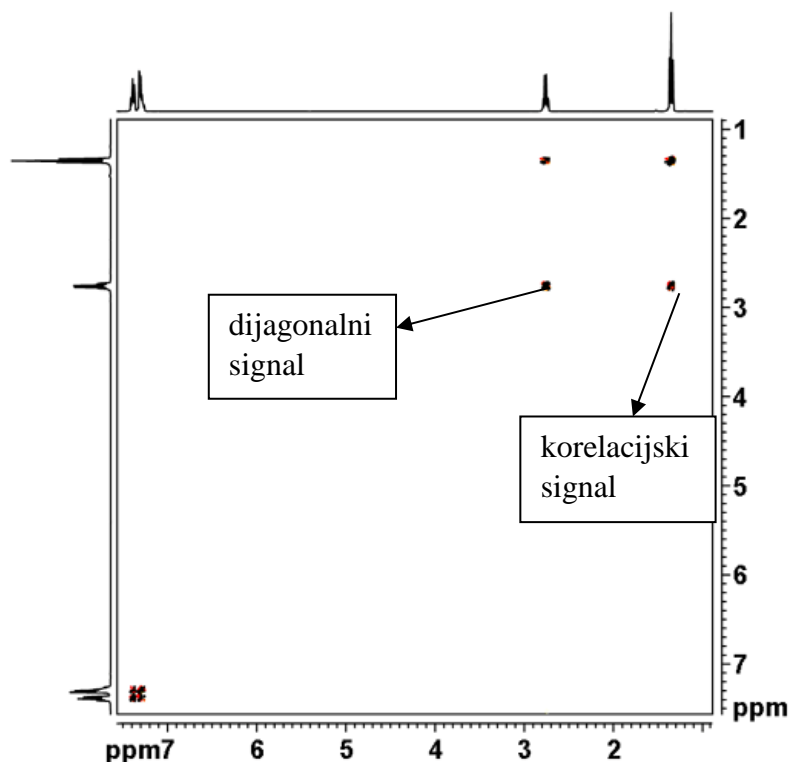
Editirani HSQC pruža informacije o multiplicitetu heterojezgre. U slučaju ugljika, CH i CH_3 imaju drugačiju fazu od C i CH_2 što uvelike ubrzava i olakšava rješavanje spektra i strukture molekule. Uvid u korelacije protona s ugljikovim atomima preko dvije, tri ili četiri kemijske veze te povezivanje pojedinih spinskih sustava omogućava tehnika HMBC (engl. *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*). Pomoću ove tehnike mogu se opaziti korelacije između protona i kvaternih ugljikovih atoma te utvrditi povezanost između atoma koji se nalaze u istom spinskom sustavu te tako povezati pojedine molekulske fragmente u cjelinu.

Osim heteronuklearnih tehnika, za dodatne informacije o udaljenosti atoma u strukturi makrocikla korištene su i homonuklearne tehnike, COSY (prikazuju interakcije kroz kemijske veze) te NOESY i ROESY (interakcije kroz prostor). Tehnika COSY (engl. *Correlation Spectroscopy*) jedna je od najjednostavnijih i najviše korištenih homonuklearnih dvodimenzijskih NMR tehnika, a koristi se za određivanje signala susjednih protona.⁷ Protoni su povezani preko skalarnog sprežavanja najčešće kroz dvije ili tri kemijske veze. Pulsni slijed za ovu tehniku prikazan je na slici 11.



Slika 11. Pulsni slijed za tehniku COSY

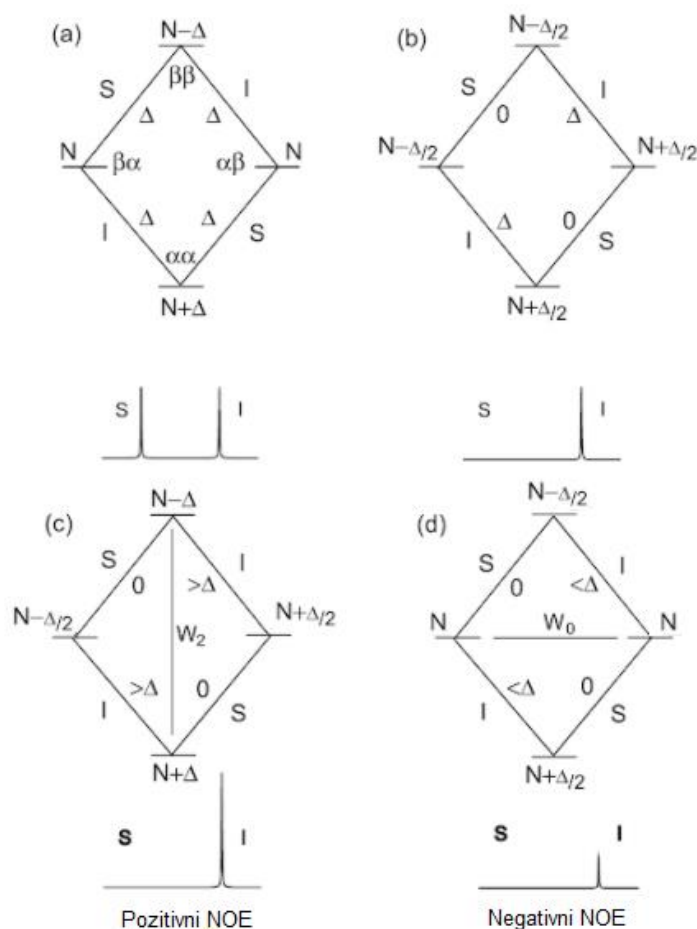
Nakon prvog pulsa dolazi do prijenosa magnetizacije s osi z na ravninu xy, dok drugi puls omogućava prijenos koherencije između spregnutih spinova te pojavu izvandijagonalnih ili korelacijskih signala.² Dijagonalni signali daju 1D protonski spektar za danu molekulu, a izvandijagonalni nam omogućuju određivanje položaja pojedinih protona u molekuli. COSY spektar je simetričan, a na osima se nalaze F_1 i F_2 frekvencijske domene. Na slici 12 prikazan je primjer COSY spektra. Ova tehnika se pokazala iznimno korisnom kada dolazi do preklapanja multiplleta u spektru.



Slika 12. Primjer spektra COSY s dijagonalnim i korelacijskim signalima⁷

2.1.4. Tehnike NOESY i ROESY NMR

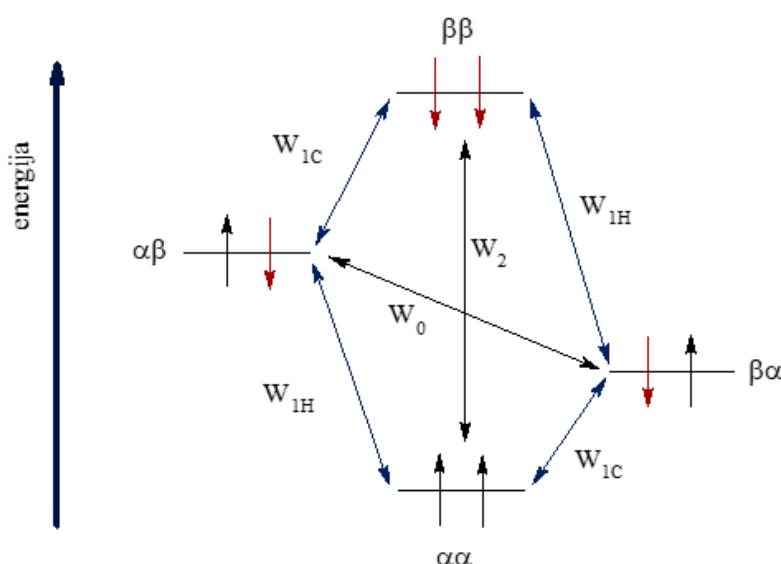
Osim tehnike COSY, postoje homonuklearne korelacijske tehnike NOESY i ROESY koje prikazuju interakcije kroz prostor. Ove tehnike su od iznimne važnosti kod konformacijske analize makromolekula jer daju informacije o udaljenosti prostorno bliskih skupina atoma. Obje tehnike temelje se na nuklearnom Overhauserovom efektu (NOE) koji može dati korisne informacije o strukturi molekule. Definira se kao promjena intenziteta rezonancije određenog spina zbog promjena u ravnotežnoj napučenosti spinova druge jezgre ako su navedeni procesi povezani tzv. mehanizmom križne relaksacije.² Ovaj efekt može nastati na dva načina, zasićenjem ("steady-state NOE") ili inverzijom napučenosti ("transient NOE").⁸ Energijski dijagram prilikom zasićenja napučenosti za sustav dva spina prikazan je na slici 13.



Slika 13. Shema energetskih razina i razlika u napučenosti za dva spina S i I u dipolnoj interakciji gdje je sustav (a) u ravnoteži, (b) nakon prezasićenja spina S, (c) nakon relaksacije procesom W_2 i (d) nakon relaksacije procesom W_0 (ref. 9)

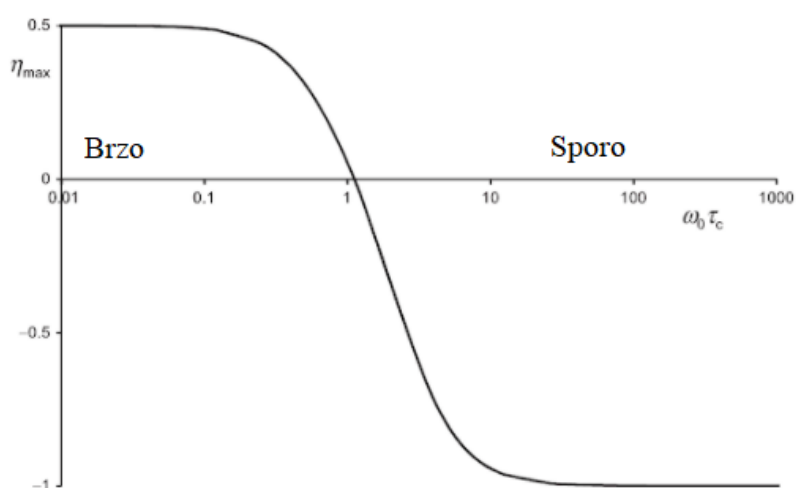
Oznake I i S predstavljaju susjedne spinove. Kako se uzima u obzir da se radi o homonuklearnom sustavu, energije prijelaza za spinove I i S su jednake te se zbog toga pretpostavlja da su prilikom postizanja ravnoteže, napučenosti (Δ) stanja $\alpha\beta$ i $\beta\alpha$ jednake.⁹ Slika 13 (a) prikazuje ravnotežno stanje u kojem je prema Boltzmannovoj raspodjeli, prisutan višak napučenosti ($N + \Delta$) pri nižem energijskom stanju te manjak ($N - \Delta$) pri višem energijskom stanju. Zasićenjem S spinova dolazi do stanja gdje razlika u napučenosti kod S prijelaza postaje 0 i gubi se ravnoteža sustava (slika 13 (b)). Za uspostavljanje ponovne ravnoteže sustava događaju se razni relaksacijski procesi. Kod dvospinskih sustava postoji 6 mogućih prijelaza prikazanih na slici 14. Četiri prijelaza uključuju promjenu orijentacije samo jednog spina (W_1) gdje kvantni magnetski broj iznosi 1. Međutim, postoje i prijelazi koji obuhvaćaju istovremenu

promjenu orijentacije oba spina (W_2 i W_0) koji su zabranjeni izbornim pravilima kvantne mehanike ($\Delta M(W_0) = 0$, $\Delta M(W_2) = 2$). Do tih prijelaza dolazi mehanizmom križne relaksacije i oni su odgovorni za pojavljivanje NOE signala. Slika 13 (c) prikazuje relaksacijski proces W_2 koji uzrokuje povećanje razlike u napučenosti između dvije razine I spina. Prema tome, ovim procesom povećava se intenzitet rezonancije I spina u spektru i nastaje pozitivan NOE. Za razliku od njega proces W_0 je odgovoran za nastajanje negativnog NOE (slika 13 (d)) zbog smanjenja intenziteta rezonancije I spina. S obzirom da se ova dva procesa „natječu“ jedan s drugim, onaj koji prevlada odrediti će predznak promatranog NOE. Također, proces W_1 će se i dalje odvijati pokušavajući uspostaviti ravnotežu sustava u trenutku kada se NOE počne stvarati, pa ako ti procesi prevladaju NOE neće biti vidljiv.



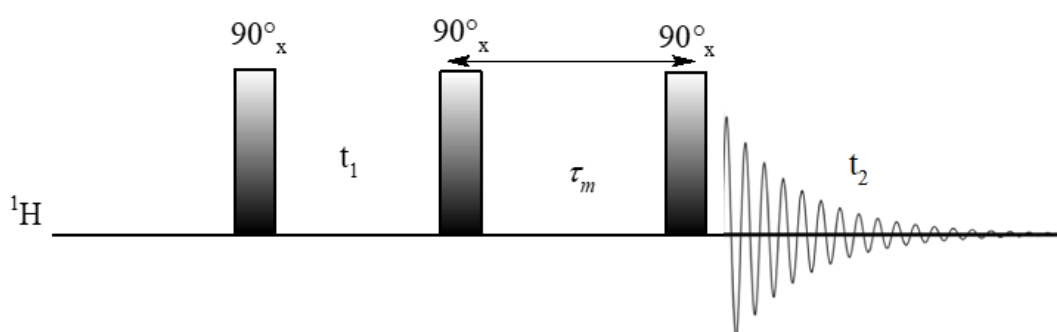
Slika 14. Mogući prijelazi spinova jezgri ^{13}C i protona

NOE ovisi i o brzini kojom se molekula kreće u otopini. Brzo okretanje molekula (kratko korelacijsko vrijeme τ_c) preferira visokoenergetske procese W_2 , dok sporo okretanje molekula preferira procese W_0 .⁸ Zbog toga velike molekule imaju negativni, a male molekule pozitivni NOE (slika 15).



Slika 15. Ovisnost NOE za homonuklearni sustav dva spina u ovisnosti o brzini kretanja molekule u otopini

Dakle, NOESY (engl. *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) je dvodimenzijaska tehnika temeljena na križnoj relaksaciji spinova koji su u dipolnoj sprezi pomoću koje se dobivaju informacije o međusobnoj udaljenosti spinova.² Pulsni slijed ove tehnike prikazan je na slici 16. Prvi puls od 90°_x prebacuje magnetizaciju u ravninu xy, drugi puls od 90°_x slijedi nakon evolucijskog vremena (t_1), koji prebacuje jednu komponentu vektora magnetizacije na negativni dio osi z čime se postiže inverzija napučenosti. NOE nastaje tijekom vremena miješanja (τ_m). Zadnji puls vraća magnetizaciju na ravninu xy i omogućava njezinu detekciju.



Slika 16. Pulsni slijed za tehniku NOESY

Do prijenosa magnetizacije između spinova dolazi putem dipolnih interakcija, pa spinovi trebaju biti prostorno blizu. Ovisnost jačine NOE (I_{NOE}) o udaljenosti između spinova r prikazana je jednadžbom 6.

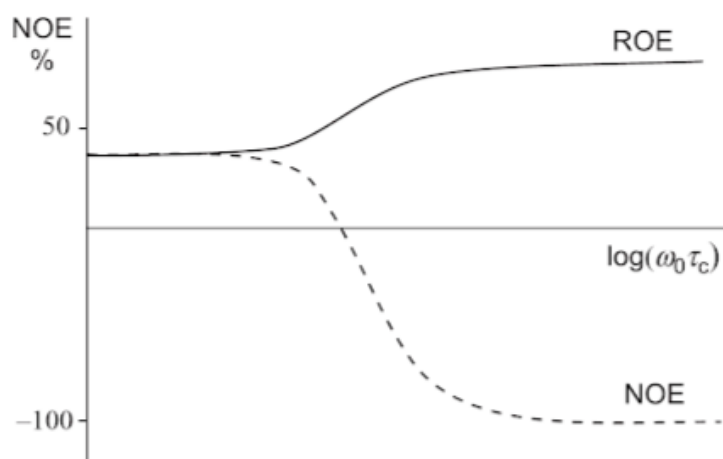
$$I_{NOE} = \gamma_1^2 \gamma_2^2 \frac{1}{r^6} \quad (6)$$

Dipolna interakcija ovisi o vremenu, dok skalarna ne ovisi. U spektru NOESY može postojati više tipova signala: signali dipolnih interakcija, skalarnih sprežanja i kemijske izmjene. Predznak signala u spektru NOESY prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Predznak signala u spektru NOESY

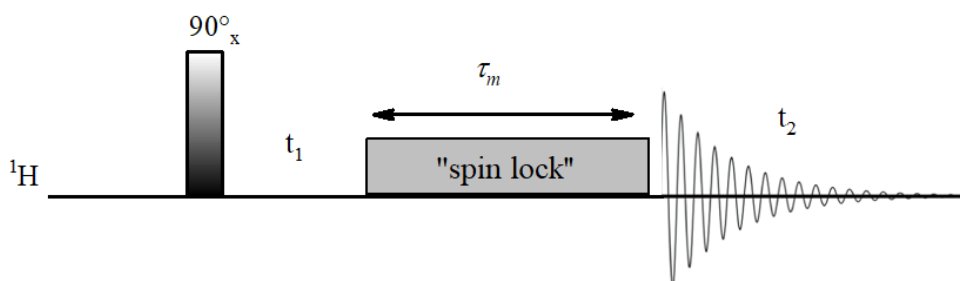
Predznak dijagonale	Podrijetlo korelacijskih signala	Predznak korelacijskih signala
pozitivan	pozitivan NOE	negativan
	negativan NOE	pozitivan
	kemijska izmjena	pozitivan

Iz tablice je vidljivo da su signali nastali kemijskom izmjenom jednake faze kao dijagonala. Stoga, moguće je odrediti postoje li vodikove veze u makrociklima s amidnim skupinama. Istraživanje je pokazalo da u slučaju kada je podrijetlo NH – NH korelacijskih signala kemijska izmjena, ti amidni protoni nisu uključeni u vodikove veze.¹⁰ Kod tehnike NOESY, NOE je pozitivan za molekule male molekulske mase i malog korelacijskog vremena, a negativan je za molekule velikih molekulskih masa. Za molekule srednje veličine, vrijednost NOE-a je vrlo mala ili jednaka nuli, umnožak frekvencije vanjskog polja i korelacijskog vremena ($\omega_0 \tau_c$) približno je 1 (slika 17). Zbog toga je razvijena još jedna tehnika kod koje je NOE uvijek pozitivan, ROESY.



Slika 17. Shematski prikaz ovisnosti intenziteta signala u spektrima NOESY i ROESY kod izoliranog homonuklearnog dvospinskog sustava o $\omega_0\tau_c$

Tehnika ROESY (engl. *Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy*) je vrlo slična NOESY tehnici s tom razlikom što ROE efekt nastaje u ravnini xy , a ne uzduž osi z . Na slici 18 prikazan je pulsni slijed ove tehnike.



Slika 18. Pulsni slijed tehnike ROESY

Jednako kao kod pulsniog slijeda za NOESY, početni puls od 90°_x „prebacuje“ magnetizaciju u ravninu xy . Razlika je u tome što tehnika ROESY za vrijeme perioda miješanja (τ_m) koristi tzv. zaključavanje spinova ("spin lock") čime se omogućuju procesi križne relaksacije i nastanak ROE.

Interakcije dobivene tehnikom ROESY istovjetne su NOESY interakcijama. U spektru ROESY mogu se pojaviti signali TOCSY i COSY koji imaju suprotnu fazu (tablica 2) te ovisno

o podrijetlu interakcija i antifazni signali. Osim toga česta je i pojava lažno pozitivnih interakcija tipa TOCSY-ROE i ROE-TOCSY koji imaju istu fazu kao i pravi pa je potrebno pažljivo interpretirati spektre ROESY.

Tablica 2. Predznak signala u spektru ROESY

Predznak dijagonale	Podrijetlo korelacijskih signala	Predznak korelacijskih signala
pozitivan	direktni ROE	negativan
	Indirektni ROE	slabo pozitivan
	TOCSY	pozitivan
	TOCSY - ROE	negativan (<i>lažni</i> ROE)
	ROE - TOCSY	negativan (<i>lažni</i> ROE)
	kemijska izmjena	pozitivan
	COSY	antifazni

Različitom kombinacijom tehnika COSY, HSQC te HMBC mogu se u većini slučajeva nedvojbeno identificirati male organske molekule i odrediti njihova dvodimenzijaska struktura.²

NOESY i ROESY vrlo su važne dvodimenzijske tehnike jer detektiraju kemijske i konformacijske izmjene organskih molekula i biomolekula. Također se pomoću njih može utvrditi točna struktura različitih izomera, te odrediti trodimenzijaska struktura kompleksnih molekula.

2.2. Molekulsko modeliranje

Molekulsko modeliranje (MM) obuhvaća sve teorijske metode i računalne tehnike upotrebljavane u svrhu proučavanja strukture i imitacije molekula, počevši od manjih molekulskih sustava pa sve do većih bioloških molekula i materijalnih sklopova.¹¹ Trodimenzijaska struktura spojeva generiraju se i proučavaju koristeći metode molekulskog modeliranja. MM možemo također koristiti kako bi proučavali vezanje liganada na aktivno mjesto u makromolekuli te određivanje njihove bioaktivne konformacije. Nakon generiranja početne 3D strukture potrebno je provesti konformacijsku analizu te odrediti najstabilniju konformaciju.

Konformacijska analiza može se provesti kvantno-kemijskim, semi-empirijskim ili molekulsko-mehaničkim metodama, ovisno o veličini molekulskog sustava koji promatramo. Za proučavanje makrocikličkih molekula, najčešće se koriste metode molekulske mehanike koje koriste matematičke procedure za računanje energije molekularnih sustava. Atomi u molekuli promatraju se kao točkaste mase, a elektroni su uključeni u račun putem parametrizacije. Međusobne interakcije atoma opisuju se eksplicitno, funkcijom potencijalne energije. Jednadžbe i parametri koji definiraju potencijalnu energiju molekule kolektivno se nazivaju poljem sila. Koristeći polje sila računa se potencijalna energija sustava u datoj konformaciji gdje su obuhvaćene vezne i nevezne interakcije atoma (savijanje kutova, istežanje veza, diedarske deformacije, van der Waalsove sile, elektrostatske sile). Točan funkcijski oblik polja sila ovisan je o korištenom simulacijskom programu (AMBER, CHARMM, CFF, GROMOS...). Osim makrocikala, ovim se metodama proučavaju razni sustavi, od manjih molekula pa sve do materijalnih skupova sa po više od tisuću atoma.

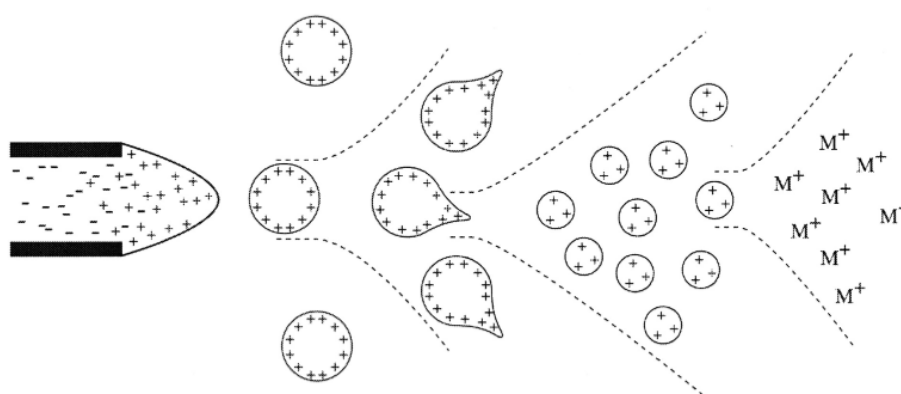
Rezultati molekulske mehanike najčešće se dalje koriste u području molekulske dinamike, gdje se računi polja sila koriste za dobivanje računalne simulacije gibanja atoma i molekula. Molekulska dinamika je tehnika koja omogućava simulaciju ponašanja molekule u realnom sustavu na danoj temperaturi. Gibanje atoma u molekuli opisuje se skupom diferencijalnih jednadžbi. Sila koja djeluje na jedan atom u molekuli ovisi o položaju tog atoma ali i o položaju svih ostalih atoma s kojima je u interakciji. Moguća stanja sustava u termodinamičkoj ravnoteži mogu se odrediti praćenjem razvoja sustava kroz dovoljno dugačak vremenski period. Na dinamiku u otopini često utječu molekule otapala koje prilikom interakcije s molekulama otopine uzrokuje trenje pri čemu dolazi do usporavanja gibanja molekula kroz otapalo. Utjecaj otapala može se modelirati na više načina. Eksplicitnim metodama koje uzimaju u obzir pojedine molekule otapala oko otopljene vrste, implicitnim metodama (tretiraju otapalo kao kontinuum) ili kombinacijama ta dva pristupa. Simulacije molekulske dinamike danas se uspješno koriste kao tehnike za učinkovito razumijevanje veze između strukture makromolekula i njihove funkcije.¹²

U ovom radu, rezultati simulacije molekulske dinamike uspoređivani su s onima dobivenim eksperimentima NMR za određivanje stabilnosti sustava kroz vrijeme.

2.3. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa (engl. Mass spectrometry, MS) analitička je tehnika koja daje uvid u kvalitativne (struktura) kao i kvantitativne (molekulska masa ili koncentracija) informacije analizirane molekule.¹³ Kemijske vrste se prvo ioniziraju pomoću nekog vanjskog izvora (nastanak molekuskog iona), nakon čega se nastali ioni provode kroz analizator koji ih zatim razdvaja u prostoru i/ili vremenu na temelju njihove mase i naboja. Iz analizatora, ioni putuju na različite dijelove detektora ovisno o njihovom omjeru mase i naboja (m/z) nakon čega proizvode električni signal koji se registrira na računalu ili nekom drugom uređaju. Nastali spektar prikaz je količine nastalih iona prema njihovom m/z omjeru. Najvažniji dio spektrometra je uređaj za ionizaciju, odnosno ionizator. Proces ionizacije obično uključuje dovodjenje energije molekuli što uzrokuje izbacivanje jednog ili više elektrona. Pri tom procesu može doći i do fragmentacije molekule u dva ili više fragmenta. Postoji više načina ionizacije, a najznačajnije su elektronska ionizacija, kemijska ionizacija, ionizacija brzim atomima i ionima, elektrosprej ionizacija (ESI) i MALDI (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*).

Spektrometrija masa elektrosprej ionizacijom (engl. *Electrospray Ionisation Mass Spectrometry*, ESI-MS) tehnika je visoke osjetljivosti, robusnosti i pouzdanosti. ESI koristi električnu energiju za prelazak iona iz otopine u plinovitu fazu prije spektrometrijske analize.¹³ Prelazak iona iz otopine u plinovitu fazu odvija se u tri koraka: (1) raspršenje nabijenih finih kapljica, nakon kojeg slijedi (2) isparavanje otapala te na kraju (3) izbacivanje iona iz visoko nabijenih kapljica. Proces je prikazan na slici 19.



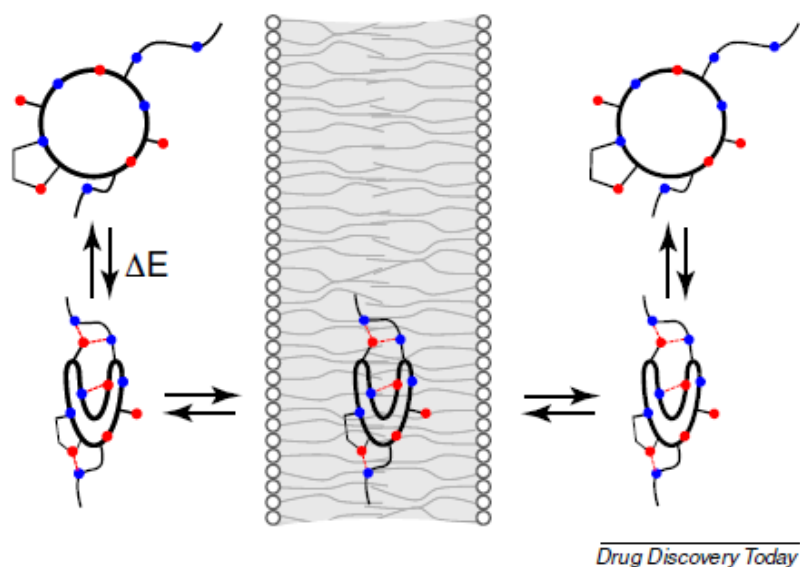
Slika 19. Mehanizam elektrosprej ionizacije¹³

Uobičajeno je da se najveći signal gleda kao 100%-na napućenost, a svi ostali signali su izraženi kao postotak toga. Broj naboja na proteinskim molekulama ovisi o molekulskoj masi te broju dostupnih položaja.

Zbog svoje visoke osjetljivosti, ESI-MS je od iznimne važnosti u kliničkim laboratorijima za ispitivanje strukture ili dobivanje kvantitativnih informacija za metabolite u kompleksnim biološkim sustavima. Jednako tako, ova tehnika se koristi kod određivanja molekulske mase peptida i proteina pri niskim koncentracijama.¹⁴ ESI-MS se, osim za karakterizaciju molekula, može koristiti i za određivanje kapaciteta vezanja metalnih iona na makrocikličke molekule. Istraživanja su pokazala kako se kombinacijom spektroskopije NMR i spektrometrije masa može odrediti afinitet vezanja metalnih iona na makromolekule.¹⁴ Slijedeći te primjere u ovom radu kompleksiranje kalcijevih iona provjereno spektrometrijom masa.

2.4. Makrocikli

Makrocikli se prema IUPAC-u definiraju kao cikličke makromolekule ili makromolekulski ciklički dijelovi molekule. Sastavljeni su od prstena sa po najmanje 9-12 atoma. Iako veličina prirodnih makrocikala može doseći i do 50+ atoma u najvećim prstenima, nedavna istraživanja prirodnih spojeva pokazala su da su najčešći prirodni makrocikli 14-, 16-, i 18-člani prsteni.¹⁵ Postoji veliki broj vrsta makrocikala, ali najviše pažnje u istraživanju lijekova izazvali su ciklički peptidi i peptidomimetici. Određeni makrociklički lijekovi posjeduju jedinstveno svojstvo, nazvano „kameleonska“ sposobnost (slika 20), koje im omogućava mijenjanje konformacije u ovisnosti o sredini u kojoj se nalaze.



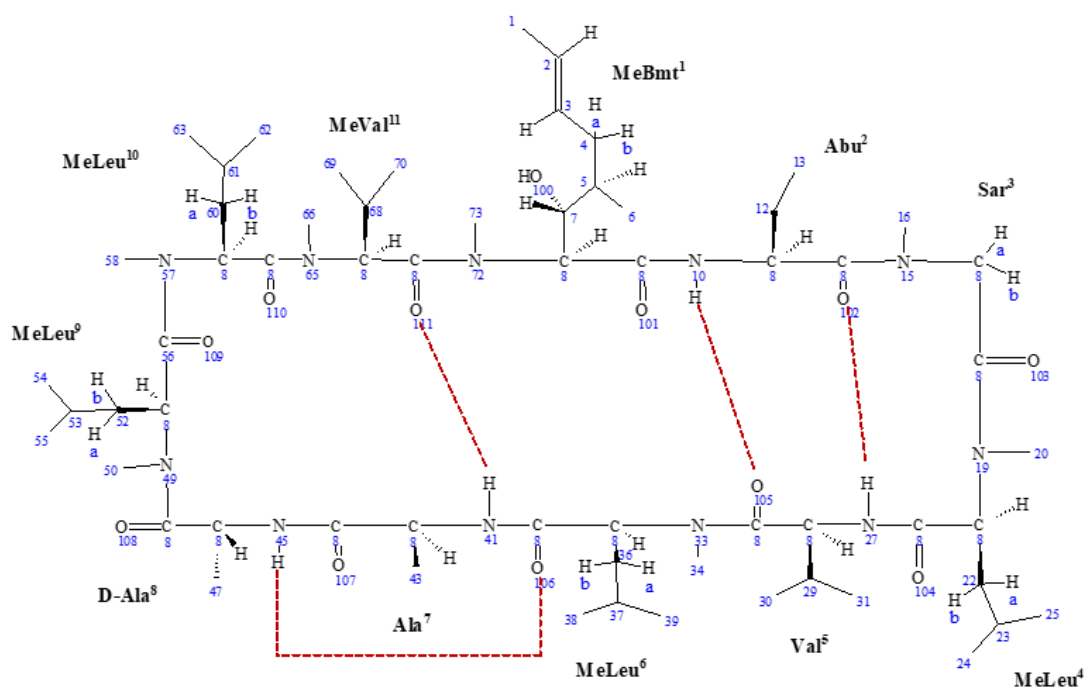
Slika 20. Ilustracija koja prikazuje na koji način „kameleonsko“ svojstvo omogućuje molekuli zaklanjanje polarnih grupa kako bi se poboljšala pasivna propusnost membrane. Crvene točke predstavljaju proton donorske skupine, a plave proton akceptorske¹⁶

Ovo svojstvo molekuli omogućuje izlaganje njezine velike nepolarne površine u nepolarom okruženju, za vrijeme prolaska kroz staničnu membranu, odnosno promjenu konformacije za izlaganje polarne površine u vodenom okruženju (polarom) kao što je to prikazano na slici 20.¹⁶ Gornja struktura predstavlja konformaciju molekule u vodenoj otopini gdje su proton akceptorske (plavo) i proton donorske (crveno) skupine potpuno izložene otapalu. Donja struktura predstavlja drugu vrstu konformacije gdje su proton akceptorske i donorske skupine zaklonjene od otapala, odnosno stvaraju intramolekulske vodikove veze (isprekidane crvene linije). Te dvije strukture su u ravnoteži jedna s drugom. Ova konformacijska promjena smanjuje interakcije između molekula vode i spoja, te snižava energiju potrebnu za ulazak i prolazak kroz staničnu membranu. Time povećava permeabilnost i bioraspoloživost makrocikličkih lijekova. Cilj ovog diplomskog rada bio je konformacijskom analizom u različitim uvjetima potvrditi ovo svojstvo na ciklosporinu A te pritom razvijeni eksperimentalno - teorijski pristup primijeniti na makrociklima rifampicinu i fidaksomicinu. Fidaksomicin, razliku od ciklosporina A i rifampicina, strukturno pripada u skupinu makrolidnih lijekova.

2.4.1. Ciklosporin A

Ciklosporin A (CsA) je molekula molarne mase 1.202,61 g mol⁻¹, pripada grupi cikličkih oligopeptida gljivičnog podrijetla i jedan je od najpoznatijih predstavnika makrocikala. Vrsta je imunosupresivnog lijeka koji se koristi kod sprječavanja odbacivanja transplantata nakon transplantacije koštane srži i organa.¹⁰ Izoliran je 1976. godine zajedno sa ciklosporinom C iz gljivične vrste *Tolypocladium inflatum*.¹⁷ Tijekom godina testiran je velik broj različitih sintetskih i prirodnih ciklosporina, ali ciklosporin A je i dalje najaktivniji od svih njih. Pokazao se korisnim u liječenju raznih bolesti kao što su nefritis, Chronova bolest, ulcerativni kolitis, bilijarna ciroza, aplastična anemija, reumatoidni artritis, itd.¹⁰

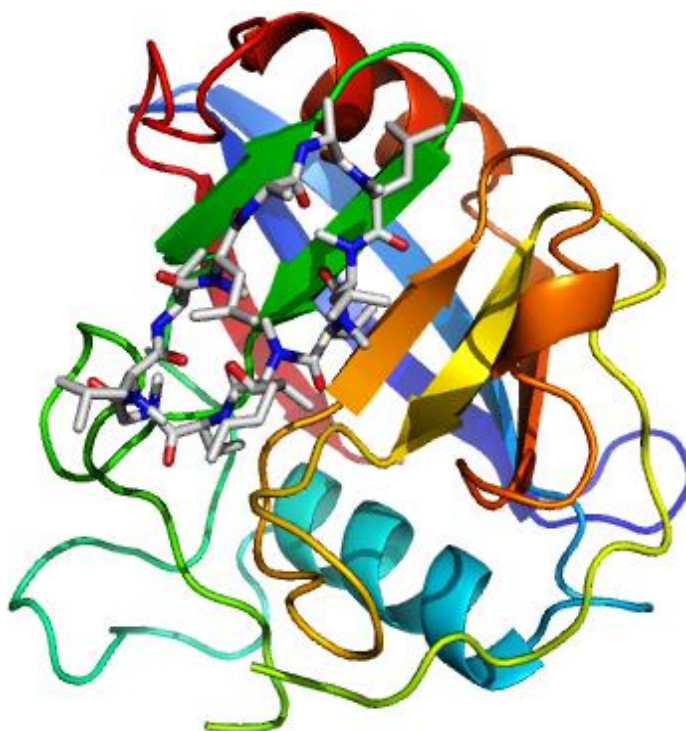
CsA je neutralna molekula sastavljena od 11 lipofilnih aminokiselina (od čega ih je 7 *N*-metiliranih) primarne strukture: MeBmt¹-Abu²-Sar³-MeLeu⁴-Val⁵-MeLeu⁶-Ala⁷-D-Ala⁸-MeLeu⁹-MeLeu¹⁰-MeVal¹¹ prikazane na slici 21.



Slika 21. Numerirana struktura ciklosporina A s prikazanim vodikovim vezama (crveno)

Zbog prisutnost *N*-metiliranih aminokiselina povećan je udio *cis* peptidnih konfiguracija. Posebna značajka ove molekule je jedinstvena aminokiselina MeBmt (derivat treonina). Iako ona sama nema posebnu biološku aktivnost, bilo kakva strukturna promjena ove kiseline utječe

na imunosupresivnu aktivnost ciklosporina A. Veliki udio alifatskih ostataka čini ovaj peptid iznimno hidrofobnim što rezultira slabom topljivosti u vodi ($27,67 \mu\text{g mL}^{-1}$ pri $20 \text{ }^\circ\text{C}$) zbog čega ga je teško analizirati u vodenim otopinama.¹⁸ Imunosupresivna aktivnost ciklosporina usko je povezana s njegovim afinitetom vezanja na unutarstanični receptor ciklofilin (CyP), (slika 22).



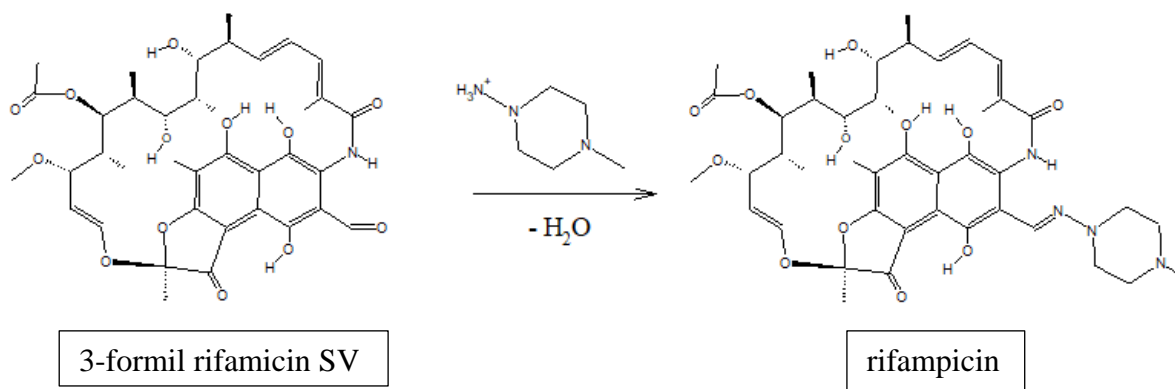
Slika 22. Prikaz veznog mjesta CsA sa CyP¹⁹

Konformacija ciklosporina A u nepolarnim otapalima, kao što su CHCl_3 , THF, ili CH_3CN , predstavlja jedan dominantni konformer kojeg karakteriziraju (u CHCl_3) četiri stabilne intramolekularne vodikove veze od kojih su tri transanularne, odnosno unutar makrocikličkog prstena. U njih su uključeni svi amidni vodici,¹⁸ a prikazane na slici 21 isprekidanim linijama. Peptidna veza između MeLeu⁹ i MeLeu¹⁰ ima *cis* konfiguraciju, a svi hidrofobni ugljikovi lanci izloženi su otapalu.^{20,21} Povećanjem polarnosti otapala, gube se vodikove veze i struktura gubi svoju rigidnost, što dovodi do nastajanja nekoliko različitih stabilnih konformera.^{21–23} U polarnim otapalima, kao što je DMSO-d_6 , pronađeno je sedam konformacija u ravnoteži, što otežava njihovu detaljnu analizu.¹⁰ Prilikom vezanja na CsA poprima konformaciju u kojoj su sve peptidne veze *trans* što utječe na njegovu farmakološku aktivnost. Ta konformacija je u

potpunosti drugačija od one pronađene u otapalima niske polarnosti ili u kristalu. Uz ove, istraživanja su pokazala kako postoji još jedna vrsta konformacije ciklosporina A koja se pojavljuje prilikom kompleksiranja metalnih iona gdje isto tako dolazi do nestanka vodikovih veza i promjene konfiguracije peptidne veze između MeLeu⁹ i MeLeu.^{10,14,18,24} Stoga, očito je da CsA pokazuje konformacijsku fleksibilnost, odnosno da konformacija CsA jako ovisi o okolini što ga čini najboljim primjerom makrocikla s „kameleonskom“ sposobnosti.¹⁶

2.4.2. Rifampicin

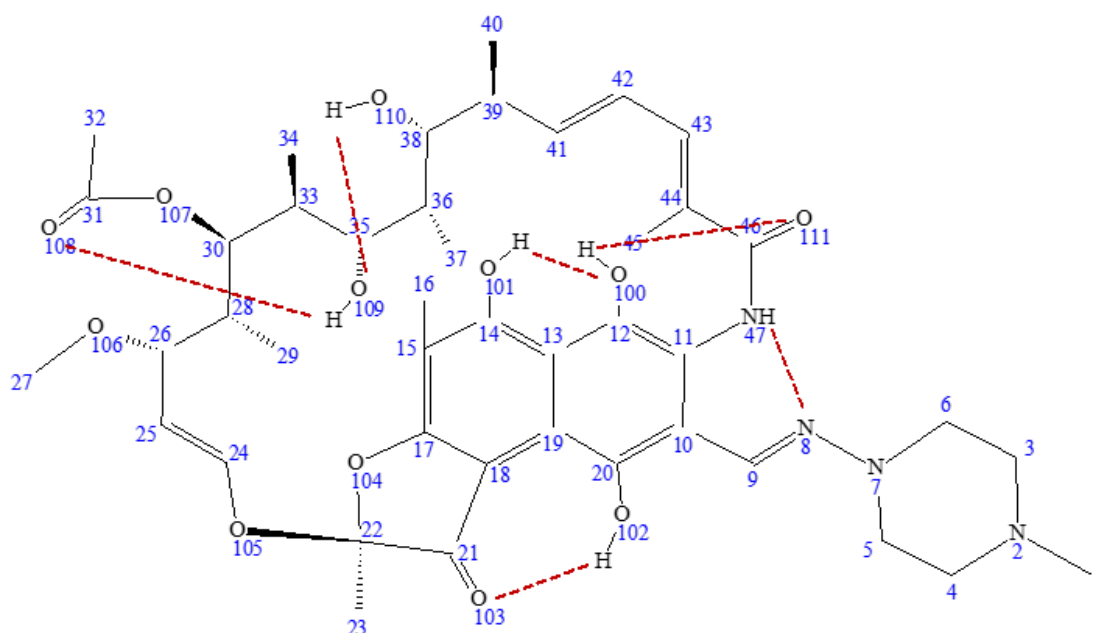
Rifampicin (Rfmp) je makrociklička molekula za koju se pretpostavila mogućnost „kameleonskog“ ponašanja.¹⁶ Semi-sintetski je baktericidni antibiotik, aktivan *in vitro* protiv gram-pozitivnih mikroorganizama i mikobakterija.²⁵ Kao poliketid molekulske formule C₄₃H₅₈N₄O₁₂, pripada skupini kemijskih spojeva pod nazivom ansamicini. Koristi se u kombinaciji zajedno sa izoniazidom (hidrazid izonikotinske kiseline) i pirazinamidom (pirazinkarboksiamid) kod invazivnog liječenja plućne tuberkuloze.²⁵ Po strukturi Rfmp je derivat rifamicina SV. Dobiva se reakcijom 3-formil rifamicin SV sa 1-amino-4-metilpiperazinom u tetrahidrofuranu (slika 23).



Slika 23. Shema reakcije dobivanja rifampicina

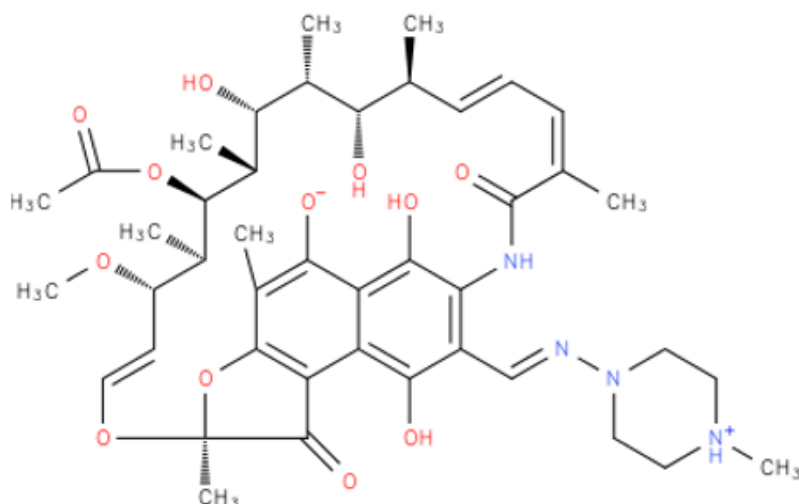
Rifampicin je slabo topiv u vodi pri pH 6, dobro topiv u većini organskih otapala i slabije topljiv u acetonu i ugljikovom tetrakloridu. Strukturno je rifampicin (slika 24) vrlo zanimljiva molekula. Analiza spektroskopijom NMR čvrstog stanja pokazala je kako rifampicin u svojoj

strukturi sadržava šest intramolekulskih vodikovih veza, od kojih četiri igraju ključnu ulogu u njegovom inhibitornom vezanju bakterijske RNA polimeraze.²⁶



Slika 24. Numerirana struktura rifampicina s prikazanim vodikovim vezama (isprekidane linije)

Osim toga, uz pomoć različitih instrumentalnih tehnika, pokazano je da rifampicin postoji u obliku zwitter iona koji nastaje tako što amino skupina u piperazinskoj jedinici deprotonira hidroksilnu skupinu iz naftalnog prstena (slika 25).²⁷

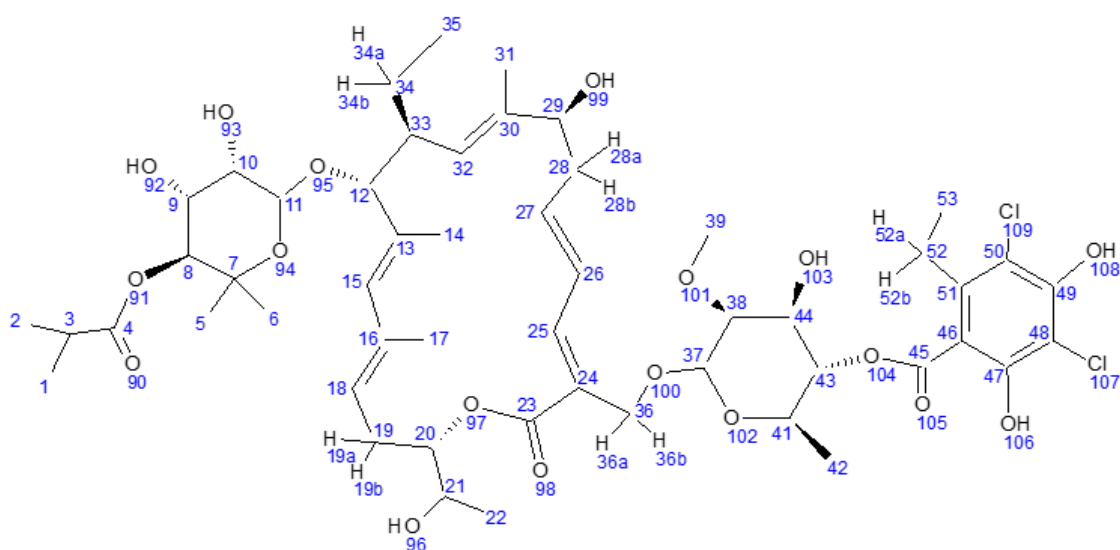


Slika 25. Rifampicin u obliku zwitter iona²⁸

Navedena strukturna obilježja, naročito prisustvo intramolekulskih vodikovih veza, kao i preliminarni rezultati literaturnih izvora,¹⁶ ukazuju na mogućnost postojanja „kameleonskog“ svojstva ovog makrocikla.

2.4.3. Fidaksomicin

Fidaksomicin (Fdx) je prvi antimikrobni agens odobren od FDA (U.S. *Food and Drug Administration*) u svrhu liječenja infekcije *Clostridium difficile* (CDI) kod odraslih u zadnjih 25 godina.²⁹ Prirodni spoj otkriven 1970-ih, fidaksomicin je prvi spoj u novoj skupini makrocikličkih lijekova s uskim spektrom djelovanja. Po strukturi je makrolid sa 18-članim laktonskim prstenom, molekulske mase 1058,04 Da i kemijske formule $C_{52}H_{74}C_{12}O_{18}$. Makrolidi su makrociklički laktoni koje u prirodi proizvodi vrsta *Streptomyces*, a često u strukturi sadrže jednu ili više molekula deoksi šećera, najčešće kladinozu i desosamin. Fidaksomicin pripada skupini kemijskih spojeva tiakumicina, makrocikličkih antibiotika prirodno dobivenih iz soja *Dactylosporangium aurantiacum* izoliranog iz uzorka tla. Tiakumicin B je glavna komponenta tiakumicin kompleksa. Optički čisti R-tiakumicin B najaktivnija je komponenta fidaksomicina.³⁰ Struktura s numeriranim atomima prikazana je na slici 26.



Slika 26. Numerirana struktura fidaksomicina

Fidaksomicin, kao i rifamicini, djeluje putem zaustavljanja sinteze bakterijske RNA inhibirajući RNA polimerazu, iako se njegovo vezno mjesto razlikuje od mjesta na koje se vežu rifamicini.³¹ Dostupan je kao DIFICID oralne tablete na američkom tržištu. S obzirom da nisu pronađeni literaturni izvori o konformacijskoj analizi tehnikom NMR, te njegovoj 3D strukturi, izabran je kao treća molekula za ovaj istraživački rad. Uz to, do sada još nije pokazano mogu li makrolidne vrste imati „kameleonska“ svojstva ili ne.

2.5. Vezanje metalnih iona na makrocikle

Dosadašnja istraživanja su pokazala kako postoji određeni broj makrocikličkih molekula koje mogu kompleksirati metalne ione pri čemu često dolazi do promjene konformacije makrocikala ili njihove biološke aktivnosti.^{10,24,32,33,34} Najviše istraživanja pomoću raznih analitičkih metoda o utjecaju metalnih iona na strukturalna obilježja pronađeno je na ciklosporinu A. Tako je pokazano da kompleksiranjem iona kalcija ili litija, CsA poprima konformaciju koja se razlikuje od one pronađene u kristalnoj strukturi ili konformacije koju poprima prilikom vezanja na svoj prirodni receptor, ciklofilin.^{10,24} Osim toga, strukturne promjene pronađene su i u kompleksima s ionima kao što su Mg^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} i Ce^{3+} uz nešto manji afinitet vezanja.^{14,18,24,35} Daptomicin je makrociklički antibiotik čija normalna funkcija ovisi o kalciju.³⁴ Pokazalo se kako divalentni kationi kao što su Ca^{2+} i Mg^{2+} služe za „maskiranje“ negativno

nabijenih ostataka u anionskim lipopeptidima kao što je daptamicin, pri čemu omogućavaju utjecaj antibiotika na bakterijske membrane. Osim ciklosporina A i daptomicina, afinitet prema vezanju metalnih iona pokazao je i antibiotik vankomicin. Istraživanja su pokazala kako vezanje iona bakra ili iona cinka različito utječe na aktivnost vankomicina.^{33,36}

Tehnike spektroskopije NMR pokazale su se kao dobar izbor za praćenje vezanja metalnih iona na makrocikle s obzirom da pružaju strukturne informacije na atomskoj razini i osjetljive su na dinamiku molekula u otopini.^{18,24,35,37} Uspoređujući dijamagnetske i paramagnetske metalne ione, puno veći efekt na spektre NMR pokazuje vezanje paramagnetskih metalnih iona na organsku molekulu. Razlog tomu je što paramagnetski metalni ioni imaju slobodan elektronski par koji ostvaruje jaku interakciju s jezgrom koja ga okružuje. Samim time, prisustvo slobodnog elektronskog para ima veliki utjecaj na kemijske pomake i brzinu relaksacije jezgara u molekuli. Skalarna sprežanja su u većini slučajeva odgovorna za drastični kemijski pomak signala jezgre u neposrednoj metalnog iona.³⁷ Osim toga, može doći i do širenja signala u takvom razmjeru da ih više nije moguće detektirati stoga ponekad nije moguće dobiti informacije o geometrijskog strukturi molekule koja se nalazi u prostornoj blizini metala.³⁷

U ovom radu, za potrebe testiranja „kameleonskog“ svojstva, istražen je utjecaj iona kalcija na konformaciju CsA, Rfmp i Fdx uz pomoć spektroskopije NMR i metodama molekuskog modeliranja.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Ciklosporin A (CsA, CAS: 59865-13-3) korišten za izradu ovog diplomskog rada nabavljen je u suradnji s dr. sc. Jovicom Ralić. Rifampicin (Rfmp, CAS: 13292-46-1) proizvođača Fisher Scientific (Fisher BioReagents) osiguran je u suradnji s mag. chem. Petrom Mišetić. Treći spoj, fidaksomicin (Fdx, CAS: 873857-62-6) kupljen je od proizvođača Biomol (Cayman Chemical). Kao otapalo korištene su ampule deuteriranog tetrahidrofurana od 1 mL (THF-d₈, 99,5 %, CAS: 1693-74-9) od Cambridge Isotope Laboratories, Inc, te isti oblik od proizvođača Euriso-top. Za eksperimente u kojima se pratilo vezanje metalnih iona na makrocikličke molekule kao izvor kalcija korišten je kalcijev klorid (CaCl₂, CAS: 10043-52-4) od proizvođača Sigma (Sigma Chemical Co.).

3.2. Priprema uzorka

Za potvrdu strukture i konformacijsku analizu korišteno je 9,0 mg (0,0075 mmol) CsA, 10,3 mg (0,0125 mmol) Rfmp i 9,8 mg (0,0093 mmol) Fdx, te je svaki uzorak otopljen u 1,0 mL THF-d₈. Otopljeni uzorci preneseni su u NMR cjevčice promjera 5,0 mm i snimani pri 25 °C. Isti uzorci korišteni su kasnije za NMR eksperimente pri povišenoj temperaturi na 35 °C i 45 °C. Za eksperimente ciklosporina A s kalcijem, izvagano je 40,3 mg (0,0335 mmol) CsA, otopljeno u 4,0 mL THF-a i podijeljeno u četiri različite cjevčice. U svaku je dodan CaCl₂ kako je prikazano u tablici 3.

Tablica 3. Priprema uzorka CsA s različitim količinama CaCl₂

	<i>m</i> (CsA) / mg	<i>m</i> (CaCl ₂) / mg	<i>n</i> (CsA) / mmol	<i>n</i> (CaCl ₂) / mmol
cjevčica 1	10,075	0	1,0	0
cjevčica 2	10,075	0,5	1,0	0,54
cjevčica 3	10,075	1,0	1,0	1,08
cjevčica 4	10,075	1,9	1,0	2,06

Za analizu interakcija Rfmp i Fdx s kalcijem, izvagano je 20,3 mg (0,0247 mmol) Rfmp i 20,4 mg (0,0193 mmol) Fdx te je svaki otopljen u 2,0 mL THF- d_8 . Uzorci su zatim podijeljeni na dva jednaka dijela i dodan im je $CaCl_2$ kako je prikazano u tablici 4.

Tablica 4. Priprema uzoraka Rfmp i Fdx s različitim količinama $CaCl_2$

	<i>m</i> (Rfmp) / mg	<i>m</i> ($CaCl_2$) / mg	<i>n</i> (Rfmp) / mmol	<i>n</i> ($CaCl_2$) / mmol
cjevčica 1	10,15	0	1,0	0
cjevčica 2	10,15	1,3	1,0	1,0
	<i>m</i> (Fdx) / mg	<i>m</i> ($CaCl_2$) / mg	<i>n</i> (Fdx) / mmol	<i>n</i> ($CaCl_2$) / mmol
cjevčica 1	10,20	0	1,0	0
cjevčica 2	10,20	1,1	1,0	1,0

Za potrebe analize spektrometrijom masa, uzeti su alikvoti od 10,0 μ L prethodno pripremljenih uzoraka CsA, Rfmp i Fdx s različitim omjerom kalcijeva klorida. Uzorci su prebačeni u već označene bočice i razrijeđeni na završni volumen od 1,0 mL mješavinom otapala acetonitril/voda (1:1, v/v).

3.3. Metode

Svi jednodimenzijски i dvodimenzijски NMR spektri snimljeni su u Laboratoriju za NMR spektroskopiju poduzeća Fidelta d.o.o. Spektri 1H , DEPTq, COSY, editirani HSQC, HMBC, NOESY i ROESY NMR snimani su na Bruker Avance III 600 spektrometru opremljenom inverznom probom i z-gradijentima. Svi eksperimenti provedeni su u NMR cjevčicama od 5,0 mm. Eksperimenti za potvrdu strukture, konformacijsku analizu te eksperimenti s kalcijem provedeni su pri 25 °C. Temperaturni eksperimenti provedeni su pri 25 °C, 35 °C i 45 °C. Za snimanje svih spektara korišteni su standardni pulsni slijedovi koji se nalaze u biblioteci proizvođača (Bruker BioSpin).

3.3.1. Spektri za asignaciju

Za potpunu asignaciju vodikovih i ugljikovih atoma snimljeni su jednodimenzijски (1H i DEPTq) i dvodimenzijски (COSY, editirani HSQC, HMBC) NMR spektri. Eksperimentalni

parametri snimljenih ^1H i DEPTq NMR spektara nalaze se u dodatcima (slika D1 - D16). Kod svih dvodimenzijских HSQC spektara FID (engl. *free induction decay*) je skupljan u matricu podataka veličine 2 K s 512 inkremenata odnosno 2 K s 384 inkrementa za HMBC spektre. Obrada je provedena korištenjem 2 K x 1 K matrice sa *zero filling* u F_1 domeni. COSY spektri snimani su s 4 pulsa, editirani HSQC s 8 - 36 pulseva, a HMBC sa 16 - 64 pulseva. U HMBC spektrima vrijeme odgode bilo je 1,5 s, a vrijeme odgode za razvijanje sprežanja dugog doseg a bilo je 60 ms.

3.3.2. Spektri za konformacijsku analizu

U svrhu provođenja konformacijske analize snimani su dvodimenzijски NOESY i ROESY spektri. Kod snimanja uzoraka CsA i Fdx korištena je spektralna širina od 7000 Hz u obje dimenzije, FID je sakupljan u matricu podataka veličine 4 K s 1024 inkremenata, a procesiranje je provedeno koristeći 2 K x 1 K matricu sa *zero filling* u F_1 domeni. Za Rfmp korištena je spektralna širina od 8400 Hz u obje dimenzije, FID je sakupljan u matricu podataka veličine 2 K s 256 inkremenata, a procesiranje je provedeno koristeći 2 K x 1 K matricu u F_1 domeni. Broj pulseva je bio od 16 do 32. Za NOESY spektar vrijeme odgode bilo je 2 s, a vrijeme miješanja 0,4 s.

3.3.3. Eksperimenti s kalcijevim ionima

Kako bi se ispita o utjecaj metalnih iona na strukturu istraživanih makrocikala, snimljeni su jednodimenzijски (^1H i DEPTq) NMR spektri. Za određivanje konformacije rifampicin u prisustvu iona kalcija snimljeni su spektri NOESY i ROESY prema parametrima iz prethodnog odjeljka 3.3.2. Parametri za sve eksperimente jednaki su kao u dodatcima (slika D1 - D16), s iznimkom broja pulseva za DEPTq spektre koji je umjesto 8 000 iznosio 10 000.

3.3.4. Temperaturni eksperimenti

S ciljem istraživanja temperaturnog utjecaja na strukturu promatranih molekula snimljeni su jednodimenzijски (^1H i DEPTq) NMR spektri pri 25 °C, 35 °C i 45 °C kako bi se usporedili kemijski pomaci i intenziteti signala na različitim temperaturama. Eksperimentalni parametri snimljenih ^1H i DEPTq NMR spektara jednaki su kao u dodatcima (slika D1 - D16).

3.3.5. Spektrometrija masa kao potvrda nastajanja kompleksa s kalcijem

Spektroskopija masa (MS) provedena je u svrhu potvrde vezanja kalcijevih iona na istraživane makrocikle. Analiza je provedena na vezanom sustavu Waters Acquity UPLC sa SQD spektrometrom masa (MS). Kao otapalo korištena je otopina acetonitril/voda (1:1, v/v). Volumen injektiranja iznosio je 1,0 μL dok je vrijeme zaustavljanja iznosilo 0,5 min. Uzorci su direktno injektirani u MS. Tehnika ionizacije bila je ionizacija elektroraspršenjem (ES+ / ES-). Raspon snimanja bio je od 100 do 1500 AMU, a vrijeme snimanja 0,30 s.

3.3.6. Molekulsko modeliranje

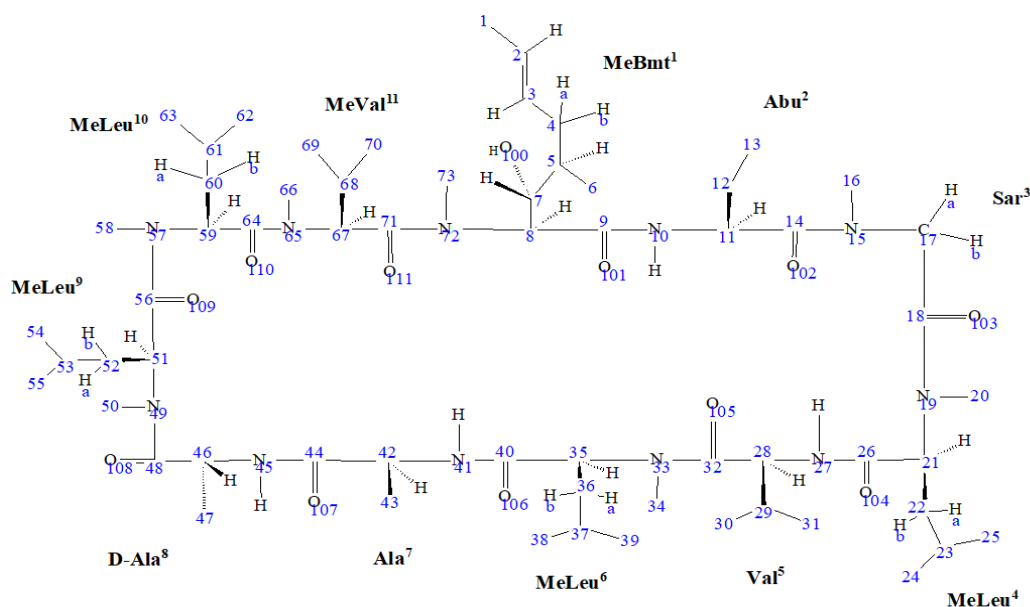
Kristalne strukture ciklosporina A i rifampicina koje su korištene kao polazna točka za generiranje konformacije tih molekula u otopini pronađene su u bazama CSD (*Cambridge Structural Database*) i PDB. Zbog nedostatka kristalne strukture fidaksomicina, generiranje konformacije te molekule u otopini provedeno je od početka koristeći samo dvodimenzijску strukturu i stereokemiju tog spoja.³⁰ Dvije šećerne jedinice fidaksomicina su zasebno modelirane u konformaciju stolca kako bi se postigla bolja optimizacija njihove orijentacije u odnosu na makrocikl. Pretraga konformacijskog prostora provedena je koristeći matricu uvjeta dobivenih iz NMR eksperimenata metodom molekulske mehanike. NOE interakcije su upotrijebljene kao ograničenja udaljenosti, dok su konstante sprezanja korištene kao granice za vrijednosti kutova među susjednim protonima. Nakon određivanja energetski najpovoljnije konformacije uslijedio je račun molekulske dinamike da bi se provjerila stabilnost dobivene strukture kroz vrijeme te odredio mogući utjecaj molekula otapala. Molekulska dinamika provodila se u vremenu od 100 ns pri 300 K u kloroformu. Kloroform je izabran kao odgovarajuće zamjensko otapalo zbog vrlo slične dielektrične konstante THF- d_8 budući da računalni uvjeti za simulaciju u THF-u nisu bili dostupni. Konformacijske analize te simulacije molekulsom dinamikom provedene su koristeći Schroedinger programski paket,³⁸ MacroModel program za konformacijsku analizu uz OPLS3 polje sila i implicitni utjecaj otapala,³⁹ te Desmond program za simulacije molekulsom dinamikom.^{40,41} Dužina simulacija bila je 20 ns, korišten je NPT ansambl, na temperaturi od 300 K i tlaku od 1,01325 bara.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Potvrda strukture makrocikala analizom NMR

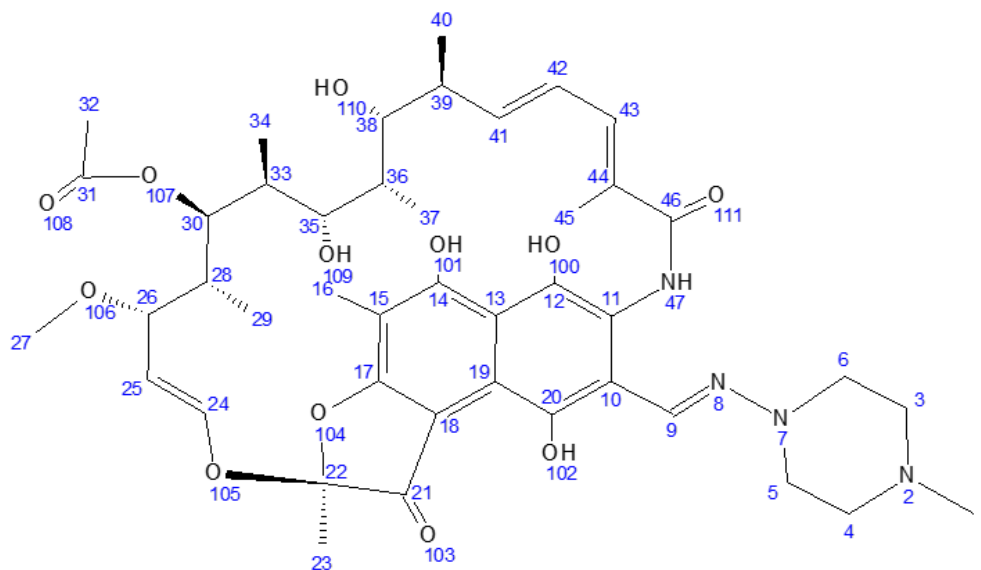
Detaljnou analizom NMR spektara dobivenih različitim homonuklearnim i heteronuklearnim tehnikama NMR (Eksperimentalni dio, str. 31) određeni su kemijski pomaci ugljikovih i vodikovih atoma za sva tri spoja. U dodatcima (slika D1 – D16) prikazani su spektri ^1H i ^{13}C NMR te tablice kemijskih pomaka za CsA, Rfmp i Fdx. Tetrahidrofuran- d_8 (THF- d_8) je odabran kao otapalo zbog svoje dielektrične konstante koja omogućuje simulaciju uvjeta u aktivnom mjestu proteina.⁴² U tom pogledu THF- d_8 je sličan kloroformu (CDCl_3), uz prednost da mnogi spojevi koji nisu topivi u kloroformu, imaju dobru topivost u THF- d_8 .

S obzirom da je ciklosporin A korišten kao referentna molekula s ciljem optimizacije eksperimentalnog i računalnog pristupa za istraživanje konformacijskog prostora makrocikala, dobiveni rezultati uspoređivani su s već poznatim literaturnim podacima za ciklosporin u THF- d_8 .^{10,32} Tablica usporedbe literaturnih i eksperimentalnih rezultata kemijskih pomaka nalazi se u dodatcima (tablica D9). Kako nije bilo većih odstupanja može se zaključiti da su korišteni eksperimentalni uvjeti, struktura i čistoća referentnog spoja u skladu s rezultatima analiza iz literature. Slika 27 prikazuje numeriranu strukturu CsA potvrđenu analizom NMR.



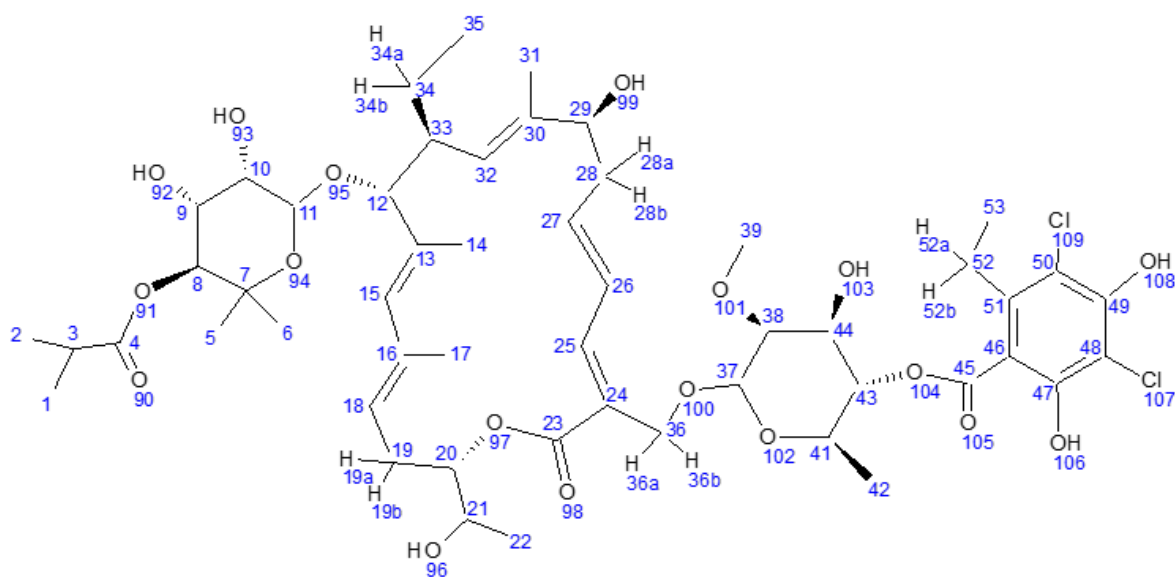
Slika 27. Numerirana struktura CsA potvrđena analizom NMR

Literaturni podatci za rifampicin u THF-d₈ nisu pronađeni, pa dobiveni rezultati predstavljaju originalni doprinos razumijevanju konformacije rifampicina u otapalu niske dielektrične konstante. Uz izuzetak hidroksilnih skupina iz naftolnog prstena (100 OH, 101 OH i 102 OH) rifampicina, svi ostali protoni i sve ugljikove jezgre uspješno su povezani s odgovarajućim signalima u spektrima NMR čime je potvrđena struktura rifampicina u THF-d₈ (slika 28). Pokazano je da se 23 H nalazi prekriven signalom otapala tako što su pronađene jake HMBC interakcije sa jezgrama 21 C i 22 C. Točno određivanje kemijskih pomaka karbonilnih ugljika bilo je moguće jedino kroz korelacije iz spektra HMBC.



Slika 28. Numerirana struktura Rfmp potvrđena analizom NMR

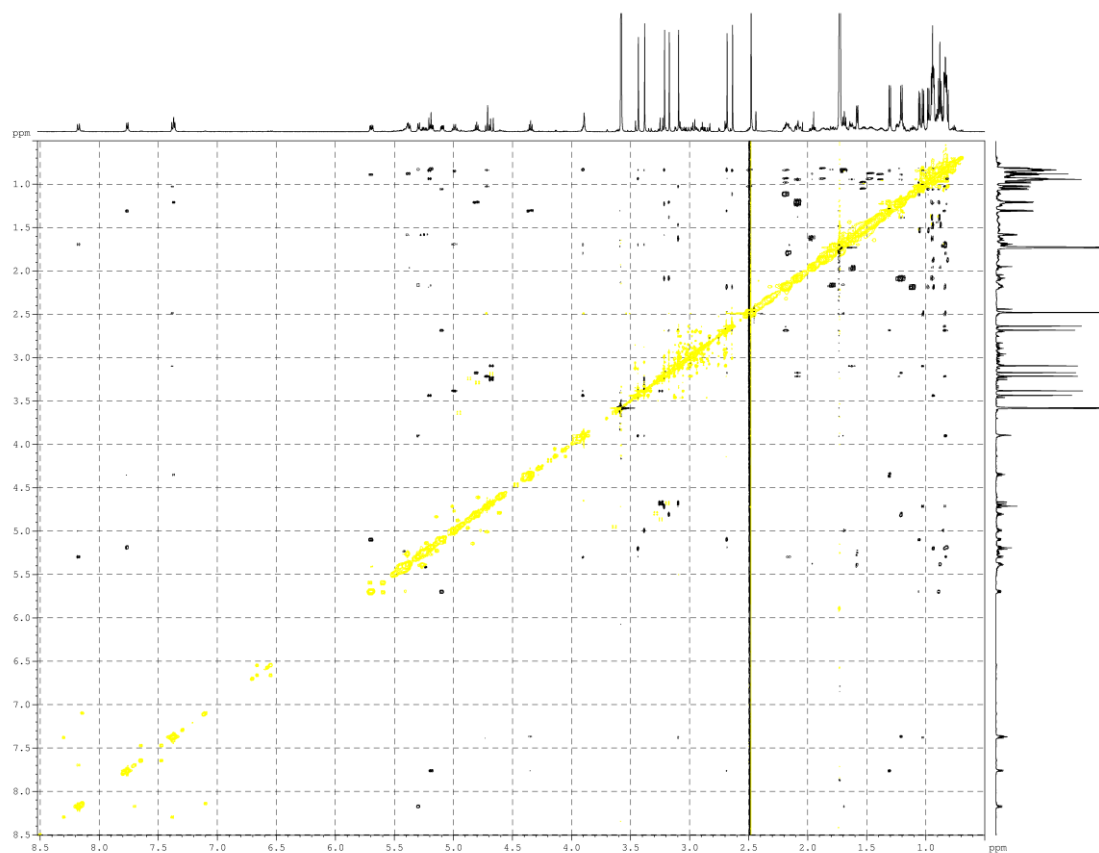
Za strukturu fidaksomicina pronađeno je vrlo malo literaturnih izvora stoga je potvrda njegove strukture, kao i određivanje konformacije, bilo najzahtjevnije. Spektar COSY pokazao je sve relevantne H - H interakcije susjednih atoma. Uz to, pronađeno je da metilne skupine 1 CH₃ i 2 CH₃ te 5 CH₃ i 6 CH₃ nemaju isti kemijski pomak, odnosno njihove magnetske okoline nisu identične, vjerojatno zbog definirane orijentacije u prostoru. Kemijski pomaci protona hidroksilnih skupina 92 OH, 93 OH i 106 OH nisu određeni, ali to nije utjecalo na konačnu potvrdu strukture (slika 29).



Slika 29. Numerirana struktura Fdx potvrđena analizom NMR

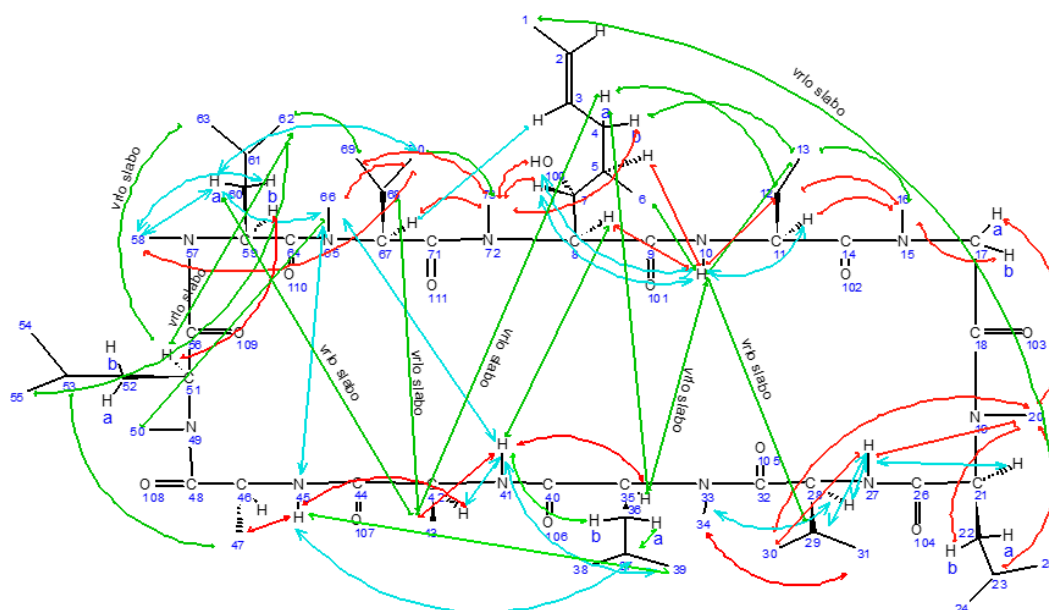
4.2. Konformacijska analiza ciklosporina A

NMR dio konformacijske analize ciklosporina A u THF- d_8 proveden je određivanjem konstanti sprezanja i matrice NOE interakcija iz spektra NOESY (slika 30). Konstante sprezanja izvedene su iz spektra ^1H NMR i prikazane u tablici D1, dok su sve NOE interakcije navedene u tablici D2. Zbog veličine molekule ciklosporina A, odnosno velikog broja signala NMR dolazi do preklapanja u spektru ^1H , što onemogućuje određivanje konstanti sprezanja između svih protona u molekuli.



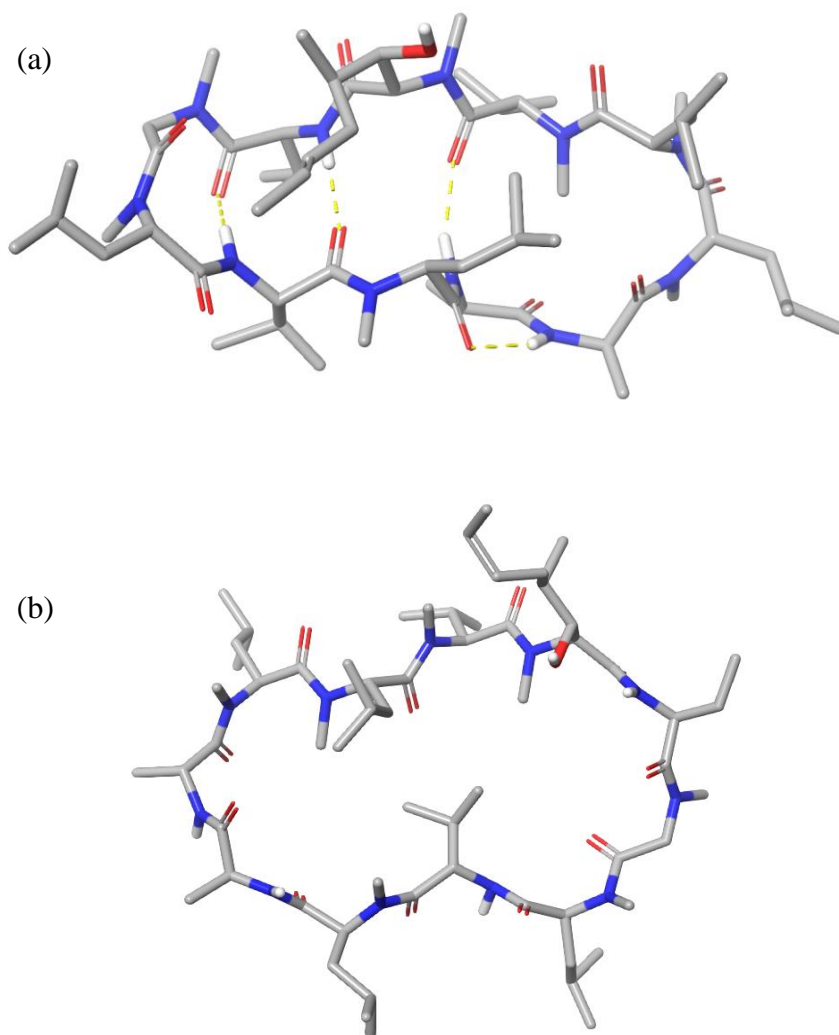
Slika 30. Spektar NOESY CsA u THF-d₈ pri 25 °C

Isto tako, preklapanje uzrokuje da se velik broj interakcija u spektru NOESY (slika 30) može pripisati različitim parovima protona, što i inače čini konformacijsku analizu makrocikala puno zahtjevnijom od analize malih heterocikličkih molekula. Ključni NOE kontakti ciklosporina prikazani su na slici 31.



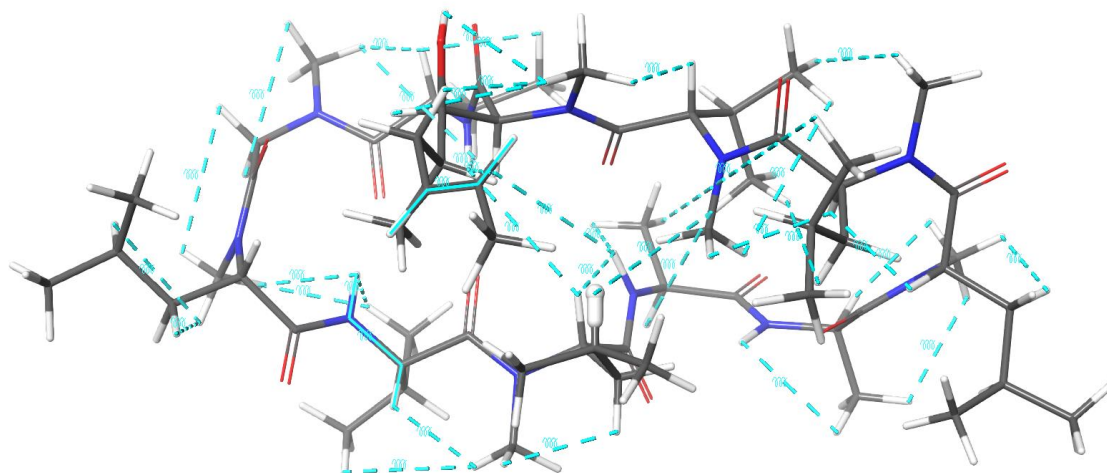
Slika 31. Struktura CsA s ključnim NOE interakcijama; jake interakcije (crveno), srednje jake (plavo) te slabe (zeleno)

U svrhu utvrđivanja točne konformacije CsA, a zbog veličine i kompleksnosti molekule, nakon analize spektara NMR, dobiveni eksperimentalni podatci korišteni su tijekom konformacijske pretrage kao uvjeti ili ograničenja u sklopu računa molekulske mehanike. Kao početna točka za konformacijsku pretragu molekulskom mehanikom upotrijebljene su kristalne strukture ciklosporina A pronađene u bazama CSD (kod: deksan) i PDB (2ESL i 1IKF). Usporedba pronađenih kristalnih struktura pokazala je da najveću razliku u konformaciji ciklosporina uzrokuje okolina u kojoj se molekula nalazi, odnosno, da li je vezan na makromolekulu ili je u slobodnom stanju. U kristalnoj strukturi slobodnog spoja, slika 32 (a), prikazane su vodikove veze koje nisu prisutne u vezanom bioaktivnom obliku CsA, slika 32 (b). Kristalna struktura ciklosporina u kompleksu sa makromolekulom odgovara njegovoj strukturi u otapalu dielektrične konstante visoke vrijednosti, odnosno u fiziološkim uvjetima, dok kristalna struktura slobodnog ciklosporina A odgovara izduženoj, lipofilnijoj konformaciji koju poprima prilikom prolaska kroz biološke membrane.



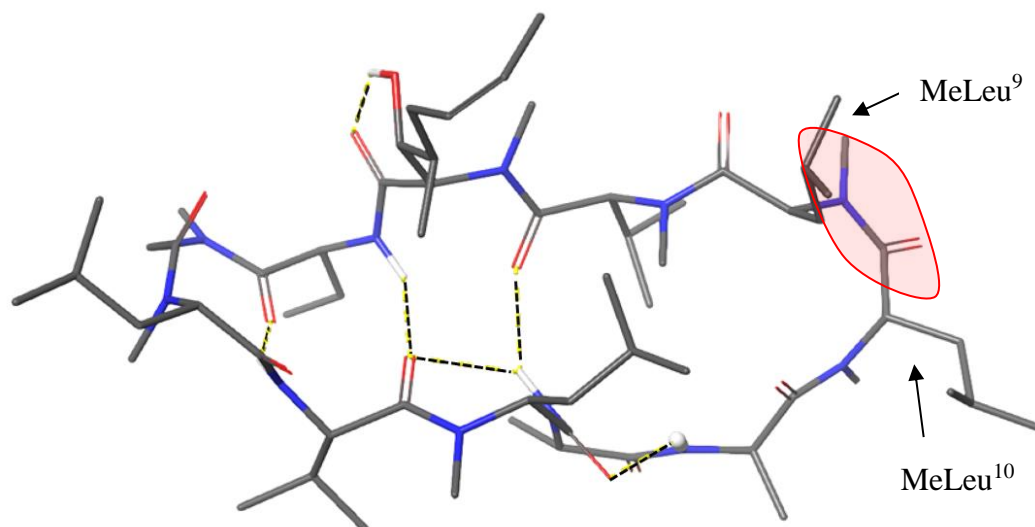
Slika 32. Konformacija CsA u kristalnom stanju; (a) slobodan i (b) vezani oblik

Početna točka za pretragu konformacijskog prostora CsA generirana je uz pomoć prethodno navedenih kristalnih struktura. Na tu početnu točku postavljeni su uvjeti dobiveni iz eksperimenata NMR. U prvom koraku korištene su samo jake NOE interakcije kao ograničenja udaljenosti između protona koji nisu susjedi (udaljenosti od 2.0-3.0 Å).⁴³⁻⁴⁵ Iterativno su zatim uvedene i srednje jake NOE interakcije (udaljenosti od 3.0-4.0 Å), te slabe transanularne interakcije (udaljenosti veće od 4.0 Å). Korištena NOE ograničenja prikazana su na slici 33 plavim isprekidanim linijama. Drugi set uvjeta dobiven iz spektara NMR odnosi se na kutove između protona, što je ograničenje dobiveno iz konstanti spreznja dva susjedna protona.



Slika 33. Konformacija CsA uz NOE ograničenja (plave isprekidane linije)

Pretraga konformacijskog prostora provedena je koristeći matricu uvjeta dobivenih iz NMR eksperimenata nakon čega je uslijedio račun molekulske dinamike da bi se provjerila stabilnost dobivene strukture u vremenu, te utjecaj otapala. Optimirana struktura koja je najbolje odgovarala podacima NMR prikazana je na slici 34. Potvrđena je prisutnost intramolekulskih vodikovih veza kao i *cis* konfiguracija peptidne veze između MeLeu⁹ i MeLeu¹⁰ što je očekivana konformacija u nepolarnom okruženju prema literaturnim opažanjima (2.4.1. Ciklosporin A, str. 24).

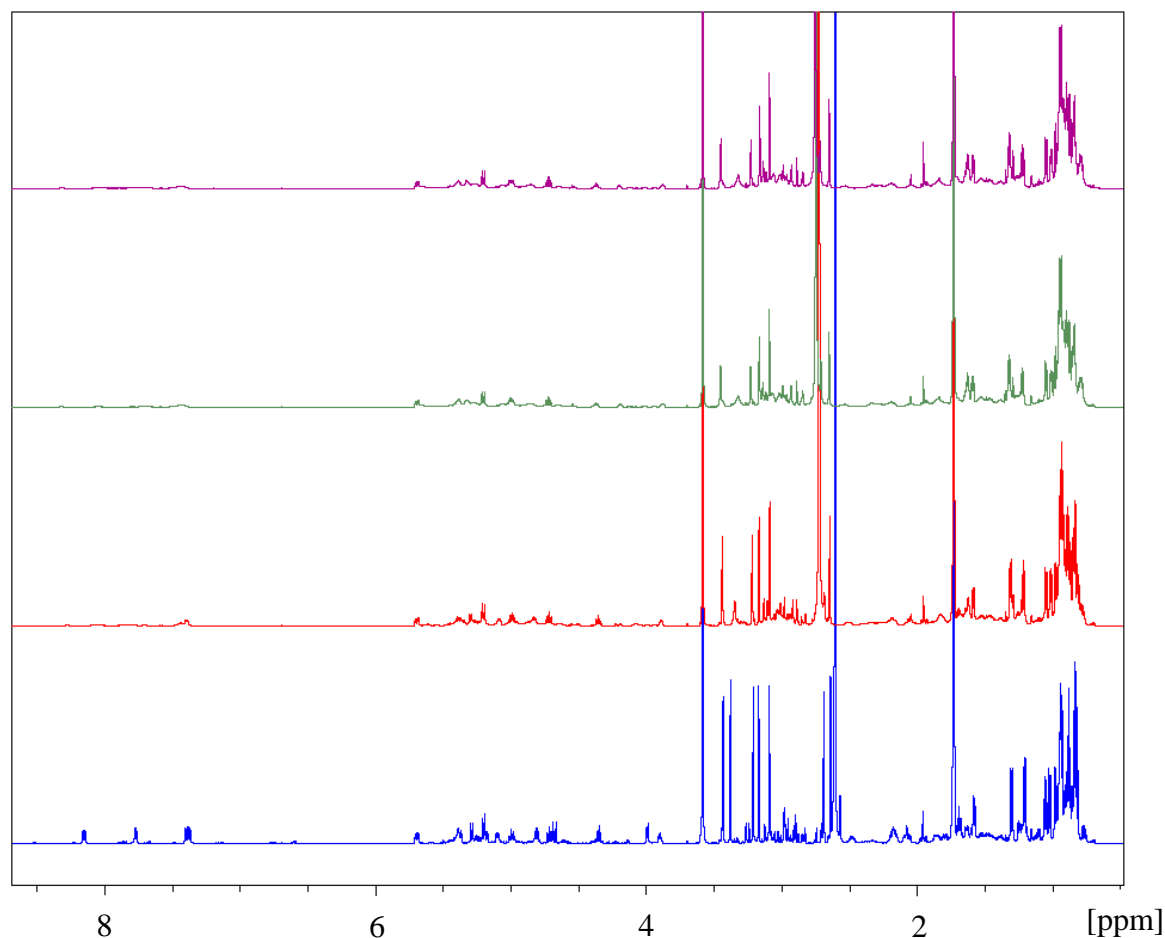


Slika 34. Struktura CsA u THF-d₈ koja odgovara podatcima dobivenim iz eksperimenata NMR

4.2.1. Stvaranje kompleksa s ionima kalcija

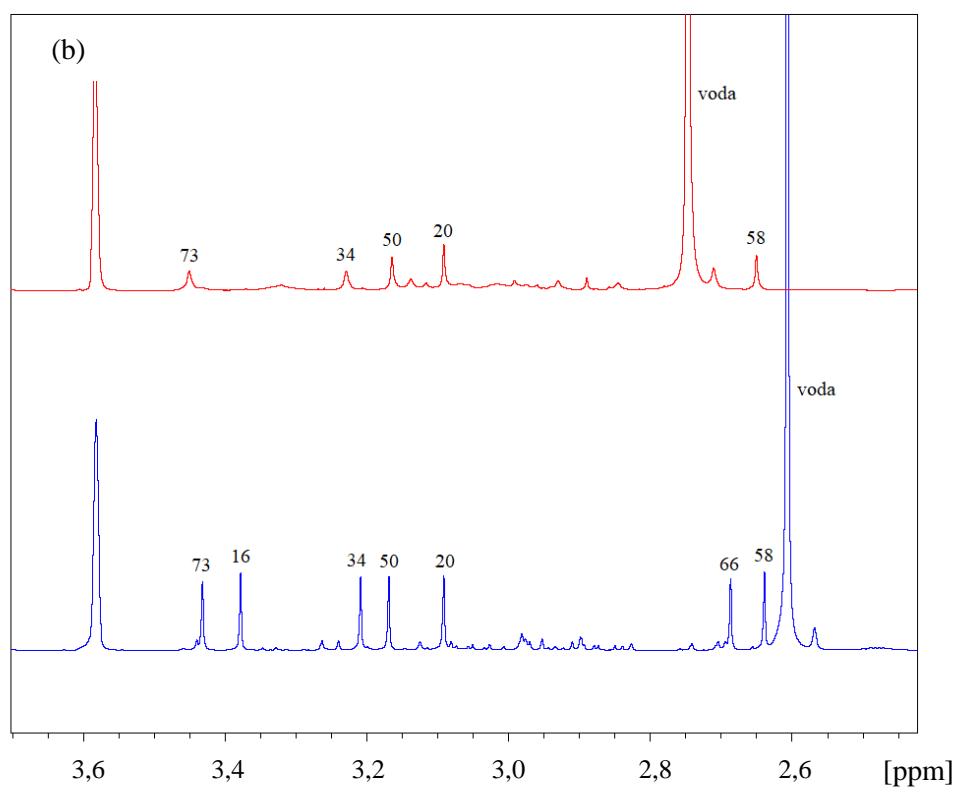
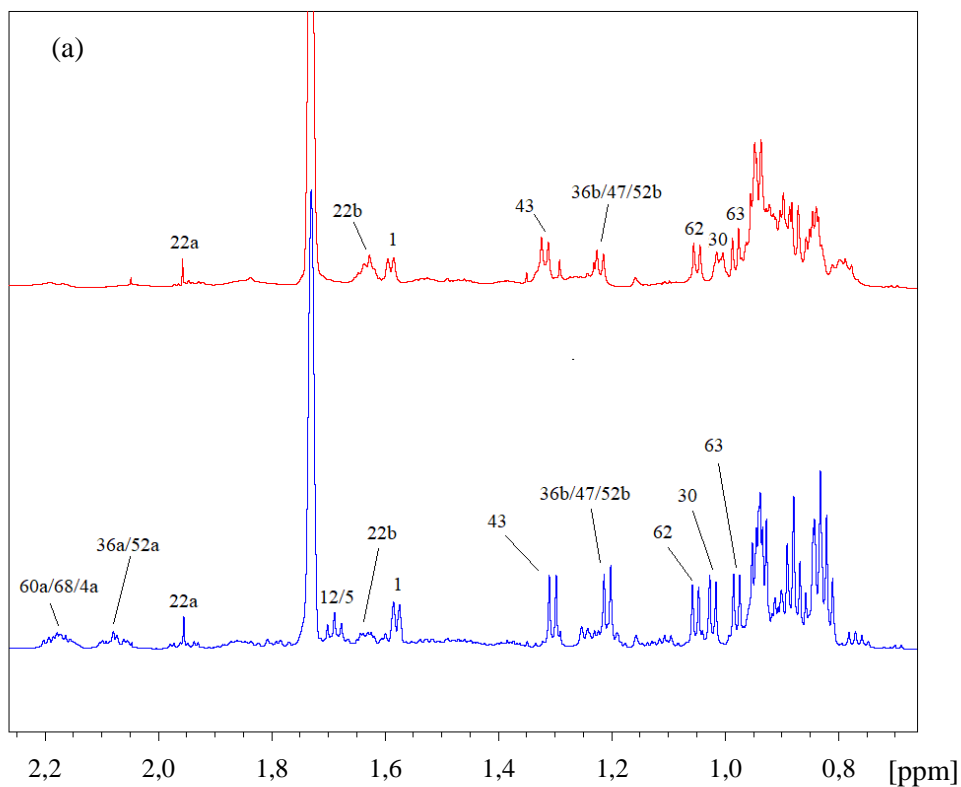
Kompleksiranje ciklosporina A s kalcijevim kloridom u THF-d₈ istraživano je spektroskopijom NMR koristeći pri tome različite koncentracije CaCl₂ (tablica 3). Spektri ¹H i DEPTq NMR su snimljeni i uspoređivani kako bi se pronašle razlike u kemijskim pomacima i/ili intenzitetima signala nakon dodatka različite količine kalcijevih iona. Omjer CsA i Ca²⁺ iona u eksperimentima bio je 1 : 0,5, 1 : 1 i 1 : 2 kako bi se ispitalo kod koje količine kalcijevih iona dolazi do maksimalne promjene uzrokovane nastankom kompleksa ciklosporina A i kalcija. Nažalost, količine kalcijevih iona bile su ograničene topljivošću kalcijeva klorida u organskim otapalima.

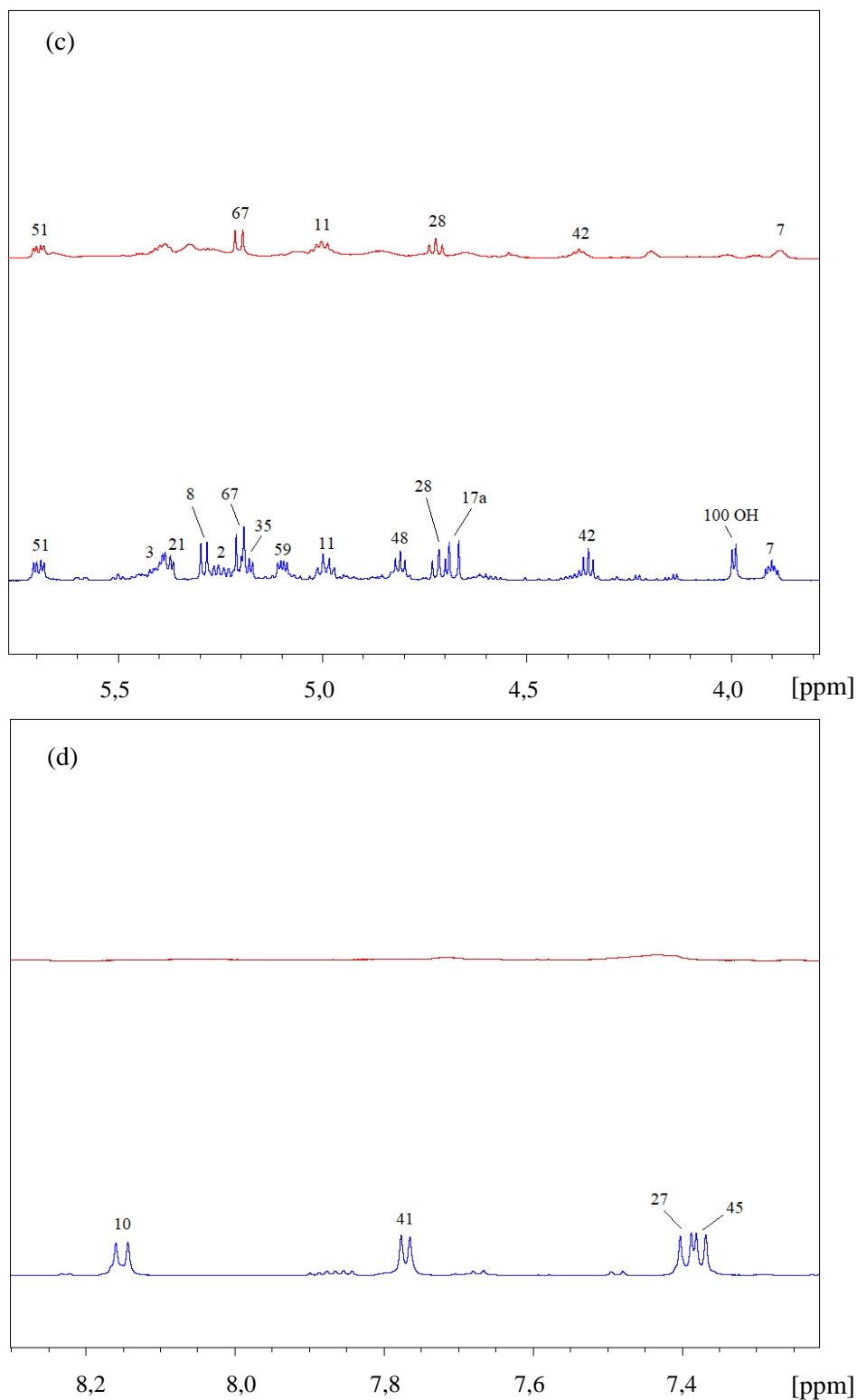
Usporedba spektara ¹H NMR dobivenih snimanjem uzoraka s različitim koncentracijama kalcijevih iona (slika 35) pokazala je kako kod omjera CsA : CaCl₂ = 1 : 0,5 dolazi do manjih promjena u spektru NMR. Intenzivnije i značajnije promjene vidljive su u uzorku s omjerom ciklosporina i kalcijevog klorida 1 : 1. Daljnje povećanje koncentracije kalcijevih iona nije uzrokovalo nikakvu veću razliku u kemijskim pomacima ili intenzitetu signala. Iz tih razloga, sve daljnje analize provedene su usporedbom NMR spektara čistog uzorka CsA u THF-d₈ s uzorkom nakon dodatka 1 ekvivalenta CaCl₂ u otopinu.



Slika 35. Spektar ^1H CsA u THF- d_8 bez CaCl_2 (plavo), te uz različite omjere CsA i CaCl_2 - 1 : 0,5 (crveno), 1 : 1 (zeleno) i 1 : 2 (ljubičasto)

Područja spektara ^1H NMR s najintenzivnijim promjenama detaljnije su prikazana na slici 36. Primijećeno je da je većina signala koji pripadaju protonima u blizini NH skupina promjenila svoj kemijski pomak ili im se smanjio intenzitet: 30 H, 36b H, 47 H, 43 H, 12 H, 5 H, 66 H, 20 H, 42 H, 28 H, 11 H, 35 H, 8 H i 21 H. Značajnu promjenu smanjenja intenziteta signala u prisutnosti kalcijevih iona pokazali su i svi protonski signali iz *N*-metiliranih amidnih grupa: 20 NCH_3 , 50 NCH_3 , 34 NCH_3 , 16 NCH_3 i 73 NCH_3 (slika 36 (b)). Utjecaj kalcija zapaža se i na smanjenju intenziteta signala protona nekih metilnih skupina, 63 CH_3 , 62 CH_3 i 1 CH_3 . Uz to, svi signali NH skupina su nestali iz spektra, slika 36 (d).

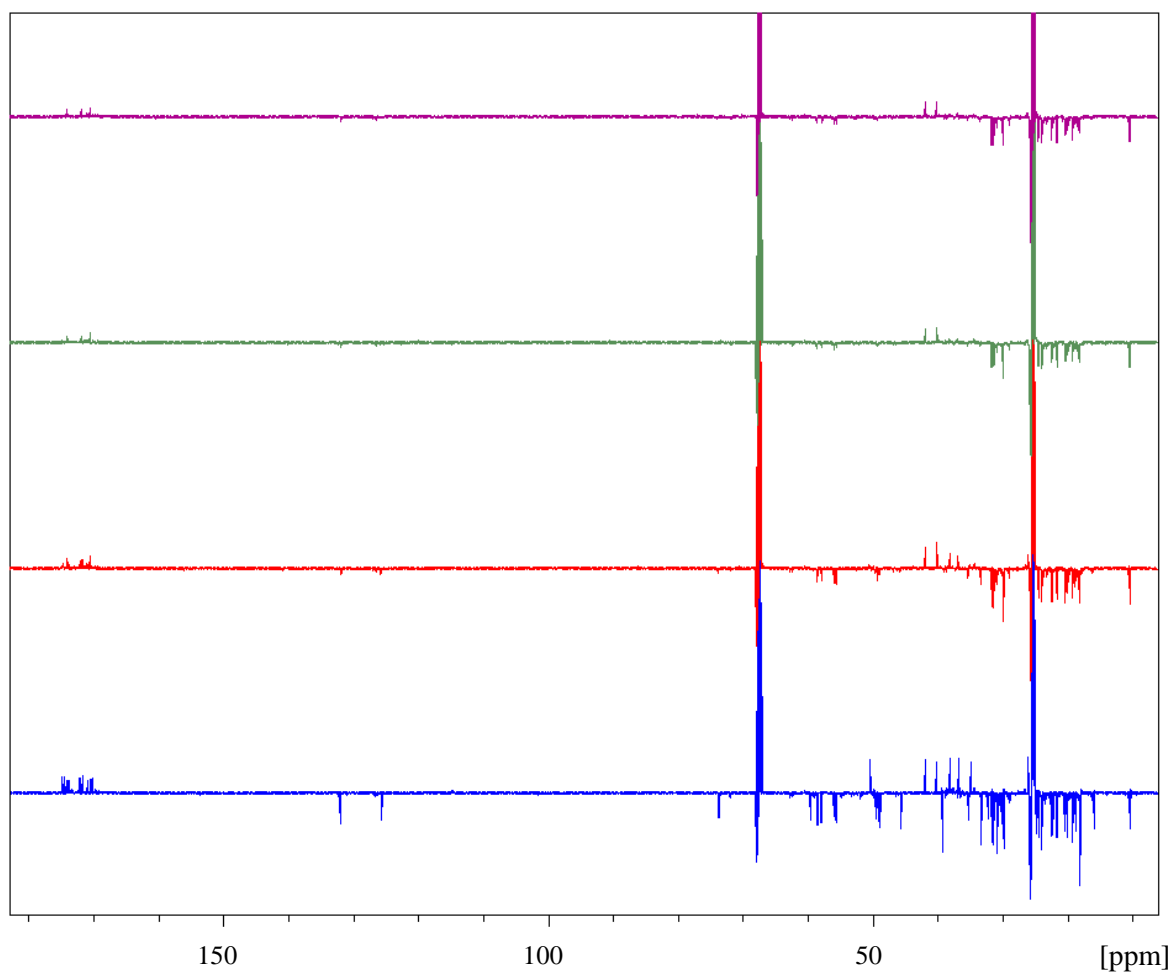




Slika 36. Usporedba područja s najistaknutijim promjenama (a,b,c i d) u spektrima ^1H NMR uzorka CsA bez CaCl_2 (plavo), te s dodatkom CaCl_2 (crveno)

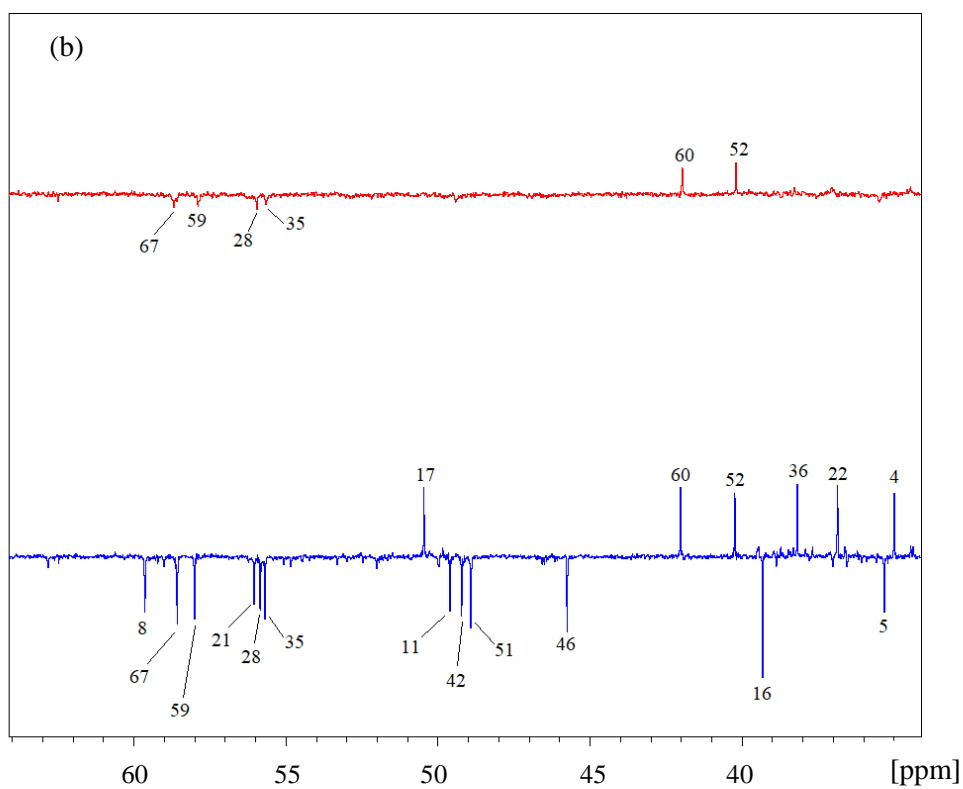
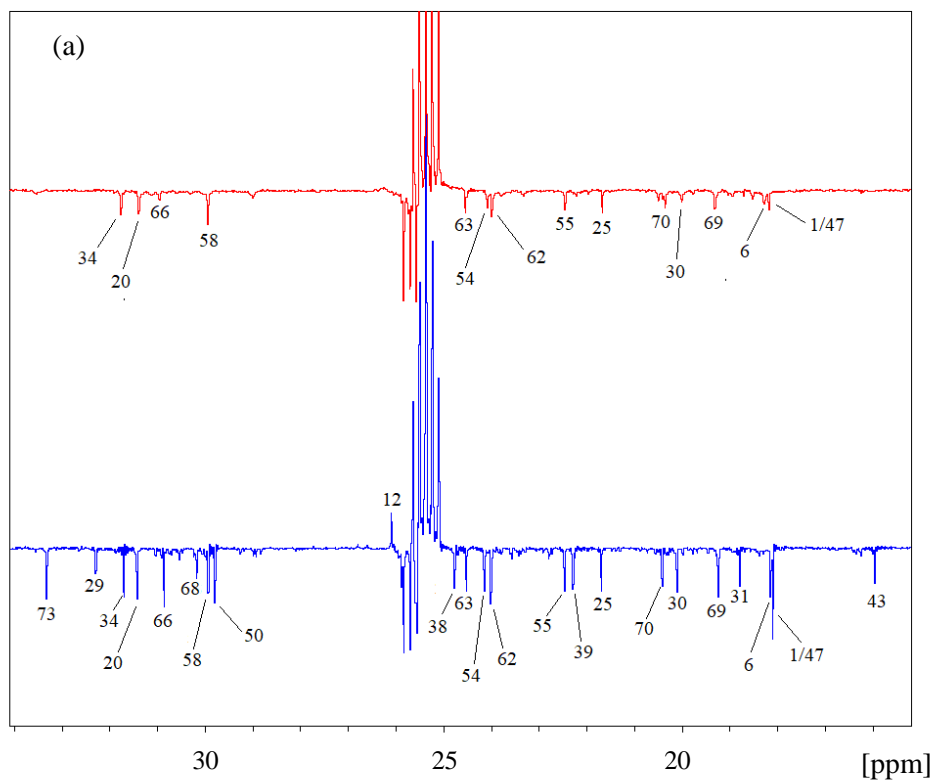
Ove promjene odgovaraju kidanju vodikovih veza unutar makrocikličkog prstena CsA kako bi se stvorio prostor za smještanje kalcijevog iona i njegovu koordinaciju s kisikovim atomima iz karbonilnih skupina.

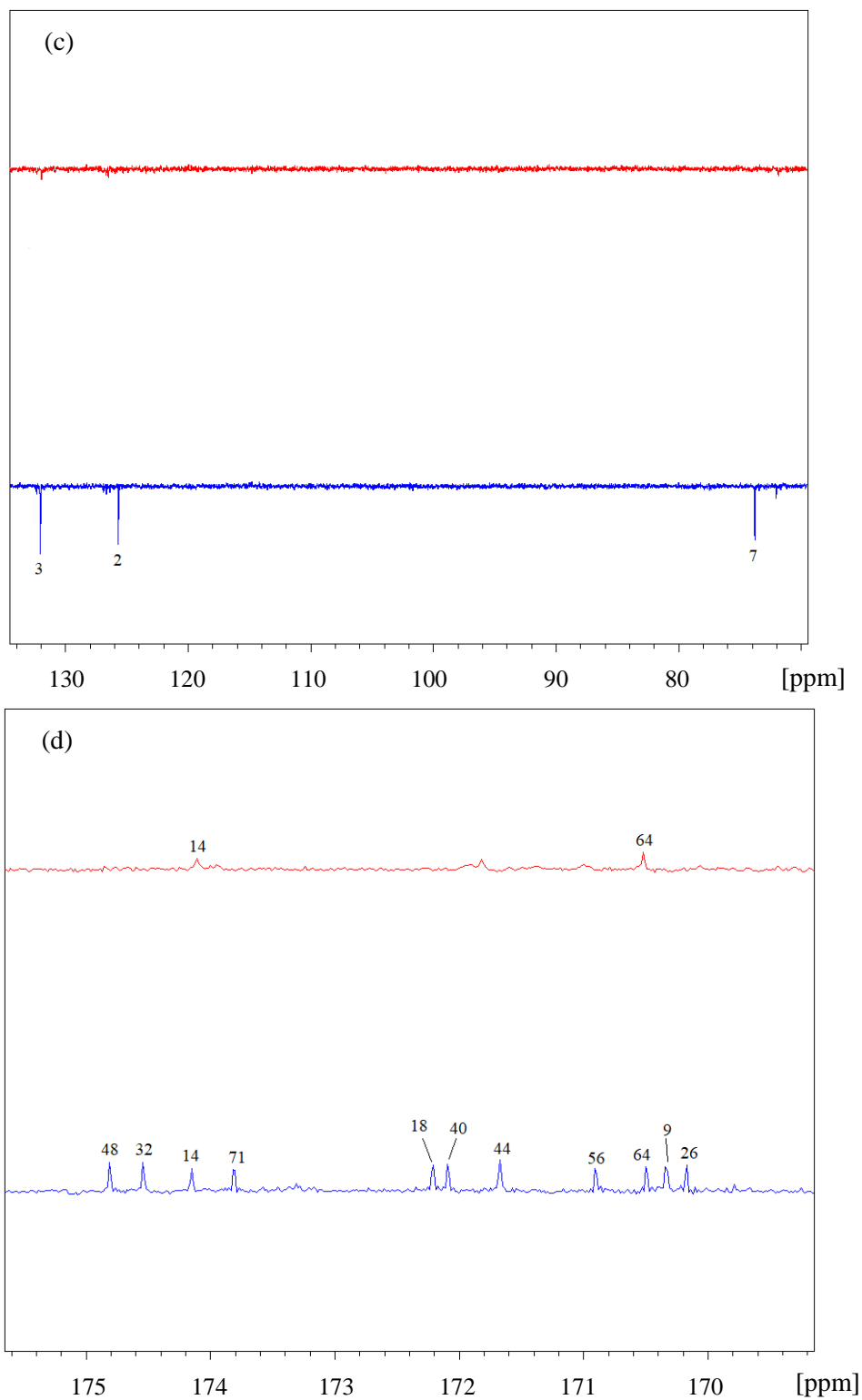
Slično protonskom spektru NMR, najistaknutija promjena kemijskih pomaka i intenziteta signala kod usporedbe spektara ^{13}C NMR primijećena je u uzorku koji je sadržavao 1 ekvivalent kalcijeva klorida (slika 37).



Slika 37. Spektar ^{13}C CsA u THF- d_8 bez CaCl_2 (plavo), te uz različite omjere CsA i CaCl_2 - 1 : 0,5 (crveno), 1 : 1 (zeleno) i 1 : 2 (ljubičasto)

Slika 38 predstavlja usporedbu područja spektra ^{13}C NMR čistog CsA (plavo) sa spektrom ^{13}C NMR u kojem je omjer CsA : CaCl_2 jednak 1 : 1 (crveno), oba u THF- d_8 , gdje su te promjene izazvane prisustvom metalnih iona najvidljivije.



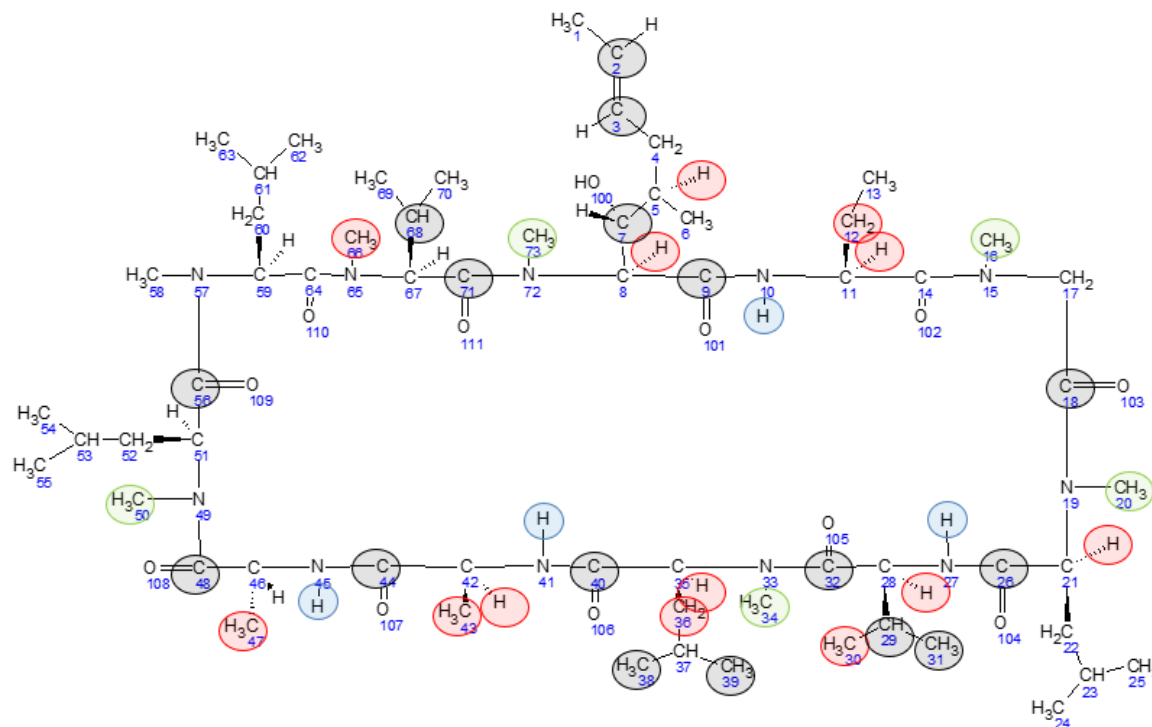


Slika 38. Usporedba područja s najistaknutijim promjenama (a,b,c i d) u spektrima ¹³C NMR uzorka CsA bez CaCl₂ (plavo), te s dodatkom CaCl₂ (crveno)

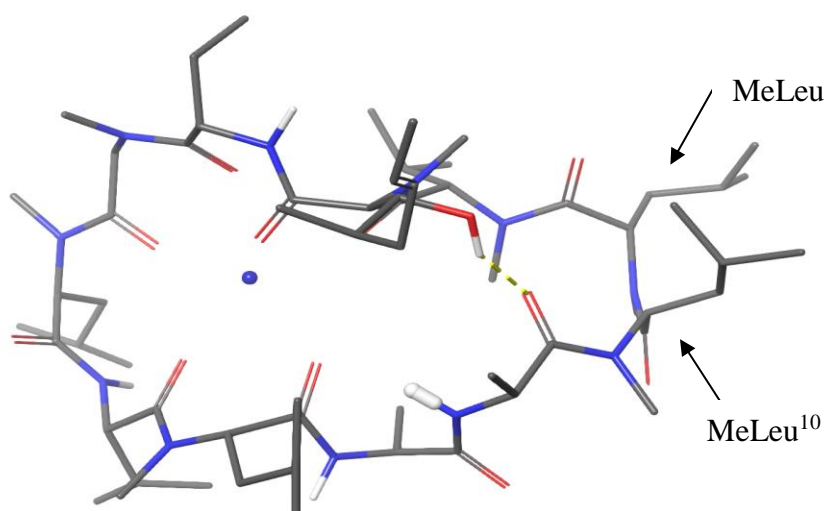
Najveća promjena u odnosu na spektar uzorka koji ne sadrži kalcijeve ione primijećena je na karbonilnom dijelu spektra. Većina signala je nestala: 26 C, 9 C, 56 C, 44 C, 40 C, 18 C, 71 C, 32 C i 48 C, dok se signalima 64 C i 14 C smanjio intezitet (slika 38 (d)). Također, signali koji pripadaju ugljicima 43 CH₃, 31 CH₃, 39 CH₃, 38 CH₃, 12 CH₂, 50 CH₂, 68 CH₂, 29 CH, 73 CH₃, 7 CH, 2 CH i 3 CH su nestali u prisustvu kalcija (slika 38 (a) i (b)). U literaturnom pregledu (str. 29) navedeno je kako vezanjem metalnih iona na makromolekule može doći do širenja signala u spektrima NMR u takvom razmjeru da ih više nije moguće detektirati. Takvu promjenu može izazvati smanjenje T_2 relaksacijskog vremena. U spektrima DEPTq ovaj učinak je još izraženiji budući se magnetizacija za vrijeme trajanja pulsnog slijeda prenosi s vodikove jezgre na ugljikovu jezgru u svrhu pojačanja osjetljivosti. Promjene su također zamijećene i na ostatku molekule: 1 CH₃, 47 CH₃, 6 CH₃, 69 CH₃, 30 CH₃, 70 CH₃, 25 CH₃, 55 CH₃, 62 CH₃, 54 CH₃, 63 CH₃, 58 CH₃, 66 CH₃, 20 CH₃ i 34 CH₃.

Promjene u jednodimenzijским spektrima ciklosporina A koje uzrokuje nastajanje kompleksa s kalcijevim ionima prikazane su sažeto na slici 39 gdje su označeni atomi koji su pokazali najveće promjene u 1D spektrima NMR u prisustvu iona kalcija. Iz slike 39 vidljivo je da kalcijev ion utječe na veliki broj atoma prema čemu se iz analize NMR može zaključiti da CsA radi kompleks s Ca²⁺ ionima što, vjerojatno izaziva promjenu konformacije makrocikličkog prstena u odnosu na slobodni CsA.

Iako konformacijska analiza CsA s kalcijem nije provedena koristeći spektroskopiju NMR, položaj kalcija pretpostavljen je na temelju struktura dobivenih konformacijskom analizom te molekulskom dinamikom (slika 40), a rezultat je provjeren usporedbom s područjima koja su pokazala najveću promjenu u jednodimenzijским NMR spektrima. Promjene vidljive u spektrima NMR odgovaraju utjecaju kidanja vodikovih veza ulaskom iona kalcija u makrociklički prsten. Ova opažanja odgovaraju prethodno provedenim eksperimenta na CsA u različitim otapalima i s različitim metalnim ionima.^{10,14,18,24,35}

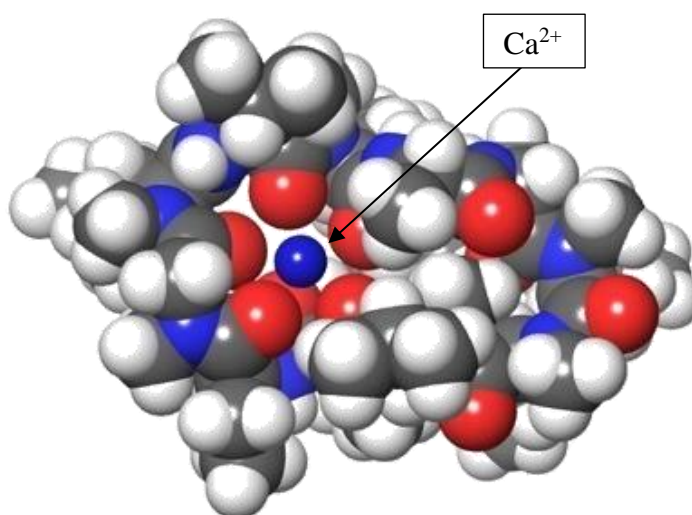


Slika 39. Numerirana struktura CsA s označenim atomima čiji su signali pokazali najveće promjene u spektrima NMR nakon dodatka iona kalcija; crveno su označene promjene kemijskog pomaka/intenziteta signala u spektru ^1H , zeleno su amidni metili koji su pokazali promjene u spektru ^1H , plavo i crno su atomi čiji su signali nestali u spektru ^1H i ^{13}C

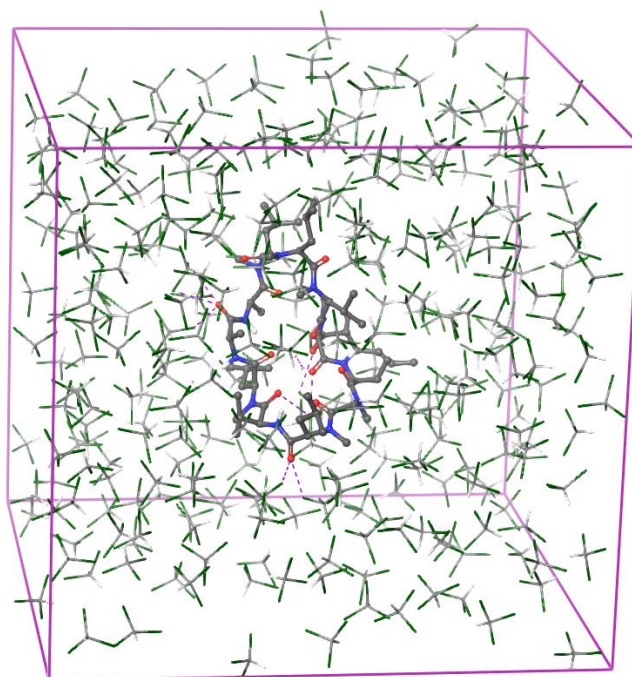


Slika 40. Konformacija CsA nakon dodatka iona kalcija

Uspoređujući rezultat dobiven pretragom konformacijskog prostora u odsustvu iona kalcija, te račun s ionima kalcija, zapaženo je da konfiguracija peptidne veze između MeLeu⁹ i MeLeu¹⁰ prelazi iz *cis* u *trans* te dolazi do pucanja svih transanularnih vodikovih veza kako bi se ion kalcija smjestio unutar makrocikla. Na slici 41 prikazana je koordinacija kalcijevog iona s kisikovim atomima iz karbonilnih skupina u molekuli ciklosporina A.



Slika 41. Prikaz koordinacije iona kalcija i kisika iz karbonilnih skupina u CsA. Stabilnost CsA-Ca²⁺ kompleksa utvrđena je dalje metodama molekuskog modeliranja. Simulacija molekulske dinamike kompleksa CsA-Ca²⁺ u CDCl₃ prikazana je na slici 42.

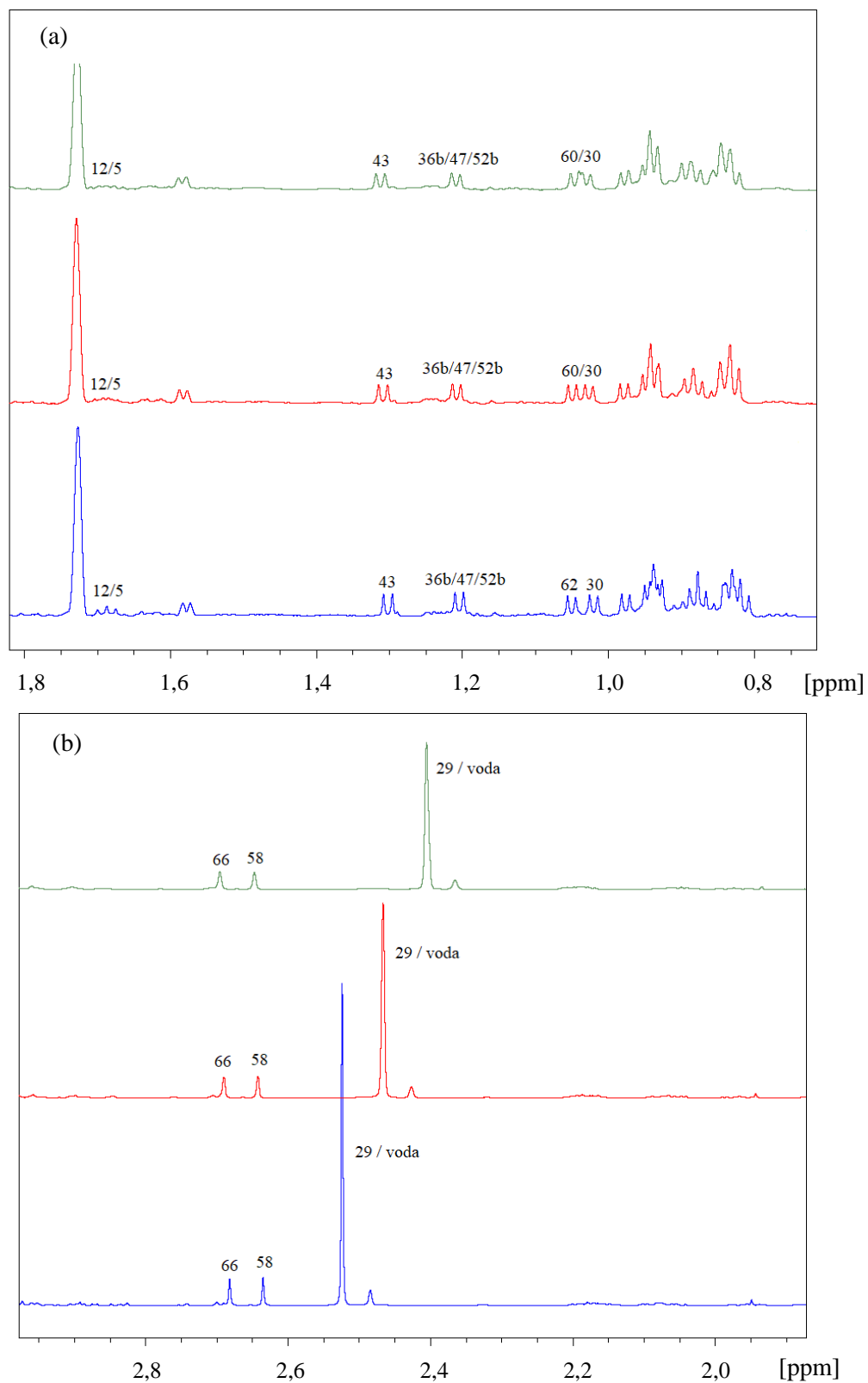


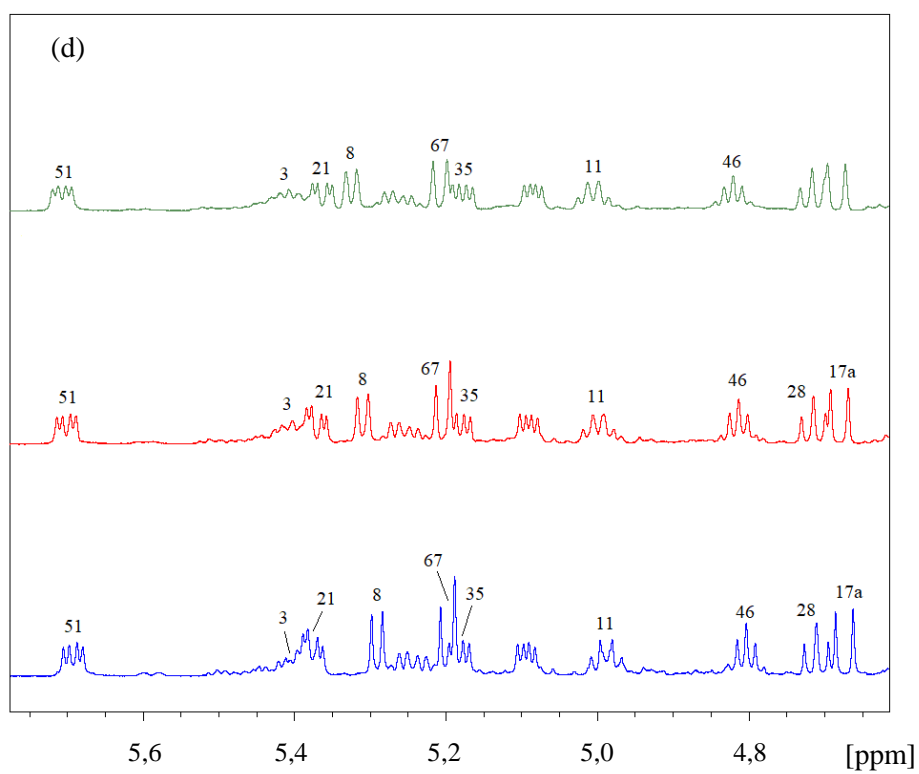
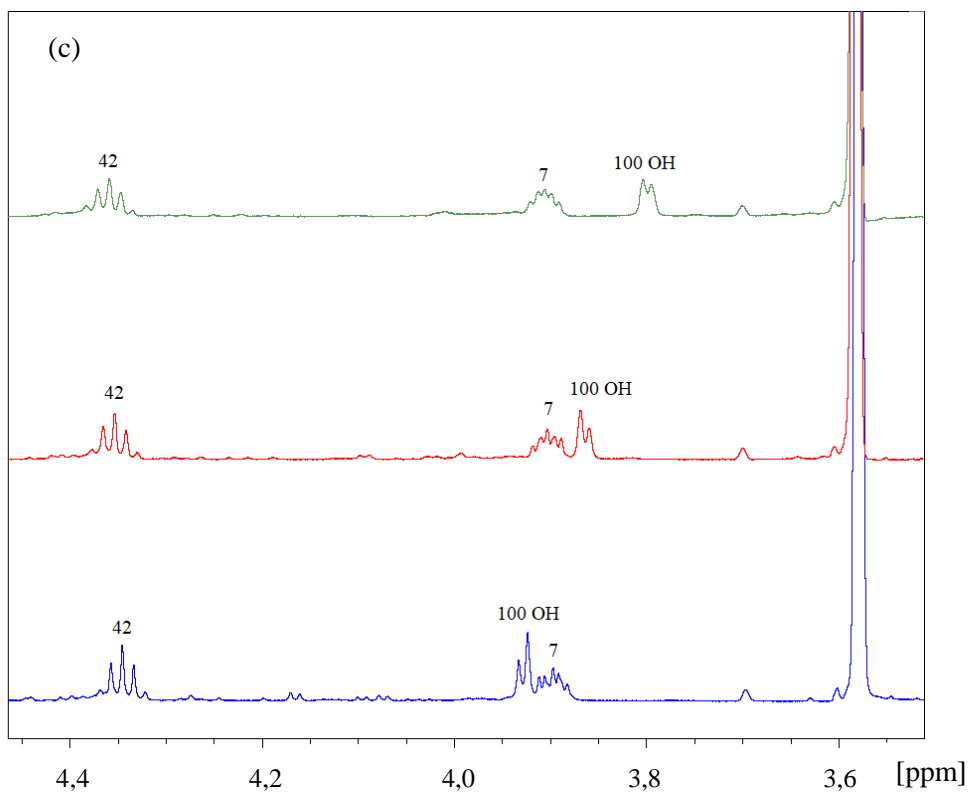
Slika 42. MD simulacija kompleksa CsA i Ca²⁺ u kloroformu

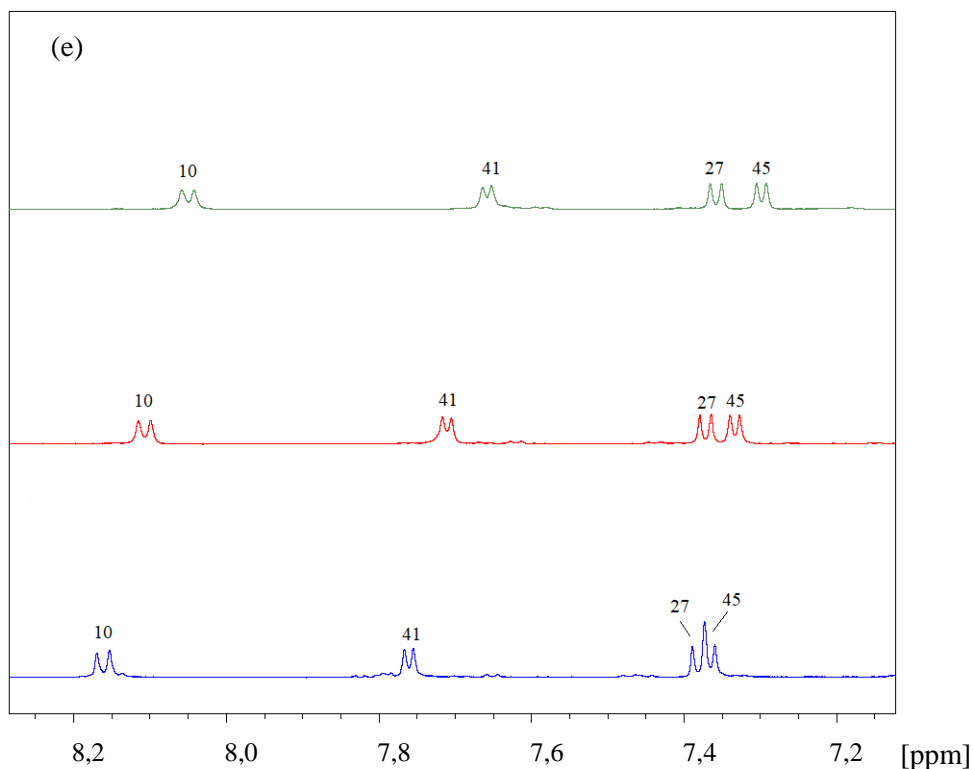
Rezultati dobiveni spektroskopijom NMR i metodama molekuskog modeliranja, potvrdili su stvaranje kompleksa CsA i kalcijevog iona te promjenu konformacije koju ulazak kalcijevih iona izaziva ulaskom u makrociklički prsten. Molekulskom dinamikom potvrđena je stabilnost CsA-Ca²⁺ kompleksa kroz vrijeme.

4.2.2. Utjecaj temperature

Prethodno pripremljen uzorak iz cjevčice 1 ciklosporina A (Eksperimentalni dio, str. 30) korišten je za temperaturne NMR eksperimente. Uzorak je sniman pri 25 °C, 35 °C i 45 °C. Snimljeni ¹H i DEPTq NMR spektri su analizirani kako bi se pronašle bilo kakve promjene kemijskih pomaka i/ili intenziteta signala u spektru prilikom povećanja temperature. Dijelovi ¹H i ¹³C spektara gdje su te promjene bile najizraženije prikazani su na slici 43.



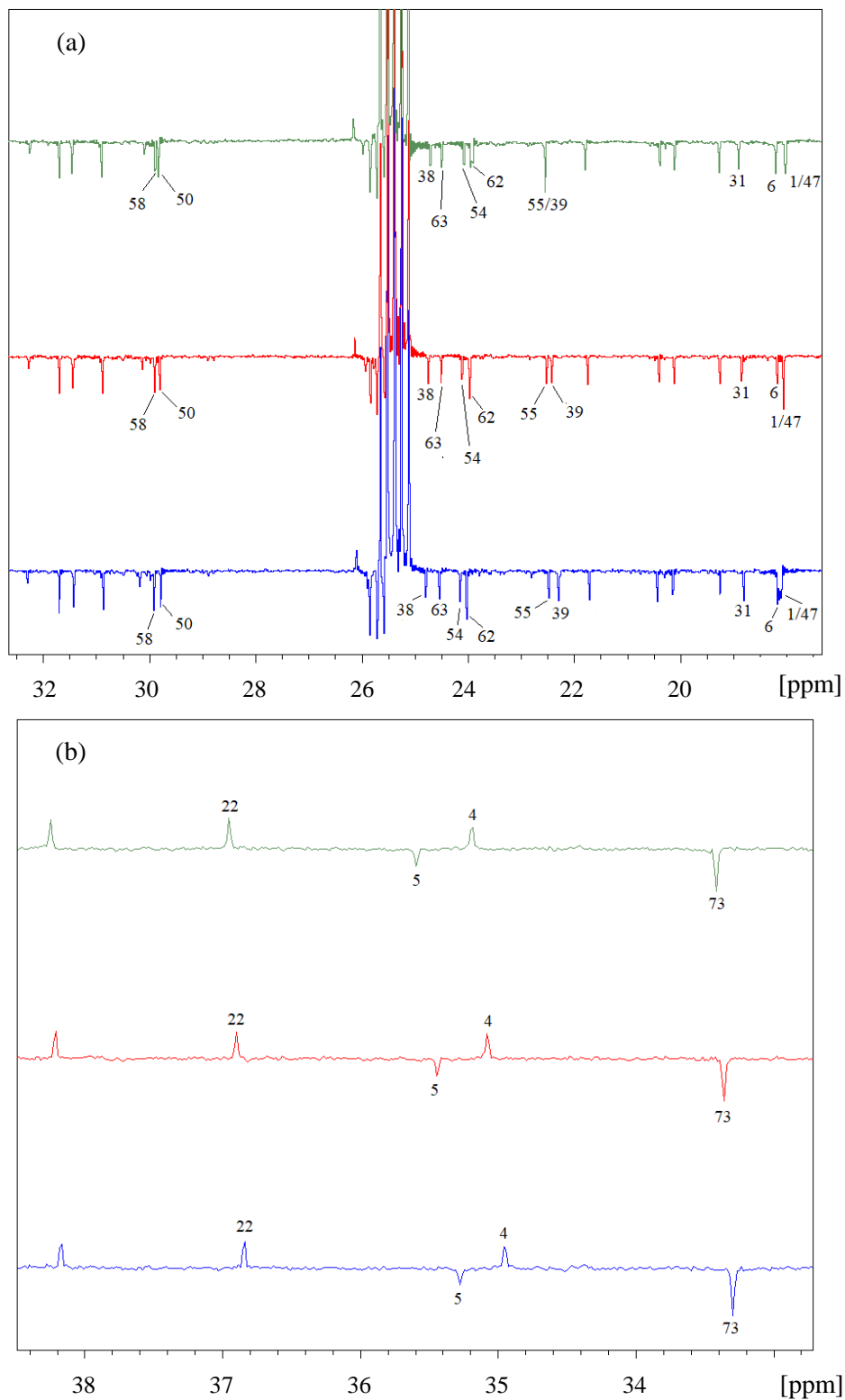


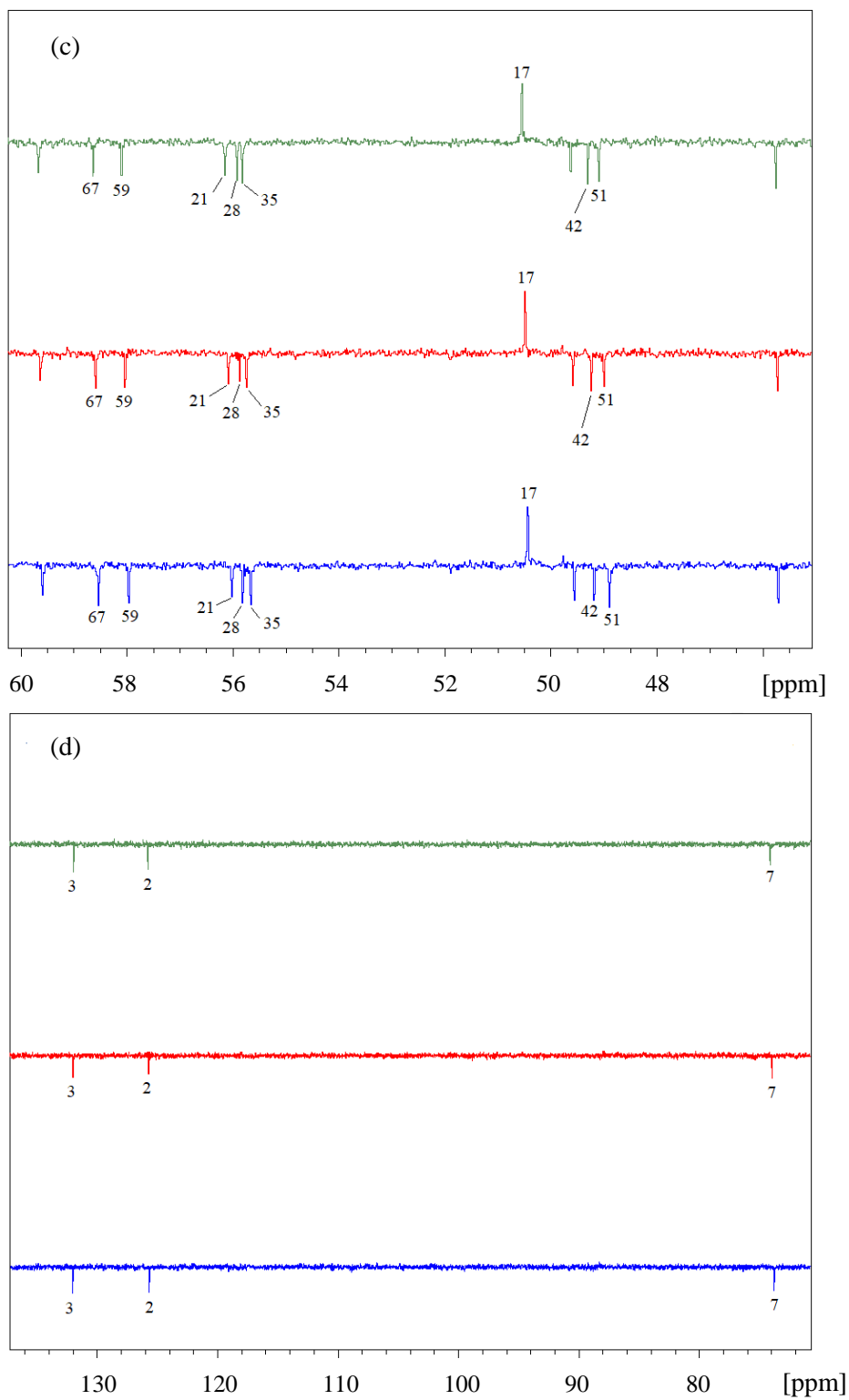


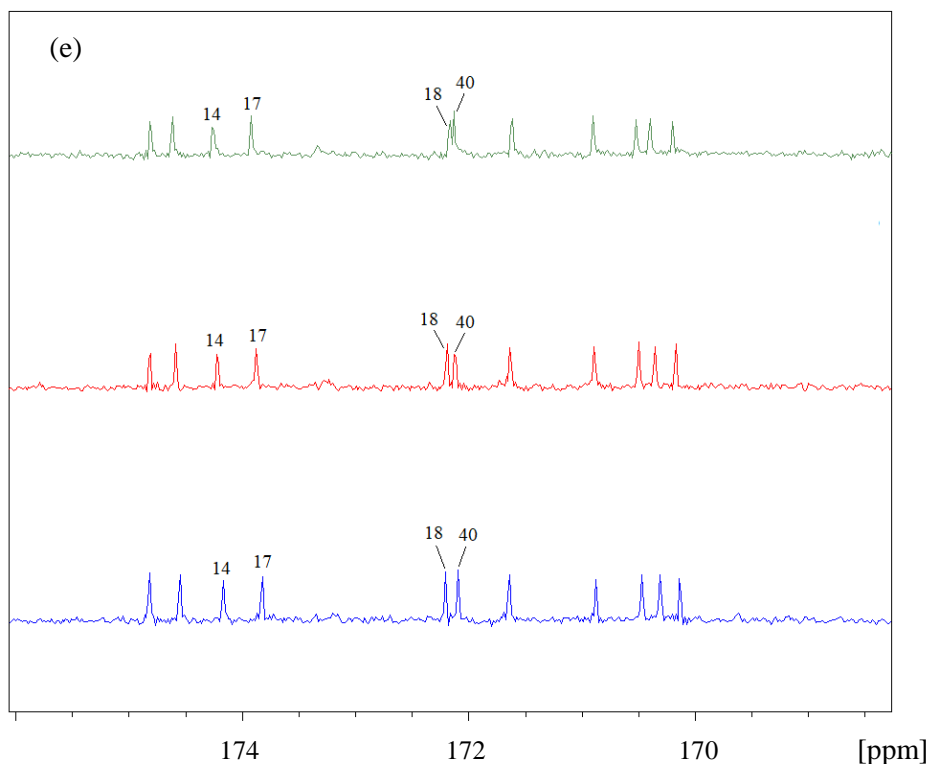
Slika 43. Područja spektara ^1H NMR CsA u THF- d_8 (a, b, c, d i e) pri 25 °C (plavo) 35 °C (crveno) i 45 °C (zeleno)

Usporedba protonskih spektara pri različitim temperaturama, pokazala je da su protoni u blizini amidnih grupa promijenili svoj kemijski pomak ili intenzitet signala: 12 H, 5 H, 29 H, 7 H, 35 H, 67 H. Signali protona hidroksilne skupine (100 OH), kao i signali protona i svih četiri NH skupina (10 NH, 41 NH, 27 NH i 45 NH) pokazali su značajan pomak prema nižim frekvencijama, slika 43 (e), čime je potvrđeno da povišenje temperature rezultira pucanjem intramolekulskih vodikovih veza u kojima sudjeluju amidni protoni CsA. Usporedba značajnih dijelova spektra ^{13}C NMR prikazana je na slici 43. Nakon povišenja temperature primijećen je značajan pomak prema manjim ppm vrijednostima za 43 CH_3 , 39 CH_3 , 5 CH, 42 CH, 35 CH, 21 CH i 7 CH. Protoni vezani na ove ugljikove atome imaju NOE interakciju sa NH skupinama (slika 33). Signali dva karbonilna atoma (71 CO i 14 CO) su također pokazali pomak prema nižim frekvencijama s povišenjem temperature. Ostale promjene u DEPTq spektru povišenjem temperature primijećene su na još nekoliko signala ugljika 4 CH_2 , 51 CH, 17 CH_2 , 59 CH i 2 CH. 73 NCH_3 je jedina *N*-metilirana skupina koja je imala promjenu u kemijskom pomaku

signala ugljikove jezgre pri većim temperaturama. Sve ove promjene u skladu su s pucanjem/slabljenjem transanularnih vodikovih veza s povećanjem temperature.



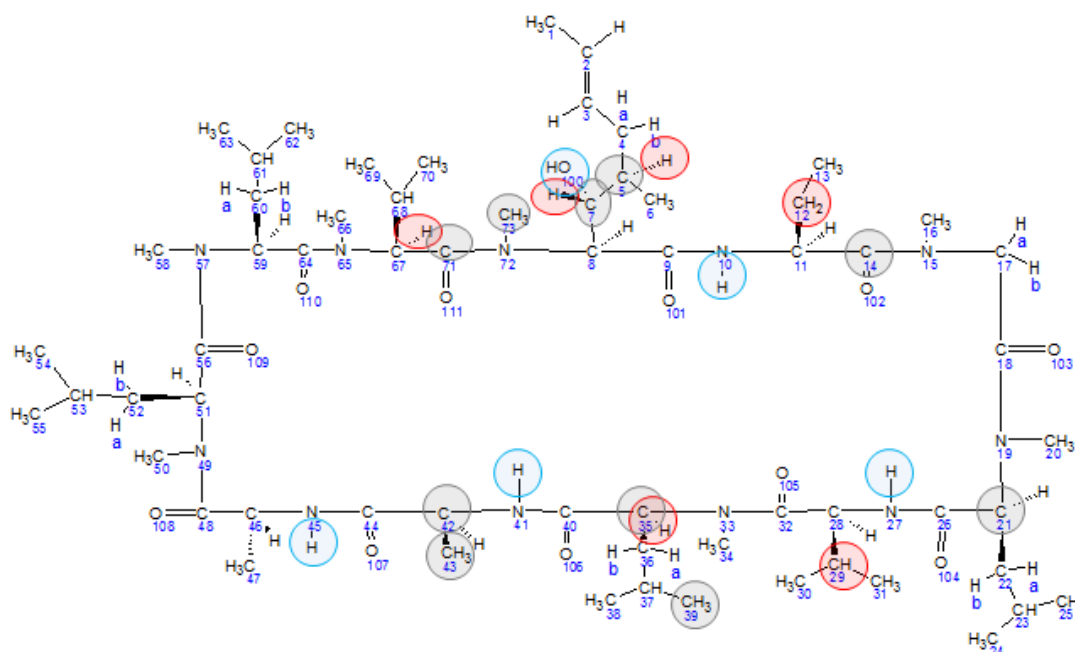




Slika 44. Područja spektara ^{13}C NMR CsA u THF-d_8 (a, b, c, d i e) pri 25 °C (plavo) 35 °C (crveno) i 45 °C (zeleno)

Nažalost, temperaturni efekt nije mogao biti ispitan na temperaturama višim od 45 °C zbog niske točke vrelišta THF-d_8 .

Sažetak analize promjena u jednodimenzijskim spektrima ciklosporina A koje je uzrokovala promjena temperature prikazan je na slici 45 s označenim atomima koji su pokazali najveće promjene u 1D spektrima NMR prilikom povišenja temperature.

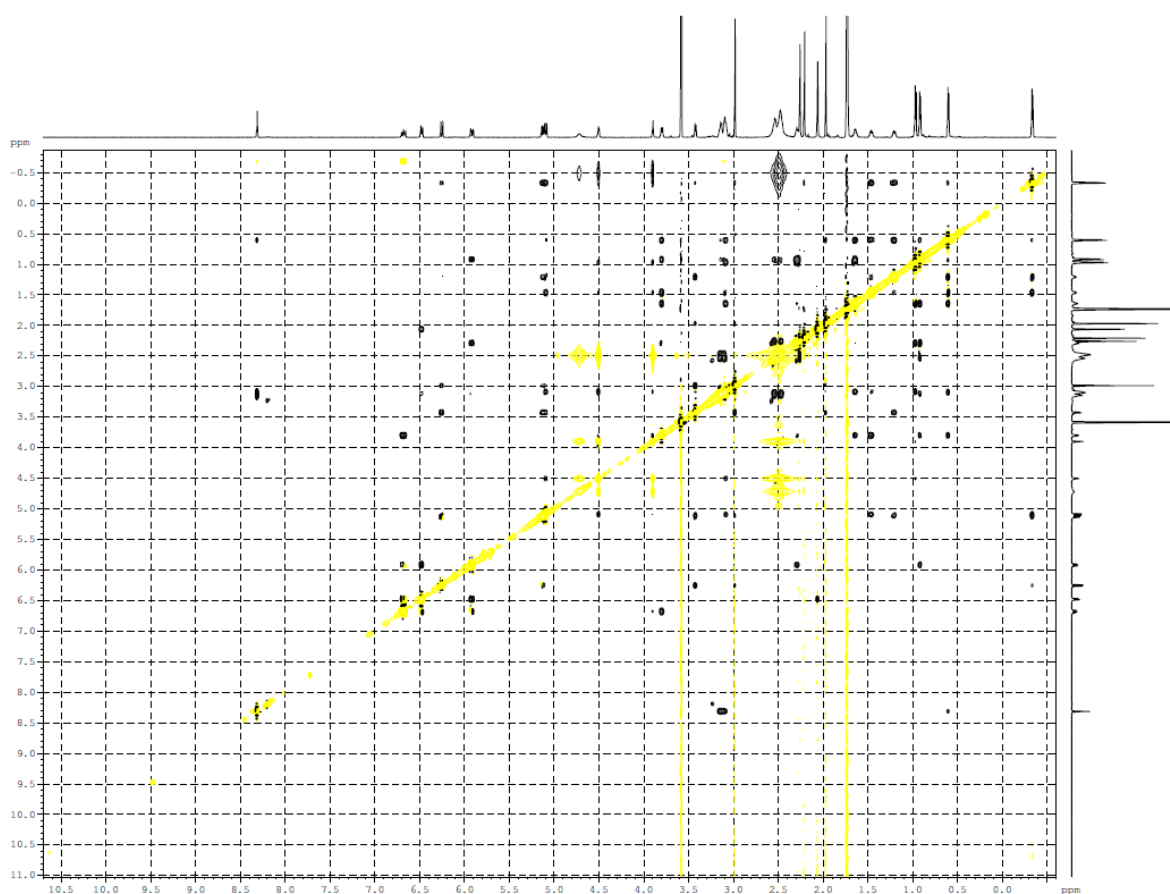


Slika 45. Numerirana struktura CsA s označenim atomima čiji su signali pokazali najveće promjene u spektrima NMR nakon povećanja temperature; crveno su označene promjene intenziteta signala u spektru ^1H , plavo promjene kemijskih pomaka u spektru ^1H i crno promjene kemijskih pomaka u spektru ^{13}C

Iz prikazanog se može zaključiti da povećanje temperature utječe na strukturu ciklosporina A. Primijećeno je da signali amidnih protona koji sudjeluju u vodikovim vezama s povišenjem temperature pokazuju pomak prema manjim frekvencijama što indicira promjenu, odnosno pucanje tih vodikovih veza.

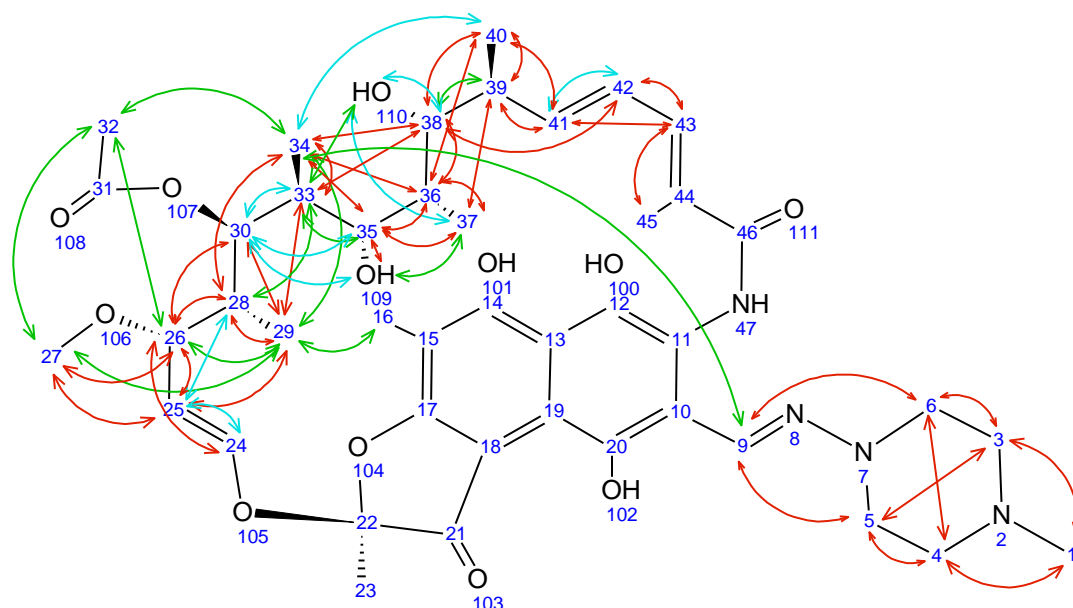
4.3. Konformacijska analiza rifampicina

Konformacija rifampicina pomoću spektroskopije NMR određena je očitavanjem konstanti sprežanja iz spektra ^1H NMR (tablica D3) i NOE interakcija (tablica D4) iz spektra NOESY. Svi spektri su, kao i kod ciklosporina A snimani u THF- d_8 . Spektar NOESY prikazan je na slici 46.



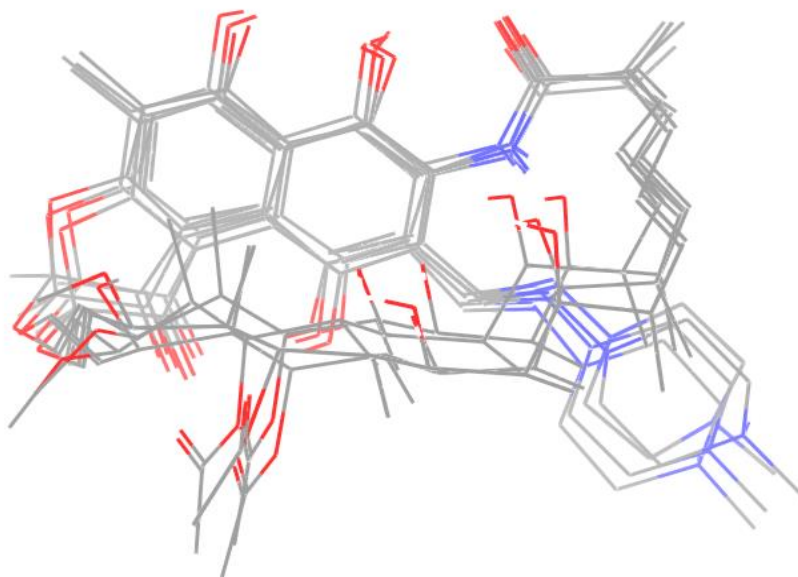
Slika 46. Spektar NOESY Rfmp u THF-d₈ pri 25 °C

U odnosu na spektar ^1H NMR CsA u THF-d₈, protonski spektar NMR rifampicina pokazao je puno manje preklopljenih signala, što je olakšalo očitavanje konstanti sprezanja. Posljedično, spektar NOESY rifampicina je imao manje interakcija koje su se mogle pripisati različitim protonskim parovima, pa je analiza bila jednostavnija. Ključne NOE interakcije za određivanje konformacije rifampicina prikazane su na slici 47.



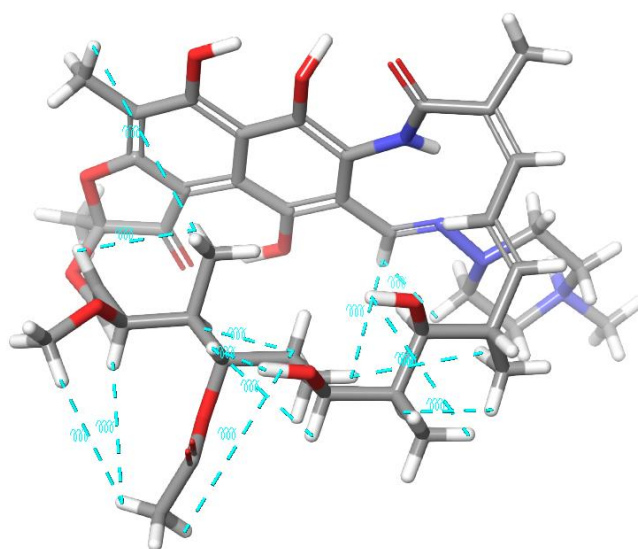
Slika 47. Struktura Rfmp s ključnim NOE interakcijama; jake interakcije (crveno), srednje jake (plavo) te slabe (zeleno)

Najviše NOE kontakata pronađeno je na području molekule između atoma 24-44 koji je fleksibilniji od ostatka molekule. S obzirom da naftalenski prsten sadrži uglavnom kvaterne ugljikove atome, NOE interakcije nisu pronađene u tom području. Podatci dobiveni analizom spektara NMR korišteni su dalje kao uvjeti za pretragu konformacijskog prostora metodama molekuskog modeliranja. U svrhu korištenja dostupnih kristalnih struktura rifampicina kao početne točke za konformacijsku analizu, pretražene su PDB i CSD baze. Na slici 48 prikazane su preklapljene dostupne kristalne strukture rifampicina iz CSD baze gdje se jasno primjećuje sličnost konformacije u svim unosima.



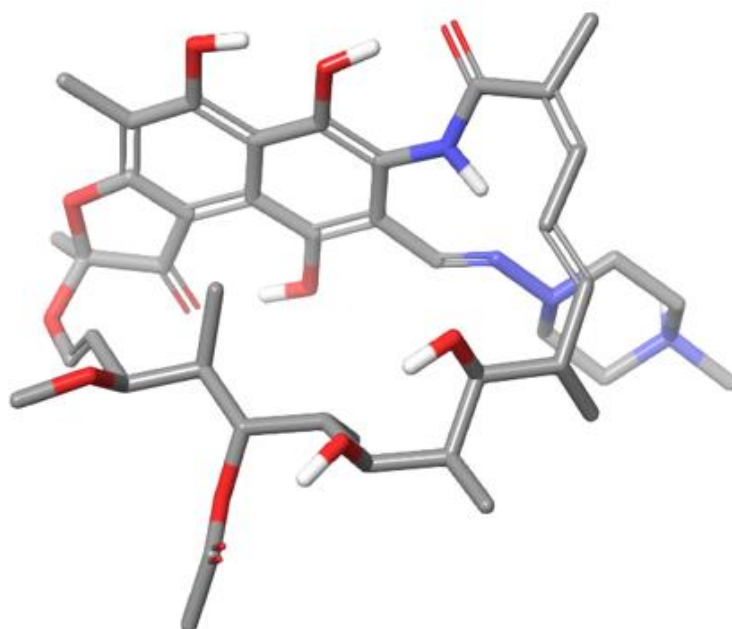
Slika 48. Preklopljene strukture slobodnog Rfmp pronađene u CSD bazi

Osim kristalnih struktura slobodnog spoja, proučavane su i strukture rifampicina u bioaktivnom obliku. Pronađeno je nekoliko konformacija rifampicina u kompleksu sa RNA polimerazom, 5UH6, 5UAC, 5UAG, 5UAH, 5UAJ, 5UAL, 5UAQ, te dvije (5KOX, 6BRD) strukture sa monooksigenazom u kojima dolazi do konformacijskih promjena izazvanih oksidacijskim procesima. Na kraju je kao početna točka za daljnju analizu odabrana kristalna struktura slobodnog rifampicina iz CSD baze pod šifrom 7217071. Završna konformacija rifampicina dobivena je pretragom konformacijskog prostora nakon uvođenja matrice ograničenja dobivenim iz eksperimenata NMR (slika 49), jednakim postupkom kao i u slučaju CsA.



Slika 49. Struktura Rfmp uz označena NOE ograničenja (plave isprekidane linije) korištena u pretrazi konformacijskog prostora

Nakon minimizacije, dobivena je struktura koja najbolje odgovara NMR podacima dobivenim u THF- d_8 , a prikazana je na slici 50.

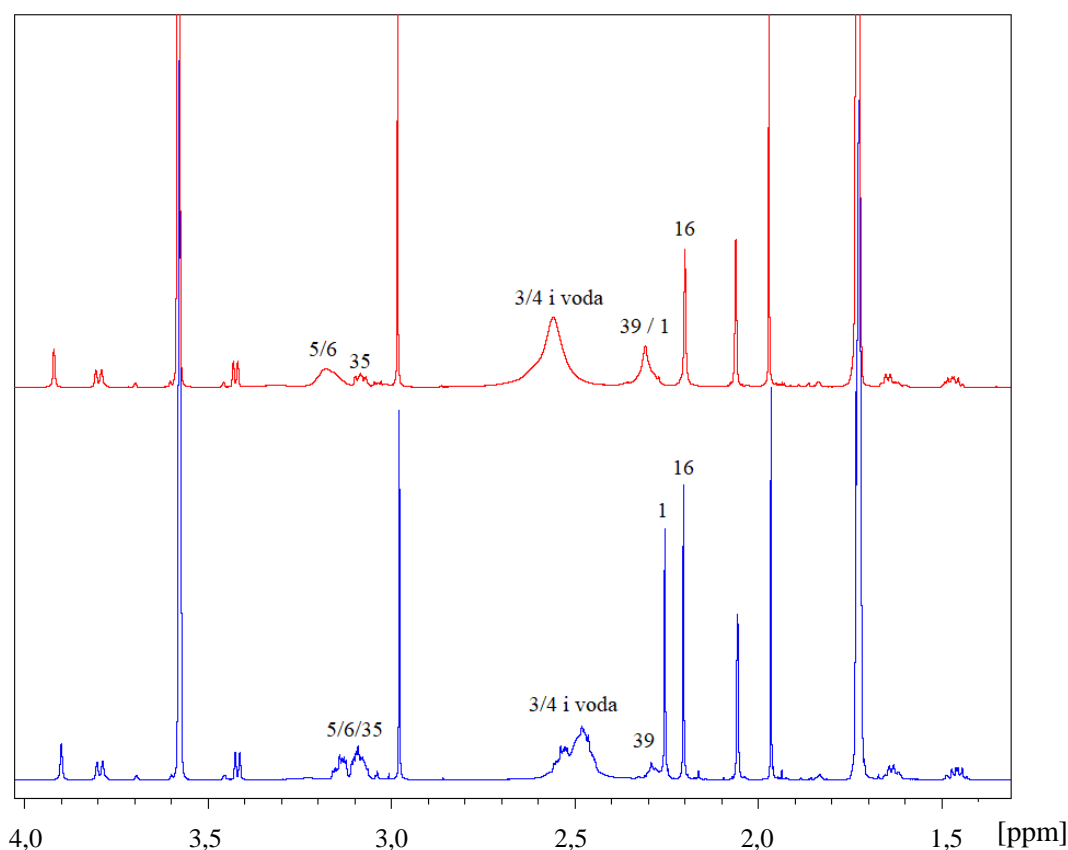


Slika 50. Konformacija Rfmp dobivena molekulskim modeliranjem

Dobivena konformacija vrlo je slična strukturama ranije analiziranim rendgenskom kristalografijom.

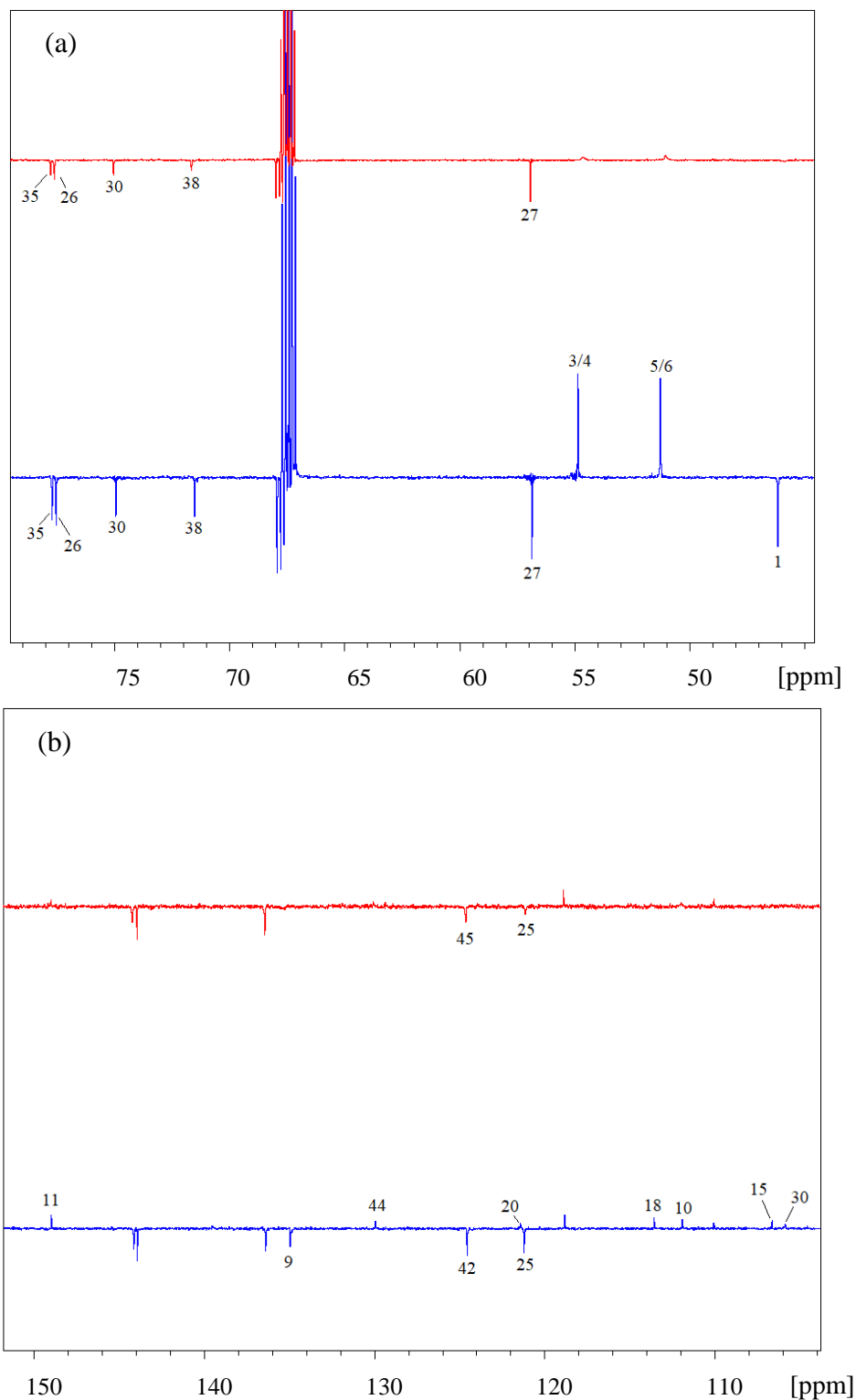
4.3.1. Stvaranje kompleksa s ionima kalcija

Uzorci rifampicina za određivanje utjecaja metalnih iona na konformaciju istog, pripremljeni su prema tablici 4. Kako se prethodno pokazalo na uzorku ciklosporina A da molarni omjer 1 : 1 = CsA : CaCl₂ pokazuje najbolje rezultate, isti omjer uzet je i za analizu rifampicina. Snimljeni su i uspoređivani spektri ¹H i DEPTq NMR kako bi se analizirale promjene kemijskog pomaka i/ili intenziteta signala u prisustvu kalcijevih iona. Slika 51 prikazuje dio spektra ¹H NMR gdje je nakon dodatka kalcijevih iona vidljiva najveća razlika signala. Kao što je vidljivo iz usporedne slike, prisustvo kalcijeva klorida najviše utječe na kemijski pomak i intenzitet signala protona iz piperazinskog dijela molekule, 1 H, 3 H, 4 H, 5 H, 6 H.



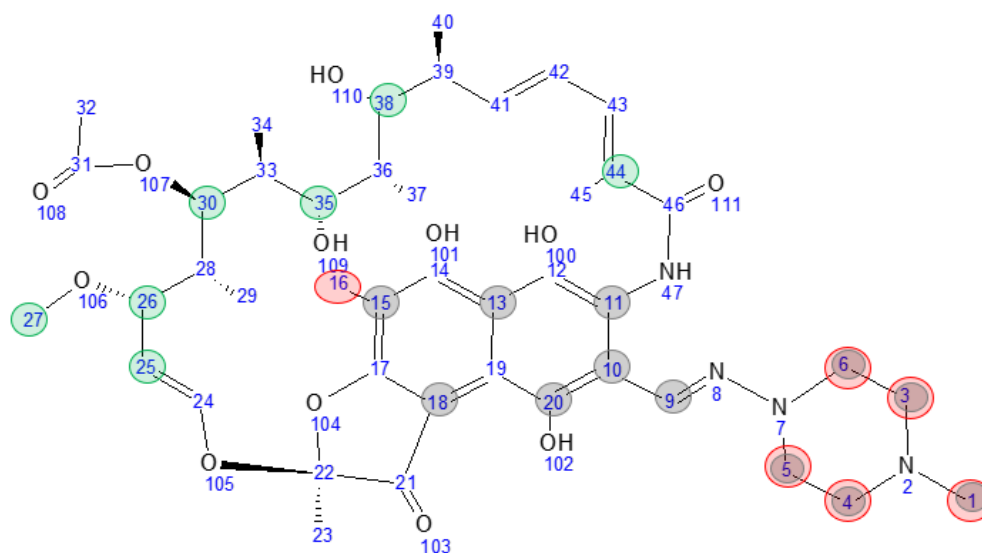
Slika 51. Područje s najistaknutijim promjenama u spektru ¹H NMR uzorka Rfmp bez CaCl₂ (plavo), te s dodatkom CaCl₂ (crveno)

Nakon protonskog spektra, analiziran je i spektar ^{13}C NMR rifampicina sa i bez kalcijevog klorida. Usporedba dijelova spektra gdje su vidljive najveće promjene prikazana je na slici 52. Iz spektra je vidljivo da su svi signali koji pripadaju piperazinskom dijelu (slika 52 b) nestali u prisustvu kalcija: 3 CH_2 , 4 C H_2 , 5 CH_2 , 6 CH_2 i 1 CH_3 . S obzirom da su promjene na piperazinskom prstenu primijećene u oba snimljena spektra NMR (^1H i DEPTq), zaključeno je da kalcijev ion ima jaku interakciju s tim dijelom molekule, što je kasnije proučavano i molekulskim modeliranjem. Osim na piperazinski dio molekule, kalcij je imao utjecaj i na promjenu intenziteta signala u aromatskom području spektra (slika 52 b) od 25 CH do 38 CH. Što se tiče ostatka molekule, neki signali iz naftalenskog prstena koji pripadaju kvaternim ugljikovim atomima (44 C i 9 C) su također nestali iz spektra. Još jednom se može potvrditi da je prisustvo kalcijeva iona uzrokovalo širenje signala do te razine da se više ne mogu detektirati i odrediti njihov kemijski pomak. Smanjenje intenziteta signala bilo je primijećeno i kod 42 CH.



Slika 52. Usporedba područja s najistaknutijim promjenama (a i b) u spektrima ^{13}C NMR uzorka Rfmp bez CaCl_2 (plavo), te s dodatkom CaCl_2 (crveno)

Na slici 53 prikazana je numerirana struktura rifampicina i zaokruženi su atomi čiji su signali pokazali najveće promjene u prisustvu kalcijevih iona.

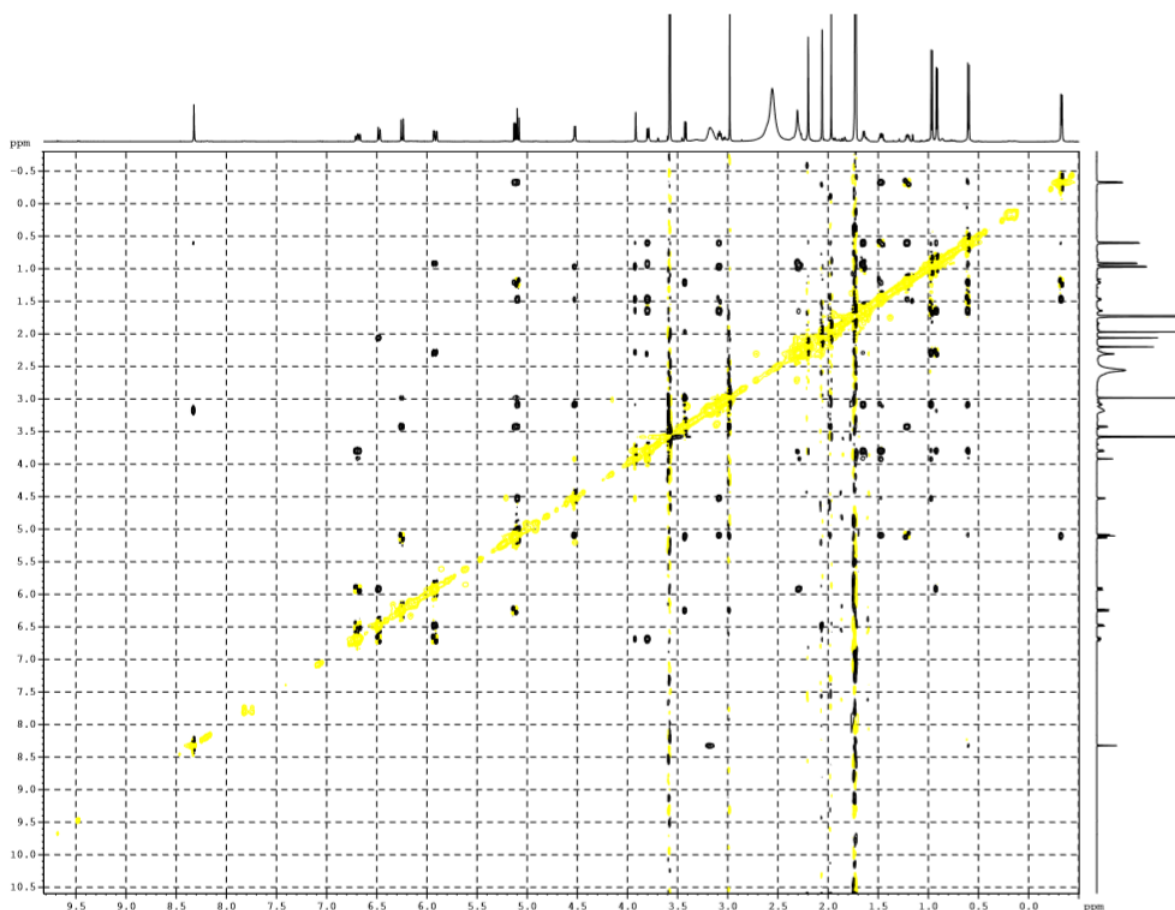


Slika 53. Numerirana struktura Rfmp s označenim atomima koji su pokazali najveće promjene u spektrima NMR u prisustvu iona kalcija; crveno su označene promjene kemijskog pomaka/intenziteta signala u spektru ^1H , zeleno najveće promjene intenziteta signala u spektru ^{13}C i crno atomi čiji su signali nestali u spektru ^{13}C

Budući da je analizom jednodimenzijskih spektara NMR pokazano da kalcijevi ioni stvaraju komplekse s rifampicinom, sljedeći korak bilo je traženje odgovora na pitanje da li ulazak kalcijevih iona u makrociklički prsten izaziva promjenu konformacije cijele molekule ili ne. Konformacijska analiza napravljena je na uzorku s dodatkom CaCl_2 u omjeru 1 : 1 = Rfmp : CaCl_2 , koristeći iste uvjete kao prethodno provedena konformacijska analiza uzorka čistog Rfmp u THF-d_8 . Rezultirajući ^1H , ^{13}C kemijski pomaci i konstante sprežanja nalaze se u dodatcima (slika D13 – D16).

Iako su snimljena oba spektra NOESY i ROESY NMR, vrijednost NOE signala u spektru NOESY bila je vrlo mala ili jednaka nuli (Literaturni pregled, str. 17) pa je za konformacijsku analizu korišten spektar ROESY koji je prikazan na slici 54. Uspoređivanjem NOE interakcija rifampicina bez (tablica D4) i s kalcijevim ionima (tablica D8), te konstanti sprežanja bez

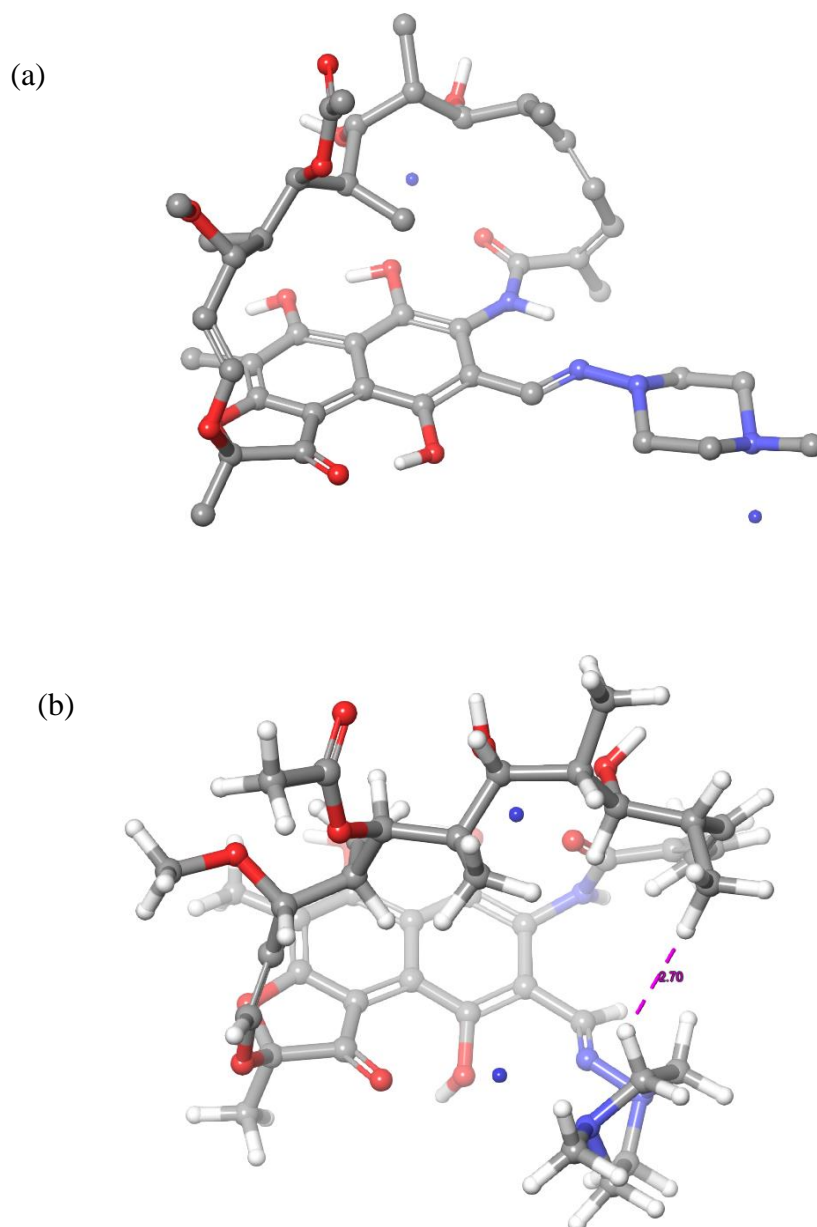
(tablica D3) i s dodatkom kalcija (tablica D7), nisu pronađene značajnije razlike što je sugeriralo kako nije došlo do značajne konformacijske promjene molekule.



Slika 54. Spektar ROESY Rfmp uz dodatak iona kalcija u THF-d₈ pri 25 °C

Međutim, zbog širenja signala piperazinskih protona (mjesto gdje su se očitovale najveće promjene u spektrima ^1H i ^{13}C NMR nakon dodatka Ca^{2+}) nije bilo moguće očitati, pa ni usporediti konstante sprezanja, a zbog širine linija iz spektra ROESY izostale su i NOE interakcije. Osim toga, cijela regija koja uključuje naftalenski prsten nije vidljiva niti u protonskom, niti u spektru ROESY zbog nedostatka protona. Stoga, iako makrociklički prsten nije doživio značajniju promjenu, mogućnost promjene konformacije cijele molekule Rfmp nije u potpunosti isključena.

Metodama molekuskog modeliranja istraženo je na koji točno način kalcijevi ioni utječu na strukturu rifampicina. Metodama molekulske mehanike i dinamike pokazano je kako postoje dvije moguće strukture kompleksa Rfmp-Ca²⁺ u kojima sudjeluju dva iona kalcija (slika 55), a razlika je u konformaciji piperazinskog prstena.



Slika 55. Prikaz mogućih konformacija Rfmp nakon dodatka iona kalcija

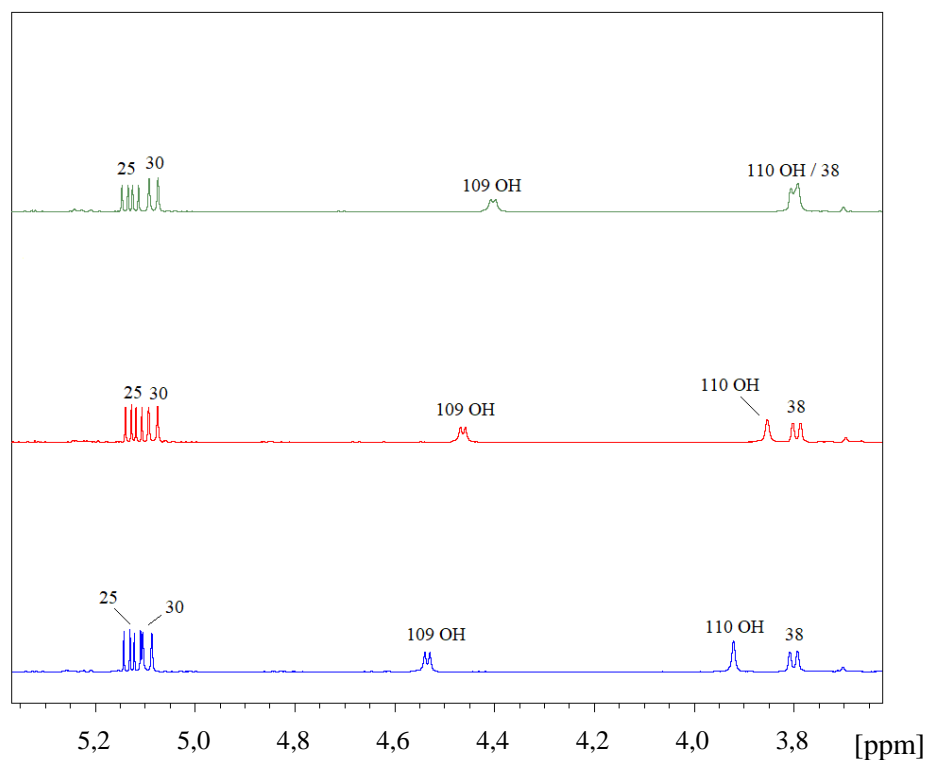
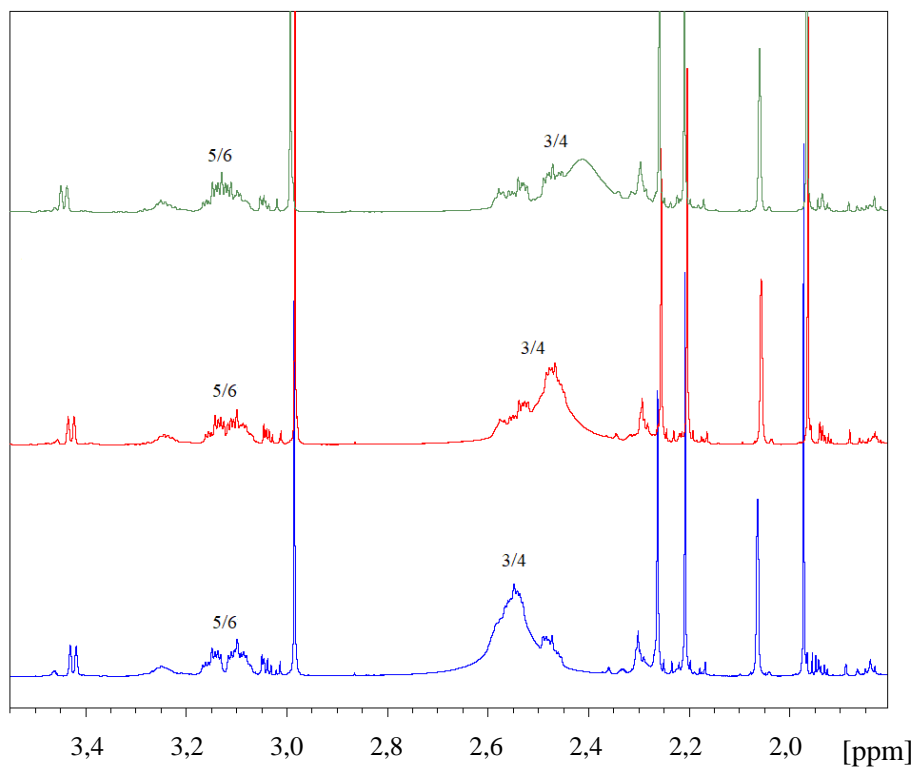
Struktura na slici 55 (a) prikazuje koordinaciju iona kalcija na rifampicinu bez većih konformacijskih promjena. Jedan Ca^{2+} ion koordiniran je na vrhu prstena pri čemu su polarni atomi orijentirani prema otapalu. Drugi Ca^{2+} koordiniran je prema terminalnom dušikovom atomu (2 N). Struktura na slici 55 (b) indicira veće konformacijske promjene rifampicina. Amidna veza je u ovom slučaju rotirana za 90° kako bi se stvorio prostor za ulazak Ca^{2+} iona u sredinu prstena. Drugi Ca^{2+} koordiniran je s dva dušikova atoma (2 N i 8 N) i OH skupinom (102 OH).

Budući da analizom spektara NMR nisu pronađeni dokazi da je došlo do promjene konformacije makrocikličkog prstena u kompleksu s ionima kalcija, od dvije dobivene konformacije molekulskim modeliranjem, struktura prikazana na slici 55 (a) je više vjerojatna. U slučaju CsA pokazalo se kako ulazak iona kalcija uzrokuje pucanje intramolekulskih vodikovih veza, a samim time i promjenu njegove konformacije (Rezultati i rasprava, str. 50). Kod Rfmp nije pronađen isti efekt bez obzira što se i u njegovoj strukturi nalazi šest intramolekulskih vodikovih veza (Literaturni pregled, str. 27). Razlika je u tome što Rfmp nema translanularne vodikove veze (unutar makrocikličkog prstena) u kojima sudjeluju protoni iz amidnih veza. Rezultati ukazuju da će pucanje transanularnih intramolekulskih vodikovih veza u makrociklu uzrokovati veće konformacijske promjene.

4.3.2. Utjecaj temperature

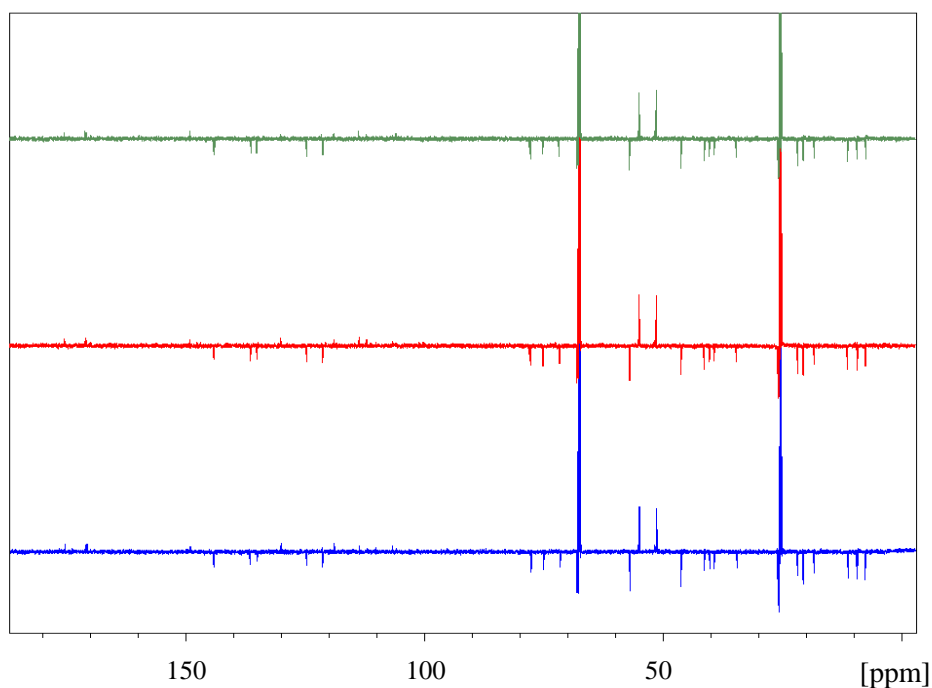
Za analizu promjena kemijskog pomaka i/ili intenziteta signala prilikom povećanja temperature snimljeni su spektri ^1H i DEPTq NMR pri različitim temperaturama (25°C , 35°C i 45°C) te su uspoređivane promjene.

Usporedba dijelova spektra ^1H NMR gdje su primijećene najveće promjene pri različitim temperaturama prikazana je na slici 56. Pronađeno je da povećanjem temperature dolazi do pomaka signala za protone 3 H i 4 H (koji se nalaze ispod signala vode) te 5 H i 6 H. Sličan efekt imao je i dodatak kalcija. Kao što je očekivano,⁴⁶ došlo je do kemijskog pomaka hidroksilnih protona prema višim frekvencijama. Osim njih, različit kemijski pomak primijećen je i za 25 H.



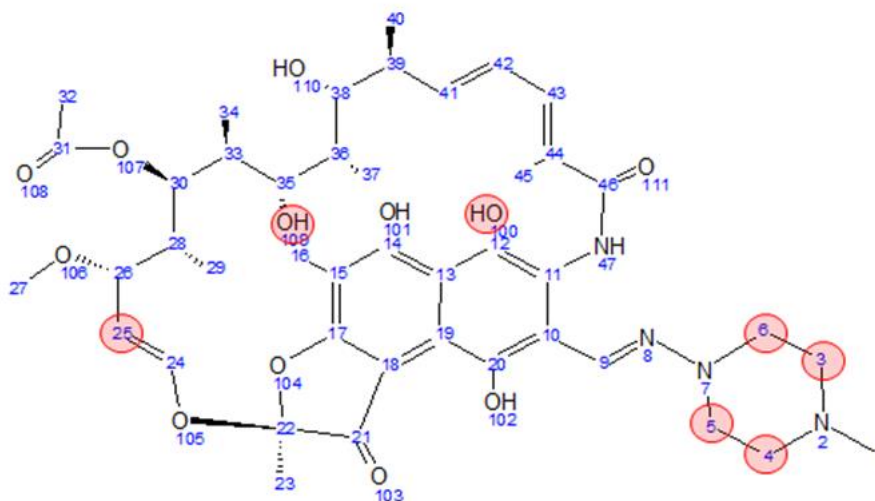
Slika 56. Područja spektra ^1H NMR Rfmp u THF-d_8 pri 25 °C (plavo) 35 °C (crveno) i 45 °C (zeleno)

U spektru DEPTq NMR povećanje temperature nije uzrokovalo nikakve veće promjene kao što je vidljivo na slici 57 koja prikazuje usporedbu spektara pri različitim temperaturama.



Slika 57. Spektar ^{13}C NMR za Rfmp u THF- d_8 pri 25 °C (plavo) 35 °C (crveno) i 45 °C (zeleno)

Dobiveni rezultati pokazali su da promjena temperature nema značajan utjecaj na konformaciju rifampicina (slika 58). Doduše, zbog točke vrelišta tetrahidrofurana maksimalna testirana temperatura je bila samo 45 °C, tako da nije isključeno da do promjene konformacije dolazi pri višim temperaturama.

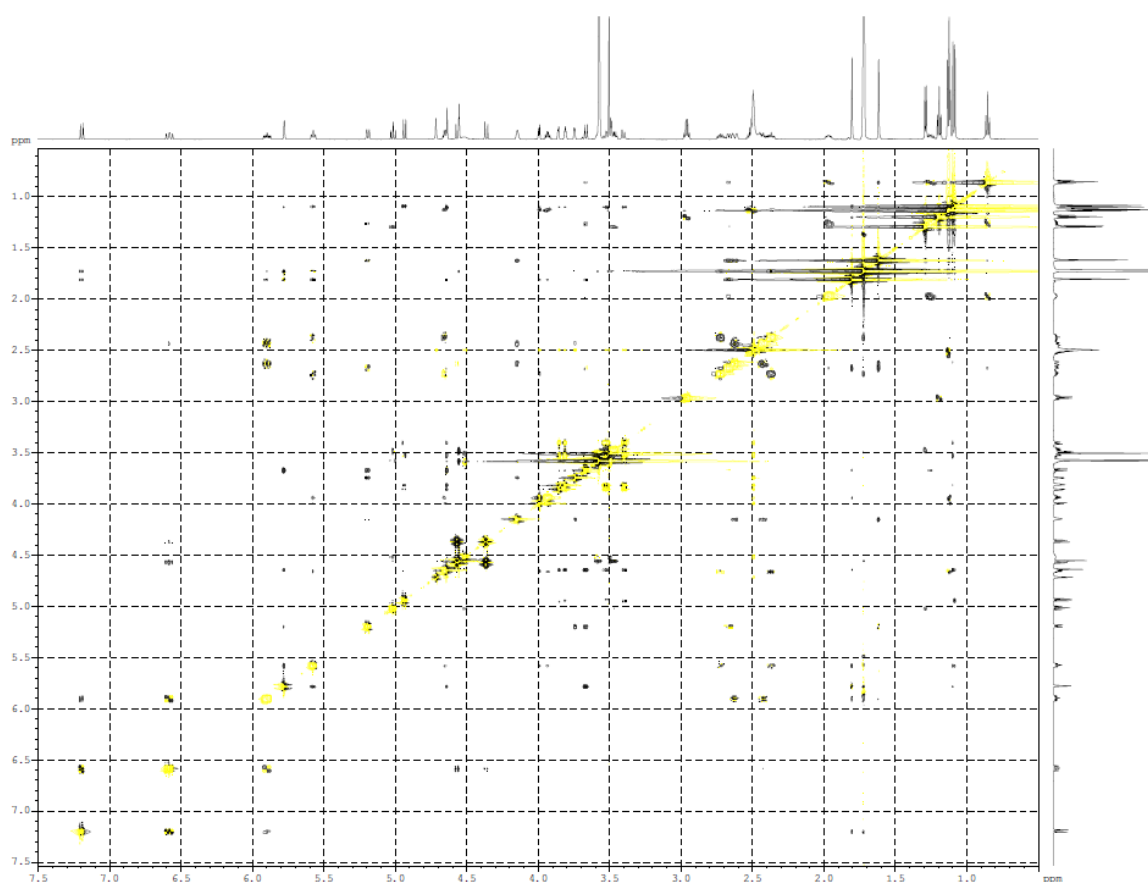


Slika 58. Numerirana struktura Rfmp s označenim atomima čiji su signali pokazali najveće promjene u spektrima NMR nakon povećanja temperature; crveno su označene vidljive promjene kemijskih pomaka u spektru ^1H

4.4. Konformacijska analiza fidaksomicina

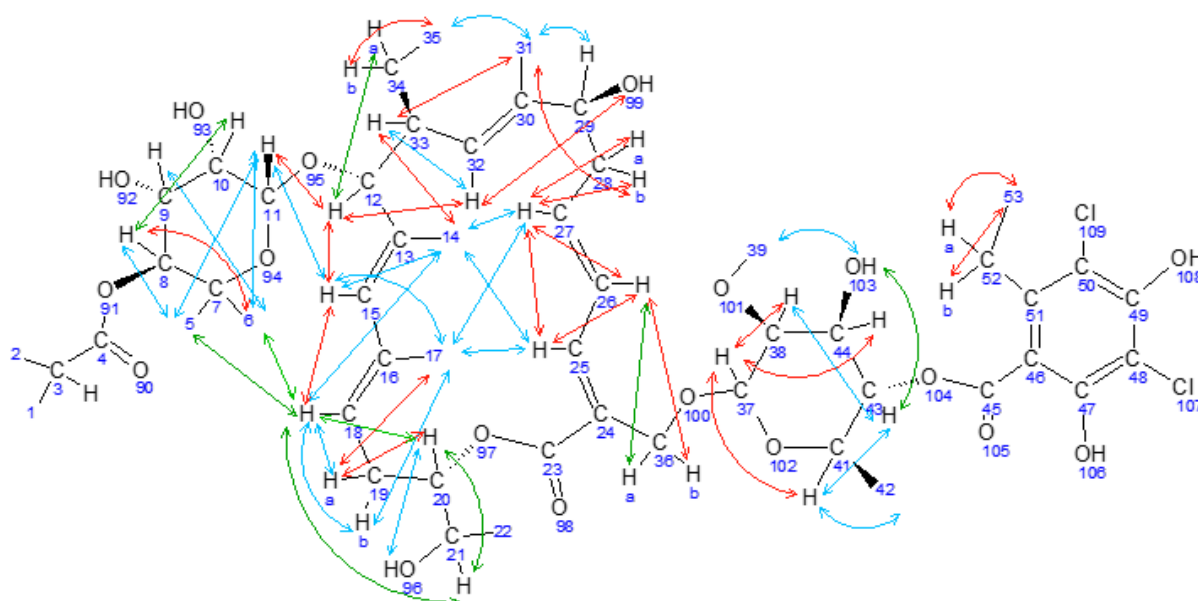
S obzirom na nedostatak literaturnih izvora o strukturi i konformaciji fidaksomicina provedena je iscrpna konformacijska analiza spektroskopijom NMR, a zatim su svi izvedeni eksperimentalni podaci korišteni kao matrica ograničenja za račun molekulske mehanike.

Konformacijska analiza fidaksomicina u THF- d_8 provedena je uz pomoć podataka dobivenih iz spektra ^1H NMR (konstante sprežanja, tablica D5) i spektra ROESY (NOE interakcije, tablica D6). Korišteni spektar ROESY NMR prikazan je na slici 59. Iako je snimljen i spektar NOESY, kao i u slučaju kompleksa rifampicina s kalcijem, vrijednost NOE signala u spektru bila je vrlo mala ili jednaka nuli (Literaturni pregled, str. 17). Ključne NOE interakcije prikazane su na slici 60.

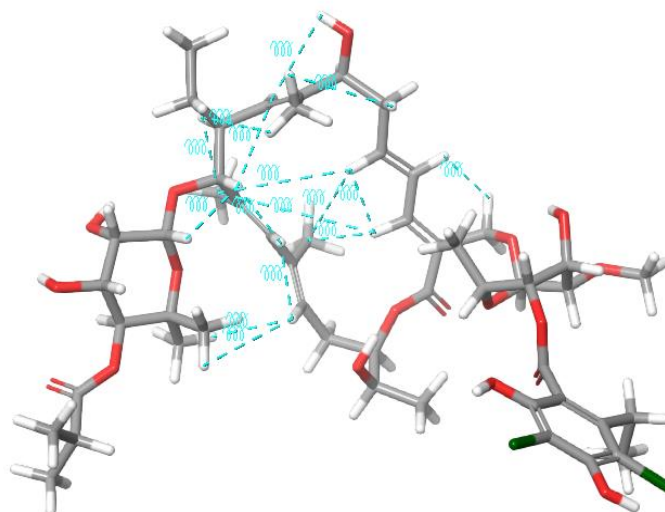


Slika 59. Spektar ROESY NMR za Fdx u THF-d₈

Za razliku od CsA i Rfmp, gdje su za konformacijsku pretragu korištene kristalne strukture pronađene u bazama CSD i PDB, kristalna struktura Fdx nije literaturno dostupna. Zbog toga je konformacija Fdx generirana od samog početka koristeći dvodimenzijisku strukturu molekule i njezinu stereokemiju. Slika 61 predstavlja početnu konformaciju Fdx na kojoj su prikazane ključne NOE interakcije korištene kao ograničenja udaljenosti između protona za vrijeme trajanja računa molekulske mehanike. Pretraga konformacijskog prostora provedena je metodom molekulske mehanike koristeći matricu uvjeta dobivenih iz eksperimenata NMR, uz dodatni uvjet da sve dvostruke veze zauzimaju *trans* konfiguraciju u skladu s eksperimentalnim podacima. Zatim je računom molekulske dinamike potvrđena stabilnost dobivene strukture.

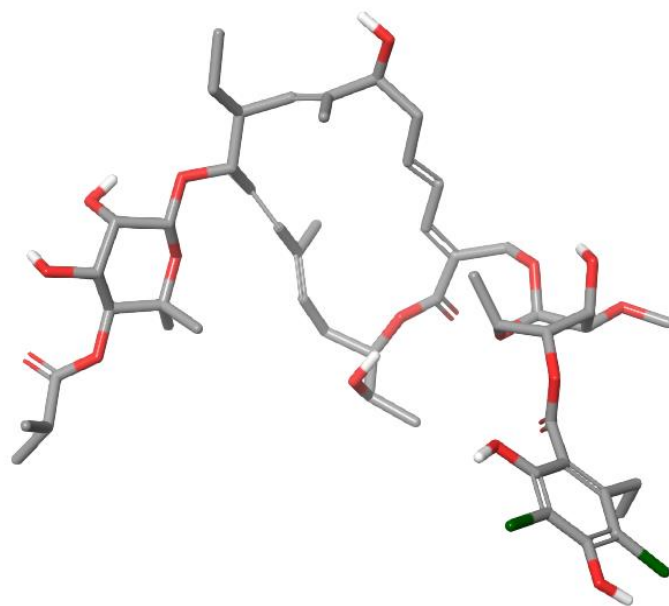


Slika 60. Struktura Fdx s ključnim NOE interakcijama; jake interakcije (crveno), srednje jake (plavo) te slabe (zelene)



Slika 61. Konformacija Fdx uz NOE ograničenja (plave isprekidane linije)

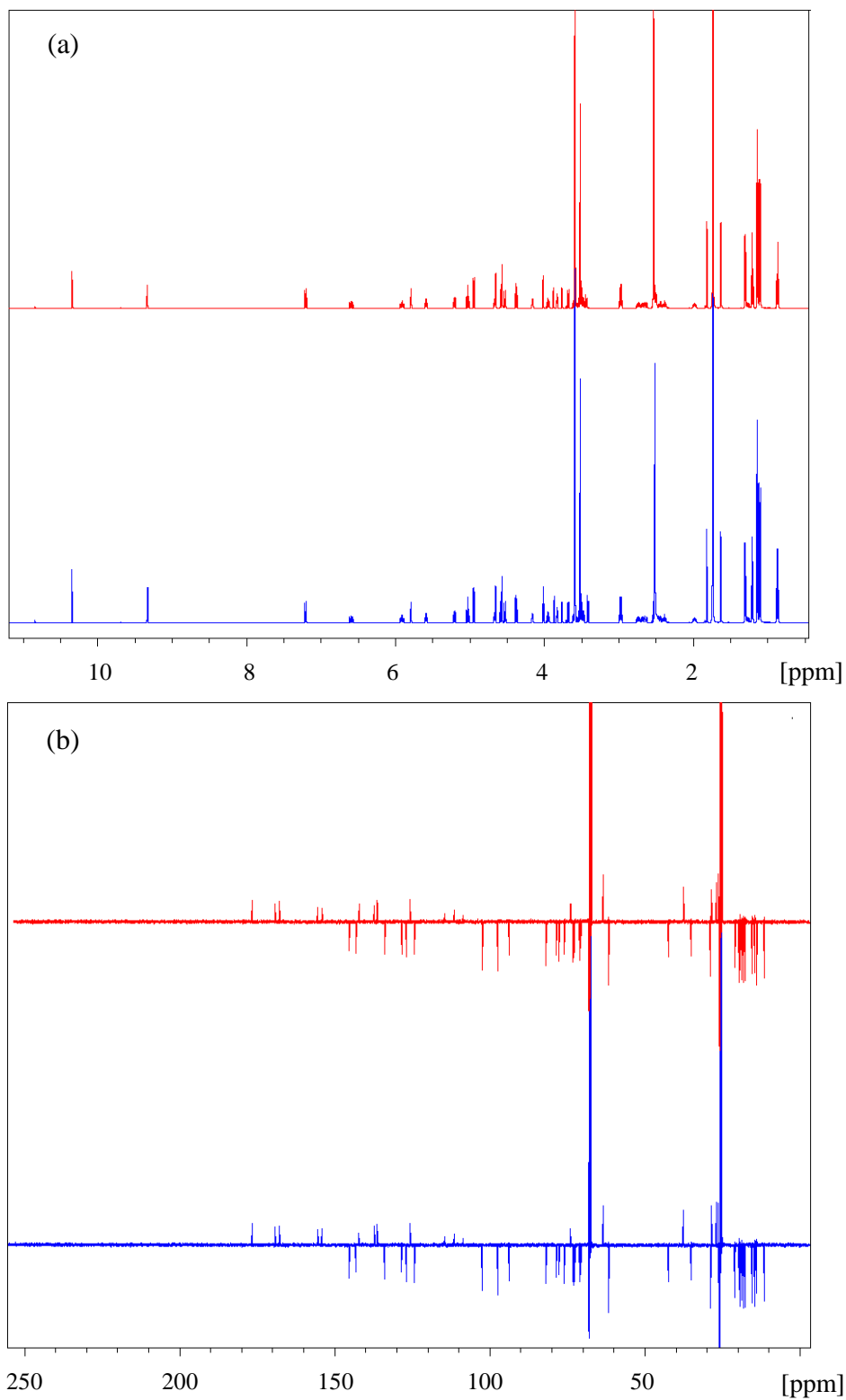
Konačna konformacija fidaksomicina koja odgovara podacima dobivenim analizom NMR prikazana je na slici 62.



Slika 62. Struktura Fdx koja odgovara podacima dobivenim iz eksperimenata NMR

4.4.1. Stvaranje kompleksa s ionima kalcija

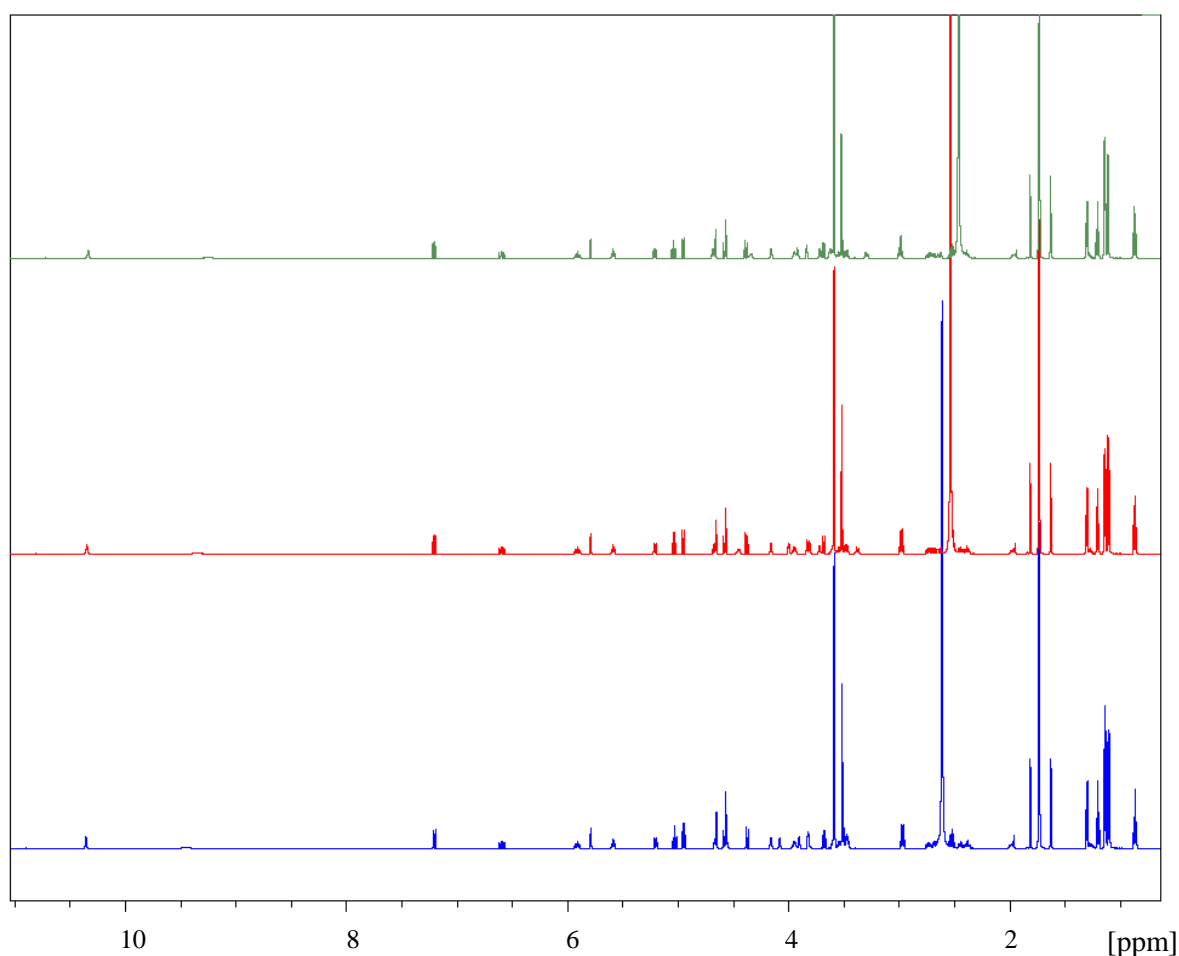
Uzorak Fdx sa kalcijevim kloridom (tablica 4) korišten je za analizu utjecaja metalnih iona na konformaciju ovog makrocikličnog spoja. Omjer Fdx i CaCl_2 bio je još jednom 1 : 1 zbog već navedene ograničene topljivosti kalcijeva klorida u THF- d_8 i s obzirom da je taj omjer pokazao najbolje rezultate i kod ciklosporina A. Uzorci su snimani pri 25 °C. Snimljeni su spektri ^1H i DEPTq NMR kako bi se pronašle razlike u kemijskom pomaku i/ili intenzitetu signala istih atoma fidaksomicina u uzorku čistog spoja u usporedbi s uzorkom koji sadrži kalcijeve ione. Slika 63 (a) prikazuje usporedbu spektra ^1H Fdx sa i bez kalcijevog klorida u THF- d_8 . Nakon detaljne analize nisu pronađene značajne razlike u spektrima. Isti rezultat pokazala je i usporedba spektara DEPTq Fdx sa i bez dodatka CaCl_2 , slika 63 (b). Kako dodatak kalcijevih iona nije uzrokovao nikakve značajnije promjene u spektru NMR, daljnje analize molekulskim modeliranjem nisu bile potrebne.



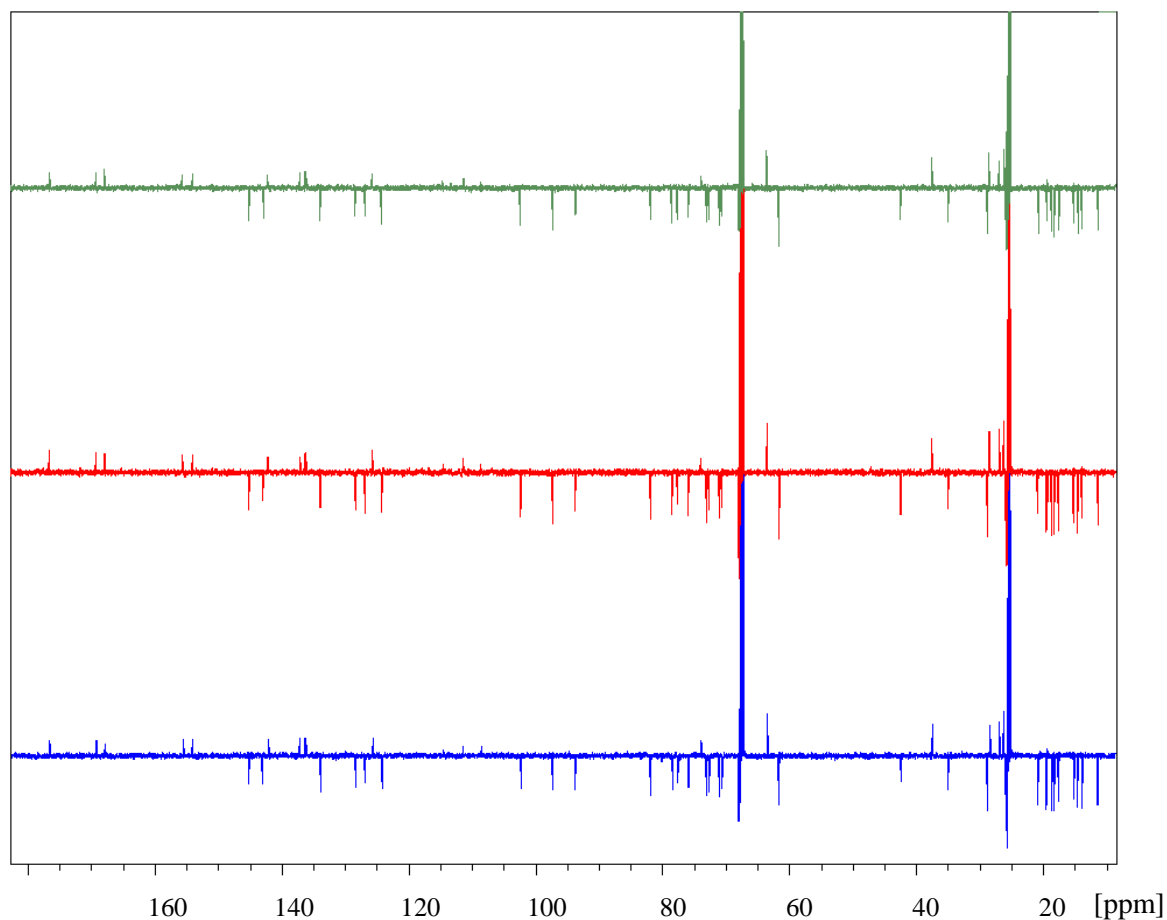
Slika 63. Spektri ¹H (a) i DEPTq (b) NMR za Fdx u THF-d₈ bez dodatka iona kalcija (plavo) i nakon dodatka CaCl₂ (crveno)

4.4.2. Utjecaj temperature

Za potrebe temperaturnih eksperimenata snimljeni su spektri ^1H i DEPTq NMR s prethodno pripremljenim uzorkom Fdx u cjevčici 1 (tablica 4.). Uzorak je sniman pri 25 °C, 35 °C i 45 °C. Snimljeni spektri ^1H i DEPTq su proučavani kako bi se pronašle bilo kakve promjene kemijskih pomaka i/ili intenziteta signala u spektru prilikom povećanja temperature. Detaljnom analizom navedenih spektara nisu pronađene nikakve značajne promjene. Rezultat je bio isti kao i nakon dodatka Ca^{2+} u otopinu Fdx. Spektri ^1H i DEPTq NMR su prikazani na slici 64 i 65.



Slika 64. Spektar ^1H NMR za Fdx u THF-d_8 pri 25 °C (plavo) 35 °C (crveno) i 45 °C (zeleno)

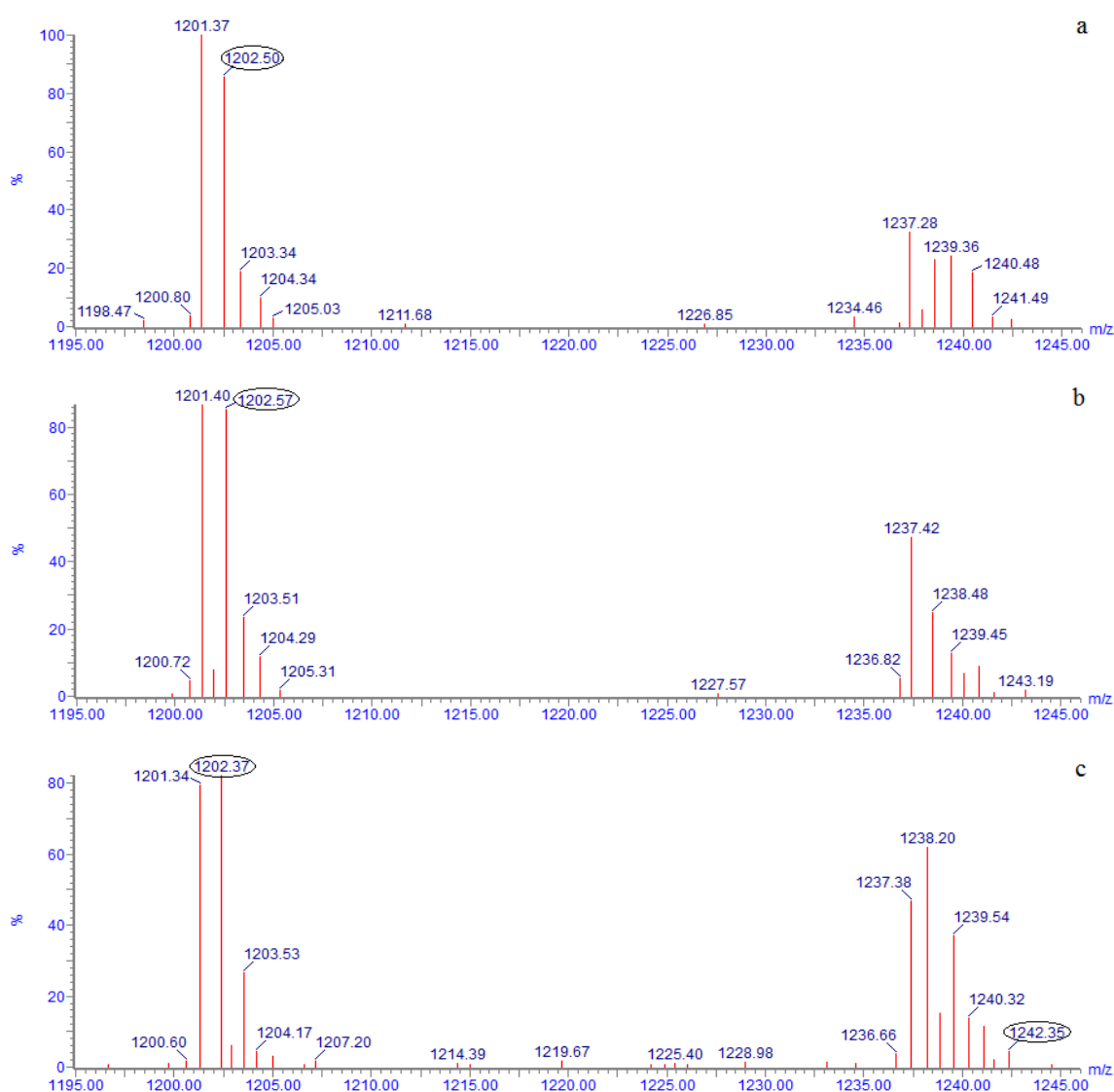


Slika 65. Spektar ^{13}C NMR za Fdx u THF-d_8 pri 25 °C (plavo) 35 °C (crveno) i 45 °C (zeleno)

Ovom analizom je pokazano da fidaksomicin, za razliku od ciklosporina A i rifampicina, ne stvara komplekse s kalcijevim ionima, te da dodatak iona kalcija ne izaziva nikakvu konformacijsku promjenu. Jednako tako, promjena temperature izgleda da nema nikakav utjecaj na promjenu konformacije fidaksomicina u THF-d_8 . Doduše, zbog točke vrelišta tetrahidrofurana maksimalna testirana temperatura je bila samo 45 °C, tako da nije isključeno da do promjene konformacije dolazi pri većim temperaturama.

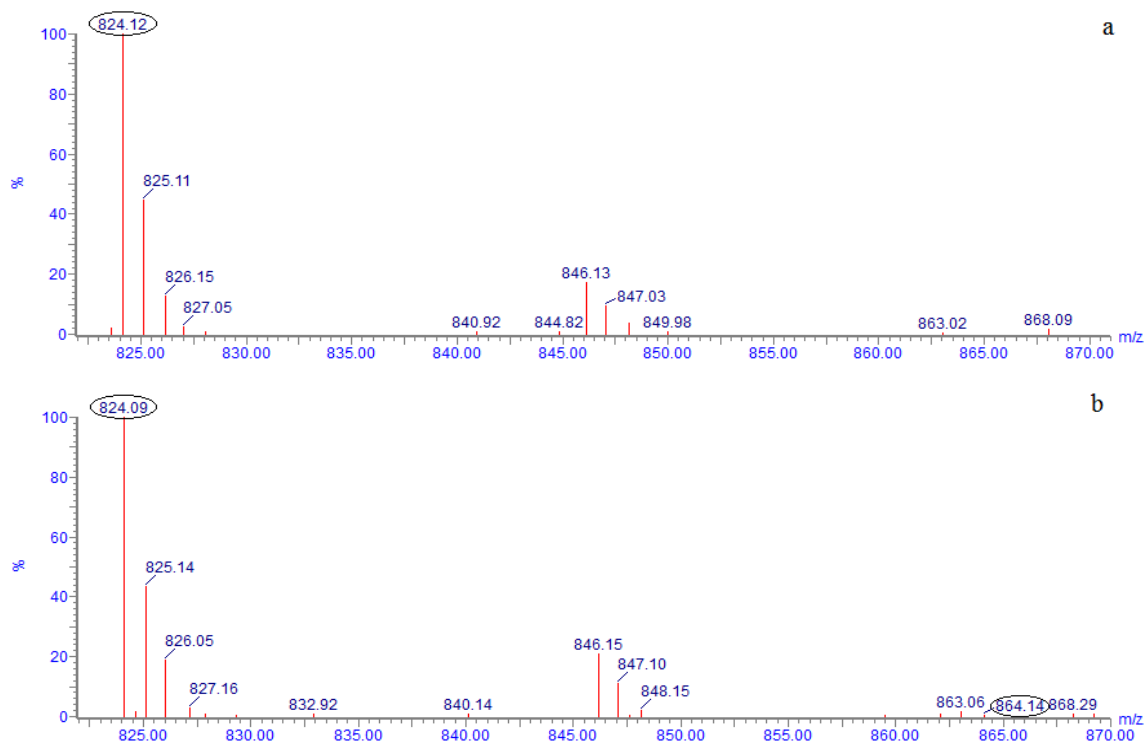
4.5. Analiza vezanja kalcija na makrocikle spektrometrijom masa

Alikvoti CsA, Rfmp i Fdx uzeti su iz ranije pripremljenih otopina uzoraka u svrhu analize NMR (tablice 3-4). Nakon razrjeđenja smjesom otapala prilagođenom za analizu masenom spektrometrijom, spektri su snimljeni i analizirani. Slika 66 prikazuje usporedbu spektara masa za CsA s različitim koncentracijama CaCl_2 u otopini voda/acetonitril. Molekulski ion pri m/z 1202 pripada $[\text{CsA-H}]^-$. Uočeno je da se kod omjera 1 : 1 = CsA : CaCl_2 (slika 66 c) pojavljuje molekulski ion pri m/z 1242 što dokazuje stvaranje kompleksa kalcijevog iona sa ciklosporinom A.



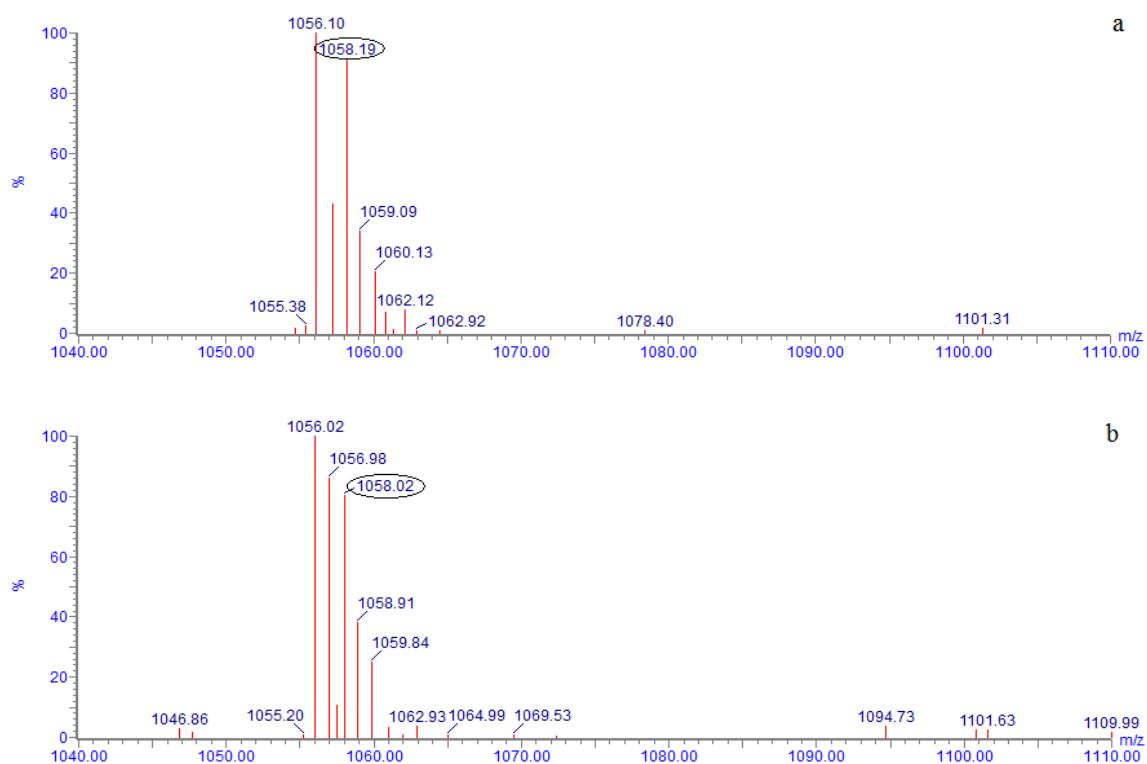
Slika 66. Usporedni spektri mase za čisti CsA u otopini acetonitril/voda (a), te uz različite omjere CsA i CaCl_2 - 1 : 0,5 (b) i 1 : 1 (c)

Usporedni spektri mase rifampicina sa i bez kalcijevog klorida u otopini voda/acetonitril prikazani su na slici 67. Pronađeni molekularni ioni na m/z 824 i m/z 864 dodijeljeni su $[\text{Rfmp}+\text{H}]^+$ i $[\text{Rfmp}+\text{Ca}^{2+}]^{2+}$. Isto kao eksperimenti NMR i molekularno modeliranje, spektrometrija masa dokazala je stvaranje kompleksa kalcijevih iona sa CsA i Rfmp.



Slika 67. Usporedni spektri mase za čisti Rfmp u otopini acetonitril/voda (a) i uz prisustvo CaCl_2 (b)

Bez obzira što NMR i MM nisu pokazali interakcije kalcija s Fdx, spektrometrija masa je provedena kako bi se dodatno utvrdili rezultati. Slika 68 prikazuje usporedni spektar masa fidaksomicina sa i bez kalcijevih iona u otopini voda/acetonitril. Pronađen je molekularni ion koji pripada Fdx pri m/z 1058, $[\text{Fdx}+\text{H}]^+$. Međutim, kao što je i bilo očekivano, ni spektrometrija masa nije pokazala promjene u spektru nakon dodatka CaCl_2 u otopinu Fdx.



Slika 68. Usporedni spektri mase za čisti Fdx u otopini acetonitril/voda (a) i uz prisustvo CaCl₂ (b)

§ 5. ZAKLJUČAK

Pomoću spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije (NMR) uspješno su potvrđene strukture komercijalno dostupnih makrocikličkih molekula ciklosporina A, rifampicina i makrolida fidaksomicina u THF-d₈. Usporedbom eksperimentalno dobivenih rezultata konformacijske analize ciklosporina A u THF-d₈ s onima opisanim u literaturi, može se zaključiti da ne postoje veća odstupanja. Ovi rezultati pokazali su uspješnost primjenjene kombinacije eksperimentalnog i računalnog pristupa za istraživanje konformacijskog prostora makrocikala. Sukladno s tim, na isti je način određena konformacija rifampicina i fidaksomicina u THF-d₈.

Budući da je u literaturi pokazano da dodatak metalnih iona i povišenje temperature utječu na promjenu konformacije nekih makrocikala, obje tehnike primijenjene su na sve tri testirane molekule kako bi se provjerilo da li posjeduju „kameleonsko“ svojstvo.

Rezultati dobiveni spektroskopijom NMR i metodama molekuskog modeliranja nakon dodatka kalcijeva klorida u THF-d₈ otopinu ciklosporina A potvrdili su stvaranje kompleksa. Pokazano je kako za smještaj iona kalcija unutar makrocikličkog prstena mora doći do kidanja svih transanularnih vodikovih veza, kao i promjene konfiguracije jedne od peptidnih veza. To uzrokuje „kameleonsku“ promjenu konformacije ciklosporina A koja dovodi do veće permeabilnosti spoja. Stabilnost kompleksa potvrđena je molekulskom dinamikom. U jednodimenzijским spektrima NMR pronađeno je da signali amidnih protona koji sudjeluju u vodikovim vezama pokazuju pomak prema nižim frekvencijama što ukazuje da s povišenjem temperature također dolazi do pucanja transanularnih vodikovih veza u ciklosporinu A.

Usporedba jednodimenzijских spektara NMR otopine rifampicina prije i nakon dodatka kalcijeva klorida pokazala je da dolazi do nastajanja kompleksa. Iako rifampicin ima intramolekulske vodikove veze, nakon detaljne usporedbe konformacije slobodnog rifampicina s konformacijom kompleksa nisu pronađeni nikakvi dokazi o značajnijoj konformacijskoj promjeni. Razlika u odnosu na ciklosporin A je u tome što rifampicin nema transanularne vodikove veze (unutar makrocikličkog prstena) u kojima sudjeluju protoni iz amidnih veza čije bi kidanje uzrokovalo mijenjanje konformacije kao što se to dogodilo kod ciklosporina A. Rezultati analize NMR dobiveni nakon povišenja temperature također nisu pokazali utjecaj na

konformaciju rifampicina. Međutim, promjena konformacije nije isključena s obzirom da je maksimalana temperatura mjerenja bila samo 45 °C zbog niske točke vrelišta tetrahidrofurana.

U slučaju fidaksomicina, rezultati dobiveni analizom NMR nisu ukazivali na značajnije promjene u strukturi nakon dodatka kalcijeva klorida, te je zaključeno da ne dolazi do stvaranja kompleksa sa kalcijem. Isti rezultati dobiveni su pomoću eksperimenata provedenih na povišenoj temperaturi.

Spektrometrija masa potvrdila je kompleksiranje iona kalcija sa ciklosporinom A i rifampicinom, ali ne i fidaksomicinom, što je u skladu s prethodno dobivenim rezultatima analize NMR i molekuskog modeliranja.

Kombinacija spektroskopije NMR i metoda molekuskog modeliranja pokazala se kao dobar izbor za konformacijsku analizu makrocikličkih molekula u različitom okruženju. Ovim istraživanjem pokazala se važnost prisustva transanularnih intramolekulskih vodikovih veza za „kameleonsko“ ponašanje makrocikličkih molekula, budući da za razliku od ciklosporina A, niti rifampicin niti fidaksomicin ne pokazuju „kameleonsko“ svojstvo.

§ 6. LITERATURNI IZVORI

1. T. D. W. Claridge, Chapter 1 – Introduction, *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Pergamon, New York, 1999, str. 1–12.
2. K. Pičuljan, T. Jednačak, N. Cindro, P. Novak, *Osnovni priručnik za rad sa spektrometrom NMR visoke rezolucije*, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2015.
3. <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/orgpage/nmr.htm> (datum pristupa 11. ožujak 2018.)
4. T. D. W. Claridge, Chapter 3 – Practical aspects of high-resolution NMR, *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Pergamon, New York, 1999, str. 45-48.
5. J. Keeler, *Understanding NMR Spectroscopy*, John Wiley & Sons. Inc., New York, 2002.
6. D. W. Claridge, Chapter 5 – Correlations through the chemical bond I: Homonuclear shift correlation, *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Pergamon, New York, 1999, str. 148–218.
7. <http://chem.ch.huji.ac.il/nmr/techniques/2d/cosy/cosy.html> (datum pristupa 11. ožujka 2018.)
8. A. Čikoš, *Konformacijska analiza 8-metilenoleandomicina spektroskopijom NMR*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2003, str. 30.
9. T. D. W. Claridge, Chapter 8 – Correlations through space: The nuclear Overhauser effect, *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Pergamon, New York, 1999, str. 277-337.
10. M. Kock, H. Kessler, D. Seebach, A. Thaler, *J. Am. Chem. Soc.* **114** (1992) 2676–2686.
11. <https://www.nature.com/subjects/molecular-modelling> (datum pristupa 12. ožujak 2018.)
12. A. Hospital, J. R. Goñi, M. Orozco, J. L. Gelpí, *Adv. Appl. Bioinform. Chem.* **8** (2015) 37–47.
13. C. S. Ho, C. W. K. Lam, M. H. M. Chan, R. C. K. Cheung, L. K. Law, L. C. W. Lit, K.

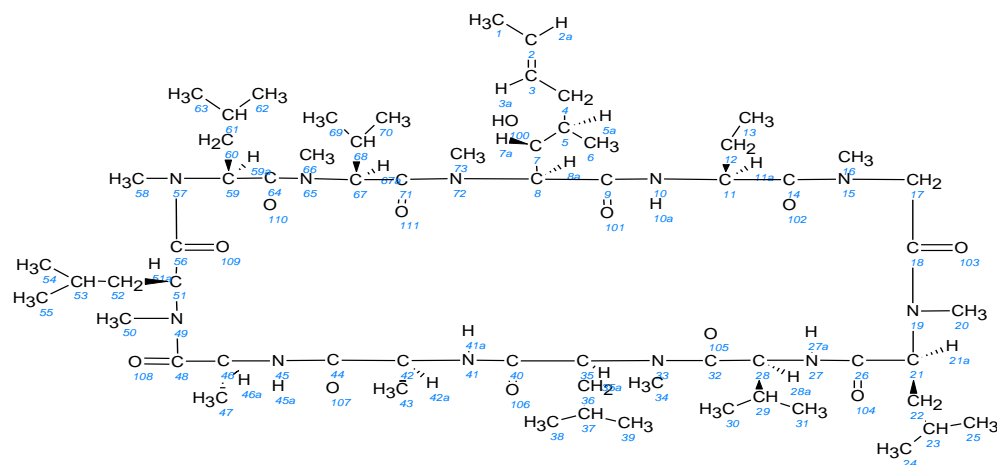
- F. Ng, M. W. M. Suen, H. L. Tai, *Clin. Biochem.* **24** (2003) 3–12.
14. R. Dancer, A. Jones, D. Fairlie, *Aust. J. Chem.* **48** (1995) 1835.
15. A. K. Yudin, *Chem. Sci.* **6** (2015) 30–49.
16. A. Whitty, M. Zhong, L. Viarengo, D. Beglov, D. R. Hall, S. Vajda, *Drug Discov. Today.* **21** (2016) 712–717.
17. H. Kessler, M. Köck, T. Wein, M. Gehrke, *Helv. Chim. Acta.* **73** (1990) 1818–1832.
18. F. Bernardi, E. Gaggelli, E. Molteni, E. Porciatti, D. Valensin, G. Valensin, *Biophys. J.* **90** (2006) 1350–1361.
19. <https://www.thesgc.org/structures/2poy> (datum pristupa 15. ožujak 2018.)
20. H. -R Loosli, H. Kessler, H. Oschkinat, H. P. Weber, T. J. Petcher, A. Widmer, *Helv. Chim. Acta.* **68** (1985) 682–704.
21. H. Kessler, H.-R. Loosli, H. Oschkinat, *Helv. Chim. Acta.* **68** (1985) 661–681.
22. Y. Ran, L. Zhao, Q. Xu, S. H. Yalkowsky, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **2** (2001) 23–26.
23. N. El Tayar, A. E. Mark, P. Vallat, R. M. Brunne, B. Testa, W. F. van Gunsteren, *J. Med. Chem.* **36** (1993) 3757–3764.
24. J. A. Carver, N. H. Rees, D. L. Turner, S. J. Senior, B. Z. Chowdhry, *J. Chem. Soc. Commun.* 1992, 1682–1684.
25. A. A. Salem, H. A. Mossa, B. N. Barsoum, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **62** (2005) 466–472.
26. I. Wawer, Chapter 4 – Solid State Measurements of Drugs and Drug Formulations, *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*, Elsevier, Warsaw, 2008, str. 201–231.
27. N. Maggi, C. R. Pasqualucci, R. Ballotta, P. Sensi, *Chemotherapy*, **11** (1966) 285–292.
28. <http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI%3A71365> (datum pristupa 27. ožujak 2018.)
29. A. A. Venugopal, S. Johnson, *Clin. Infect. Dis.* **54** (2012) 568–574.
30. <https://newdrugapprovals.org/2016/02/22/fidaxomicin/> (datum pristupa 15. ožujak 2018.)
31. J. S. Hardesty, P. Juang, *Pharmacotherapy*, **31** (2011) 77–886.
32. H. Kessler, M. Gehrke, J. Lautz, M. Köck, D. Seebach, A. Thaler, *Biochem. Pharmacol.* **40** (1990) 169–73.
33. A. Zarkan, H.-R. Macklyne, A. W. Truman, A. R. Hesketh, H.-J. Hong, *Sci. Rep.* **6** (2016) 19602.

34. S. W. Ho, D. Jung, J. R. Calhoun, J. D. Lear, M. Okon, W. R. P. Scott, R. E. W. Hancock, S. K. Straus, *Eur. Biophys. J.* **37** (2008) 421–433.
35. R. M. Cusack, L. Grøndahl, D. P. Fairlie, G. R. Hanson, L. R. Gahan, *J. Inorg. Biochem.* **97** (2003) 191–198.
36. M. Świątek, D. Valensin, C. Migliorini, E. Gaggelli, G. Valensin, M. Jeżowska-Bojczuk, *Dalt. Trans.* **0** (2005) 3808.
37. M. R. Jensen, M. A. S. Hass, D. F. Hansen, J. J. Led, *Cell. Mol. Life Sci.* **64** (2007) 1085–1104.
38. <https://www.schrodinger.com/suites/small-molecule-drug-discovery-suite> (datum pristupa 27. travanj 2018.)
39. E. Harder, W. Damm, J. Maple, C. Wu, M. Reboul, J. Y. Xiang, L. Wang, D. Lupyan, M. K. Dahlgren, J. L. Knight, J. W. Kaus, D. S. Cerutti, G. Krilov, W. L. Jorgensen, R. Abel, R. A. Friesner, *J. Chem. Theory Comput.* **12** (2016) 281–296.
40. <https://www.schrodinger.com/desmond> (datum pristupa 27. travanj 2018.)
41. K. J. Bowers, K. J. Bowers, E. Chow, H. Xu, R. O. Dror, M. P. Eastwood, B. A. Gregersen, J. L. Klepeis, I. Kolossvary, M. A. Moraes, F. D. Sacerdoti, J. K. Salmon, Y. Shan, D. E. Shaw, *SC '06 Proc. 2006 ACM/IEEE Conf. Supercomput.*
42. M. Solvents, M. Sizes, M. Solutions, *Cambridge Isot. Lab. Inc.* 2010, **R2 Orange**, 5–6
43. M. Nilges, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6** (1996) 617–623
44. F. J. M. van de Ven, M. J. J. Blommers, R. E. Schouten, C. W. Hilbers, *J. Magn. Reson.* **94** (1991) 140–151
45. R. Stoll, W. Voelter, T. A. Holak
46. B. Bernet, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta.* **83** (2000) 995–1021

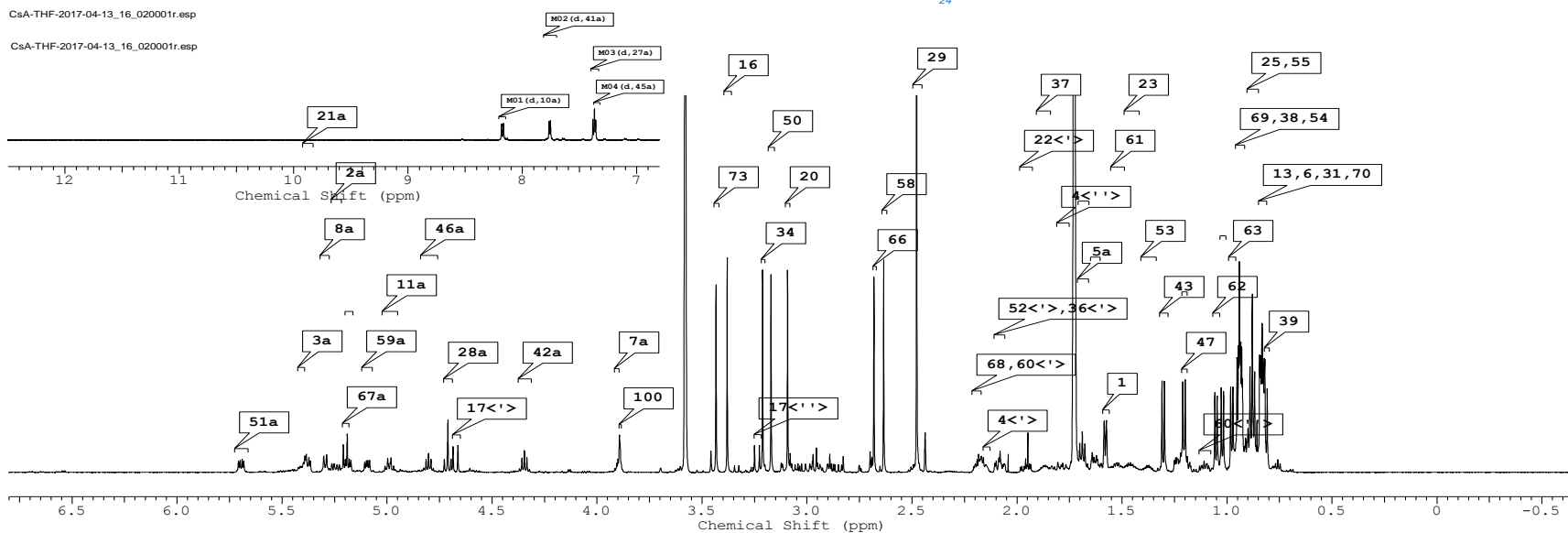
§ 7. DODATAK

U dodatku se nalaze:

1. assignirani ^1H i ^{13}C NMR spektri, te njihovi eksperimentalni uvjeti
2. tablica konstanti sprezanja
3. tablice NOE pomaka
4. usporedna tablica literaturno i eksperimentalno dobivenih rezultata za ciklosporin A
5. usporedna tablica konstanti sprezanja rifampicina sa i bez dodatka kalcijeva klorida



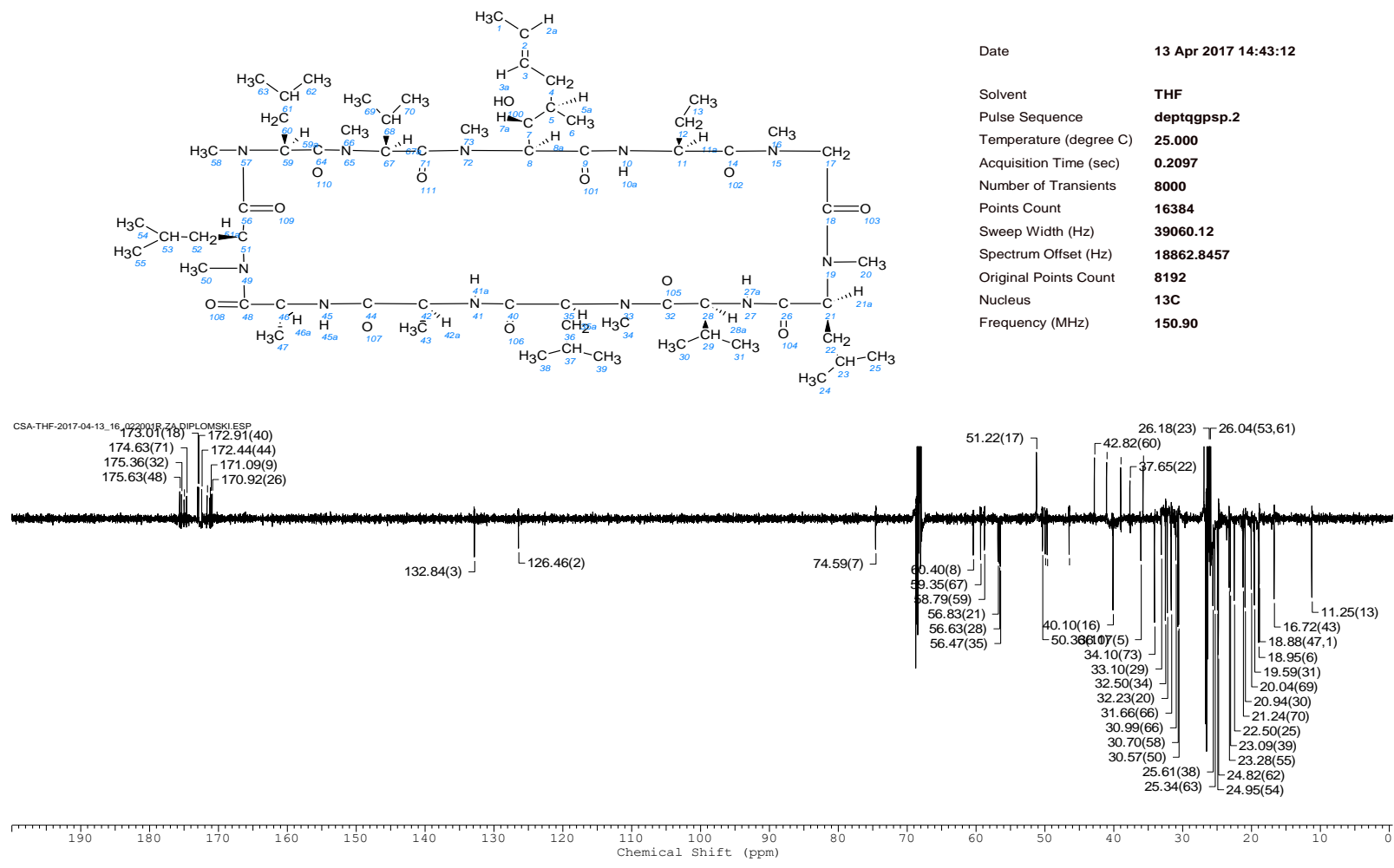
Date	13 Apr 2017 14:11:12
Solvent	THF
Pulse Sequence	zg30
Temperature (degree C)	25.000
Acquisition Time (sec)	5.4526
Number of Transients	64
Points Count	65536
Sweep Width (Hz)	12019.05
Spectrum Offset (Hz)	4266.6592
Original Points Count	65536
Nucleus	1H
Frequency (MHz)	600.13



Slika D1. ¹H asignirani spektar CsA u THF-d₈

Shift1 (ppm)	X's	Type	J (Hz)	Atom1	Multiplet1	Shift1 (ppm)	X's	Type	J (Hz)	Atom1	Multiplet1
8.174	1	d	9.9	10a	M01	1.625	1	m	-	22<">	M33
7.760	1	d	7.0	41a	M02	1.959	1	ddd	14.7, 10.8, 3.9	22<'>	M34
7.377	1	d	9.2	27a	M03	1.109	1	ddd	13.2, 7.7, 4.9	60<">	M35
7.365	1	d	7.6	45a	M04	5.410	1	m	-	3a	M36
5.695	1	dd	10.7, 4.7	51a	M05	5.185	1	dd	10.8, 4.8	35a	M37
5.294	1	d	8.4	8a	M06	5.199	1	d	11.0	67a	M38
5.095	1	dd	9.0, 5.0	59a	M07	3.907	1	m	-	7a	M39
4.989	1	ddd	9.9, 8.0, 7.1	11a	M08	3.893	1	s	-	100	M40
4.802	1	quin	7.0	46a	M09	2.182	2	m	-	68, 60<'>	M41
4.346	1	quin	7.0	42a	M10	2.160	1	br. s.	-	4<'>	M42
3.433	3	s	-	73	M11	2.082	2	m	-	52<'>, 36<'>	M43
3.380	3	s	-	16	M12	1.786	1	m	-	4<">	M44
3.211	3	s	-	34	M13	1.689	2	dd	-	12<">, 12<'>	M45
3.171	3	s	-	50	M14	0.880	6	m	-	25, 55	M46
3.092	3	s	-	20	M15	0.813	3	d	6.8	39	M47
2.681	3	s	-	66	M16	0.941	9	m	-	69, 38, 54	M48
2.635	3	s	-	58	M17	1.205	3	d	7.0	47	M49
2.477	1	dd	7.0, 6.4	29	M18	1.226	1	m	-	36<">	M50
5.378	1	dd	11.8, 4.0	21a	M19	1.204	1	m	-	52<">	M51
5.245	1	dd	14.6, 6.1	2a	M20	0.838	12	m	-	13, 6, 31, 70	M52
1.877	1	m	-	37	M21	1.687	1	m	-	5a	M53
1.579	3	d	6.2	1	M22						
1.522	1	m	13.9, 7.9, 6.2	61	M23						
1.464	1	m	10.3, 6.8, 3.1	23	M24						
1.374	1	m	10.0, 6.7, 3.3	53	M25						
1.303	3	d	7.2	43	M26						
1.052	3	d	6.6	62	M27						
1.022	3	d	6.4	30	M28						
0.977	3	d	6.6	63	M29						
4.711	1	dd	10.2, 9.2	28a	M30						
4.674	1	d	13.9	17<'>	M31						
3.238	1	d	13.9	17<">	M32						

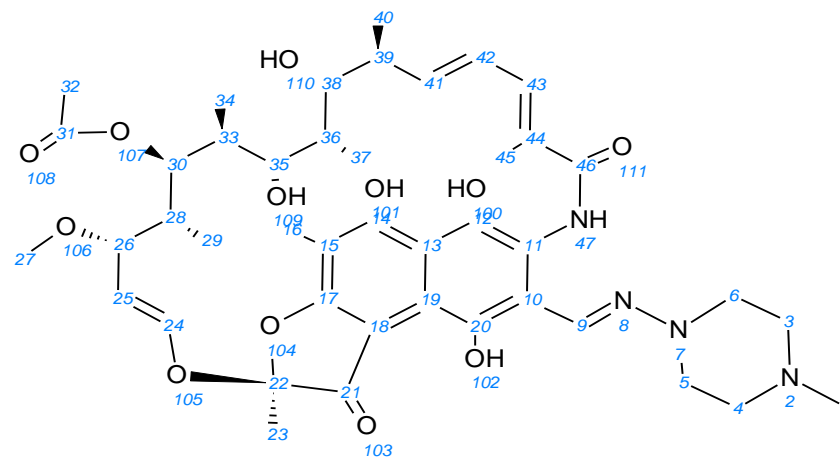
Slika D2. Tablica ¹H kemijskih pomaka i konstanti spreznja za CsA u THF-d₈



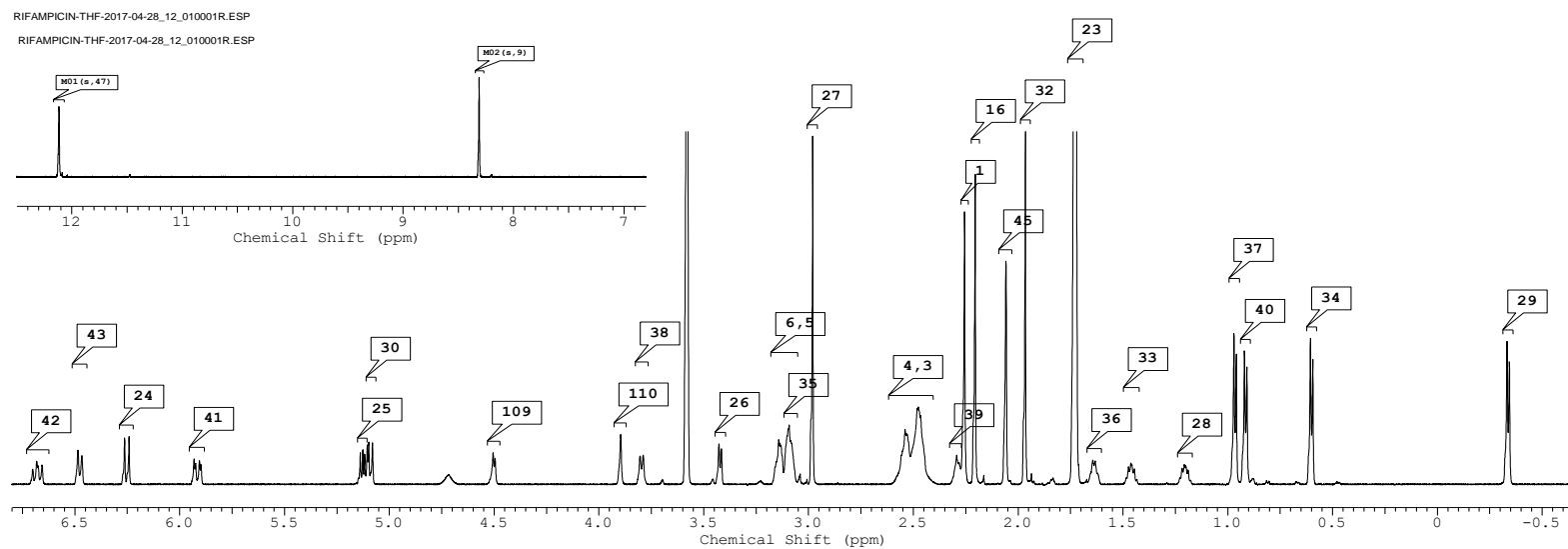
Slika D3. ¹³C asignirani spektar CsA u THF-d₈

Atom	Exp. Shift (ppm)	Atom	Exp. Shift (ppm)	Atom	Exp. Shift (ppm)
13	11.25	58	30.70	28	56.63
43	16.72	66	30.99	21	56.83
47	18.88	68	31.00	59	58.79
1	18.88	66	31.66	67	59.35
6	18.95	20	32.23	8	60.40
31	19.59	34	32.50	7	74.59
69	20.04	29	33.10	2	126.46
30	20.94	73	34.10	3	132.84
70	21.24	4	35.76	26	170.92
25	22.50	5	36.07	9	171.09
39	23.09	22	37.65	64	171.25
55	23.28	36	39.00	64	171.27
55	23.29	16	40.10	56	171.66
62	24.82	16	40.12	44	172.44
54	24.95	52	41.05	40	172.91
63	25.34	60	42.82	18	173.01
38	25.61	46	46.48	71	174.63
53	26.04	46	46.50	71	174.65
61	26.04	51	49.68	14	174.98
23	26.18	42	49.98	14	175.00
37	26.31	11	50.36	32	175.36
12	26.89	17	51.22	48	175.63
50	30.57	35	56.47		

Slika D4. Tablica ^{13}C kemijskih pomaka za CsA u THF- d_8



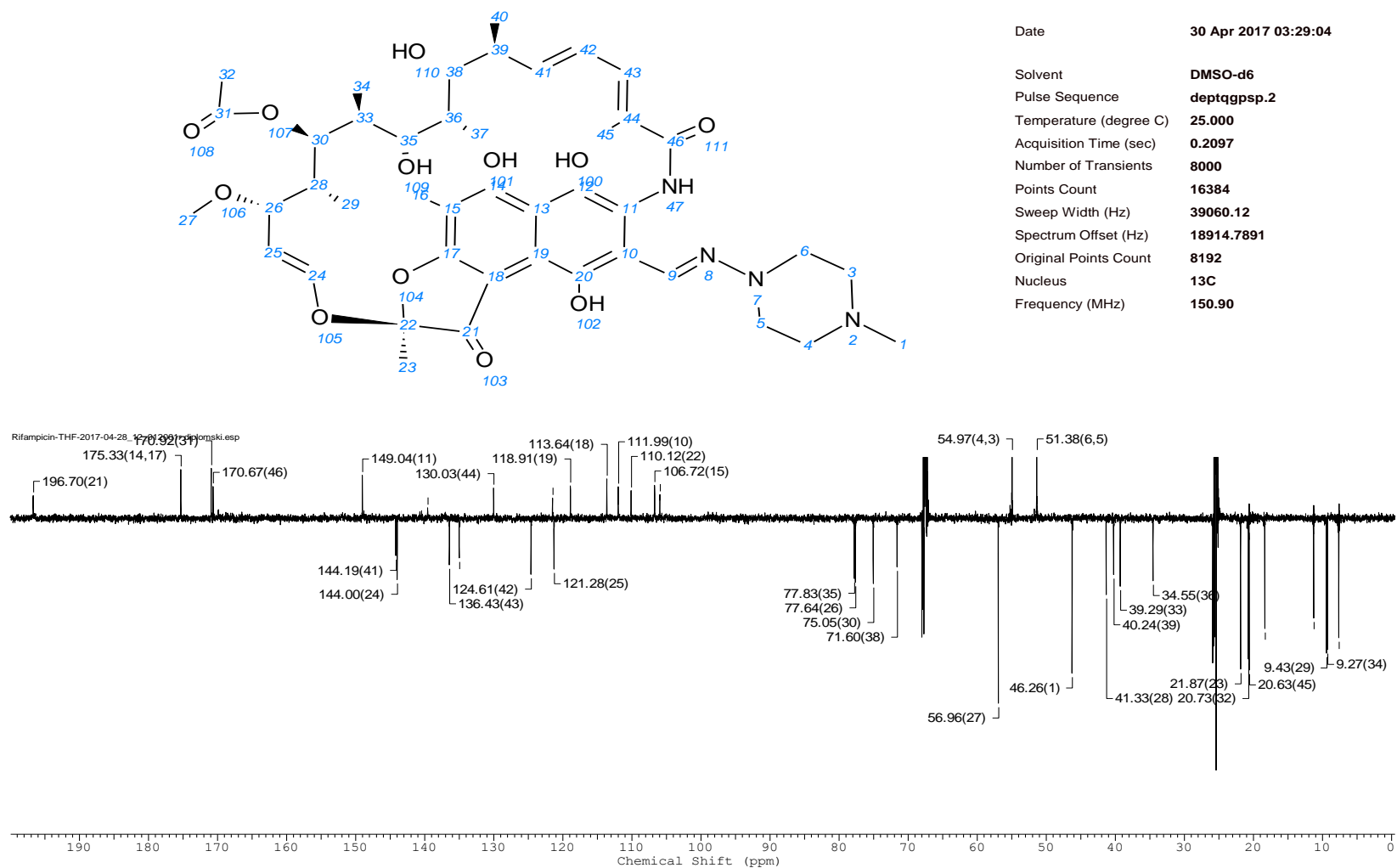
Date	30 Apr 2017 02:57:04
Solvent	DMSO-d6
Pulse Sequence	zg30
Temperature (degree C)	25.000
Acquisition Time (sec)	5.4526
Number of Transients	16
Points Count	65536
Sweep Width (Hz)	12019.05
Spectrum Offset (Hz)	4920.8257
Original Points Count	65536
Nucleus	1H
Frequency (MHz)	600.13



Slika D5. ¹H asignirani spektar za Rfmp u THF-d₈

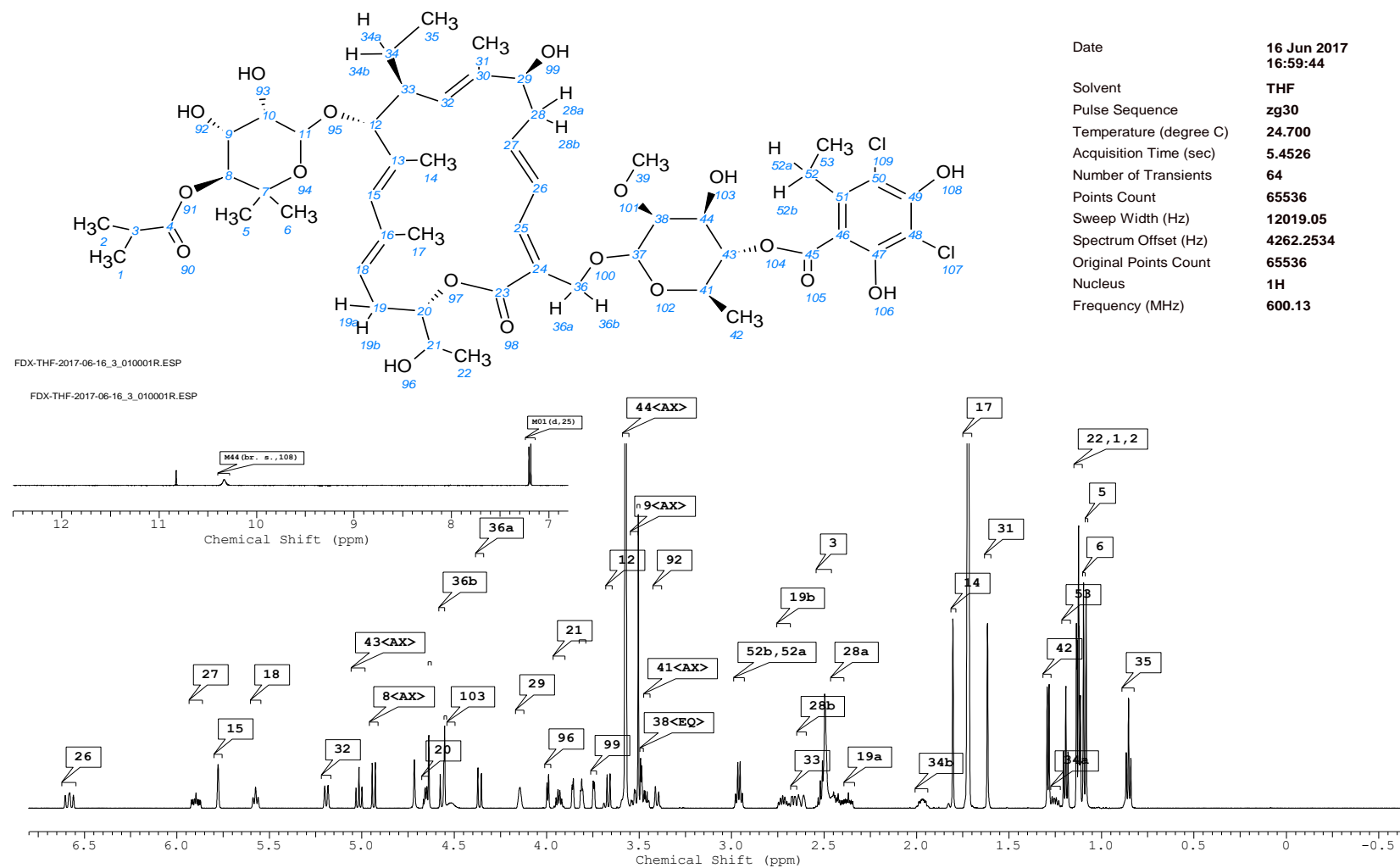
Shift1 (ppm)	X's	Type	J (Hz)	Atom1	Multiplet1	Shift1 (ppm)	X's	Type	J (Hz)	Atom1	Multiplet1
12.116	1	s	-	47	M01	1.459	1	dq	9.7, 7.0	33	M24
8.312	1	s	-	9	M02	1.203	1	m	10.6, 7.0, 1.3	28	M25
6.680	1	dd	15.4, 11.4	42	M03	0.965	3	d	7.0	37	M26
6.476	1	d	11.4	43	M04	0.915	3	d	7.0	40	M27
6.252	1	d	12.8	24	M05	0.600	3	d	7.0	34	M28
5.915	1	dd	15.4, 4.6	41	M06	-0.338	3	d	6.8	29	M29
5.127	1	dd	12.7, 7.3	25	M07						
5.089	1	d	10.8	30	M08						
4.500	1	d	5.7	109	M09						
3.896	1	s	-	110	M10						
3.796	1	dt	9.0, 2.0	38	M11						
3.421	1	d	7.3, 1.8	26	M12						
3.122	4	m	-	6, 5	M13						
3.096	1	m	-	35	M14						
2.980	3	s	-	27	M15						
2.502	4	m	-	4, 3	M16						
2.292	1	m	-	39	M17						
2.256	3	s	-	1	M18						
2.205	3	s	-	16	M19						
2.058	3	s	-	45	M20						
1.966	3	s	-	32	M21						
1.727	3	br. s.	-	23	M22						
1.638	1	dt	6.8	36	M23						

Slika D6. Tablica ^1H kemijskih pomaka i konstanti sprezanja za Rfmp u THF- d_8

Slika D7. ¹³C asignirani spektar za Rfmp u THF-d₃

Atom	Exp. Shift (ppm)	Atom	Exp. Shift (ppm)
16	7.65	22	110.12
34	9.27	10	111.99
29	9.43	18	113.64
37	11.28	19	118.91
40	18.36	25	121.28
45	20.63	20	121.50
32	20.73	42	124.61
23	21.87	44	130.03
36	34.55	9	135.01
33	39.29	43	136.43
39	40.24	12	139.59
28	41.33	24	144.00
1	46.26	41	144.19
6	51.38	11	149.04
5	51.38	46	170.67
4	54.97	31	170.92
3	54.97	14	175.33
27	56.96	17	175.33
38	71.60	21	196.70
30	75.05		
26	77.64		
35	77.83		
13	105.97		
15	106.72		

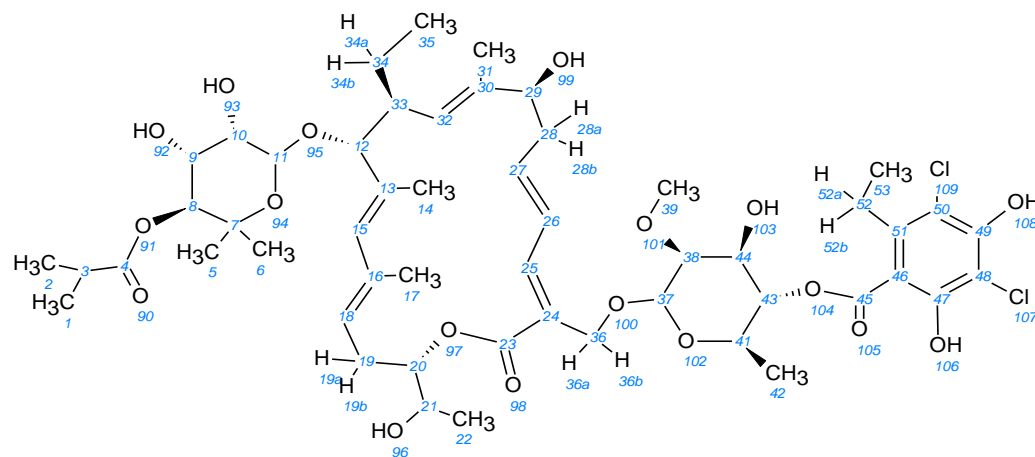
Slika D8. Tablica ^{13}C kemijskih pomaka za Rfmp u THF- d_8



Slika D9. ¹H asignirani spektar za Fdx u THF-d₈

Shift1 (ppm)	X's	Type	J (Hz)	Atom1	Multiplet1	Shift1 (ppm)	X's	Type	J (Hz)	Atom1	Multiplet1
7.194	1	d	11.4	25	M01	1.968	1	m	12.8, 7.6, 2.4	34b	M34
6.581	1	m	14.1, 11.9	26	M02	1.803	3	s	-	14	M35
5.897	1	ddd	14.8, 9.8, 4.4	27	M03	1.721	3	s	-	17	M36
5.777	1	s	-	15	M04	1.616	3	s	-	31	M37
5.574	1	t	8.2	18	M05	1.288	3	d	6.2	42	M38
5.191	1	d	10.8	32	M06	1.256	1	dq	14.0, 8.1	34a	M39
5.015	1	t	9.7	43<AX>	M07	1.192	3	t	7.2	53	M40
4.935	1	d	10.1	8<AX>	M08	1.125	9	m	-	22, 1, 2	M41
4.653	1	q	5.5	20	M09	1.083	3	s	-	5	M42
4.638	1	s	-	11<AX>	M10	0.853	3	t	7.6	35	M43
4.566	1	d	11.7	36b	M11	10.333	1	br. s.	-	108	M44
4.552	1	s	-	37<AX>	M12	1.097	3	s	-	6	M45
4.520	1	m	-	103	M13						
4.363	1	d	11.4	36a	M14						
4.144	1	br. s.	-	29	M15						
3.994	1	d	5.1	96	M16						
3.934	1	sxt	6.0	21	M17						
3.523	1	td	10.5, 2.9	9<AX>	M18						
3.811	1	t	3.5, 3.5	10<EQ>	M19						
3.745	1	d	3.9	99	M20						
3.665	1	d	9.7	12	M21						
3.573	1	s	-	44<AX>	M22						
3.404	1	d	10.8	92	M23						
3.504	3	s	-	39	M24						
3.489	1	d	3.5	38<EQ>	M25						
3.470	1	dd	9.5, 6.1	41<AX>	M26						
2.960	2	q	7.2	52b, 52a	M27						
2.724	1	dt	13.9, 6.8	19b	M28						
2.665	1	qd	9.9, 2.6	33	M29						
2.624	1	dt	16.5, 2.6	28b	M30						
2.508	1	spt	7.2	3	M31						
2.424	1	m	14.9, 9.9, 4.4	28a	M32						
2.369	1	ddd	13.9, 9.2, 4.3	19a	M33						

Slika D10. Tablica ^1H kemijskih pomaka i konstanti sprezanja za Fdx u THF- d_8



Date **16 Jun 2017**
 17:40:16

Solvent **THF**

Pulse Sequence **deptqgppsp.2**

Temperature (degree C) **25.000**

Acquisition Time (sec) **0.2097**

Number of Transients **8000**

Points Count **16384**

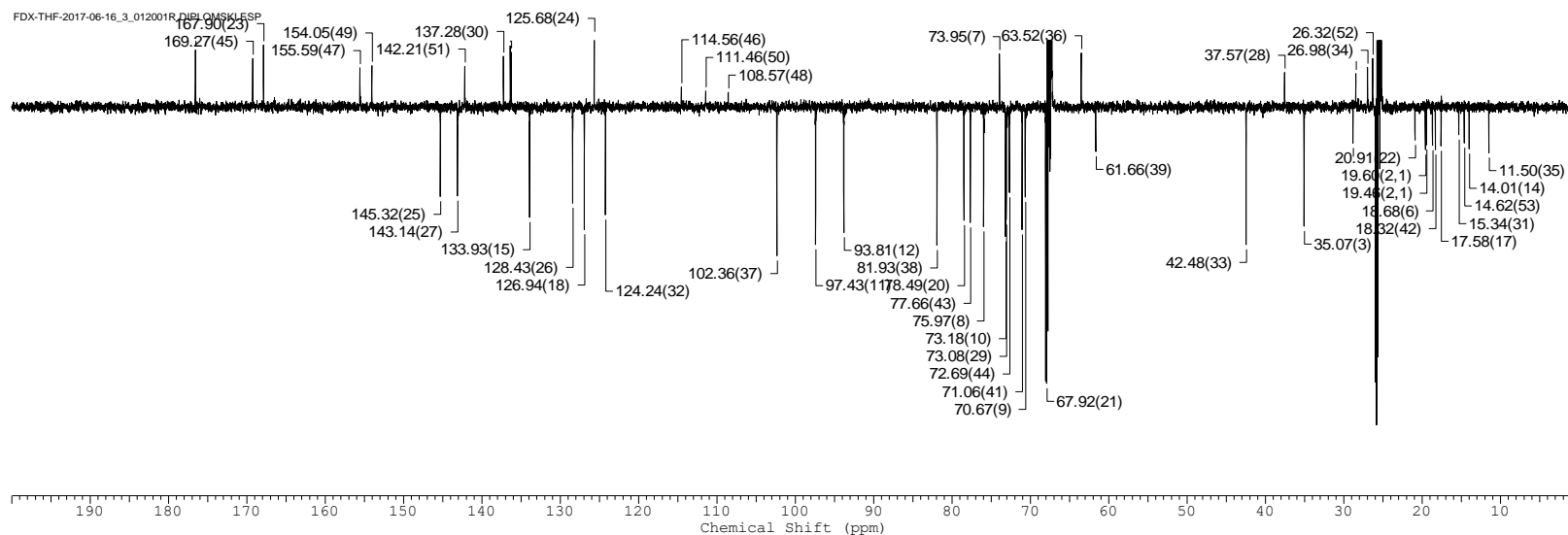
Sweep Width (Hz) **39060.12**

Spectrum Offset (Hz) **18756.6953**

Original Points Count **8192**

Nucleus **13C**

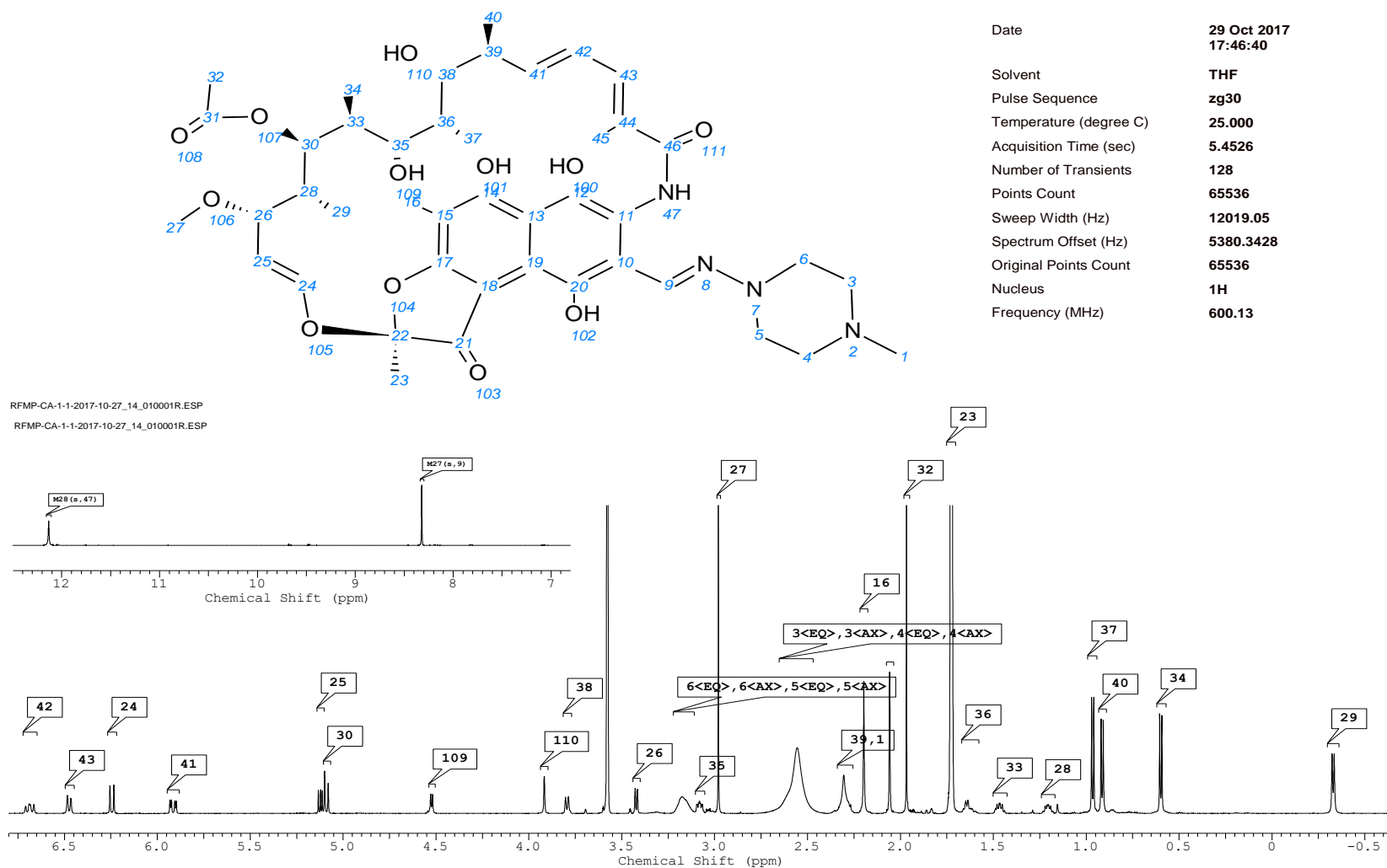
Frequency (MHz) **150.90**



Slika D11. ¹³C asignirani spektar za Fdx u THF-d₈

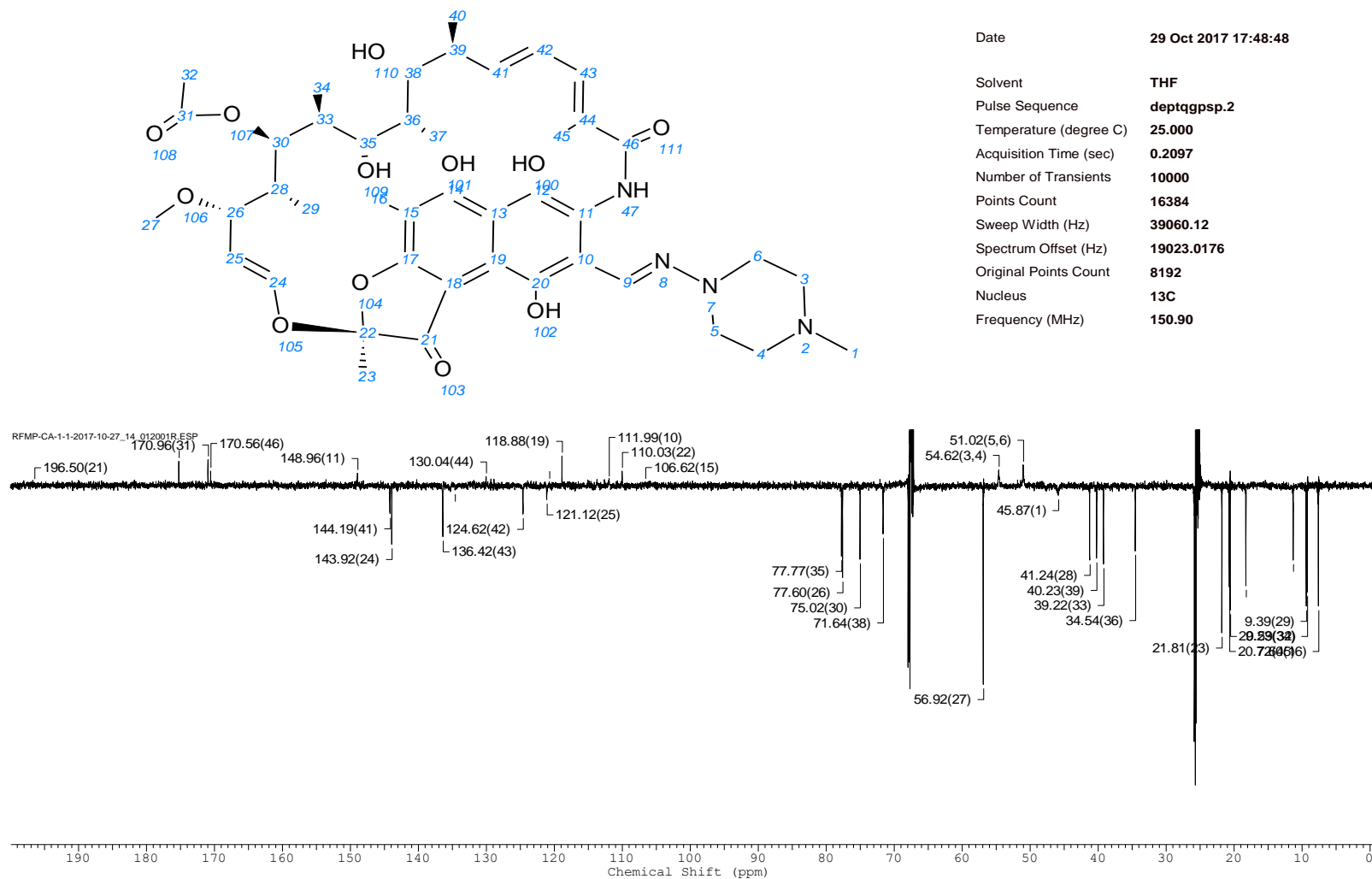
Atom	Exp. Shift (ppm)	Atom	Exp. Shift (ppm)	Atom	Exp. Shift (ppm)
35	11.50	21	67.77	26	128.43
14	14.01	21	67.92	15	133.93
53	14.62	9	70.67	16	136.28
31	15.34	41	71.06	13	136.39
17	17.58	44	72.69	30	137.28
42	18.32	29	73.08	51	142.21
6	18.68	10	73.18	27	143.14
2	19.46	7	73.95	25	145.32
1	19.46	8	75.97	49	154.05
2	19.60	43	77.66	47	155.59
1	19.60	20	78.49	23	167.90
22	20.91	38	81.93	45	169.27
52	26.32	12	93.81	4	176.57
34	26.98	11	97.43		
19	28.46	37	102.36		
5	28.84	48	108.57		
3	35.07	50	111.46		
28	37.57	46	114.56		
33	42.48	32	124.24		
39	61.66	24	125.68		
36	63.52	18	126.94		

Slika D12. Tablica ^{13}C kemijskih pomaka za Fdx u THF- d_8

Slika D13. ¹H asignirani spektar Rfmp u THF-d₈ s dodatkom Ca²⁺ iona

Shift1 (ppm)	X's	Type	J (Hz)	Atom1	Multiplet1	Shift1 (ppm)	X's	Type	J (Hz)	Atom1	Multiplet1
-0.329	3	d	7.0	29	M01	3.917	1	s	-	110	M19
0.598	3	d	7.0	34	M02	4.524	1	d	5.9	109	M20
0.914	3	d	7.2	40	M03	5.090	1	d	11.6	30	M21
0.965	3	d	7.0	37	M04	5.122	1	m	12.7, 7.2	25	M22
1.206	1	m	10.7, 6.8, 1.0	28	M05	5.915	1	dd	15.5, 4.7	41	M23
1.465	1	dq	9.9, 7.0	33	M06	6.245	1	d	12.7	24	M24
1.643	1	q	7.0	36	M07	6.474	1	d	11.2	43	M25
1.732	3	m	-	23	M08	6.687	1	dd	14.9, 11.8	42	M26
1.975	3	m	-	32	M09	8.322	1	s	-	9	M27
2.060	3	m	-	45	M10	12.133	1	s	-	47	M28
2.197	3	s	-	16	M11						
2.299	4	m	-	39, 1	M12						
2.556	4	br. s.	-	3<EQ>, 3<AX>, 4<EQ>, 4<AX>	M13						
2.980	3	s	-	27	M14						
3.079	1	m	-	35	M15						
3.176	4	br. s.	-	6<EQ>, 6<AX>, 5<EQ>, 5<AX>	M16						
3.422	1	dd	7.3, 1.8	26	M17						
3.795	1	dt	9.4, 2.0	38	M18						

Slika D14. Tablica ^1H kemijskih pomaka i konstanti sprezanja za Rfmp u THF- d_8 s dodatkom Ca^{2+} iona

Slika D15. ^{13}C asignirani spektar Rfmp u THF- d_8 s dodatkom Ca^{2+} iona

Atom	Exp. Shift (ppm)	Atom	Exp. Shift (ppm)
16	7.65	13	105.97
34	9.27	15	106.72
29	9.43	22	110.12
37	11.28	10	111.99
40	18.36	18	113.64
45	20.63	19	118.91
32	20.73	25	121.28
23	21.87	20	121.50
36	34.55	42	124.61
33	39.29	44	130.03
39	40.24	9	135.01
28	41.33	43	136.43
1	46.26	12	139.59
6	51.38	24	144.00
5	51.38	41	144.19
4	54.97	11	149.04
3	54.97	46	170.67
27	56.96	31	170.92
38	71.60	14	175.33
30	75.05	17	175.33
26	77.64	21	196.70
35	77.83		

Slika D16. Tablica ^{13}C kemijskih pomaka za Rfmp u THF- d_8 s dodatkom Ca^{2+} iona

Tablica D1. Geminalne i vicinalne konstante sprežanja za Ciklosporin A (+ nerazlučene, * preklapanje)

Protoni	³ J/Hz ; ² J/Hz	Protoni	³ J/Hz ; ² J/Hz	Protoni	³ J/Hz ; ² J/Hz	Protoni	³ J/Hz ; ² J/Hz
1, 2	6.2	35, 36a	*	12b, 13	*	59, 60b	5.0
2, 3	14.6	35, 36b	*	17a, 17b	13.9	60a, 60b	13.2
3, 4a	+	36a, 36b	*	21, 22a	4.0	60a, 61	13.9
3, 4b	+	36a, 37	+	21, 22b	11.8	60b, 61	7.7
4a, 4b	+	36b, 37	+	22a, 22b	14.7	61, 62	6.6
4a, 5	+	37, 38	*	22a, 23	10.27	61, 63	6.6
4b, 5	+	37, 39	*	22b, 23	6.79	67, 68	11.0
5, 6	*	41 NH, 42	7.0	23, 24	3.1	68, 69	*
5, 7	*	42, 43	7.2	23, 25	3.1	68, 70	*
7, 100	*	45 NH, 46	7.6	27 NH, 28	9.2		
7, 8	8.4	46, 47	7.0	28, 29	10.2		
10 NH, 11	9.9	51, 52a	10.7	29, 30	6.4		
11, 12a	7.1/ 8.0	51, 52b	4.7	29, 31	7.0		
11, 12b		52a, 52b	*	53, 54	3.3		
12a, 12b	*	52a, 53	10/6.69	53, 55	3.3		
12a, 13	*	52b, 53		59, 60a	9.0		

Tablica D3. Geminalne i vicinalne konstante sprežanja za rifampicin (+ nerazlučene, * preklapanje)

Protoni	$^3J/\text{Hz}$; $^2J/\text{Hz}$	Protoni	$^3J/\text{Hz}$; $^2J/\text{Hz}$
3a,3b; 6a,6b	*	39, 40	4.6
4a,4b; 5a,5b	*	39, 41	4.6
24, 25	12.8	41, 42	15.3
25, 26	7.3	42, 43	11.4
26, 28	1.3	3a, 3b	*
28, 29	6.8	4a, 4b	*
28, 30	10.6	5a, 5b	*
30, 33	10.8	6a, 6b	*
33, 34	7.0		
33, 35	+		
35, 109OH	5.7		
35, 36	+		
36, 37	7.0		
36, 38	2.0		
38, 110OH	2.0		
38, 39	9.0		

Tablica D5. Geminalne i vicinalne konstante sprezanja za Fdx (+ nerazlučene, * preklapanje)

Protoni	³ J/Hz ; ² J/Hz	Protoni	³ J/Hz ; ² J/Hz	Protoni	³ J/Hz ; ² J/Hz
1, 3	7.15	29, 99OH	3.85	26, 27	14.12
3, 2	7.15	32, 33	9.9	27, 28a	9.81
8, 9	10.09	33, 34a	8.07	27, 28b	2.6
9, 92OH	10.82	33, 34b	2.38	28a, 28b	14.86
9, 10	2.93	34a, 34b	12.84	28a, 29	4.4
10, 11	3.48	34a, 35	7.61	41, 42	6.24
10, 93OH	+	34b, 35	7.61	52, 53	7.15
18, 19a	8.16	33, 12	9.9		
18, 19b	8.16				
19a, 19b	13.89	36a, 36b	11.37		
19a, 20	4.31	37, 38	*		
19b, 20	6.79	38, 44	*		
20, 21	6.02	44, 103OH	+		
21, 96OH	5.14	44, 43	9.72		
21, 22	6.02	43, 41	9.54		
28b, 29	2.6	25, 26	11.92		

Tablica D7. Geminalne i vicinalne konstante sprezanja za Rfmp uz dodatak Ca²⁺ (+ nerazlučene, * preklapanje)

Protoni	³ J/Hz ; ² J/Hz	Protoni	³ J/Hz ; ² J/Hz
3a,3b; 6a,6b	*	38, 39	9,4
4a,4b; 5a,5b	*	39, 40	4,7
24, 25	12,7	39, 41	4,7
25, 26	7,2	41, 42	15,0
26, 28	1,8	42, 43	11,2
28, 29	7,0	3a, 3b	*
28, 30	10,7	4a, 4b	*
30, 33	9,9	5a, 5b	*
33, 34	7,0	6a, 6b	*
33, 35	+		
35, 109OH	5,9		
35, 36	+		
36, 37	7,0		
36, 38	2,0		
38, 110OH	2,0		

Tablica D9. Usporedna tablica literaturnih (lit) i eksperimentalno (eksp) dobivenih rezultata kemijskih pomaka ^1H i ^{13}C za CsA u THF- d_8

Aminokiselina		^1H pomak (lit)	^1H pomak (eksp)	Oznaka	^{13}C pomak (lit)	^{13}C pomak (eksp)	
MeBmt	NMe	3,43	3,43	73	33,26	34,1	
	C $_{\alpha}$ H	5,30	5,30	8	59,55	60,5	
	C $_{\beta}$ H	3,89	3,89	7	73,76	74,7	
	OH	3,89		100			
	C $_{\gamma}$ H	1,69	1,69	5	35,25	36,2	
	C $_{\gamma}$ Me	2,16	0,83	6	18,06	18,9	
	C $_{\delta}$ H	1,79	1,79	4'	34,93	35,9	
	C $_{\delta}$ H'	0,83	2,16	4''	34,93	35,9	
	C $_{\epsilon}$ H	5,40	5,40	3	131,98	132,8	
	C $_{\zeta}$ H	5,24	5,24	2	125,62	126,5	
	C $_{\eta}$ H	1,57	1,57	1	18,06	18,9	
	Abu	NH	8,15	8,17	10		
		C $_{\alpha}$ H	4,99	4,99	11	49,5	50,5
C $_{\beta}$ H		1,68	1,68	12'	25,97	27	
C $_{\beta}$ H'		1,68	1,68	12''	25,97	27	
C $_{\gamma}$ H		0,83	0,83	13	10,39	11,1	
Sar	NMe	3,38	3,38	16	39,25	40,08	
	C $_{\alpha}$ H	4,67	4,67	17'	50,38	51,2	
	C $_{\alpha}$ H'	3,24	3,24	17''	50,38	51,2	
MeLeu	NMe	3,09	3,09	20	31,38	32,15	
	C $_{\alpha}$ H	5,37	5,37	21	55,99	57	
	C $_{\beta}$ H	1,95	1,96	22'	36,8	37,8	
	C $_{\beta}$ H'	1,62	1,62	22''	36,8	37,8	

	C _γ Me	1,46	1,46	23	25,65	26,7
	C _δ H	0,93		24	24,08	nije izašao
	C _δ H'	0,87	0,87	25	21,65	22,6
Val	NH	7,37	7,37	27		
	C _α H	4,71	4,71	28	55,77	56,8
	C _β H	2,48	2,48	29	32,23	33,1
	C _γ H	1,02	1,02	30	20,07	21
	C _γ H'	0,83	0,83	31	18,74	19,6
MeLeu	NMe	3,21	3,21	34	31,64	32,5
	C _α H	5,18	5,18	35	55,63	56,7
	C _β H	2,07	2,08	36'	38,14	39
	C _β H'	1,22	1,22	36''	38,14	39
	C _γ Me	1,86	1,86	37	25,83	26,8
	C _δ H	0,93	0,93	38	24,67	25,6
	C _δ H'	0,81	0,81	39	22,24	23,1
Ala	NH	7,74	7,74	41		
	C _α H	4,34	4,34	42	49,12	50,09
	C _β H	1,30	1,30	43	15,87	16,9
D-Ala	NH	7,35	7,37	45		
	C _α H	4,80	4,80	46	45,64	46,6
	C _β H	1,20	1,20	47	18,06	18,9
MeLeu	NMe	3,17	3,17	50	29,73	30,6
	C _α H	5,69	5,70	51	48,84	49,8
	C _β H	2,07	2,07	52'	40,19	41
	C _β H'	1,20	1,20	52''	40,19	41
	C _γ Me	1,37	1,37	53	25,56	26,5

	C _δ H	0,94	0,88	54	23,74	24,98
	C _δ H'	0,88	0,88	55	22,42	23,2
MeLeu	NMe	2,64	2,64	58	29,84	30,8
	C _α H	5,09	5,09	59	57,94	58,9
	C _β H	2,18	2,18	60'	41,95	42,9
	C _β H'	1,11	1,11	60''	41,95	42,9
	C _γ Me	1,53	1,53	61	25,56	26,5
	C _δ H	1,05	1,05	62	23,95	24,8
	C _δ H'	0,97	0,97	63	24,48	25,39
MeVal	NMe	2,68		66	30,81	31,7
	C _α H	5,20	5,20	67	58,49	59,3
	C _β H	2,18	2,18	68	30,12	31
	C _γ H	0,93	0,93	69	19,18	21,2
	C _γ H'	0,83	0,83	70	20,37	21,23

Tablica D10. Usporedna tablica konstanti sprezanja za čisti uzorak Rfmp i Rfmp nakon dodatka Ca²⁺ iona u THF-d₈

	Rfmp	Rfmp + Ca²⁺		Rfmp	Rfmp + Ca²⁺
Protoni	³ J/Hz ; ² J/Hz	³ J/Hz ; ² J/Hz	Protoni	³ J/Hz ; ² J/Hz	³ J/Hz ; ² J/Hz
3a,3b; 6a,6b	*	*	38, 39	9.0	9,4
4a,4b; 5a,5b	*	*	39, 40	4.6	4,7
24, 25	12.8	12,7	39, 41	4.6	4,7
25, 26	7.3	7,2	41, 42	15.3	15,0
26, 28	1.3	1,8	42, 43	11.4	11,2
28, 29	6.8	7,0	3a, 3b	*	*
28, 30	10.6	10,7	4a, 4b	*	*
30, 33	10.8	9,9	5a, 5b	*	*
33, 34	7.0	7,0	6a, 6b	*	*
33, 35	+	+			
35, 109OH	5.7	5,9			
35, 36	+	+			
36, 37	7.0	7,0			
36, 38	2.0	2,0			
38, 110OH	2.0	2,0			

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Nera Marjanović

Datum rođenja: 01.09.1993.

Mjesto rođenja: Osijek, Hrvatska

Obrazovanje

2000–2008 Osnovna škola Tin Ujević, Osijek

2008–2012 Srednja medicinska škola, Osijek

2012–2015 Preddiplomski studij kemije, Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

2015–2018 Diplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2017 IAESTE stručna praksa, Sveučilište na Malti, Malta

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2016 Otvoreni dan kemije

2017 Otvoreni dan kemije

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. M. Karnaš, N. Marjanović, M. Drulak, M. Jozanović, M. Sak-Bosnar, N. Sakač, *Potentiometric determination of cationic surfactants in liquid disinfectants*, 24. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Zagreb, 2015.