

Interakcija biomolekula

Hošnjak, Ema

Undergraduate thesis / Završni 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:444999>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-03**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Ema Hošnjak

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

INTERAKCIJA BIOMOLEKULA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za Analitičku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Predrag Novak

Zagreb, 2020. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

27. svibnja 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

17. srpnja 2020.

Mentor rada: prof. dr. sc. Predrag Novak

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VI
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Biomolekule	1
1.2. Spektroskopija NMR.....	1
§ 2. INTERAKCIJE PROTEIN – LIGAND	3
2.1. Interakcije proučavane spektroskopijom trNOE	3
2.2. Interakcije proučavane spektroskopijom STD-NMR	9
§ 3. INTERAKCIJE MEMBRANA – LIGAND	16
3.1. Makrolidi	20
3.2. Interakcije makrolid-membrana.....	20
§ 4. LITERATURNI IZVORI.....	XXV

§ Sažetak

Mnoga istraživanja u područjima medicine, biologije, kemije i farmacije temeljena su na proučavanju interakcija bioaktivnih molekula budući da daju uvid u funkciju bioloških procesa u živim organizmima. Za uspješan dizajn lijekova i bioaktivnih molekula potrebno je odrediti funkcijske skupine, strukturne elemente odgovorne za biološku aktivnost, mjesta i način vezanja liganda na makromolekule te trodimenzijsku strukturu. Iako postoje mnoge tehnike poput infracrvene i elektronske spektroskopije, koje mogu u grubo strukturno okarakterizirati biomolekule i njihove interakcije, najčešće se primjenjuje spektroskopija NMR koja daje detaljan uvid u strukturu i interakcije bez potrebe za uništavanjem uzorka. Također, primjenom eksperimenata NMR koji se uglavnom provode u otopini, čime se oponašaju uvjeti *in vivo*, biomolekule zadržavaju svoju izvornu konformaciju ne utječući na afinitet i način vezanja. U ovom su radu na konkretnim primjerima opisane neke od interakcija (protein-ligand, membrana-ligand, makrolid-membrana) te rezultati kojima se potvrđuje interakcija i značenje biomolekula.

§ 1. UVOD

1.1. Biomolekule

Biomolekule (biološke molekule) su organske molekule koje se prirodno javljaju u živim organizmima. Biomolekule mogu biti podijeljene u male molekule (lipidi, fosfolipidi, ugljikohidrati, vitamini, hormoni), monomerne molekule (aminokiseline, monosaharidi, nukleotidi), i polimere (polisaharidi, peptidi, nukleinske kiseline [DNA i RNA]).¹

Ove su biomolekule osnovne građevne jedinice živih organizama i zbog toga je njihova prisutnost i odgovarajuća koncentracija osnova za pravilnu funkciju organizma. Iz tog razloga bitno je identificirati strukturne elemente i skupine koje su odgovorne za bioaktivnost molekula, kako bi bolje razumjeli, predočili i definirali mehanizme i interakciju biomolekula.

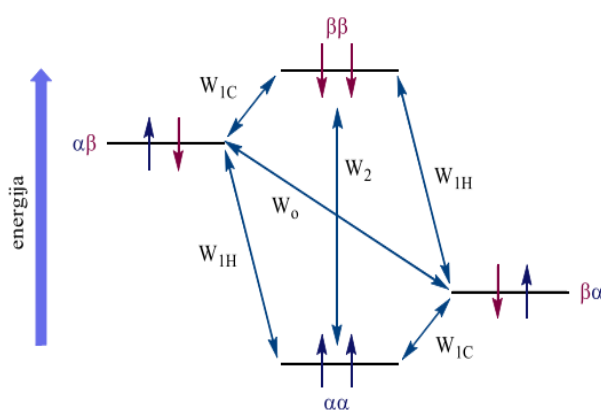
Interakcija biomolekula i njihovo međusobno prepoznavanje temelji se na stvaranju nespecifičnog kompleksa najčešće putem nekovalentnih interakcija između dviju ili više molekula. Ligand je mala molekula koja se reverzibilno veže na vezno mjesto u proteinu koje je komplementarno ligandu u veličini, strukturi, naboju i hidrofobnom ili hidrofilnom karakteru. Struktura proteina se danas može odrediti putem izotopnog obilježavanja proteina eksprimiranog u genetički modificiranoj bakteriji. Za molekulsko prepoznavanje bitna je specifičnost, protein može razlikovati mnogobrojne molekule i naposljetku selektivno vezati jednu ili nekoliko molekula.² Druga, ali ne i manje bitna komponenta molekuskog prepoznavanja je afinitet, koji određuje tendenciju vezanja liganda. Molekulsko prepoznavanje danas ima važnu ulogu u kemiji, biologiji, kliničkoj dijagnozi te sintezi i analizi novih lijekova.

1.2. Spektroskopija NMR

Spektroskopija nuklearne magnetne rezonancije (engl. *nuclear magnetic resonance spectroscopy*, NMR) je tehnika analize koja se koristi za strukturnu karakterizaciju organskih, anorganskih i bioloških molekula. Spektroskopijom NMR mogu se proučavati jezgre s neparnim atomskim ili neparnim masenim brojem čiji je kvantni broj nuklearnog spina I različit od nule (npr. ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P i ^{19}F). Dobiveni spektri asigniraju se na temelju dobivene multiplernosti signala, kemijskih pomaka te iznosa konstanti sprege između spinova.

U spektroskopiji NMR razlikujemo jednodimenzijske i višedimenzijske tehnike. Neke od jednodimenzijskih tehnika jesu: ^1H NMR, *off resonance* ^{13}C NMR, INEPT, APT a neke od

dvodimenzijских tehnika su: COSY, NOESY, ROESY, HMQC, HSQC i dr. Pri prijelazu između kvantnih stanja atomskih jezgri u metodi NMR dolazi do apsorpcije radiofrekvencijskog zračenja. Podaci o trodimenzijskoj strukturi molekule mogu se dobiti korištenjem tehnika temeljenim na nuklearnom Overhauserovom efektu (NOE). Ovaj efekt definiran je kao promjena intenziteta rezonancije određenog spina zbog promjena u ravnotežnoj napućenosti spinova druge jezgre uz uvjet da su navedeni procesi povezani tzv. mehanizmom križne relaksacije (Slika 1.).³



Slika 1. Mogući prijelazi spinova jezgri ^{13}C i protona.³

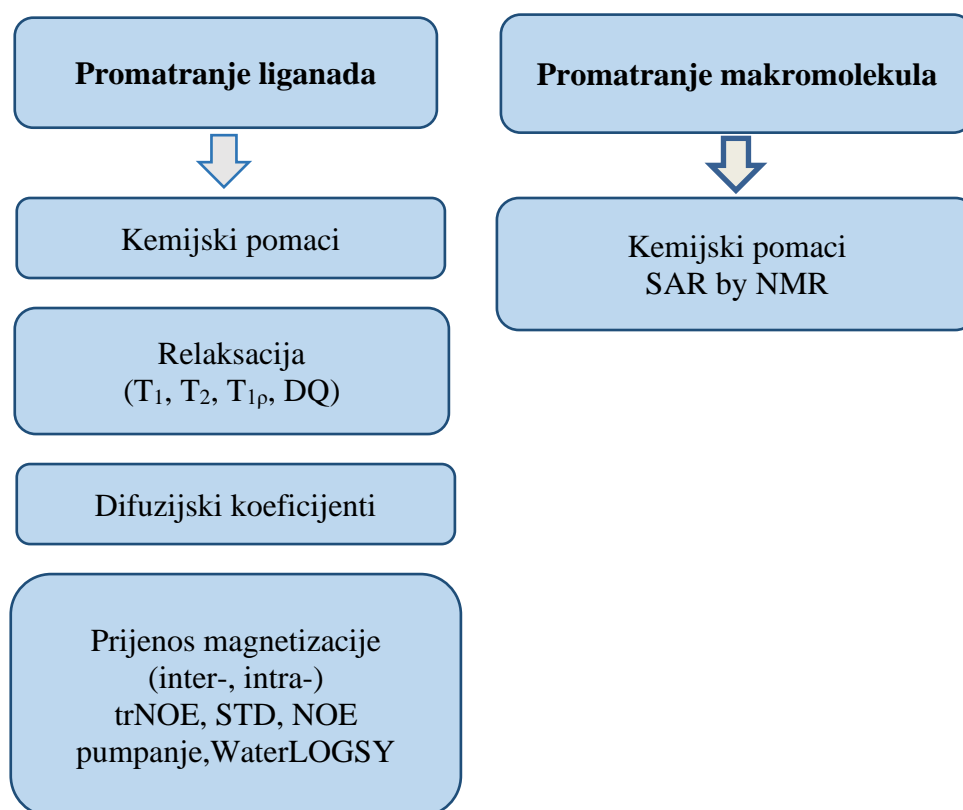
Uz poznavanje trodimenzijске strukture kompleksa važnu ulogu u karakterizaciji molekule ima optimizacija fizikalno-kemijskih svojstva poput; apsorpcije, topljivosti, distribucije, metabolizma, izlučivanja i toksičnosti, poznatiji kao ADMET, koji diktiraju učinkovitost *in vivo*. Kratkotrajni postupak, određivanje strukture i konformacije malih organskih liganada i makromolekula u otopini te pružanje mnogobrojnih informacija bez potrebe za uništavanjem uzorka, svojstva su koja spektroskopiju NMR čine jednom od najmoćnijih i najpouzdanijih metoda u znanstvenom istraživanju.

Razumijevanje interakcija i funkcija bioloških molekula u različitim sustavima pomaže nam predvidjeti konačan rezultat procesa u kojima su uključeni, opisati njihovu ulogu i u konačnici pomoću tih svojstava pronaći potencijalnu primjenu u industriji i znanosti.

§ 2. INTERAKCIJE PROTEIN – LIGAND

Interakcije između liganada i receptora mogu se promatrati različitim tehnikama NMR koje se temelje na detekciji promjena parametara receptora ili liganada uslijed interakcije prilikom stvaranja zajedničkog kompleksa (Tablica 1.)⁴

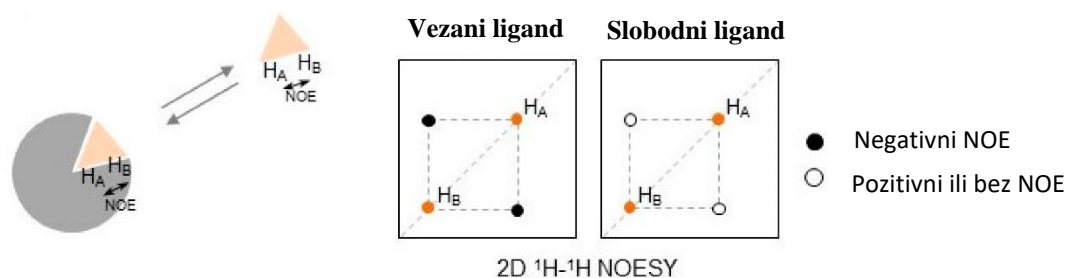
Tablica 1. Parametri NMR za proučavanje interakcija receptor-ligand



2.1. Interakcije proučavane spektroskopijom trNOE

Prijenosni NOE (engl. transferred nuclear Overhauser effect, trNOE) je dvodimenzijaska tehnika temeljena na efektu NOE koja pruža informacije o konformaciji vezanog liganada. Ova tehnika se temelji na različitim korelacijskim vremenima slobodnih i vezanih liganada. Intenzitet signala ovisi o brzini križne relaksacije na koju utječe udaljenost dipolno spregnutih spinova i korelacijsko vrijeme τ_c . Korelacijsko vrijeme proteina, odnosno prosječno vrijeme potrebno da se molekula zarotira za jedan radijan, je znatno veće ($\tau_c \approx 1$ s) od korelacijskog vremena liganada ($\tau_c \approx 200$ ms).⁵ Stoga ligandi daju male pozitivne korelacijske signale, dok makromolekule daju

jake negativne signale. Međutim, poznato je da ako se mala molekula (ligand) veže na receptor ona se ponaša kao makromolekula te se može uočiti promjena u vrijednostima i predznaku efekta NOE. Zbog osjetljivosti metode potrebna je puno manja količina makromolekule u usporedbi s ligandom (Slika 2.).⁶

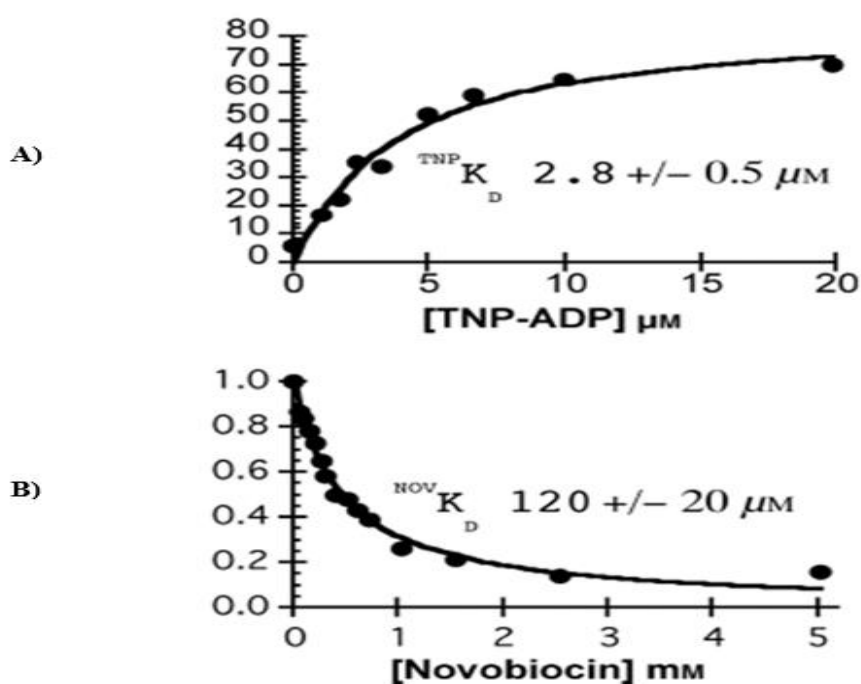


Slika 2. Shematski prikaz tehnike trNOE⁶

U istraživanju provedenom 2008. na Sveučilištu u San Diegu pomoću trNOE i STD-tehnika NMR proučeno je vezanje novobiocina na EnvZ.

Histidinske proteinske kinaze (HPKs) su razred proteinskih receptora pronađenih u dvokomponentnim bakterijskim sustavima prijenosa signala, koji omogućuju bakterijama da odgovore na promjene u svomu vanjskom okruženju.⁷ EnvZ je histidinska proteinska kinaza koja sa svojim kognitivnim regulatorom reakcije OmpR regulira ekspresiju proteina vanjske membrane (porini) kao odgovor na osmotski stres u bakteriji. EnvZ je sekvencom i topologijom slična DNA Girazi B. DNA Giraza B ima nekoliko dobro okarakteriziranih inhibitora, uključujući novobiocin i klorobiocin.⁸

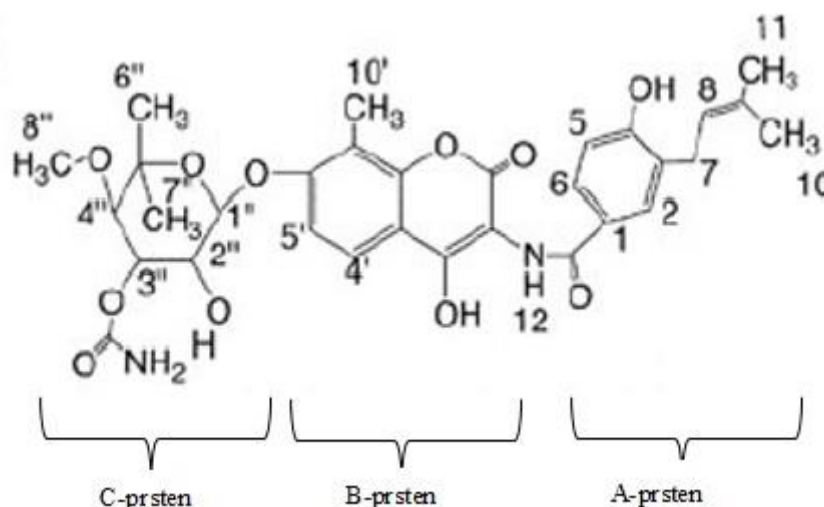
Na početku eksperimenta provedeni su fluorescencijski eksperimenti u svrhu prepoznavanja afiniteta vezanja novobiocina na histidin kinaznu domenu EnvZ. Ranije je otkriveno da se fluorescentni trinitrofenilni analozi ATP-a i ADP-a vežu na mjesto vezanja nukleotida u histidin kinaznoj domeni EnvZ. Provedeni su eksperimenti s TNP-ADP pod uvjetima visoke ionske jakosti, koji imaju slične afinitete vezanja (Slika 3.A). Dodatkom novobiocina u uzorke EnvZ koji sadrže 8,2 μ M TNP-ADP dovodi do smanjenja pojačanja fluorescencije izazvane vezanjem za EnvZ (Slika 3.B).⁹



Slika 3. **A)** Pojačanje fluorescencije promatrane za TNP-ADP u prisutnosti EnvzB ($c(\text{EnvzB}) = 1 \mu M$). **B)** Smanjenje pojačanja fluorescencije TNP-ADP novobiocinom u eksperimentima kompeticijske fluorescencije.⁹

Eksperimentima kompeticijske fluorescencije određeno je da se novobiocin veže na EnvZ s konstantom vezanja od $^{nov}K_d = 120 \pm 20 \mu M$.

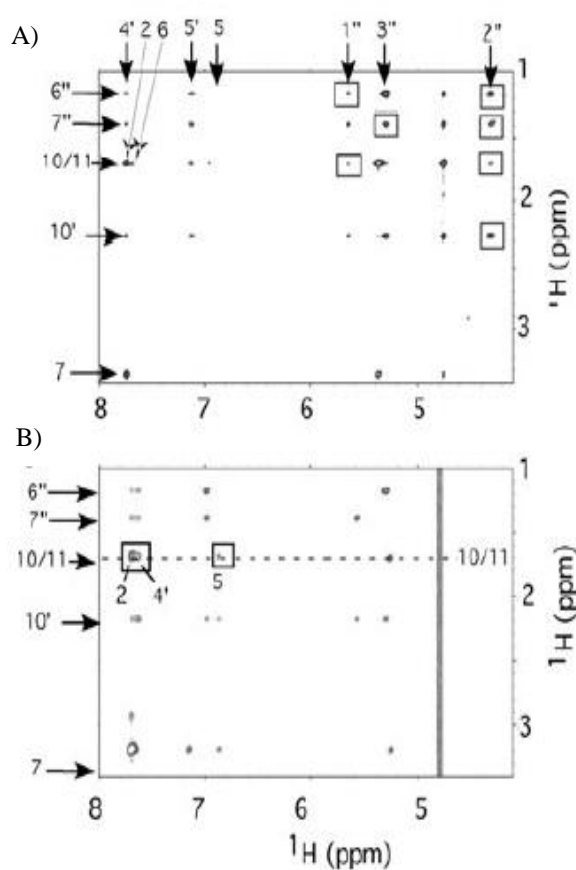
Za otkrivanje i usmjeravanje istraživanja na vezanje i konformacijska obilježja novobiocina slobodnog u otopini i vezanog za EnvZB provedeni su eksperimenti NMR. Zbog lakše asignacije spektra prikazana je označena kemijska struktura novobiocina (Slika 4.).



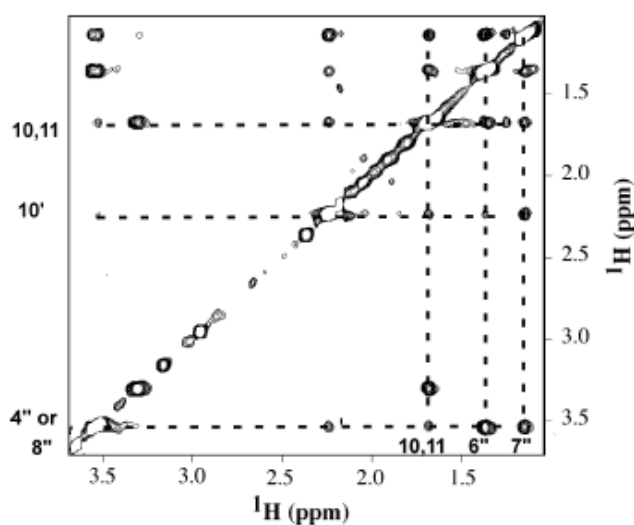
Slika 4. Označena struktura novobiocina za asignaciju NOE⁹

U uzorku koji sadrži EnvZ vidljivo je da je frekvencija protona H4' pomaknuta prema višim vrijednostima ppm od protona H6. Ovaj je raspored posljedica korelacijskih signala NOE i TOCSY između H4' i H5' te između H5 i H6. U eksperimentima ROESY gdje je vrijeme miješanja bilo 500ms, zamijećeni su korelacijski signali između H4' i H6'', H7' i H10/H11 na susjednim prstenovima. (Slika 5.B),

Eksperimenti prijenosnog NOE provedeni su u uvjetima velikog suviška liganda i različitim afinitetom vezanja, a uzorci su sadržavali 2mM novobiocina i 80 μ M EnvZB. Promatrajući NOE, vidljivo je da se slobodno stanje razvija sporo i suprotnog je predznaka od NOE novobiocina vezanog na EnvZB, što ukazuje na to da se NOE opažen u ovoj metodi odnosi isključivo na vezanu konformaciju. NOE korelacijski signali koji se javljaju u proširenoj regiji spektra NOESY između protona H3'' i H7'' te između H1'' i H6'' ukazuju na promjenu konformacije C-prstena prilikom vezanja za EnvZ ATP džep. Kao posljedica vezanja u spektru NOESY javljaju se novi korelacijski signali unutar prstena kao na primjer između protona H2'' i H6'' (Slika 5.A). Na Slici 6. prikazano je područje metilnih protona spektra NOESY koje sadrži mnoge signale NOE koji se ne pojavljuju u spektru ROESY.

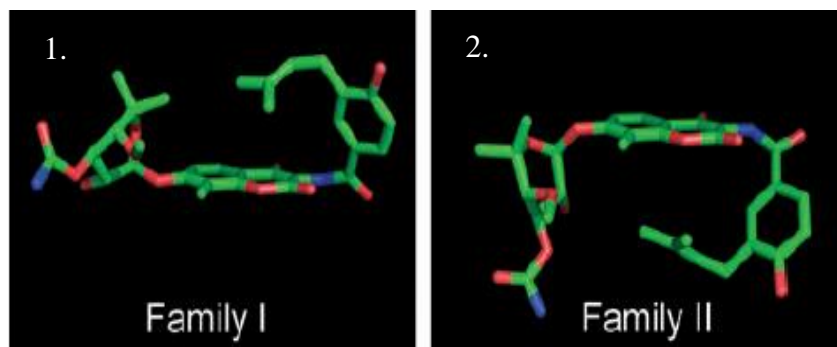


Slika 5. **A)** Prijenosni spektar NOE s obilježenim bitnim signalima u proširenom području s vremenom miješanja od 200ms. Uzorak je sadržavao 2mM i 88 μ M EnvZB u 50mM fosfatnom puferu (pH=7,4). **B)** Spektar ROESY u uzorku koji je sadržavao 40mM novobiocina s vremenom miješanja 500ms.⁹



Slika 6. Prijenosni spektar NOE koji prikazuje korelacijske signale između metilnih skupina novobiocina.⁹

U svrhu određivanja mjesta i skupina vezanja novobiocina za histidinsku domenu EnvZ provedeni su izračuni molekulske dinamike uz ograničenje minimizacije energije što je dovelo do pretpostavke dviju struktura (Slika 7) međusobno sličnih energija i mjera ograničenja.

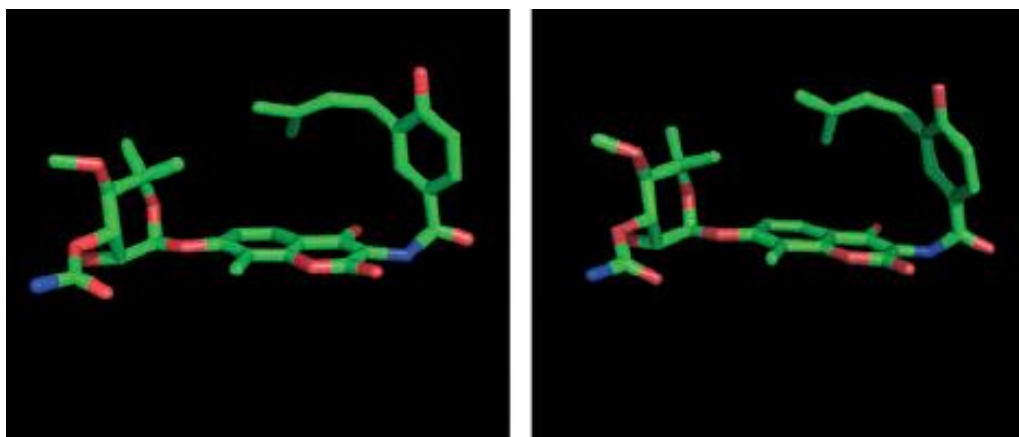


Slika 7. Pretpostavljene strukture novobiocina 1. i 2.⁹

Ukoliko se osvrnemo nazad na Sliku 5 i Sliku 6 možemo primijetiti kako su korelacijski signali NOE između H6'' i H10' većeg intenziteta od korelacijskih signala između H7'' i H10'. Navedeni korelacijski signali i njihovi intenziteti ukazuju na to kako se proton H6'' nalazi bliže džepu, a ta udaljenost je manja u pretpostavljenoj strukturi 1, sukladno tomu struktura 1 uzima se kao reprezentativni primjer vezane konformacije novobiocina u EnvZ-u.

Nadalje, na Slici 8 prikazane su strukture novobiocina vezane za DNA Girazu (A) te za Topoizomerazu IV (B). Navedene dvije strukture međusobno imaju mnoge sličnosti i imaju

slična preklapanja s metilnim skupinama H6", H10/11 i H7" koji preklapaju središnji B- prsten, kao što je prikazano na izračunatoj reprezentativnoj strukturi 1. (Slika 7.), međutim vidljivo je kako je nabor C- prstena poprilično različit kada je novobiocin vezan za EnvZ. Prsten ima proton H2" koji je usmjeren prema H6" što uzrokuje drugačiju orijentaciju amidnog protona H3" i konačnu konformaciju čamca.

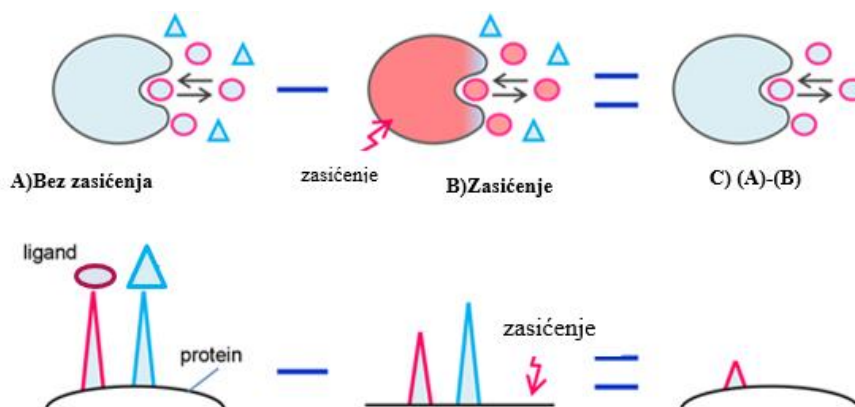


Slika 8. A) Novobiocin u kompleksu s DNA Girazom; B) novobiocin u kompleksu s Topoizomerazom IV.⁹

Ovo istraživanje i eksperimenti provedeni u dvokomponentnom prijenosu signala u bakterijama izvedeni pomoću prijenosne tehnike NOE omogućili su nam otkrivanje ciljnih skupina koje mogu pomoći u istraživanju inhibitora histidinskih kinaza u svrhu liječenja i sinteze lijekova. Iako je afinitet vezanja novobiocina za EnvZ manji u odnosu na afinitet vezanja za DNA Girazu, dobiveni rezultati ukazuju da postoje razni smjerovi i vrste inhibitora histidinskih kinaza koji se mogu detektirati daljnjim istraživanjima.

2.2. Interakcije proučavane spektroskopijom STD-NMR

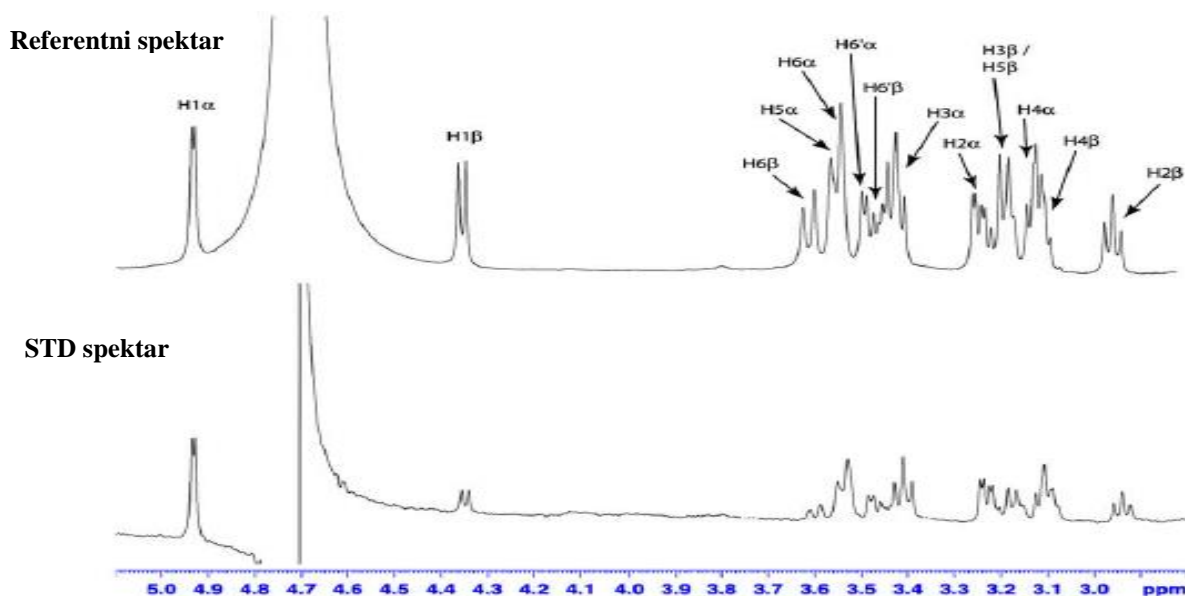
Spektroskopija STD (engl. *saturation transfer difference*) NMR je brza i precizna tehnika koja se oslanja na nuklearni Overhauserov efekt. Ova tehnika temeljena je na prijenosu magnetizacije s receptora na vezani ligand koji se izmijeni u otopini i zatim detektira. Konačan rezultat spektra STD jest razlika dvaju spektara, "on-resonance" od spektra "of-resonance", pri čemu dobijemo spektar razlike koji sadrži signale samo onih skupina koje se vežu na receptor (Slika 9.).⁴

Slika 9. Shematski prikaz STD-NMR tehnike¹⁰

Tehnika STD je pogodna za velike receptore jer nema ograničenja u molekularnoj masi receptora te nema potrebe za izotopnim obilježavanjem receptora i liganata. Također, za snimanje spektra STD-NMR nisu potrebne velike količine receptora, što proizlazi iz činjenice da signali u spektru odgovaraju samo ligandima koji su u interakciji.⁴ Analiza intenziteta signala omogućuje mapiranje veznih epitopa liganata, te je na temelju proporcionalnosti intenziteta signala moguće odrediti skupine koje su ključne za interakciju između receptora i liganata.

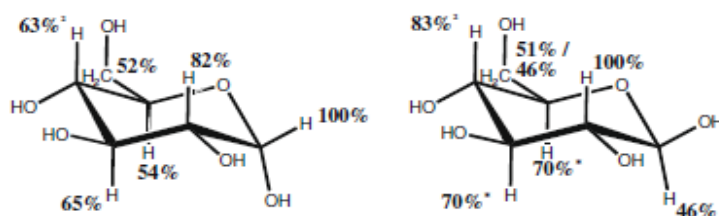
Heksokinaza je prvi u nizu enzima u putu glikolize, a njegova je uloga kataliziranje prijenosa γ -fosforilne skupine s ATP-a na 6-hidroksilnu skupinu glukoze što u konačnici dovodi do stvaranja glukoze-6-fosfata i ADP-a. Kloniranjem gena heksokinaze je dokazano da u kvascu ovaj enzim ima dva izoenzima, PI i PII.¹¹ Za istraživanje interakcija enzim-ligand u kvaščevoj izoformnoj heksokinazi PII korištena je STD tehnika radi boljeg opažanja načina vezanja, afiniteta vezanja različitih molekula liganada. NMR eksperimenti izvođeni su s čistom heksokinazom otopljenom u deuteriranom fosfatnom puferu pri fiziološkim uvjetima.¹²

Iako je poznato da heksokinaza fosforilira svoj supstrat, glukozu, u prisutnosti ATP-a otkriveno je da enzim ima mogućnost vezanja glukoze i u odsutnosti nukleotidnog fosfata. U STD spektru je također vidljivo da enzim može vezati α - i β - anomere D-glukoze. Variranjem koncentracije supstrata i porastom dobivenih intenziteta signala STD uočena je asimptotska korelacija što upućuje da se vezanje D-glukoze za kvaščevu heksokinazu PII događa na određenom mjestu enzima te je ono specifično. Za potvrdu aktivnosti heksokinaze PII pri eksperimentalnim uvjetima bili su potrebni spektar 1D NMR glukoze u prisutnosti heksokinaze te ATP (Slika 10.).



Slika 10. Referentni spektar 1D (gore) i spektar STD-NMR D-glukoze (dolje)¹²

Izračunom efekata STD koji odražavaju relativni iznos zasićenja prenesenog s proteina na ligand, dobivenih pomoću amplifikacijskih faktora STD koji su sadržani u spektru STD, određeni su vezni epitopi pojedinačnog liganda. Pretpostavka je da se protoni s velikom vrijednošću STD nalaze bliže površini proteina od onih s niskom vrijednošću STD. Oba epitopa D-glukoze, α - i β - , vežu se na sličan način za vezno mjesto (Slika 11.).

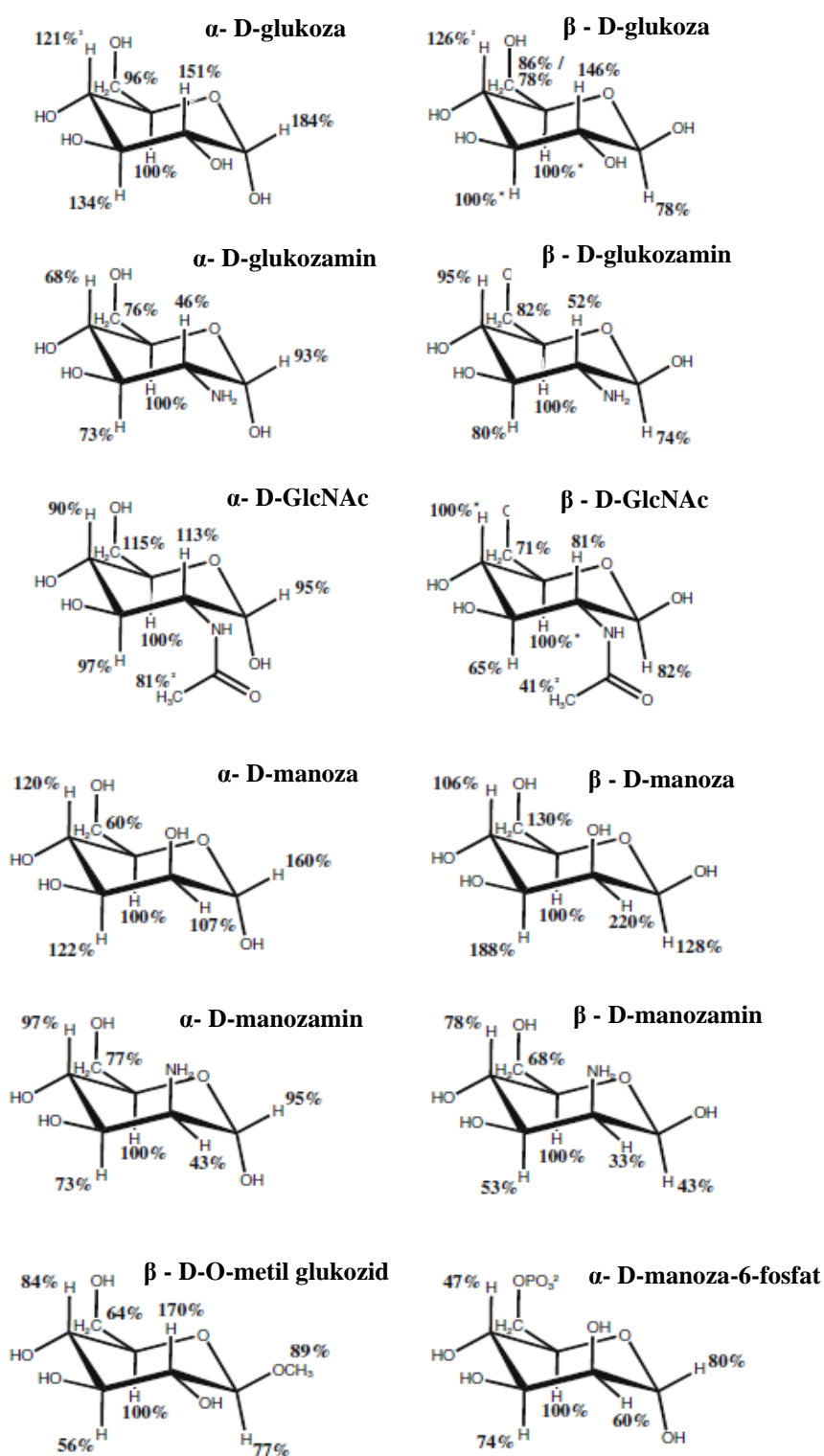


Slika 11. Vezni epitopi dobiveni tehnikom 1H STD-NMR; α -D-glukoza (lijevo), β -D-glukoza (desno)¹²

Na Slici.11. postotci označavaju stupanj prijenosa zasićenja za dane molekule te porast postotka ukazuje na bliži kontakt s površinom proteina. Vidljivo je da proton H1 α -anomera najbliži površini proteina, dok je u β - anomeru to proton H2 .

Kako bi što točnije okarakterizirali vezanje liganada na heksokinazu PII istraženi su različiti derivati α - i β - anomera glukoze. Promjenama na atomu C-2 izvornog supstrata glukoze, ne dolazi do značajnog odstupanja u intenzitetima STD signala dok se epimerizacijom

atoma C-4 značajno smanjuje vezanje liganda za heksokinazu PII (Slika 12.). STD NMR eksperimentima je također dokazano da se prilikom fosforilacije šećera drastično mijenja način vezanja za receptor odnosno intenziteti signala prilikom njihovog vezanja bili su toliko slabi da njihova kvantifikacija nije bila moguća. Kako bismo mogli odrediti relativne afinitete vezanja različitih derivata glukoze i usporediti ih s prirodnim supstratom D-glukozom, provedeni su eksperimenti STD kompetitivne titracije. Ovim eksperimentom utvrđeno je da se svi istraženi ligandi vežu na isto mjesto u heksokinazi PII budući da je uočena kompeticija prilikom vezanja. Ispostavljeno je da D-manoza i GlcNAc imaju veći afinitet vezanja za receptor heksokinazu PII od njenog prirodnog supstrata, glukoze. Također je pokazano da 6-fosfati imaju značajno manji afinitet vezanja od ostalih supstrata. (Slika 13.).¹²

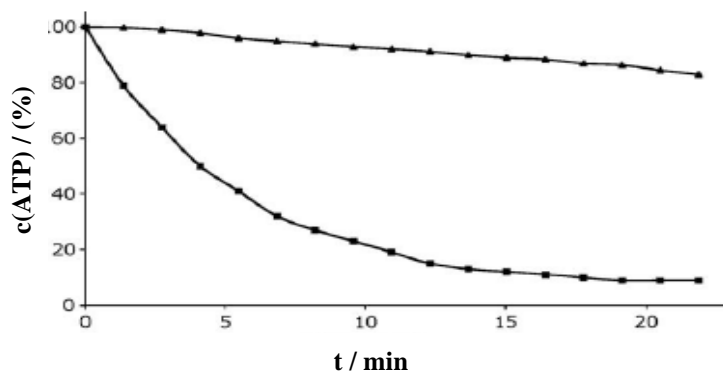
Slika 12. Vezni epitopi derivata glukoze dobiveni tehnikom ^1H STD NMR.¹²

Relativni afinitet vezania

Man >> α -GlcNAc > Glc – Glukozamin > β -GlcNAc > Manozamin >> GAL

Slika 13. Shematski prikaz relativnog afiniteta vezanja D-glukoze i njenih derivata

Poznato je kako je za enzimsku aktivnost mnogih kinaza potreban Mg^{2+} . U ovome je istraživanju dokazano kako kvaščeve heksokinaza PII pokazuje enzimsku aktivnost čak i kod odsutnosti iona Mg^{2+} . Utjecaj prisutnosti iona Mg^{2+} istražen je eksperimentima 1H NMR. Dokazano je kako konverzija D-glukoze u D-glukozu-6-fosfat u odsutnosti iona Mg^{2+} traje 1 sat dok je u prisutnosti 0.1M iona Mg^{2+} 50% pretvorbe postignuto u prvih 4 minute, a za cijeli proces bilo je potrebno 20 minuta (Slika 14.). Ovime je dokazano da su za enzimsku aktivnost kinaze potrebni ioni Mg^{2+} dok to nije slučaj za ATP, što znači da ioni Mg^{2+} nemaju značajan utjecaj na oblik vezanja ATP-a te da prilikom fosforilacije vezno mjesto nukleotida ne prolazi kroz strukturne promjene.



Slika 14. Promjena intenziteta signala ATP-a u prisutnosti glukoze i kvaščeve heksokinaze PII s vremenom. Trokuti označuju podatke dobivene u odsutnosti iona Mg^{2+} a kvadrati označuju podatke dobivene u prisutnosti 0.1M iona Mg^{2+} .¹²

Rezultati koji ukazuju na relativno velike efekte STD dobivene za protone koji se nalaze ispod piranoznog prstena upućuju na to da velika domena enzima veže šećer odozdo. Također, ako šećer kojeg je vezala velika podjedinica enzima nije fosforiliran, doći će do pomicanje male podjedinice koja u konačnici tvori vezni džep. Ova zatvorena forma enzima dovodi do bliskog

kontakta gornje strane piranoznog prstena s površinom proteina što uzrokuje velike efekte STD protona smještenih iznad prstena šećera (Slika 11.). Unatoč tomu što je enzimskim reakcijama utvrđeno kako β -D-glukoza ima veći afinitet vezanja za heksokinazu PII, zbog steričkih smetnji i energetski nepovoljne orijentacije u enzimskom džepu, α -D-glukoza smatra se boljim supstratom. Razlog tomu je dobiveni veći stupanj fosforilacije α -D-glukoze zbog njenog načina vezanja koji uzrokuje bolji prijenos fosfata od β -D-glukoze.

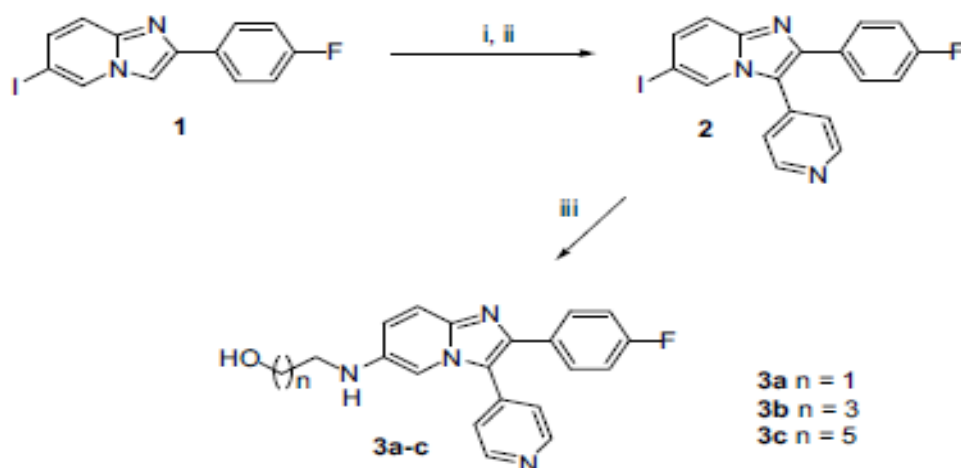
Ovo je istraživanje također ukazalo na zanimljivu činjenicu kako se unatoč značajnim promjenama veznih epitopa α - forme prilikom dodatka amidne ili acetoamidne skupine na atom C-2 glukoze te značajnim promjenama veznih epitopa α - i β - forme prilikom epimerizacije i umetanja amino skupine na atom C-2, afiniteti vezanja ostaju slični ili su veći nego kod prirodnog supstrata, D-glukoze. Jedan od šećera kojem je otkriven veći afinitet vezanja za heksokinazu PII u odnosu na D-glukozu je D-manoza. Ono što D-manozu čini boljim supstratom od D-glukoze su povoljne interakcije između aksijalne hidroksilne skupine atoma C-2 i male podjedinice heksokinaze PII. Zbog toga što ovaj enzim pokazuje afinitet prema više različitih šećera u stanicama se može ponašati kao vrsta "enzima za hitne slučajeve". Temeljem ovog istraživanja moguće je proizvesti spojeve analogne glukozi koji će poslužiti kao inhibitori heksokinaze i daljnjem istraživanju u metaboličkom inženjeringu.

§ 3. INTERAKCIJE MEMBRANA – LIGAND

Lipidni dvosloj je dinamična struktura, no unatoč tomu, membrane se ne sastoje samo od lipida već sadrže neutralne i polarizirane fosfatne grupe te visoko strukturirane i kiralne pozitivne ili negativno nabijene glavice. Interakcije s tim strukturama imaju presudan utjecaj na podjelu, orijentaciju i konformaciju liganada te na njihova fizikalno- kemijska obilježja i funkciju membrana. Nespecifične interakcije liganada s molekulama sadržanim u membranama također uključuju interakciju sa specifičnim fosfolipidnim strukturama.¹³ Ovisno o sastavu membrane i strukturi molekule liganada interakcija može poticati ili spriječiti aktivnost lijeka ili toksičnost. Jedan od najučinkovitijih načina za proučavanje interakcije između liganada i membrana je korištenje više analitičkih metoda, uključujući i tehnike NMR.

U jednom od istraživanja koje je temeljeno na interakciji između membrane i liganada proučavale su se 3 molekule koje su sintetizirane po modelu inhibitora p38 kinaze u svrhu suzbijanja apoptoze. Tri proučavane molekule čine lijekove koji su konstruirani da interregiraju s membranom varirajući duljinu lanca.

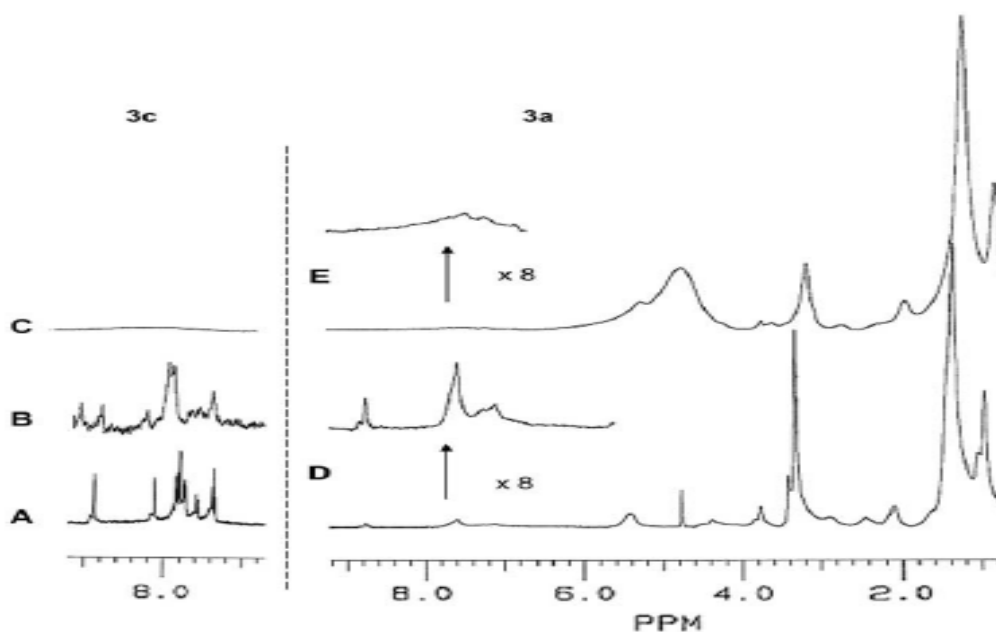
Molekulska baza ovog istraživanja bila je da se dobije direktna kompeticija vezanja ATP-a na enzim p38 na način da se stabilizira konformacija p38 koja je inkompatibilna s vezanjem ATP-a. Tri potencijalne molekule lijeka na kojima je temeljeno ovo istraživanje dobivene su u 2 koraka a početna molekula u njihovoj sintezi bila je 2-(4-fluorofenil)-6-jodimidazo[1,2-a]piridin (Slika 15.).¹⁴



Slika 15. Sinteza derivata 2-(4-fluorofenil)-6-jod-imidazo[1,2-a]piridina variranjem duljine lanca na poziciji 6, od hidroksietilamino (**3a**) do hidroksibutilamino (**3b**) i hidroksiheksilamino (**3c**) derivata.¹⁴

Uzimajući u obzir koeficijente razdjeljenja ovih triju spojeva $\log P$ [**3a**] = 1.75; $\log P$ [**3b**] = 2.3; $\log P$ [**3c**] = 3.2, očekivan je porast topljivosti od **3c** do **3a**, međutim, **3a** i **3b** pronađeni su kao potpuno netopljivi u vodi dok se **3c** čiji je koeficijent razdjeljenja relativno velik gotovo s lakoćom otapa u vodi.

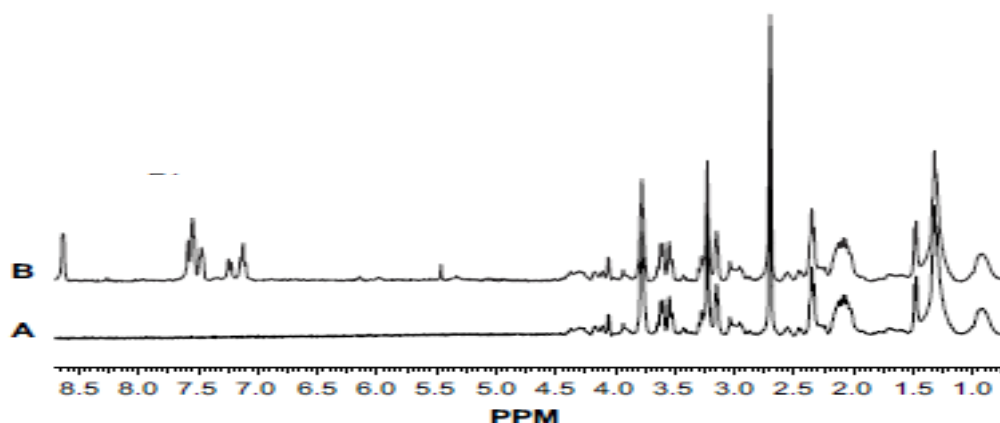
Snimljen je spektar ^1H NMR za tekući uzorak koji je sadržavao 30 μM spoja **3c** (Slika 16.A). Izmjerene širine linija između 3 i 5 Hz sugeriraju na to da su formirani molekularni skupovi kao što su micelle ili kapljice.



Slika 16. Spektar ^1H NMR aromatskog ogranka **3c** (lijevi odsječak) i eksperimenti **3a** spoja u A) čisti u D_2O otapalu; B) i D) u prisutnosti SUV (engl. *small unimellar vesicles*), omjer lijeka/lipida = 1/10; C) i E) nakon dodatka MnCl_2 , $0,8\mu\text{M}$.¹⁴

U svrhu otkrivanja razloga dobre topljivosti spoja **3c**, koji pokazuje veći koeficijent razdjeljenja u odnosu na druga dva sintetizirana spoja, provedeni su eksperimenti molekulske dinamike. Ovi su eksperimenti pokazali da bočni lanac ovog spoja tvori peti “pseudo” prsten koji je rezultat interakcije između terminalne hidroksilne skupine i pirimidinskog prstena. Ova interakcija je jača ako je u proces stvaranja vodikovih veza uključena i molekula vode te ako je ona izložena okolini.¹⁴

Nadalje, snimljen je spektar ^1H THP-1 stanica bez (Slika 17. A) i u prisutnosti spoja **3a** (Slika 17. B). Nakon dodatka spoja **3a** u spektru se mogu primijetiti pikovi u aromatskom dijelu spektra (8,8-7ppm). Iako je **3a** u potpunosti ne topljiv u vodi, snimljeni spektar ^1H NMR ukazuje na njegovu djelomičnu topljivost u stanicama THP-1 ili njegovo vezanje za stanice THP-1.



Slika 17. Spektar ^1H NMR THP-1 (A) te THP-1 u prisutnosti spoja **3a** (B).¹⁴

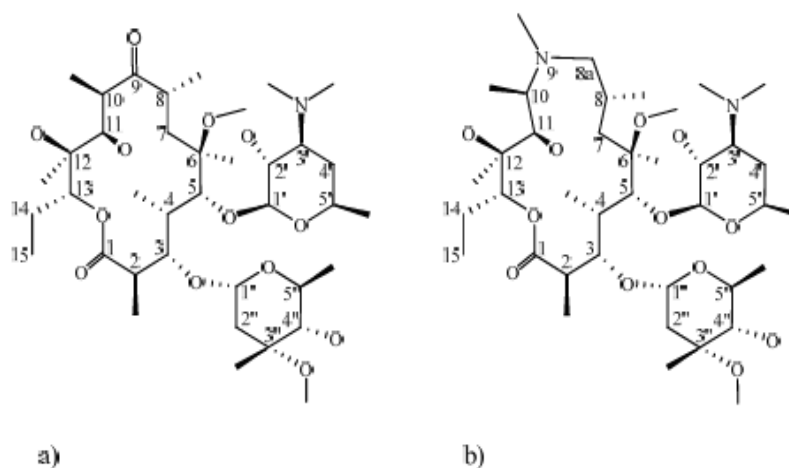
Kako bi bolje istražili način i mjesta interakcije između ovih triju potencijalnih lijekova s membranom, kao imitacija biološke membrane korišten je model malih jednoslojnih vezikula koje su tretirane ultrazvukom. Na Slici 16. B) i D) prikazani su spektri ^1H NMR lijekova **3a** i **3c** (**3b** pokazuje slično ponašanje kao **3c**) u prisutnosti malih jednoslojnih vezikula (engl. *SUV*). Ovi spojevi pokazuju dobru topljivost u CDCl_3 dajući pikove uže od 1 Hz, no, u usporedbi s **3c**, **3a** i **3b** u potpunosti su netopljivi u vodi te djelomično topljivi u ili vezani za male jednoslojne vezikule. Također, vrijednosti kemijskih pomaka svih signala spoja **3c** su slični onima detektiranim u vodi, dok su za spoj **3a** vidljiva proširenja u malim jednoslojnim vezikulama u usporedbi s spektrom u CDCl_3 . Budući da su proširenja signala lijekova slična onima pronađenim za protone u najpokretljivijem dijelu fosfolipida, u lijekove koji sadrže male jednoslojne vezikule dodani su paramagnetični manganovi ioni, kako bi mogli odrediti točno mjesto vezanja lijeka na membranu (Slika 16. C) i E)). Dodatak paramagnetične molekule MnCl_2 uzrokuje proširenje rezonancije protona koji je sukladno svojoj geometriji najdostupniji na vanjskom sloju vezikule npr. polarna glavica fosfatidilserina. Na istom sustavu spektar snimljen u ovim uvjetima pokazuje značajno proširenje signala **3a**, dok je paramagnetski efekt jači za druga dva spoja. Ovime je dokazano da je **3a** veoma pokretljiv te da se veže blizu površinskog dijela, dok spektri za **3c** i **3b** ukazuju na njihovu ugradnju unutar membrane. Dobiveni rezultati koji upućuju na amfifilna svojstva spoja **3a**, također su potvrđena snimanjem spektra ^{31}P i ^2H NMR dobivenih iz disperzija DMPC- d_{54} i DMPC- d_9 .¹⁴

Zaključno, policikličke aromatske molekule imaju tendenciju međusobnog slaganja kako bi smanjile kontakt s vodom,¹⁵ a u ovom istraživanju to je postignuto stvaranjem petog pseudocikličkog prstena koji rezultira rigidnijom strukturom i boljom topljivošću u biološkim

membranama. Supstitucijom hidroksilnih skupina na bočnom lancu C6 omogućene su bolje interakcije membrane. Dobiveni rezultati dobar su temelj za daljnje istraživanje inhibitora kinaze p38 sa svrhom suzbijanja apoptoze.

3.1. Makrolidi

Pojam makrolid je izvorno predložio R.B.Woodward 1957. godine, kao skraćenicu od makrolakton glikozid, a odnosilo se na strukturu koja se sastojala od makrolaktonskog prstena na kojeg su bile vezane jedna ili više deoksi- šećernih skupina.¹⁶ Makrolidi su jedna od najbitnijih i najprimjenjivijih obitelji antibiotika u borbi protiv infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim bakterijama.¹⁷ Kemijski su klasificirani na temelju broja atoma u njihovim makrocikličkim prstenovima te tako razlikujemo 14-, 15- ili 16-člane makrolide. Prvi korišteni makrolid bio je 14-člani Eritromicin A (Slika 18a)), a daljnjim razvojem je Beckmannovom pregradnjom, odnosno ugradnjom dušikovog atoma u prsten eritromicina A, sintetiziran jedan od najpoznatijih makrolidnih derivata, 15-člani prsten azitromicina (Slika 18b).). Istraživanjima je dokazano kako se makrolidi vežu na veliku podjedinicu ribosoma u blizini peptidil-transferaznog centra čime zaustavljaju sintezu proteina a samim time zaustavlja se rast stanice.



Slika 18. Kemijska struktura **a)** eritromicina i **b)** azitromicina.⁴

3.2. Interakcije makrolid-membrana

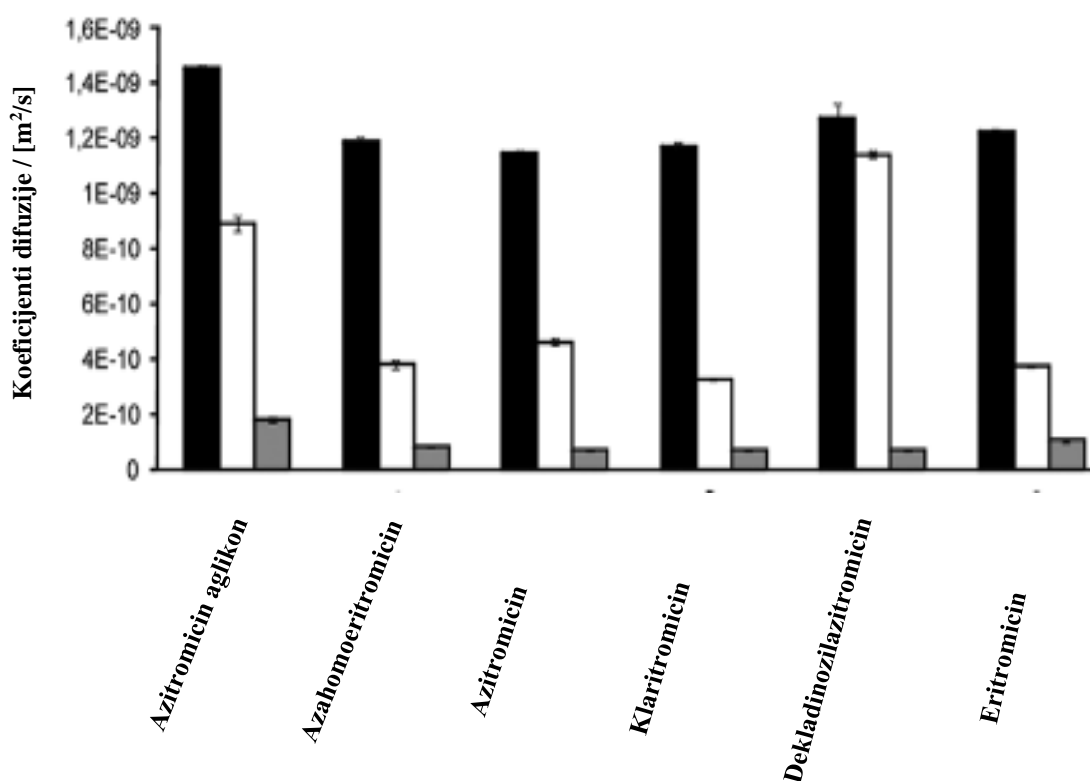
Iako je kemijskim modifikacijama postignuta veća kiselinska stabilnost i rezistentnost na bakterije i dalje ne postoji antibiotik koji je aktivan na sve rezistentne sojeve bakterija. Konačni

je cilj pronaći lijek koji će imati bolji biološki profil s posebnim naglaskom na rezistencijuu. Jedne od molekula koje bi mogle zadovoljiti uvijete za postizanje cilja jesu azalidi, semisintetski derivati Eritromicina A, koji su pokazali široki antibakterijski spektar i sposobnost da se u stanice domaćina nakupljaju u velikim koncentracijama.⁴

2012. godine, objavljeno je istraživanje temeljeno na interakcijama makrolidnih antibiotika i modela bioloških membrana. Za analizu interakcija korištena je spektroskopija NMR. Budući da većina istraživanja makrolidnih antibiotika uključuje karakterizaciju interakcija i načina njihovog vezanja na veliku podjedinicu ribosoma, zbog prevencije rezistencije bakterija i razumijevanja cjelokupne biološke slike makrolida potrebno je dobro istražiti kako i na koji način oni intragiraju s bakterijskim membranama.¹⁸

U ovome su istraživanju korišteni makrolidi bili azitromicin, eritromicin A, azahomoeritromicin, dekladinozil-azitromicin, klaritromicin, azitromicin aglikon te još nekoliko njihovih derivata. Zbog njihove lake dostupnosti i veličine koja onemogućuje proširenje linija u spektru NMR kao modeli membrana prilikom difuzijskih eksperimenata NMR poslužili su dodecilsfosfokolin (engl. *DPC*) te natrijev dodecil-fosfat (engl. *SDS*).

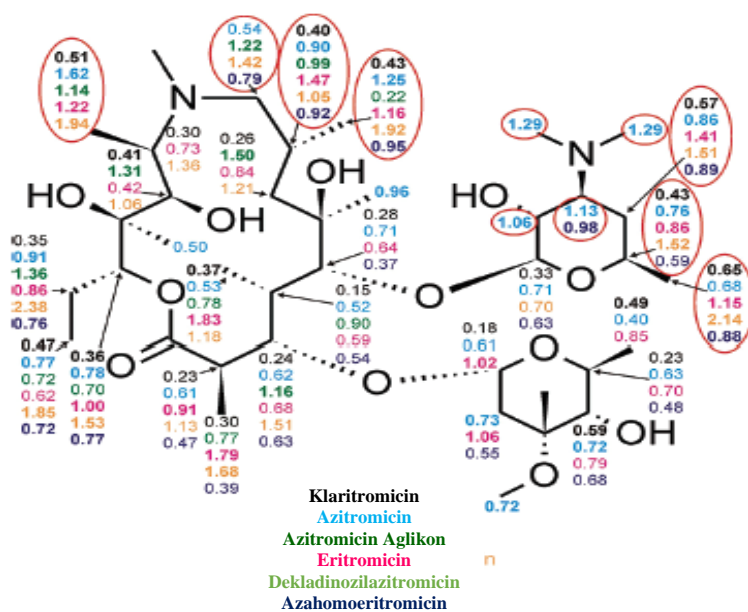
Kako bi dobili točnu sliku interakcije između modela membrane i makrolida provedeni su eksperimenti slobodne difuzije NMR i eksperimenti temeljeni na pojačanju paramagnetske relaksacije makrolida.¹⁷ Ovim pokusima je dobiveno da su nenabijeni makrolidi uglavnom netopljivi u vodi, a isto tako nisu pokazali topljivost u DPC-u i SDS-u. Iz navedenih rezultata te iz prijašnjih istraživanja potvrđeno je kako su pozitivno nabijene amino skupine nužne za dobru topljivost u vodi i za interakcije s membranom. Za makrolide koji sadrže nabijene skupine u svojoj okosnici izračunati su difuzijski koeficijenti slobodnih makrolida te makrolida u prisutnosti deuteriranog DPC-a ili SDS-a (Slika 19.)¹⁸



Slika 18. Difuzijski koeficijenti ($\text{m}^2/\text{s} * 10^{10}$) slobodnih makrolida (crno), u prisutnosti DPC-a (bijelo) ili SDS-a (sivo).¹⁸

Iz dobivenih difuzijskih koeficijenata za različite makrolide vidljivo je kako bolje interagiraju s negativno nabijenim micelama SDS-a nego s DPC-om. Također je pokazano da se azitromicin aglikon veže znatno slabije za oba modela membrana od ostalih makrolida. Kao što je već gore rečeno, a sada je i rezultatima potvrđeno, za dobru interakciju između membrane i makrolida esencijalni su prsten desozamina i pozitivno nabijene amino skupine makrolida. Na temelju dobivenih difuzijskih koeficijenata za slobodne i vezane makrolide izračunati su koeficijenti razdjeljenja između makrolidnih antibiotika i modela membrana, koji su pokazali dobro vezanje svih makrolida za SDS i za usko vezanje svih osim azitromicin aglikola i dekladinozilazitromicina za DPC.¹⁸

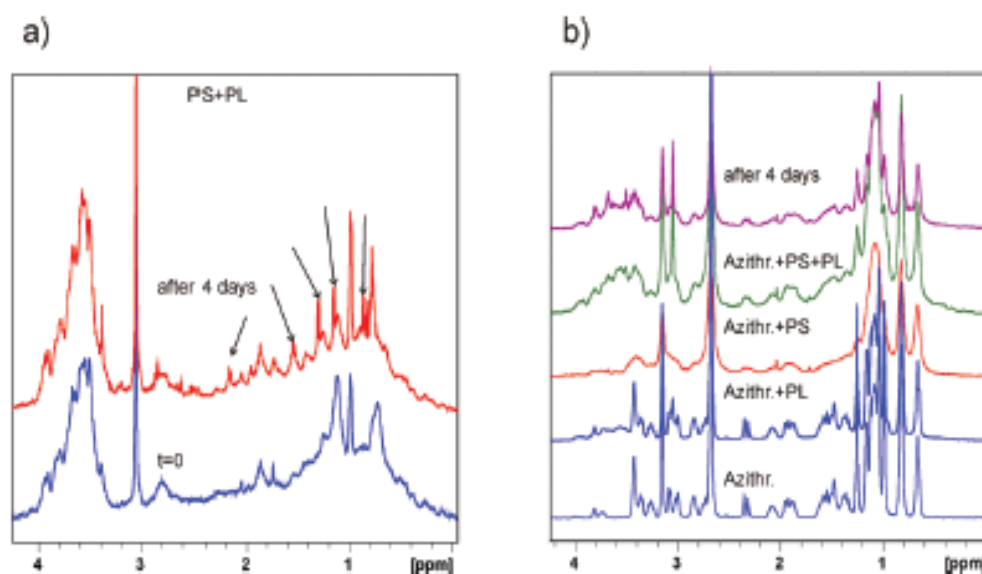
Informacije o orijentaciji i mjestu vezanja makrolida za membranu dobiveni su titriranjem topljivog paramagnetičnog i inertnog agensa Gd(DTPA-BMA) u otopinama makrolida vezanih za DPC. Dodatkom navedenog spoja u otapalo postignuto je paramagnetično okruženje micela promatrane jezgre, što dovodi do pojačanja paramagnetske relaksacije otapala koja ovisi o udaljenosti od površine micela (Slika 19.).



Slika 19. Dobivene vrijednosti PREs (engl. *paramagnetic relaxation enhancements*) otapala za sve topljive makrolide. Za svaki je makrolid polovica vrijednosti PREs označena podebljanim slovima, a protoni za koje je većina makrolida dala visoke vrijednosti PRE su zaokruženi crveno.¹⁸

Visoke vrijednosti pojačanja paramagnetskom relaksacijom, pripadaju rezonancijama u blizini pozitivno nabijenih amino skupina i ukazuju na usko vezanje u blizini površine micela te na povoljne elektrostatske interakcije s negativno nabijenim fosfatnim skupinama fosfolipidnih glavica.¹⁸

Budući da se u posljednje vrijeme fosfolipidoza povezuje s antibioticima, u ovom je istraživanju pomoću spektroskopije ¹H NMR proučena interakcija između fosfolipaze A s fosfatidilserinom u odsutnosti i prisutnosti azitromicina (Slika 20.).



Slika 20. Spektar ^1H NMR fosfatidil serina (PS) s fosfolipazom A (a), te spektar ^1H NMR slobodnog azitomicina i pomiješanog s fosfatidilserinom (PS) i/ili fosfolipazom A (PL) (b).¹⁸

Iz spektra na Slici 20.(a) vidljivo je kako prvobitnim miješanjem fosfolipaze A i fosfatidilserina nema značajnih promjena dok se nakon četiri dana mogu uočiti oštri pikovi koji sugeriraju da je fosfolipaza A katalizirala degradaciju fosfolipida. U drugom spektru u prisutnosti azitromicina nisu vidljive tako oštre promjene pikova te možemo zaključiti da u njegovoj prisutnosti ne dolazi do cijepanja fosfatidilserina pomoću fosfolipaze A. Kao što je ranije pokazano da se makrolidi vežu u blizini površine lipida, u ovom slučaju se azitromicin veže na površinu fosfatidilserina i čini fosfatidilserin nedostupnim za fosfolipazu A. Takvim se načinom vezanja dolazi do indirektno inhibicije fosfolipaze, što u konačnici može dovesti do fosfolipidoze.¹⁸

§ 4. LITERATURNI IZVORI

1. S. P. Singh, A. Pandey, G. Du, S. Kumar, *Curr. Dev. Biotechnol. and Bioeng; Synthetic Biology, Cell Engineering and Bioprocessing Technologies*, Elsevier, 2019., str. 143-161.
2. S. C. B. Gopinath, T. Lakshmi Priya, *Nanobiosensors for Biomolecular Targeting*, Elsevier, 2019., str. 23-50.
3. K. Pičuljan, T. Jednačak, N. Cindro, P. Novak, Osnovni priručnik za rad sa spektrometrom NMR visoke rezolucije, Skripta za internu upotrebu, Zagreb, 2016. str. 23-24.
4. P. Novak i T. Jednačak u Z. Mandić (ur.), *Physico-chemical methods in drug discovery*, IACP, Zagreb, 2011, 189-231.
5. E. Yuriev, P. A. Ramsland, *Structural Glycobiology*, CRC Press, New York, 2012, str. 38.
6. T. Sugiki, K. Furuita, T. Fujiwara i C. Kojima, *Molecules* **23**(1)(148) (2018) 1–27.
7. Stock A.M., Robinson V.L., Goudreau P.N. (2000) *Two-component signal transduction*. *Annu Rev Biochem*;69: str. 183–215.
8. Qin Z., Lee B., Yang L., Zhang J., Yang X., Qu D. et al. (2007) *Antimicrobial activities of YycG histidine kinase inhibitors against Staphylococcus epidermidis biofilms*. *FEMS Microbiol Lett*;273: str. 149–156.
9. L.A. Plesniak, K. Botsch, M. Leibbrand, M. Kelly, D. Sem, J.A. Adams, P. Jennings, *Transferred NOE and Saturation Transfer Difference NMR Studies of Novobiocin Binding to EnvZ Suggest Binding Mode Similar to DNA Gyrase*. *Chemical Biology & Drug Design* **71**(1) (2008), str. 28-35.
10. <https://www.jeol.co.jp/en/applications/detail/1615.html> (datum pristupa 22. travnja 2020.)
11. E. Kopetzki, K. Entian, D. Mecke, *Complete nucleotide sequence of the hexokinase PI gene (HXK1) of Saccharomyces cerevisiae Gene (Amst)* **39** (1985) , str. 95–102.
12. A. Blume, M. Fitzen, A. J. Benie, T. Peters, *Carbohydrate Research* **344** (2009), str. 1567-1574.
13. C. R. Hatty, R. B. Banatti, *Pharmacological Research* v100 (2015.), str. 58-63.

14. S. Follot et al., *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009), str. 3509-3518.
15. J.C. Debouzy et al., *J. Pharm. Sci.* **85** (1996) , str. 200-205.
16. L. Katz, A. S. Mankin, *Macrolides, Encycl. Microbiol.* (3rd Ed.) (2009), str. 529-558.
17. M. Gaynor, A. S. Mankin, *Current Topics in Medicinal Chemistry* **3** (2003), str. 949-960.
18. S. Kosol et al., *J. Med. Chem.* (2012.), 55, 11, str. 5632-5636.