

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra organické chemie

Habilitační práce

**Vývoj experimentálních a teoretických metod NMR
spektroskopie pro studium struktury a dynamiky molekul**

RNDr. Martin Dračínský, Ph.D.

Praha 2016

Obsah

1. Úvod.....	2
2. NMR spektroskopie.....	3
2.1. NMR interakce.....	3
2.1.1. Stínění jader elektrony.....	3
2.1.2. Dipól–dipólová interakce.....	3
2.1.3. Nepřímá spin–spinová interakce.....	4
2.1.4. Kvadrupolární interakce.....	4
2.2. NMR spektroskopie látek v roztoku.....	4
2.3. NMR spektroskopie pevných látek.....	5
2.4. Výpočty NMR parametrů.....	6
3. Shrnutí vlastních výsledků.....	7
3.1. Vliv dynamického chování molekul na NMR parametry.....	7
3.2. Studium struktury a dynamiky modifikovaných složek nukleových kyselin.....	11
3.2.1. 5-Nitrosopyrimidiny.....	12
3.2.2. Izotopové výměny vodíku v derivátech pyrimidinu.....	15
3.2.3. Dynamické chování solvatačního obalu v pevných hydrátech nukleotidů.....	17
4. Závěr.....	21
5. Seznam literatury.....	22
6. Poděkování.....	23
7. Přílohy.....	24

1. Úvod

Rozvoj fyzikálních, chemických a biologických věd do dnešní podoby je úzce spjat se znalostí struktury hmoty na molekulární úrovni. Informace o tom, jak jsou atomy uspořádány do molekul, jaký mají molekuly tvar a jakým způsobem na sebe molekuly vzájemně působí, jsou naprosto nepostradatelné pro vysvětlení vlastností a reaktivity veškeré hmoty na Zemi.

Kromě struktury je dalším důležitým faktorem ovlivňujícím vlastnosti molekul jejich dynamické chování. Molekuly se mohou pohybovat ve velmi široké škále rychlostí – od rychlých vibračních pohybů probíhajících na femtosekundové škále po pomalé konformační změny makromolekul nebo molekul v pevných materiálech, které mohou probíhat v řádu dnů až let.

NMR spektroskopie je univerzální analytická metoda, která umožňuje studovat strukturu molekul v nejširším slova smyslu od konstituce, konfigurace a konformace malých molekul po třídídimenzionální strukturu biomakromolekul a jejich komplexů. NMR spektroskopie zároveň umožňuje studovat dynamické chování molekul v celém rozsahu možných rychlostí.

V NMR experimentech bývají komplexní strukturní a dynamické informace redukovány na několik málo pozorovaných veličin, proto se interpretace těchto experimentů často neobejde bez molekulového modelování. Obrovský rozvoj kvantově chemických výpočetních metod v posledních několika desítkách let tak umožňuje nové způsoby interpretace NMR experimentů.

Tato předkládaná habilitační práce shrnuje některé výsledky mého výzkumu v oblasti NMR spektroskopie. Jedná se především o rozvoj výpočetních metod pro lepší porozumění vztahu mezi strukturou a dynamikou molekul na jedné straně a pozorovatelnými NMR veličinami na druhé straně. Ve druhé části této práce jsou shrnuty výsledky studia modifikovaných složek nukleových kyselin, kde jsou kombinovány experimentální i teoretické přístupy.

2. NMR spektroskopie

Atomová jádra s nenulovým spinovým kvantovým číslem mohou nabývat různých magnetických stavů, které mají v magnetickém poli rozdílnou energii. S jaderným spinem je spojen jaderný magnetický moment, který v magnetickém poli vykonává Larmorovu precesi, s frekvencí ν přímo úměrnou intenzitě magnetického pole B v místě jádra

$$\nu = \gamma B / 2\pi$$

kde γ je gyromagnetický poměr, který je pro každý nuklid konstantní. Nukleární magnetická rezonance (NMR) je jev, při kterém se stimulují přechody mezi jednotlivými magnetickými stavy jader pomocí radiofrekvenčního záření s frekvencí odpovídající frekvenci Larmorovy precese sledovaných jader. NMR spektroskopie je analytická metoda, která využívá magnetických vlastností jader atomů k získání informací o struktuře a dynamice molekul a materiálů. Vzhled NMR spekter ovlivňují především čtyři typy interakcí mezi jadernými magnetickými momenty vzájemně a mezi jadernými magnetickými momenty a elektrony.

2.1. NMR interakce

2.1.1. Stínění jader elektrony

Intenzita magnetického pole v místě jádra je dána součtem velikosti externího magnetického pole a magnetického pole vyvolaného pohybem elektronů v blízkosti sledovaného jádra. Elektrony „stíní“ jádro od externího magnetického pole, což vede ke změně rezonanční frekvence a tedy posunu signálu daného jádra v NMR spektru. Toto stínění jader elektrony je základem obrovského úspěchu NMR spektroskopie v chemických vědách při určování struktury molekul, protože různá místa v molekule jsou různě stíněna elektrony.

2.1.2. Dipól–dipólová interakce (přímá spin–spinová interakce, dipolární interakce)

Přímá spin–spinová interakce je interakce mezi jadernými magnetickými momenty přenášená přes prostor. Dipolární interakční konstanta D je pro heteronukleární pár jader A a X vyjádřena:

$$D_{AX} = \gamma_A \gamma_X (h/4\pi^2)(\mu_0/4\pi)r_{AX}^{-3}$$

kde γ_A a γ_X jsou gyromagnetické poměry jader A a X , r_{AX} je vzdálenost těchto jader a μ_0 je permeability vakua. To, jakým způsobem se dipolární interakce projeví ve spektru, závisí kromě

velikosti dipolární interakční konstanty D_{AX} i na orientaci vektoru r_{AX} vůči magnetickému poli spektrometru.

2.1.3. *Nepřímá spin–spinová interakce*

Nepřímé spin–spinové interakce, též nazývané skalární nebo J -interakce, jsou interakce mezi jadernými spiny zprostředkované elektrony. Na rozdíl od přímých spin–spinových interakcí není jejich velikost primárně dána vzdáleností mezi interagujícími jádry ale elektronovou strukturou molekuly. Většina NMR učebnic popisuje nepřímou spin–spinovou interakci jako interakci po vazbách a existence této interakce je mnohdy považována za důkaz existence kovalentních vazeb mezi interagujícími atomy. Nicméně je známo, že ačkoliv je tato interakce zprostředkována elektrony, jejich kovalentní distribuce není nutnou podmínkou a skalární interakce mohou být měřeny i například mezi jádry spojenými vodíkovou vazbou nebo disperzními silami ve van der Waalsových komplexech.¹⁻²

2.1.4. *Kvadrupolární interakce*

Jádra, která mají spinové kvantové číslo větší než $\frac{1}{2}$, mají jaderný kvadrupólový moment a jeho interakce s gradientem elektrického pole (daného distribucí okolních jader a elektronů) se nazývá kvadrupolární interakce.

2.2. **NMR spektroskopie látek v roztoku**

Všechny výše zmíněné NMR interakce mají anizotropní charakter; jejich velikost tedy závisí na orientaci zkoumané molekuly v magnetickém poli. V roztocích se však díky rychlému izotropnímu pohybu molekul anizotropie těchto interakcí ztrácí a k signálům ve spektrech pak přispívají pouze izotropní průměry těchto interakcí, což vede k pozorování ostrých a dobře rozlišených spekter jader se spinovým kvantovým číslem $\frac{1}{2}$.

Izotropní chemický posun je pravděpodobně nejdůležitější měřený NMR parametr a úspěch NMR spektroskopie ve strukturní analýze je založen především na interpretaci chemických posunů ve spektrech studovaných látek. Chemické posuny jsou dány různým stíněním jader elektrony, které se nachází v blízkosti pozorovaného jádra a v NMR spektrech lze často vymezit dobře definované oblasti, kde se nachází signály určitých funkčních skupin.

Jedinou další NMR interakcí, jejíž izotropní hodnota je nenulová, je nepřímá spin–spinová interakce. Velikost této interakce poskytuje nepostradatelné informace při určování konformace a konfigurace molekul v roztoku. Například vztah mezi velikostmi vicinální interakční

konstanty a torzním úhlem mezi interagujícími atomy, známý jako Karplusova křivka,³⁻⁴ je hojně využíván ve strukturní analýze.

Kvadrupolární interakce a přímé dipól–dipólové interakce mají nulovou izotropní hodnotu a v izotropních roztocích tedy neovlivňují významně vzhled NMR spekter, pouze přispívají k relaxaci spinového systému. Rychlá relaxace může být výhodná, protože díky návratu spinového systému do rovnováhy lze rychle opakovat daný NMR experiment a akumulovat naměřená data. U jader s elektrickým kvadrupólem bývá ale relaxace natolik rychlá, že vede k velmi širokým nerozlišeným signálům a prakticky tak znemožňuje interpretaci spekter těchto jader.

Pokud je rychlost náhodné reorientace molekul v roztoku snížena, například v kapalných krystalech, anizotropní charakter NMR interakcí není zcela potlačen a je možné pozorovat zbytkové přímé dipól–dipólové interakce, zbytkové kvadrupolární interakce nebo zbytkovou anizotropii chemického stínění. Měření těchto zbytkových anizotropních interakcí v roztoku se stalo vítaným doplňkem standardních NMR experimentů a hojně se využívá při určování třídimenzionální struktury biomolekul⁵ i malých organických molekul.⁶⁻⁷

2.3. NMR spektroskopie pevných látek

NMR spektroskopie pevných látek je v současné době často používána jako komplementární technika k difrakčním metodám pro charakterizaci pevných látek. NMR spektroskopie může poskytnout informace, které jsou pomocí difrakčních metod (především difrakce rentgenového záření) obtížně zjistitelné – například informace o pozicích vodíkových atomů nebo o dynamice molekul v pevném stavu. Nezastupitelnou roli hraje NMR spektroskopie například při charakterizaci polymorfních struktur krystalických látek nebo při charakterizaci amorfních látek.

V pevných látkách většinou nedochází k rychlé reorientaci molekul a všechny výše zmíněné NMR interakce přispívají ke vzhledu NMR spekter. To, jakým způsobem se tyto interakce ve spektru projeví, je dáno orientací molekul vůči magnetickému poli NMR spektrometru, což vede k tomu, že NMR spektra práškových vzorků s náhodnou orientací krystalitů mohou být velmi komplikovaná a těžko interpretovatelná. Při měření NMR spekter pevných organických látek se proto používají dvě techniky, které významně zjednodušují výsledná spektra: vysokovýkonný dekaplink a rotace vzorku pod magickým úhlem (54,7°, magic angle spinning, MAS). Vysokovýkonný dekaplink vede k potlačení všech dipól–dipólových interakcí s dekaplovanými jádry. Rotace vzorku pod magickým úhlem vede k částečnému potlačení anizotropního charakteru NMR interakcí. Vzhled spektra jader se spinovým kvantovým číslem $\frac{1}{2}$ pak určují především izotropní chemické posuny pozorovaných jader, takže například

^{13}C spektra měřená s rotací pod magickým úhlem a s dekaplinkem vodíkových jader mohou být velmi podobná uhlíkovým spektrům měřeným v roztoku.

V některých případech je ale výhodné využít anizotropii NMR interakcí v pevných látkách. Například měření přímých dipól–dipólových interakcí lze využít k přesnému určování vzdáleností mezi jádry. Protože je anizotropie NMR interakcí snižována molekulovými pohyby, lze měření anizotropních parametrů také využít ke studiu dynamiky molekul v pevném skupenství.⁸ Například měření deuteriových kvadrupolárních interakcí je obzvláště výhodné, protože tyto interakce jsou poměrně malé a tedy snadno měřitelné a zároveň velmi citlivé na lokální dynamické procesy.⁹

2.4. Výpočty NMR parametrů

Protože na vzhled NMR spekter mají vliv jak intra- tak intermolekulární interakce a komplexní informace o struktuře studovaných molekul je zredukována do několika málo pozorovatelných veličin, využívají se často při interpretaci NMR experimentů výpočetní metody. Vypočtená NMR data poskytují přímé spojení mezi strukturou a pozorovatelnými veličinami v NMR spektrech. Velikost přímé dipól–dipólové interakce lze vypočítat jednoduše ze vzdálenosti interagujících jader, ale všechny ostatní NMR parametry jsou ovlivněny strukturou elektronového obalu a pro jejich predikci je třeba použít kvantově chemické výpočty. V současnosti nejrozšířenější metody výpočtu NMR parametrů jsou založeny na teorii funkcionálu hustoty (density functional theory, DFT). Typický postup výpočtu zahrnuje optimalizaci geometrie molekuly minimalizací energie a následný výpočet NMR parametrů. Běžně se počítají NMR parametry izolovaných molekul, ale v posledních 10–15 letech došlo k obrovskému pokroku v metodologii výpočtů NMR parametrů pevných látek. Rozvoj těchto výpočetních metod vedl dokonce ke vzniku nového oboru – NMR krystalografie, který je založen na kombinaci experimentálních a teoretických NMR dat.¹⁰⁻¹¹ Metody NMR krystalografie lze využívat ke studiu struktury a lokálních pohybů v pevných látkách a to nejen krystalických.

3. Shrnutí vlastních výsledků

Ve svém výzkumu se dlouhodobě zabývám vývojem nových experimentálních a teoretických metod NMR spektroskopie. V první části tohoto shrnutí budou stručně představeny vybrané publikace zabývající se rozvojem teoretických metod výpočtu NMR parametrů. Ve druhé části pak budou ukázány především experimentální výsledky získané při studiu modifikovaných složek nukleových kyselin.

3.1. Vliv dynamického chování molekul na NMR parametry

Jak bylo již řečeno, standardním postupem kvantově chemických výpočtů NMR parametrů je provedení optimalizace geometrie následované vlastním NMR výpočtem. Tento NMR výpočet tedy bývá prováděn na jedné statické struktuře molekuly, kde jsou pozice jednotlivých atomů jasně definovány. Reálné molekuly ale nejsou statické – i při teplotě absolutní nuly molekuly vibrují a při vyšších teplotách se mohou účastnit celé řady dynamických dějů. Experimentální NMR parametry tedy neodpovídají jedné statické struktuře ale časovému průměru všech dynamických stavů molekuly. Pokud například měříme spektra běžných izotopů s rezonančními frekvencemi v řádech stovek MHz, vibrační pohyby molekul, které probíhají na femtosekundové až pikosekundové časové škále, budou zcela vyprůměrovány.

Vibrační středování je možné při výpočtu NMR parametrů zohlednit dvěma způsoby. Jedním z nich je výpočet vibrační vlnové funkce a její vynásobení vypočtenou závislostí NMR parametrů na geometrii molekuly. Tento přístup jsem použil například v publikaci 1 (**Příloha 1**), kde byl systematicky studován vliv použitých aproximací vibrační vlnové funkce na shodu vypočtených vibračních korekcí s experimentálními daty. Ve druhé publikaci (**Příloha 2**) je pak studován vliv vibračních pohybů na chemické posuny v krystalických látkách. Druhým způsobem vibračního středování je provedení simulace molekulové dynamiky (MD) a výpočet NMR parametrů pro soubor struktur získaných z této simulace. NMR parametry vypočítané pro jednotlivé struktury jsou potom průměrovány. Nevýhodou tohoto přístupu je, že pro tyto MD simulace nelze použít klasické simulační techniky založené na empirických silových polích, protože empirická silová pole nereflktují kvantový charakter molekulových vibrací. Naopak velkou výhodou metod založených na průměrování NMR dat vypočtených pro trajektorie z MD simulací je, že tyto simulace mohou zahrnovat jakýkoliv dynamický děj, nejen molekulové vibrace ale například i konformační rovnováhu, dynamické chování solvatačního obalu nebo protonaci/deprotonaci studované molekuly.

Kombinací MD simulací a výpočtů NMR parametrů jsem studoval vliv rychlých molekulových pohybů na veličiny pozorovatelné v NMR spektrech pevných látek (**Přílohy 2 a 3**). Tyto studie ukázaly, že vibrační a librační (oscilace celých molekul v krystalové mřížce) pohyby vedou ke snížení anizotropie pozorovatelných NMR parametrů (anizotropie chemického stínění a kvadrupolárního kaplinku). Zahrnutí těchto rychlých molekulových pohybů do výpočtu potom vede k lepší shodě s experimentálními anizotropiemi a je tedy žádoucí především pro NMR krystalografii.

Chemické posuny a skalární interakční konstanty molekul v roztoku mohou být výrazně ovlivněny interakcemi s rozpouštědlem. Při nejčastěji používaných NMR výpočtech izolovaných molekul je rozpouštědlo buď zcela zanedbáno nebo simulováno jako polarizovatelné kontinuum. Solvatačním efektům v NMR spektroskopii a jejich modelování se dlouhodobě zabývám, což dokládají tři přiložené publikace (**Přílohy 4–6**). V těchto pracích bylo ukázáno, že simulace rozpouštědla pomocí polarizovatelného kontinua není vhodná v případě rozpouštědel, které se studovanou látkou interagují, například vodíkovými vazbami nebo π - π interakcemi. Jako metoda, která poskytuje nejlepší shodu s experimentálními daty, byla opět prokázána kombinace MD simulací s výpočty NMR parametrů pro soubor struktur získaných z těchto simulací. Také bylo ukázáno, že trajektorie získané z DFT molekulové dynamiky poskytují lepší shodu vypočtených NMR parametrů než trajektorie z klasické molekulové dynamiky.

Jednou ze studovaných modelových látek pro sledování vlivu solvatace na NMR parametry je alanin, který se v závislosti na pH prostředí může vyskytovat v jedné ze tří iontových forem – kation, zwitterion, anion. Každá z těchto forem má jiné experimentální hodnoty chemických posunů a skalárních interakčních konstant. Použije-li se pro výpočet NMR parametrů standardní postup se simulací rozpouštědla pomocí polarizovatelného kontinua, výsledné rozdíly chemických posunů mezi jednotlivými formami jsou daleko od experimentálních rozdílů (Tabulka 1). Pokud se však provede DFT simulace molekulové dynamiky a následně se počítají chemické posuny pro soubor molekulových klastrů alaninu se všemi molekulami vody v jeho blízkém okolí, výsledná shoda s experimentálními daty je velmi dobrá. Stejný závěr platí i pro shodu experimentálních a vypočtených skalárních interakčních konstant. Tato kombinace NMR experimentů s MD simulacemi zároveň umožňuje studovat nejen strukturu rozpuštěné látky (alaninu), pro kterou jsou k dispozici NMR data, ale i strukturu a dynamiku hydratačního obalu, které jsou pouze experimentálními metodami těžko dostupné.

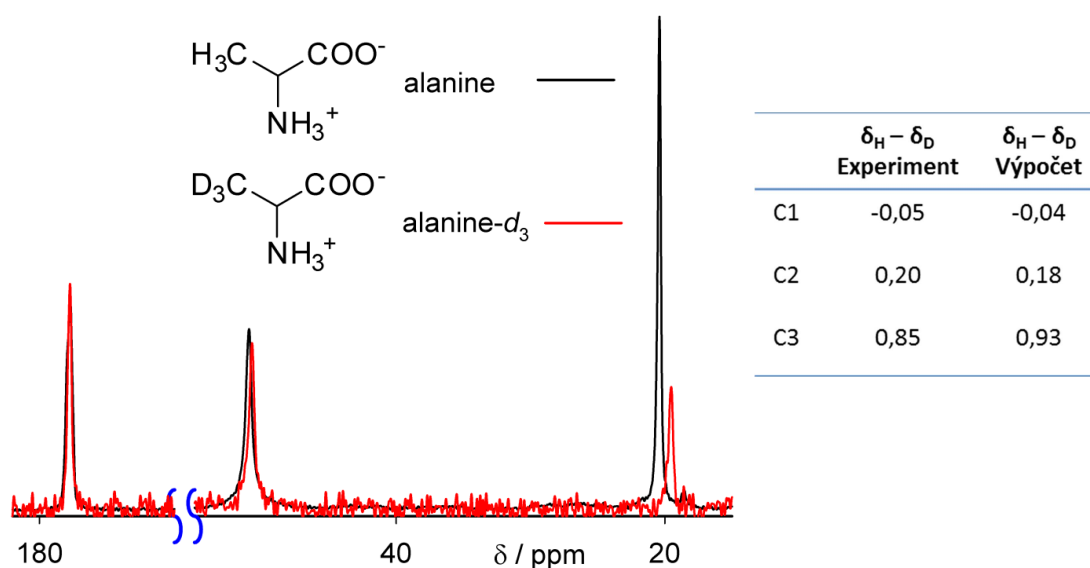
Tabulka 1. Experimentální a vypočtené rozdíly chemických posunů různých iontových forem alaninu (A^- – anion, A^{ZW} – zwitterion, A^+ – kation). Simulace rozpouštědla ve výpočtech pomocí polarizovatelného kontinua (PCM) nebo simulací molekulové dynamiky (MD) s explicitními molekulami vody a následný výpočet chemických posunů pro soubor MD struktur.

$\delta A^- - \delta A^{ZW}$				$\delta A^+ - \delta A^{ZW}$			
atom	PCM	MD	Exp.	atom	PCM	MD	Exp.
N	-11.7	-6.91	-6.60	N	-4.94	-2.47	-2.20
C $^\alpha$	0.87	-0.24	0.93	C $^\alpha$	-1.21	-2.14	-1.77
C'	14.31	9.80	8.94	C'	-0.42	-2.47	-3.11
C $^\beta$	4.72	3.22	4.25	C $^\beta$	-2.19	-0.95	-0.83
H $^\alpha$	-0.9	-0.77	-0.48	H $^\alpha$	0.76	0.58	0.37
H $^\beta$	-0.41	-0.35	-0.26	H $^\beta$	0.27	0.23	0.08

DFT molekulová dynamika využívá pro výpočet sil působících na jednotlivé atomy v průběhu simulace kvantově chemické DFT metody. Jádra atomů se ale v DFT dynamice chovají jako klasické částice, jejichž pohyb je dán Newtonovými pohybovými rovnicemi. Jádra lehkých atomů (hlavně vodíku 1H) mohou mít ale částečně vlnový charakter, který vede k nukleárním kvantovým efektům (NQE) jako tunelování nebo delokalizace pozic jader. Tyto nukleární kvantové efekty nejsou v běžných MD simulacích (klasických i DFT) zahrnuty. Jedním z možných způsobů, jak NQE do simulací zahrnout je použití molekulové dynamiky s dráhovými integrály (path integral molecular dynamics, PIMD). Ve třech příložených publikacích (**Příloha 7–9**) jsem systematicky studoval, jaký vliv mají nukleární kvantové efekty na pozorovatelné NMR parametry.

Například jsme ukázali, že NQE vedou ke změnám chemických posunů uhlíkových atomů pevných látek. To je především dáno delokalizací vodíkových jader v blízkosti pozorovaných uhlíků. Největší vliv NQE byl pozorován pro methylové skupiny a nejmenší pro kvartérní uhlíky. Tyto výsledky vedly zároveň k objasnění dříve pozorovaných nesrovnalostí v korelacích experimentálních a vypočtených chemických posunů uhlíkových atomů. V ideálním případě by takové korelace měly být lineární se směrnici 1, v mnoha studiích zabývajících se NMR krystalografií se ale směrnice této korelace odchylovala od hodnoty 1. V naší práci (**Příloha 7**) jsme ukázali, že pokud se k vypočteným hodnotám chemických posunů připočte vliv NQE, výsledná směrnice korelace je velmi blízká hodnotě 1. Tento vliv NQE byl vysvětlen tak, že v NMR spektrech bývají uhlíkové signály methylových skupin v oblasti nižších hodnot

chemických posunů a signály kvartérních uhlíků spíše v oblasti vyšších chemických posunů. Protože vliv NQE na uhlíkové posuny je větší pro methylové uhlíky než pro kvartérní, dochází ke změně směrnice lineární korelace. Ve stejné práci jsme také ukázali, že kombinací PIMD simulací s výpočty chemických posunů a skalárních interakčních konstant lze predikovat změny těchto NMR parametrů při izotopové výměně vodíku ^1H za deuterium v excelentní shodě s experimentem (Obrázek 1). Tyto izotopové posuny jsou přitom mimořádně důležité například při objasňování mechanismů chemických reakcí.

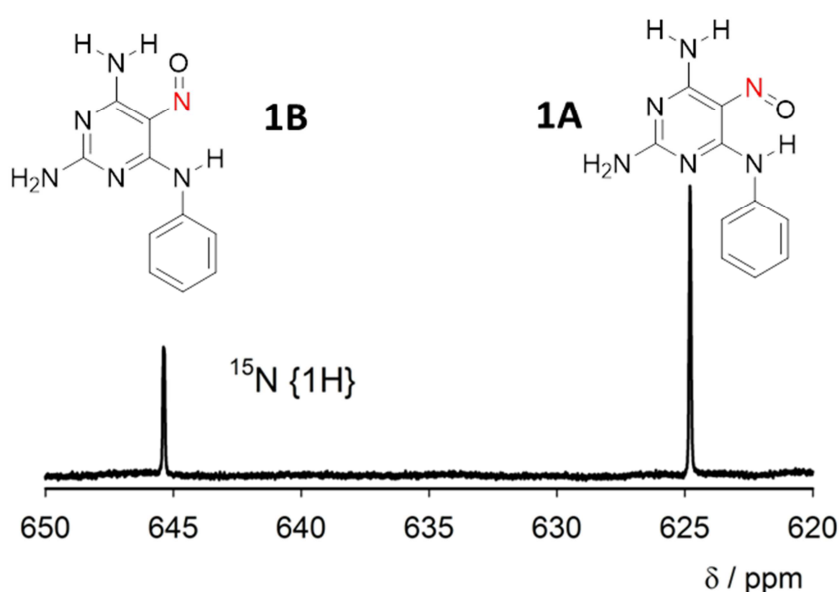


Obrázek 1. ^{13}C NMR spektra krystalického alaninu s přirozeným izotopovým zastoupením a alaninu s deuterovanou methylovou skupinou. Experimentální a vypočtené izotopové posuny (ppm) uhlíkových signálů jsou uvedeny v tabulce.

V další práci (**Příloha 8**) jsme ukázali, že pomocí PIMD simulací lze také správně předpovídat teplotní závislosti NMR parametrů (chemických posunů a kvadrupolárního kaplinku). Metody simulací molekulové dynamiky, které nezahrnují NQE, vedou k výrazně vyšší závislosti distribuce atomových pozic na teplotě a tedy i k nerealistické teplotní závislosti NMR parametrů, kdežto PIMD simulace, kde je simulováno i kvantování vibračních stavů molekul, vedou k vynikající shodě vypočtených a experimentálních teplotních závislostí.

V poslední práci, která je zařazena do této části (**Příloha 9**), jsou využity zkušenosti s PIMD simulacemi při studiu rezonančně stabilizovaných vodíkových vazeb (resonance assisted hydrogen bonds, RAHB). Byla připravena ^{15}N značená sloučenina **1** (připravila Lucie Čechová, UOCHB AV ČR), která existuje v rovnovážném stavu jako směs rotamerů A a B. Tyto rotamery se liší orientací nitroso skupiny, která může tvořit intramolekulární vodíkovou vazbu s jedním ze dvou možných donorů vodíkové vazby v sousedních pozicích. Tyto vodíkové vazby, kde donor a

akceptor jsou propojeny systémem konjugovaných dvojných vazeb, se označují jako rezonančně stabilizované.¹² V ^{15}N NMR spektru látky **1** jsou pak vidět dvě sady signálů odpovídající těmto dvěma rotamerům. Například rozdíl chemického posunu dusíku nitroso skupiny je 20,6 ppm (Obrázek 2), avšak standardní DFT výpočet chemických posunů pro optimalizované geometrie vede k rozdílu chemických posunů dusíků nitroso skupin o velikosti 10,0 ppm. Po zahrnutí NQE do výpočtu je výsledný rozdíl chemických posunů 19,6 ppm, tedy ve velmi dobré shodě s experimentální hodnotou. V této práci bylo prokázáno, že rezonanční stabilizace je úzce spjata s delokalizací vodíkových jader a že NMR spektroskopie ve spojení s PIMD simulacemi je vhodný nástroj, ke studiu této delokalizace.



Obrázek 2. Část ^{15}N NMR spektra látky **1** s oblastí signálů nitroso skupiny.

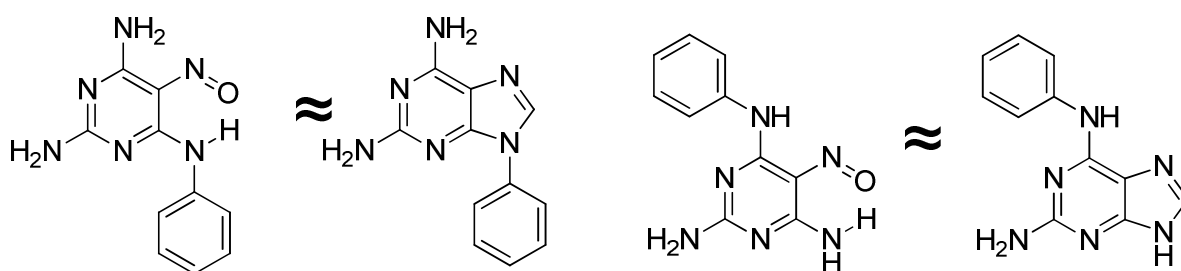
3.2. Studium struktury a dynamiky modifikovaných složek nukleových kyselin

Nukleobáze, nukleotidy a nukleové kyseliny jsou fascinující molekuly zodpovědné za mnoho buněčných procesů jako je uložení dědičné informace, metabolické regulace nebo katalýza biochemických reakcí.¹³ Chemické modifikace složek nukleových kyselin navíc otevírají nové možnosti boje proti mnoha nemocem, například AIDS nebo rakovině.¹⁴⁻¹⁵ NMR spektroskopie umožňuje studovat nejenom strukturu nově připravených derivátů složek nukleových kyselin ale i jejich reaktivitu a dynamické chování.

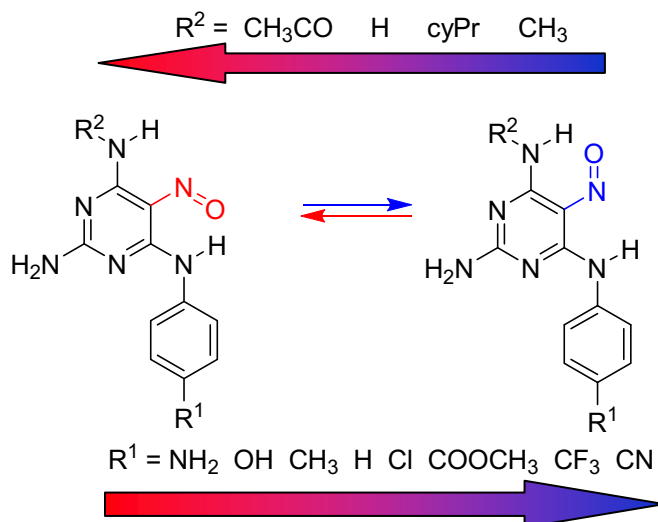
Modifikované složky nukleových kyselin jsou významným předmětem mého výzkumu. Pro získání nových informací o těchto molekulách ve své práci často kombinuji experimentální a teoretické přístupy. Některé aspekty studia složek nukleových kyselin pomocí NMR spektroskopie jsem shrnul ve třech zvaných přehledných článcích,^{9, 16-17} které však kvůli svému značnému rozsahu nejsou součástí této práce.

3.2.1. 5-Nitrosopyrimidiny

Deriváty pyrimidinu s nitroso skupinou v poloze 5 byly již představeny v závěru předchozí části. Jejich studiu jsou věnovány i další publikace (**Přílohy 10–12**). Všechny studované látky byly připraveny ve skupině Dr. Zlatka Janeby na UOCHB AV ČR. Jak již bylo řečeno, tyto látky vytvářejí stabilní intramolekulární vodíkové vazby a pokud jsou v sousedství nitroso skupiny dva různé donory vodíkové vazby, tyto molekuly mohou existovat jako směs dvou rotamerů. Svým tvarem i elektrostatickým potenciálem tyto molekuly mimikují deriváty purinu (Obrázek 3) a přítomnost dvou forem těchto látek může být využita k cílení jejich vlivu na dva různé buněčné procesy. Poměr těchto dvou rotamerů v rovnováze je výrazně ovlivněn substituenty na amino skupinách, které slouží jako donory vodíkové vazby. Vhodnou volbou těchto substituentů lze ladit rovnovážný poměr obou rotamerů v širokém rozsahu. Například pro sérii derivátů 5-nitrosopyrimidinu (Obrázek 4) s *para*-substituovaným derivátem anilinu v sousední pozici k nitroso skupině je rovnovážné zastoupení rotameru, kde nitroso skupina tvoří vodíkovou vazbu s tímto anilinovým vodíkem, silně závislé na charakteru *para* substituentu a může nabývat hodnot 32–84%.

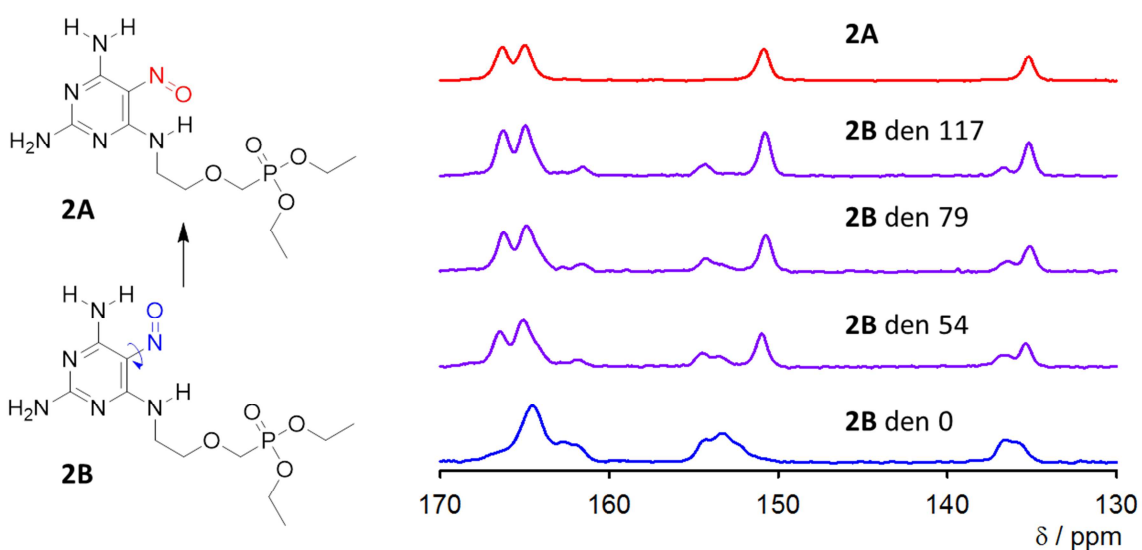


Obrázek 3. Jeden derivát 5-nitrosopurinu mimikující dva různé purinové deriváty.



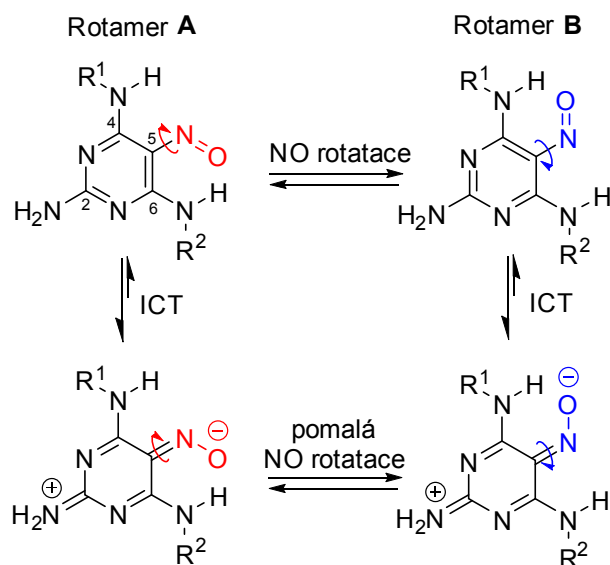
Obrázek 4. Rovnovážné zastoupení rotamerů 5-nitrosopyrimidinu je závislé na substituentech na donorech vodíkové vazby.

Velikost bariéry rotace nitroso skupiny a tedy bariéry přechodu jednoho rotameru na druhý lze zjistit pomocí analýzy NMR spekter měřených při různých teplotách. Tato měření ukázala, že rychlost rotace kolem C–NO vazby je velmi pomalá a tedy velikost izomerační bariéry je překvapivě vysoká. V některých případech bylo dokonce možné oba rotamery od sebe separovat běžnými chromatografickými metodami (**Příloha 11**). Izolované rotamery modelové látky **2** byly charakterizovány pomocí ^{13}C NMR spekter měřených v pevném stavu a bylo ukázáno, že jeden z rotamerů je krystalický a druhý je amorfní. Amorfní rotamer postupně v pevném stavu v průběhu několika měsíců přechází na krystalickou formu opačného rotameru (Obrázek 5). Po rozpuštění čistých rotamerů dochází k postupnému ustanovování konformační rovnováhy, které je možné sledovat postupným měřením série ^1H NMR spekter. Kinetické parametry zjištěné z tohoto měření potvrdily neobvyklou velikost bariéry rotace kolem jednoduché C–NO vazby.



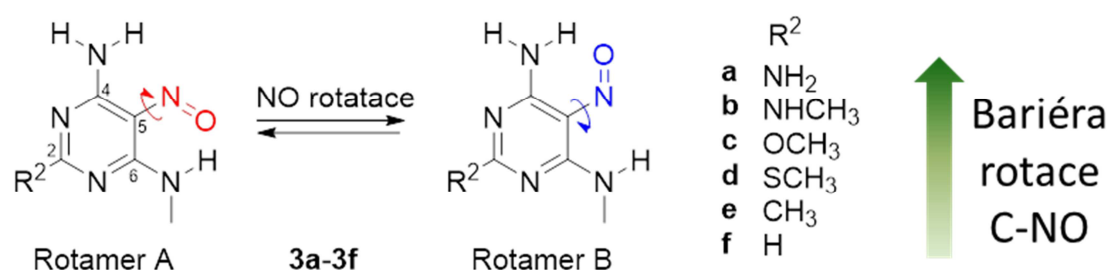
Obrázek 5. Postupný přechod amorfního rotameru B látky **2** na krystalický rotamer A sledovaný pomocí ^{13}C NMR spekter pevné látky (zobrazena je pouze oblast signálů aromatických uhlíků).

Tato mimořádně velká bariéra rotace vedla k hypotéze, že stabilita jednotlivých rotamerů není způsobena pouze intramolekulárními vodíkovými vazbami, ale že bráněné rotaci může přispívat i push–pull interakce substituentů na pyrimidinovém kruhu. Interakce elektron-donorních a elektron-akceptorních substituentů může vést k intramolekulárnímu přenosu náboje (intramolecular charge transfer, ICT) a tím ke zvýšení řádu vazby C–NO (Obrázek 6).



Obrázek 6. Intramolekulární přenos náboje (ICT) vede ke zpomalení rotace kolem C–NO vazby.

Pomocí analýzy NMR spekter měřených při různých teplotách byly stanoveny bariéry rotace kolem C5–NO vazby pro sérii derivátů **3a–3f** s různými substituenty v poloze 2 (Obrázek 7) a bylo zjištěno, že elektron-donorní substituenty zvyšují velikost této bariéry. Bylo tedy prokázáno, že intramolekulární přenos náboje vede ke zvýšení řádu formálně jednoduchých vazeb a tím i ke zvýšení rotační bariéry kolem těchto vazeb. U methylamino derivátu **3b** je navíc i bariéra rotace kolem vazby C2–NHCH₃ natolik vysoká, že v NMR spektrech této látky lze pozorovat čtyři konformery odpovídající dvěma rotamerům kolem C5–NO vazby a dvěma rotamerům kolem C2–NHCH₃ vazby. Pomocí analýzy NMR spekter měřených při různých teplotách byla určena i velikost této bariéry rotace kolem C2–NHCH₃ vazby, která je o cca 6 kcal/mol vyšší u 5-nitrosoderivátu **3b** než u analogické látky bez nitroso skupiny v poloze 5.



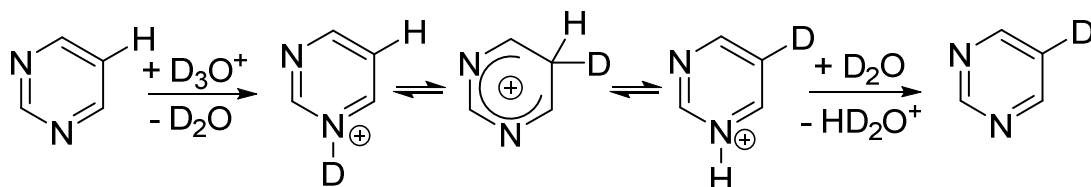
Obrázek 7. Substituent v poloze 2 u derivátů 5-nitrosopyrimidinu **3a–3f** výrazně ovlivňuje velikost bariéry rotace kolem C–NO vazby.

U derivátů 5-nitrosopyrimidinu se dvěma donory vodíkové vazby v polohách 4 a 6 bylo tedy zjištěno, že rovnovážné zastoupení dvou možných struktur s intramolekulární vodíkovou vazbou lze řídit vhodnou volbou těchto donorů vodíkové vazby a bariéru přechodu mezi těmito dvěma možnými strukturami lze ovlivňovat charakterem substituentu v poloze 2. Tyto látky by tedy mohly fungovat jako variabilní molekulové přepínače. V současné době proto studujeme vliv externích interakcí (například intermolekulárních vodíkových vazeb) na rotamerní rovnováhu těchto látek.

3.2.2. Izotopové výměny vodíku v derivátech pyrimidinu

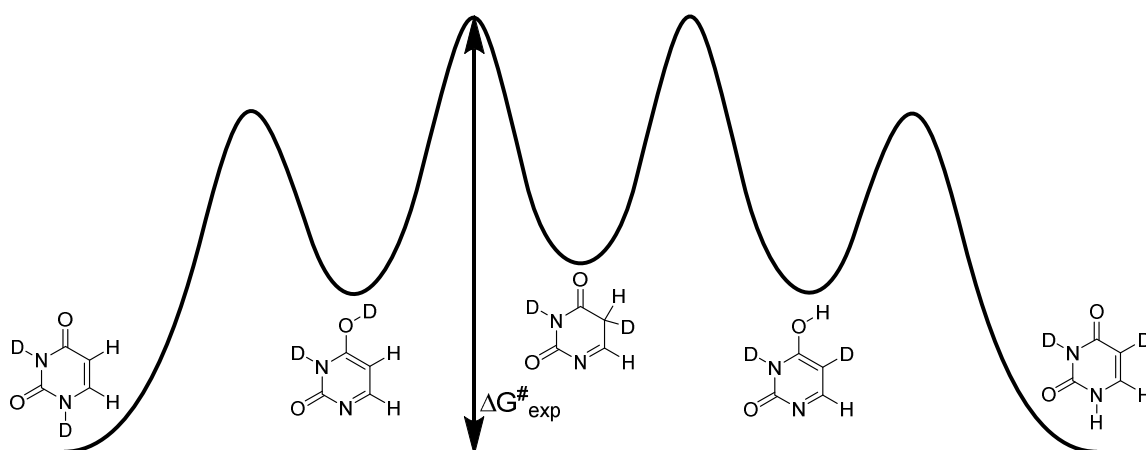
Jiným příkladem využití NMR spektroskopie při výzkumu vlastností bází nukleových kyselin je studie izotopových výměn vodíku v poloze 5 derivátů uracilu (**Příloha 13**). Tato studie navazuje na naši předchozí práci, ve které byl vysvětlen mechanismus izotopových výměn vodíku v poloze 5 u derivátů pyrimidinu s elektron-donorními substituenty.¹⁸ Tento mechanismus zahrnoval C-protonované/deuterované formy pyrimidinu, které jsou v rovnováze s N-

protonovanými/deuterovanými formami (Obrázek 8). Výsledná izotopová výměna je mimořádně důležitá při studiu mechanismu účinku nových potenciálních léčiv na bázi pyrimidinu, protože v těchto studiích se často používá radioaktivní značení tritiem právě v poloze 5.



Obrázek 8. Mechanismus izotopové výměny vodíku v poloze 5 u derivátů pyrimidinu.

Podobná izotopová výměna vodíku v poloze 5 byla pozorována i u uracilu a jeho derivátů, přestože protonace uracilu v neutrálním prostředí je velmi nepravděpodobná (pK_A protonovaného uracilu je -2).¹⁹ Na základě měření kinetiky izotopové výměny pomocí NMR spektroskopie a výpočtu energií všech možných tautomerních forem uracilu byl navržen mechanismus této izotopové výměny, který jako klíčový intermediát zahrnuje neobvyklý tautomer uracilu s sp^3 hybridizovaným uhlíkem v poloze 5 (Obrázek 9). Tento tautomer má energii o 15,6 kcal/mol vyšší než kanonický tautomer uracilu s dvěma vodíky na dusíkových atomech. Znalost mechanismu izotopové výměny vodíku byla využita k návrhu jednoduché metody pro přípravu série tritiem značených derivátů uracilu.²⁰



Obrázek 9. Mechanismus izotopové výměny vodíku v poloze 5 derivátů uracilu.

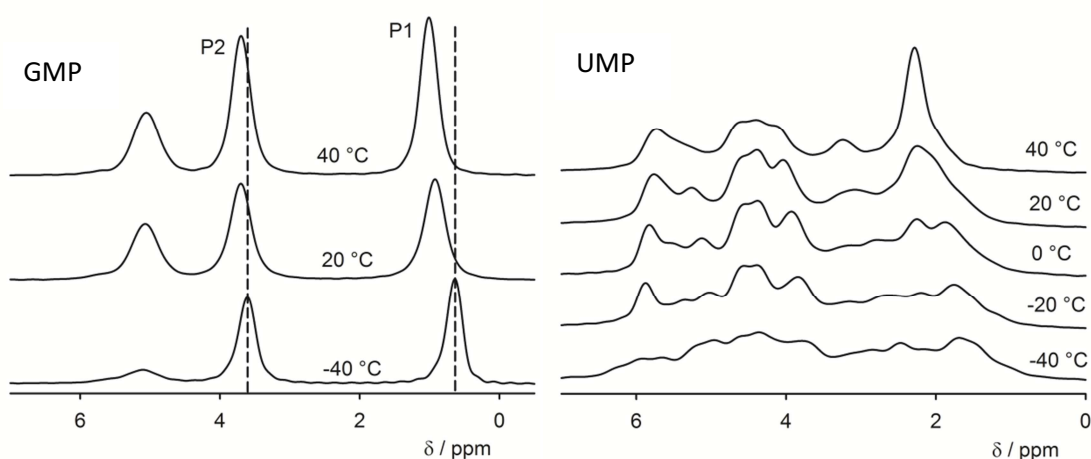
3.2.3. Dynamické chování solvatačního obalu v pevných hydrátech nukleotidů

Dalším příkladem využití NMR spektroskopie při výzkumu složek nukleových kyselin je studium struktury krystalických hydrátů nukleotidů (**Příloha 14**). Dva přirozené nukleotidy, guanosin-5'-monofosfát (GMP) a uridin-5'-monofosfát (UMP), tvoří při krystalizaci jejich sodných solí z vodného prostředí heptahydráty, jejichž struktura byla již dříve studována pomocí rentgenové difrakce.²¹⁻²² Obě krystalové struktury se skládají z vrstev nukleotidů, mezi kterými jsou kanály s molekulami vody a sodnými kationty. V případě GMP jsou pozice všech molekul vody i sodných kationtů dobře definovány, v solvatačním kanálu UMP panuje ale velká neuspořádanost a pozice jednotlivých molekul vody a sodných kationtů nebylo možné pomocí difrakčních experimentů určit.

V ³¹P NMR spektru krystalického GMP (Obrázek 10) jsou vidět dva signály, které odpovídají dvěma atomům fosforu v krystalograficky neekvivalentních molekulách GMP (v asymetrické buňce GMP jsou dvě molekuly GMP, $Z' = 2$). Ve fosforovém spektru GMP je navíc patrný další signál, který patří dehydratované formě GMP, jeho intenzita při vyšších teplotách postupně vzrůstá na úkor intenzity signálů heptahydrátu GMP.

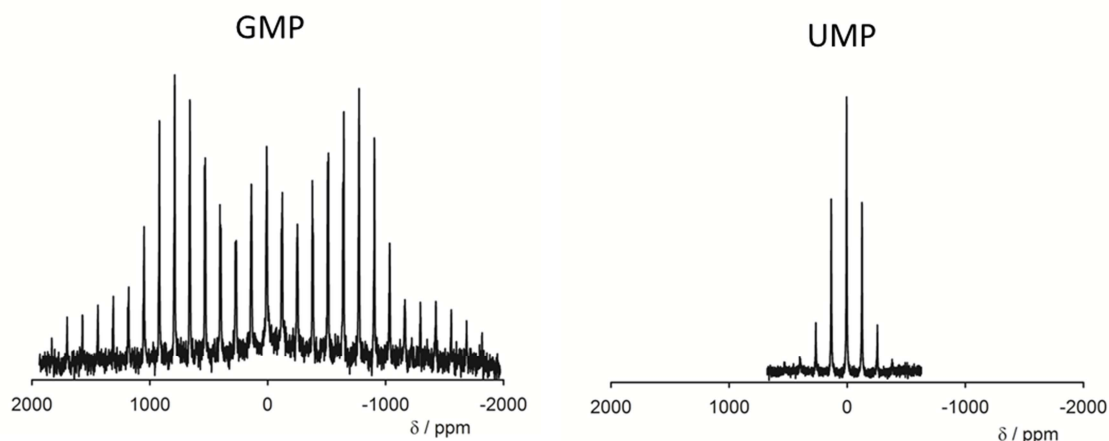
Struktura UMP zjištěná z difrakčních experimentů obsahuje v asymetrické buňce pouze jednu molekulu UMP ($Z' = 1$), ve fosforovém NMR spektru bychom tedy měli pozorovat pouze jeden signál. V experimentálním spektru je ale mnoho vzájemně se překrývajících signálů. Toto velké množství signálů je důsledkem neuspořádanosti solvatačního obalu. Protože v krystalickém UMP existují různé struktury hydratovaného fosfátového aniontu, jádra fosforu v těchto strukturách mají různé chemické posuny.

Podobná pozorování byla učiněna i v ²³Na spektrech krystalických GMP a UMP. GMP obsahuje čtyři krystalograficky neekvivalentní pozice sodíkového kationtu a ve spektrech jsou vidět čtyři signály odpovídající těmto pozicím. Naproti tomu v sodíkových spektrech UMP lze pozorovat velké množství vzájemně se překrývajících signálů.



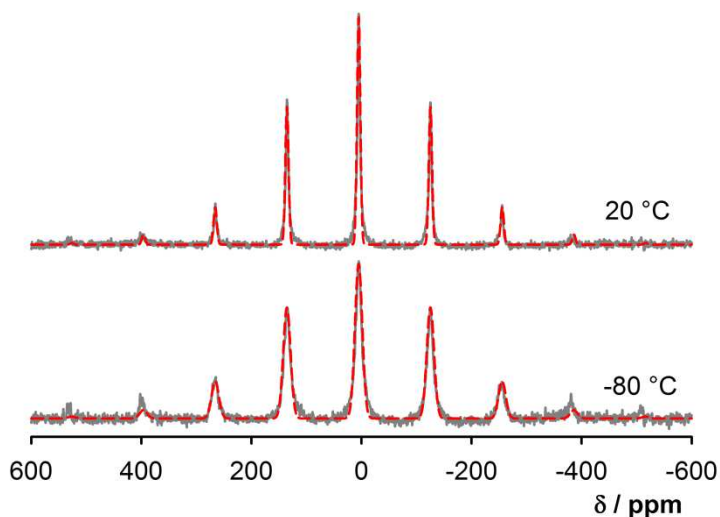
Obrázek 10. ^{31}P NMR spektra krystalických hydrátů GMP a UMP měřená při různých teplotách. Signál u 5 ppm ve spektru GMP patří dehydratované formě.

Dynamické chování solvatačního obalu lze studovat pomocí deuteriových NMR spekter pevných látek. Protože deuterium má spinové kvantové číslo 1, jeho jádra mají kvadrupolární moment a ve ^2H spektrech pevných látek pak pozorujeme kvadrupolární kaplink. Na obrázku 11 vlevo je ^2H NMR spektrum krystalického hydrátu GMP připraveného krystalizací z D_2O . Šířka spektra a tvar signálu v tomto spektru odpovídají typickým ^2H spektrům rigidních pevných látek. Porovnáním tohoto spektra se simulovanými spektry lze odhadnout velikost kvadrupolárního kaplinku na přibližně 200 kHz. Naproti tomu deuteriové spektrum UMP připraveného krystalizací z D_2O je mnohem užší, což potvrzuje velkou mobilitu molekul vody v tomto hydrátu (díky fluktuaci tenzoru gradientu elektrického pole je průměrný tenzor bližší své izotropní, a tedy nulové, hodnotě). Odhadovaná velikost kvadrupolárního kaplinku deuteria v UMP získaná porovnáním experimentálních a simulovaných spekter je 35 kHz.



Obrázek 11. ^2H NMR spektra krystalických hydrátů GMP a UMP připravených krystalizací z D_2O měřená s rotací vzorku pod magickým úhlem s frekvencí 10 kHz při teplotě $20\text{ }^\circ\text{C}$.

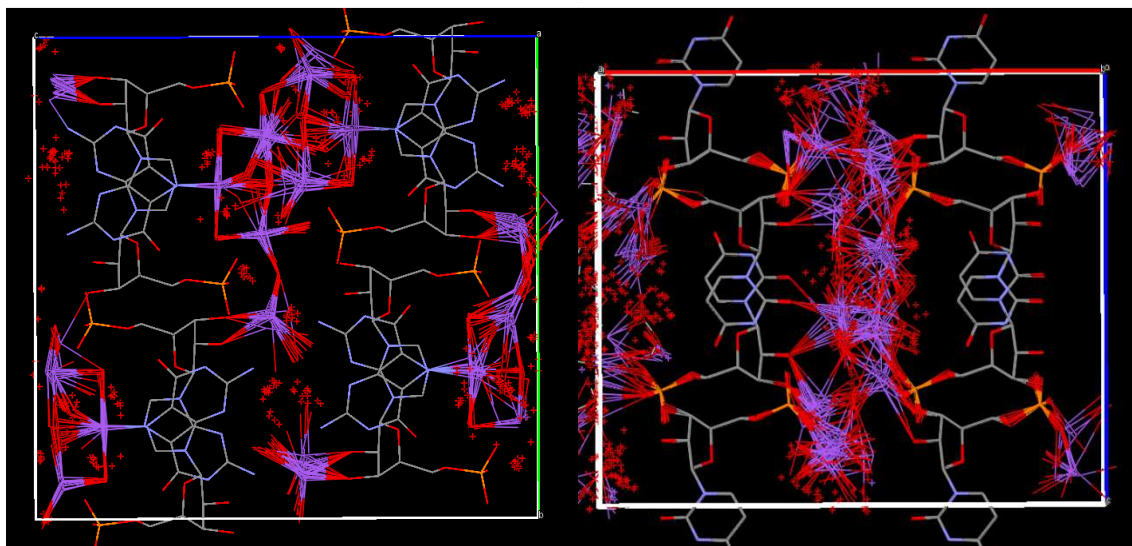
Nízká hodnota deuteriového kvadrupolárního kaplinku v UMP potvrzuje velkou mobilitu molekul vody v tomto hydrátu. Krystalická struktura UMP by se tedy dala popsat jako rigidní matrice molekul nukleotidů s kanálky vyplněnými volně se pohybujícími molekulami vody a sodných kationtů. Zajímavé je, že vzhled deuteriového NMR spektra je téměř nezávislý na teplotě a dokonce i při $-80\text{ }^\circ\text{C}$ je velikost kvadrupolárního kaplinku stále blízka 35 kHz (Obrázek 12), což znamená, že molekuly vody jsou i při této teplotě velmi pohyblivé a nedochází k jejich „zamrznutí“.



Obrázek 12. Experimentální (šedá) a simulovaná (červená) ^2H NMR spektra hydrátu UMP při 20 a $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

Simulace molekulové dynamiky krystalického GMP a UMP potvrdily experimentálně pozorované rozdíly v mobilitě molekul vody a sodných kationtů v těchto dvou systémech. Tyto

simulace byly provedeny při 1000 K a se zafixovanými pozicemi atomů nukleotidů, nesimulují tedy reálné chování molekul v krystalech a nelze je použít k získání dynamických parametrů. Tyto simulace ale jasně ukazují, že molekuly vody a sodné kationty v solvatačních kanálcích v GMP oscilují kolem svých optimálních pozic, kdežto v UMP mohou volně difundovat (Obrázek 13).



Obrázek 13. Překryv 23 struktur z MD simulace GMP (vlevo) a UMP (vpravo). Atomy kyslíku jsou červené a atomy sodíku fialové, vodíkové atomy nejsou zobrazeny kvůli lepší přehlednosti obrázku.

Všechna experimentální i teoretická data tedy jasně poukazují na rozdíly v dynamickém chování molekul vody a sodných kationtů v krystalických hydrátech GMP a UMP.

4. Závěr

Jedním z cílů předloženého souboru prací bylo přesvědčit čtenáře, že NMR spektroskopie v kombinaci s kvantově chemickými výpočty může poskytnout informace o studovaných systémech jinými metodami nedostupné. Tyto informace se mohou týkat nejen struktury studované látky ale i například struktury solvatačního obalu, dynamického chování molekul nebo delokalizace atomových jader.

Některé nejpodstatnější závěry týkající se první části výsledků lze shrnout v těchto bodech:

- Jakýkoliv dynamický děj včetně molekulových vibrací má vliv na pozorovatelné NMR parametry.
- Kvantově chemické výpočty NMR parametrů mohou poskytovat data ve velmi dobré shodě s experimentem, pokud tyto výpočty zahrnují dynamiku studovaných molekul.
- Simulace vlivu rozpouštědla na NMR parametry pomocí metod polarizovatelného kontinua často selhává, vhodnější je použít simulace molekulové dynamiky.
- Nukleární kvantové efekty mohou mít výrazný vliv na NMR parametry.
- Pomocí PIMD simulací je možné studovat nukleární kvantové efekty a predikovat například izotopové posuny nebo teplotní závislosti NMR parametrů.

Ve druhé části výsledků bylo představeno několik prací, které by měly dokládat, že NMR spektroskopie je vynikající nástroj pro studium struktury a vlastností složek nukleových kyselin. Bylo například ukázáno, že 5-nitrosopyrimidiny mohou nabývat dvou překvapivě stabilních rotamerních forem, kde poměr rotamerů v rovnováze i velikost bariéry přechodu mezi rotamery lze řídit volbou substituentů. Také byl vysvětlen mechanismus izotopové výměny vodíku v poloze 5 derivátů pyrimidinu a pomocí metod NMR krystalografie byl prokázán překvapivě dynamický charakter molekul vody krystalickém hydrátu uridin-5'-monofosfátu.

5. Seznam literatury

1. Hierso, J. C. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4838-4867.
2. Ledbetter, M. P.; Saielli, G.; Bagno, A.; Tran, N.; Romalis, M. V. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 12393-12397.
3. Karplus, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 2870-2871.
4. Haasnoot, C. A. G.; Deleeuw, F. A. A. M.; Deleeuw, H. P. M.; Altona, C. *Org. Magn. Reson.* **1981**, *15*, 43-52.
5. Chen, K.; Tjandra, N. *Top. Curr. Chem.* **2012**, *326*, 47-67.
6. Thiele, C. M. *Concepts Magn. Reson.* **2007**, *30A*, 65-80.
7. Thiele, C. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 5673-5685.
8. Paluch, P.; Pawlak, T.; Jeziorna, A.; Trebosc, J.; Hou, G. J.; Vega, A. J.; Amoureux, J. P.; Dračínský, M.; Polenova, T.; Potrzebowski, M. *J. Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 28789-28801.
9. Dračínský, M.; Hodgkinson, P. *RSC Advances* **2015**, *5*, 12300-12310.
10. Bonhomme, C.; Gervais, C.; Babonneau, F.; Coelho, C.; Pourpoint, F.; Azais, T.; Ashbrook, S. E.; Griffin, J. M.; Yates, J. R.; Mauri, F.; Pickard, C. J. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 5733-5779.
11. Pickard, C. J.; Mauri, F. *Phys. Rev. B* **2001**, *6324*, 245101.
12. Gilli, G.; Bellucci, F.; Ferretti, V.; Bertolasi, V. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1023-1028.
13. Blackburn, G. M.; Gait, M. J.; Loakes, D.; Williams, D. M., *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*; RSC: The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2006.
14. Simons, C.; Wu, Q. P.; Htar, T. T. *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, *5*, 1191-1203.
15. De Clercq, E.; Holý, A. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 928-940.
16. Dračínský, M.; Pohl, R., NMR studies of purines. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, Webb, A. G., Ed. Elsevier Ltd.: Oxford, 2014; Vol. 82, 59-113.
17. Dračínský, M.; Pohl, R. *Chem. Res. Toxicol.* **2015**, *28*, 155-165.
18. Dračínský, M.; Holý, A.; Jansa, P.; Kovačková, S.; Buděšínský, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 4117-4122.
19. Benoit, R. L.; Frechette, M. *Can. J. Chem.* **1986**, *64*, 2348-2352.
20. Dračínský, M.; Jansa, P.; Elbert, T. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2011**, *76*, 1567-1577.
21. Katti, S. K.; Seshadri, T. P.; Viswamitra, M. A. *Acta Cryst. B* **1981**, *37*, 1825-1831.
22. Seshadri, T. P.; Viswamitra, M. A.; Kartha, G. *Acta Cryst. B* **1980**, *36*, 925-927.

6. Poděkování

Rád bych poděkoval všem, se kterými jsem spolupracoval na výzkumu uvedeném v této práci. Z mnoha skvělých spolupracovníků bych chtěl zmínit alespoň čtyři: Petru Bouřovi děkuji za to, že mě naučil dívat se na chemickou problematiku z fyzikální stránky, Paulu Hodgkinsonovi za vynikající diskuse a inspirující dotazy, které vždy směřují k jádru problému. Lucii Čechové patří velký dík za syntézu všech modelových látek diskutovaných v kapitole 3.2.1. Chtěl bych také poděkovat Elišce Procházkové, která byla mojí Ph.D. studentkou a v rámci svého studia se zabývala vlastnostmi modifikovaných složek nukleových kyselin a prováděla většinu NMR experimentů zahrnutých do kapitoly 3.2.1.

Rád bych také poděkoval všem kolegům z NMR oddělení UOCHB AV ČR, kteří kromě svých skvělých vědeckých výsledků dokážou vytvářet i mimořádně přátelské pracovní prostředí a pohodovou atmosféru.

Speciální dík patří mé ženě Heleně a celé rodině za neustálou podporu a lásku.

7. Přílohy

- 1) Dračínský M., Kaminský J., Bouř P.: Relative Importance of First and Second Derivatives of NMR Chemical Shifts and Spin-Spin Coupling Constants for Vibrational Averaging. *J. Chem. Phys.* **2009**, *130*, 094106.
- 2) Dračínský M., Bouř P.: Vibrational Averaging of the Chemical Shift in Crystalline α -Glycine. *J. Comput. Chem.* **2012**, *33*, 1080-1089.
- 3) Dračínský M., Hodgkinson P.: A molecular dynamics study of the effects of fast molecular motions on solid-state NMR parameters. *CrystEngComm* **2013**, *15*, 8705-8712.
- 4) Dračínský M., Kaminský J., Bouř P.: Structure of the Alanine Hydration Shell Probed by NMR Chemical Shifts and Indirect Spin-Spin Coupling. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 14698-14707.
- 5) Dračínský M., Bouř P.: Computational analysis of solvent effects in NMR spectroscopy. *J. Chem. Theory Comput.*, **2010**, *6*, 288-299.
- 6) Dračínský M., Möller H., Exner T.: Conformational Sampling by Ab Initio Molecular Dynamics Simulations Improves NMR Chemical Shift Predictions. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 3806-3815.
- 7) Dračínský M., Hodgkinson P.: Effects of quantum nuclear delocalisation on NMR parameters from path integral molecular dynamics. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 2201-2207.
- 8) Dračínský M., Bouř P., Hodgkinson P.: Temperature dependence of NMR parameters calculated from path integral molecular dynamics simulations. *J. Chem. Theory Comput.* **2016**, *12*, 968-973.
- 9) Dračínský M., Čechová L., Hodgkinson P., Procházková E., Janeba Z.: Resonance-assisted stabilisation of hydrogen bonds probed by NMR spectroscopy and path integral molecular dynamics. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 13986-13989.
- 10) Procházková E., Čechová L., Janeba Z., Dračínský M.: A switchable intramolecular hydrogen bond in polysubstituted 5-nitrosopyrimidines. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 10121-10133.
- 11) Čechová L., Procházková E., Císařová I., Dračínský M., Janeba Z.: Separation of planar rotamers through intramolecular hydrogen bonding in polysubstituted 5-nitrosopyrimidines. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 14892-14895.
- 12) Procházková E., Čechová L., Tarábek J., Janeba Z., Dračínský M.: Tunable push-pull interactions in 5-nitrosopyrimidines. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 3780-3789.

- 13) Dračínský M., Jansa P., Chocholoušová J., Vacek J., Kovačková S., Holý A.: Mechanism of isotopic exchange reaction of the 5-H hydrogen of uracil derivatives in water and nonprotic solvents. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 777-785.
- 14) Dračínský M., Šála M., Hodgkinson P.: Dynamics of water molecules and sodium ions in solid hydrates of nucleotides. *CrystEngComm* **2014**, 16, 6756-6764.

7.1. Příloha 1

Relative Importance of First and Second Derivatives of NMR Chemical Shifts and Spin-Spin Coupling Constants for Vibrational Averaging

Dračínský M., Kaminský J., Bouř P.

J. Chem. Phys. **2009**, *130*, 094106.

7.2. Příloha 2

Vibrational Averaging of the Chemical Shift in Crystalline α -Glycine

Dračínský M., Bouř P.

J. Comput. Chem. **2012**, 33, 1080-1089.

7.3. Příloha 3

A molecular dynamics study of the effects of fast molecular motions
on solid-state NMR parameters

Dračínský M., Hodgkinson P.

CrystEngComm **2013**, *15*, 8705-8712.

7.4. Příloha 4

Structure of the Alanine Hydration Shell Probed by NMR Chemical Shifts and Indirect Spin-Spin Coupling

Dračínský M., Kaminský J., Bouř P.

J. Phys. Chem. B **2009**, *113*, 14698-14707.

7.5. Příloha 5

Computational analysis of solvent effects in NMR spectroscopy

Dračínský M., Bouř P.

J. Chem. Theory Comput., **2010**, *6*, 288-299.

7.6. Příloha 6

Conformational Sampling by Ab Initio Molecular Dynamics
Simulations Improves NMR Chemical Shift Predictions

Dračínský M., Möller H., Exner T.

J. Chem. Theory Comput. **2013**, *9*, 3806-3815.

7.7. Příloha 7

Effects of quantum nuclear delocalisation on NMR parameters from
path integral molecular dynamics

Dračínský M., Hodgkinson P.

Chem. Eur. J. **2014**, *20*, 2201-2207.

7.8. Příloha 8

Temperature dependence of NMR parameters calculated from path
integral molecular dynamics simulations

Dračínský M., Bouř P., Hodgkinson P.

J. Chem. Theory Comput. **2016**, *12*, 968-973.

7.9. Příloha 9

Resonance-assisted stabilisation of hydrogen bonds probed by NMR spectroscopy and path integral molecular dynamics

Dračínský M., Čechová L., Hodgkinson P., Procházková E., Janeba Z.
Chem. Commun. **2015**, 51, 13986-13989.

7.10. Příloha 10

A switchable intramolecular hydrogen bond in polysubstituted 5-nitrosopyrimidines

Procházková E., Čechová L., Janeba Z., Dračínský M.

J. Org. Chem. **2013**, *78*, 10121-10133.

7.11. Příloha 11

Separation of planar rotamers through intramolecular hydrogen bonding in polysubstituted 5-nitrosopyrimidines

Čechová L., Procházková E., Císařová I., Dračínský M., Janeba Z.

Chem. Commun. **2014**, 50, 14892-14895.

7.12. Příloha 12

Tunable push–pull interactions in 5-nitrosopyrimidines

Procházková E., Čechová L., Tarábek J., Janeba Z., Dračínský M.

J. Org. Chem. **2016**, *81*, 3780-3789.

7.13. Příloha 13

Mechanism of isotopic exchange reaction of the 5-H hydrogen of
uracil derivatives in water and nonprotic solvents

Dračínský M., Jansa P., Chocholoušová J., Vacek J., Kovačková S.,
Holý A.

Eur. J. Org. Chem. **2011**, 777-785.

7.14. Příloha 14

Dynamics of water molecules and sodium ions in solid hydrates of
nucleotides

Dračínský M., Šála M., Hodgkinson P.

CrystEngComm **2014**, *16*, 6756-6764.