

Spektroskopija NMR u analizi biomolekula

Mihovilović, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:217:559131>

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

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



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Petra Mihovilović

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

SPEKTROSKOPIJA NMR U ANALIZI BIOMOLEKULA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Tomislav Jednačak

Zagreb, 2019. godina

Datum predaje prve verzije Završnog rada: 29. svibnja 2019.
Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita: 12. srpnja 2019.

Mentor rada: doc. dr. sc. Tomislav Jednačak

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. SPEKTROSKOPIJA NMR U ANALIZI BIOMOLEKULA	4
2.1. Strukturna karakterizacija malih molekula.....	4
2.2. Strukturna karakterizacija makromolekula	6
2.3. Proučavanje interakcija liganda i receptora	8
2.3.1. <i>Detekcija kemijskih pomaka liganda</i>	<i>9</i>
2.3.2. <i>Detekcija kemijskih pomaka receptora</i>	<i>10</i>
§ 3. SPEKTRALNO MAPIRANJE LIPIDA A U INTERKACIJI S RECEPTOROM CD14.....	12
3.1. Eksperimentalna izvedba	13
3.1.1. <i>Priprema i izotopno označavanje Kdo₂-lipida A u E. coli</i>	<i>13</i>
3.1.2. <i>Ekspresija i pročišćavanje rekombinantnog sCD14 u P. pastoris.....</i>	<i>13</i>
3.2. Rezultati	14
§ 4. STRUKTURA 2'-O-(2-METOKSI)ETILOM MODIFICIRANOG I C5-METILIRANOG RNA DODEKAMERNOG DUPEKSA.....	18
4.1. Eksperimentalna izvedba	19
4.1.1. <i>Izvedba eksperimenta NMR.....</i>	<i>19</i>
4.1.2. <i>Izračun strukture.....</i>	<i>19</i>
4.1.3. <i>Spektroskopija UV-Vis.....</i>	<i>19</i>
4.2. Rezultati	20
§ 5. KATALITIČKA AKTIVNOST GLIKOZIDAZE – NEKOVALENTNE INTERAKCIJE ENZIM-SUPSTRAT	24
5.1. Eksperimentalna izvedba	24
5.1.1. <i>Eksperiment NMR.....</i>	<i>24</i>
5.2. Rezultati	25
5.2.1. <i>Vežanje za CelB</i>	<i>25</i>
5.2.2. <i>Vežanje za AfβGly.....</i>	<i>28</i>
§ 6. ZAKLJUČAK	30
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	XXXI

§ Sažetak

Spektroskopija NMR predstavlja moćan alat za određivanje strukture, dinamike i interakcije bioloških makromolekula. Informacije o molekulskoj strukturi liganada, receptora i njihovih kompleksa čine osnovu uspješnog dizajna bioaktivnih molekula.^{1,2} Budući da je funkcija i aktivnost biomolekula povezana s 3D strukturom, određivanje funkcijskih skupina i strukturnih elemenata odgovornih za aktivnost, dinamiku i interakciju biomolekula nužno je za razumijevanje molekulskih mehanizama biokemijskih reakcija. Za strukturnu karakterizaciju biomolekula i njihovih interakcija mogu se koristiti tehnike infracrvene i elektronske spektroskopije, cirkularnog dikroizma, optičke rotorske disperzije te dinamičkog raspršenja svjetlosti. Međutim, takve tehnike općenito daju samo grubu sliku makromolekula. S druge strane, višedimenzijske tehnike NMR pružaju detaljan uvid u strukturu i interakcije biomolekula bez potrebe za uništavanjem uzorka. S obzirom da se eksperimenti NMR uglavnom provode u otopini čime se oponašaju uvjeti *in vivo*, biomolekule zadržavaju svoju prirodnu konformaciju ne utječući pritom na afinitet i način vezanja receptora i liganda. Ovaj rad daje pregled najkorištenijih suvremenih tehnika spektroskopije NMR za identifikaciju bioloških makromolekula i njihove međusobne interakcije. Nadalje, kroz konkretne primjere predstavljene su primjene višedimenzijskih tehnika NMR u određivanju struktura organskih liganada, makromolekula te detekciji specifičnih interakcija biomolekula.

§ 1. UVOD

Spektroskopija nuklearne magnetne rezonancije (engl. nuclear magnetic resonance spectroscopy) je analitička metoda koja se koristi za određivanje strukture anorganskih, organskih i bioloških molekula.³

Fenomen nuklearne magnetske rezonancije temelji se na svojstvu nuklearnog magnetizma. Atomske jezgre koje imaju neparan atomski (Z) ili maseni (A) broj posjeduju spin, kvantnomehaničko svojstvo unutrašnjeg impulsa gibanja neovisno o orbitalnom gibanju. Broj dopuštenih spinskih stanja $2I + 1$ koje poprima jezgra definiran je kvantnim brojem nuklearnog spina I . Kvantni broj nuklearnog spina može biti cijeli broj (n), ako je maseni broj paran ili polucijeli broj ($n/2$), ako je maseni broj neparan. Prema tome, jezgre koje se proučavaju spektroskopijom NMR, poput ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{19}F , ^{15}N , moraju posjedovati $I > 0$. Kvantni broj nuklearnog spina definira vektor spinske kutne količine gibanja, P .

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

Pritom je z -komponenta vektora spinske kutne veličine gibanja P definirana nuklearnim magnetskim spinskim kvantnim brojem m_I , koji određuje orijentaciju nuklearnog spina u vanjskom magnetskom polju B_0 i poprima vrijednosti u intervalu $[-I, I]$.

$$P_z = m_I \hbar$$

U odsutnosti vanjskog magnetskog polja B_0 , sva spinska stanja određene jezgre su degenerirana, a u populaciji atoma sva spinska stanja su gotovo jednako popunjena. Primjenom vanjskog magnetskog polja B_0 , spinska stanja više nisu degenerirana, s obzirom da jezgra kao nabijena čestica generira vlastito magnetsko polje. Posljedično jezgra stvara vlastiti nuklearni magnetski moment μ , koji je povezan s iznosom spinske kutne količine gibanja preko relacije:

$$\mu = \gamma P$$

Žiromagnetski omjer γ predstavlja omjer magnetskog i kutnog momenta koji je karakteristika svake pojedine jezgre.

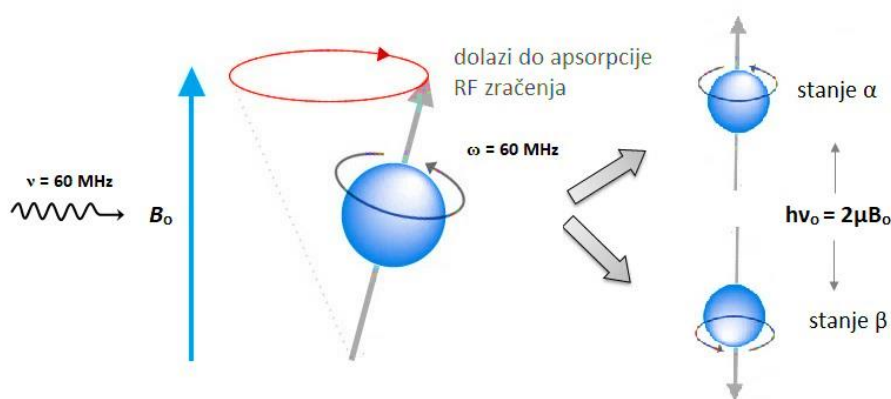
Interakcijom magnetskog momenta jezgre μ s vanjskim magnetskim poljem B_0 spinovi jezgri se raspodjeljuju u $2I + 1$ energetske razine. Energija spinskih stanja odgovara vrijednosti

$$E = -\mu B_0 = -m_I \hbar \gamma B_0$$

U vanjskom magnetskom polju B_0 , jezgra precesira frekvencijom koja se naziva Larmorova frekvencija. Za prijelaz iz stanja m_I u stanje m_{I+1} potrebna je energija fotona koja mora biti jednaka razlici dvaju spinskih stanja $\Delta E = 2\mu B_0 = h\nu_f$. Ako je frekvencija precesije oko vektora vanjskog magnetskog polja B_0 jednaka frekvenciji EMZ, prema relaciji

$$\nu_f = \nu_L = \frac{\gamma B_0}{2\pi},$$

dolazi do rezonancije. Apsorpcijom RF zračenja jezgra prelazi u drugo spinsko stanje (slika 1.1.)⁴.

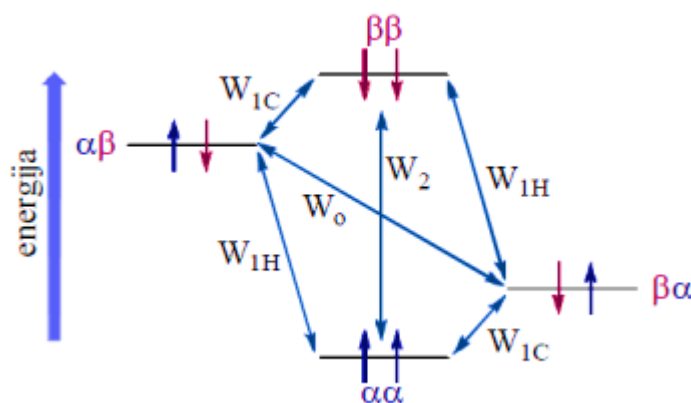


Slika 1.1. Proces apsorpcije RF zračenja - fenomen nuklearne magnetske rezonancije

Spektroskopija NMR je korisna zbog činjenice da ne rezoniraju sve jezgre pri istoj frekvenciji. Ta je varijabilnost posljedica je magnetskog okruženja protona. Vanjsko magnetsko polje B_0 stvara cirkulaciju elektrona u valentnoj ljuski čime se stvara lokalna dijamagnetska struja koja zasjenjuje protone. Efektivno jezgra slabije osjeća magnetsko polje te posljedično precesira pri nižoj frekvenciji.

Nuklearni Overhauserov efekt

Za dobivanje informacija o trodimenzijskoj strukturi molekula mogu se koristiti tehnike koje se temelje na nuklearnom Overhauserovom efektu. Ovaj efekt se očituje kao promjena intenziteta signala uzrokovana promjenom u ravnotežnoj napučenosti spinskih stanja druge jezgre putem mehanizama tzv. križne relaksacije (slika 1.2.). Ravnotežna napučenost može se promijeniti zasićenjem pojedine rezonancije, odnosno izjednačavanjem napučenosti višeg i nižeg spinskog stanja, ili inverzijom napučenosti. Izborna pravila NMR-a dopuštaju prijelaze kod kojih se mijenja orijentacija samo jednog spina (W_{1C} , W_{1H}).



Slika 1.2. Mogući prijelazi spinova jezgri ^{13}C i ^1H .²

Primjenom NOE-a, intenziteti signala promatrane jezgre S mijenjaju se prema jednadžbi:

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

Pritom je γ_I žiromagnetski omjer jezgre s promijenjenom ravnotežnom napučenosti spinova. Obično je jezgra I ona s velikim žiromagnetskim omjerom (^1H), a S ona s malim (^{13}C). Zbog razlike u žiromagnetskom omjeru, energija prijelaza spinova ^{13}C atoma bit će manja od energije potrebne za prelazak ^1H u više stanje.

§ 2. SPEKTROSKOPIJA NMR U ANALIZI BIOMOLEKULA

2.1. Strukturna karakterizacija malih molekula

Strukture malih organskih molekula obično se određuju analizom jednodimenzijskih i dvodimenzijskih spektara NMR.

Tehnika ^1H NMR

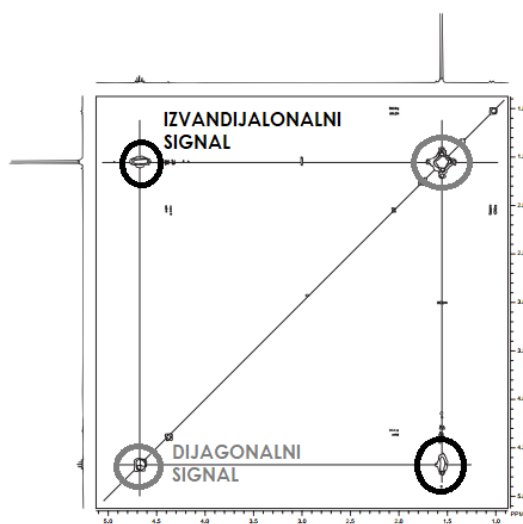
Jednodimenzijski spektar ^1H NMR predstavlja prikaz signala protona čiji su spinovi u rezonanciji s primijenjenom frekvencijom izraženom u obliku kemijskog pomaka. Spektar ^1H NMR daje uvid u strukturu spoja na temelju opaženih kemijskih pomaka i konstanti sprežanja spin-spin. Ovom se tehnikom detektiraju signali kemijski neekvivalentnih protona u spoju. Broj neekvivalentnih protona proporcionalan je omjeru površina ispod pojedinih signala.

Tehnika APT

APT (engl. *attached proton test*) je višepulsna jednodimenzijska tehnika za određivanje multipletnosti heterojezgri (najčešće ^{13}C). Ova tehnika omogućuje razlikovanje ugljikovih atoma prema njihovoj multipletnosti kao i određivanje broja protona direktno vezanih na ugljik.

Tehnika COSY

COSY (engl. *correlation spectroscopy*) je najjednostavnija homonuklearna dvodimenzijska tehnika NMR. Koristi se za dobivanje informacija o povezanosti protona preko skalarne sprege najčešće kroz dvije ili tri kemijske veze. COSY spektar se sastoji od dijagonalnih i izvandijagonalnih (križnih) signala, koji se pojavljuju ako postoji sprega između protona (slika 2.1.).



Slika 2.1. Shematski prikaz korelacija u COSY spektru

Tehnika HSQC

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

Tehnika HMBC

Tehnika HMBC (engl. *heteronuclear multiple bond correlation*) omogućava uvid u spregu ^1H - ^{13}C preko dvije, tri ili četiri kemijske veze. HMBC omogućava detekciju korelacija između atoma koji se nalaze u istom spinskom sustavu, posebice sprege između protona i kvaternog ugljikova atoma, te povezivanje pojedinih molekulskih fragmenata u cjelinu.

Tehnika NOESY

NOESY (engl. *nuclear Overhauser effect spectroscopy*) je dvodimenzijaska tehnika temeljena na križnoj relaksaciji spinova koji su u dipolnoj sprezi. Ova tehnika pruža informacije o prostornoj sprezi spinova te njihovoj međusobnoj udaljenosti.

2.2. Strukturna karakterizacija makromolekula

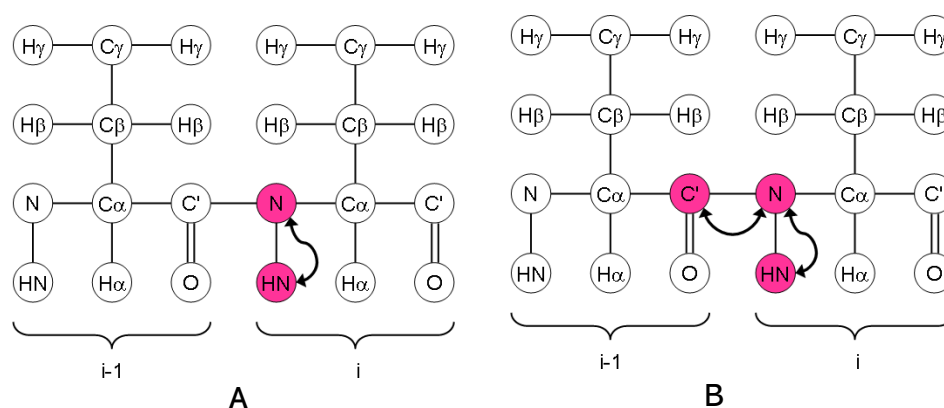
Za karakterizaciju proteina najčešće se koriste tehnike trostruke rezonancije, s obzirom da jednodimenzijske i dvodimenzijske tehnike daju višestruko preklapajuće signale. Trodimenzijske tehnike daju informacije o aminokiselinskoj sekvenciji, a temelje se na heteronuklearnom sprezanju i prijenosu magnetizacije.⁵

Tehnika ^1H - ^{15}N HSQC

U slučaju manjih proteina asignacija peptidne okosnice se može provesti pomoću obilježenog proteina s izotopom ^{15}N . U tu svrhu najčešće korištena metoda dvostruke rezonancije je ^1H - ^{15}N HSQC, koja pokazuje sve N-H korelacije. Spektar ^1H - ^{15}N HSQC je poput otiska prsta i obično prvi heteronuklearni eksperiment izveden na proteinima. Magnetizacija se preko J -sprege prenosi s ^1H na direktno vezani ^{15}N i zatim natrag na proton, gdje se detektira (slika 2.2.A).

Tehnika HNCO

HNCO je najosjetljiviji eksperiment trostruke rezonancije i daje informacije o korelaciji CO–N–HN u okosnici peptida. Kemijski pomak u tehnici HNCO se razvija kroz tri jezgre što rezultira trodimenzijским spektrom. Tehnika se temelji na prijenosu magnetizacije s ^1H na ^{15}N , a zatim selektivno na karbonilni ugljik ^{13}C preko skalarne sprege između ^{15}NH – ^{13}CO . Magnetizacija se zatim prenosi natrag preko ^{15}N do ^1H radi detekcije (slika 2.2.B).



Slika 2.2. Prijenos magnetizacije amidnog dušika ^{15}N unutar istog (i) i prethodnog aminokiselinskog ostatka ($i-1$) u tehnikama (A) ^1H - ^{15}N HSQC (B) HNCO

Tehnika HNCACO

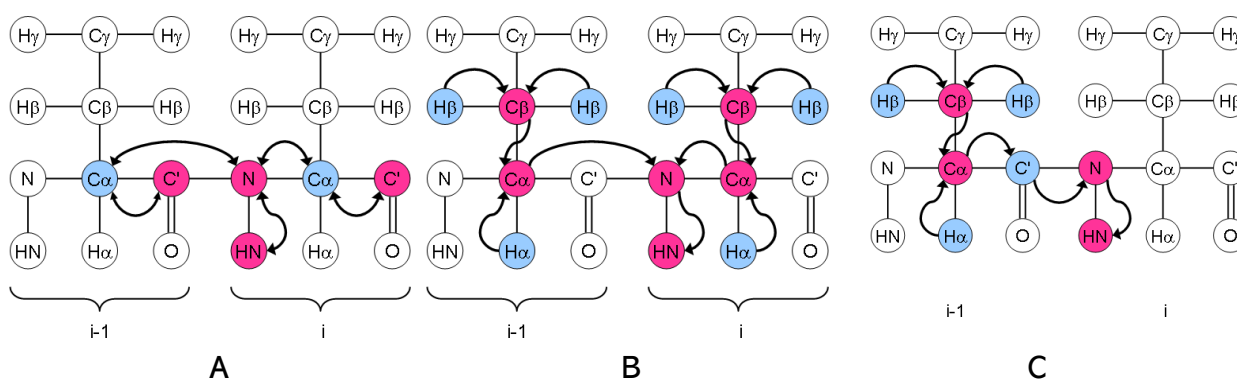
Pomoću tehnike HNCACO mogu se dobiti korelacije između amidnog dušika ^{15}N i C_α prethodne aminokiseline u okosnici. U ovoj tehnici magnetizacija se prenosi s protona na jezgru ^{15}N , a zatim preko skalarne sprege između N i C_α na $^{13}\text{C}_\alpha$. Nakon toga magnetizacija prelazi na ^{13}CO preko J-sprege između $^{13}\text{C}_\alpha$ i ^{13}CO . Kako bi se mogla detektirati, magnetizacija se vraća s karbonilnog ugljika na $^{13}\text{C}_\alpha$, ^{15}N i na kraju ^1H (slika 2.3.A), pri čemu se dobiva trodimenzijski spektar.

Tehnika HNCACB

Eksperiment HNCACB korelira amidni proton s jezgrama $^{13}\text{C}_\alpha$ i $^{13}\text{C}_\beta$ pripadne i susjedne aminokiseline. Magnetizacija se prenosi s protona $^1\text{H}_\alpha$ i $^1\text{H}_\beta$ na jezgre $^{13}\text{C}_\alpha$ i $^{13}\text{C}_\beta$, a zatim s $^{13}\text{C}_\beta$ na $^{13}\text{C}_\alpha$. Nakon toga magnetizacija prelazi na jezgre ^{15}NH , a zatim na ^1HN radi detekcije (slika 2.3.B). Kemijski pomak se razvija istovremeno na $^{13}\text{C}_\alpha$ i $^{13}\text{C}_\beta$, tako da se oni pojavljuju u jednoj dimenziji, dok druge dvije dimenzije predstavljaju pomaci ^{15}NH i ^1HN .

Tehnika HNCOCACB

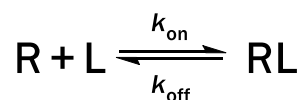
Eksperiment HNCOCACB korelira amidni proton s jezgrama $^{13}\text{C}_\alpha$ i $^{13}\text{C}_\beta$ prethodne aminokiseline. Magnetizacija se prenosi s protona $^1\text{H}_\alpha$ i $^1\text{H}_\beta$ na jezgre $^{13}\text{C}_\alpha$ i $^{13}\text{C}_\beta$, a zatim s $^{13}\text{C}_\beta$ na $^{13}\text{C}_\alpha$. S jezgara $^{13}\text{C}_\alpha$ se magnetizacija najprije prenosi na karbonilni ugljik, zatim na amidni dušik i na kraju na amidni proton, gdje se detektira (slika 2.3.C).



Slika 2.3. Prijenos magnetizacije amidnog dušika ^{15}N unutar istog (i) i prethodnog aminokiselinskog ostatka (i-1) u tehnikama (A) HNCACO (B) HNCACB (C) HNCOCACB⁶

2.3. Proučavanje interakcija liganda i receptora

Vežanje molekule liganda na njegov receptor je reakcija bimolekulske asocijacije koju opisuje jednažba:

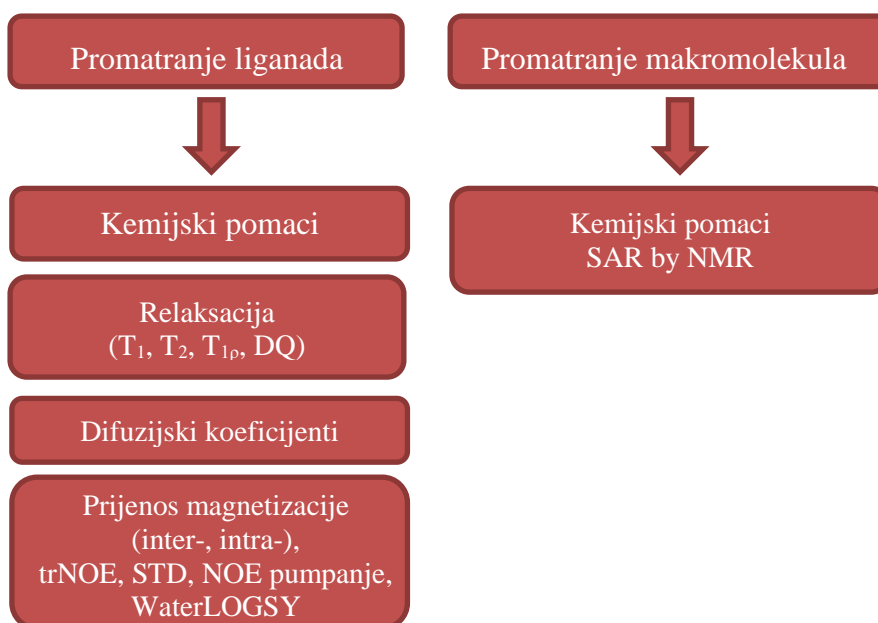


Slijedi da se konstanta disocijacije kompleksa ligand-receptor može izraziti preko jednažbe:

$$K_d = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} = \frac{[R][L]}{[RL]}$$

Razvoj različitih pulsni sljedova NMR omogućio je detekciju interakcija između liganda i receptora. Korištene tehnike temelje se na promjenama NMR parametara liganda ili receptora prilikom međusobne interakcije prilikom stvaranja kompleksa (Tablica 1.)¹.

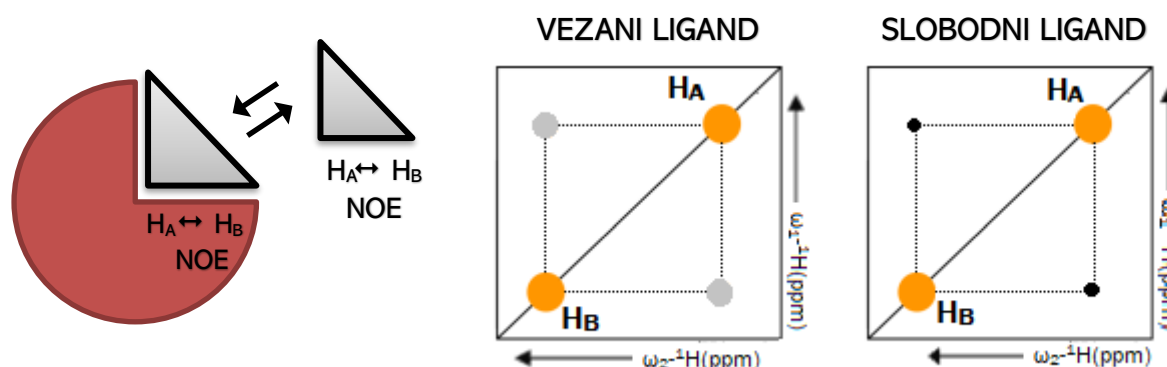
Tablica 1. Promatrani parametri NMR prilikom interakcije receptor-ligand



2.3.1. Detekcija kemijskih pomaka liganda

Tehnika trNOE

Prijenosni NOE (engl. *transferred nuclear Overhauser effect, trNOE*) je dvodimenzijaska tehnika temeljena na efektu NOE koja pruža informacije o konformaciji vezanog liganda.⁷ Tehnika se temelji na različitim predznacima korelacijskih signala (slika 2.4.). Intenzitet signala ovisi o brzini križne relaksacije na koju utječe udaljenost dipolno spregnutih spinova i korelacijsko vrijeme τ_c . Korelacijsko vrijeme proteina je znatno veće ($\tau_c \approx 1$ s) od korelacijskog vremena liganda ($\tau_c \approx 200$ ms). Stoga ligandi daju male pozitivne korelacijske signale, dok makromolekule daju jake negativne signale. Budući da prilikom vezanja na receptor ligand poprima svojstva makromolekule, korelacijsko vrijeme liganda postaje jednako korelacijskom vremenu makromolekule. Kao posljedica, signali NOE mijenjaju vrijednosti i predznak. Eksperiment se obično izvodi u suvišku liganda te signali koji potječu od receptora nisu vidljivi.

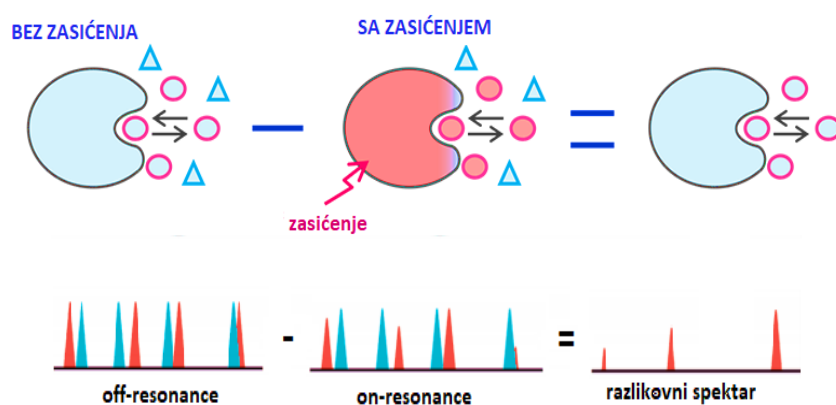


Slika 2.4. Shematski prikaz tehnike trNOE

Tehnika STD

STD-NMR (engl. *saturation transfer difference NMR*) je eksperiment temeljen na nuklearnom Overhauserovom efektu i detekciji signala liganda u rezonanciji.^{8,9} Ovom tehnikom mogu se detektirati ligandi s malim afinitetom vezanja ($K_d = 10^{-8} - 10^{-3}$ mol dm⁻¹) koji su u dinamičkoj ravnoteži između slobodnog i vezanog stanja.

Naime, eksperiment STD daje spektar razlike dvaju eksperimenata (slika 2.5). Prvi eksperiment uključuje spektar dobiven selektivnim zasićenjem proteina dobiven ozračivanjem u području spektra koji uključuje rezonantne frekvencije receptora (*on-resonance* spektar). Ako se ligand veže na protein, zasićenje se prenosi na ligand putem spinske difuzije, koja podrazumijeva prijenos magnetizacije na sve protone preko intermolekulske proton-proton križne relaksacije. Snimanjem spektra detektiraju se smanjeni signali, koji su rezultat prijenosa magnetizacije slobodnih liganda u otopini. Referentni spektar snimljen je bez zasićenja receptora (*off-resonance*). U razlikovnom spektru vidljivi su samo signali liganda koji potječu od prijenosa magnetizacije.



Slika 2.5. Shematski prikaze tehnike STD¹⁰

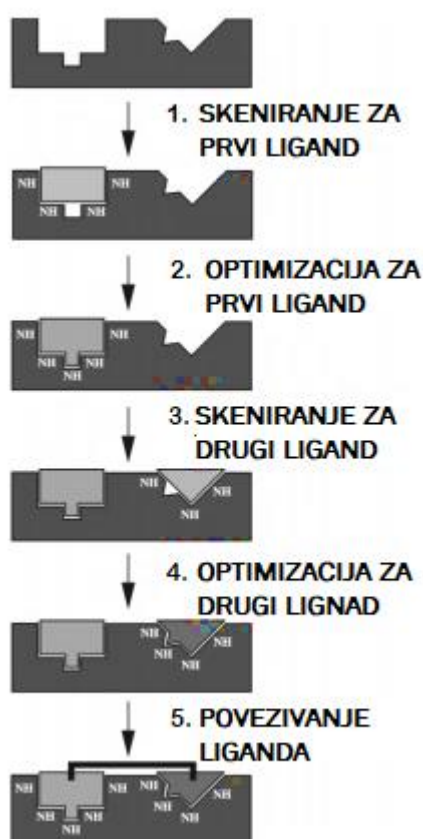
S obzirom da se detektiraju samo signali liganda, tehnika STD-NMR ne zahtijeva upotrebu velikih količina receptora. Robusnost metode i korištenje malih količina receptora čini STD-NMR pogodnom tehnikom za detekciju interakcija protein-ligand. Nadalje, analiza intenziteta signala omogućuje mapiranje veznih epitopa liganda. Na temelju proporcionalnosti intenziteta signala moguće je odrediti skupine ključne za interakcije između receptora i liganda. Stoga će jezgre u blizini veznog mjesta dati intenzivnije signale od onih koje su izložene otapalu.

2.3.2. Detekcija kemijskih pomaka receptora

Tehnika SAR by NMR

Tehnika SAR by NMR (engl. *structure – activity relationship by nuclear magnetic resonance*) je metoda kojom se identificiraju, optimiraju i povezuju male organske molekule, koje se vežu na proksimalna vezna mjesta proteina, tvoreći ligand visokog afiniteta.¹¹

Tehnika se sastoji od pet glavnih koraka kao što je shematski prikazano na slici 2.6. U prvom koraku pretpostavljaju se funkcijske skupine i oblik liganda koji se veže na protein, odnosno pretražuje se skup malih organskih molekula kako bi se identificirale molekule koje se vežu na protein. Vežanje se detektira usporedbom dvodimenzijskih spektara ^1H - ^{15}N HSQC ^{15}N -obilježenog proteinskog receptora u odsutnosti i prisutnosti liganda kako bi se ustanovile promjene u kemijskom pomaku izazvane vezanjem liganda. Dobivene konstante asocijacije bliskih analoga liganda koriste se za optimizaciju veznog mjesta. Zatim se na temelju kemijskih pomaka i korelacijskih signala iz novog spektra ^1H - ^{15}N HSQC identificira i optimira drugi ligand niskog afiniteta. Nakon identifikacije dvaju osnovnih fragmenata, njihovo mjesto i orijentacija u kompleksu određuje se eksperimentalno spektroskopijom NMR ili difrakcijom rendgenskih zraka. Na temelju ovih informacija, dva fragmenta se kemijski povezuju uz točno određeni prostorni raspored. Tako dobiveni ligand se pritom može vezati na protein s visokim afinitetom.

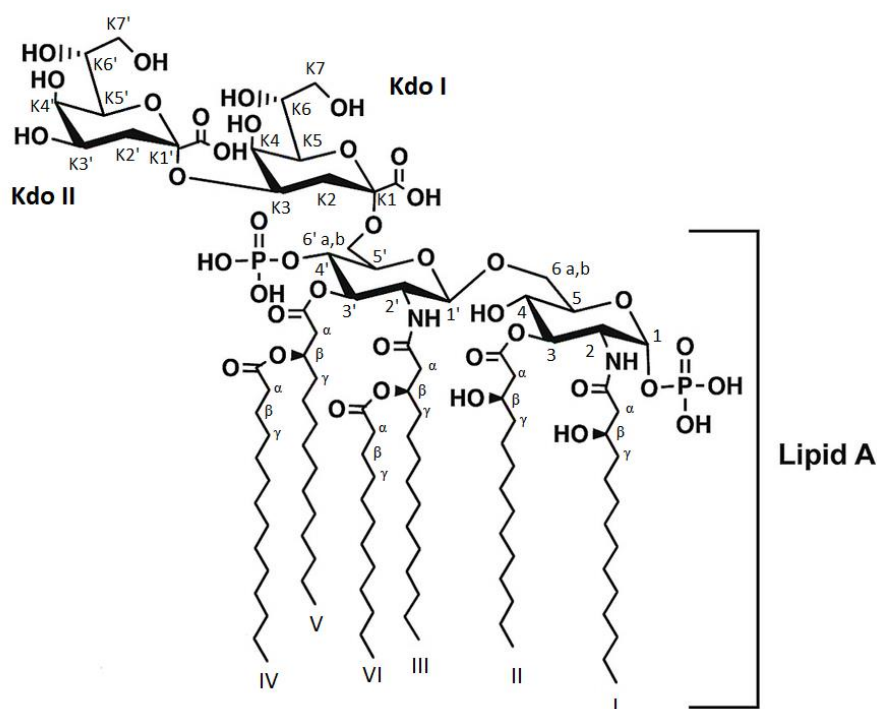


Slika 2.6. Shematski prikaz tehnike SAR by NMR¹²

§ 3. SPEKTRALNO MAPIRANJE LIPIDA A U INTERKACIJI S RECEPTOROM CD14

Topljivi CD14 (sCD14) je serumski glikoprotein koji visokim afinitetom veže lipid A, posebnu lipidnu skupinu lipopolisaharida (LPS). Interakcija sCD14 i lipida A posljedica je reakcije imunološkog sustava na bakterijske endotoksine. Bakterijski endotoksini, poput LPS-a koji izgrađuju vanjsku staničnu stijenku Gram-negativnih bakterija, jaki su imunostimulatori i uzročnici patogeneze sepse u višim organizmima. Kemijski, LPS se sastoji od varijabilnog polisaharidnog područja kovalentno vezanog za fosfolipid A, koji je odgovoran za biološko djelovanje LPS-a.

U istraživanju S. Albright *et al.*¹³ spektroskopija NMR je korištena za mapiranje izotopno obilježenog Kdo₂-lipida A (slika 3.1.) vezanog za sCD14. S obzirom na nedostupnost izotopno obilježenog lipida A sintetizirana je varijanta lipida A koja sadrži disaharid 3-deoksi-D-manooktulosonske kiseline visokog afiniteta prema sCD14. Time je omogućena identifikacija strukturnog područja antagonističkog liganda u interakciji s receptorom sCD14, kao i njihovo dinamičko ponašanje.



Slika 3.1. Struktura Kdo₂-lipida A

3.1. Eksperimentalna izvedba

3.1.1. Priprema i izotopno označavanje Kdo₂-lipida A u *E. coli*

Kdo₂-lipid A je pripremljen iz heptozno-deficijentnog mutanta *E. coli* WBB06 uzgojem soja u M9 minimalnom mediju pri 37 °C tijekom 22–24 sata. Litra medija M9 sadržavala je 7 g Na₂HPO₄, 3,5 g KH₂PO₄, 0,5 g NaCl, 1 cm³ otopine metala u tragovima, 4 g ¹³C₆ D-glukoze, 1 g ¹⁵NH₄Cl i 12 ug cm⁻³ tetraciklina. Ekstrakcijom smjesom otapala CHCl₃ i CH₃OH stanične suspenzije dobiven je Kdo₂-lipid A, koji je pročišćen kolonskom kromatografijom tehnikom normalnih i obrnutih faza. Frakcije središnjeg pika posljednje kromatografske serije ultracentrifugirane su tijekom 15 minuta na 256000 g. Čistoća konačnog produkta procijenjena je na > 90% tankoslojnom kromatografijom i spektrometrijom masa uz analizator MALDI-TOF. Defosforilirani Kdo₂-Lipid A pripremljen je iz Kdo₂-Lipida A kiselom hidrolizom uz dodatak 48% vodene otopine HF tijekom 42 sata pri 2 °C i zatim pročišćen pomoću kromatografije na tankom sloju smjesom otapala CHCl₃:CH₃OH:H₂O (100:87,5:22,5). Gubitak fosfatnih skupina potvrđen je spektrometrijom masa uz analizator MALDI-TOF.

Indukcija nF-κB citokina lipopolisaharidom u stanicama THP1 provedena je kako bi se testirala biološka aktivnost pročišćenog Kdo₂-lipida A i defosforiliranog Kdo₂-lipida A.¹⁴ Nadalje, aktivnost je uspoređena s LPS-om visoke čistoće iz *S. Minnesota* soja R959 (ReLPS). Kao kontrolni eksperiment korištena je aktivacija stanica ligandima.

3.1.2. Ekspresija i pročišćavanje rekombinantnog sCD14 u *P. pastoris*

Slijed gena koja kodira N-terminalnu domenu ljudskog sCD14 koja veže endotoksin (sCD14-EBD) sintetizirana je optimizacijom kodona za kvasac i klonirana pomoću vektora pPICZαA¹⁴. Vektor pPICZαA s domenom sCD14-EBD transformiran je u stanice divljeg tipa *P. pastoris* nanese na agar ploče koje su sadržavale zeocin koncentracije 200 μg cm⁻³ te su inkubirane 3 do 4 dana. Nakon perioda ekspresije, stanična kultura je centrifugirana i supernatant je pročišćen na afinitetnoj kromatografskoj smoli. Kolona je isprana puferom PBS (engl. *phosphate buffer saline*, 137 mmol dm⁻³ NaCl, 2,7 mmol dm⁻³ KCl, 10 mmol dm⁻³ Na₂HPO₄, 1,8 mmol dm⁻³ KH₂PO₄, pH 7,4), koji je sadržavao imidazol koncentracije 20 mmol dm⁻³. Vezani sCD14 je eluiran puferom PBS koji je sadržavao imidazol koncentracije 200 mmol dm⁻³. Protein je dalje pročišćen gel-filtracijom koristeći HiPrep S-100 punjenje u puferu PBS. Frakcije sCD14-EBD su skupljene, ukoncentrirane i okarakterizirane pomoću analize SDS-PAGE i Western blot.

3.1.3. Izvedba eksperimenta NMR

Eksperimenti NMR provedeni su na Varian Unity Inova 600 MHz spektrometru opremljenim krio probom pri 290 K. Snimljeni su dvodimenzijski ^1H COSY i NOESY spektri uzorka neobilježenog Kdo₂-Lipida A koncentracije 1 g dm^{-3} u smjesi otapala $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}:\text{D}_2\text{O}$ (2:3:1). Eksperimenti ^1H - ^{13}C i ^1H - ^{15}N HSQC snimljeni su pomoću ^{13}C i ^{15}N izotopno obilježenog uzorka koncentracije 1 g dm^{-3} u istoj smjesi otapala kako bi se dobile korelacije za ^1H - ^{13}C i ^1H - ^{15}N , uz zamjenu D_2O s H_2O kako ne bi došlo do izmjene amidnih protona. Kao standard za kemijske pomake korišten je natrijev 4,4-dimetil-4-silapentan-1-sulfonat (DSS). Uzorci neobilježenog sCD14 korišteni za eksperimente NMR pripremljeni su u puferu PBS pri koncentraciji od $0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$. Nadalje, pripremljene su otopine ^{13}C , ^{15}N označenog Kdo₂-lipida A i defosforiliranog Kdo₂-Lipida A koncentracije 5 g dm^{-3} , koje su naknadno sonicirane kako bi se dobila ravnomjerna suspenzija liganda. Ligandi su zatim dodani proteinu u molarnom omjeru 1:1. Svaki uzorak je sadržavao i rekombinantni ljudski LBP (engl. *lipopolysaccharide binding protein*) koncentracije $2 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$. Uzorci smjese proteina i liganda inkubirani su 30 min pri 290 K kako bi se osiguralo potpuno vezanje liganda. Spektri ^1H - ^{13}C i ^1H - ^{15}N HSQC snimljeni su za svaki uzorak proteina sa i u odsutnosti liganda. ^1H - ^{13}C i ^1H - ^{15}N HSQC spektri liganada snimljeni su u PBS puferu.

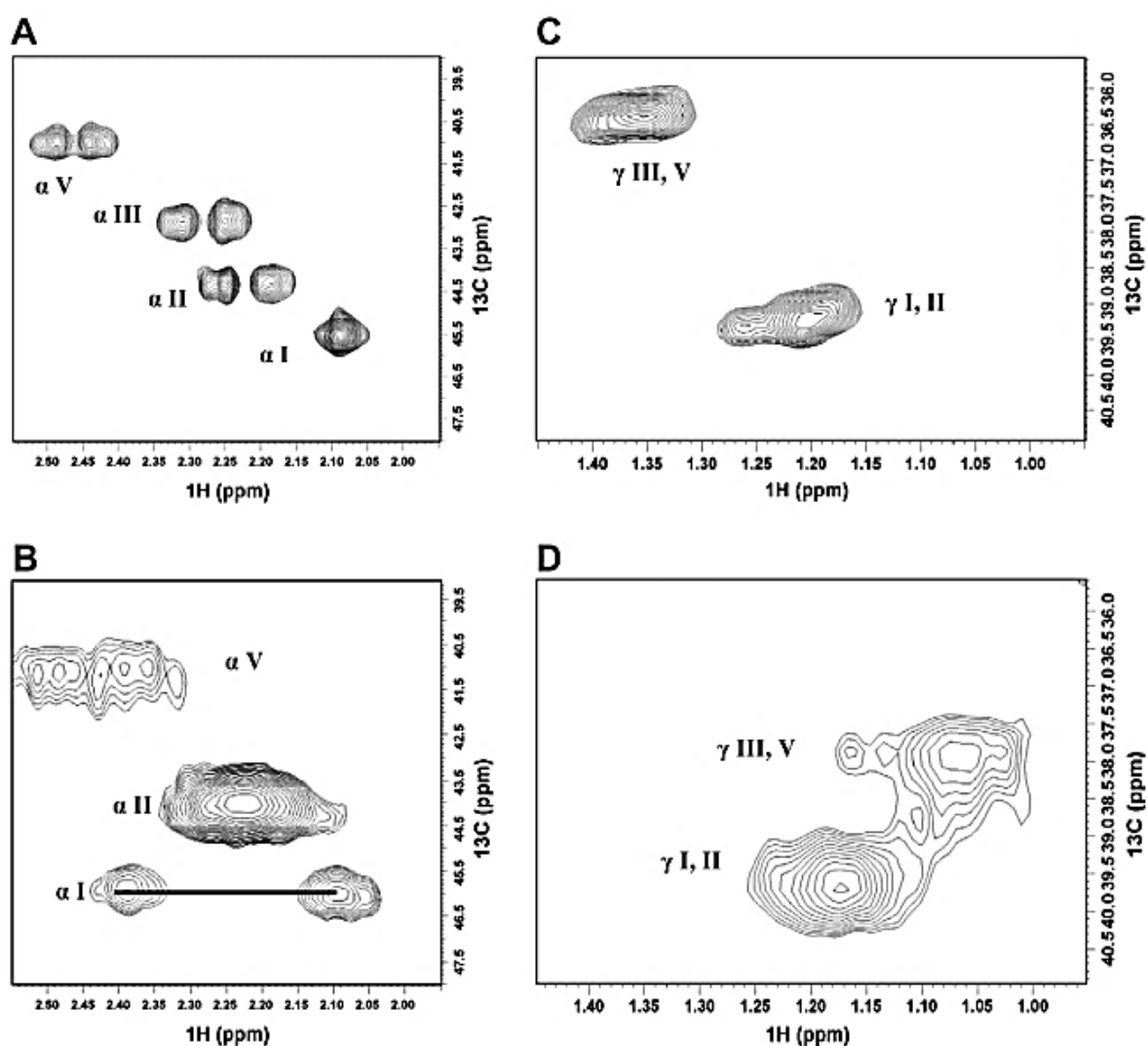
3.2. Rezultati

Sam Kdo₂-lipid A u vodenoj otopini tvori velike agregate ($M > 1 \text{ MDa}$) čiji su prošireni rezonancijski signali u protonskom NMR spektru izvan granica detekcije. Međutim, Kdo₂-lipid A veže se visokim afinitetom na sCD14 u obliku monomernog kompleksa ($K_d \approx 40 \text{ nmol dm}^{-3}$) u prisutnosti katalitičke količine LBP, što rezultira pojavom dobro odijeljenih protonskih signala.

Analizom spektra ^1H - ^{13}C HSQC kompleksiranog Kdo₂-lipida A uočene su rezonancije za terminalne metilne skupine i δ -metilenske skupine lauroilnog, miristoilnog i β -hidroksimiristoilnog lanca uz proširenje signala kao posljedica vezanja na protein. Na temelju analize rezonancija acilnih lanaca predložen je način vezanja lipida A koji uključuje umetanje acilnog lanca u veliki hidrofobni džep sCD14 obložen bočnim ograncima leucinskih ostataka (Leu). Za razliku od ostalih skupina acilnog lanca, skupina δ -CH₂ i terminalna skupina CH₃ (slika 3.2.) pokazuju signale većeg intenziteta uz odsutnost proširenja uzrokovanog protonskom izmjenom. Dobiveni rezultat ukazuje da ovi fragmenti zadržavaju određenu pokretljivost unutar

hidrofobnog džepa i ostvaruju samo nespecifične van der Waalsove interakcije s bočnim ograncima Leu. Na temelju promatranih spektralnih karakteristika procijenjeno je da donja polovica acilnih lanaca Kdo₂-lipida A ostvaruje nepolarne interakcije na udaljenosti 10–12 Å, što odgovara desnoj udubini hidrofobnog veznog džepa receptora sCD14.

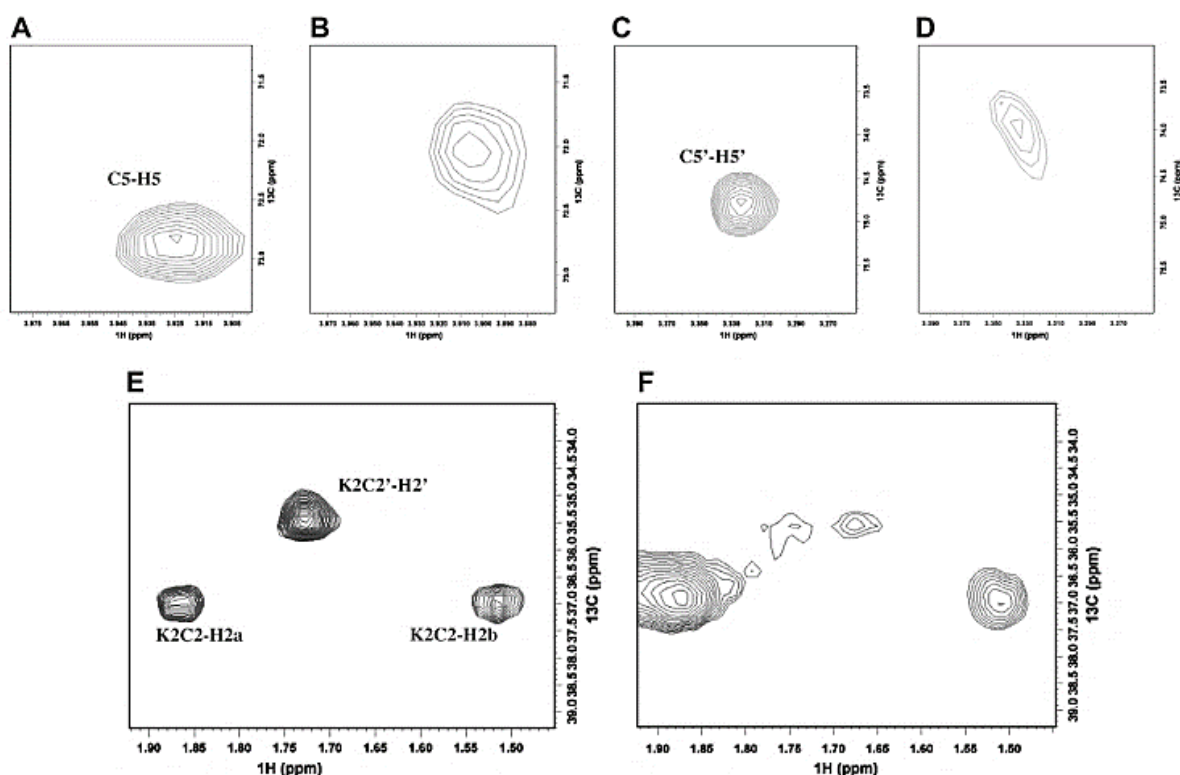
Nasuprot tome, rezonancije α , β i γ -CH₂ skupine znatno ovise o tipu acilnog lanca. Kao što se vidi na slici 3.2., α -CH₂ daje skupinu signala pri niskim kemijskim pomacima, između 2,1 i 2,5 ppm. U kompleksu s sCD14 dolazi do proširenja signala prilikom protonske izmjene protona α -CH₂ skupine u lancima III i V. Signali α -CH₂ lanca V slabo su vidljivi, dok oni iz lanca III nisu uopće vidljivi (slika 3.2.B). Nekoliko prostorno bliskih signala α -CH₂ lanca V upućuje na prisutnost višestrukih veznih konformacija u sporoj ravnoteži s obzirom na vremensku skalu eksperimenta NMR.



Slika 3.2. Spektar ¹H-¹³C HSQC za izotopno obilježeni ¹³C Kdo₂-lipid A gornje polovice acilnog lanca. (A) i (C) Kdo₂-lipid A u CDCl₃:CD₃OD:D₂O (2:3:1) te (B) i (D) kompleks Kdo₂-lipid A s sCD14 u PBS puferu

Signali skupina β i γ -CH₂ slični su signalima skupine α -CH₂. Najveće proširenje signala pokazuju lanci III i V, nakon čega slijede lanci I i II te IV i VI, koji su najmanje pogođeni protonskom izmjenom. Metilenska skupina u položaju γ lanaca III i V daje višestruke signale, slično rezonancijama metilenske skupine u položaju α , što ukazuje na sporo gibanje skupina prilikom interakcije s sCD14. ¹H_N rezonancije lanaca I i III potpuno su proširene u prisutnosti sCD14, što se može objasniti stvaranjem vodikovih veza s polarnim skupinama hidrofilnog ruba sCD14.

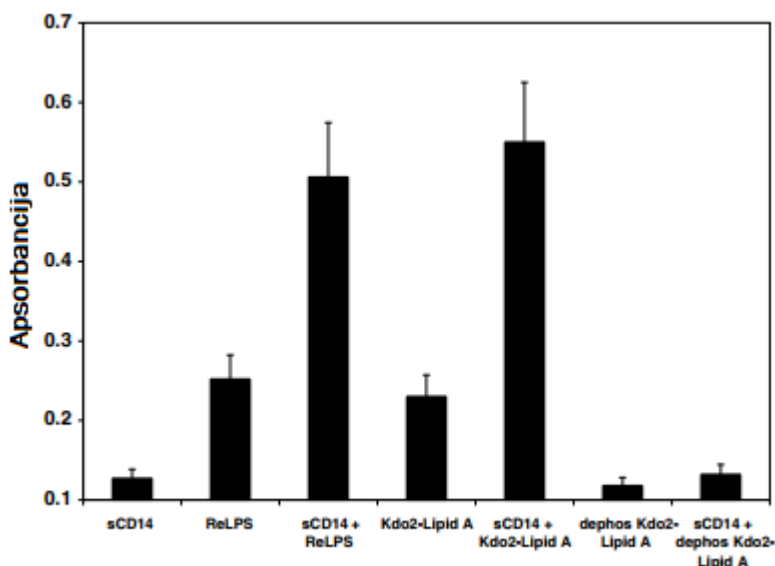
Zbog protonske izmjene prilikom vezanja s sCD14m, dolazi i do proširenja signala šećerne skupine Kdo₂-lipid A. Pritom su se mogli detektirati samo signali protona H5, H5', H6_{ab} i H6'_{ab} (slika 3.3). Za razliku od šećernih skupina lipida A, šećerne jedinice Kdo daju uže signale većeg intenziteta. Jedine iznimke su H2' i H3' skupine Kdo II, koji pokazuju znatno proširenje signala (slika 3.3. F).



Slika 3.3. Spektar ¹H-¹³C HSQC za izotopno obilježeni ¹³C Kdo₂-lipid A šećerne jedinice. (A), (C) i (E) Kdo₂-lipid A u CDCl₃:CD₃OD:D₂O (2:3:1) te (B), (D) i (F) kompleks Kdo₂-lipid A s sCD14 u PBS puferu

Ovi protoni nalaze se na istom kraju kao i 4'-fosfatna skupina, što znatno utječe na interakciju s sCD14. Gibanje karboksilnih skupina šećernih jedinica Kdo smještenih u blizini tih protona stabilizira interakciju 4'-PO₄³⁻ skupine s pozitivnim aminokiselinskim ostacima amfipatskih heliksa i petlji u hidrofilnom rubu sCD14. Takvo kretanje karboksilne skupine u odnosu na 4'-

PO_4^{3-} s premošćavajućim atomom kalcija potvrđeno je i simulacijom molekularne dinamike Kdo₂-lipid A. Uloga fosfatnih skupina Kdo₂-lipida A u veznim interakcijama s sCD14 potvrđena je eksperimentom NMR koristeći potpuno defosforilirani Kdo₂-lipid A, pri čemu nije došlo do vezanja defosforiliranog spoja na sCD14 čak i u prisutnosti LBP (Slika 3.4.).



Slika 3.4. Ispitivanja biološke aktivnosti endotoksinskih liganada sa sCD14. Stimulacija endotoksina procijenjena je apsorbancijom pri $\lambda=630$ nm za nF-KB inducirajući reporter, odnosno izlučenu embrionalnu bazičnu fosfatazu (SEAP)

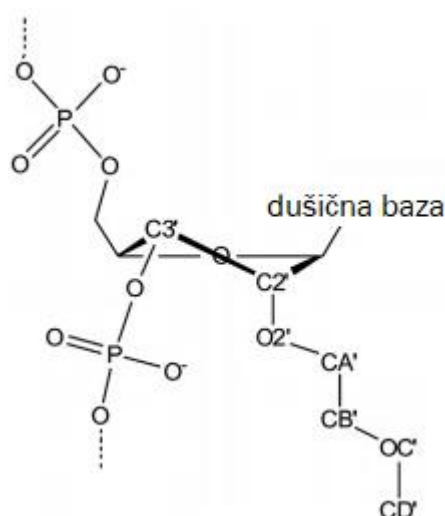
Nadalje, donja polovica šećernih jedinica lipida A, koja sadrži visoki udio polarnih supstituenata unutar amidnih i esterskih veza acilnih lanaca I, III i V, zajedno s fosfatnim skupinama tvore molekularni obrazac koji ostvaruje interakcije s polarnim aminokiselinskim ostacima hidrofилnog ruba sCD14. Budući da se eksperimentima NMR nisu mogle razlikovati rezonancije koje su posljedica direktne interakcije i one sekundarnih interakcija, nije bilo moguće utvrditi koja su područja Kdo₂-lipida A u izravnom kontaktu s sCD14.

Istraživanja kompleksiranog Kdo₂-lipida A metodama NMR pokazala su pojavu spore izmjene na vremenskoj skali kemijskog pomaka za mnoge rezonancije pri čemu se proširenje signala razlikovalo od područja do područja. S obzirom na visoki afinitet proteina prema ligandu, ovakvo diferencijalno dinamičko ponašanje nije bilo u skladu s očekivanjima. Naime, takvi su obrasci ukazali da ligand posjeduje značajnu pokretljivost poprimajući višestruke vezne konformacije, što odgovara velikoj vrijednosti koeficijenta brzine disocijacije k_{off} izmjerene za ovaj kompleks. Ova pretpostavka potvrđena je analizom spektara ^1H - ^{15}N HSQC proteina sCD14 obilježenog s ^{15}N i vezanog na LPS.¹⁴

§ 4. STRUKTURA 2'-O-(2-METOKSI)ETILOM MODIFICIRANOG I C5-METILIRANOG RNA DODEKAMERNOG DUPLEKSA

Struktura palindromskog dupleksa sastavljenog od dodekamera RNA r(*CG*CGAA*U*U*CG*C)d(G) supstituiranog 2'-O-(2-metoksi)etilom (2'-MOE) i sa svim citozinima i uracilima metiliranim u položaju C5 određena je spektroskopijom NMR u otopini. Oligonukleotid ima supstituente MOE na 2'-položaju svakog ribofuranoznog prstena (Slika 4.1.), uz iznimku terminalnog 2'-deoksigvanozina. Analizom spektara NMR dobivene su strukturne informacije koje pružaju uvid u učinke kemijske modifikacije s obzirom na afinitet vezanja na RNA, rezistenciju na nukleazu ili interakciju s ostalim enzimima.

Istraživanje M. Plevnik *et al.*¹⁵ kemijski modificiranog RNA oligonukleotida predstavlja važan doprinos u području farmakologije. Budući da specifično vezanje komplementarnog oligonukleotida RNA za određeni segment mRNA onemogućuje ekspresiju pojedinih gena, istraživanja kemijski modificiranih nukleinskih kiselina dovele su do razvoja lijekova temeljenih na molekulama RNA. Modifikacija na položaju 2' ribofuranoznog prstena osobito je pogodna jer ne aktivira ribonukleazu H, a ujedno ne utječe na interferenciju RNA. Visoki afinitet i specifičnost vezanja, kao i dobra raspodjela u tkivima čini kemijski modificirane oligonukleotide djelotvornim lijekovima protiv bolesti poput karcinoma te neurodegenerativnih, metaboličkih i kardiovaskularnih oboljenja.



Slika 4.1. Struktura 2'-MOE RNA. Furanozni prsten se nalazi u preferiranoj konformaciji N-tipa

4.1. Eksperimentalna izvedba

4.1.1. Izvedba eksperimenta NMR

Neoznačeni oligonukleotid 2'-MOE RNA sintetiziran je primjenom fosforamiditne metode. Spektri NMR snimljeni su u smjesi otapala H₂O:D₂O (9:1) ili čistom D₂O pri fiziološkom pH i koncentracijama 2,5 mmol dm⁻³ oligonukleotida i 100 mmol dm⁻³ NaCl. Spektri su snimljeni na spektrometru Agilent (Varian) Unity INOVA 600 MHz te obrađeni i analizirani softverom.

4.1.2. Izračun strukture

Granične udaljenosti protona dobivene su analizom dvodimenzijskog spektra NOESY u D₂O pri 30 °C uz vrijeme miješanja od 150 ms. Udaljenosti NOE su kalibrirane koristeći metilne protone H6 (2,7Å) C5-metiliranog citozina kao standard. Odgovarajuće vrijednosti za protone podložne brzom izmjeni dobivene su iz spektra NOESY u H₂O pri 5 °C uz vrijeme miješanja od 150 ms.

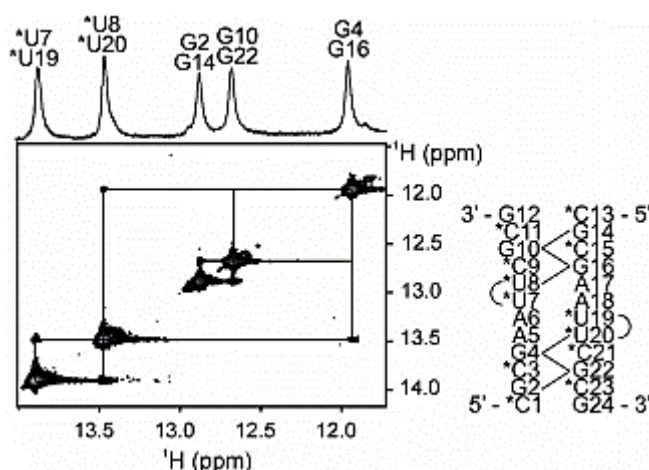
Izračuni strukture provedeni su pomoću SANDER modula AMBER 7.0 softvera i Cornel *et al.*¹⁶ polja sila. Početne strukture su pripremljene simulacijom molekularne dinamike u temperaturnom intervalu od 600 K do 900 K i trajanju od 5 ps. Strukturni izračuni za 50 struktura izvedeni su pomoću generaliziranog Bornovog implicitnog modela solvatacije unutar 20 ps s vremenskim razmakom od 1 fs. Molekula je najprije zagrijana na 500 K (10 ps), zatim je temperatura postupno snižavana na 100 K (8 ps) te na kraju smanjena na 0 K (2 ps). Konstante sile veza za granične udaljenosti atoma i torzijske kuteve iznosile su 50 kcal mol⁻¹ Å⁻² i 500 kcal mol⁻¹ rad⁻².

4.1.3. Spektroskopija UV-Vis

Snimljen je apsorpcijski spektar UV-Vis oligonukleotida pri valnoj duljini $\lambda = 260$ nm. Uzorci oligonukleotida pripremljeni su u rasponu koncentracija od 4 do 150 mmol dm⁻³. Kao pufer je korišten natrijev dimetilarsenat koncentracija 10 i 20 mmol dm⁻³, pri čemu je jedan uključivao 50 mmol dm⁻³ NaCl pri pH 7,3, a drugi 1 mol dm⁻³ NaCl pri pH 7,6. Za termičku analizu korišten je Beckman DU Series 600 spektrofotometar. Uzorak je zagrijavan u temperaturnom rasponu od 40 do 95 °C brzinom zagrijavanja 1,0 °C min⁻¹. Vrijednost molarnog apsorpcijskog koeficijenta ϵ za 2'-MOE RNA iznosi 112 700 dm³ mol⁻¹ cm⁻¹. Termodinamički parametri određeni su iz ovisnosti T_m^{-1} o $\ln[c]$.¹⁷

4.2. Rezultati

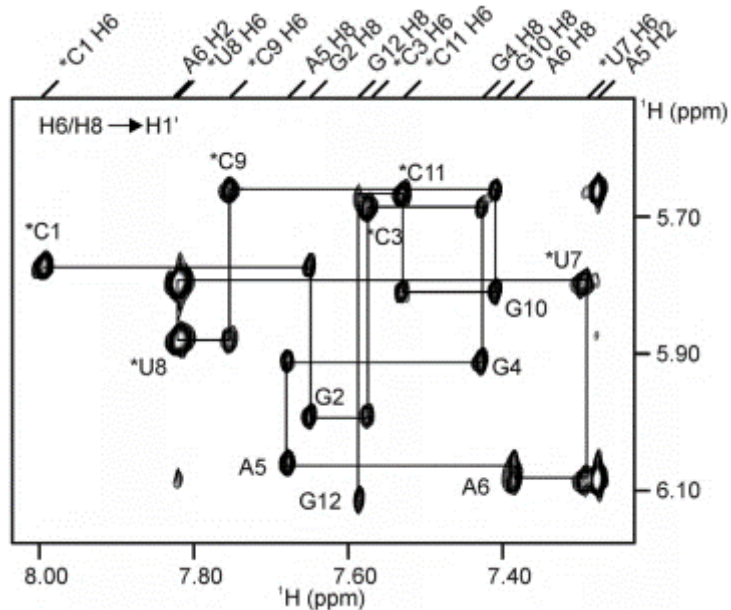
Pročišćena i liofilizirana 2'-MOE RNA otopljena je u H₂O uz dodatak 100 mmol dm⁻³ NaCl i dobivenoj otopini je snimljen spektar NMR. U spektru NOESY vidljiv je jedan skup izvandijagonalnih signala koji uključuje pet imino protona svih G i U, osim terminalnog G12, što upućuje na formiranje simetričnog dimera i daje uvid u sparivanje baza dvolančane RNA (slika 4.2.).



Slika 4.2. Imino regija spektra ¹H NMR i 2D NOESY u smjesi otapala H₂O:D₂O (9:1)

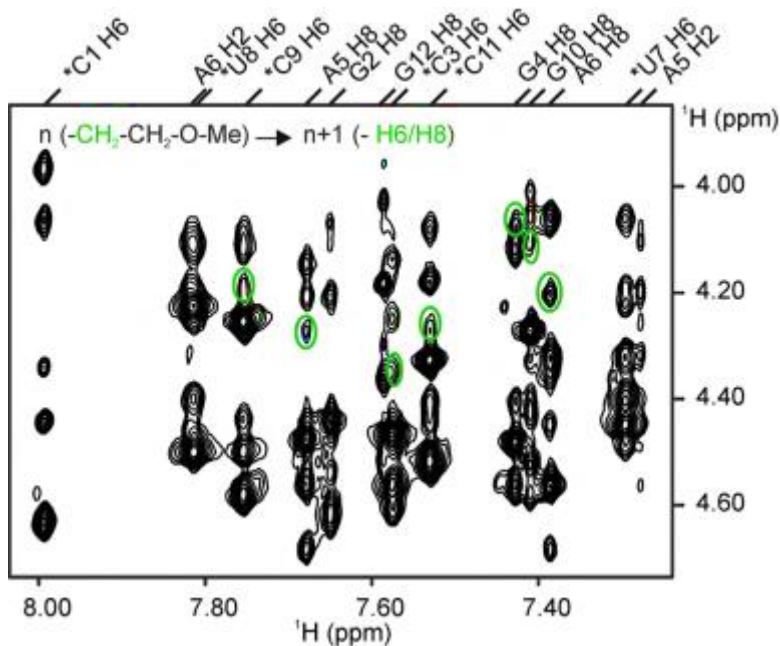
Povezanost parova baza unutar dvolančane RNA određena iz korelacijskih signala NOE između imino protona te protona baza i ribofuranoze. Intenzivan korelacijski signal, koji potječe od protona *U19 imino i A6 H2 ukazuje na Watson-Crickovo sparivanje baza A6 i *U19. Slično tome, snažan NOE signal imino protona A5 H2 i *U20 odgovara sparivanju baza A5 i *U20. Nadalje, izvandijagonalni signal imino protona *U19 i *U20 posljedica je hidrofobnih interakcija slaganja parova baza A5-*U20 i A6-*U19.

Slabi signali NOE između unutarnjih aromatskih protona i anomernog protona riboze ukazuju na činjenicu da sve baze u dvolančanoj RNA zauzimaju takvu konformaciju da je glikozidna veza u anti položaju (slika 4.3.). Budući da ribofuranozni prsten poprima konformaciju *N*-tipa, dvodimenzijski spektar DQF-COSY ne daje korelaciju između protona H1' i H2'. Nadalje, jaki signal NOE, koji potječe od aromatskih i H2' protona, potvrđuje A-oblik RNA s furanoznim prstenom u konformaciji *N*-tipa. Međutim, korelacija između terminalnih G12 H1' i H2' protona, kao i H2'' ukazuje da 2'-deoksiriboza nukleotida G12 poprima konformaciju *S*-tipa.



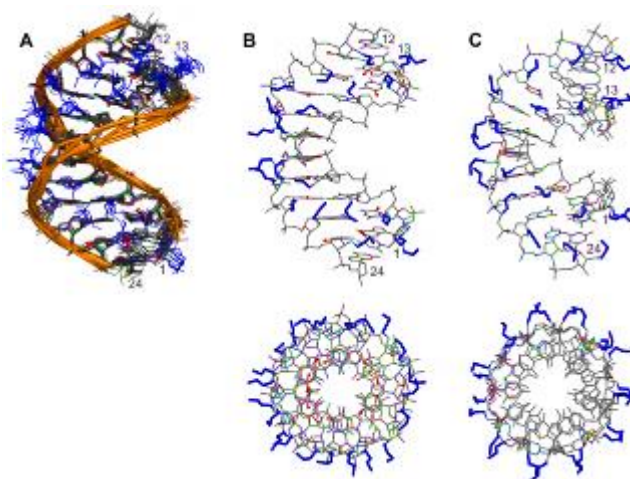
Slika 4.3. Aromatsko-anomerno područje spektra NOESY dvolančane 2'-MOE RNA u D₂O

Na spektru NOESY dvolančane 2'-MOE RNA vidljiva je korelacija između aromatskih protona i protona skupina HA' MOE (slika 4.4.). Nadalje, korelacija aromatskih te HB' s terminalnim HD' protonima skupine MOE pokazatelj je definirane konformacije MOE. Ovoj tvrdnji u prilog idu i izvandijagonalni signali između H1'/H6/H8 i MOE protona te između HA' te protona vezanog na anomerni ugljik.



Slika 4.4. Područje spektra NOESY dvolančane 2'-MOE RNA u D₂O s korelacijama aromatskih protona (n+1) i HA' protona (n) MOE supstituenta

Struktura dvolančane 2'-MOE u otopini dobivena je na temelju graničnih udaljenosti NOE. Dobiveni torzijski kutovi δ ograničeni su na konformaciju *N*-tipa zbog odsutnosti $^3J_{H1',H2'}$ korelacijskih signala u ^{31}P raspregnutom spektru DQF-COSY. Nukleotid dG12 poprima konformaciju *S*-tipa s obzirom na veliku konstantu sprege $^3J_{H1',H2'}$. Glikozidni torzijski kutovi χ poprimaju vrijednosti u rasponu $-120 \pm 90^\circ$, što odgovara *anti*- konformaciji. Budući da signali NOE ukazuju na A-konformaciju dvostruke uzvojnice, torzijski kutovi α , ζ , ϵ fosfatno-šećerne okosnice mogu biti u rasponu $0 \pm 120^\circ$. Simulacijom sustava izračunato je ukupno 50 struktura (slika 4.5.). Dvolančana 2'-MOE RNA s dvostrukom uzvojnicom A-tipa pokazuje ukupno odstupanje korijena srednjeg kvadrata koji iznosi $0,75 \text{ \AA}$ za sve atome. Nadalje, visina okreta 2'-dvolančane MOE RNA iznosi $2,5 \text{ \AA}$, uz okret uzvojnice od $30,6^\circ$.

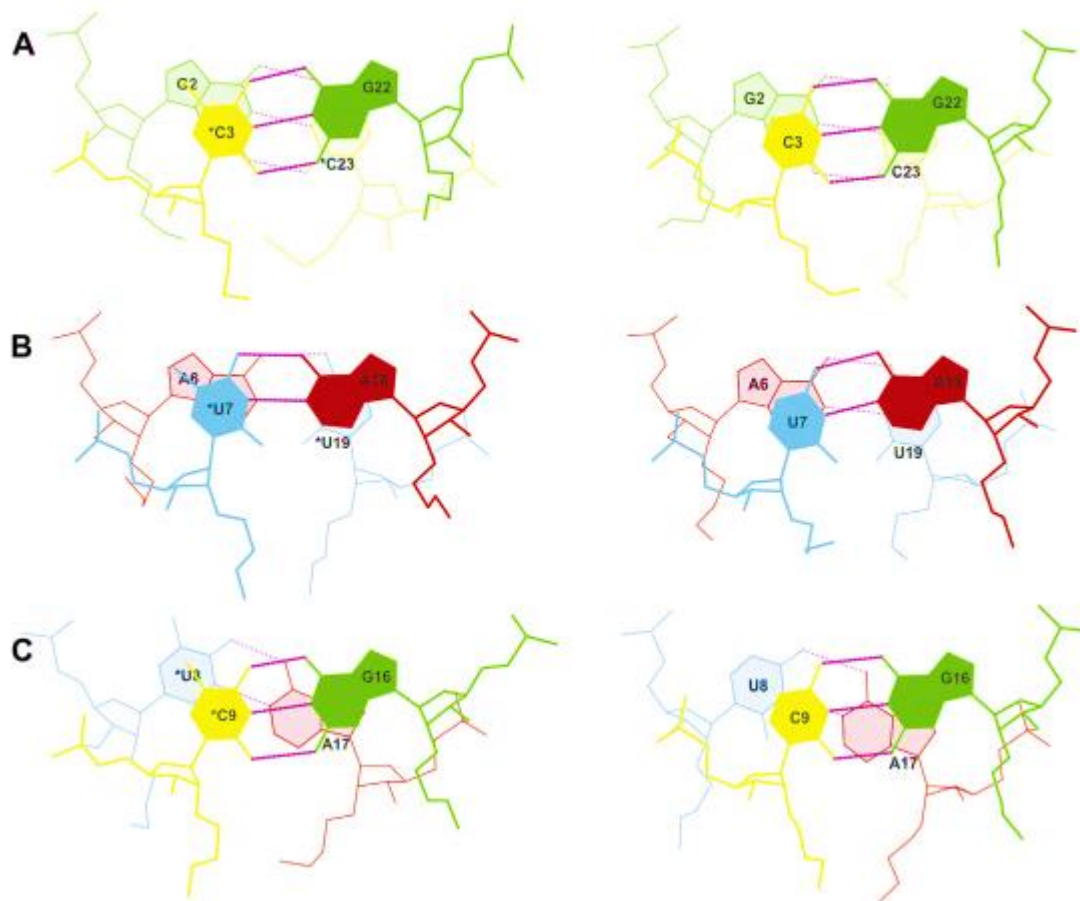


Slika 4.5. (A) superpozicija devet struktura dvolančane 2'-MOE RNA metilirane na ugljikovom atomu u položaju 5 (B) struktura dvolančane 2'-MOE RNA metilirane na ugljikovom atomu u položaju 5 (C) nemetilirana dvolančana 2'-MOE RNA

Preferirana konformacija veza $\text{O2}'\text{-CA}'\text{-CB}'\text{-OC}'$ je g^+ , a *trans*- rotameri su preferirani duž veza $\text{C3}'\text{-C2}'\text{-O2}'\text{-CA}'$ i $\text{C2}'\text{-O2}'\text{-CA}'\text{-CB}'$, što se može objasniti steričkim razlozima. Iako su konformacije skupina MOE određene *gauche* učinkom, one ne utječu na ukupnu strukturu manjeg utora.

Obrasci slaganja susjednih parova baza dobiveni su programom 3DNA (slika 4.6.). Interakcije slaganja parova baza od $*\text{C1G2}/*\text{C23G24}$ do $*\text{C11G12}/*\text{C13G14}$ značajnije doprinose stabilizaciji dvolančane RNA u slučaju metiliranja ugljikova atoma u položaju 5 u odnosu na nemetilirani izomer. Porast površine preklapanja u slučaju metilirane dvolančane RNA ($85,9 \text{ \AA}^2$) u odnosu na nemetiliranu RNA ($59,5 \text{ \AA}^2$) rezultira većom termičkom stabilnošću metiliranog oligonukleotida.

Iako metilacija uracila može rezultirati slabijom vodikovom vezom između Watson-Crickovog para A-*U, interakcija slaganja baza metilirane RNA nadoknađuje izgubljenu energiju stabilizacije.



Slika 4.6. Shematski prikaz interakcije slaganja baza za metiliranu i nemetiliranu dvolančanu 2'-MOE RNA (A) G2*C3/G22*C23, (B) A6*U7/A18*U19, (C) *U8*C9/G16A17

Termičkom UV analizom 2'-MOE RNA pri koncentraciji 1 mol dm^{-3} NaCl dobivena je temperatura mekšanja T_m iznad mjerljivog raspona, dok je pri koncentraciji 50 mmol dm^{-3} NaCl vrijednost T_m za koncentraciju oligonukleotida od 15 mmol dm^{-3} iznosila $83 \text{ }^\circ\text{C}$, a za koncentraciju od 4 mmol dm^{-3} $79 \text{ }^\circ\text{C}$. Analizom podataka dobivene su vrijednosti $\Delta H = 100,2 \pm 12,6 \text{ kcal mol}^{-1}$ i $\Delta S = 259,2 \pm 35,7 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. Na temelju Van't Hoffove jednadžbe ekstrapolirana je vrijednost T_m od $96,5 \text{ }^\circ\text{C}$ pri koncentraciji oligonukleotida od $2,5 \text{ mmol dm}^{-3}$, što je u skladu s protonskim spektrima NMR snimljenima u temperaturnom rasponu od 5 do $90 \text{ }^\circ\text{C}$ pri koncentraciji oligonukleotida od $2,5 \text{ mmol dm}^{-3}$. Usporedba termodinamičkih podataka s podacima nemetilirane dvolančane RNA pokazala je da metilacija pirimidinskih baza na ugljikovom atomu u položaju 5 znatno stabilizira dvolančanu RNA.¹⁸

§ 5. KATALITIČKA AKTIVNOST GLIKOZIDAZE – NEKOVALENTNE INTERAKCIJE ENZIM-SUPSTRAT

Glikozidaze (glikozid hidrolaze), enzimi koji kataliziraju hidrolizu složenih šećera, nalaze visoku primjenu u biotehnologiji s obzirom da pokazuju visoku supstratnu specifičnost i stereoselektivnost. Iako nalaze brojnu praktičnu primjenu, interakcije prilikom nastajanja kompleksa enzim-supstrat nemaju jasnu molekulsku interpretaciju, odnosno nije poznat uzrok visoke supstratne specifičnosti.

L. Brecker *et al.*¹⁹ okarakterizirali su nekovalentne interakcije prilikom vezanja supstrata za enzim β -glikozidazu primjenom spektroskopije STD-NMR. U tu svrhu kao modelni enzimi korištene su β -glikozidaze iz *Pyrococcus furiosus* (CelB) i *Aspergillus fumigatus* BG1 (Af β Gly). Oba enzima su stabilna i posjeduju većinski β -glukozidaznu [EC 3.2.1.21] te u manjoj mjeri β -galaktozidaznu [EC 3.2.1.23] aktivnost.

5.1. Eksperimentalna izvedba

5.1.1. Eksperiment NMR

Uzorci, koji su sadržavali β -glukozidazu koncentracije $7,5 \mu\text{mol dm}^{-3}$ i Tris pufer (25 mmol dm^{-3} ; pH 7,0), pripremljeni su u $0,65 \text{ cm}^3 \text{ D}_2\text{O}$. Za CelB dodano je $7,5 \text{ mmol dm}^{-3}$, dok je za Af β Gly dodano $3,3 \text{ mmol dm}^{-3}$ odgovarajućeg saharida. Visoki suvišak liganda bio je potreban za održavanje suviška supstrata u odnosu na produkt kako ne bi došlo do značajne kompeticije za aktivno mjesto enzima. Kontrolni eksperimenti sa značajno smanjenim suviškom saharida (50 do 200 puta) doveli su do usporedivog spektra STD s nižim omjerom signala i šuma (S/N), što ukazuje da suvišak supstrata ne uzrokuje nastajanje interferirajućih signala.

Protonski spektri NMR snimljeni su na Bruker DRX-600 AVANCE spektrometru frekvencije 600,13 MHz pri 30 °C uz korištenje 5 mm inverzne probe trostruke rezonancije. Kao referentno otapalo za kemijske pomake korišten je aceton pri 2,225 ppm. Za snimanje spektara STD selektivno zasićenje enzima postignuto je nizom od 2, 10, 20, 30, 40 i 60 Gaussovih pulseva intenziteta $\gamma B_1 = 68 \text{ Hz}$ i duljine 50 ms uz odgodu od 1 ms. *Spin lock* puls od 30 ms dodan je

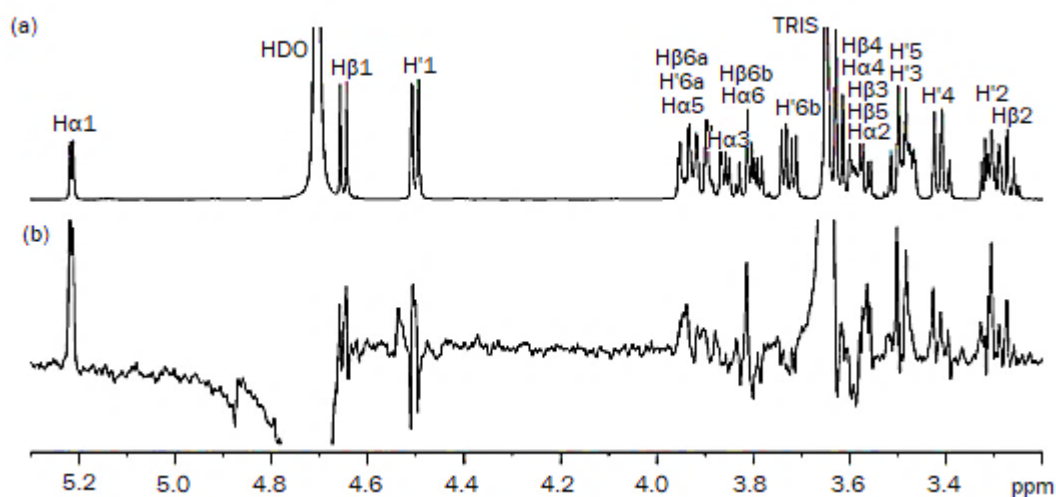
nakon pulsa od $\pi/2$ kako bi se uklonile frekvencije proteina. Razlikovni spektar STD dobiven je tijekom faznog cikliranja te promjenom frekvencije zračenja. Spektar *on-resonance* snimljen je pri $\delta = -2,0$ ppm, dok je za dobivanje spektra *off-resonance* zračenje primijenjeno pri $\delta = 41,66$ ppm i $\delta = -41,66$ ppm.

Za dobivanje efekta STD intenziteti signala u spektrima normirani su s obzirom na intenzitete odgovarajućih signala u referentnom spektru. Budući da se nisu mogli odrediti svi čimbenici koji utječu na prijenos magnetizacije, poput konstante disocijacije kompleksa enzim-supstrat K_d , konformacija vezanih supstrata i strukture Af β Gly, nije se mogla primijeniti analiza matrica ukupne relaksacijske i konformacijske izmjene (CORCEMA) za izračun korigiranih efekata STD. Stoga je maksimalni efekt STD u svakom uzorku bio referenciran sa 100%-tnom vrijednošću te su određeni relativni iznosi za ostale efekte. Analiza relativnih efekata STD omogućila je mapiranje veznih epitopa, ali ne i apsolutnog intenziteta vezanja saharida.

5.2. Rezultati

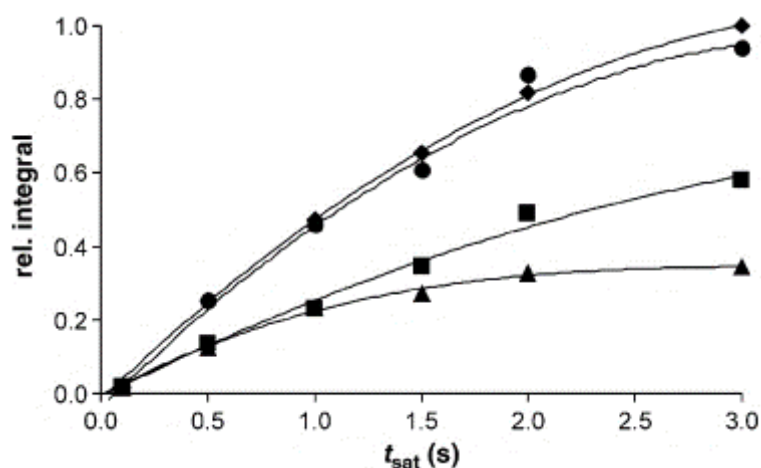
5.2.1. Vezanje za CelB

CelB je hipertermofilan enzim s optimalnom aktivnošću pri temperaturama višim od 90 °C. Pri 30 °C pokazuje slabu aktivnost i stoga je pogodan za eksperimente STD-NMR. Njegova katalitička efikasnost pri 30 °C za hidrolizu celobioze iznosi $9,4 \pm 0,5 \text{ dm}^3 \mu\text{mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, dok pri 70 °C iznosi $8,4 \pm 0,05 \text{ dm}^3 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Slika 5.1. prikazuje spektre STD celobioze u prisutnosti CelB pri 30 °C zajedno s odgovarajućim referentnim protonskim spektrom.



Slika 5.1.(a) Spektar ^1H NMR celobioze (b) spektar STD-NMR celobioze u prisutnosti CelB-a

Slika 5.2. prikazuje pojačanje relativnih efekata STD u ovisnosti o povećanju vremena zasićenja za četiri protona glukoze, što ukazuje da su utjecaji križne relaksacije i spinske difuzije tijekom ozračivanja prilično mali. Također, ovi rezultati pokazuju da ne dolazi do detektibilnog prijenosa magnetizacije između protona. Stoga se efekti STD mogu sa sigurnošću dodijeliti svim protonima u saharidu.



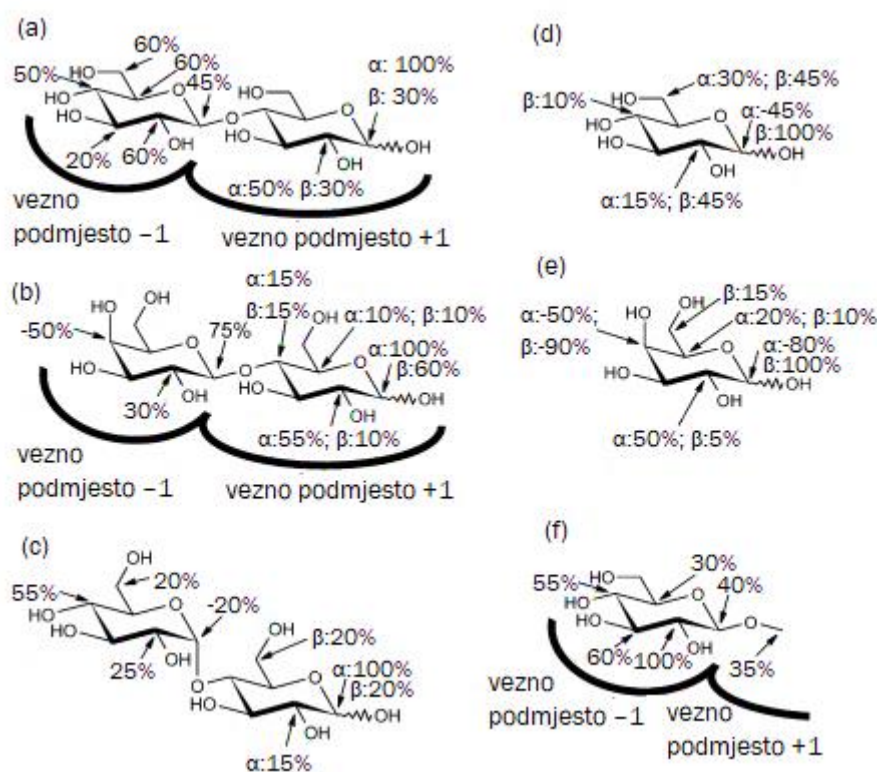
Slika 5.2. Intenziteti signala STD ovisni o vremenu zasićenja (t_{sat}) glukoze vezane za CelB pri 30 ° C. Prikazani su prirasti signala H-1 i H-2 β - glukoze (romb i kvadrat), H-2 α -glukoze (trokut), i sumarno H-6a i H-6b oba anomera glukoze (krug).

Većina protona glukopiranozidne jedinice celobioze daje jake efekte STD ukazujući na prostornu bliskost saharidnih protona i aktivnog mjesta enzima (Slika 5.3.a). Izraženi efekt STD potječe od nekovalentnih interakcija prilikom vezanja geminalnih ili vicinalnih hidroksilnih skupina saharida na funkcijske skupine enzima. Iako jačina interakcije vezanja nije izravno proporcionalna efektu STD, glukopiranozid je najvjerojatnije čvrsto asociran s veznim podmjestom –1. Prema Davies *et al.*²⁰, katalitičko mjesto se nalazi smješteno između vезnog podmjesta +1, gdje se veže izlazna skupina, i podmjesta –1, gdje se veže glikopiranozid.

Obrazac vezanja galaktopiranozidne jedinice laktoze na vezno podmjesto –1 je znatno različito u odnosu na celobiozu, što se odražava u promijenjenim relativnim efektima STD protona od H-3 do H-6 (Slika 5.3.a i b). Stoga je specifičnost CelB-a za hidrolizu celobioze i laktoze rezultat globalno perturbiranih interakcija enzim-supstrat uzrokovanih epimerizacijom C-4 kiralnog centra. Međutim, proton H-4 u laktozi, koji je izravno vezan za epimerni ugljik, pokazuje negativan signal u spektru STD. Sličan učinak pokazuju i epimeri drugih kiralnih centara laktoze (slika 5.3.). Ovakav učinak se objašnjava vezanjem D₂O na položaj izlazne hidroksilne skupine te interferencijom s ligandom tijekom zasićenja i *spin lock* pulsa.

Relativni signali STD glukopiranozidne jedinice maltoze potpuno su različiti od onih u celobiozi (sl. 5.3.c), što ukazuje na različito vezanje supstrata. Različit obrazac vezanja maltoze vjerojatno je posljedica steričke nekompatibilnosti α -1,4-disaharida i veznog mjesta supstrata. Dobiveni efekti STD u skladu su s nemjerljivom aktivnošću CelB-a pri bilo kojoj temperaturi u slučaju maltoze.

Glukopiranozidne jedinice sva tri disaharida vezane na podmjesto +1 pokazuju efekte STD samo za H-1 i H-2, što je naročito vidljivo u slučaju α -anomera. Mali relativni signali STD svih drugih protona u glukopiranozama ukazuju na nespecifično vezanje u skladu s nespecifičnošću β -glikozidaza prema izlaznoj skupini. Metil β -glukopiranozid daje značajne signale STD za gotovo sve protone (slika 5.3.f), iako je zbog kinetike reakcije hidrolitička aktivnost CelB-a pri 30 °C znatno smanjena.



Slika 5.3. Relativni efekt STD za (a) celobiozu (b) laktozu (c) maltozu (d) glukozu (e) galaktozu i (f) metilglukopiranozid vezan na CelB pri 30 °C

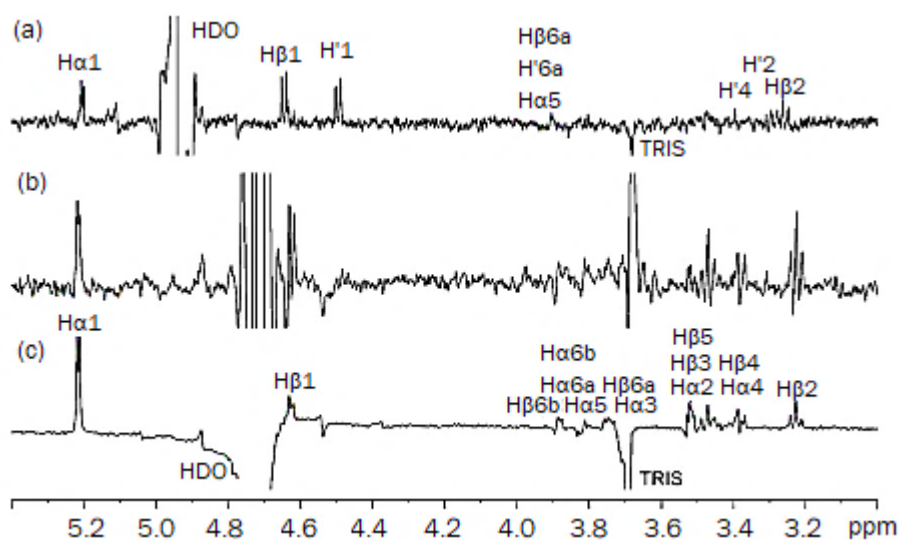
Enzimaska hidroliza homolognih glikokonjugata uključuje konformacijske promjene mehanizmom induciranog pristajanja vezanog glukopiranozida iz stolice (4C_1) u izvijeni čamac (1S_3). Konformacijske promjene uključuju i proton H-2. Prilikom zamjene glukopiranozne

izlazne skupine metanolom dolazi do značajnih promjena u relativnim efektima STD glukopiranozida, što je osobito vidljivo u vrijednostima za H-2 proton. Promjene u signalima ukazuju na različitu veznu konformaciju šećernih jedinica u blizini anomernog središta prilikom vezanja na podmjesto –1. Prema tome, vezanje glikopiranozida i izlaznih skupina je međusobno neovisno.

Inkubacijom isključivo glukoze ili galaktoze sa CelB-om opaženi su veliki efekti STD za β -anomerni proton H-1, dok su za ostale protone bili znatno manji (slika 5.3.d i e). Ovi obrasci vezanja ukazuju na to da efekti STD slobodnih monosaharida uglavnom potječu od interakcija s veznim podmjestom +1. Stoga je vezanje na podmjesto –1 prilično slabo ili alternativno iznimno čvrsto ($k_{\text{off}} < 10 \text{ s}^{-1}$), što dovodi do niskih efekata STD.

5.2.2. Vezanje za Af β Gly

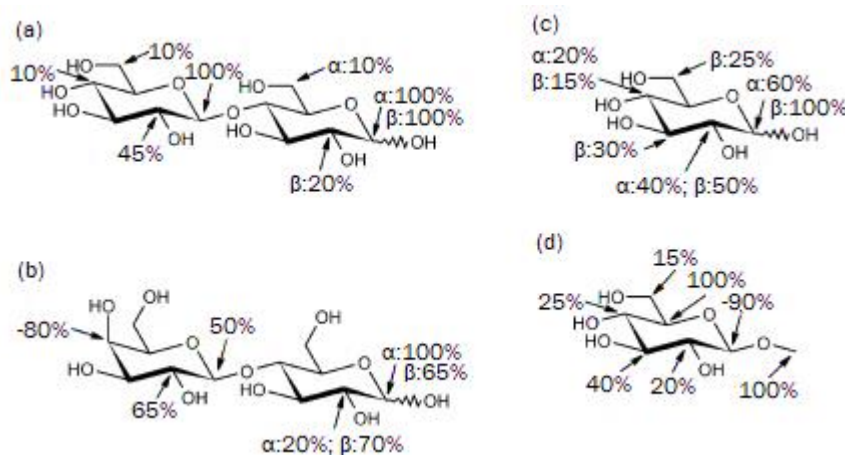
Katalitička efikasnost hidrolize celobioze Af β Gly-om, koja pri 30 °C iznosi $0,91 \pm 0,1 \text{ dm}^3 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, veća je za dva reda veličine od katalitičke efikasnosti CelB-a. No, pri 10 °C smanjuje se oko 15 puta. Efekti STD za celobiozu su prilično mali, što upućuje na to da se koeficijent brzine disocijacije kompleksa enzim-supstrat k_{off} razlikuje od odgovarajuće k_{off} vrijednosti za celobiozu vezanu na CelB pri 30 °C.



Slika 5.4. Spektar STD celobioze u prisutnosti Af β Gly pri (a) 10 °C i (b) 30 °C (c) obrazac STD za slobodnu glukozu pri 30 °C

Najizraženiji relativni efekti STD opaženi su u anomernim položajima obje jedinice glukoze, pri čemu α i β -protoni glukopiranozida pokazuju slične intenzitete signala (slike 5.4.a i 5.5.a). Dobiveni rezultati ukazuju na činjenicu da celobioza brzo hidrolizira dajući glukozu, koja se otpušta u otopinu nakon što nastane u većim količinama.

Budući da se celobioza nalazi u velikom suvišku u otopini, slobodna glukoza ne konkurira za aktivno mjesto enzima. Stoga efekti STD glukoze potječu od nekovalentnih interakcija prisutnih tijekom katalitičkog procesa. Relativni efekti STD slobodnih molekula glukoze ukazuju na izražene interakcije na položajima 1 i 2, što odgovara obrascu vezanja za svaku od sastavnih jedinica celobioze pri 10 °C. Kada se u otopinu Af β Gly doda slobodna glukoza pri 30 °C, glukoza pokazuje sličan obrazac vezanja u odnosu na onaj opažen u eksperimentu konverzije (Slika 5.4.c). Međutim, odnos S/N se značajno povećava i ukazuje na različitu kinetiku vezanja.



Slika 5.5. Relativni efekti STD za (a) celobizu pri 10 °C (b) laktozu pri 30 °C (c) glukožu pri 30°C i (d) metilglukopiranozid pri 30 °C vezan na AfGly

Vezni epitopi glukopiranozidne izlazne skupine laktoze pri 30 °C usporedivi su s onima izlazne skupine celobioze pri 10 °C (Slika 5.5.a i b). Međutim, oni daju nešto veći efekt STD, od onog za α -anomerni oblik vezanog na Af β Gly. Nadalje, usporedba efekata STD celobioze pri 10 °C i laktoze pri 30 °C ukazuje na različite relativne efekte kod H-1, H-3 i H-4 u glikopiranozidnim jedinicama i na različito vezanje galaktopiranozidne jedinice. Iz dobivenih rezultata može se uočiti da obrazac vezanja na vezno podmjesto –1 jako ovisi o strukturi izlazne skupine. Metil β -glukopiranozid pokazuje najjači efekt STD za H-5, dok kod celobioze to vrijedi za H-1 (Slika 5.5.a i d).

Usporedba efekata STD prikazana na slikama 5.3. i 5.5. pokazuje da β -glikozidi i njihovi sastavni monosaharidi međusobno interagiraju drukčije sa CelB-om i Af β Gly-om. Različita vezna interakcija β -glikozida i monosaharida sa CelB-om i Af β Gly-om ukazuje na suptilne strukturne razlike veznih džepova dvaju enzima.

§ 6. ZAKLJUČAK

Rezultati su pokazali da je spektroskopijom NMR moguće odrediti kompletnu strukturu bioloških makromolekula, poput dvolančanog dodekamera RNA modificiranog 2'-*O*-(2-metoksi)etilom i metiliranog na ugljikovom atomu u položaju 5. Nadalje, moguće je provesti NMR spektralno mapiranje, odnosno definiranje područja molekule lipida A na koje utječu vezne interakcije s receptorom sCD14. Osim toga, spektroskopija STD NMR omogućuje identifikaciju strukturnih karakteristika aktivnog mjesta enzima β -glikozidaze koje određuju visok afinitet enzima prema različitim supstratima. Odabirom optimalnih eksperimentalnih uvjeta i NMR tehnika moguće je provesti kompletnu karakterizaciju strukture biološki aktivnih molekula te dinamiku njihovih interakcija što predstavlja važan preduvjet u dizajnu i sintezi lijekova.

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. P. Novak, T. Jednačak u Z. Mandić (ur.), *Physico-chemical methods in drug discovery*, IACP, Zagreb, 2011, str. 189–231.
2. O. Zerbe, *BioNMR in Drug Research*, John Wiley & Sons, New York, 2006, str. 79.
3. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA Tiskara Varaždin, Varaždin, 2013.
4. D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz, J. R. Vyvyan, *Introduction to spectroscopy*, Brooks/Cole, Belmont, 2008, str. 110.
5. J. Cavanagh, W. J. Fairbrother, A. G. Palmer III, N. J. Skelton, *Protein NMR Spectroscopy – Principles and Practice*, Academic Press, London, 2007, str. 613–654.
6. <https://www.protein-nmr.org.uk> (datum pristupa 20. travnja 2019.)
7. E. Yuriev, P. A. Ramsland, *Structural Glycobiology*, CRC Press, New York, 2012, str. 38.
8. A. Viegas, J. Manso, F. L. Nobrega, E. J. Cabrita, *J. Chem. Educ.* **88** (2011) 990–994.
9. B. Meyer, T. Peters, *Angew. Chem. Int. Ed.* **42** (2003) 864–890.
10. <https://www.jeol.co.jp/en/applications/detail/1615.html> (datum pristupa 20. travnja 2019.)
11. A. Bortoluzzi, A. Ciulli u D. Huddler, E. R. Zartler, *Applied Biophysics for Drug Discovery*, John Wiley & Sons Ltd., New York, 2017, str. 161.
12. B. J. Stockman, C. Dalvit, *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.*, **41** (2002) 187–231.
13. S. Albright, P. Agrawal, N. U. Jain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **378** (2009) 721–726.
14. S. Albright, B. Chen, K. Holbrook, N.U. Jain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **368** (2008) 231–237.
15. M. Plevnik, M. Cevec, J. Plavec, *Biochim.* **95** (2013) 2385–2391.
16. T.E. Cheatham, P. Cieplak, P.A. Kollman, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **16** (1999) 845–862.
17. J.D. Puglisi, I. Tinoco, *Methods Enzymol.* **180** (1989) 304–332.
18. M. Teplova, G. Minasov, V. Tereshko, G.B. Inamati, P.D. Cook, M. Manoharan, M. Egli, *Nat. Struct. Biol.* **6** (1999) 535–539.
19. L. Brecker, G. D. Straganz, C. E. Tyl, W. Steiner, B. Nidetzky, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **42** (2006) 85–89.
20. G.J. Davies, K.S. Wilson, B. Henrissat, *Biochem. J.* **321** (1997) 557–559.