

# Konformacijska pretraga strukturnih derivata azitromicina i njihovo molekulsko uklapanje u peptidil-transferazni centar velike podjedinice ribosoma bakterije *Escherichia coli*

---

Škevin, Sonja

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:085885>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-31**



Repository / Repozitorij:

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



Prirodoslovno-matematički fakultet

Sveučilište u Zagrebu

Biološki odsjek

Sonja Škevin

Konformacijska pretraga strukturnih derivata azitromicina i njihovo molekularno uklapanje u peptidil-transferazni centar velike podjedinice ribosoma bakterije *Escherichia coli*

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za fizikalnu kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta  
Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Branimira Bertoše.

Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta  
Sveučilišta u Zagrebu, radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

## **Zahvale**

Ovu priliku koristim da bih se zahvalila svom mentoru, izv. prof. dr. sc. Branimiru Bertoši na svom strpljenju koje je imao za mene i za sve stvari koje me naučio. Zahvale idu mojoj obitelji koji mi nikad nisu rekli da nešto nije moguće, mojim prijateljima i Matiji za podršku cijelo ovo vrijeme. Bez njih usklađivanje studija i bavljenja sportom ne bi bilo moguće. Jedno veliko hvala ide kolegici Nini Čorak koja je odvojila svoje vrijeme da sa mnom podijeli iskustvo sa svog istraživanja, te svim ostalim kolegama koji su studiranje učinili ljepšim iskustvom.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### **Konformacijska pretraga strukturnih derivata azitromicina i njihovo molekulsko uklapanje u peptidil transferazni centar velike podjedinice ribosoma bakterije**

*Escherichia coli*

SONJA ŠKEVIN

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Makrolidni antibiotici u širokoj su upotrebi od pedesetih godina dvadesetog stoljeća. Tijekom njihove dugogodišnje upotrebe u medicini i veterini došlo je do pojave rezistencije. Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti vezanje deset strukturnih derivata azitromicina u regiju PTAR ribosoma bakterije *Escherichia coli* metodom molekuskog uklapanja. Prvi korak bio je pretražiti konformacijski prostor svakog liganda metodom Monte Carlo uz korištenje četiri različita modela otapala. Najzastupljeniji konformeri korišteni su kao početne strukture u računima molekuskog uklapanja u regiju PTAR bakterijskog ribosoma. Računima molekuskog uklapanja izračunat je afinitet svih deset liganada za vezanje u vezno mjesto PTAR bakterijskog ribosoma. S obzirom da se rezistencija na makrolide temelji na dimetilaciji A2058 ili A2058G supstituciji, pronađen je ligand s najvećim potencijalom za aktivnost protiv bakterija rezistentnih na makrolide. Kod tog liganda, pet pronađenih energijski najpovoljnijih načina vezanja ne ostvaruje interakcije s A2058. Analiza rezultata računa molekuskog uklapanja za svih deset liganada ukazala je na važnost  $\pi$ - $\pi$  interakcija za stabilizaciju liganda u veznom mjestu. Predložena su tri nova liganda kod kojih bi potencijal za ostvarivanje  $\pi$ - $\pi$  interakcija u veznom mjestu PTAR ribosoma bakterije *Escherichia coli* trebao biti još izraženiji.

(62 stranice, 27 slika, 14 tablica, 23 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici, PMF – Biološki odsjek, Marulićev trg 20, Zagreb

Ključne riječi: makrolidi, računalna biologija, konformacijska pretraga Monte Carlo, molekulsko uklapanje

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Ocjenitelji: Izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće  
Izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša  
Izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Rad prihvaćen: 30.04.2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation thesis

### **Conformational search of azithromycin structural derivatives and their docking into peptidyl-transferase center of *Escherichia coli* large ribosomal subunit**

SONJA ŠKEVIN

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Macrolides are widely used antibiotics since 1950s. Their extensive use in medicine and veterinary medicine has led to the development of resistance. Goal of this thesis is to study binding of ten structural derivatives of azithromycin to PTAR region of *Escherichia coli* ribosome using computational methods, primarily docking. First step was to conduct Monte Carlo conformational searches of all ten ligands using four different solvent models. The representative conformers were used as input structures for docking study of their binding into bacterial PTAR. Binding affinities of all ten ligands into *E. coli* PTAR were obtained. Ligand that does not interact with A2058 within its five best binding modes was identified. That ligand is considered as the one with the greatest potential of effectiveness against macrolide resistant bacteria since bacterial resistance to macrolides is based on A2058 dimethylation or A2058G substitution. Analysis of the results obtained by docking pointed to the importance of  $\pi$ - $\pi$  interactions for ligand stabilisation within bacterial PTAR. Three ligands with enhanced potential for  $\pi$ - $\pi$  interactions within *Escherichia coli* PTAR are proposed for further research.

(62 pages, 27 figures, 14 tables, 23 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library, Faculty of Science – Department of Biology, Marulićev trg 20, Zagreb

Keywords: macrolides, computational biology, Monte Carlo conformational search, molecular docking

Supervisor: Dr. sc. Branimir Bertoša, Associate professor

Reviewers: Dr. sc. Ivana Ivančić Baće, Associate Professor  
Dr. sc. Branimir Bertoša, Associate Professor  
Dr. sc. Martina Šeruga Musić, Associate Professor

Thesis accepted: 30.04.2020.

## Sadržaj:

1. Uvod:.....	9
1.1 Funkcija i građa ribosoma: .....	9
1.2 Makrolidni antibiotici.....	10
1.2.3 Rezistencija na makrolidne antibiotike .....	13
1.3 Računalne metode u biofizici.....	13
1.3.1 Metode koje se temelje na polju sila.....	14
1.3.2 Optimizacija.....	14
1.3.3 Monte Carlo konformacijska pretraga .....	15
1.3.4 Molekulsko uklapanje .....	15
1.4 Ciljevi istraživanja.....	16
2. Materjali i metode .....	17
2.1 Konformacijska pretraga.....	17
2.2 Klasteriranje i probir liganada.....	19
2.3 Molekulsko uklapanje .....	19
3. Rezultati .....	20
3.1 Konformacijska pretraga liganada .....	20
3.2 Molekulsko uklapanje .....	24
4. Diskusija .....	31
4.1 Monte Carlo konformacijska pretraga.....	31
4.2 Molekulsko uklapanje .....	35
4.2.1 Intramolekulske interakcije u veznom mjestu .....	35
4.2.2 Intermolekulske interakcije u veznom mjestu .....	36
4.3 prijedlog za daljnja istraživanja.....	37
5. Zaključak.....	39
6. Popis literature: .....	40
7. Dodatak .....	42

7.1. Najpovoljniji konformeri pronađeni Monte Carlo konformcijskom pretragom u četiri modela otapala.....	42
7.2 Energije vezanja, intramolekulske i intermolekulske interakcije pojedinih načina vezanja dobiveni računima molekuskog uklapanja.....	52



## Popis kratica:

<b>mRNA</b>	glasnička ribonukleinska kiselina (eng. <i>messenger ribonucleic acid</i> )
<b>tRNA</b>	transportna ribonukleinska kiselina (eng. <i>transfer ribonucleic acid</i> )
<b>rRNA</b>	ribosomska ribonukleinska kiselina (eng. <i>ribosome ribonucleic acid</i> )
<b>PTC</b>	peptidil-transferazni centar (eng. <i>peptidil-transferase center</i> )
<b>PTAR</b>	regija povezana s peptidil-transferazom (eng. <i>peptidyl transferase-associated region</i> )
<b>PRCG</b>	algoritam konjugiranih gradijenata po Polaku i Ribièreu (eng. <i>Polak-Ribière conjugate gradient</i> )
<b>TNCG</b>	Newtonova metoda konjugiranog gradijenta (eng. <i>truncated-Newton conjugate-gradient</i> )
<b>MCMM</b>	Monte Carlo algoritam (eng. <i>Monte Carlo multiple-minima</i> )
<b>RMSD</b>	korijen kvadrata srednje vrijednosti odstupanja (eng. <i>root mean square deviation</i> )

Napomena: numeracija nukleotida i aminokiselina u ovom radu označava numeraciju koja se koristi za opis biopolimera bakterije *Escherichia coli*, osim ako je napomenuto da se radi o drugoj vrsti. Vodikove veze su na slikama prikazane plavom isprekidanom linijom, a hidrofobne i  $\pi$ - $\pi$  interakcije sivom isprekidanom linijom.

# 1. Uvod:

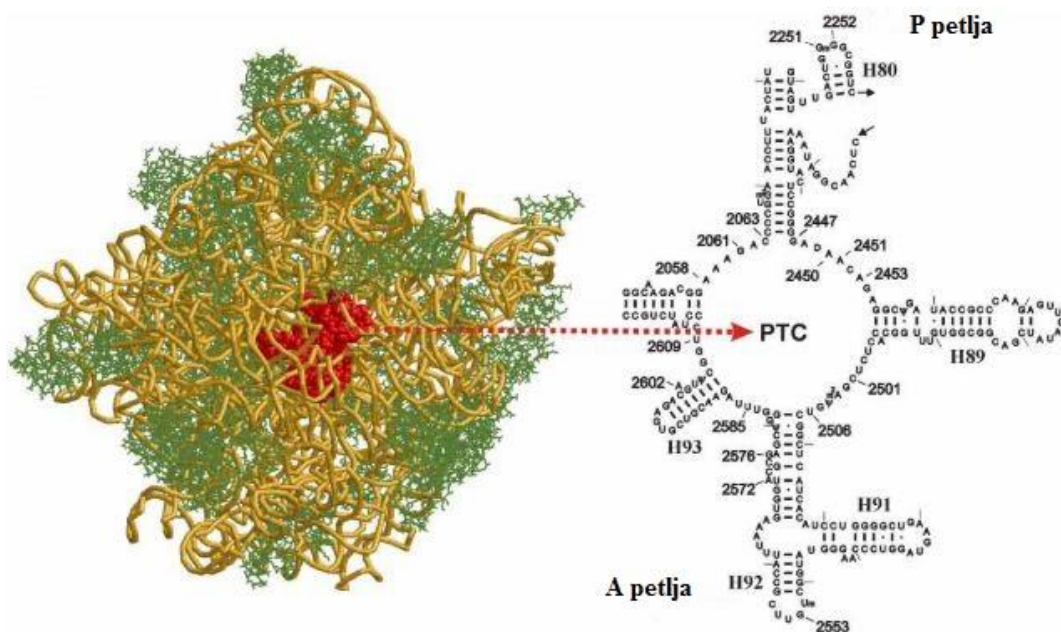
## 1.1 Funkcija i građa ribosoma:

Ribosom je veliki nukleoproteinski kompleks koji u svim živim bićima ima ulogu translacije proteina prema kalupu mRNA. Prokariotski ribosom sastoji se od male (30S) i velike (50S) podjedinice. Mala podjedinica sastoji se od 16S RNA i 21 proteinskog lanca, a velika od 23S i 5S rRNA i 34 proteinska lanaca. Eukariotski ribosom nešto je veći (80S) i razlikuje se u proteinskom sastavu i sekvenci rRNA. Mala podjedinica eukariotskog ribosoma sastoji se od 18S rRNA i oko 30 proteina, a velika podjedinica sastoji se od 28S, 5.8S i 5S rRNA te oko 45 proteina. Proteini koji sudjeluju u određenim fazama translacije pridružuju se i odvajaju od ribosoma za vrijeme translacije pa proteinski sastav ribosoma nije konstantan (Cooper i Hausman, 2007). Ribonukleinski dio ribosoma ima ulogu u održavanju strukture te u pozicioniranju tRNA na mRNA i katalitičkoj aktivnosti stvaranja peptidne veze. Glavna uloga proteinskog dijela ribosoma je formiranje i stabilizacija jezgre ribosoma istovremeno dozvoljavajući konformacijske promjene u rRNA potrebne za efikasno odvijanje sinteze proteina. Svaki ribosom u velikoj podjedinici ima jedno vezno mjesto za mRNA i tri vezna mjesta za tRNA: mjesto A (eng. *aminoacyl-tRNA site*), mjesto P (eng. *peptidyl-tRNA site*) i mjesto E (eng. *exit site*). Sinteza proteina započinje pozicioniranjem 30S podjedinice ribosoma na AUG kodon s pomoću Shine-Dalgarnove signalne sekvence na mRNA. S kodonom AUG na mRNA sparuje se antikodon na tRNA za koju je vezan formilmetionin (fMet-tRNA<sup>fMet</sup>), te se podjedinica 30S spaja s podjedinicom 50S tako tvoreći inicijacijski kompleks 70S (Nelson i Cox, 2008). Jednom kada je sinteza proteina započela, nova aminokiselina dodaje se na proteinski lanac u četiri glavna koraka: (i) vezanje tRNA u mjesto A, (ii) formiranje peptidne veze, (iii) pomicanje velike jedinice ribosoma i (iv) pomicanje male podjedinice ribosoma (Alberts et al., 2008)

Peptidna veza formira se u peptidil-transferaznom centru (PTC, od eng. *peptidyl-transferase center*) 50S podjedinice ribosoma (**Slika 1.**). Područje 50S podjedinice ribosoma koje obuhvaća katalitičku jezgru i ulaz u izlazni tunel ribosoma zove se PTAR (od eng. *peptidyl transferase-associated region*). Integritet PTAR-a je ključan za sintezu proteina, a time i za preživljavanje organizma. To ga čini dobrom metom nekoliko vrsta antibiotika kao što su makrolidi, linkozamidi i kloramfenikol (Harms et al., 2003).

Funkcija PTC-a je precizno pozicionirati univerzalne krajeve peptidil tRNA sekvence CCA i aminoacil-tRNA u PTC-u tako što ostvaruje ključne interakcije s nekoliko konzerviranih 23S rRNA nukleotida. Sparivanje C74 i C75 na peptidil tRNA s G2253 i G2252 na P-petlji

23S rRNA, te interakcije A76 s A2450 i C2501 fiksiraju donorski supstrat. Sparivanje C75 aminoacil-tRNA s G2553 iz 23S rRNA te interakcije A76 s U2506 i G2583 23S rRNA drže akceptor na mjestu. U kristalnoj strukturi 50S podjedinice ribosoma *Haloarcula marismortui* s vezanim supstratima, konzervirani nukleotid A2451 na 23S rRNA najbliže je  $\alpha$ -amino skupini aminoacil-tRNA. Dušik na poziciji 3 u adeninu i 2' hidroksilna skupina na ribozi nalaze se unutar 4 Å, odnosno unutar udaljenosti u kojoj je moguće stvaranje vodikove veze, od  $\alpha$ -amino skupine aminoacil-tRNA što čini A2451 najvjerojatnijim sudionikom u katalizi peptidne veze. Njegovo pozicioniranje u PTC-u postignuto je mrežom vodikovih veza u koje su uključeni visoko konzervirani nukleotidi 23S rRNA G2447, A2450 i G2061. Nekonzvencionalni parovi baza A2453-C2499 i A2450-C2063 locirani su u blizini A2451, a zbog njihovog gotovo neutralnog pKa potencijalno imaju ulogu u ovisnosti peptidil-transferazne reakcije o pH-u. U prvom koraku peptidil-transferazne reakcije  $\alpha$ -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> na aminoacil-tRNA je deprotonirana, najvjerojatnije molekulom vode, i nastaje nukleofilna NH<sub>2</sub> skupina koja nukleofilno napada karbonilnu skupinu peptidil-tRNA. Prijelazno tetraedarsko stanje raspada se prelaskom protona NH<sub>2</sub> skupine na kisik izlazne tRNA i dobiva se krajnji produkt: deacetilirana tRNA u P mjestu i peptidil-tRNA dulja za jednu amino kiselinu u A mjestu (Polacek i Mankin, 2005).

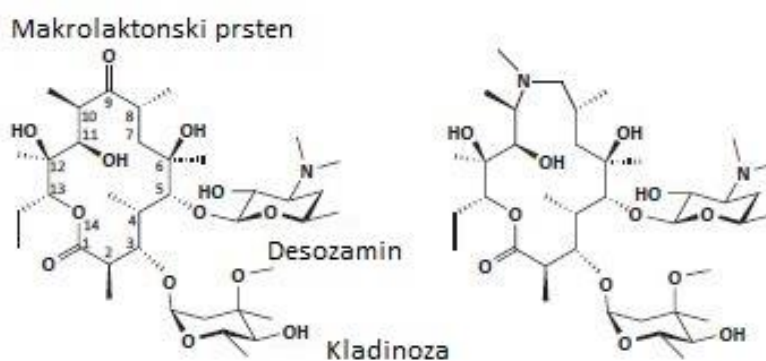


**Slika 1.** Peptidil-transferazno mjesto prokariotskog ribosoma. Slika preuzeta iz Polacek and Mankin, 2005.

## 1.2 Makrolidni antibiotici

Makrolidi su prirodni poliketidni sekundarni metaboliti aktinomicetskih vrsta bakterija. Sastoje se od 14-, 15- ili 16-članog laktonskog prstena koji je najčešće supstituiran neutralnim

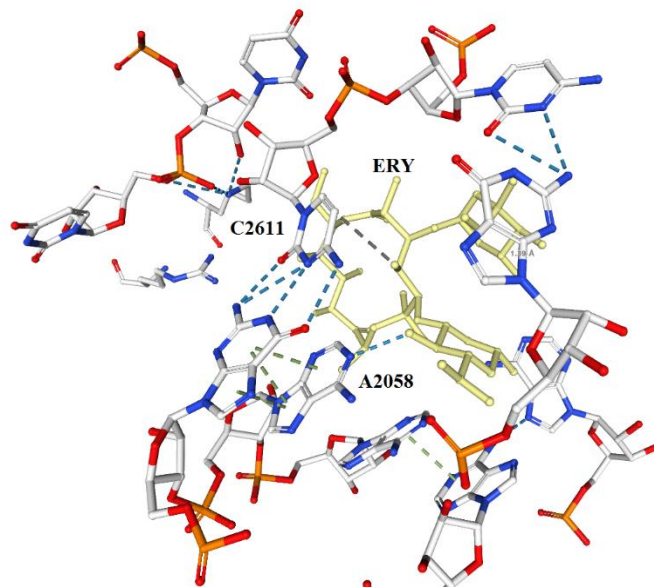
ili amino šećerom. Antibiotičko djelovanje makrolida temelji se na vezanju za 50S podjedinicu bakterijskog ribosoma što sprječava translaciju. Visoka konzerviranost ribosoma kroz bakterijske vrste te veliki afinitet makrolida za bakterijski ribosom zaslužni su za njihov širok spektar djelovanja. Od otkrića prvog makrolida eritromicina (**Slika 2.**) 1952. godine, sintetizirano je mnogo derivata koji imaju bolju bioraspodjelivost, stabilnost i farmakokinetiku. Makrolidi su prvenstveno djelotvorni protiv Gram-pozitivnih bakterija poput stafilokoka, streptokoka i diplokoka. Imaju ograničenu djelotvornost protiv Gram-negativnih bakterija, ali svejedno se koriste u liječenju infekcija uzrokovanih bakterijama *Neisseria gonorrhoea*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*. Vrlo su učinkoviti protiv raznih vrsta mikoplazmi. Zbog niskog afiniteta vezanja za 80S ribosom, nisu učinkoviti u ubijanju eukariotskih stanica. Niski afinitet vezanja za eukariotski ribosom temelji se na tome što eukariotska rRNA na poziciji 2058 ima gvanin za razliku od adenozina kod prokariota, ali to nije jedina razlika odgovorna za slabije vezanje makrolida na eukariotski ribosom (Dinos, 2017).



**Slika 2.** 2D struktura eritromicina (lijevo) i azitromicina (desno) (preuzeto iz (Vázquez-Laslop and Mankin, 2018)).

### 1.2.1 Eritromicin

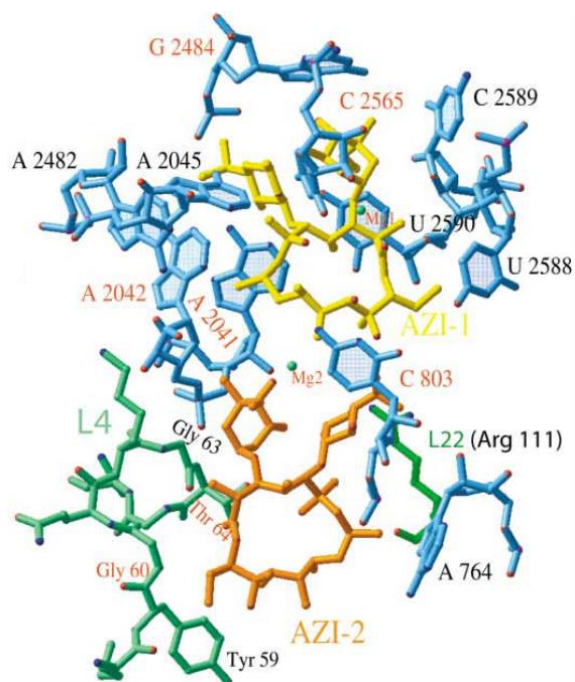
Eritromicin je prvi otkriveni makrolid, 1952. godine dobiven je iz bakterije *Streptomyces erythreus*. Sadrži 14-člani makrolaktonski prsten supstituiran šećerima desozaminom i kladinozom na pozicijama 5 i 3. Kao i ostali makrolidi, eritromicin inhibira sintezu proteina tako što se veže za 50S podjedinicu ribosoma i inducira disocijaciju peptidil-tRNA s ribosoma za vrijeme elongacije proteinskog lanca (Enzler, 1999). Hidroksilna skupina desozamina tvori vodikovu vezu s N1 atomom A2058 23S rRNA 50S podjedinice. Makrolaktonski prsten stvara hidrofobne interakcije s nukleotidima C2611 i C2057 u izlaznom tunelu peptida (**Slika 3.**) (Dunkle et al., 2010).



**Slika 3.** Vežanje eritromicina u PTAR-u ribosoma *E. coli* pronađeno u kristalnoj strukturi (preuzeto iz (Dunkle et al., 2010)). Vodikove veze označene su isprekidanom plavom linijom, a hidrofobne interakcije isprekidanom sivom linijom.

### 1.2.2 Azitromicin

Azitromicin je polusintetski derivat eritromicina iz skupine azalidnih antibiotika. Dobiven je iz eritromicina A kratkom kemijskom sintezom od šest koraka (Dinos, 2017). Sadrži 15-člani makrolaktonski prsten koji, za razliku od eritromicina, na poziciji C9,10 sadrži dodatni atom dušika. Azitromicin jedini je makrolid kojem su nađena dva mjesta vezanja u prokariotskom ribosomu što dovodi do veće konformacijske promjene u 23S rRNA. Primarno vezno mjesto slično je kao kod drugih proučavanih makrolida kao što su eritromicin, roksitromicin i klaritromicin. Nukleotidi A2062 i U2609 doprinose vezanju azitromicina kroz hidrofobne interakcije. Dušikov atom umetnut u makrolaktonski prsten direktno ne pridonosi vezanju azitromicina nego mijenja konformaciju makrolaktonskog prstena dovoljno za interakciju s magnezijevim ionom i C2565. Azitromicin u drugom veznom mjestu kroz desozamin tvori vodikove veze s O1 makrolaktonskog prstena prvog azitromicina što dovodi do sinergijskog poboljšavanja vezanja azitromicina (Harms et al., 2003).



**Slika 4.** Dva vezna mjesta azitromicina u regiji PTAR ribosoma *E. coli*. Žuto je označen način vezanja azitromicina sličan načinu vezanja drugih makrolida. Narančasto je označen azitromicin u drugom veznom mjestu koji sinergijski pojačava vezanje azitromicina u prvo vezno mjesto (preuzeto iz (Harms et al., 2003.)).

### 1.2.3 Rezistencija na makrolidne antibiotike

Najčešći mehanizmi rezistencije na antibiotike kod bakterija su rezistencija zbog modifikacije ribosoma ili antibiotika i rezistencija zbog izlaska antibiotika iz stanica povećanjem permeabilnosti membrane ili povećanom ekspresijom pumpi (Wilson, 2014). Rezistencija na eritromicin kod *E. coli* događa se zbog djelovanja enzima Erm (eng. *erythromycin resistace methylase*) koji mono- ili di- metiliraju N6 poziciju nukleotida A2058 23S rRNA te zbog mutacije A2058G (Dinos, 2017).

## 1.3 Računalne metode u biofizici

Kontinuiran razvoj tehnologije omogućava analiziranje, usporedbu i karakteriziranje sve većih i složenijih podataka dobivenih iz eksperimenata provedenih na biomolekularnim sustavima što je dovelo do jačanja uloge računalnih metoda u biologiji, biokemiji i biofizici (Gunsteren et al., 2006). Računalne simulacije općenito se koriste u slučajevima kada je eksperiment nemoguć, opasan, skup ili kada je predmet istraživanja teško detektirati (npr. mali vremenski okviri ili molekularna razina promatranja sustava). Računalne metode u strukturnoj biokemiji i biofizici pomažu pri interpretaciji rezultata eksperimenta, planiranju novih eksperimenata, predviđanju 3D strukture makromolekule, proučavanju konformacijskih i kemijskih promjena te razumijevanju mehanizma bioloških procesa na molekularnoj razini

(Becker et al., 2001). Primarna podjela računalnih metoda u kemiji je na metode koje se temelje na klasičnoj mehanici i na one koje se temelje na kvantnoj mehanici. Molekule su toliko male da bi ih se, strogo gledano, trebalo opisivati koristeći zakone kvantne mehanike, ali kvantno mehaničke metode limitirane su samo na manje sustave. Kod proučavanja većih sustava, poput biokemijskih i bioloških sustava, neophodno je napraviti određene aproksimacije i koristiti zakone klasične mehanike što znatno pojednostavljuje i ubrzava račun te omogućuje njegovu primjenu i na veće sustave. Metode koje koriste zakone klasične mehanike temelje se na polju sila i još ih zovemo empirijske metode zato što je većina parametara korištena u izradi modela dobiveni iz eksperimentalnih podataka (Ulrich and Allinger, 1982).

### 1.3.1 Metode koje se temelje na polju sila

Polja sila koriste atomističke modele u kojima su atomi najmanji dio sustava za razliku od kvantno-mehaničkih metoda koje eksplicitno promatraju i elektrone i jezgre (Becker et al., 2001). Polja sila su kombinacija funkcionala energetske doprinosa energiji sustava i skupa parametara koji se koriste u računanju potencijalne energije proučavanog sustava. Parametri su dobiveni iz eksperimentalnih podataka, kvantno-mehaničkim izračunima ili kombinacijom navedenog. Opći zapis funkcionala energetske doprinosa potencijalnoj energiji sustava prikazan je u formuli (1) (Leach, 2001). Neka od polja sila u širokoj upotrebi su: AMBER, GROMOS, OPLS\_AA, MM2\*/MM3\*.

$$E = E_{\text{istezanja}} + E_{\text{savijanja}} + E_{\text{torzije}} + E_{\text{van ravnine}} + E_{\text{elektrostatske}} + E_{\text{vdw}} + \sum E_{\text{mj. članovi}} \quad (1)$$

Originalno, OPLS (eng. *optimized potentials for liquid simulations*) polje sila koristi model kod kojeg se za računanje energetske doprinosa eksplicitno uzimaju interakcije između svih atoma osim atoma vodika koji nisu vezani za heteroatome ili ugljike aromatskih prstena. (Jorgensen, Maxwell and Tirado-Rives, 1996). OPLS\_2005 je poboljšana verzija OPLS\_2001 polja sila koje je razvila tvrtka Schrödinger kako bi imalo bolju upotrebu na organskim molekulama. Između ostalog, poboljšani su torzijski parametri, naboji, te su ažurirani parametri za proteinske molekule (Schrodinger, 2017a).

### 1.3.2 Optimizacija geometrije molekule

Primarna podjela optimizacijskih metoda je na one koje ne koriste derivacije funkcija i na one koje ih koriste. Metode koje koriste derivacije funkcija možemo podijeliti na metode prvog i metode drugog reda, ovisno o tome koriste li prvu ili i prvu i drugu derivaciju funkcije. Najčešće korištene metode prvog reda u molekulskom modeliranju su metoda najstrmijeg spusta i metoda konjugiranog gradijenta. Algoritam metode najstrmijeg spusta generira nove

koordinate tako što radi pomake niz gradijent funkcije. Iznos pomaka može biti proizvoljan ili se provodi linijsko pretraživanje. Metode konjugiranog gradijenta daju skup konjugiranih smjerova i ortogonalnih gradijenata. Za razliku od metoda najstrmijeg spusta, metode konjugiranih gradijenata ne osciliraju u blizini uskih minimuma. Primjer metode konjugiranog gradijenta je metoda po Polaku i Ribièreu (eng. *Polak-Ribière conjugate gradient* (PRCG)). Metode drugog reda uz prvu derivaciju, koriste i drugu derivaciju funkcije. Newtonova metoda konjugiranog gradijenta (engl. *truncated-Newton conjugate-gradient* ili TNCG) primjer je metode drugog reda. Na području funkcije daleko od minimuma metode drugog reda mogu imati problema s nalaženjem minimuma budući da metode drugog reda rade aproksimaciju da je funkcija kvadratna, pa je najbolje kombinirati metode prvog reda da pretragu približe minimumu i metode drugog reda za preciznije nalaženje minimuma (Leach, 2001).

### 1.3.3 Konformacijska pretraga Monte Carlo

Metode Monte Carlo su skupina računalnih algoritama koji se temelje na višestrukom nasumičnom uzorkovanju u svrhu dobivanja numeričkog rezultata za rješavanje problema kod kojih je teško ili nemoguće koristiti druge metode. Uglavnom se koriste kod optimizacije, numeričke integracije te generiranja nasumičnih vrijednosti iz distribucije vjerojatnosti (Kroese et al., 2014). Konformacijski prostor, odnosno ploha potencijalne energije sustava s velikim brojem rotabilnih veza vrlo je složena i puna energetskih barijera između minimuma, pa je konformacijska pretraga takvog sustava vrlo složen zadatak. Stohastičke metode, poput metode Monte Carlo, pokazale su se korisne u takvim situacijama (Leach, 2001).

Kod konformacijske pretrage Monte Carlo uzima se početna konformacija, na nasumičnom ili izabranom broju koordinata rade se nasumične promjene čime se dobiva nova konformacija koja se zatim optimizira i njezina se energija uspoređuje s energijom konformacija nađenim u prethodnim koracima. Tako dobivena konformacija je zatim pohranjena kao nova konformacija ili odbačena kao duplikat. Jedan takav ciklus zovemo Monte Carlo (MC) korak (Chang et al., 1989).

### 1.3.4 Molekulsko uklapanje

Molekulsko uklapanje (eng. *docking*) je računalni postupak kojem je cilj predvidjeti nekovalentno vezanje između makromolekula ili makromolekula i liganda, konformaciju vezanih molekula te afinitet vezanja. *AutoDock Vina* (Trott and Olson, 2010) jedan je od dostupnih programa koji se koriste za molekulsko uklapanje. Općeniti zapis funkcionala koji koristi *AutoDock Vina* glasi:



$$c = \sum f_{itj}(r_{ij}) \quad (2)$$

Za računanje energetske doprinosa energiji vezanja funkcional programa *AutoDock Vina* uzima u obzir atome koji se mogu međusobno pomicati, a isključuje interakcije među atomima koji su odvojeni za tri ili više kovalentne veze. Svakom atomu  $i$  dodijeljen je tip atoma  $t_i$  i definirana je funkcija udaljenosti između atoma koja opisuje njihove interakcije. Vodikovi atomi nisu uračunati eksplicitno i nisu uključeni u formulu. Za traženje globalnog minimuma *AutoDock Vina* koristi algoritam *Iterated Local Search*, a kvazi-Newtonovu metodu Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS) za lokalnu optimizaciju. Za razliku od starije verzije *AutoDocka (AutoDock 4)*, za *AutoDock Vina* nije potrebno ručno generirati mrežu unutar koje će se obavljati pretraga, birati tipove atoma, parametre te klasterirati rezultate nakon računa, već to program radi automatski (Trott and Olson, 2010).

#### 1.4 Ciljevi istraživanja

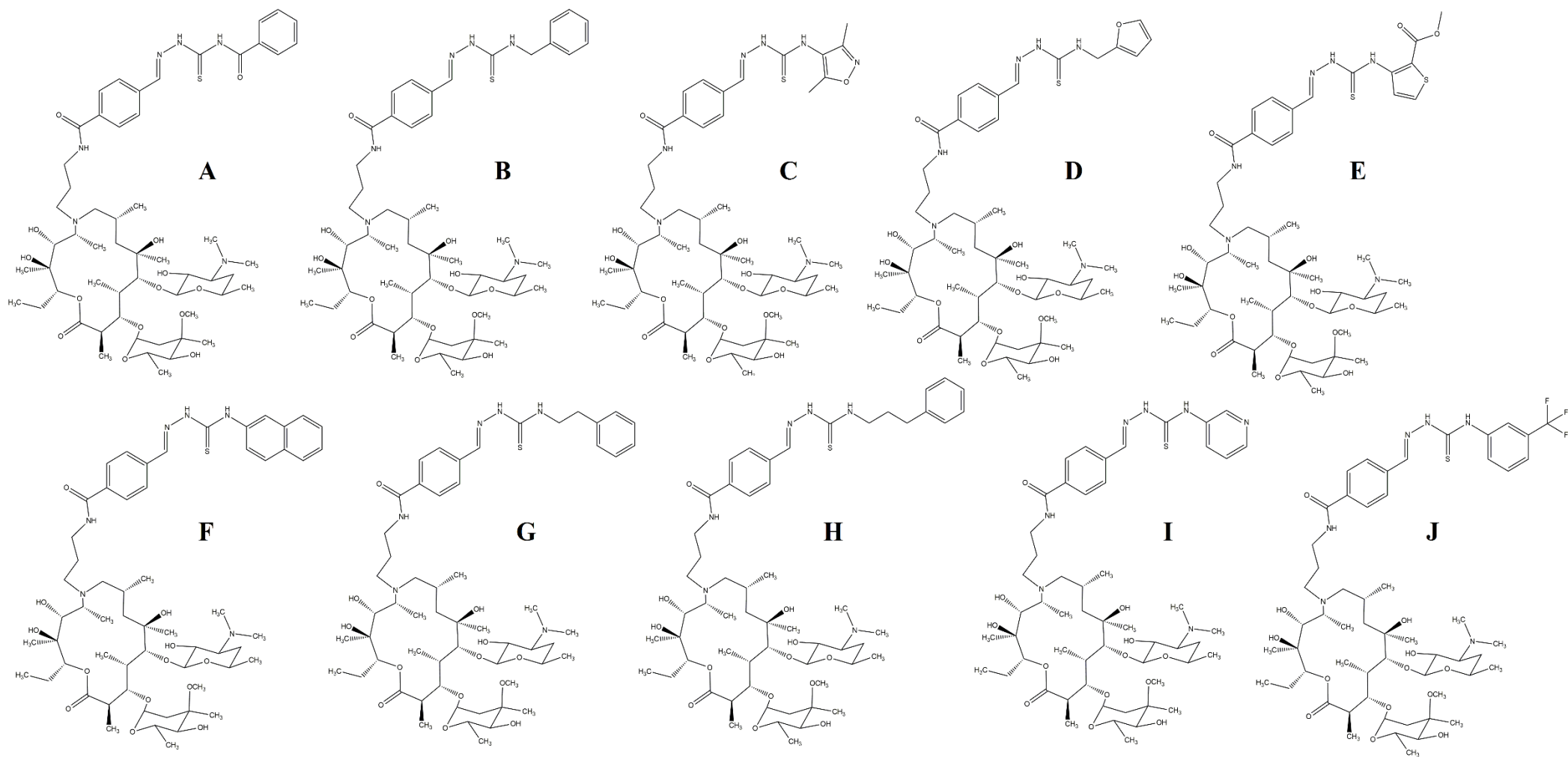
Makrolidni antibiotici u širokoj su upotrebi od pedesetih godina prošlog stoljeća. Iako se uspješno koriste kod tretiranja mnogih bakterijskih infekcija, postoji nekoliko prepreka u njihovom korištenju poput razvoja rezistencije nekih bakterijskih sojeva. Računalne metode u biokemiji i biofizici koriste se kao pomoć pri planiranju eksperimenta i interpretaciji rezultata eksperimenta. Cilj ovog istraživanja jest računalno istražiti vezanje deset strukturnih derivata azitromicina u regiju PTAR velike podjedinice ribosoma *E.coli* te usporediti njihove načine vezanja s vezanjem eritromicina. Spojevi su izgrađeni *in silico* i na njima je provedena konformacijska pretraga Monte Carlo. Korištenjem klasteriranja, probane su konformacije liganada koje su korištene za račune molekuskog uklapanja.

## 2. Materijali i metode

### 2.1 Konformacijska pretraga

Strukture liganada prikazanih na slici 5 izgrađene su *in silico* programom Maestro iz Schrödingerovog programskog paketa (Schrödinger, 2017b), te je provedena konformacijska pretraga u programu *MacroModel* iz istog paketa programa (Schrodinger, 2017a).

Konformacijska pretraga liganada Monte Carlo napravljena je koristeći četiri modela otapala: implicitni model vode, implicitni model oktanola, model otapala dielektrične konstante 81 (odgovara dielektričnoj konstanti citoplazme), model otapala dielektrične konstante 4 (aproksimira dielektričnu konstantu aktivnog mjesta ribosoma). Korišten je algoritam *Monte Carlo Multiple Minima* (MCMM) uz opciju koja omogućava rotaciju amidnih, esterskih i azo veza te se dobiveni enantiomeri spremaju kao zasebni konformer. Parametrizacija sustava načinjena je poljem sila OPLS\_2005 (Jorgensen et al., 1996). U svakom koraku napravljene su 2-4 nasumične promjene odabranih varijabli u konformaciji. Broj promjena na konformaciji nasumično je variran između 2 i 4 kako bi se spriječila koncentracija pretrage na istim područjima konformacijskog prostora. Ukupan broj koraka pretrage Monte Carlo iznosio je 50 000, a broj koraka za svaku rotabilnu vezu bio je 100. Granična vrijednost (eng. *cutoff*) udaljenosti između atoma u kojoj se računao entalpijski doprinos potencijalnoj energiji sustava za elektrostatske i Van der Waalsove interakcije iznosio je 8 Å, a za vodikove veze 4 Å. Spremljene su samo konformacije koje su se nalazile unutar 20 kJmol<sup>-1</sup> od energetske najpovoljnije konformacije nađene u prethodnim koracima pretrage, a maksimalan broj struktura koji je bilo moguće pohraniti iznosio je 10 000. Ukoliko bi vrijednost RMSD-a (eng. *root mean square deviation*) bila manja od 0,05 Å konformacija bi bila definirana kao redundantna. Ulazna struktura i sve konformacije nađene u prijašnjim koracima Monte Carlo pretragom optimizirane su metodom PRCG (eng. *Polak and Ribiereu conjugated gradient*) dok vrijednost gradijenta nije postala manja od 0,05 kJmol<sup>-1</sup>Å<sup>-1</sup> ili dok nije postignuto 10 000 iteracija. Zatim je svaka konformacija optimizirana metodom TNCG (eng. *truncated Newton conjugated gradient*) dok vrijednost gradijenta nije postala manja od 0,01 kJmol<sup>-1</sup>Å<sup>-1</sup> ili dok nije postignuto 10 000 iteracija. Energetske najpovoljnije konformacije nađene su desetak ili više puta tijekom pretrage što implicira da je korišten dovoljno velik broj MC koraka tijekom pretrage.



**Slika 5.** Dvodimenzionalni prikaz strukturnih derivata azitromicina korištenih u računima konformacijske pretrage i molekuskog uklapanja.

## 2.2 Klasteriranje i probir liganada

Klasteriranje (eng. *clustering*) na osnovi RMSD vrijednosti struktura pronađenih konformacijskom pretragom provedeno je programom Gromacs (Abraham et al., 2015), algoritmom Gromos. Granična vrijednost (eng. *cutoff*) vrijednosti RMSD iznosila je između 1,0 Å i 3,5 Å, ovisno o broju pronađenih klastera. Reprezentativna struktura najzastupljenijeg klastera korištena je u računima molekuskog uklapanja.

## 2.3 Molekulsko uklapanje

Struktura ribosoma s vezanim eritromicinom u peptidil-transferaznom centru (Dunkle et al., 2010) preuzeta je s PDB baze (PDB oznaka: 4V7U) te pripremljena (Čorak, 2018) za simulacije u fiziološkim uvjetima programom Protein Preparation Wizard 9 (Schrödinger, 2018). Dobivanje koordinata središta PTAR-a, te spremanje strukture ribosoma i liganada u formate pogodne za molekulklo uklapanje obavljeno je programom *AutoDock Tools* (Sanner, 1999). Molekulsko uklapanje provedeno je programom *AutoDock Vina* (Trott and Olson, 2010). Koordinate središta 3D mreže korištene pretragom su  $x = -65,482$ ,  $y = -57,235$ ,  $z = 4,328$ , a dimenzije 3D mreže postavljene su na 108, 105 i 118 Å. Maksimalan broj načina vezanja koji su pohranjeni je postavljen na 15, a maksimalna razlika u energiji vezanja između najpovoljnijeg načina vezanja i najnepovoljnijeg načina vezanja kojeg je bilo moguće pohraniti iznosio je 4 kcal mol<sup>-1</sup>. Odnosno, ukoliko bi razlika između energije vezanja nađenog načina vezanja i najpovoljnijeg načina vezanja bila veća od 4 kcal mol<sup>-1</sup>, a broj nađenih načina vezanja nije dosegao 15, nađeni način vezanja ne bi bio pohranjen. Iscrpnost pretrage (eng. *exhaustiveness*) postavljena je na 12. Iscrpnost pretrage određuje broj ponavljanja optimizacije pojedinog načina vezanja. Broj koraka u optimizaciji određuje se heuristički. Povećanje iscrpnosti dovodi do linearnog povećanja vremena pretrage i eksponencijalnog smanjenja vjerojatnosti da se neće pronaći minimum. Kod jednostavnih sustava nije potrebno povećati iscrpnost pretrage jer se vjerojatnost neuspjeha pronalaska minimuma neće značajno smanjiti, a vrijeme pretrage će se nepotrebno povećati.

### 3. Rezultati

#### 3.1 Konformacijska pretraga liganada

Konformacijska pretraga Monte Carlo provedena je na 10 liganada uz korištenje četiri različita modela otapala. Korišteni su model otapala dielektrične konstante 81, model otapala dielektrične konstante 4, implicitni model vode i implicitni model oktanola. Najviše konformera pronađeno je kod konformacijske pretrage liganda **F** uz korištenje implicitnog modela oktanola (**Tablica 1**), gdje je pronađeno 544 konformera. Najmanje konformera pronađeno je konformacijskom pretragom liganda **E** uz korištenje modela otapala dielektrične konstante 4 gdje je nađeno 27 konformera.

**Tablica 1.** Broj pronađenih konformera konformacijskom pretragom Monte Carlo pojedinih liganada uz korištenje različitih modela otapala.

Ligand	Broj pronađenih konformacija u modelu otapala			
	$\epsilon = 81^a$	$\epsilon = 4^b$	Oktanol <sup>c</sup>	Voda <sup>d</sup>
<b>A</b>	238	31	247	156
<b>B</b>	246	146	206	144
<b>C</b>	263	173	197	134
<b>D</b>	369	103	234	209
<b>E</b>	114	27	286	74
<b>F</b>	243	178	544	269
<b>G</b>	196	175	227	195
<b>H</b>	189	66	136	132
<b>I</b>	235	65	95	256
<b>J</b>	263	207	49	210

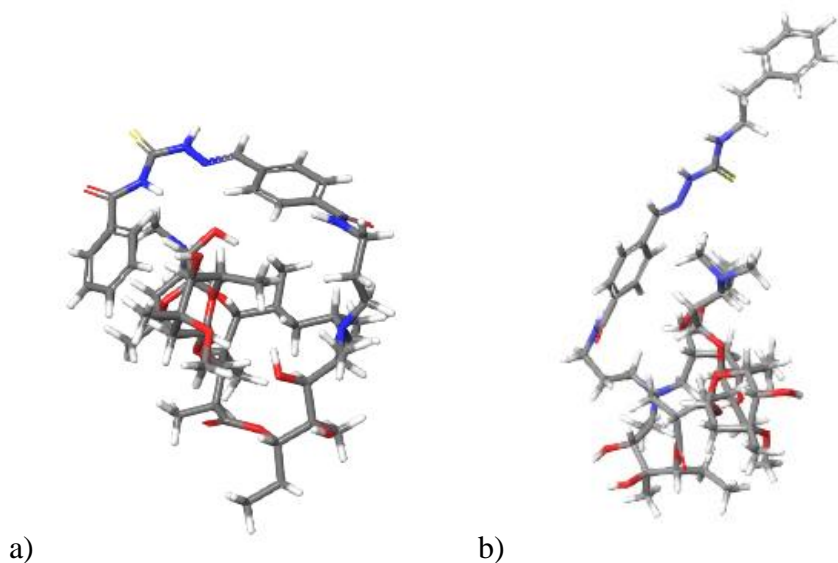
<sup>a</sup> medij dielektrične konstante 81

<sup>b</sup> medij dielektrične konstante 4

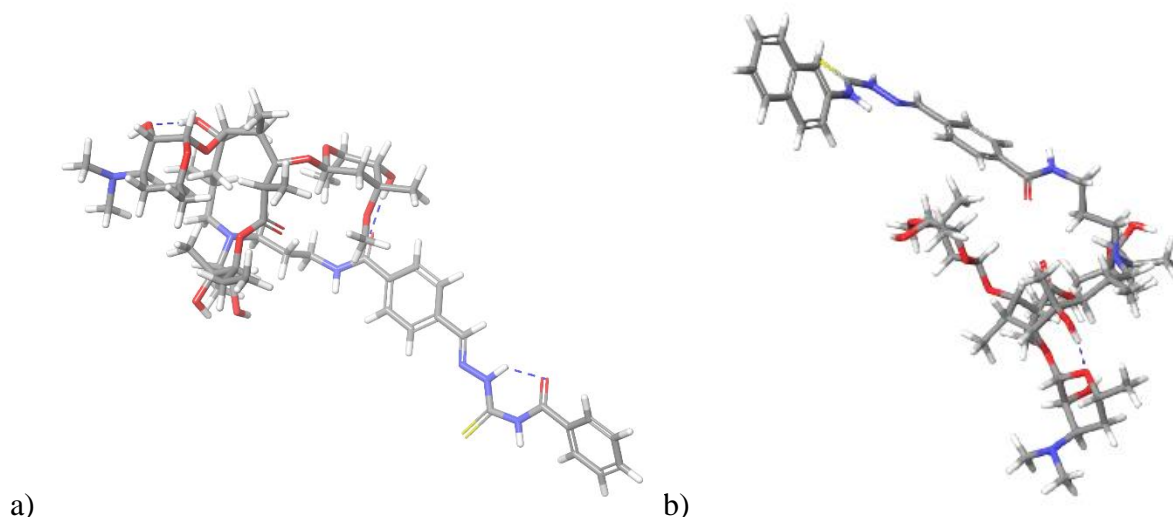
<sup>c</sup> implicitni model oktanola

<sup>d</sup> implicitni model vode

Većina energetski najpovoljnijih konformera ima karakteristiku da im se semitiokarbazoni supstituent nalazi u blizini makrolaktonskog prstena (slika 6a). Iznimka su ligand **A** (slika 7a) i ligand **F** (slika 7b) čiji su konformeri najniže energije pronađeni konformacijskom pretragom uz korištenje implicitnog modela oktanola. U tim slučajevima semitiokarbazoni supstituent je ispružen i udaljen od makrolaktonskog prstena. Ligandi na čijem je terminalnom dijelu semitiokarbazonskog supstituenta aromatska skupina kod nekih konformera viših energija također imaju udaljeni supstituent od makrolaktonskog prstena (slika 6b).

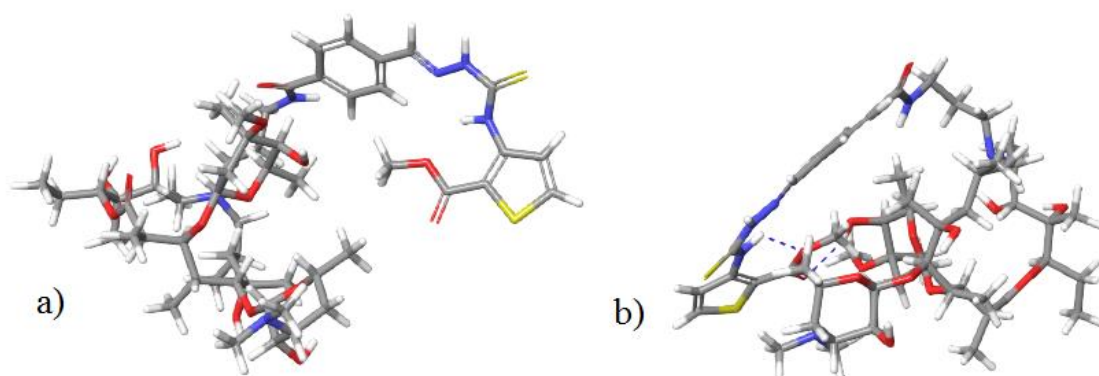


**Slika 6.** Konformeri liganda **G** pronađeni konformacijskom pretragom uz korištenje modela otapala dielektrične konstante 81: a) konformer najniže energije, b) konformer koji ima 12,21 kJ mol<sup>-1</sup> višu energiju od najpovoljnijeg konformera.



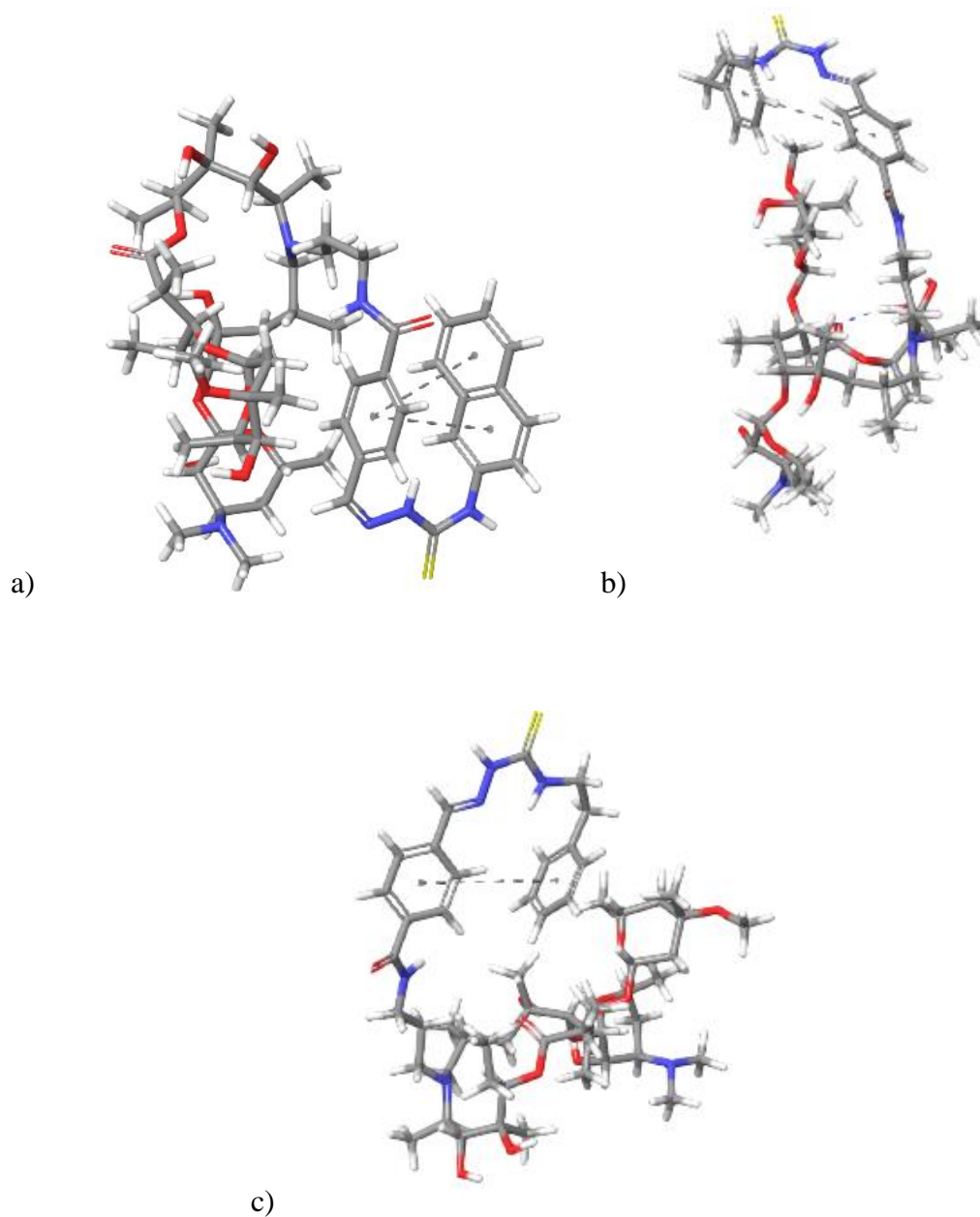
**Slika 7.** Konformeri najniže energije liganda **A** (a) i liganda **F** (b) pronađeni konformacijskom pretragom uz korištenje implicitnog modela oktanola. Intramolekulske vodikove veze prikazane su isprekidanom plavom linijom.

Intramolekulske vodikove veze pronađene su kod 21 od 40 najpovoljnijih konformera liganada pronađenih konformacijskom pretragom uz korištenje sva četiri modela otapala. U nekim slučajevima, intramolekulskih vodikovih veza nema kod konformera najniže energije, ali su prisutne u konformerima viših energija. Primjerice, najpovoljniji konformer liganda **E** nađen konformacijskom pretragom u implicitnom modelu oktanola nema niti jednu intramolekulsku vodikovu vezu, dok konformer koji je za 6,92 kJ mol<sup>-1</sup> nepovoljniji ima dvije (slika 8).



**Slika 8.** Konformeri liganda E pronađeni konformacijskom pretragom uz korištenje implicitnog modela oktanola: a) najpovoljniji konformer, b) konformer koji je 6,92 kJ mol<sup>-1</sup> nepovoljniji od energetski najpovoljnijeg konformera. Kod najpovoljnijeg konformera nema intramolekulskih vodikovih veza, dok su kod konformera prikazanog pod b) nađene dvije koje su prikazane plavom isprekidanom linijom.

Intramolekulske  $\pi$ - $\pi$  interakcije nisu pronađene niti kod jednog najpovoljnijeg konformera. Kod 7 od ukupno 7614 konformera pronađenih pretragom unutar energetskog prozora od 20 kJ mol<sup>-1</sup> pronađene su intramolekulske  $\pi$ - $\pi$  interakcije. Od toga kod četiri konformera liganda **G** pronađenih konformacijskom pretragom uz korištenje implicitnog modela oktanola te kod jednog konformera liganda **G** pronađenog konformacijskom pretragom uz korištenje implicitnog modela vode (slika 9). Intramolekulske  $\pi$ - $\pi$  interakcije prisutne su još kod jednog konformera liganda **F** pronađenog konformacijskom pretragom uz korištenje modela otapala dielektrične konstante 4 (slika 9).



**Slika 9.** Konformeri liganada F i G kod kojih su nađene  $\pi$ - $\pi$  interakcije: a) konformer liganda F pronađen konformacijskom pretragom uz korištenje modela otapala dielektrične konstante 4 koji je 16,96 kJ mol<sup>-1</sup> nepovoljniji od najpovoljnijeg konformera, b) konformer liganda G pronađen konformacijskom pretragom uz korištenje implicitnog modela oktanola koji je 8,76 kJ mol<sup>-1</sup> nepovoljniji od najpovoljnijeg konformera, c) konformer liganda G pronađen konformacijskom pretragom u implicitnom modelu vode koji je 17,51 kJ mol<sup>-1</sup> nepovoljniji od najpovoljnijeg konformera. Intramolekulske  $\pi$ - $\pi$  interakcije prikazane su sivom isprekidanom linijom.



## 3.2 Molekulsko uklapanje

Najviše različitih načina vezanja u regiju PTAR ribosoma bakterije *Escherichia coli* računima molekulskog uklapanja pronađeno je kod liganda **D** (tablica 2). Najmanje različitih načina vezanja nađeno je kod liganda **I**.

**Tablica 2.** Broj pronađenih načina vezanja pojedinih liganada. Konformacijska pretraga ulazne strukture napravljena je u jednom od četiri modela otapala.

Ligand	Otapalo				Ukupno
	81	4	Oktanol	Voda	
<b>A</b>	4	2	6	8	20
<b>B</b>	3	5	6	6	20
<b>C</b>	3	7	6	7	23
<b>D</b>	3	10	4	7	24
<b>E</b>	2	9	2	5	18
<b>F</b>	7	3	7	3	20
<b>G</b>	3	7	5	4	19
<b>H</b>	2	3	4	6	15
<b>I</b>	3	2	7	1	13
<b>J</b>	6	4	10	2	22

<sup>a</sup> dielektrične konstante 81

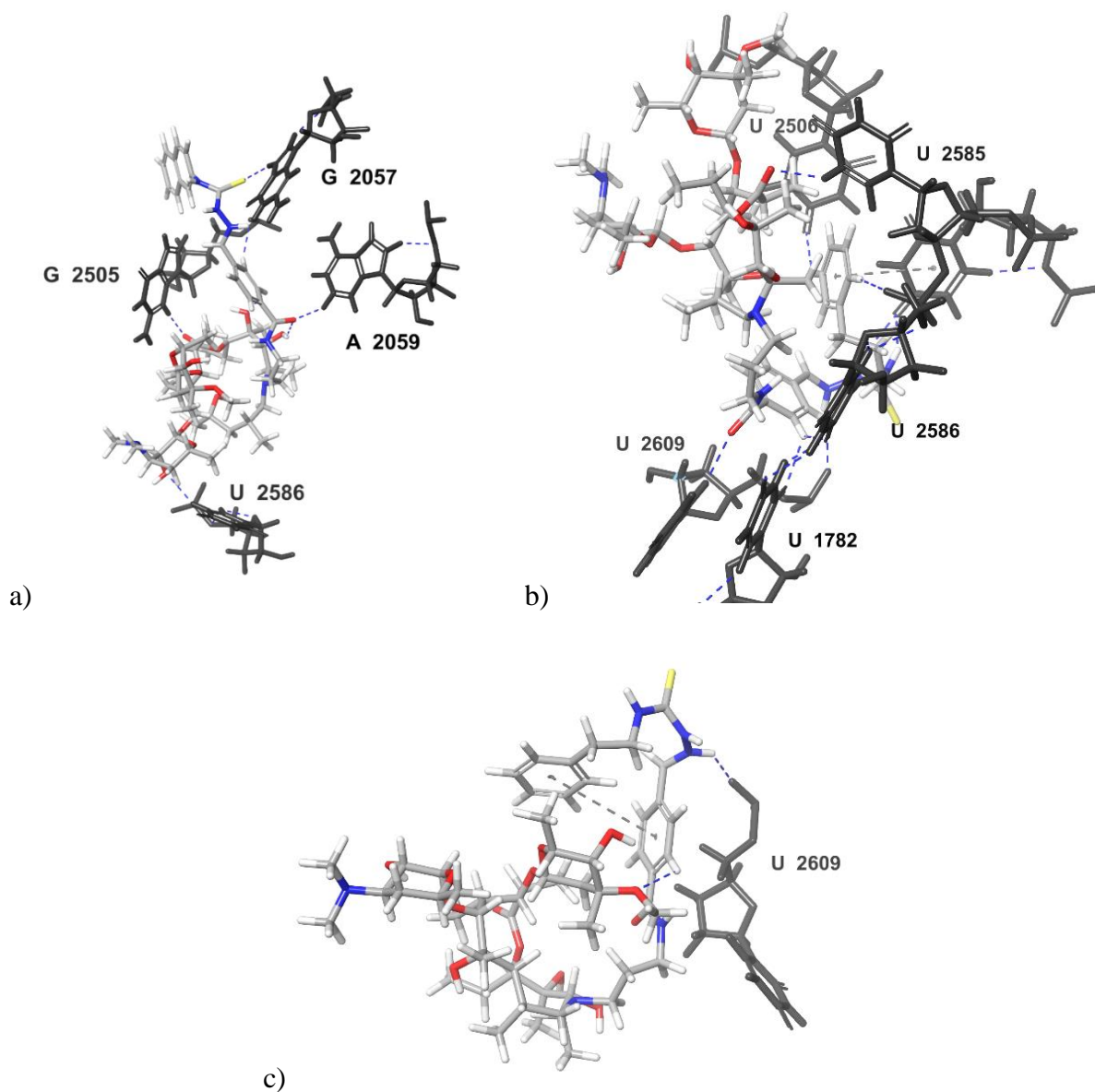
<sup>b</sup> dielektrične konstante 4

<sup>c</sup> implicitnog modela oktanola

<sup>d</sup> implicitnog modela vode

Računima molekulskog uklapanja dobiveno je da ligand **F** (slika 10a) ima najpovoljniju energiju vezanja u PTAR ribosoma *E. coli*, zatim redom ligandi **H** (slika 10b) i **G** (slika 10c) čiji su najpovoljniji načini vezanja za 0,41, odnosno 2,09 kJ mol<sup>-1</sup> nepovoljniji od najpovoljnijeg načina vezanja liganda **F** (

**Tablica 3).** Različiti načini vezanja pronađeni za ligande **F**, **H** i **G** zauzimaju prvih 13 mjesta u ukupnom poretku načina vezanja svih liganada. U rasponu od  $4 \text{ kJ mol}^{-1}$  od najpovoljnijeg načina vezanja liganda **F**, osim liganada **H** i **G**, nalaze se i načini vezanja liganada **C** (jedan način vezanja), **B** (jedan način vezanja), **I** (tri načina vezanja) i **A** (tri način vezanja).



**Slika 10.** Ligandi s najpovoljnijim energijama vezanja u PTAR ribosoma bakterije *E. coli* i nukleotidi veznog mjesta s kojim stupaju u interakcije. a) ligand **F**, b) ligand **H**, c) ligand **G**. Vodikove veze prikazane su plavom isprekidanom linijom, a  $\pi$ - $\pi$  interakcije sivom isprekidanom linijom.

**Tablica 3.** Energije vezanja te prisutnost intermolekulskih i intramolekulskih vodikovih veza kod najpovoljnijih načina vezanja svih liganada dobivenih računima molekuskog uklapanja.

Rangiranje <sup>a</sup>	Ligand	Energija vezanja [kJ mol <sup>-1</sup> ]	Intermolekulske interakcije <sup>b</sup>		Intramolekulske interakcije <sup>c</sup>	
			Vodikove veze	$\pi$ - $\pi$ interakcije	Vodikove veze	$\pi$ - $\pi$ interakcije
1	<b>F</b>	-49,74	+	-	+	-
3	<b>H</b>	-49,32	+	+	-	-
8	<b>G</b>	-47,65	+	-	+	+
14	<b>C</b>	-46,82	+	-	-	-
19	<b>B</b>	-46,40	+	-	+	-
25	<b>I</b>	-46,40	+	-	-	-
26	<b>A</b>	-45,98	+	+	-	-
34	<b>J</b>	-45,56	+	+	+	-
82	<b>D</b>	-43,89	+	-	-	-
84	<b>E</b>	-43,89	+	+	-	-

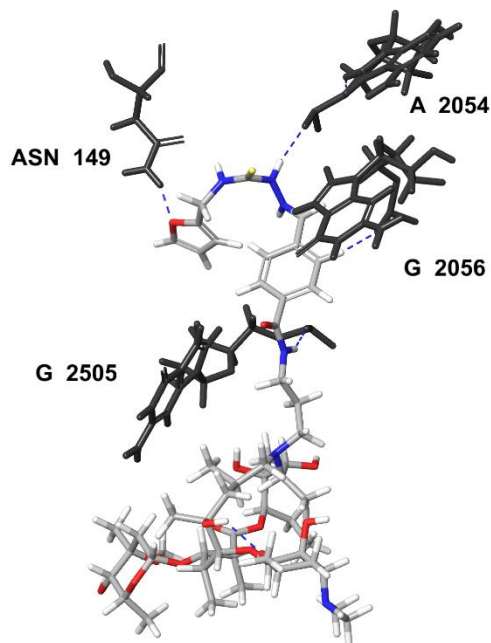
<sup>a</sup> Pozicija u ukupnom poretku svih pronađenih načina vezanja poredanih po energiji vezanja od najmanje prema najvećoj.

<sup>b</sup> Prisutnost određene intermolekulske interakcije (vodikove veze ili  $\pi$ - $\pi$  interakcije) kod navedenog načina vezanja.

<sup>c</sup> Prisutnost određene intramolekulske interakcije (vodikove veze ili  $\pi$ - $\pi$  interakcije) kod navedenog načina vezanja.

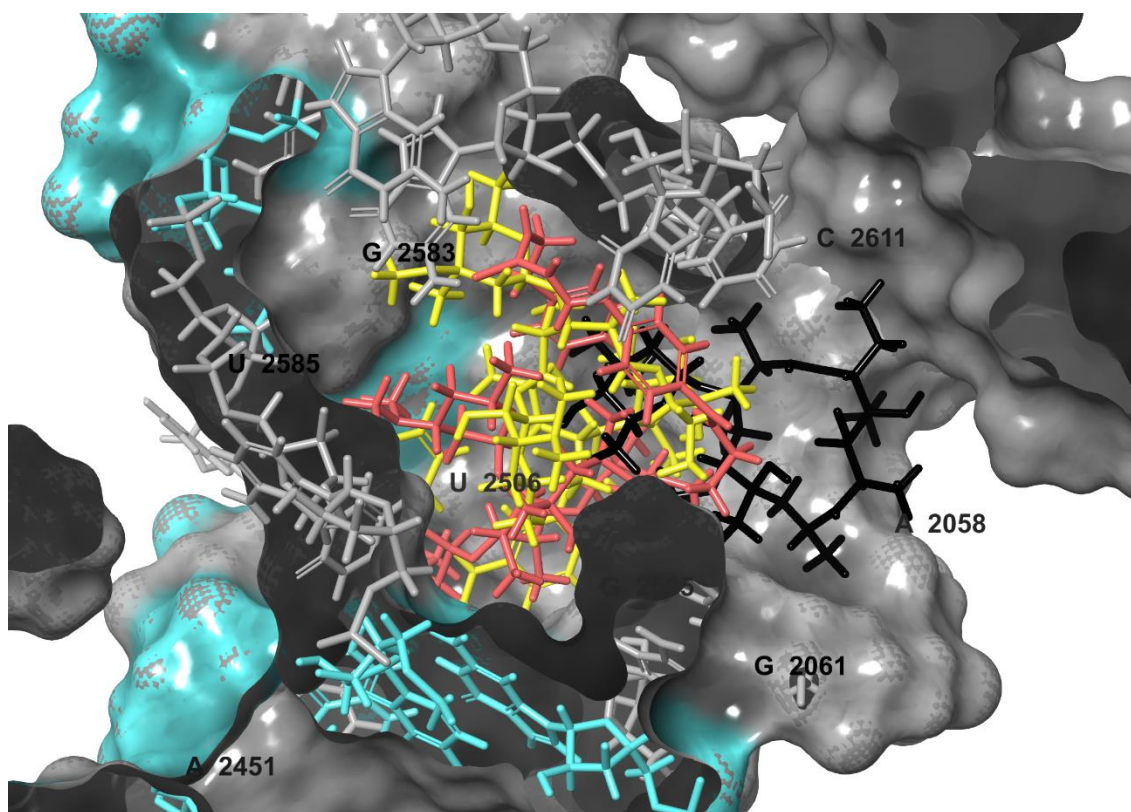
Kod 47 od 187 pronađenih načina vezanja prisutne su intramolekulske vodikove veze. U slučaju liganada **F**, **G**, **B** i **J** te iste veze pronađene su i kod najpovoljnijih načina vezanja. Kod 31 načina vezanja pronađene su intramolekulske  $\pi$ - $\pi$  interakcije. Među najpovoljnijim načinima vezanja samo ligand **G** tvori intramolekulske  $\pi$ - $\pi$  interakcije (slika 10c).

Vodikove veze između liganada i PTAR veznog mjesta ribosoma nađene su kod svih najpovoljnijih načina vezanja svih liganada. Vodikove veze između liganda i veznog mjesta prisutne su i kod većine načina vezanja viših energija, osim u slučaju: dva načina vezanja liganda **G**, dva načina vezanja liganda **J** te po jedan način vezanja liganada **A**, **H**, **B**, **D**. Vodikove veze ligandi u veznom mjestu uglavnom tvore s RNA okosnicom veznog mjesta. Vodikove veze s aminokiselinama uočene su kod jednog od nepovoljnijih načina vezanja liganda **G** koji tvori vodikovu vezu s aminokiselinom Gln 150. Jedan način vezanja više energije liganda **F** tvori vodikovu vezu s aminokiselinom Lys 90. Ligand **D** u jednom od svoja dva najpovoljnija načina vezanja tvori vodikovu vezu s aminokiselinom Asn 149 (slika 12).



**Slika 11.** Jedan od dva najpovoljnija načina vezanja liganda **D** tvori vodikove veze s Asn 149 iz proteinskog dijela ribosoma. Vodikove veze prikazane su plavom isprekidanom linijom.

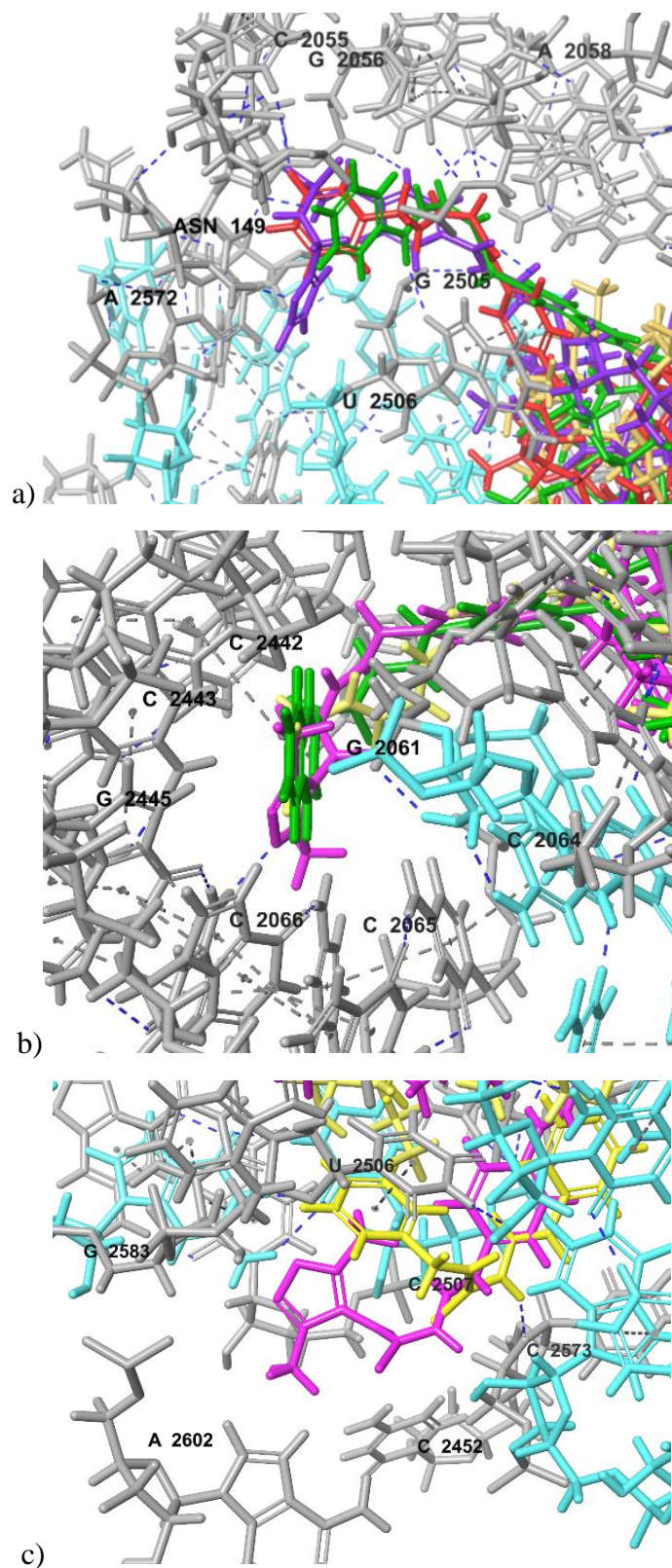
Intermolekulske  $\pi$ - $\pi$  interakcije pronađene su kod najpovoljnijih načina vezanja liganada **H**, **A**, **J** i **E**, te kod još 65 načina vezanja viših energija. Ligandi kod pronađenih načina vezanja uglavnom poprimaju konformacije nalik najpovoljnijim konformacijama nađenih Monte Carlo konformacijskom pretragom te stupaju u interakcije s nukleotidima G2057, A2058, A2059, G2061, A2062, G2505, U2506, G2583, U2585, U2586 i C2611 (slika 12). Nukleotidi C2611 i A2058 sudjeluju u stabilizaciji eritromicina u veznom mjestu.



**Slika 12.** Način vezanja i konformacija u veznom mjestu koju poprima većina liganada. Crvenom bojom prikazan je način vezanja liganda **G** koji je  $3,35 \text{ kJ mol}^{-1}$  nepovoljniji od najpovoljnijeg načina vezanja liganda **G**. Žutom bojom prikazan je način vezanja liganda **H** koji je  $6,68 \text{ kJ mol}^{-1}$  nepovoljniji od najpovoljnijeg načina vezanja liganda **H**. Crnom bojom prikazan je eritromicin, a svijetloplavom bojom prikazani su nukleotidi koji sudjeluju u pozicioniranju supstrata i katalizi peptidne veze.

U manjem broju slučajeva semitiokarbazoni supstituent je ispružen i udaljen od makrolaktonskog prstena, a njegov terminalni kraj se nalazi u jednom od tri alternativna mjesta vezanja. Kod mjesta vezanja prikazanog na slici 13a terminalni dio semitiokarbazonkog supstituenta nalazi se u džepu čiju površinu tvore nukleotidi C2055, C2056, A2572 i aminokiselina Asn 149. Na slici 13b prikazano je mjesto vezanja čiju površinu tvore nukleotidi C2442, C2443, G2445, C2066, C2061 i C2066. Treći alternativni način vezanja prikazan je na slici 13c i njegovu površinu tvore nukleotidi G2583, A2602, C2502, U2506, G2507 i C2573.





**Slika 13.** Tri alternativna načina vezanja liganada u regiju PTAR: a) crvenom bojom prikazan je način vezanja liganda **A** više energije, zelenom bojom prikazan je način vezanja više energije liganda **B**, a ljubičastom bojom prikazan je najpovoljniji način vezanja liganda **D**, b) ružičastom bojom prikazan je način vezanja više energije liganda **C**, zelenom bojom prikazan je način vezanja više energije liganda **F**, a žutom bojom prikazan je način vezanja više energije liganda **D**, c) ružičastom bojom prikazan je način vezanja više energije liganda **C**, a žutom bojom način vezanja više energije liganda **B**.

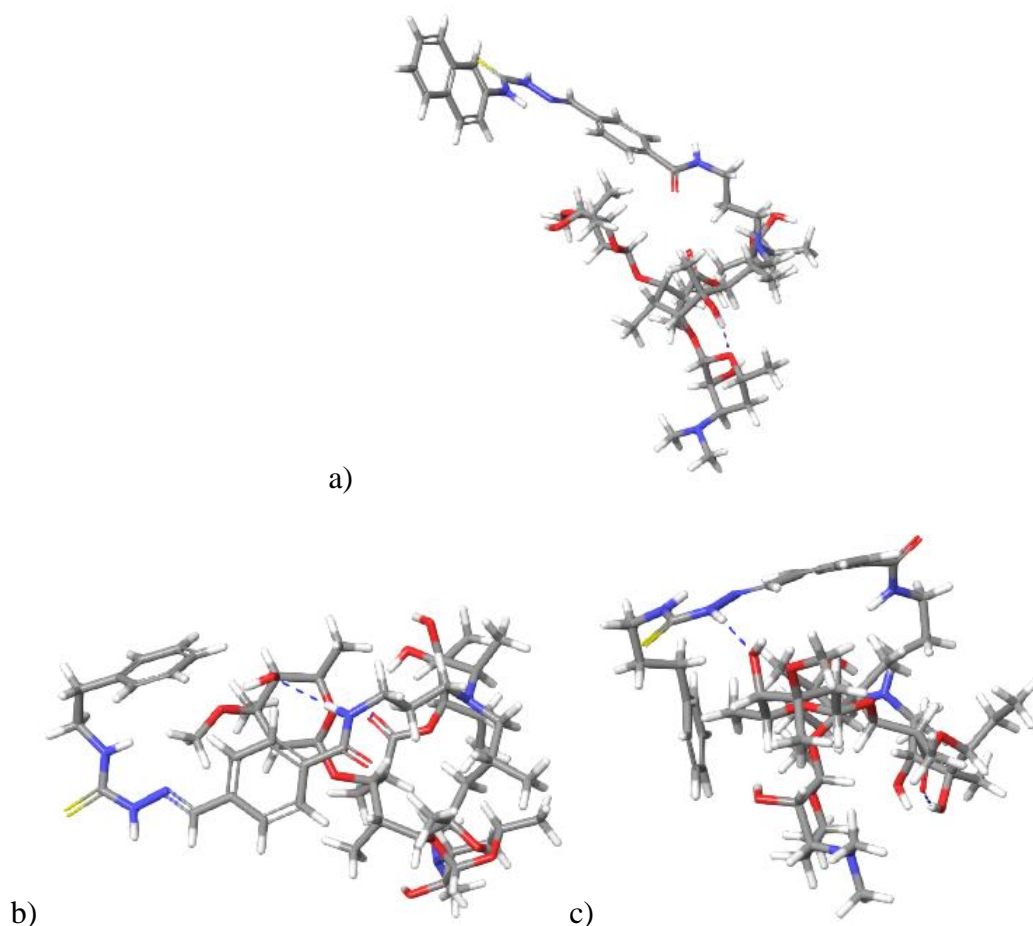
Nije uočena pravilnost da je vezanje za određene nukleotide češće prisutno kod povoljnijih načina vezanja, niti da je u povoljnijim načinima vezanja prisutan veći broj vodikovih veza i  $\pi$ - $\pi$  interakcija nego kod ostalih načina vezanja. Primjerice, najpovoljniji način vezanja liganda **G** ukupno je osmi način vezanja, a tvori samo jednu vodikovu vezu s veznim mjestom.

## 4. Rasprava

### 4.1 Konformacijska pretraga Monte Carlo

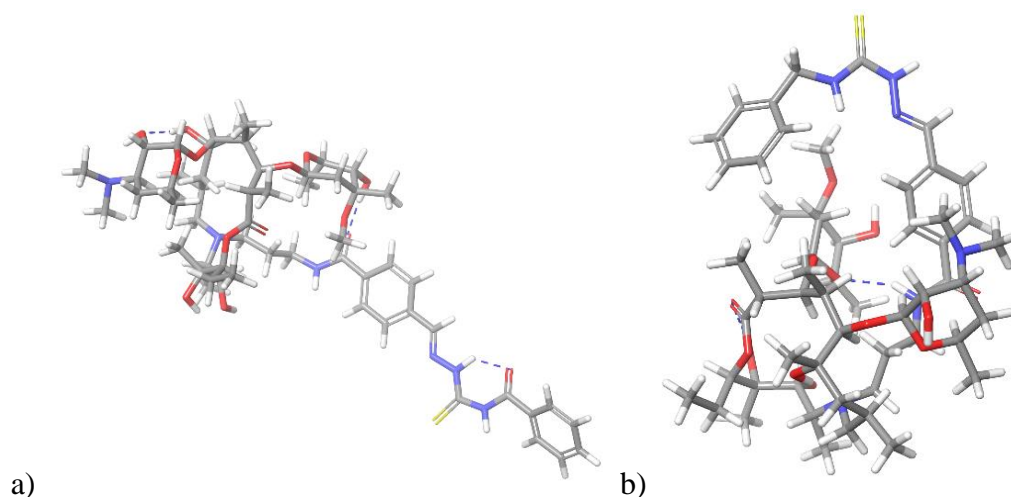
Kod većine konformera strukturnih derivata azitromicina najniže energije konformacijskom pretragom Monte Carlo pronađeno je da se semitiokarbazoni supstituent nalazi u blizini makrolaktonskog prstena. Takva konformacija čini ligande kompaktnima te bi u teoriji mogla biti povoljna za ulazak liganda u stanicu i u vezno mjesto ribosoma što poboljšava njihov farmakološki potencijal. Od tih rezultata odstupaju najpovoljnije konformacije liganada **A** i **F** pronađene konformacijskom pretragom uz korištenje implicitnog modela oktanol (slika 7). Kod tih konformera semitiokarbazoni supstituent ispuženi je i udaljeniji od makrolaktonskog prstena. Ti rezultati vjerojatno su uzrokovani time što ligandi **A** i **F** imaju aromatsku skupinu na terminalnom kraju i u nepolarnom otapalu nemaju tendenciju smanjivanja kontakta s otapalom. Razlog zašto ligand **F** poprima takvu konformaciju, a ligandi **G** i **H**, koji na terminalnom kraju semitiokarbazonskog supstituenta također imaju nesupstituiranu aromatsku skupinu ne poprimaju takvu konformaciju (slika 14), ima dva moguća objašnjenja. Prvo je to da aromatska skupina liganada **G** i **H** nalazi na lancu od dva, odnosno tri ugljikova atoma što omogućava veću fleksibilnost i savijanje prema makrolaktonskom prstenu. Drugo objašnjenje je to što ligand **F** ima naftilnu skupinu na terminalnom kraju semitiokarbazonskog supstituenta koja je veća od fenilne skupine zbog čega su hidrofobne interakcije s otapalom jače od onih koje ima s makrolaktonskim prstenom.





**Slika 14.** Najpovoljniji konformeri liganada **F** (a), **G** (b) i **H** (c) pronađeni konformacijskom pretragom uz korištenje implicitnog modela oktanol.

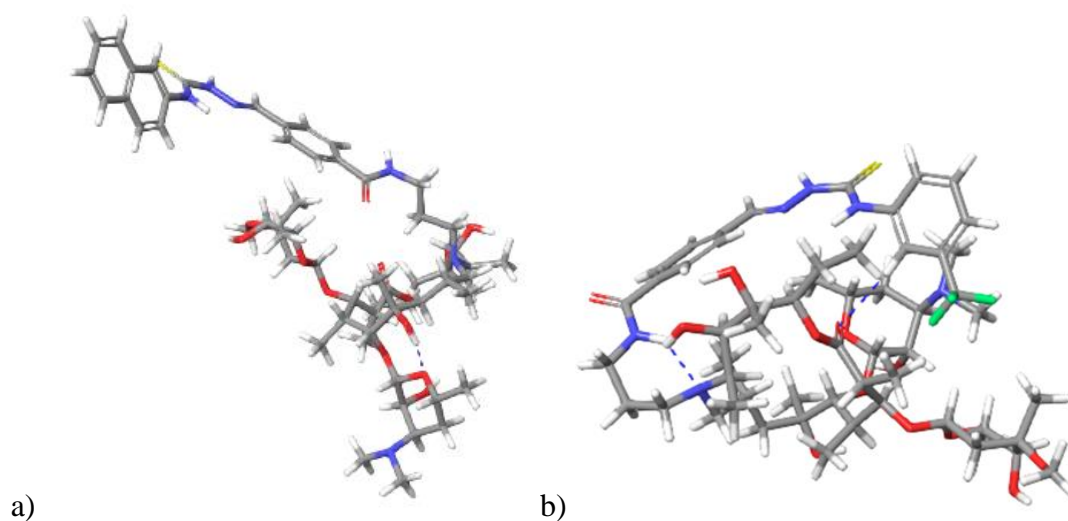
Ligandi **A** i **B** razlikuju se po prisutnosti karbonilne skupine na samom kraju semitiokarbazonskog supstituenta koja tvori intramolekulsku vodikovu vezu sa susjednim atomom dušika (slika 15). Te interakcije mogle bi biti zaslužne za različitost konformacije najpovoljnijeg konformera liganda **A** od konformacije najpovoljnijih konformera liganda **B**, **G** i **H** koji također imaju benzenski prsten na terminalnom kraju semitiokarbazonskog supstituenta. Vodikova veza između kisika karbonilne skupine na terminalnom kraju semitiokarbazonskog supstituenta i susjednog dušika čine supstituent rigidnim i sprječava savijanje prema makrolaktonskom prstenu.



**Slika 15.** Najpovoljniji konformeri liganada **A** (a) i liganada **B** (b) nađeni konformacijskom pretragom uz korištenje implicitnog modela oktanola.

Budući da je konformacijska pretraga liganada **A** i **F** napravljena uz korištenje implicitnog modela oktanola, položaj supstituenta u kojem je udaljen od makrolaktonskog prstena ne trebamo očekivati u vodenom okruženju, već prvenstveno u fosfolipidnom dvosloju stanične membrane ili u hidrofobnom okruženju staničnih organela.

Najveći broj konformera pronaden je konformacijskom pretragom liganada **F** u implicitnom modelu oktanola, a najmanji broj kod liganada **J** (tablica 1). Ligand **F** na terminalnom kraju semitiokarbazonkog supstituenta ima aromatsku skupinu što potencijalno omogućava veću fleksibilnost u nepolarnom otapalu poput oktanola. S druge strane, ligand **J** na terminalnom kraju semitiokarbazonkog supstituenta ima polarnu skupinu koja u nepolarnom otapalu poput oktanola nastoji zauzeti položaj u kojem će biti čim manje izložena otapalu (slika 15).



**Slika 16.** Usporedba najpovoljnijih konformera liganda **F** (a) i liganda **J** (b) dobivenih konformacijskom pretragom uz korištenje implicitnog modela oktanola. Intramolekulske vodikove veze prikazane su plavom isprekidanom linijom.

Iako svi ligandi na terminalnom kraju semitiokarbazonkog supstituenta imaju skupinu koja može stvarati  $\pi$ - $\pi$  interakcije sa središnjim benzenskim prstenom, one nisu nađene ni kod jednog konformera najniže energije. Pronađene su kod ukupno samo 7 konformera viših energija liganada **F** i **G**.

## 4.2 Molekulsko uklapanje

Računima molekulskog uklapanja dobiveno je da najpovoljnije energije vezanja imaju redom ligandi **F**, **H** i **G**. Njihove energije vezanja prikazane su u tablici 4 i uspoređene su s energijama vezanja široko korištenih antibiotika azitromicina i eritromicina dobivenih računima molekulskog uklapanja u sličnom računalnom istraživanju (Čorak, 2018). Energije svih načina vezanja dobivenih u ovom istraživanju povoljnije su od energija vezanja azitromicina i eritromicina. To ukazuje na veći afinitet istraživanih liganda za vezanje na PTAR u odnosu na spomenute antibiotike. Međutim, afinitet vezanja nije jedini kriterij za efikasnost antibiotika i iluzorno je očekivati da bi svi istraženi ligandi bili bolji antibiotici od azitromicina i eritromicina. Ostali faktori, poput mehanizma ulaska u stanicu i toksičnosti za ljudski organizam igraju važnu ulogu u tome hoće li neki antibiotik biti efikasan i ući u široku upotrebu.

**Tablica 4.** Usporedba energija vezanja najpovoljnijih načina vezanja liganada F, H i G s energijom vezanja azitromicina i eritromicina.

<b>Ligand</b>	<b>Energija vezanja [kJ mol<sup>-1</sup>]</b>
<b>F</b>	-49,74
<b>H</b>	-49,32
<b>G</b>	-47,65
Azitrmicin	-18,46
Eritromicin	-8,95

Razlike između energija pojedinih načina vezanja iznose oko 0,5 kJ mol<sup>-1</sup> što nije značajna razlika i teško je reći koji se ligand zapravo najefikasnije veže u PTAR ribosoma *E. coli*. Iz tog razloga bilo bi korisno provesti konformacijsku pretragu Monte Carlo veznog mjesta s vezanim ligandom. Tako bi se temeljitije istražio položaj nukleotida u veznom mjestu i interakcije koje tvore s ligandom. Konformacijska pretraga veznog mjesta s vezanim ligandom otkrila bi nam da li konformacijske promjene uzrokovane vezanjem liganda za nukleotide i aminokiseline u veznom mjestu dovode do promjene položaja nukleotida koji imaju ulogu u pozicioniranju supstrata i katalizi peptidne veze.

### 4.2.1 Intramolekulske interakcije u veznom mjestu

Intramolekulske  $\pi$ - $\pi$  interakcije i vodikove veze pronađene su kod velikog udjela načina vezanja. Intramolekulske  $\pi$ - $\pi$  interakcije prisutne su u 31 od 187 načina vezanja što je značajno više nego 7 od 7614 koliko je pronađeno u konformerima nađenih konformacijskom pretragom. Iako su kod najpovoljnijih načina vezanja nađene samo u ligandu **G**, intramolekulske  $\pi$ - $\pi$  interakcije prisutne su kod načina vezanja viših, ali i dalje povoljnih energija vezanja liganada

**F i H.** Ovi rezultati upućuju na to da su intramolekulske  $\pi$ - $\pi$  interakcije učestalije u PTAR-u nego u otapalu što je neočekivan rezultat. Intramolekulske vodikove veze prisutne su kod 4 od 10 najpovoljnijih načina vezanja, te u ukupno 47 pronađenih načina vezanja. Velika učestalost intramolekulskih vodikovih veza, te njihova prisutnost u nekim od najpovoljnijih načina vezanja, upućuje na to da one ne utječu negativno na vezanje liganada u PTAR.

#### 4.2.2 Intermolekulske interakcije u veznom mjestu

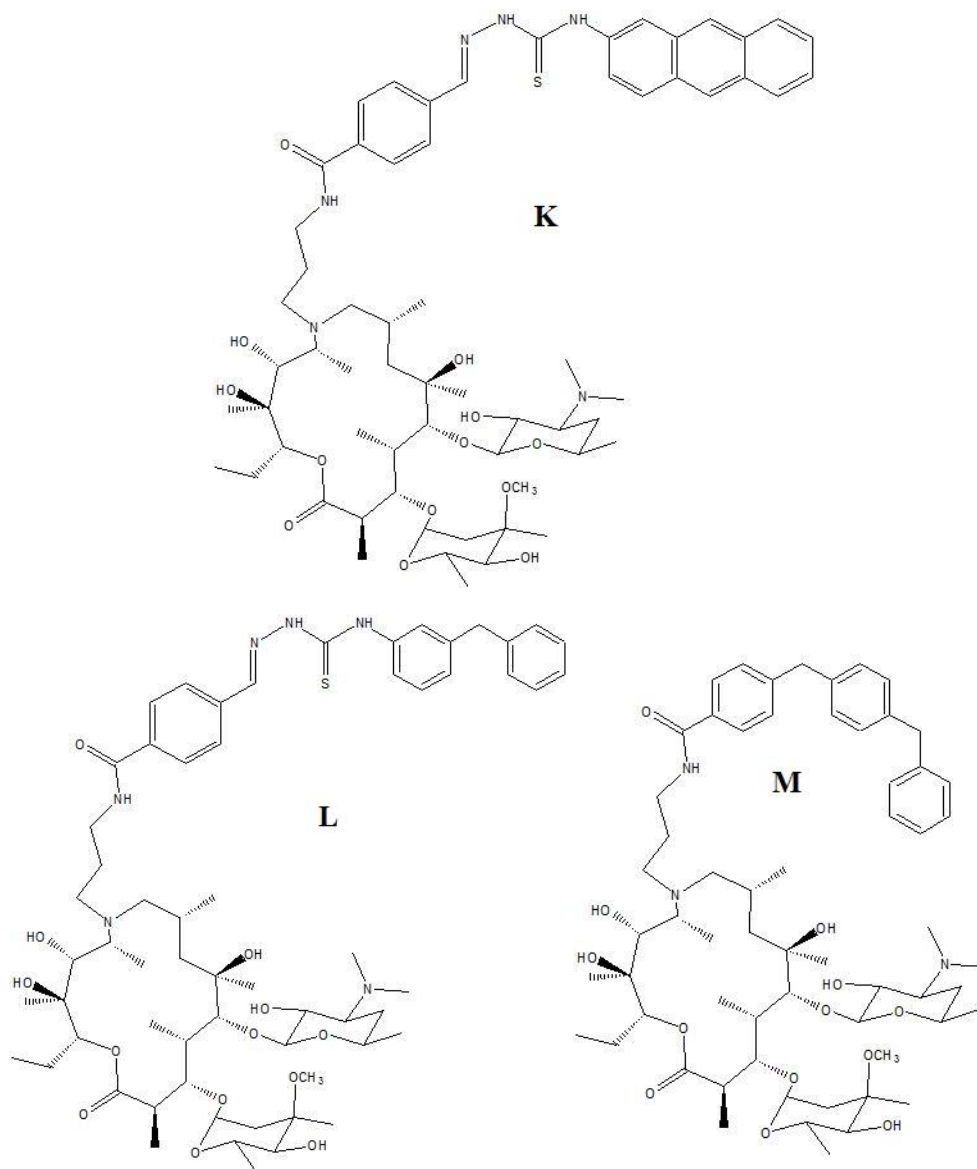
Budući da su intermolekulske vodikove veze prisutne kod većine pronađenih načina vezanja, može se zaključiti da su one ključne u stabiliziranju liganda u veznom mjestu. Intermolekulske  $\pi$ - $\pi$  interakcije također su vrlo česte i, iako nisu prisutne u najpovoljnijem načinu vezanja, prisutne su u načinu vezanja koji je za samo 0,42 kJ mol<sup>-1</sup> nepovoljniji od najpovoljnijeg načina vezanja te u mnogim drugim povoljnim načinima vezanja. To ih, kao i intermolekulske vodikove veze, čini vrlo bitnim za stabiliziranje liganda u veznom mjestu.

Većina liganada u veznom mjestu poprima konformaciju nalik većini najpovoljnijih konformacija nađenih Monte Carlo konformacijskom pretragom te se veže u džep koji u veznom mjestu tvore nukleotidi G2057, A2058, A2059, G2061, A2062, G2505, U2506, G2583, U2585 i U2586. S tim nukleotidima makrolaktonski prsten i semitiokarbazoni supstituent tvore vodikove veze i  $\pi$ - $\pi$  interakcije. Ti rezultati u skladu su s očekivanim budući da je u blizini vezno mjesto eritromicina koji se stabilizira interakcijama s A2058 i C2611. Pronađena su tri alternativna mjesta vezanja u koje se pozicionira terminalni kraj semitiokarbazonkog supstituenta. Za takve načine vezanja ligand poprima konformaciju u kojoj je semitiokarbazoni supstituent ispružen i udaljen od makrolaktonskog prstena. Alternativni načini vezanja prikazani na slikama 13b i 13c farmakološki su najzanimljiviji budući da površinu mjesta vezanja tvore nukleotidi koji sudjeluju u pozicioniranju supstrata i kataliziraju reakcije stvaranja peptidne veze. Njihova deaktivacija mogla bi najviše utjecati na katalitičku aktivnost bakterijskog ribosoma.

Ligand **G**, za razliku od liganda **F i H** niti u jednom od 5 najpovoljnijih načina vezanja ne stupa u interakcije s nukleotidom A2058, što ukazuje da bi mogao biti učinkovit protiv bakterija rezistentnih na eritromicin budući da se rezistencija na makrolide temelji na dimetilaciji ili supstituciji A2058 koji je ključan za stabiliziranje eritromicina u veznom mjestu.

### 4.3 Prijedlog za daljnja istraživanja

Na temelju rezultata dobivenih računima molekuskog uklapanja može se zaključiti kako su intermolekulske  $\pi$ - $\pi$  interakcije prisutne kod velikog broja energetski povoljnih načina vezanja. U velikom broju slučajeva terminalni supstituent, koji je variran među ligandima stvara  $\pi$ - $\pi$  interakcije s nukleotidima veznog mjesta. Ligandi koji imaju nesupstituiranu aromatsku skupinu, pogotovo ligandi **F**, **G** i **H**, imaju povoljnije energije vezanja od liganada koji imaju polarni supstituent na terminalnom benzenskom prstenu i od onih koji imaju nearomatski supstituent. Uzevši u obzir te činjenice, za daljnja istraživanja predloženi su ligandi **K**, **L** i **M** (slika 17). Ligand **K** na terminalnom kraju semitiokarbazonkog supstituenta ima antracensku skupinu koja donosi dodatne mogućnosti za stvaranje  $\pi$ - $\pi$  interakcija. Potencijalni problem kod tog liganda je veličina i rigidnost terminalnog supstituenta koja može ograničiti fleksibilnost i konformacijske promjene te otežati ulazak liganda u vezno mjesto. Uloga atoma ugljika između dva terminalna benzenska prstena liganda **L** je dodatak dvije jednostruke veze oko kojih se benzenski prsteni mogu rotirati što bi im dalo dodatnu konformacijsku slobodu i povećalo mogućnost za stvaranje  $\pi$ - $\pi$  interakcija. Problem kod liganda **L**, kao i kod liganda **K** bi mogao biti taj što ima veću molekulsku masu od svih do sad pretraženih liganada što potencijalno otežava ulazak u stanicu i vezno mjesto. To je uzeto u obzir kod dizajna liganda **M** kojem su ostavljena ukupno tri benzenska prstena povezana jednostrukim vezama oko kojih je moguća rotacija, ali su izuzeta tri atoma dušika i atom sumpora. Kod liganda **M** problem bi mogao biti u nedostatku polarnih skupina na supstituentu što bi moglo smanjiti topljivost spoja i ograničiti broj vodikovih veza koje ligand stvara s veznim mjestom u ribosomu.



**Slika 17.** Dvodimenzionalni prikaz liganada predloženih za daljnja istraživanja.

## 5. Zaključak

Cilj ovog istraživanja bio je istražiti vezanje deset strukturnih derivata azitromicina u regiju PTAR ribosoma bakterije *Escherichia coli* metodom molekuskog uklapanja. Prvo je provedena konformacijska pretraga Monte Carlo uz korištenje četiri različita modela otapala. Većina najpovoljnijih konformera nađenih Monte Carlo konformacijskom pretragom poprima konformaciju u kojoj je semitiokarbazoni supstituent približen makrolaktonskom prstenu. Izuzetci su ligandi **A** i **F** čija je konformacijska pretraga napravljena uz korištenje implicitnog modela oktanola. Razlog takve konformacije leži u fleksibilnosti terminalnog supstituenta, odnosno velika nepolarna skupina na terminalnom kraju semitiokarbazonskog supstituenta zbog koje su interakcije s otapalom povoljnije od onih s makrolaktonskim prstenom.

Molekulskim uklapanjem dobiveno je da ligand **F** ima najpovoljniju energiju vezanja, a u okviru od  $2,1 \text{ kJ mol}^{-1}$  nalaze se najpovoljniji načini vezanja liganada **H** i **G**. Svi ligandi istraženi u ovom istraživanju imaju povoljniju energiju vezanja dobivenu računima molekuskog uklapanja od energija vezanja azitromicina i eritromicina dobivenih istom metodom što bi ih sve trebalo činiti potencijalno dobrim antibioticima. Međutim, energija vezanja dobivena računima molekuskog uklapanja nije jedini kriterij za efikasnost antibiotika. Ligand **G** jedini je od tri liganda s najpovoljnijim energijama vezanja koji ne stupa u interakcije s A2058 što ga čini potencijalno efikasnim protiv bakterija rezistentnih na makrolide budući da se rezistencija na makrolide temelji na dimetilaciji A2058 ili na A2058G supstituciji. Intermolekulske  $\pi$ - $\pi$  interakcije važne su za stabilizaciju liganda u PTAR-u i prisutne su kod velikog dijela najpovoljnijih načina vezanja. Na temelju toga dizajnirani su ligandi **K**, **L** i **M** kao prijedlog za daljnja istraživanja. Njihovi supstituenti trebali bi povećati mogućnost za  $\pi$ - $\pi$  interakcije zbog dodatka aromatskog prstena, odnosno zbog povećanja fleksibilnosti supstituenta.



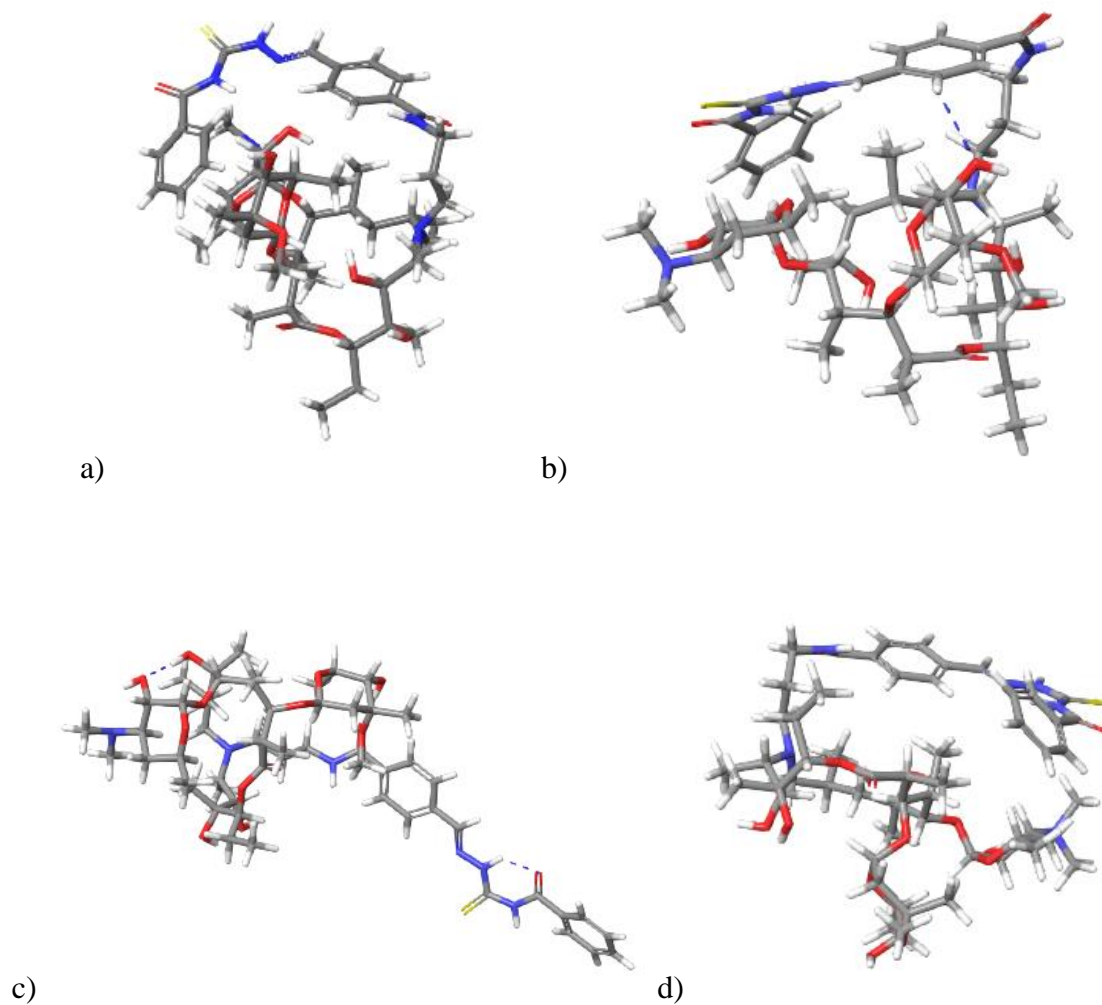
## 6. Popis literature:

- Abraham, M.J., Murtola, T., Schultz, R., Pall, S., Smith, J.C., Hess, B., Lindahl, E., 2015. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1-12:19-25.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2008. *Molecular Biology of the Cell*, 6. izd. Garland Science, New York.
- Becker, O.M., MacKerell, A.D.J., Roux, B., Watanabe, M., 2001. *Computational Biochemistry and Biophysics*, 1. izd. Marcel Dekker AG, New Yourk.
- Chang, G., Guida, W.C., Still, W.C., 1989. An internal-coordinate Monte Carlo method for searching conformational space. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 4379–4386.
- Cooper, G.M., Hausman, R.E., 2007. *The Cell: A Molecular Approach*, 4. izd. ASM Press, Washington DC.
- Čorak, N., 2018. Računalno istraživanje vezanja strukturnih derivata azitromicina u peptidil-transferazni centar velike podjedinice ribosoma bakterije *Escherichia coli* [diplomski rad], Sveučilište u Zagrebu.
- Dinos, G.P., 2017. The macrolide antibiotic renaissance. *Br. J. Pharmacol.* 174, 2967–2983.
- Dunkle, J.A., Xiong, L., Mankin, A.S., Cate, J.H.D., 2010. Structures of the *Escherichia coli* ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 17152–7.
- Enzler, J., 1999. The Macrolides: Erythromycin, Clarithromycin, and Azithromycin. *Mayo Clin. Proc.* 74, 613–634.
- Gunsteren, W.F. Van, Bakowies, D., Baron, R., Chandrasekhar, I., Christen, M., Daura, X., Gee, P., Geerke, D.P., Gl, A., Philippe, H.H., Kastenzholz, M.A., Oostenbrink, C., Schenk, M., Trzesniak, D., Vegt, N.F.A. Van Der, Yu, H.B., 2006. *Biomolecular Modeling : Goals , Problems , Perspectives* *Angewandte* 4064–4092.
- Harms, M., Franceschi, F., Hansen, H.A.S., Bartels, H., Zarivach, R., Yonath, A., 2003. Structural Basis for the Antibiotic Activity of Ketolides and Azalides *Max-Planck-Institute for Molecular Genetics* 11, 329–338.
- Jorgensen, W.L., Maxwell, D.S., Tirado-rives, J., 1996. Development and Testing of the OPLS

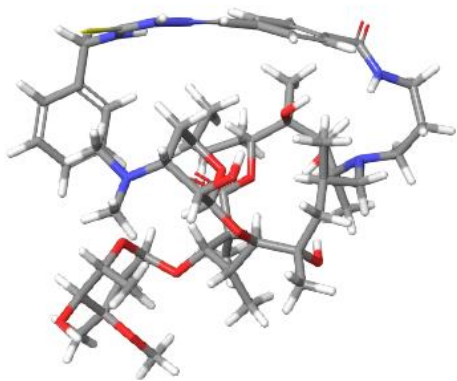
- All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids 7863, 11225–11236.
- Kroese, D.P., Brereton, T., Taimre, T., Botev, Z.I., 2014. Why the Monte Carlo method is so important today. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* 6, 386–392.
- Leach, A.R., 2001. *Molecular Modeling: Principles and Applications*, 2. izd. Pearson Education Limited, London.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2008. *Lehninger: principles of biochemistry*, 5. izd. W.H. Freeman and Company, New York.
- Polacek, N., Mankin, A.S., 2005. The Ribosomal Peptidyl Transferase Center: Structure, Function, Evolution, Inhibition. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 40, 285–311.
- Sanner, M.F., 1999. Python: A Programming Language for Software Integration and Development. *J. Mol. Graph. Mod.* 17, 57–61.
- Schrodinger, 2017a. MacroModel.
- Schrodinger, 2017b. Maestro.
- Schrodinger, 2018. Protein Preparation Wizard 9.
- Trott, O., Olson, A.J., 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J. Comput. Chem.* 455–461.
- Ulrich, B., Allinger, N.L., 1982. *Molecular Mechanics*. ACS Monogr. 177.
- Vázquez-Laslop, N., Mankin, A.S., 2018. How Macrolide Antibiotics Work. *Trends Biochem. Sci.* 43, 668–684.
- Wilson, D.N., 2014. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat. Publ. Gr.* 12, 35–48.

## 7. Dodatak

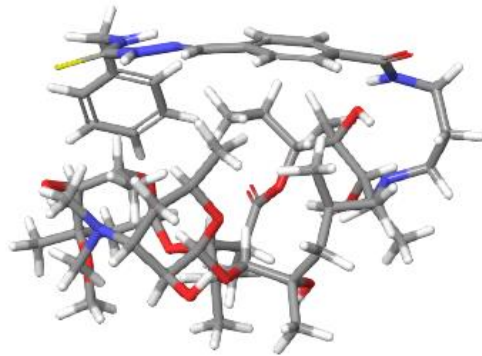
### 7.1. Najpovoljniji konformeri pronadjeni Monte Carlo konformacijskom pretragom u četiri modela otapala



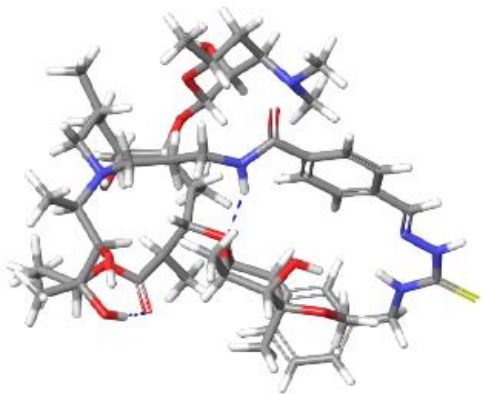
**Slika 18.** Najpovoljniji konformeri liganda A dobivenih konformacijskom pretragom u modelu otapala: a) dielektrične konstante 81, b) dielektrične konstante 4, c) implicitnom modelu oktanola, d) implicitnom modelu vode.



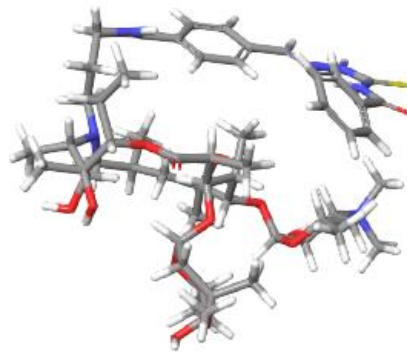
a)



b)

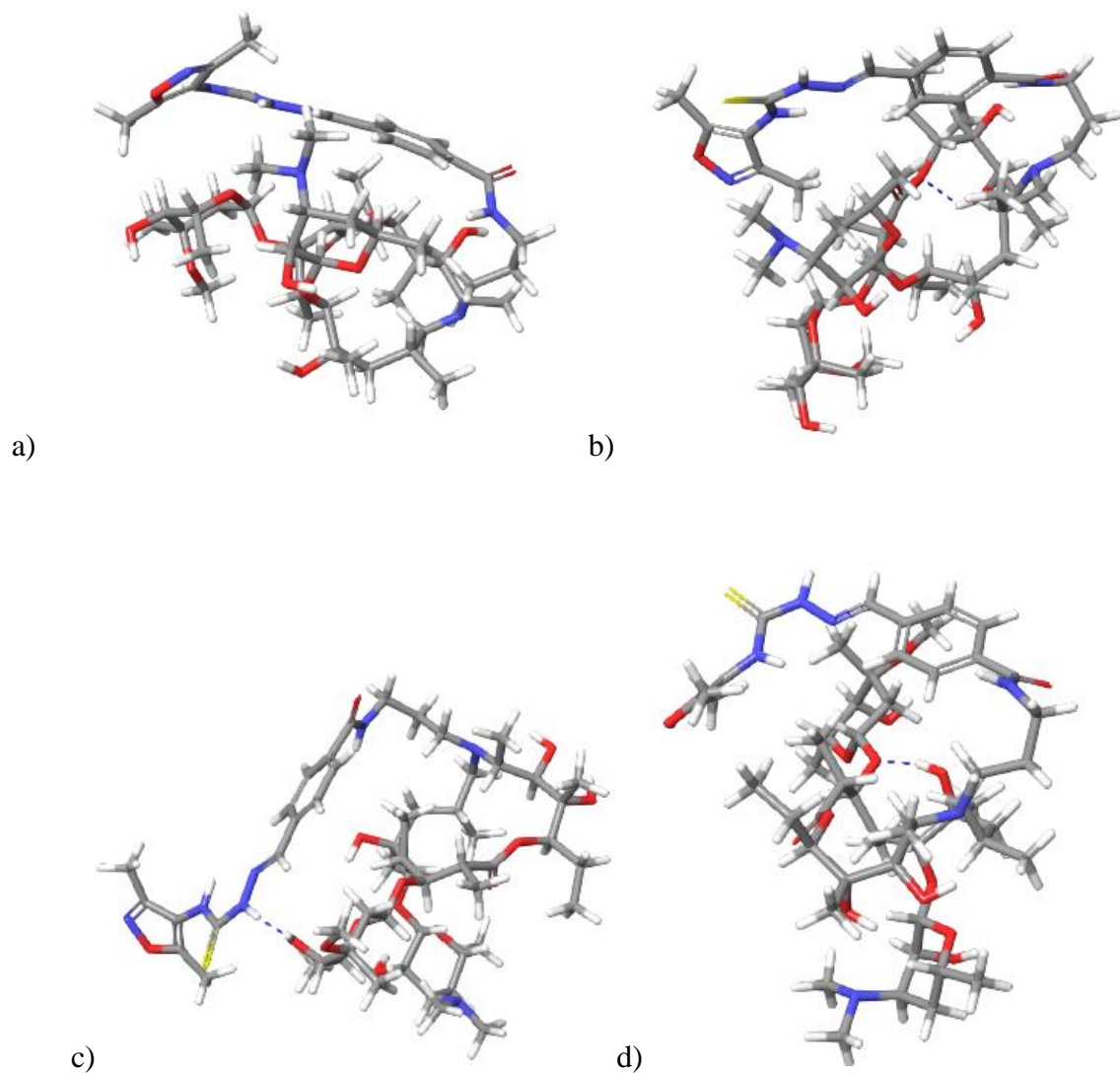


c)

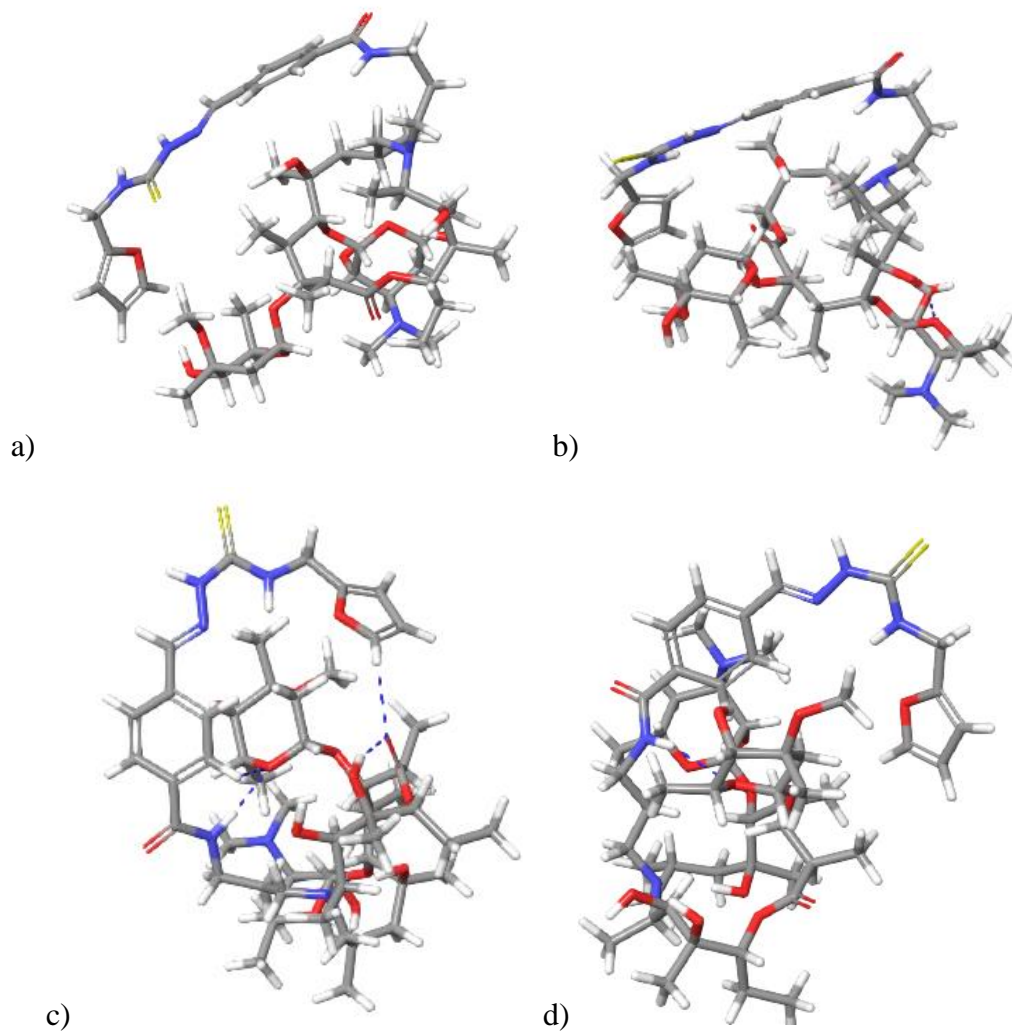


d)

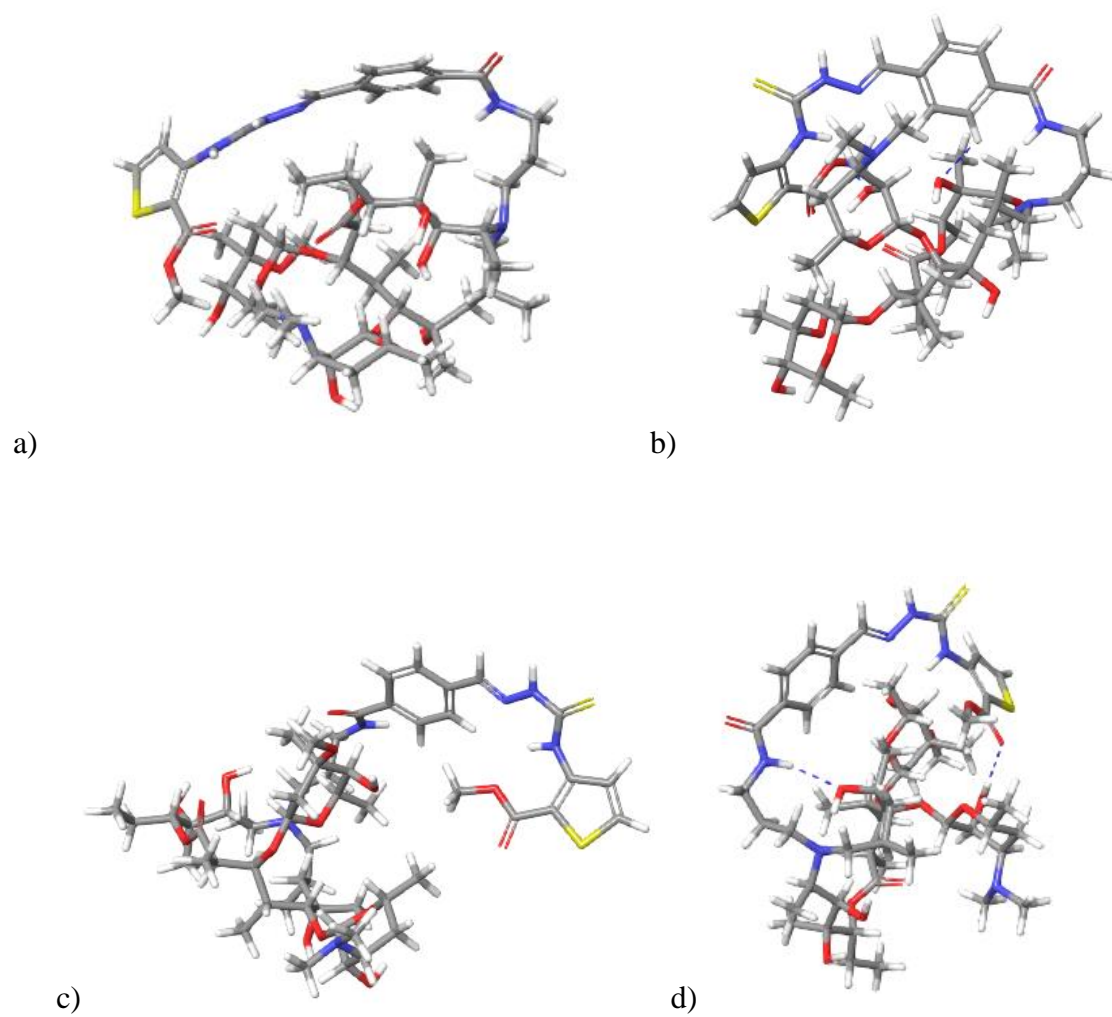
**Slika 19.** Najpovoljniji konformeri liganda B dobivenih konformacijskom pretragom u modelu otapala: a) dielektrične konstante 81, b) dielektrične konstante 4, c) implicitnom modelu oktanola, d) implicitnom modelu vode.



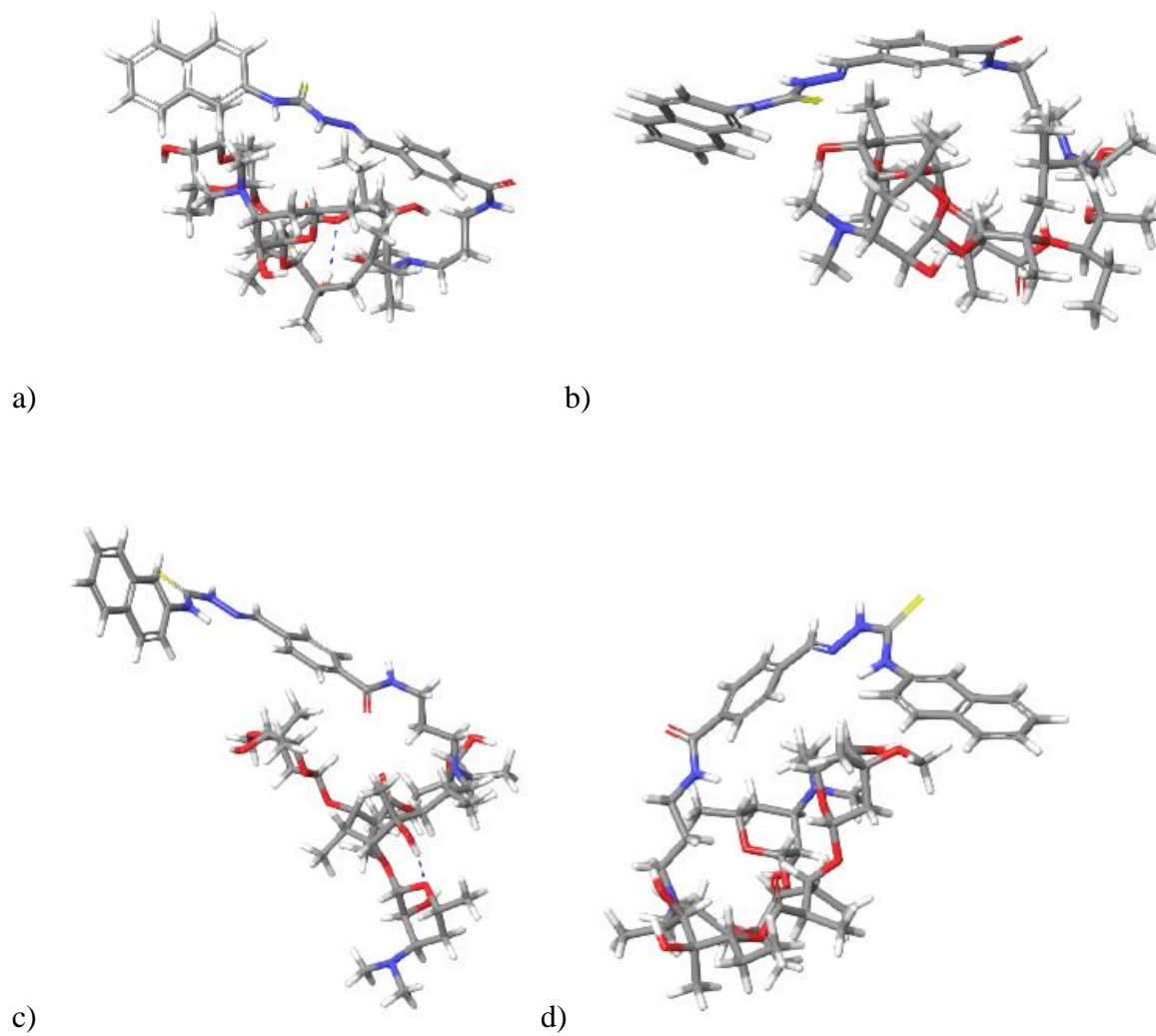
**Slika 20.** Najpovoljniji konformeri liganda C dobivenih konformacijskom pretragom uz korištenje modela otapala: a) dielektrične konstante 81, b) dielektrične konstante 4, c) implicitnom modelu oktanola, d) implicitnom modelu vode.



**Slika 21.** Najpovoljniji konformeri liganda D dobivenih konformacijskom pretragom uz korištenje modela otapala: a) dielektrične konstante 81, b) dielektrične konstante 4, c) implicitnom modelu oktanola, d) implicitnom modelu vode.

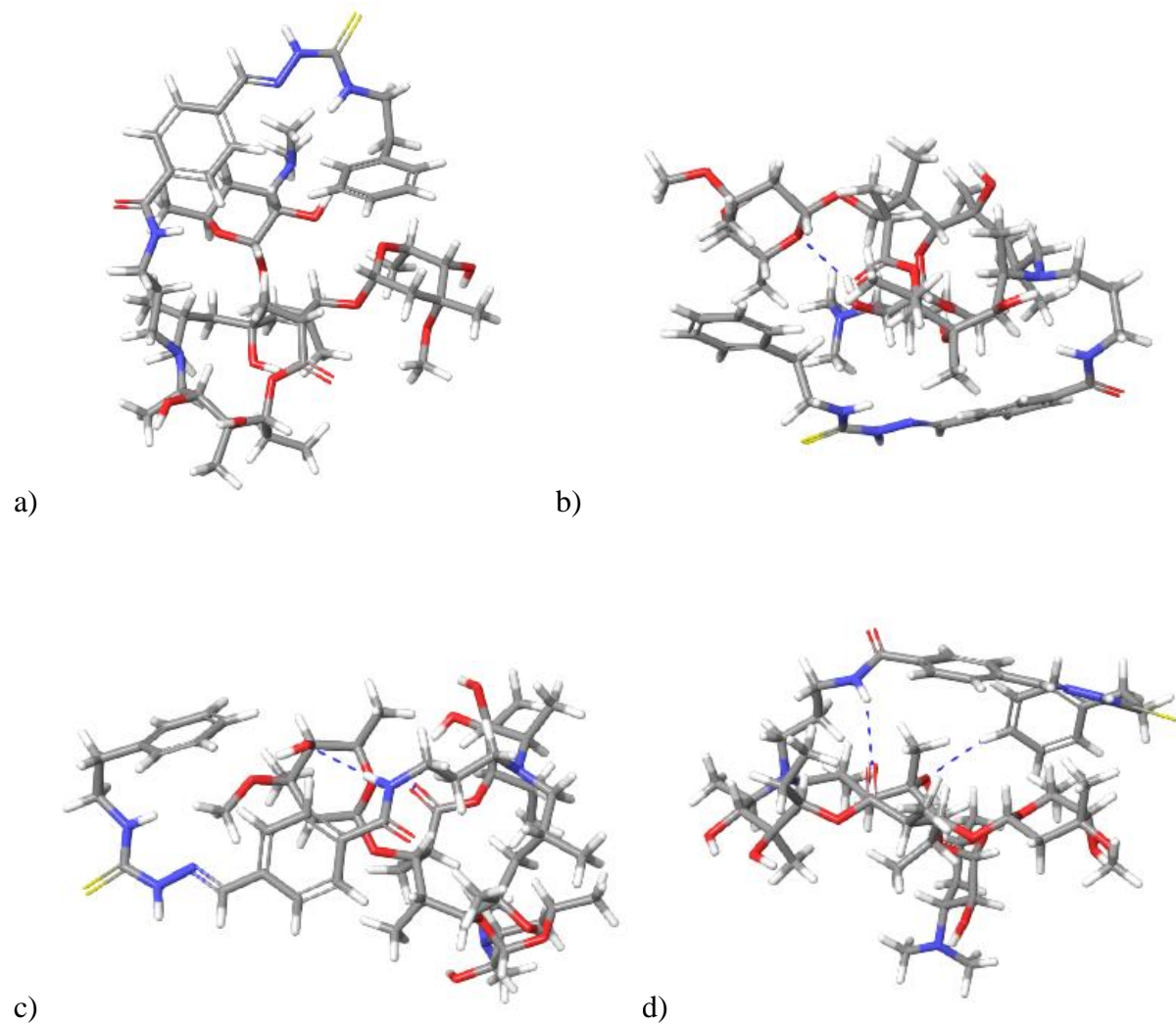


**Slika 22.** Najpovoljniji konformeri liganda **E** dobivenih konformacijskom pretragom uz korištenje modela otapala: a) dielektrične konstante 81, b) dielektrične konstante 4, c) implicitnom modelu oktanola, d) implicitnom modelu vode.

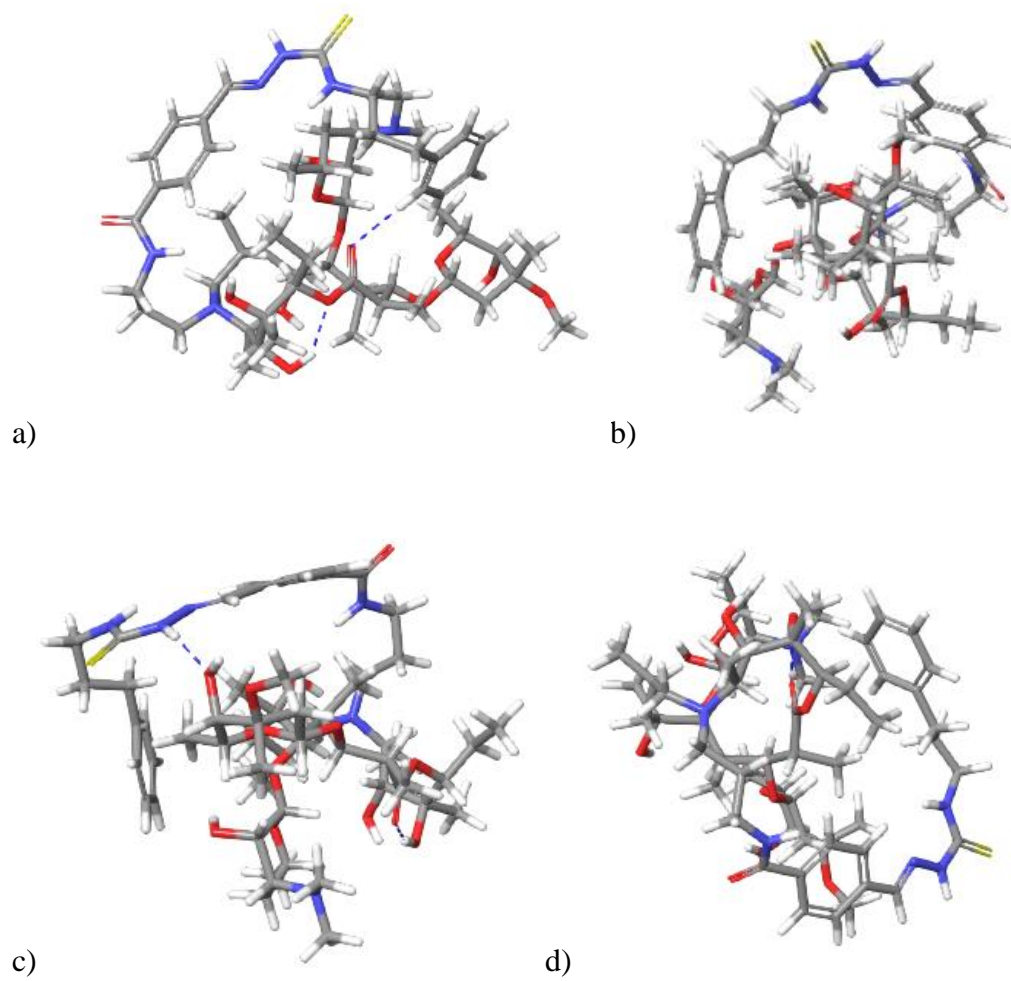


**Slika 23.** Najpovoljniji konformeri liganda **F** dobivenih konformacijskom pretragom uz korištenje modela otapala: a) dielektrične konstante 81, b) dielektrične konstante 4, c) implicitnom modelu oktanola, d) implicitnom modelu vode.

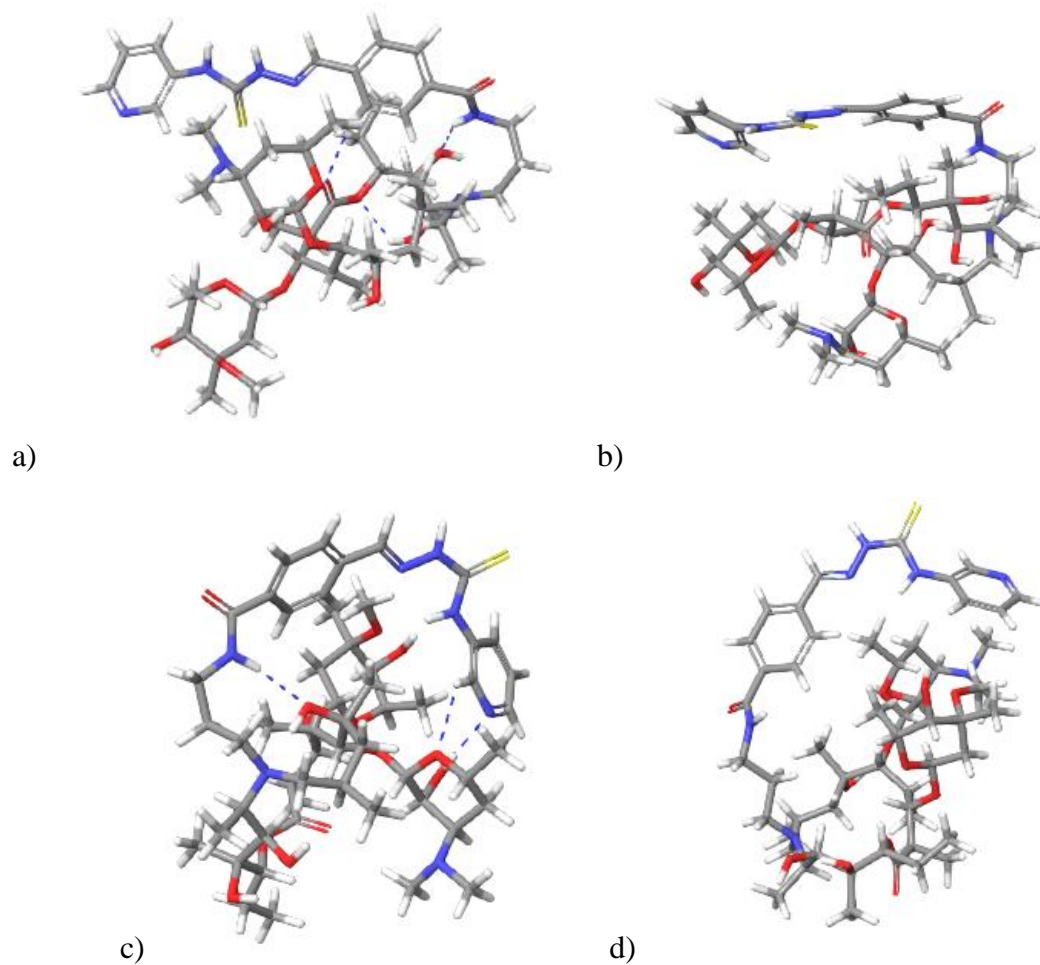




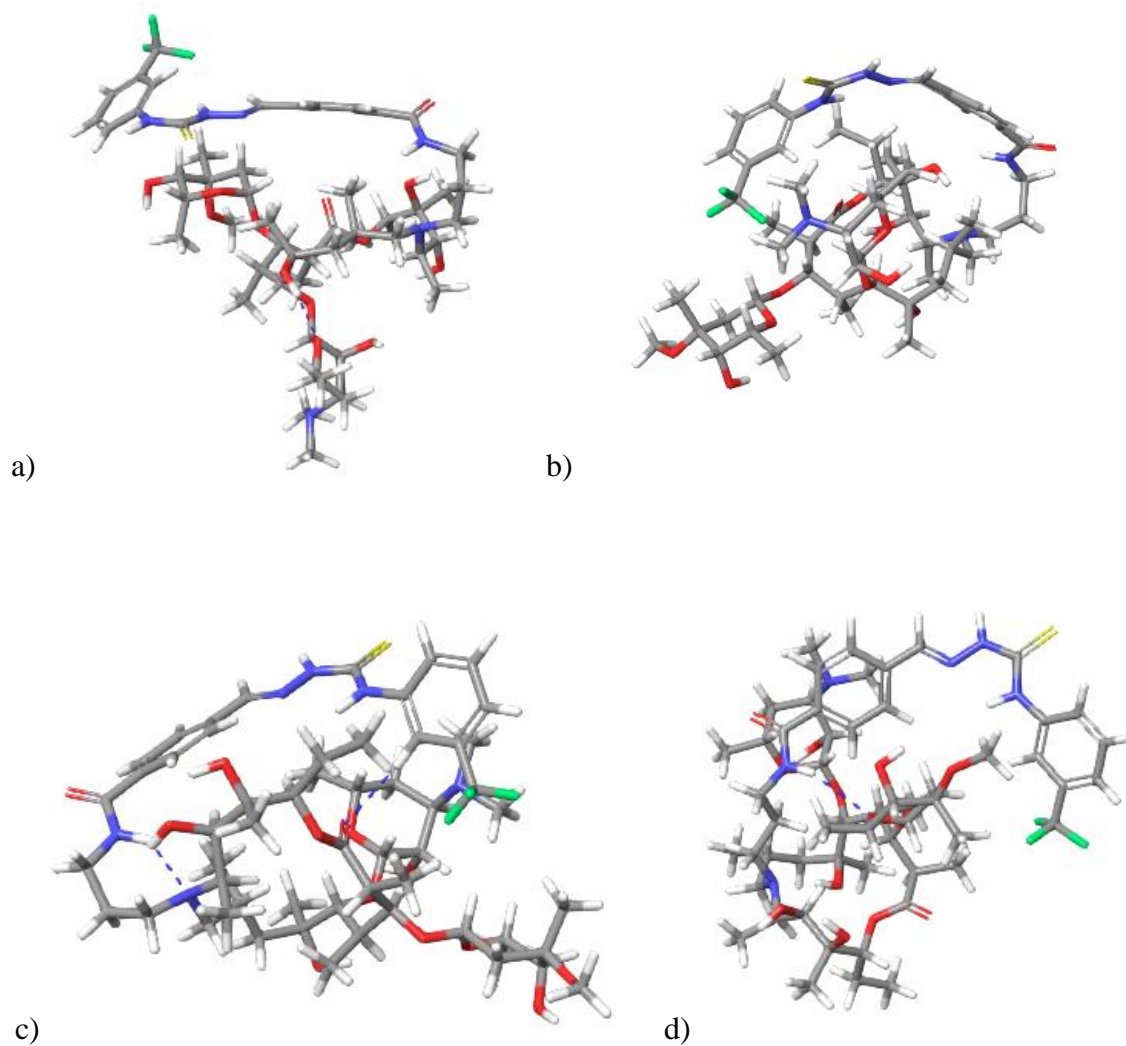
**Slika 24.** Najpovoljniji konformeri liganda **G** dobivenih konformacijskom pretragom uz korištenje modela otapala: a) dielektrične konstante 81, b) dielektrične konstante 4, c) implicitnom modelu oktanola, d) implicitnom modelu vode.



**Slika 25.** Najpovoljniji konformeri liganda **H** dobivenih konformacijskom pretragom uz korištenje modela otapala: a) dielektrične konstante 81, b) dielektrične konstante 4, c) implicitnom modelu oktanola, d) implicitnom modelu vode.



**Slika 26.** Najpovoljniji konformeri liganda **I** dobivenih konformacijskom pretragom u modelu otapala: a) dielektrične konstante 81, b) dielektrične konstante 4, c) implicitnom modelu oktanola, d) implicitnom modelu vode.



**Slika 27.** Najpovoljniji konformeri liganda **J** dobivenih konformacijskom pretragom uz korištenje modela otapala: a) dielektrične konstante 81, b) dielektrične konstante 4, c) implicitnom modelu oktanola, d) implicitnom modelu vode.

## 7.2 Energije vezanja, intramolekulske i intermolekulske interakcije pojedinih načina vezanja dobiveni računima molekuskog uklapanja.

**Tablica 5.** Nukleotidi i aminokiseline s kojim ligand A stvara vodikove veze i  $\pi$ - $\pi$  interakcije. Prisutnost intramolekulskih vodikovih veza i  $\pi$ - $\pi$  interakcija. Energije pojedinih načina vezanja dobivene računima molekuskog uklapanja.

Ligand	Energija [kJmol <sup>-1</sup> ]	Intermolekulske vodikove veze	Intermolekulske $\pi$ - $\pi$ interakcije	Intramolekulske vodikove veze	Intramolekulske $\pi$ - $\pi$ interakcije
A	-45,98	G2505, A2062	C2611 U2504	0	0
A	-45,56	G2057, A2059, G2053	A2058	1	0
A	-45,14	G2057, G2053, A2062	G2505	0	0
A	-44,73	A2059, U2609	C2611	0	0
A	-44,73	G2061, U2585, A2062 U1782	U2504	0	0
A	-44,73	U2585, U2586, A2062, U2584, U2609	U2504	0	0
A	-44,31	A800	0	0	0
A	-44,31	C2610, A742	0	0	0
A	-44,31	A2062, A2503, G2505	U2506, G2061	0	0
A	-43,89	A2058, G2505	0	0	0
A	-43,89	G2505	A2058, G2505	0	0
A	-43,89	G2505, C2451	0	0	0
A	-43,47	G2504	0	0	0
A	-43,05	U2441, U2585, U2585 G2057, G2056, Gln	A2587, A2061	0	0
A	-42,64	150	0	0	0
A	-42,64	U2441, U2586, U2585	A2062	1	0
A	-42,22	0	0	1	0
A	-42,22	A2059	0	0	0

**Tablica 6.** Nukleotidi s kojima ligand **B** stvara vodikove veze i  $\pi$ - $\pi$  interakcije. Prisutnost intramolekulskih vodikovih veza i  $\pi$ - $\pi$  interakcija. Energije pojedinih načina vezanja dobivene računima molekuskog uklapanja.

Ligand	Energija [kJmol <sup>-1</sup> ]	Intermolekulske vodikove veze	Intermolekulske $\pi$ - $\pi$ interakcije	Intramolekulske vodikove veze	Intramolekulske $\pi$ - $\pi$ interakcije
B	-46,40	U2585, G2505, A2062	U2584	1	0
B	-45,14	G2505, A2503, U2584,	0	0	0
B	-45,14	U2609, C2452, C2442, A2062,	U2585	0	0
B	-42,22	G2505, U2584	A2062	0	0
B	-41,80	U2585, A2059, A2062	0	0	1
B	-41,80	G2505, U2585, U1782	U2605	1	0
B	-41,38	U2584, U2506, G2505, U1782, A2503	0	0	0
B	-41,38	U2585, U2506	A2451	0	0
B	-39,71	A2059, G2505, U2585	U2504	0	0
B	-39,71	U2585, A2059	0	0	0
B	-39,71	G2505, A2062	G2505	1	0
B	-38,87	U2586, G2608	A2503, A2062	0	1
B	-37,20	A2062, G2505	0	0	0
B	-37,20	G2056	G2505	0	0
B	-36,78	A2059, G2053	A2059	1	0
B	-36,37	U2584, U1782, A2062	U2585,	0	0
B	-35,95	U2585, G2505	0	0	1
B	-35,53	U2506, G2505	0	0	0

**Tablica 7.** Nukleotidi s kojima ligand **C** stvara vodikove veze i  $\pi$ - $\pi$  interakcije. Prisutnost intramolekulskih vodikovih veza i  $\pi$ - $\pi$  interakcija. Energije pojedinih načina vezanja dobivene računima molekuskog uklapanja.

Ligand	Energija [kJ mol <sup>-1</sup> ]	Intermolekulske vodikove veze	Intermolekulske $\pi$ - $\pi$ interakcije	Intramolekulske vodikove veze	Intramolekulske $\pi$ - $\pi$ interakcije
C	-46,82	U2585, G2505, A2058,	0	0	0
C	-45,56	G2061	0	0	0
C	-45,14	G2505, U2506, U1782, A2062	U2506	0	0
C	-44,73	A2058, U2609, G2505	A2059, A2503	1	0
C	-44,73	G2583, A2451, U2585, A2062	A2451	0	0
C	-44,73	A2059, U2584,	0	0	0
C	-44,73	G2061, U2584	0	0	0
C	-44,73	U2584, U2586, C2610	0	0	0
C	-44,31	G2505, U2506	0	1	0
C	-44,31	U2506, G2505, A2503, U2584,	0	0	0
C	-44,31	C2063, C2442, C2066, C2056, C2442, A2439	0	0	0
C	-44,31	A2059, G2505	0	0	0
C	-44,31	G2581, U2586, A2062	U2506	0	0
C	-44,31	G2061, U2584	0	0	0
C	-44,31	G2505,	G2505	0	0
C	-43,89	G2061	0	0	0
C	-43,89	U2585,	0	0	0
C	-43,89	A2062,	0	1	0
C	-43,89	G2061, U2584, G2505	U2506	0	0
C	-43,47	C2066, C2063, C2442, A2439	0	0	0
C	-43,05	C2442, A2059, A2062	C2442	0	0

**Tablica 8.** Nukleotidi i aminokiseline s kojima ligand **D** stvara vodikove veze i  $\pi$ - $\pi$  interakcije. Prisutnost intramolekulskih vodikovih veza i  $\pi$ - $\pi$  interakcija. Energije pojedinih načina vezanja dobivene računima molekuskog uklapanja.

Ligand	Energija [kJ mol <sup>-1</sup> ]	Intermolekulske vodikove veze	Intermolekulske $\pi$ - $\pi$ interakcije	Intramolekulske vodikove veze	Intramolekulske $\pi$ - $\pi$ interakcije
D	-43,89	A2452, G2061, A2503, U2585, U2586	0	0	0
D	-43,89	Asn 149, A2054, G2056, G2505,	0	1	0
D	-43,47	U2858	U2584	1	0
D	-43,05	U2506, A2059	U2585	0	1
D	-43,05	G2505, A2439, U2585, G2505, A2503,	0	0	0
D	-42,64	G2061, A2058, C2452, G2061, U2585,	0	0	0
D	-42,22	U2586,	0	0	0
D	-42,22	G2505, U2585, A2503,	0	0	1
D	-42,22	U2506, U2585, A2059	U2585	0	1
D	-42,22	A2059, U2585, A2503, U2441, U2586, A2062,	G2505	0	0
D	-42,22	G2505	0	0	0
D	-42,22	G2505, U2441, A2062	0	0	0
D	-41,80	U2585 C2442, A2062, U2585,	U2504, U2506	0	0
D	-41,80	A2503,	0	1	0
D	-41,80	U2441, G2505, A2062	0	0	0
D	-41,38	U2504, U2585, C2063,	G2505	0	0
D	-41,38	U2441, G2505	A2062	0	0
D	-40,96	U2586	A2578, A2062	0	0
D	-40,55	C2452, G2505,	0	0	0
D	-40,55	A2059, G2505,	A2503	1	0
D	-39,29	G2505, G2056, G2057	G2056, G2505	0	0
D	-38,04	0	0	0	0



**Tablica 9.** Nukleotidi s kojima ligand **E** stvara vodikove veze i  $\pi$ - $\pi$  interakcije. Prisutnost intramolekulskih vodikovih veza i  $\pi$ - $\pi$  interakcija. Energije pojedinih načina vezanja dobivene računima molekuskog uklapanja.

<b>Ligand</b>	<b>Energija [kJ mol<sup>-1</sup>]</b>	<b>Intermolekulske vodikove veze</b>	<b>Intermolekulske <math>\pi</math>-<math>\pi</math> interakcije</b>	<b>Intramolekulske vodikove veze</b>	<b>Intramolekulske <math>\pi</math>-<math>\pi</math> interakcije</b>
<b>E</b>	-43,89	U2584 U2585	U2506	0	0
<b>E</b>	-43,89	U2585, A2062	U2585	0	0
<b>E</b>	-42,22	U2609, U2586	U2609	0	0
<b>E</b>	-41,80	0	0	0	0
<b>E</b>	-41,80	U2586, U2506, U2585, G2061,	U2504	3	0
<b>E</b>	-41,38	U2504, U1782	0	0	0
<b>E</b>	-41,38	G2505, U2585, C2610	G2505	0	0
<b>E</b>	-40,96	C2610, U1782	U2586	0	0
<b>E</b>	-40,96	U1782, U2586, A2058	A2062	0	0
<b>E</b>	-40,96	A2503 G2056, G2505, A2059,	A2059, A2503	2	0
<b>E</b>	-40,96	U2586	A2058	0	0
<b>E</b>	-40,55	A2451, G2505, U2586	U2585	0	0
<b>E</b>	-39,71	U2506, U2585	0	0	0
<b>E</b>	-39,29	U2609, G2505	0	1	1
<b>E</b>	-39,29	A2451, A2062, G2505	A2451	1	0

**Tablica 10.** Nukleotidi i aminokiseline s kojima ligand **F** stvara vodikove veze i  $\pi$ - $\pi$  interakcije. Prisutnost intramolekulskih vodikovih veza i  $\pi$ - $\pi$  interakcija. Energije pojedinih načina vezanja dobivene računima molekulskog uklapanja.

Ligand	Energija [kJ mol <sup>-1</sup> ]	Intermolekulske vodikove veze	Intermolekulske $\pi$ - $\pi$ interakcije	Intramolekulske vodikove veze	Intramolekulske $\pi$ - $\pi$ interakcije
<b>F</b>	-49.74	G2057, G2505, A2059, U2586	0	2	0
<b>F</b>	-49.32	U2506, G2505, A2062,	U2506, U2585	2	0
<b>F</b>	-48.49	U2585, A2058, A2062, U2506, G2505, A2058,	U2506	0	0
<b>F</b>	-47.65	A2062,	U2506	1	0
<b>F</b>	-47.65	G2056, A2062	G2505	0	0
<b>F</b>	-47.23	U2585, A2062, G2505,	A2058, G2505	1	0
<b>F</b>	-47.23	U2609, C2610, A2062, U2585, G2505, G2505,	C2610	0	0
<b>F</b>	-46.82	G2581, A2062,	A2451,	1	1
<b>F</b>	-46.40	G2505, U2586 ASN149, A2054, G2056, G2057, A2062,	U2586, A2503	2	0
<b>F</b>	-46.40	U2586,	A2058	0	0
<b>F</b>	-46.40	A2062, C2063, A2058	U2506	2	0
<b>F</b>	-44.31	U2585, C2452	0	1	0
<b>F</b>	-43.89	A2503, A2584	C2442	0	0
<b>F</b>	-43.05	U2609, A2062, U2506, U2585, A2059,	U2584	0	0
<b>F</b>	-42.64	U2586,	0	0	0
<b>F</b>	-42.64	U2586,	U2506, U2585	0	2
<b>F</b>	-40.96	Lys 90	Arg 92	0	0
<b>F</b>	-40.96	U2586, G2061, A2062	U2585, A2062	0	0
<b>F</b>	-40.96	U2609, A2062, U2584,	U2506	0	0

**Tablica 11.** Nukleotidi s kojima ligand **G** stvara vodikove veze i  $\pi$ - $\pi$  interakcije. Prisutnost intramolekulskih vodikovih veza i  $\pi$  interakcija. Energije pojedinih načina vezanja dobivene računima molekuskog uklapanja.

<b>Ligand</b>	<b>Energija [kJ mol<sup>-1</sup>]</b>	<b>Intermolekulske vodikove veze</b>	<b>Intermolekulske <math>\pi</math>-<math>\pi</math> interakcije</b>	<b>Intramolekulske vodikove veze</b>	<b>Intramolekulske <math>\pi</math>-<math>\pi</math> interakcije</b>
<b>G</b>	-47,65	U2586, G2505, A2062	U2586	0	0
<b>G</b>	-46,40	U2586, G2505, A2062	0	1	1
<b>G</b>	-45,98	U2609, A2503	0	0	0
<b>G</b>	-44,31	U2609, U1782	C2610	0	1
<b>G</b>	-43,05	0	C2610	1	1
<b>G</b>	-43,05	G2061, A2451	C2610, U2609	0	0
<b>G</b>	-42,64	0	C2610	1	1
<b>G</b>	-42,64	A2451, G2061	C2610, U2609	0	0
<b>G</b>	-42,22	G2505, A2058	U2506	0	1
<b>G</b>	-42,22	U2609, U1782, U2585	0	1	1
<b>G</b>	-42,22	G2061, A2451, U2585	U2609,	0	0
<b>G</b>	-41,38	U2585, G2061, G2505 G2581, A2062, U1782,	0	0	1
<b>G</b>	-41,38	G2061	G2608	0	0
<b>G</b>	-40,96	G2505, G2061, C2610	0	0	0
<b>G</b>	-40,96	0	U2504	1	0
<b>G</b>	-40,13	U2585, G2505, G2505 A2054, G2505, G2061	0	2	1
<b>G</b>	-38,04	A2062	0	0	0
<b>G</b>	-37,62	G2505, U2584	G2061, A2053	1	1
<b>G</b>	-37,20	A2054, A2059	A2059	0	0
<b>G</b>	-35,95	U2506, G2057, G2505	G2505	0	0

**Tablica 12.** Nukleotidi i aminokiseline s kojima ligand **H** stvara vodikove veze i  $\pi$ - $\pi$  interakcije. Prisutnost intramolekulskih vodikovih veza i  $\pi$ - $\pi$  interakcija. Energije pojedinih načina vezanja dobivene računima molekuskog uklapanja.

Ligand	Energija [kJ mol <sup>-1</sup> ]	Intermolekulske vodikove veze	Intermolekulske $\pi$ - $\pi$ interakcije	Intramolekulske vodikove veze	Intramolekulske $\pi$ - $\pi$ interakcije
H	-49,32	U2586, U2609, U1782, U2585	U2584	0	0
H	-48,07	U1782, C2610, G2061, A2577, A2058, C2610,	C2610	0	1
H	-47,65	U1782, U2609	G2056, C2611	0	0
H	-47,65	U2584, C2610, A2062	U2584, G2608,	0	1
H	-46,82	G2505, U2504	G2056	1	0
H	-46,82	0	0	0	1
H	-46,82	U2585, G2505, A2062, U2441, U1782	0	0	0
H	-46,40	C786, U2585, Asn 149, A2054, G2057, G2505, G2505,	A2587	1	1
H	-44,31	U2586	0	0	0
H	-43,05	U2585, A2062	U2506, G2061, A2503	1	0
H	-42,64	0	U2586	0	0
H	-42,22	A2058	U2506	0	0
H	-42,22	G2053, G2505, A2062, A2059	A2059	0	0
H	-42,22	U2585, A2058, U2609, U2586	C2611	0	1
H	-42,22	U2609, U2586, A2058	0	1	0
H	-41,80	U2586, U2609, U2584, A2059, G2061	U2586	1	0
H	-41,38	U2441, U2586, A2058		0	0
H	-41,38	C2610, A2058	G2505, U2609	1	0

**Tablica 13.** Nukleotidi s kojima ligand **I** stvara vodikove veze i  $\pi$ - $\pi$  interakcije. Prisutnost intramolekulskih vodikovih veza i  $\pi$ - $\pi$  interakcija. Energije pojedinih načina vezanja dobivene računima molekuskog uklapanja.

Ligand	Energija [kJ mol <sup>-1</sup> ]	Intermolekulske vodikove veze	Intermolekulske $\pi$ - $\pi$ interakcije	Intramolekulske vodikove veze	Intramolekulske $\pi$ - $\pi$ interakcije
I	-46,40	U2506, A2054, G2505, U2586	0	0	0
I	-45,98	U2504, G2505, G2505	G2505	0	0
I	-45,98	G2505	0	1	0
I	-45,56	U2585, A2058	C2611	0	1
I	-45,56	G2057, U2506	C2611, C2611	1	1
I	-45,14	A2058, U2506	C2611, C2611	1	1
I	-44,73	A2451, U2585, A2503 U2506, G2053, A2054, G2057, G2505, A2451,	U2585	0	0
I	-44,73	G2061	0	0	0
I	-44,73	G2576, A2577, C2055, G2505, U2585	A2572, A2572	0	0
I	-44,73	U2585, U2506, U2585, A2058	A2451	0	0
I	-44,31	A2059, U2586, U2586	0	0	0
I	-44,31	A2062, U2585	A2062	0	0
I	-43,05	A2062, C2610, U2609	C2610, U2506	2	0

**Tablica 14.** Nukleotidi s kojima ligand J stvara vodikove veze i  $\pi$ - $\pi$  interakcije. Prisutnost intramolekulskih vodikovih veza i  $\pi$ - $\pi$  interakcija. Energije pojedinih načina vezanja dobivene računima molekuskog uklapanja.

Ligand	Energija [kJ mol <sup>-1</sup> ]	Intermolekulske vodikove veze	Intermolekulske $\pi$ - $\pi$ interakcije	Intramolekulske vodikove veze	Intramolekulske $\pi$ - $\pi$ interakcije
J	-45,56	U2586, U1782, C2611 C2610, U2609, U2584,	C2610	1	0
J	-45,56	A2062	C2610	0	0
J	-45,56	G2505, A2062	U2586,	1	0
J	-45,14	0	G745	0	1
J	-45,14	U2441, C2610	0	0	0
J	-44,73	G2057, U2506	G2505, G2505	0	0
J	-44,73	A2503	0	0	0
J	-44,73	U2585, A2503	0	1	0
J	-44,73	U744, G745, G2061	G745,	0	0
J	-43,89	U2586	U2584	2	0
J	-43,05	C2452, A2503	U2585,	0	0
J	-42,64	U2586, A2503 G2576, G2057, G2505,	C2610	1	1
J	-42,64	A2059, U1782	G2505	0	0
J	-42,22	G2505, U2585	A2059, A2058	1	0
J	-42,22	G2505, U2585	G2061, A2503	0	0
J	-41,38	G2505	G2505	1	0
J	-40,96	G2505, G2505, U1782	G2061, A2503	0	0
J	-40,55	G2505, U2585, G2061	G2505	0	0
J	-40,13	U2585, U2584	U2506	0	0
J	-40,13	U2585	G2061, A2503	0	0
J	-40,13	0	C2611	0	1
J	-39,71	G2505	0	0	1

## **Životopis**

Rođena sam 15.06.1995. u Zagrebu gdje sam završila osnovnu školu i gimnaziju Lucijana Vranjanina. Molekularnu biologiju na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu upisala sam 2013. godine. Zvanje prvostupnika Molekularne biologije stekla sam 2017. godine nakon čega upisujem diplomski studij Molekularne biologije. Uz školovanje bavim se triatlonom u kojem sam osvojila nekoliko državnih natjecanja i natječem se na međunarodnom nivou.