Aminoacil-tRNA-sintetaze kao mete antibiotika

Brkić, Alojzije

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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:217:417152

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Alojzije Brkić

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Aminoacil-tRNA-sintetaze kao mete antibiotika

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

Zagreb, 2017.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:	20. svibnja 2017.
Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:	14. srpnja 2017.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK..... VII

§ 1. UVOD 1

1.1. Biosinteza proteina.....1

1.2. Koraci u biosintezi proteina 1

1.2.1 Transkripcija.....2

1.2.2 Translacija 7

1.3. Aminoacil-tRNA-sintetaze.....15

1.4. Reakcija aminoaciliranja.....16

1.5. tRNA, struktura i svojstva.....17

1.6. Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza (aaRS).....20

1.6.1 Aminoacil-tRNA-sintetaze razreda I 21

1.6.2 Aminoacil-tRNA-sintetaze razreda II.....24

1.7. Izoleucil-tRNA-sinetaza (IleRS) 27

1.8. Reakcije popravka pogreške 30

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME 31

2.1. Inhibitori aminoacil-tRNA-sintetaza.....31

2.1.1 Klasa I: Single site inhibitori katalitičkog mjesta.....32

2.1.2 Klasa II. Dual site inhibitori katalitičkog mjesta.....34

2.1.3 Klase III i IV: Triple site i multisite inhibitori.....36

2.1.4 Inhibitori netrasnlacijske funkcije aminoacil-tRNA-sintetaza.....37

2.2. Mupirocin.....38

2.3. Kinetička i strukturna istraživanja na mupirocinu 39

2.4. Sintetički derivati mupirocina poboljšane efikasnosti 40

2.5. Intrinzična otpornost bakterije *Pseudomonas fluorescens* prema mupirocinu.....42

2.6. Razvijena otpornost prema mupirocinu 43

2.7. Važnost istraživanja aminoacil-tRNA-sintetaza za razvoj novih lijekova.....45

§ 3. LITERATURNI IZVORI.....XLVII

§ Sažetak

Za uspješnu biosintezu proteina ključan je sinergičan učinak velikog broja različitih enzima i proteinskih kofaktora, među kojima su i aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS), enzimi koji vežu aminokiselinu na njezinu odgovarajuću tRNA i tako je aktiviraju za ugradnju u polipeptidni lanac, omogućujući ujedno dekodiranje genetičkog koda. U tom su kontekstu aminoacil-tRNA-sintetaze središnji enzimi u procesu biosinteze proteina i njihovo inhibiranje nužno zaustavlja biosintezu proteina. Kinetička i strukturna istraživanja na aminoacil-tRNA-sintetazama provode se već neko vrijeme, ali dosta je pitanja, još uvijek nerasvijetljeno. Proteklih desetljeća ovi važni enzimi prepoznati su kao potencijalno moćna meta za selektivnu i efektivnu inhibiciju bakterijskog rasta dizajnom njihovih inhibitora kao antibiotika. U istraživačkom zamahu pokušalo se dizajnirati veliki broj antibiotika koji selektivno ciljaju na bakterijski enzim. Ipak, do današnjeg dana samo je mali broj dizajniranih inhibitora pokazao značajniju aktivnost, a samo su dva inhibitora komercijalizirana kao antibiotici. Mupirocin, jedan njih, inhibira bakterijsku izoleucil-tRNA-sintetazu (IleRS) vežući se u aktivno mjesto kao kompetitivni inhibitor i mimik izoleucil-adenilata (Ile-AMP). Ipak, sve do danas univerzalnu upotrebu mupirocina i drugih potencijalno moćnih inhibitora aminoacil-tRNA-sintetaza priječi njihova mala metabolička stabilnost, toksičnost, pojava mutantnih sojeva ili sojeva prirodno otpornih na sintetizirane antibiotike. Bakterijske stanice otpornost stječu prijenosom visokokopijskih plazmida koji nose gen za aaRS veće otpornosti na antibiotik ili točkastim mutacijama u aktivnom mjestu aminoacil-tRNA-sintetaze. Razvoj ovakvih sojeva predstavlja prijetnju za zdravstveni sustav, budući da takvi visokorezistentni sojevi potencijalno posjeduju i otpornost za druge često korištene antibiotike. Smanjenje takvih prijetnji zahtjevat će dizajn novih vrsta antbiotika i za pretpostaviti je da će ti antibiotici u velikoj mjeri biti inhibitori aminoacil-tRNA-sintetaza, budući da su ti enzimi još uvijek neiskorištena meta za inhibiciju bakterijskog rasta. Tom trendu će gotovo sigurno doprinijeti tehnike molekularnog modeliranja i dosadašnje stečeno znanje o aminoacil-tRNA-sintetazama.

§ 1. UVOD

1.1. Biosinteza proteina

Biosinteza proteina jedan je od evolucijski najočuvanijih staničnih procesa i neki koraci biosinteze su jako slični i kod organizama koji nisu nužno bliski u filogenetskom stablu. Za pravilno funkcioniranje stanice nužno je da proces biosinteze, ali i biorazgradnje proteina bude precizno reguliran. Reguliranost procesa biosinteze podrazumijeva postojanje načina za vrlo brzo aktiviranje ili deaktiviranje biosintetskih putova, čija aktivnost ili inaktivnost stanici može biti potrebna iz više razloga:

1. kao trenutni odgovor na izvanstanični podražaj,
2. kao dugoročnija adaptivna mjera na uvjete u okolini,
3. kao sastavni dio proteinske izmjene (*„turnovera“*) u stanici.

Unutar stanice postoje brojni mehanizmi koji omogućavaju prilagođavanje brzine biosinteze proteina potrebama stanice, njezinom energetskom statusu i uvjetima u okolini.

Biosintezu proteina može se promatrati isključivo kao proces koji rezultira nastankom polipeptidnog lanca, no da bi nastao funkcionalan protein stanica prolazi kroz vrlo složen proces. U širem kontekstu, sastavni dio biosinteze proteina nije samo sinteza polipeptidnog lanca, nego i svi procesi koji su zaslužni za: pravilno smatanje proteina u njegovu nativnu konformaciju, dopremanje proteina na ciljano mjesto i posttranslacijske promjene proteina.

1.2. Koraci u biosintezi proteina

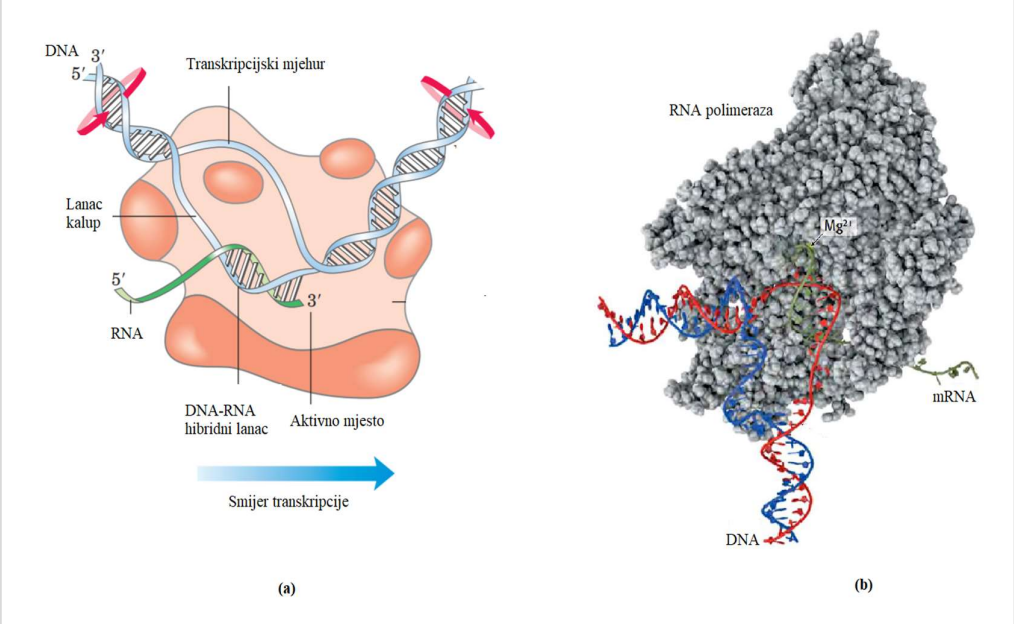
Biosinteza proteina je višestupanjski proces koji se može podijeliti na transkripciju i translaciju. Transkripcija je proces u kojem dolazi do prijepisa genetičke informacije pohranjene u nekom genu koji se nalazi na molekuli DNA u molekulu mRNA. Kako DNA sadržava stabilnu i potpunu genetičku informaciju, tako i transkript mRNA privremeno sadrži informaciju o redoslijedu aminokiselina u kodiranom polipeptidnom lancu i poslužit će kao kalup za sintezu tog polipeptidnog lanca. Transkripcija je ujedno važno mjesto regulacije cijelog procesa biosinteze proteina jer je transkript DNA nužan za daljnje korake biosintetskog puta. Translacija je proces koji se odvija na ribosomu i koji rezultira nastajanjem polipeptidnog lanca. Ribosom u procesu translacije pojedine aminokiseline ugrađuje u rastući polipeptidni lanac,

pozicioniranirajući ih zahvaljujući kodon-antikodon interakcijama aminoacil-tRNA i mRNA te katalizirajući reakciju transpeptidacije. Zbog specifičnosti kodon-antikodon prepoznavanja aminoacil-tRNA i mRNA, redoslijed aminokiselina u polipeptidnom lancu određen je polinukleotidnim slijedom mRNA. U translaciji sudjeluju i aminoacil-tRNA-sintetaze osiguravajući zalihu odgovarajućih aminoacil-tRNA. Nakon translacije sintetizirani polipeptidni lanac se prema staničnim potrebama može dodatno dorađivati.

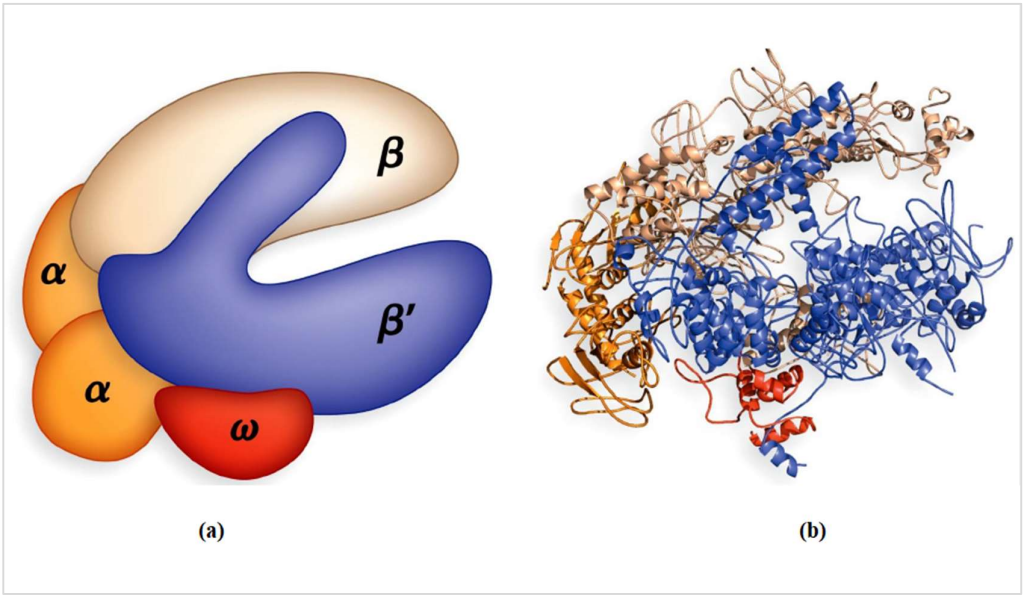
1.2.1 Transkripcija

Transkripcija se kao biopolimerizacijska reakcija može podijeliti na tri usklađena procesa: prepoznavanje promotora, elongaciju transkripta i terminaciju transkripcije na kraju gena. Transkripciju vrše enzimi DNA-ovisne RNA-polimeraze, a molekulski mehanizmi transkripcije vrlo su slični kod prokariota i eukariota. Osnovna razlika potječe od različitih mehanizama regulacije i postojanju dodatnih mehanizama dorade ranog transkripta.

Bakterijska DNA-ovisna RNA-polimeraza je apoenzim podjediničnog sastava $\alpha_2\beta\beta'\omega$. Pokazano je da izostrukturne podjedinice β i β´ (u čiju strukturu ulaze dva iona magnezija) tvore strukturu nalik kliještima koja osigurava dobro prijanjanje enzima za DNA, što je nužno, budući da je enzim procesivan pa se njegova slučajna disocijacija s enzima mora spriječiti. Apoenzim $\alpha_2\beta\beta'\omega$ naziva se još i katalitičkom srži DNA-ovisne RNA-polimeraze, ali nije funkcionalan bez σ-podjedinice koja omogućava prepoznavanje promotorskih mjesta na DNA. Na slikama 1. i 2. shematski je prikazana bakterijska DNA-ovisna RNA-polimeraza zajedno sa slikom tercijarne strukture polimeraze iz bakterije *Thermus aquaticus*.

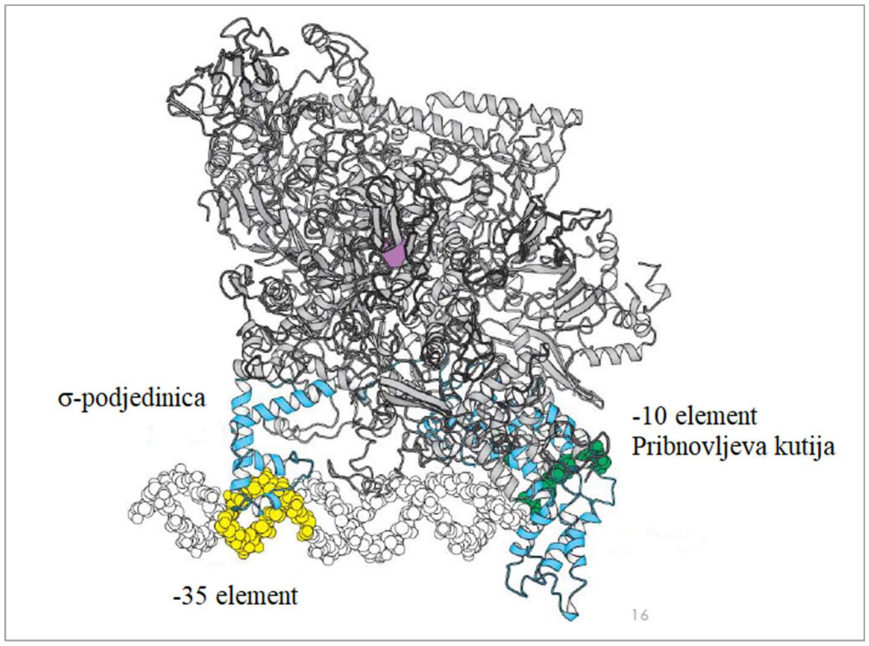


Slika 1. Apoenzim DNA-ovisna RNA-polimeraza: (a) Shematski prikaz, (b) Bakterijska polimeraza iz bakterije *T. aquaticus,* PDB: 1TAQ (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (2))



Slika 2. Apoenzim DNA-ovisna RNA-polimeraza bakterije *Escherichia coli:* (a) Shematski prikaz katalitičke srži enzima, (b) Tercijarna struktura katalitičke srži, PDB: 1KLN (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (3))

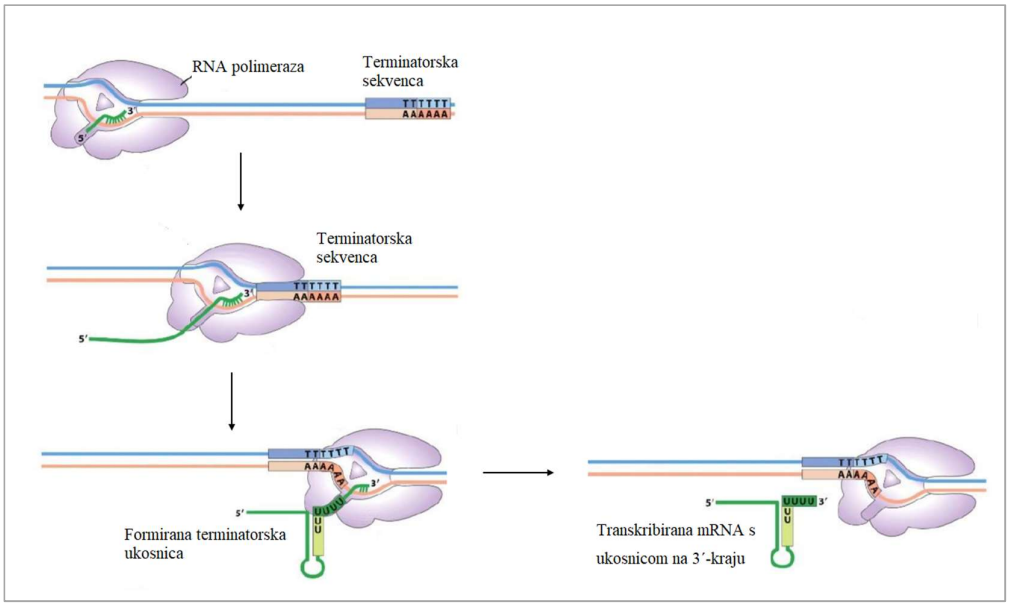
Proces transkripcije počinje prepoznavanjem dvaju posebnih sljedova DNA, jedne na -10 (Pribnowljeva kutija) i druge na -35, što znači da se početci tih nukleotidnih slijedova nalaze 10, odnosno 35 nukleotida prije mjesta inicijacije transkripcije od strane holoenzima $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$. Ta mjesta prepoznavanja nazivaju se promotorima i ona usmjeravaju DNA-ovisnu RNA-polimerazu na ispravna inicijacijska mjesta. Promotori se razlikuju po učinkovitosti, geni s jakim promotorima transkribiraju se vrlo često, oni sa slabijim rjeđe. U jako eksprimiranim genima izvan srži promotora pronađeni su i slijedovi UP (eng. *upstream element*) koji pojačavaju transkripciju ostvarujući dodatne interakcije s α-podjedinicom enzima. Neki gen može imati više promotora koje prepoznaju različite σ-podjedinice pri čemu aktivacija pojedinog promotora može ovisiti o uvjetima u okolini. Nakon prepoznavanja promotora, holoenzim $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$ (slika 3.) se pozicionira na ispravno inicijacijsko mjesto i katalizira nastanak transkripcijskog mjehura - raspletene DNA duljine oko 17 parova baza, nakon čega *de novo* započinje sintezu lanca mRNA. Sinteza lanca mRNA vrši se prema lancu kalupu DNA po principu komplementarnosti baza. Enzim katalizira nastanak fosfodiesterske veze između 3'-OH skupine riboze i α-fosfata nadolazećeg nukleozid-5'-trifosfata (NTP) pri čemu se u otopinu oslobađa pirofosfat čija hidroliza pomoću anorganske pirofosfataze reakciju čini termodinamički povoljnijom. Lanac mRNA raste u smjeru 5' prema 3'. Nakon nastanka lanca mRNA duljine oko 10 nukleotida (hibridni DNA-RNA lanac), σ-podjedinica disocira s holoenzima, a katalitička srž (slika 2.) nastavlja procesivno polimerizaciju.[4]



Slika 3. Holoenzim DNA-ovisna RNA-polimeraza bakterije *T. aquaticus*, PDB: 1TAQ. Žutom i zelenom bojom prikazani su dijelovi promotora na pozicijama -10 i -35. Plavom bojom prikazana je σ-podjedinica polimeraze zaslužna za prepoznavanje promotora. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (3))

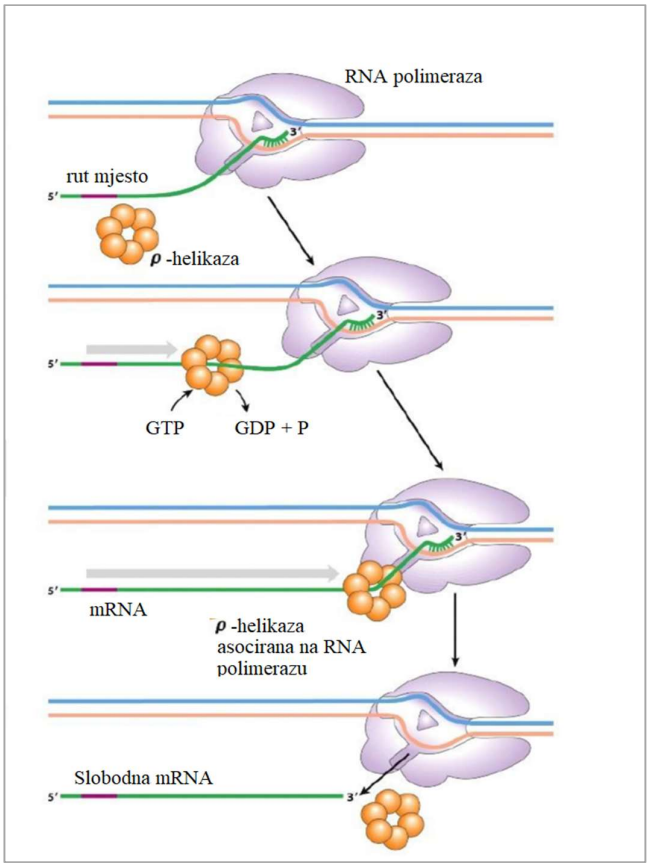
Iako *modus operandi* u načelu jest procesivan, kod DNA-ovisne RNA-polimeraze ne može se govoriti o pravoj procesivnosti, budući da zbog tzv. *backtrackinga,* provjere vjernosti transkripcije, ne dolazi do unidirekcijskog gibanja polimeraze. Intrinzična, hidrolitička aktivnost katalitičke srži, kombinirana s gotovo stohastičkim bidirekcijskim pomacima katalitičke srži tijekom *backtrackinga* osigurava visoku vjernost transkripcije genomske DNA.

Reakcija polimerizacije napreduje dok katalitička srž ne dođe do terminacijskog signala. Terminacija transkripcije kod bakterijske DNA-ovisne RNA-polimeraze moguća je ρ-ovisnim ili ρ-neovisnim mehanizmom. Zaustavljanje transkripcije kod ρ-neovisnog mehanizma osigurava se transkripcijom regije DNA koja zbog komplementarnosti svojih sljedova omogućava nastajanje sekundarne strukture mRNA tipa ukosnice, za koji se vjeruje da pomaže disocijaciju DNA-ovisne RNA-polimeraze s DNA, zaustavljajući tako transkripciju. Proces je shematski prikazan na slici 4.



Slika 4. Shematski prikaz terminacije transkripcije ρ-neovisnim mehanizmom (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (3))

Kod ρ-ovisnog mehanizma, protein ρ koji je GTP-ovisna helikaza se u početku veže za mRNA preko *rut* slijeda na mRNA, a zatim tijekom transkripcije klizi po mRNA transkriptu uz hidrolizu GTP-a. U trenutku terminacije protein ρ se veže na DNA-ovisnu RNA-polimerazu, ukidajući hibridnu DNA-RNA zavojnicu u transkripcijskom mjehuru, zaustavljajući transkripciju. Točni detalji mehanizma se još uvijek istražuju.[3] Proces je shematski prikazan na slici 5.



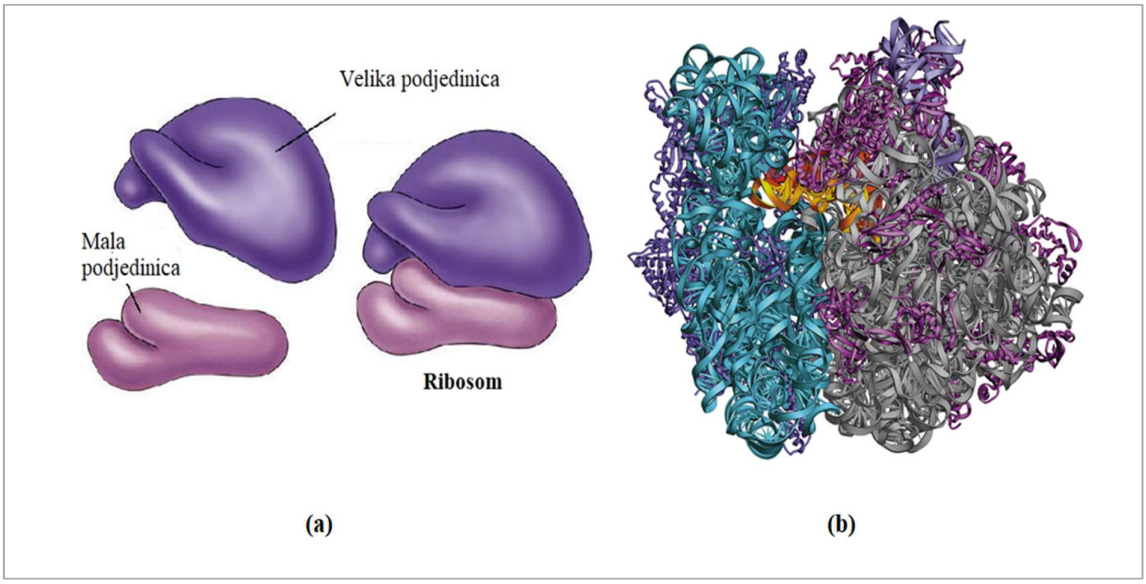
Slika 5. Shematski prikaz terminacije transkripcije ρ-ovisnim mehanizmom (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (3))

Nakon terminacije transkripcije, kod nekih se organizama mRNA prije translacije posttranskripcijski dorađuje. Posttranskripcijska dorada mRNA intenzivnija je kod eukariota, a podrazumijeva izrezivanje nekodirajućih nukleotidnih sljedova (introna), dodavanje 7-metilgvanozinske kape na 5'- kraj i poliadenilatnog repa na 3-' kraj ranog transkripta.[4]

1.2.2 Translacija

Translacija se kao i transkripcija odvija u tri koraka, a to su: inicijacija, elongacija i terminacija. U koraku inicijacije kod bakterija sastavlja se inicijacijski kompleks kojeg sačinjavaju mala i velika podjedinica ribosoma, inicijacijska tRNA, inicijacijski faktori (IF-1, IF-2 i IF-3) i mRNA. Sklapanjem podjedinica ribosoma oblikuju se tri vezna mjesta na ribosomu: mjesto u koje se veže aminoacil-tRNA (A-mjesto); mjesto u koje se smješta peptidil-tRNA (P-mjesto) i mjesto iz kojeg deacilirana tRNA napušta ribosom (E-mjesto).

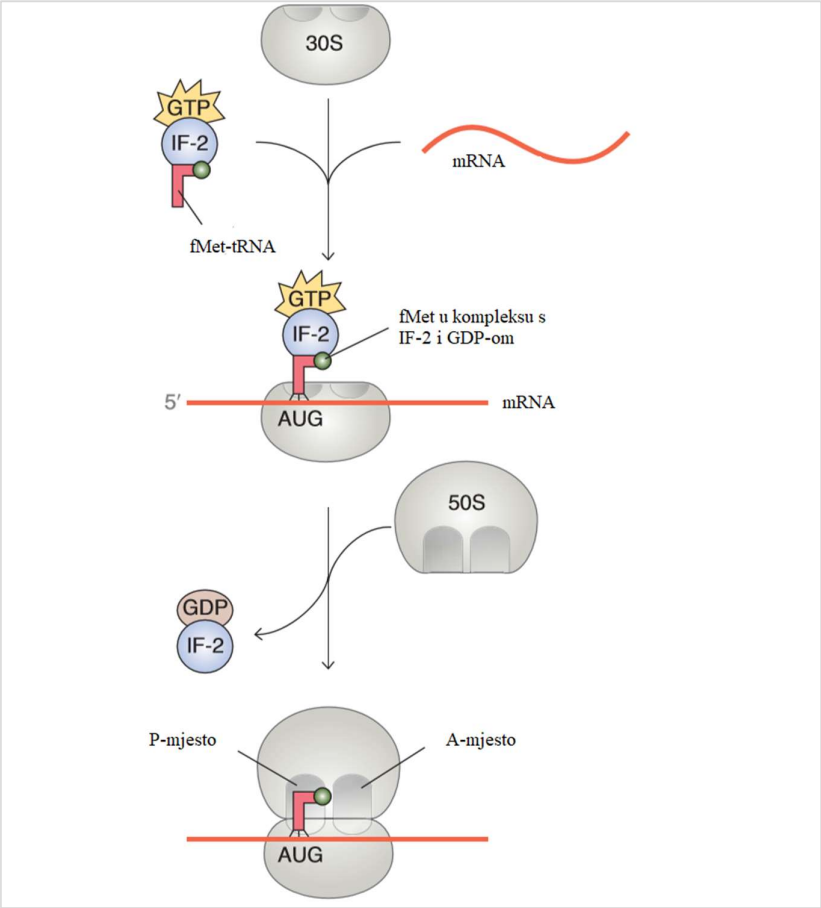
Nastale supramolekulske strukture, ribosomi (slika 6.), vrše ključni korak u biosintezi proteina, a građeni od su rRNA i proteina, organiziranih u dvije podjedinice. Zadaća je ribosoma da u svakoj stanici usklađuje interakcije mRNA i aminoacil-tRNA i na taj način potiče stvaranje peptidne veze.[5] Bakterijski ribosom je supramolekulski kompleks građen od velike podjedinice (50S) te male podjedinice (30S). U ribosomu rRNA zauzima ugrubo dvije trećine mase. Mala podjedinica bakterijskog ribosoma sadrži jednu rRNA duljine oko 1500 pb, tzv. 16S rRNA i oko 20 proteina. Velika podjedinica sadrži dvije kopije rRNA: 23S rRNA koja ima oko 2900 pb, 5S rRNA koja sadrži 120 pb i 30-40 proteina, ovisno o vrsti. Nešto veći eukariotski ribosomi su očekivano složeniji u svojoj strukturi, ali se ni „arhitektura“ niti *modus operandi* eukariotskog ribosoma ne razlikuje od onog prokariotskog.[6]



Slika 6. Ribosom: (a) Shematski prikaz organizacije ribosoma. (b) Struktura ribosoma bakterije *Thermus thermophilius*, PDB: 4V5D. Na slici se vide podjedinice naznačene zelenom i sivom bojom. Ljubičasti dijelovi odgovaraju proteinskim dijelovima ribosoma, zeleni i sivi odgovaraju rRNA. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (3) i Ref. (4))

Pokazano je da sastavljanje inicijacijskog kompleksa počinje stvaranjem kompleksa male podjedinice ribosoma s fMet-tRNA^{fMet}, posebnom vrstom aminoacil-tRNA koja nastaje dodavanjem formilne skupine na amino skupinu metionina u Met-tRNA^{fMet}. U koraku inicijacije, koji moderira mala podjedinica ribosoma, antikodon molekule fMet-tRNA^{fMet} pozicionira se se u P-mjesto na maloj podjedinici ribosoma tako da se ostvare Watson-Crickovi parovi s kodonom AUG asocirane mRNA, koji je također pozicioniran u P-mjestu.

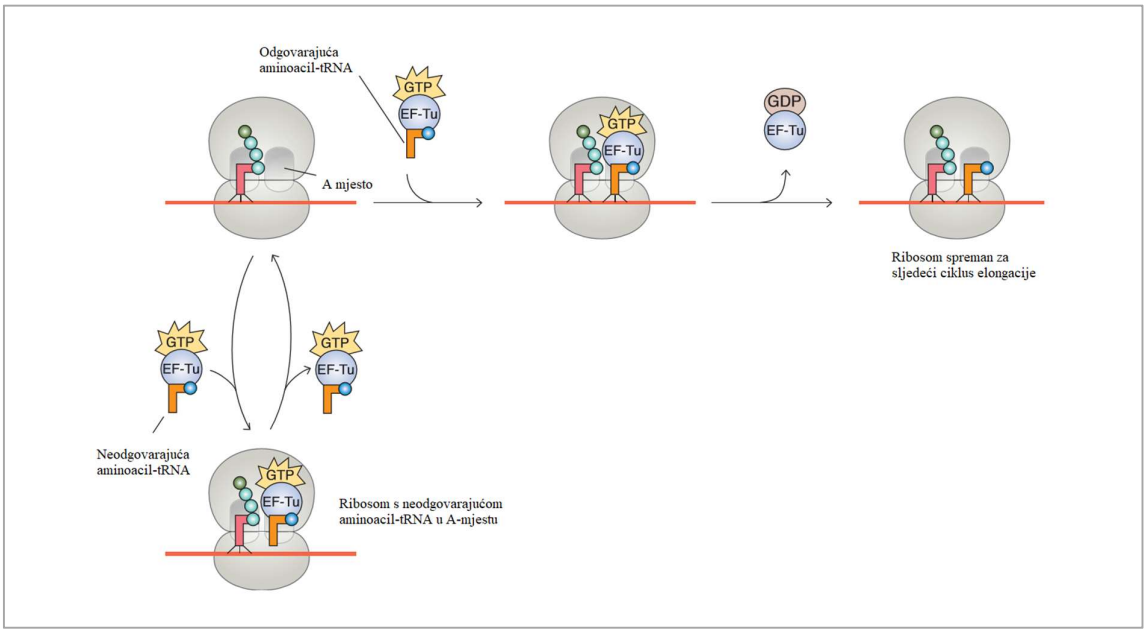
U tom procesu sudjeluje inicijacijski faktor IF-2 koji veže GTP. Na malu podjedinicu ribosoma zapravo asocira kompleks fMet-tRNA^{Met} • EF-2 • GTP te mRNA nakon čega intrinzična GTP-azna aktivnost EF-2 potiče disocijaciju EF-2 • GDP kompleksa i vezivanje velike podjedinice ribosoma na kompleks, čime završava faza inicijacije (slika 7.). Pokazano je da IF-1 i IF-3 osiguravaju zalihu slobodnih malih podjedinica ribosoma, jer IF-1 potiče disocijaciju ribosoma na podjedinice, dok se IF-3 veže na slobodne male ribosomske podjedinice stabilizirajući ih kako ne bi ponovno agregirale s velikim podjedinicama u ribosom.[7] IF-1 i IF-3 potpomažu dakle vezivanje fMet-tRNA^{fMet} na malu podjedinicu ribosoma, no nakon sklapanja ribosoma disociraju.[8] Ostaje još razjasniti kako ribosom prepoznaje odakle započeti translaciju, odnosno kako odabire ispravan okvir čitanja vezane mRNA koji je definiran odabirom startnog, AUG kodona. John Shine i Lynne Dalgarno pokazali su da postoji purinima bogat slijed u molekuli mRNA, koji se sparuje s komplementarnim pirimidinskim slijedom u 16S rRNA (30S podjedinica) i time pozicionira prvi kodon (AUG) u P-mjesto. Navedeni se slijed u mRNA, u čast znanstvenicima koji su ga otkrili, naziva Shine-Dalgarno slijed. Kako se navedeni slijed nalazi samo ispred pravilnog startnog kodona koji će osigurati odabir pravilnog okvira čitanja, ali ne i ostalih AUG kodona, ribosom jednoznačno odredi okvir čitanja.



Slika 7. Shematski prikaz sklapanja inicijacijskog kompleksa (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (3))

U fazi elongacije sudjeluju elongacijski faktori: EF-Tu, EF-Ts i EF-G. U svakom koraku elongacije EF-Tu u kompleksu s GTP-om dovodi aminoaciliranu tRNA, nastalu prethodno na odgovarajućoj aminoacil-tRNA-sintetazi, do A-mjesta ribosoma. Faktor EF-Tu ostvaruje interakcije s odgovarajućom aminoacil-tRNA i to ponajviše preko TΨC-ruke tRNA. EF-Tu se s gotovo jednakim afinitetom veže na sve molekule aminoacil-tRNA, što znači da EF-Tu ne doprinosi značajno selekciji aminoacil-tRNA za ugradnju u rastući polipeptidni lanac na ribosomu. Uloga EF-Tu je zaštita esterske veze između tRNA i aminokiseline koja je podložna hidrolizi. Selekciju aminoacil-tRNA za ugradnju u polipeptid vrši ribosom i to pomoću antikodon/kodon interakcija tRNA u aminoacil-tRNA•EF-Tu•GTP kompleksu i mRNA. Nakon vezivanja ispravnog aminoacil-tRNA•EF-Tu•GTP kompleksa u A-mjesto na ribosomu, dolazi do hidrolize GTP-a vezanog na EF-Tu, a kompleks EF-Tu•GDP disocira, pri

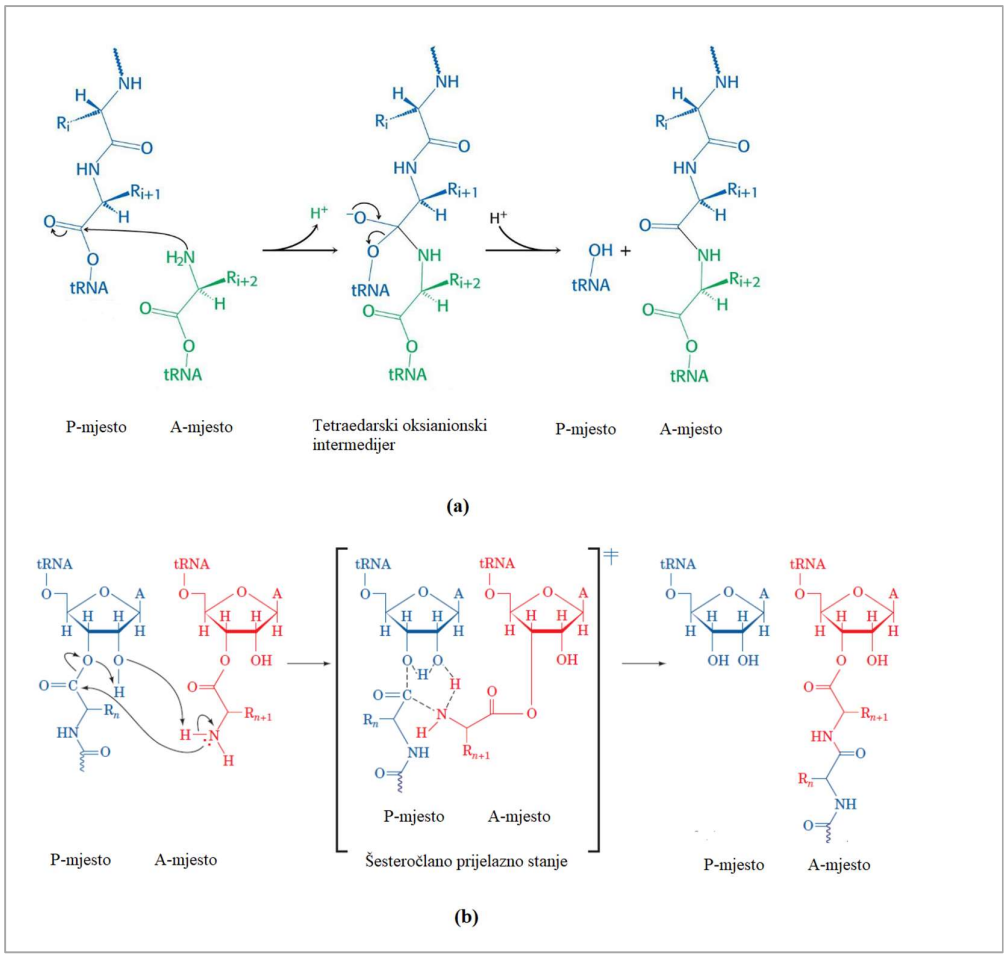
čemu odgovarajuća aminoacil-tRNA ostaje u A-mjestu ribosoma u povoljnom položaju i orijentaciji za reakciju transpeptidacije.[9] Ukoliko dođe do vezivanja krivog aminoacil-tRNA•EF-Tu•GTP kompleksa, ne dolazi do GTP-azne aktivnosti EF-Tu i cjelokupni kompleks aminoacil-tRNA•EF-Tu•GTP disocira iz veznog mjesta s ribosoma. Vezno mjesto ostaje prazno do prispjeća odgovarajućeg aminoacil-tRNA•EF-Tu•GTP kompleksa. Reakcije EF-Tu faktora shematski su prikazane na slici 8.



Slika 8. Uloga EF-Tu u elongacijskoj fazi biosinteze proteina (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (3))

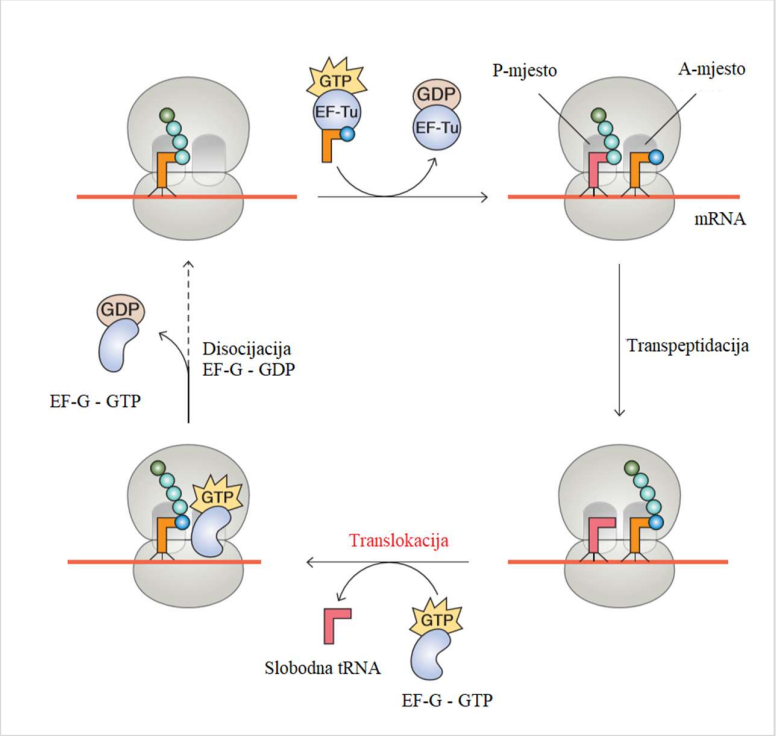
Posljedica vezivanja ispravnog aminoacil-tRNA•EF-Tu•GTP kompleksa u A-mjesto na ribosomu u fazi elongacije je da nakon disocijacije EF-Tu•GDP kompleksa u A-mjestu ribosoma preostane ispravna aminoacil-tRNA u pravilnom položaju i orijentaciji za reakciju transpeptidacije. U P-mjestu ribosoma prisutna je peptidil-tRNA sintetizirana u prethodnim ciklusima elongacije. Ribosom, koji je ribozim, u peptidil-transferaznom centru (PTC) katalizira reakciju transpeptidacije koja predstavlja prijenos polipeptida s peptidil-tRNA u P-mjestu ribosoma na aminoacil-tRNA vezanu u A-mjestu ribosoma pri čemu se polipeptidni slijed produžuje za jednu aminokiselinu na C-kraju. Mehanizam transpeptidacije pretpostavlja nukleofilni napad amino-skupine aminokiseline vezane na aminoacil-tRNA u A-mjestu ribosoma na karbonilnu skupinu peptidil-tRNA u P-mjestu ribosoma. Prvotni mehanizam pretpostavljao je nastanak oksianionskog tetraedarskog međuprodukta (slika 9. (a)), no kako nakon rentgenske strukturne analize ribosoma u peptidil-transferaznom centru (PTC) nisu

pronađene funkcionalne skupine nukleotida rRNA koje bi mogle pomoći u stabilizaciji oksianionskog prijelaznog stanja, taj je mehanizam malo vjerojatan. Danas se pretpostavlja da peptidil-transferazni centar ribosoma katalizira reakciju transpeptidacije mehanizmom katalize potpomognute supstratom (eng. *substrate assisted catalysis*) i mehanizmom dovođenja supstrata u blizinu i ispravnu orijentaciju (eng. *catalysis by proximity and orientation*). Ovakav mehanizam pretpostavlja stabilizaciju oksianona kroz nastanak šesteročlanog prijelaznog stanja (slika 9. (b)).



Slika 9. Reakcijski mehanizam za reakciju transpeptidacije koju katalizira peptidil-transferazni centar (PTC) ribosoma: (a) Prvotni reakcijski mehanizam koji je pretpostavljao nastanak tetraedarskog oksianionskog intermedijera, (b) Reakcijski mehanizam koji pretpostavlja stabilizaciju oksianiona kroz nastanak šesteročlanog prijelaznog stanja (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (3))

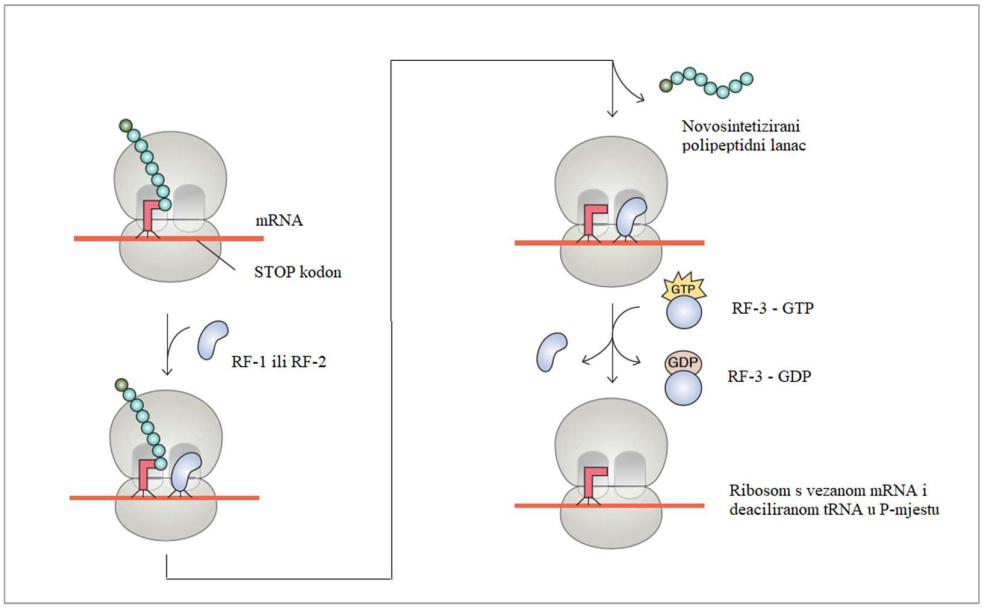
Nakon reakcije transpeptidacije ribosom se nalazi u hibridnom stanju: u P-mjestu nalazi se deacilirana tRNA, dok je u A-mjestu vezana peptidil-tRNA. Kako bi se ribosom pripremio za sljedeći ciklus elongacije, potreban je unidirekcijski pomak mRNA, tako da deacilirana tRNA dođe u E-mjesto iz kojeg može disocirati s ribosoma, peptidil-tRNA u P-mjesto te da A-mjesto postane slobodno. Ribosom se za sljedeći ciklus transpeptidacije regenerira uz pomoć elongacijskog faktora EF-G s vezanim GTP-om. Intrinzična GTP-azna aktivnost EF-G faktora inducira konformacijske promjene koje translociraju mRNA unidirektivno za tri nukleotida, mehanizmom koji se naziva *ratcheting* mehanizam. Pomak mRNA izaziva i pomak deacilirane tRNA iz P-mjesta u E-mjesto, peptidil-tRNA iz A-mjesta u P-mjesto, dok se A-mjesto oslobađa. Reakcija transpeptidacije i translokacije mRNA prikazane su na slikama 9. i 10.



Slika 10. Uloga EF-G elongacijskog faktora u biosintezi proteina (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (3))

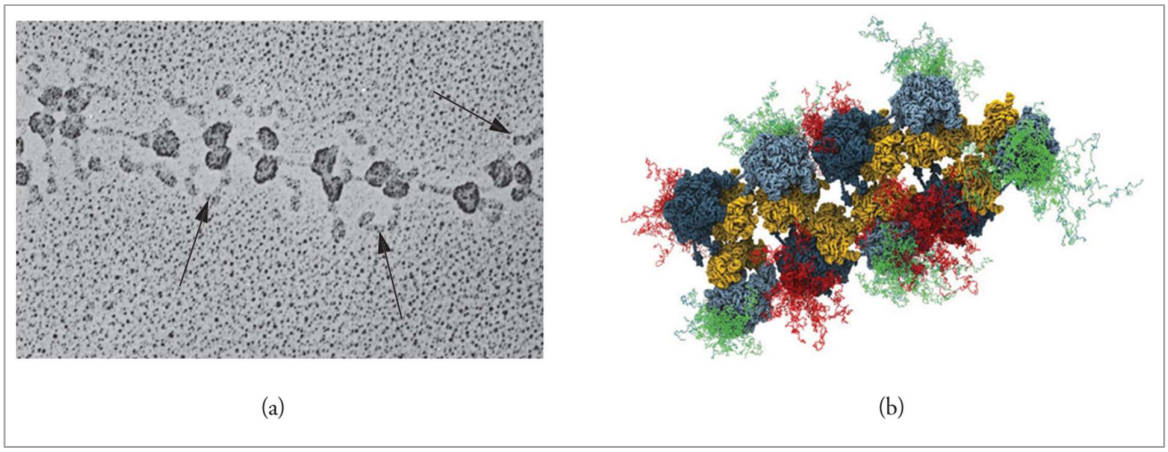
Terminaciju translacije signaliziraju STOP kodoni karakterizirani nukleotidnim sljedovima UAG, UAA ili UGA. Nakon prepoznavanja bilo koja od tri nukleotidna slijeda dolazi do vezivanja faktora otpuštanja RF-1, RF-2 i RF-3 (eng. *release factor*) u A-mjesto ribosoma zbog čega se potiče otpuštanje sintetiziranog polipeptidnog lanca zbog hidrolize peptidil-tRNA, disocijacija ribosomskih podjedinica te otpuštanje mRNA. Faktori RF-1 i RF-2

zaslužni su za prepoznavanje STOP-kodona i hidrolizu peptidil-tRNA. Za razliku od njih, RF-3 veže GTP i konformacijskim promjenama uzrokovanim GTP-aznom aktivnošću potiče disocijaciju ribosoma na podjedinice. Do intrinzične GTP-azne aktivnosti RF-3 dolazi tek nakon što RF-3 • GTP kompleks zamjeni vezani RF-1 ili RF-2 u A-mjestu ribosoma. Shema reakcija terminacije prikazana je na slici 11.



Slika 11. Uloga RF faktora u procesu biosinteze proteina (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (3))

U uvjetima *in vivo* biosinteza polipeptidnih lanaca izrazito je efikasan proces, pri čemu se postižu brzine ugradnje i do 20 aminokiselina/ s kod bakterija. Pokazano je da je razlog takve iznimne efikasnosti nastanak poliribosoma. Poliribosomi nastaju vezivanjem velikog broja ribosoma na jednu molekulu mRNA pri čemu se bisinteza polipeptidnih lanaca odvija simultano na više ribosoma. Svaki sljedeći ribosom se veže na molekulu mRNA čim prethodni ribosom oslobodi početni antikodon na mRNA. Poliribosomi su prikazani na slici 12. Treba imati na umu da je nastanak poliribosoma moguć i kod bakterija i kod eukariota, no kod eukariota ne nastaje simultano s transkripcijom za razliku od bakterija zbog prostorne odjeljenosti genetičkog koda u jezgri od mjesta sinteze proteina koje je na ribosomima u citoplazmi ili na ribosomima vezanim na grubi endoplazmatski retikulum.[3]



Slika 12. Poliribosomi prokariotske stanice: (a) Poliribosomske čestice pod elektronskim mikroskopom (b) Rekonstrukcija poliribosoma, novosintetizirani polipeptidni lanci su prikazani zelenom i crvenom bojom, ribosomi plavom i zlatnom bojom. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (10))

1.3. Aminoacil-tRNA-sintetaze

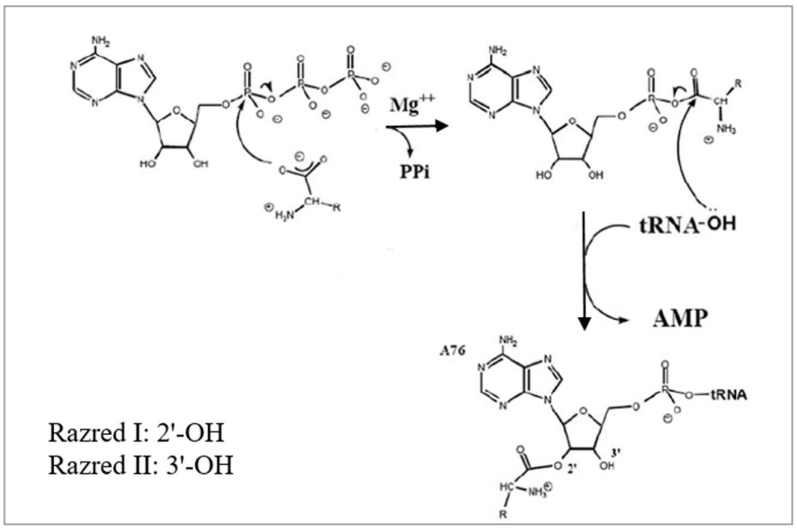
Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su enzimi koji kataliziraju nastanak kovalentno vezanog para neke od 20 proteinogenih aminokiselina i tRNA, točnije, kataliziraju nastanak esterske veze između karboksilnog ugljikovog atoma aminokiseline i 2'-OH ili 3'-OH skupine riboze terminalnog adenozina na molekuli tRNA.[1] Ti važni enzimi središnji su enzimi u procesu prijenosa genetičke informacije sadržane u slijedu nukleotida DNA u slijed aminokiselina u proteinu, budući da strogo specifično povezuju svaku od proteinogenih aminokiselina isključivo s njezinom odgovarajućom tRNA što osigurava konzistentnost genetičkog koda. Kako bi se osigurala vjernost prijepisa genetičkog koda, aaRS su razvile brojne strategije koje im omogućavaju prepoznavanje svog supstrata u staničnom okruženju, ali i ispravak pogrešaka kod misacilacija što će biti prikazano u nastavku.

1.4. Reakcija aminoaciliranja

Pretpostavlja se da sve aaRS kataliziraju reakciju aminoaciliranja u dva koraka, no dvostupanjska reakcija do sada je eksplicitno pokazana samo na primjerima izoleucil-tRNA-sintetaze (IleRS) i tirozil-tRNA-sintetaze (TyrRS): [1]

$$ATP + aa \rightarrow aa - AMP + PP_i$$
$$aa - AMP + tRNA^{aa} \rightarrow aa - tRNA^{aa} + AMP$$

Strukturno su stupnjevi aminoacilacije prikazani na slici 13.



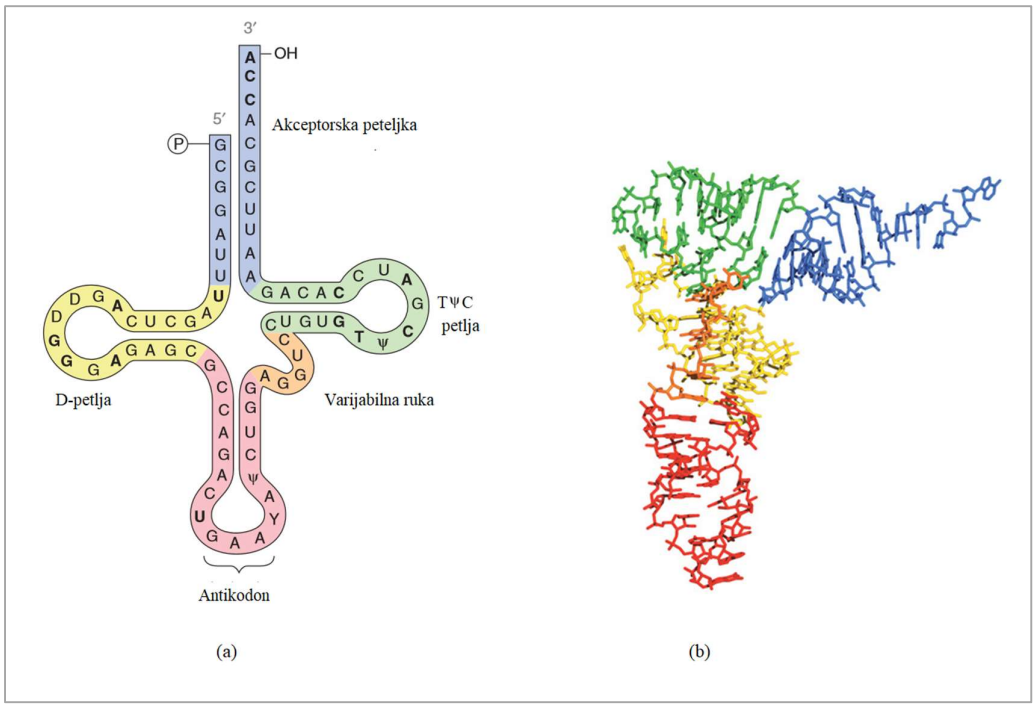
Slika 13. Prikaz katalitičkog mehanizma aminoacil-tRNA-sintetaza. Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (1))

U prvom koraku α-karboksilni kisikov atom aminokiseline nukleofilno napada α-fosforov atom Mg-ATP kompleksa, pri čemu dolazi do stvaranja miješanog anhidrida aminoacil-adenilata uz oslobađanje pirofosfata. U drugom koraku, ili 2'- ili 3'- hidroksilna skupina na 3'-terminalnom nukleotidu odgovarajuće tRNA nukleofilno napada karbonilni ugljikov atom adenilata pri čemu se u konačnici stvara aminoacil-tRNA uz oslobađanje AMP-a.[11]

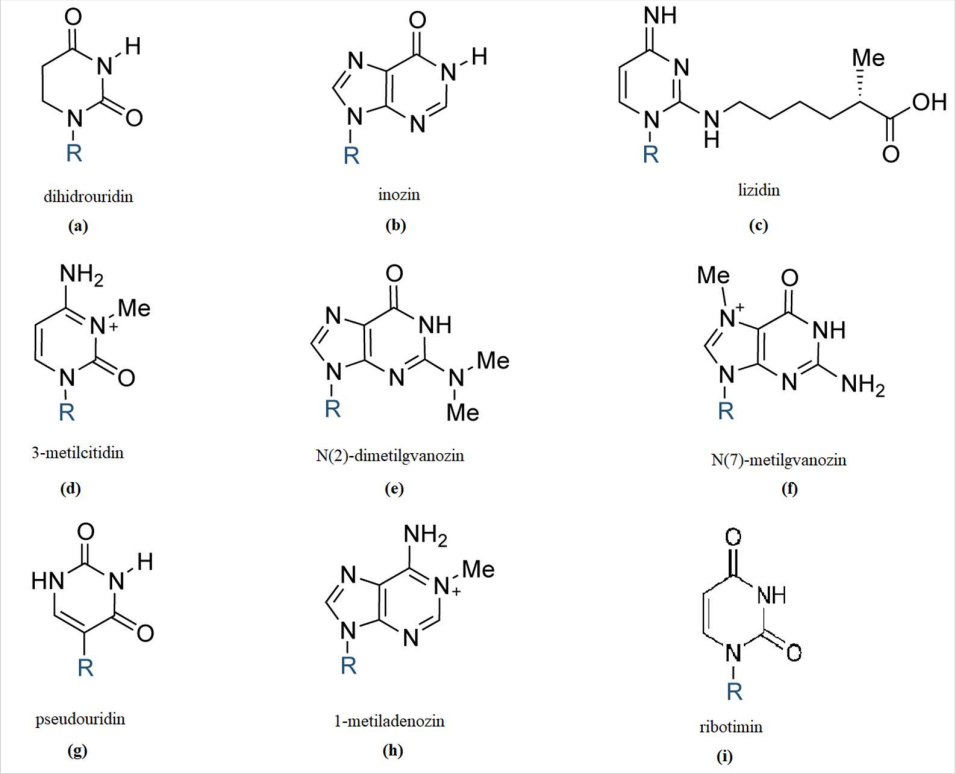
1.5. tRNA, struktura i svojstva

Prema Francisu Cricku, informacija pohranjena u nukleotidnom slijedu mRNA tijekom transkripcije ne može biti izravno dekodirana u aminokiselinski slijed nego moraju postojati posebni adapteri koji nose aktivirane aminokiseline koje će na ribosomu biti ugrađene u polipeptidni lanac. Crickova hipoteza pokazala se točnom i struktura tih adaptera za aminokiseline odgonetnuta je gotovo paralalno s postavljanjem Watson-Crickovog modela dvostruke uzvojnice DNA pedesetih godina prošlog stoljeća. U stanici je poznato 20 takvih adaptera, za koje je danas poznata struktura i koji predstavljaju molekule transportne RNA, tRNA. Transportna RNA je poliribonukleotidna molekula koja se sastoji od slijeda 76 - 90 ribonukleotida. Sekundarna struktura joj je razmjerno složena i nastaje kao posljedica Watson-Crickovog sparivanja baza tvoreći prepoznatljivu strukturu oblika djeteline (eng. *cloverleaf motif*). U strukturi se može razlikovati nekoliko karakterističnih elemenata: akceptorska peteljka, D- i TΨC- petlja, antikodonska petlja te varijabilna ruka. Akceptorska peteljka je sedam parova baza duga regija tRNA koja sadrži 5'- i 3'- kraj molekule. Na 3'- kraj akceptorske peteljke tRNA posttranskripcijski se enzimatski dodaje CCA-kraj. Na 2'- ili 3'- hidroksilnu skupinu terminalnog adenozina CCA-kraja procesom aminoacilacije na odgovarajućoj aminoacil-tRNA-sintetazi esterskom se vezom povezuje odgovarajuća aminokiselina. D-ruka se sastoji od regije duge 3 do 4 parova baza na koju se nastavlja jednostruka omča koja se sastoji od sedam nukleotida. Ime D-petlja potječe od prisustva dihidrouridina. (slika 15. (a)) Antikodonska ruka obično se sastoji od dvolančane regije duge 5 parova baza, na koje se nastavlja omča. Središnja tri nukleotida u omči, triplet nukleotida koji se komplementarno sparuje s tripletnim kodonom na molekuli mRNA naziva se antikodon. TΨC ruka se sastoji od 5 parova baza i završava omčom u kojoj se nalazi slijed nukleotida T-Ψ-C, pri čemu je T nukleotid ribotimidin (slika 15. (i)), a Ψ modificirani nukleotid pseudouridin (slika 16. (g)). Između antikodonske ruke i TΨC-ruke nalazi se varijabilna ruka, element sekundarne strukture od 3 - 21 nukleotida koji je specifičan za različite vrste tRNA. Osim triju navedenih modificiranih nukleotida, u tRNA se pojavljuje još cijeli niz modificiranih nukleotida za koje se vjeruje da imaju ulogu u stabilizaciji tercijarne strukture.[13] Neki od modificiranih nukleotida prikazani su na slici 15. (a-i). U stanici je lanac tRNA smotan u preciznu trodimenzionalnu strukturu u obliku grčkog slova Γ pri čemu jedan kraj takve strukture tvore TΨC-regija i akceptorska peteljka, a drugi kraj čine D- i antikodonska ruka.

Sekundarna i tercijarna struktura $tRNA^{Phe}$ iz kvaščeve gljivice *Saccharomyces cerevisiae*, jedne od 20 aminoacilakceptorskih tRNA prikazana je na slici 14.



Slika 14. Sekundarna i tercijarna struktura $tRNA^{Phe}$ iz kvaščeve gljivice *S. cerevisiae*, jedne od 20 aminoacilakceptorskih tRNA, PDB: 1EHZ. (a) Sekundarna struktura koja čini karakterističnu oblik djeteline, (b) Tercijarna struktura (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (3))



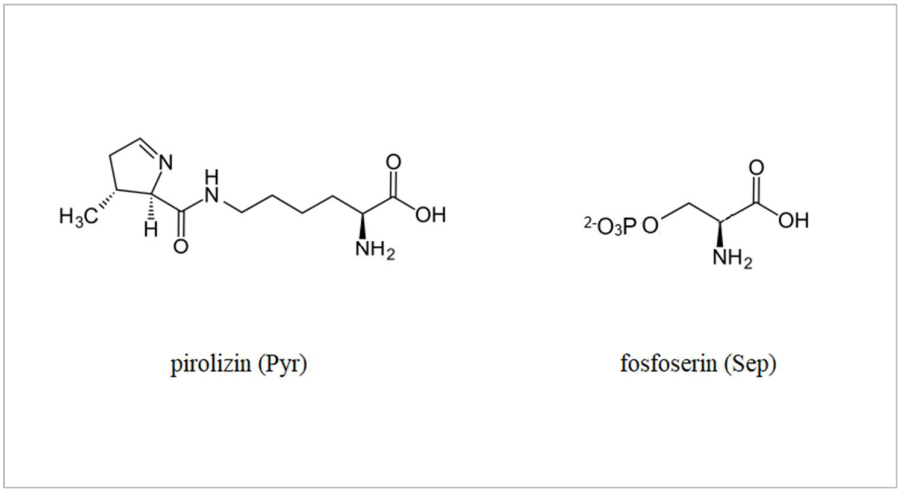
Slika 15. Neki od modificiranih nukleotida prisutni u tRNA, R = riboza (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (14))

Točno sparivanje aminokiselina i odgovarajućih molekula tRNA ključno je za odvijanje sinteze proteina i za taj proces odgovorne su sve interakciju između aaRS i molekula tRNA. Elementi tRNA koji omogućavaju njihovo raspoznavanje nazivaju se elementi identiteta tRNA. Pozitivni elementi identiteta, omogućavaju sparivanje pripadnog enzima i tRNA, a negativni elementi identiteta (diskriminirajući elementi) sprječavaju interakciju aaRS i nepripadnih molekula tRNA. Iako se elementi identiteta mogu značajno razlikovati između pojedinih molekula tRNA, često su to nukleotidi iz antikodona ili TΨC petlje tRNA.[15]

1.6. Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza (aaRS)

Za normalan rad stanice potrebno je 20 aminoacil-tRNA-sintetaza koje osiguravaju ugradnju 20 standardnih proteinogenih aminokiselina u proteine. Ipak, kod nekih organizama može postojati manji broj aaRS ili mogu postojati atipične aaRS, primjerice pirolizil-tRNA-sintetaza (PylRS) koja je pronađena samo u malom broju metanogenih bakterijskih sojeva i osigurava ugradnju nestandardne aminokiseline pirolizin vezujući je za $tRNA^{Pyr}$ neobične tercijarne strukture ili fosfoseril-tRNA-sintetaza (SepRS) koja omogućava prijenos fosfoserina na odgovarajuću $tRNA^{cys}$ nakon čega SepCysS enzim vrši konverziju Sep-$tRNA^{Cys}$ u Cys-$tRNA^{Cys}$.[1,16] Strukture tih dviju nestandardnih aminokiselina prikazane su na slici 16.

Na temelju strukturnih i funkcionalnih karakteristika aaRS se dijele u dva razreda (I i II), s 11, odnosno 13 članova u pojedinom razredu. Enzimi razreda I obično su monomeri, dok su enzimi razreda II uglavnom homodimeri, iako je potvrđeno i postojanje homotetramera α_4 (fosfoseril-tRNA-sintetaza (SepRS), fenilalanil-tRNA-sintetaza (PheRS)) ili heterotetramera $(\alpha\beta)_2$ (glicil-tRNA-sintetaza (GlyRS) i fenilalanil-tRNA-sintetaza (PheRS)). Aminoacil-tRNA-sintetaze za pojedine aminokiseline mogu postojati u više različitih formi u različitim organizmima (npr. lizil-tRNA-sintetaza (LysRS) i glicil-tRNA-sintetaza (GlyRS)). Podjela pojedinačnih aaRS prema razredima prikazana je u Tablici 1.



Slika 16. Strukture dvaju nestandardnih proteinogenih aminokiselina: pirolizina, kojeg na $tRNA^{Pyr}$ prenosi pirolizil-tRNA-sintetaza (PylRS) koja je pronađena samo u malom broju metanogenih bakterijskih sojeva i fosfoserina kojega na $tRNA^{Cys}$ prenosi fosfoseril-tRNA-sintetaza (SepRS)

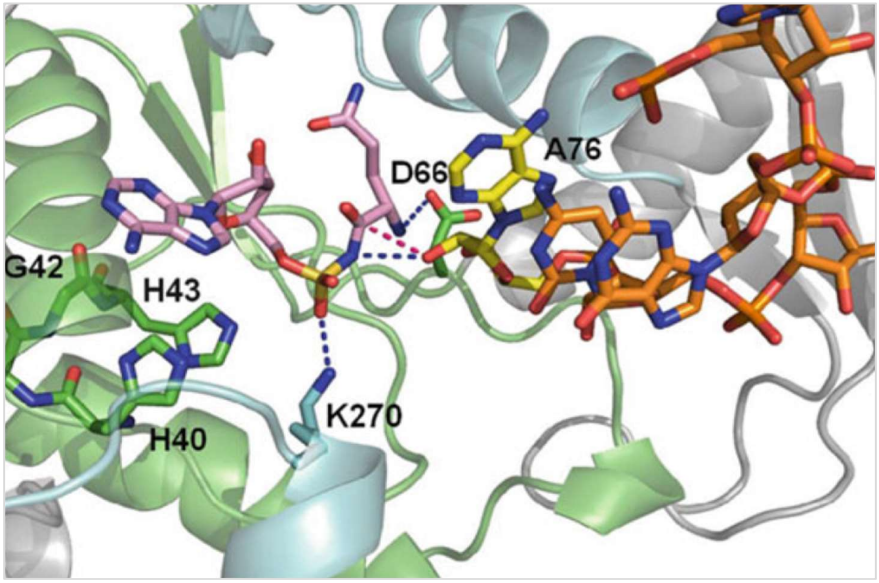
Tablica 1. Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza na razrede I i II. prema Perona i Gruic-Sovulj 2013.[1]

Razred I	Kvaterna struktura	Razred II	Kvaterna struktura
MetRS	α, α_2	SerRS	α_2
LysRS	α	ProRS	α_2
ArgRS	α_2	ThrRS	α_2
IleRS	α	GlyRS	α_2
ValRS	α	GlyRS	$(\alpha, \beta)_2$
TrpRS	α_2	HisRS	α_2
CysRS	α, α_2	AspRS	α_2
TyrRS	α	AsnRS	α_2
GluRS	α	LysRS	α_2
GlnRS	α	PylRS	α_2
		SepRS	α_4
		AlaRS	α_2, α
		PheRS	α_4, $(\alpha, \beta)_2$

1.6.1 Aminoacil-tRNA-sintetaze razreda I

Strukturne specifičnosti enzima razreda I dva su vrlo karakteristična visokoočuvana aminokiselinska slijeda koji čine motive HIGH (histidil-izoleucil-glicil-histidin) i KMSKS (lizil-metionil-seril-lizil-serin), koji sudjeluju u formiranju aktivnog mjesta enzima razreda I tako da se motiv HIGH nalazi u prvoj, a motiv KMSKS u drugoj polovici Rosmannove petlje. Navedeni visokoočuvani motivi Rossmannove petlje vrlo su važni za pravilno vezivanje ATP-a u aktivno mjesto prilikom aktivacije aminokiseline. ATP se u aktivno mjesto veže u konformaciji u kojoj riboza zauzima C-2'-*endo* konformaciju. U procesu vezivanja, okosnica (eng. *backbone*) polipeptidnog lanca u blizini visokoočuvanog glicina iz motiva HIGH omogućuje interakcije slaganja (eng. s*tacking)* s prstenom adeninske baze u ATP-u. Izoleucin povećava jakost hidrofobnih interakcija u aktivnom mjestu, dok histidini omogućavaju stvaranje vrlo jakih vodikovih veza, bilo izravno s kisikovim atomima iz fosfata iz ATP-a, bilo preko molekula vode. Osim navedenih, vodikove veze ostvaruju se i s pogodnim akceptorima na adeninskom prstenu ATP-a i njihovo bi postojanje potencijalno moglo objasniti zašto se u

aktivno mjesto aaRS veže isključivo ATP, ali ne i GTP, iako se radi o molekuli vrlo sličnog potencijala za prijenos skupina. Lizini iz motiva KMSKS stabiliziraju strukturu tvoreći ionske mostove s fosfatima iz ATP-a. Promatrano s aspekta prepoznavanja aminokiseline: dosadašnja strukturna istraživanja na aminoacil-tRNA-sintetazama razreda I, kojima su određene strukture s nehidrolizabilnim analozima ATP-a i analozima aminokiselina daju naslutiti kako je vezno mjesto za aminokiselinu formirano prije vezivanja aminokiseline. Jedina aaRS na kojoj je eksplicitno pokazano inducirano pristajanje aminokiseline je metionil-tRNA-sintetaza (MetRS). U veznom mjestu za aminokiseline nalaze se očuvani aspartatni ili glutamatni bočni ogranci koji ostvaruju ionske interakcije s α-amino skupinom aminokiseline. Za većinu aaRS razreda I koje nemaju sposobnost popravaka pogreške specifičnost prema aminokiselini određuju te ionske interakcije te vodikove veze ili elektrostatske interakcije s bočnim ograncima aminokiselina. Na Slici 17. prikazane su interakcije bočnih ogranaka aminokiselina iz motiva HIGH i KMSKS sa supstratima glutaminil-tRNA-sintetaze (GlnRS) iz bakterije *E. coli* (aaRS razreda I) na koju su vezane $tRNA^{Gln}$ i nehidrolizabilni analog glutaminil-adenilata, [*N*-(L-glutaminil)sulfamoil]adenozin.

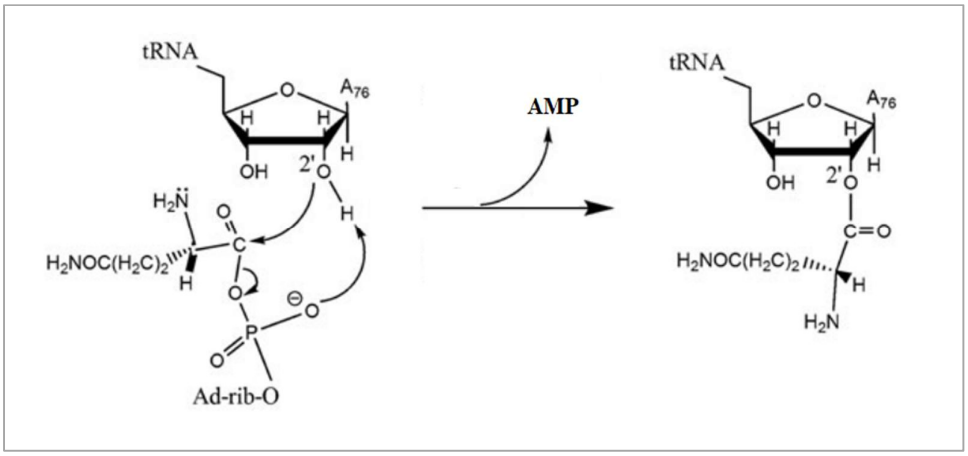


Slika 17. Struktura veznog mjesta GlnRS iz bakterije *E. coli* koja je u kompleksu s $tRNA^{Gln}$ i nehidrolizabilnim analogom gvanidil-adenilata, [*N*-(L-glutaminil)sulfamoil]adenozinom (QSI)[18], PDB: 1QTQ. U QSI fosfor iz monofosfata zamijenjen je sumporom, a premosni kisik s aminom (QSI prikazan rozo). Prikazane su interakcije bočnih ogranaka aminokiselina iz motiva HIGH (H40; H43) i KMSKS (K270) sa supstratima. Vodikove veze prikazane su plavim isprekidanim crticama. Crvena isprekidana crtica prikazuje najvjerojatniji smjer nukleofilnog napada na karbonilni ugljikovov atom miješanog anhidrida Gln-AMP 2′-hidroksilnom skupinom riboze terminalnog adenozina na CCA-kraju $tRNA^{Gln}$ kao nukleofilom (Preuzeto iz Ref. (1))

Reakcijski mehanizam za reakciju aminoacilacije koju kataliziraju aaRS razreda I temeljito je istraživan metodama strukturne analize, kinetičkim metodama i mutacijskom analizom. Pokazano je da prvi korak rekacije aminoacilacije - nastajanje aminoacil-adenilata u koraku aktivacije aminokiseline nije moguće opisati ni kao kiselinsko-bazni niti kao kovalentni tip katalize. Naprotiv, utvrđeno je da je kinetički efekt posljedica dovođenja obaju supstrata (aminokiseline i ATP-a) u prostornu blizinu i pravilnu orijentaciju, što je osigurano geometrijom aktivnog mjesta. Ipak, proteinska komponentna enzima koja formira vezno mjesto nije jedina odgovorna za kinetički efekt. Pokazano je također da ion magnezija, sastavni dio aktivnog mjesta enzima razreda I ima ogroman utjecaj na katalitičku aktivnost. Ion magnezija ostvaruje interakcije s β- i γ- fosfatom ATP-a. Kroz takve interakcije, osigurano je da konformacijske promjene polipeptidnih lanaca enzima budu spregnute s konformacijskim promjenama supstrata čime se potiče prijelaz supstrata u prijelazno stanje, što doprinosi katalitičkom efektu.

Mehanizam drugog koraka reakcije aminoacilacije koju kataliziraju aaRS razreda I prvi put je pretpostavljen za glutaminil-tRNA-sintetazu (GlnRS). Mehanizam pretpostavlja otcjepljivanje protona s 2'-OH skupine terminalnog adenozina CCA-kraja tRNA uz pomoć fosfata iz aminoacil-adenilata, pri čemu dolazi do nastanka šesteročlanog prijelaznog stanja (vidi sliku 18.). Kolapsom prijelaznog stanja dobiva se aminoacilirana tRNA i oslobađa se AMP. Esterska veza u aminoaciliranoj tRNA ostvarena je između 2'-hidroksilne skupine riboze terminalnog adenozina CCA-kraja tRNA i karbonilne skupine aninokiseline.[17] Iako pretpostavljen samo za GlnRS, pretpostavlja se da je navedeni mehanizam zajednički za sve aaRS razreda I, na što upućuje činjenica da u aktivnom mjestu enzima razreda I ne postoje bočni ogranci aminokiselina povoljno orijentirani i u dovoljnoj blizini supstrata da bi mogli sudjelovati u kiselinsko-baznoj katalizi. Navedeni mehanizam također je u skladu s temeljnim pretpostavkama evolucije ovih enzima prema kojima su se aaRS razvile iz ribozimskih sustava kod kojih su osnovni tipovi katalize kataliza potpomognuta supstratom (eng. *substrate assisted catalysis*) i kataliza dovođenjem supstrata u blizinu i ispravnu orijentaciju (eng. *catalysis by proximity and orientation*).

Iako dijele zajednički katalitički mehanizam, među pojedinim aaRS iz razreda I postoje određene strukturne i funkcionalne razlike zbog čega se načinila nešto finija podjela aaRS razreda I na podrazrede IA, IB, IC, ID, i IE.[1]

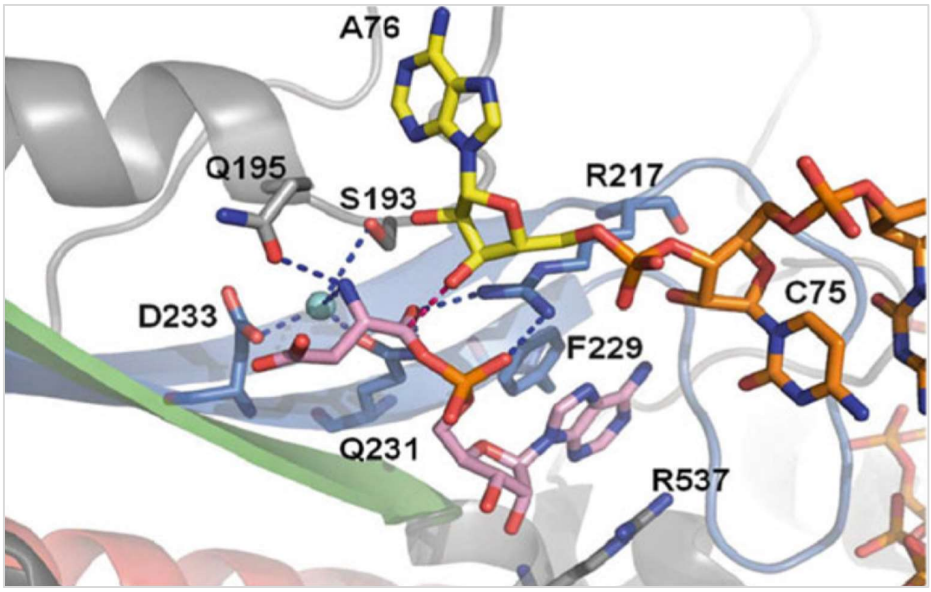


Slika 18. Pretpostavljeni reakcijski mehanizam nastanka glutaminil-tRNA^{Gln} kataliziranog glutaminil-tRNA-sintetazom (GlnRS), aminoacil-tRNA-sintetazom razreda I. Reakcijski mehanizam je pretpostavljen na osnovu kristalne strukture GlnRS iz bakterije *E. coli* u kompleksu s tRNA^{Gln} i ATP-om. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (1))

1.6.2 Aminoacil-tRNA-sintetaze razreda II

Za razred II aaRS, specifični su očuvani aminokiselinski sljedovi koji čine motive 1, 2 i 3. Za aktivno mjesto ovog razreda svojstvena je anti-paralelna β ploča sa sedam nabora koju podupiru tri α zavojnice koje zajedno čine tri navedena motiva neprisutna kod aaRS razreda I. Motiv 1 koji se sastoji od aminokiselinskog slijeda +GΦXXΦXΛPΦΦ, (gdje su: + - aminokiselina s pozitivno nabijenim bočnim ogrankom, Φ - aminokiselina s hidrofobnim bočnim ogrankom, Λ - sterički nezahtjevna aminokiselina i X - općenita aminokiselina), sudjeluje u interakciji između podjedinica dimera.[1,19] Motivi 2 i 3, čiji su pripadajući aminokiselinski sljedovi redom ++ΦΦXΦΛXXFRXEXΦXXFXXΦ, odnosno ΛXΦGΦGΦGERΦΦΦΦΦ (gdje su: R - arginin, F - fenilalanin i G - glicin), dio su aktivnog mjesta aaRS razreda II.[1, 20] Visokoočuvane aminokiseline u pojedinim motivima naglašene su podvlačenjem. Motiv 3 sudjeluje u vezivanju ATP, dok motiv 2 ima ulogu u reakciji aminoaciliranja tRNA kroz koordinirano vezivanje ATP-a, aminokiseline i 3'-kraja tRNA. Strukturna istraživanja pokazala su da se ATP veže u savijenoj konformaciji u kojoj se γ-fosfat ATP-a nalazi iznad adeninskog prstena. Pozicioniranje ATP-a u aktivno mjesto ostvareno je interakcijama slaganja (eng. *stacking*) adeninskog prstena s benzenskim prstenom očuvanog fenilalanina iz motiva 2, dok je istovremeno α-fosfat ATP-a u aktivnom mjestu stabiliziran

elektrostatskim interakcijama s očuvanim argininom, isto iz motiva 2. Dodatno vezivanje fosfatne okosnice ATP-a ostvaruje se koordinacijskim vezama fosfata s dvovalentim metalnim ionima u aktivnom mjestu ovih enzima. U aktivnom mjestu većine enzima razreda II pronađena su tri dvovalentna metalna iona u usporedbi s jednim metalnim ionom kod aaRS razreda I. Jedan od metalnih iona, u aktivno mjesto vezan koordinativno preko karboksilnih skupina očuvanih bočnih ogranaka aspartata i glutamata iz polipeptidne okosnice, stabilizira istovremeno α- i β-fosfat ATP-a. Dva preostala metalna iona premošćuju β- i γ-fosfat ATP-a i njihova je uloga stabilizacija odlazećeg pirofosfata u reakciji nastanka aminoacil-adenilata. Kada govorimo o veznom mjestu za aminokiselinu, čini se da je ono kod svih enzima prvotno formirano i da ne postoji inducirano pristajanje aminokiselina. Na Slici 19. prikazane su najvažnije interakcije koje $tRNA^{Asp}$ i aspartil-adenilat ostvaruju s očuvanim strukturnim motivima aspartil-tRNA-sintetaze (AspRS) iz *Thermus thermophilus* koje ilustriraju prethodno opisane interakcije.

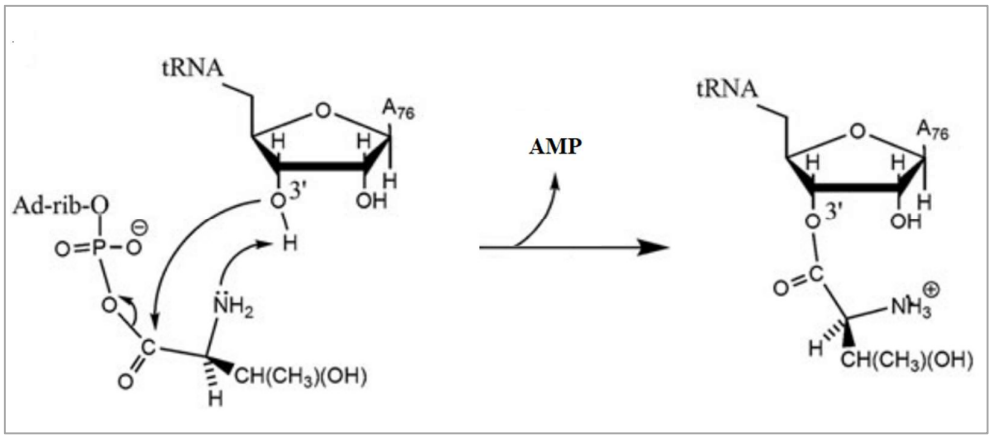


Slika 19. Kristalna struktura dijela veznog mjesta aspartil-tRNA-sintetaze (AspRS) iz bakterije *T. thermophilus* u kompleksu s $tRNA^{Asp}$ i aspartil-adenilatom, PDB: 1C0A.[21] Aspartil-adenilat je prikazan rozo, $tRNA^{Asp}$ narančasto. Vodikove veze s aspartil-adenilatom prikazane su plavim točkastim linijama. Prikazane su pozicija i interakcije invarijantnih elemenata motiva 2 (Arg217; Phe229) i motiva 3 (Arg537) karakteristične za razred II aaRS kojem pripada i AspRS. Crvena točkasta linija prikazuje modelirani smjer nukleofilnog napada 3′-hidroksilne skupine terminalnog adenozina CCA-kraja $tRNA^{Asp}$ na karbonilni ugljikov atom aspartil-adenilata. (Preuzeto iz Ref. (1))

Reakcijski mehanizam aminoacil-tRNA-sintetaza razreda II pretpostavljen na osnovu geometrije aktivnog mjesta i na osnovu iscrpne mutacijske analize očuvanih aminokiselina u već spomenutim motivima. Pokazano je da prvi korak reakcije aminoacilacije – nastanak aminoacil-adenilata odvija na donekle sličan način kao i kod aaRS razreda I. Temeljni reakcijski mehanizam je sličan, no za razliku od katalize potpomognute supstratom (eng. *substrate assisted catalysis*) i katalize dovođenjem supstrata u blizinu i ispravnu orijentaciju (eng. *catalysis by proximity and orientation*) kao kod aaRS razreda I, pokazuje se da je temeljni tip katalize kod aaRS razreda II elektrofilna kataliza. Kisikov atom karbonilne skupine nukleofilno napada α-fosforov atom ATP-a pri čemu se se oslobađa pirofosfat. Tijekom reakcije dolazi do promjene konfiguracije na α-fosforovom atomu, što sugerira reakciju bimolekulske nukleofilne supstitucije. Za stabilizaciju prijelaznog stanja u aktivnom mjestu zaslužni su očuvani arginin iz motiva 2 koji tvori ionski most s α-fosfatom i metalni ion koji koordinira α-fosfat. Očuvani arginin također ostvaruje interakcije s kisikovim atomom karbonilne skupine aminokiseline koji djeluje kao nukleofil. Razumno je pretpostaviti da stvaranje ionskog mosta s α-fosfatom povećava elektrofilnost α-fosforovog atoma tako povećavajući vjerojatnost nukleofilnog napada kisikovog atoma karbonilne skupine aminokiseline na isti.

Reakcijski mehanizam drugog koraka reakcije aminoacilacije kod aaRS razreda II analogan je mehanizmu aaRS razreda I. Male razlike ipak postoje i uključuju vezivanje ATP-a u aktivno mjesto enzima tako da riboza poprimi C3'-*endo* konformaciju. Druga je razlika da je nukleofil u koraku prijenosa aminokiseline na tRNA 3'-OH skupina terminalnog adenozina CCA-kraja tRNA, a ne 2'-OH skupina kao kod aaRS razreda I. Aminokiseline se stoga odmah vežu na 3'-OH skupinu terninalnog adenozina CCA-kraja molekule tRNA. Čini se da pretpostavljeni mehanizam poštuju sve aaRS razreda II, jedina poznata iznimka je histidinil-tRNA-sintetaza (HisRS) za koju je pretpostavljen alternativni mehanizam acilacije 3'-OH skupine CCA-kraja tRNA, budući da rezultati molekularnog modeliranja na HisRS nisu upućivali na valjanost prvotno pretpostavljenog reakcijskog mehanizma. Trenutno se čini najvjerojatnijim da HisRS katalizira prijenos aminokiseline s aminoacil-adenilata na $tRNA^{His}$ potičući prijenos protona s 3'-OH skupine terminalnog adenozina CCA-kraja $tRNA^{His}$ izravno na deprotoniranu amino-skupinu histidina. Otcjepljenjem protona 3'-OH skupina postaje jak nukleofil koji može napasti karbonilnu skupinu histidinil-adenilata. Izlaskom pirofosfata dobiva se histidinil-$tRNA^{His}$. Iako je ovakav mehanizam u skladu s teorijskim proračunima bit će potrebna daljnja istraživanja kako bi se potvrdila njegova valjanost.[1]

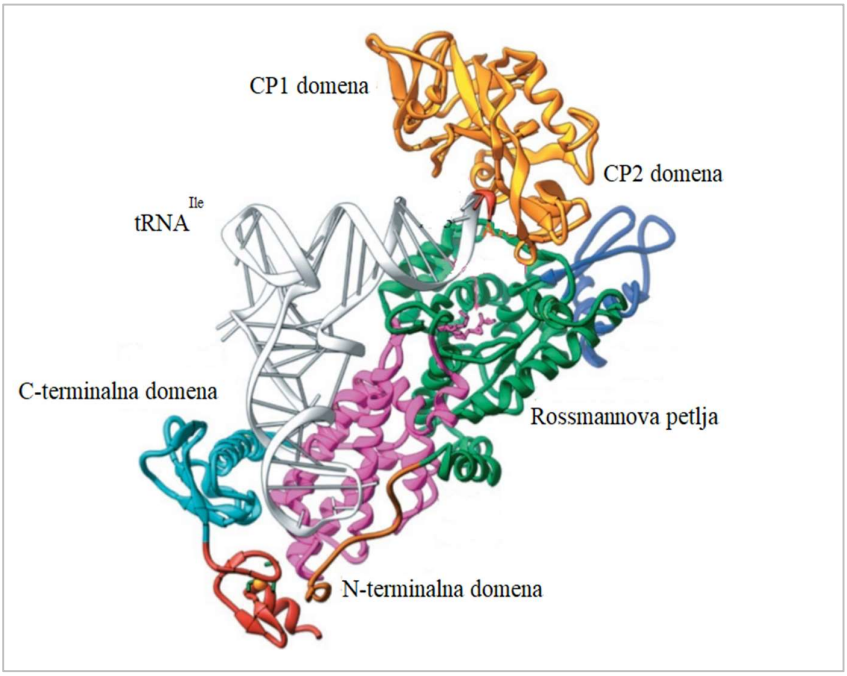
Na slici 20. prikazan je pretpostavljeni reakcijski mehanizam HisRS. [1,20]



Slika 20. Pretpostavljeni reakcijski mehanizam nastanka histidinil-tRNA^{His} kataliziranog histidinil-tRNA-sintetazom (HisRS), aminoacil-tRNA-sintetazom razreda II. Reakcijski mehanizam pretpostavljen je na osnovu rezultata molekularnog modeliranja HisRS. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (1))

1.7. Izoleucil-tRNA-sinetaza (IleRS)

Izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS) je aaRS razreda I, podrazreda IA, čiji je pripadni supstrat izoleucin. Radi se o metaloproteinskom enzimu u čiji sastav ulaze dva iona cinka. Kako je jedan od rijetkih komercijalno dostupnih antibiotika, mupirocin, kasnije obrađen u radu, snažni inhibitor ove sintetaze, potrebno je reći nešto o istoj. IleRS iz bakterije *Staphylococcus aureus* u kompleksu s tRNA^{Ile} i mupirocinom prikazana je na slici 21. Kao i većina enzima razreda I, IleRS je monomerni protein, veličine od oko 105 do 120 kDa, čije su dimenzije 100 Å x 80 Å x 45 Å.[23] Kako je već ranije rečeno, kao pripadnik razreda I aaRS, aktivno mjesto IleRS čini Rossmannova struktura u kojoj se nalaze očuvani aminokiselinski slijedovi koji čine očuvane motive HIGH i KMSKS. U modularnoj građi enzima razlikuje se nekoliko karakterističnih domena: N-terminalna katalitička domena, insercijske domene (eng. *connecting peptide*) CP-1 i CP-2 i C-terminalna tRNA-vezujuća domena. Dok se u katalitičkoj domeni nalazi aktivno mjesto enzima koje je zaslužno za aktivaciju aminokiselina i prijenos takve aktivirane aminokiseline na tRNA, CP-1 domena sadrži hidrolitičko mjesto za popravak pogreške, odgovorno za popravak misacilacije nakon prijenosa. C-terminalna domena sadrži aminokiselinske sljedove zaslužne za interakciju s antikodonskom petljom tRNA^{Ile}.



Slika 21. Struktura IleRS iz *Staphylococcus aureus* u kompleksu s mupirocinom i $tRNA^{Ile}$. Rozom je bojom označen mupirocin nalazi se u sintetskom mjestu. Rossmannova struktura označena je zeleno, CP1 domena narančasto, CP2 domena tamnoplavo, tRNA-vezna domena ljubičasto i svijetlo plavo, crvenom bojom je označeno vezno mjesto za Zn^{2+}, PDB: 1FFY (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (22))

Specifičnost IleRS za njezin supstrat izoleucin je vrlo zanimljiva, posebno ako se u ozbzir uzme iznimna sličnost izoleucina s valinom. Istraživanja pokazuju da točnosti aminoacilacije i specifičnosti IleRS prema izoleucinu spram valina doprinose dva faktora. Jedan od njih je da u katalitičkom mjestu može doći do hidrolize valil-adenilata (Val-AMP), što je karakteristično svojstvo IleRS i drugi je da IleRS posjeduje mjesto za popravak pogreške optimirano za hidrolizu misacilirane Val-$tRNA^{Ile}$, ali ne i pravilno acilirane Ile-$tRNA^{Ile}$. Valin čiji se bočni ogranak razlikuje od izoleucinskog samo po nedostatku metilenske skupine veže se u aktivno mjesto IleRS, pri tome su sve interakcije analogne onima izoleucina, osim što je hidrofobna dodirna površina koju ima valin u aktivnom mjestu nešto manja od one izoleucina. Zbog toga se izoleucin veže u aktivno mjesto s nešto većim afinitetom. Shodno tome aktivno mjesto ne može razlikovati izoleucin od valina pa razmjerno često dolazi do misacilacije $tRNA^{Ile}$ valinom. Ipak, do otpuštanja Val-RNA^{Ile} ne dolazi i razlog tomu pronađen je proučavanjem kristalne strukture IleRS. Kristalna struktura je pokazala da se aminoacilirani

3'-kraj $tRNA^{Ile}$ pozicionira i u mjesto za popravak na CP-1 domeni, udaljeno je 34 Å od prvog aktivnog mjesta.[15] Ipak, za razliku od katalitičkog mjesta, smatra se da je mjesto za popravak pogreške optimirano za smještanje Val-$tRNA^{Ile}$, ali ne i Ile-$tRNA^{Ile}$ i u tom mjestu dolazi do deacilacije misacilirane tRNA. Razlog diskriminacije izoleucina u u mjestu za popravak pogreške su steričke smetnje. Kako bočni ogranak izoleucina ne može zbog steričkih smetnji ostvariti povoljne interakcije u mjestu za popravak, mjesto za popravak ne može efikasno hidrolizirati Ile-$tRNA^{Ile}$. Hidroliza, iako je moguća, iznimno je spora, pa prije nego što može doći do hidrolize Ile-$tRNA^{Ile}$, dođe do njegove disocijacije. Suprotno tome, budući da se Val-$tRNA^{Ile}$ može produktivno smjestiti u mjesto za popravak, do njezine hidrolize dolazi. Ovakav model popravka mogao bi se poistovjetiti sa sitom: aktivno mjesto enzima ponaša se kao grubo sito, koje zbog steričkih ograničenja odbija aminokiseline većih bočnih ogranaka, a propušta pripadnu i aminokiseline manjih ogranaka (izoleucin i valin). Finije sito je mjesto je za popravak pogreške, u koje se pripadna aminokiselina ne može produktivo vezati zbog steričkih smetnji, ali zato mogu misacilirani supstrati s manjim aminokiselinama.[4]

1.8. Reakcije popravka pogreške

Na razini aminoaciliranja, zbog relativno male razlike u strukturi pojedinih aminokiselina, neke aaRS povremeno aktiviraju i nepripadne aminokiseline, što je očekivano budući da postoji cijeli niz strukturnih sličnosti i sličnosti u kemijskoj reaktivnosti pojedinih aminokiselina pa njihovo prepoznavanje može biti otežano. Problem prepoznavanja proizlazi općenito iz malog broja specifičnih interakcija koje aminokiselina može ostvariti s enzimom, na osnovu kojih je enzim mora razlikovati od drugih proteinogenih aminokiselina. Prijenos aminokiseline na neodgovarajuću tRNA unio bi pogrešku u slijed aminokiselina u proteinu, što u blažem slučaju ne bi dovelo do dramatične promjene funkcionalnosti proteina, ali akumulacija takvih pogrešaka bi u konačnici bila vrlo štetna za stanicu pa stanica takav scenarij mora spriječiti. Pokazano je da aaRS u svrhu prevencije takve nepoželjne i štetne reakcije posjeduju dodatnu enzimsku aktivnost kojom hidroliziraju nepripadni aminoacil-adenilat ili tRNA aciliranu nepripadnom aminokiselinom. U prvom slučaju radi se o popravku pogreške prije prijenosa, a u drugom o popravku pogreške poslije prijenosa aminokiseline. Popravak prije prijenosa predstavlja enzimsku hidrolizu veze između aminokiseline i AMP-a u katalitičkom mjestu odgovarajuće aaRS, pri čemu hidroliza može biti tRNA-neovisna i tRNA-ovisna hidroliza, ovisno o tome je li nužno da tijekom hidrolize na enzim bude asocirana tRNA. Osim takve enzimske hidrolize moguća je i neselektivna hidroliza acil-adenilata otpuštenog u otopinu. Ako dođe do prijenosa nepripadne aminokiseline na tRNA te nastane misacilirana tRNA, dolazi do popravka pogreške nakon prijenosa, koji podrazumijeva hidrolizu misacilirane tRNA u mjestu za popravak.[1]

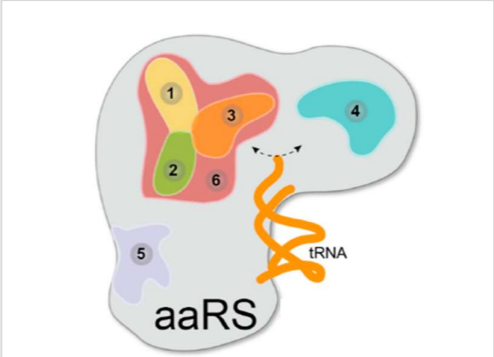
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Inhibitori aminoacil-tRNA-sintetaza

Zbog njihove vitalne važnosti u stanici, ali i činjenice da su multisupstratni enzimi, aminoacil-tRNA-sintetaze su prepoznate još dosta rano kao potencijalno vrlo važna meta za dizajn novih antibiotika. U proteklih nekoliko desetljeća napravljen je jako velik iskorak u dizajnu inhibitora gotovo svih dvadeset aaRS, no do danas je samo jedan: mupirocin, inhibitor IleRS odobren od strane *WHO* kao humani antibiotik.[24] Inhibitor HF prolil-tRNA-sintetaze (ProRS) komercijalno je dostupan za primjenu u veterini.[25] Ovisno o njihovom načinu vezivanja na enzim, inhibitore aaRS se može podijeliti u više skupina ili klasa: klasa I: *single site* inhibitore katalitičkog mjesta (eng. *Single Active Site Inhibitor*), klasa II: *dual site* inhibitore katalitičkog mjesta (eng. *Dual Active Site Inhibitor*), klasa III: *triple site* inhibitore katalitičkog mjesta (eng. *Triple Active Site Inhibitor*), klasa IV: *multisite* inhibitore (eng. *Multiple Active Site Inhibitor*), klasa inhibitora netranslacijske uloge (eng. *Non-translational Function Inhibitor*) aaRS te skupinu negrupiranih inhibitora u koju spadaju inhibitori koje se na osnovu provedenih istraživanja ne mogu smjestiti u gornje kategorije. Inhibitori aaRS mogu biti i reverzibilni i ireverzibilni. Kod do sada sintetiziranih inhibitora najčešće se radi o reverzibilnoj inhibiciji kompetitivnim inhibitorima, budući da su dizajnirani inhibitori najčešće analozi supstrata aaRS koji konkuriraju s pravim supstratima za vezivanje na slobodni enzim.[26]

Reakcija aminoacilacije je reakcija koja se odvija u dva stupnja i u prvom koraku zahtijeva aktivaciju aminokiseline ATP-om nakon koje slijedi prijenos aminokiseline na 3´-OH skupinu riboze terminalnog adenozina na CCA-kraju pripadne tRNA. Za svaki supstrat koji je potreban za uspješnu reakciju aminoaciliranja postoji optimizirano vezno mjesto na aaRS. Osim toga, kod nekih aaRS na površini mogu postojati i pomoćna vezna mjesta za vezivanje drugih proteina na aaRS (eng. *auxiliary site*). Svako od tih veznih mjesta potencijalno je korisno u dizajnu analoga originalnih supstrata koji mogu biti inhibitori za reakciju aminoaciliranja. Na slici 22. shematski su prikazana vezna mjesta aaRS koja se mogu iskoristiti u dizajnu inhibitora reakcije aminoaciliranja. *Single site* inhibitori dijele se prema mjestu na aaRS koje inhibiraju na: inhibitore koji se vežu u ATP-vezno mjesto (eng. *ATP Site Inhibitor*), inhibitore koji se vežu

u mjesto za vezivanje aminokiseline (eng. *Amino Acid Site Inhibitor*), inhibitore mjesta za popravak pogreške (eng. *Editing Site Inhibitor*) i inhibitore netranslacijske funkcije aaRS (eng. *Non-translational Function Inhibitor*).



1. ATP vezno mjesto
2. Mjesto za vezivanje aminokiseline
3. tRNA vezno mjesto
4. Mjesto za uređivanje
5. Mjesto za vezivanje drugih proteina

Slika 22. Potencijalna mjesta za inhibiciju aaRS (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (26))

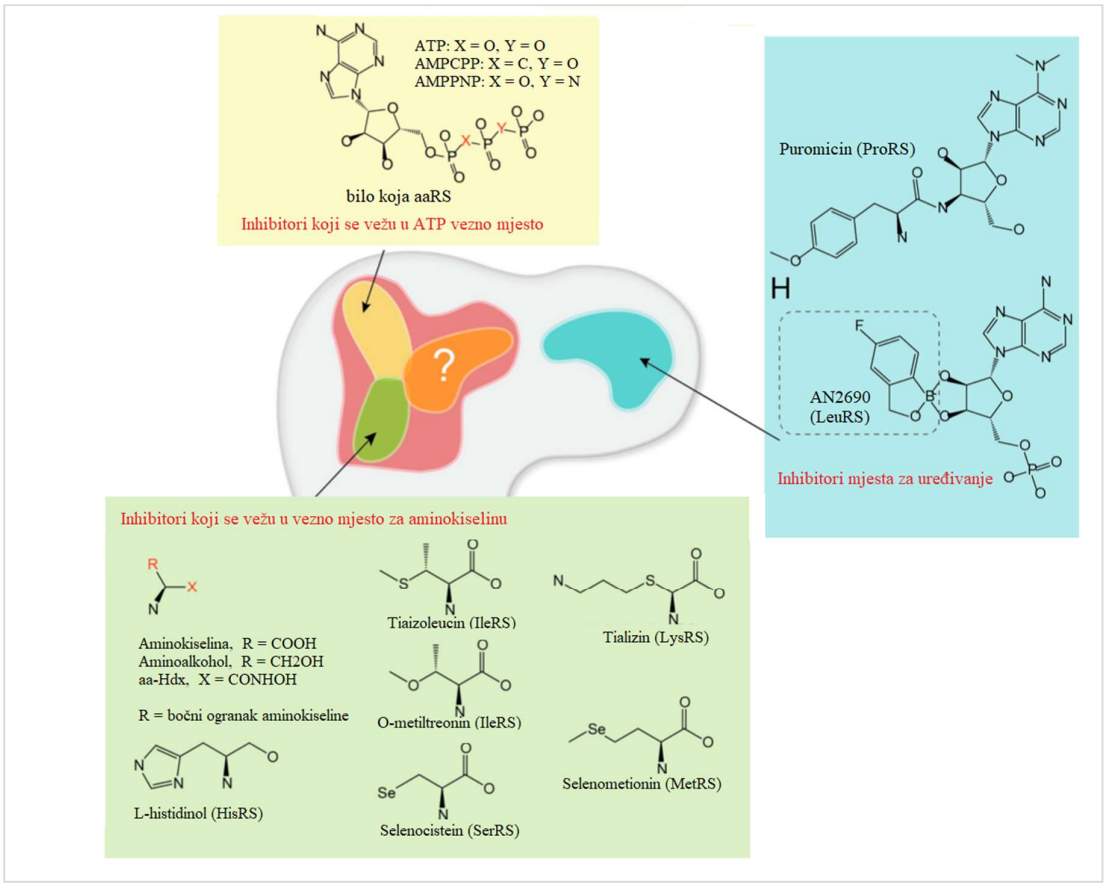
2.1.1 Klasa I: Single site inhibitori katalitičkog mjesta

U skupinu inhibitora koji se vežu u mjesto vezivanja ATP-a spadaju spojevi koji su strukturni ili funkcionalni analozi ATP-a koji u fiziološkim uvjetima nisu skloni hidrolizi. Takvi su primjerice α, β-metilenadenozin-5′-trifosfat (AMPCPP) i *β,γ*-imidoadenozin-5′-trifosfat (AMPPNP) koji se u ATP vezno mjesto vežu ostvarujući jednake interakcije kao i ATP.[26] Iako su izvrsni inhibitori aaRS, činjenica da su analozi ATP-a onemogućava bilo kakvu upotrebu *in vivo,* budući da bi bili inhibirani metabolički putevi koji koriste ATP, s obzirom na to da je ATP univerzalni metabolit u svim stanicama.

U inhibitore koji se vežu u vezno mjesto za aminokiselinu mogu se ubrojiti dvije klase analoga aminokiselina: aminoalkoholi i aminokiselinski hidroksamati. Njihovo vezivanje u aktivno mjesto aaRS najčešće spriječava prvi korak reakcije aminoacilacije, a to je nastanak aminoacil-adenilata. Ipak, mehanizam djelovanja ove vrste inhibitora može biti višestruk: mogu djelovati na razini aktivacije aminokiseline spriječavajući nastanak aminoacil-adenilata, mogu se ponašati kao nehidrolizabilni analozi aminoacil-adenilata čvrsto vezani u aktivno mjesto

aaRS ili se nestandardni aminokiselinski dio takvih analoga moše prenijeti na odgovarajuću tRNA i ugraditi u polipeptide, čineći tako polipeptid nefunkcionalnim.[28]

Mjesto za popravak pogreške također je dosta zgodno mjesto za dizajn inhibitora, ali samo za one aaRS koje posjeduju domenu za popravak aminoacilacijske pogreške, što smanjuje njihovu univerzalnu primjenu. Inhibitori koji se pojavljuju su najčešće analozi misaciliranih tRNA koji se ne mogu hidrolizirati u domeni za popravak. [29] Jedan od poznatijih antibiotika, puromicin, koji se koristi u biokemiji i staničnoj biologiji je inhibitor domene za popravak fenilalanil-tRNA-sintetaze (PheRS). Uz to je pokazano da puromicin uzrokuje preuranjeno zaustavljanje translacije na ribosomu zbog čega nastaju nefunkcionalni proteini. Puromicin je aminonukleozidni analog 3'-kraja aminoacilirane Phe-tRNA^{Phe} i ulazi kao takav u A-vezno mjesto ribosoma gdje se može ugraditi u proteine umjesto fenilalanina. Nastanak takvog purimiciliranog polipeptidnog lanca uzrokuje preuranjenu terminaciju translacije. AN2960, antifungalni lijek, također inhibitor domene za popravak pogreške, ovog puta leucil-tRNA-sintetaze (LeuRS), djeluje stvarajući AN2690•Leu-tRNA^{Leu} adukt u mjestu za poporavak pogreške LeuRS čime inhibira ugradnju leucina u proteine zaustavljajući biosintezu proteina.[30] Na slici 23. sistematizirani su spomenuti inhibitori klase I prema mjestu vezanja inhibitora.



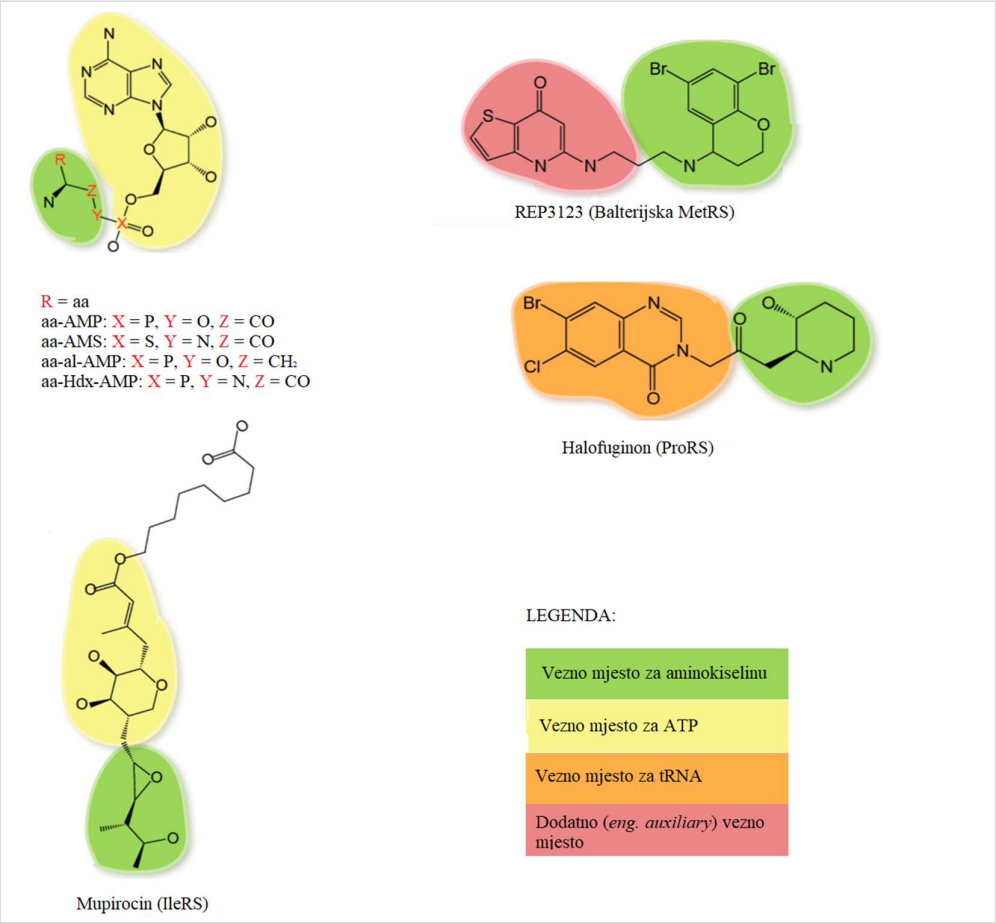
Slika 23. Reprezentativni inhibitori klase I (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (26))

2.1.2 Klasa II. Dual site inhibitori katalitičkog mjesta

Povezanost dvaju koraka aminoacilacije tRNA zahtijeva da vezna mjesta za pojedine supstrate budu u prostornoj blizini kako bi se omogućila povoljna interakcija skupina koja će rezultirati nastankom aminoacil-tRNA. Ovakva topološka ograničenja aktivnog mjesta enzima pružaju mogućnost dizajna inhibitora aaRS koji se istovremeno vežu u više od jednog veznog mjesta na aaRS. Nekoliko je strategija u dizajnu ovakvih inhibitora: inhibitori koji se vežu u aminokiselinsko i ATP-vezno mjesto (eng. *ATP-Amino Acid Dual Site Inhibitor*), inhibitori koji se vežu u aminokiselinsko i tRNA vezno mjesto (eng. *Amino Acid-tRNA Dual Site Inhibitor*) i inhibitori koji se vežu u aminokiselinsko i pomoćno vezno mjesto (eng. *Amino Acid-Auxiliary Dual Site Inhibitor*). Kao potencijalni inhibitori koji se vežu u aminokiselinsko i ATP-vezno mjesto, dizajnirani su aminoacil-sulfid-adenilati, aminoalkil-adenilati i drugi slični aminoacil-AMP derivati koji u staničnim uvjetima nisu podložni hidrolizi. Ovakvi inhibitori istovremeno se vrlo specifično vežu u vezno mjesto za aminokiselinu i vezno mjesto za ATP,

snažno inhibirajući reakciju aminoacilacije. Iako se radi o vrlo moćnim inhibitorima koji su aktivni u malim količinama u citosolu, njihova šira primjena je spriječena slabim prolaskom kroz membranu stanice u uvjetima *in vivo* zbog čega se aktivna koncentracija inhibitora teško postiže.[31] Ipak, činjenica da su vrlo selektivni, otvara mogućnost da će se u doglednoj budućnosti, ako dođe do poboljšanja metoda dostave lijekova u stanice (eng. *drug delivery*), moći koristiti kao vrlo potentni antibiotici. Iako su spomenuti sintetizirani inhibitori ove klase strukturni analozi aminoacil-adenilata, postoje i inhibitori kakav je primjerice dobro istraživani mupirocin koji je inhibitor izoleucil-tRNA-sintetaze (IleRS) pri čemu se inhibicijsko djelovanje temelji ne na strukturnoj nego na funkcionalnoj sličnosti s izoleucil-adenilatom. Mupirocin potvrđuje prethodnu hipotezu, jer iako se radi o funkcionalnom analogu Ile-AMP-a, u njegovoj strukturi nema ni adeninske jedinice niti aminokiselinske jedinice pa tako ni strukturne sličnosti s izoleucil-adenilatom, no prisutni elementi mupirocina omogućavaju da gotovo kao trojanski konj bude prepoznat i vezan u aktivno mjesto IleRS.[15]

Drugi tipovi *dual site* inhibitora klase II djeluju na sličan način kao i inhibitori koji se vežu u aminokiselinsko i ATP-vezno mjesto. Inhibitori koji bi se istovremeno vezali u ATP- i tRNA-vezno mjesto nisu poznati, što je očekivano zbog veće udaljenosti ova dva vezna mjesta.[26] Na slici 24. prikazane su strukture najreprezentativnijih inhibitora klase II.

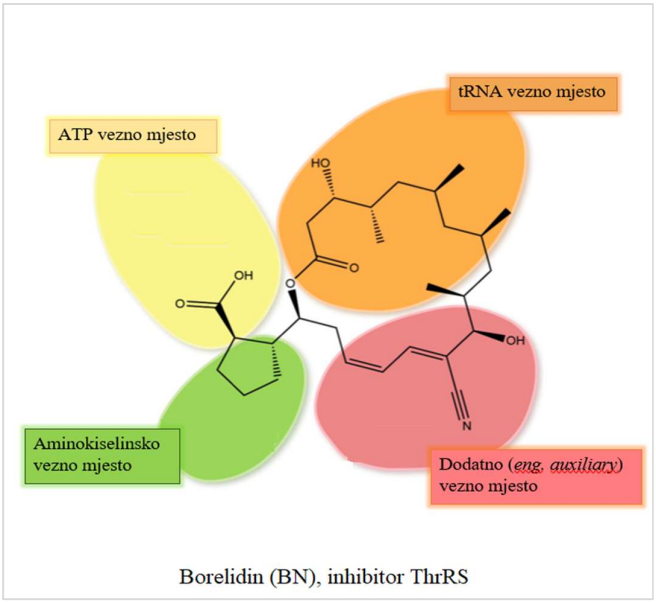


Slika 24. Strukture najreprezentativnijih inhibitora klase II. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (26))

2.1.3 Klase III i IV: Triple site i multisite inhibitori

Inhibitori koji istovremeno inhibiraju vezivanje triju supstrata vezujući se u tri vezna mjesta aaRS su jako rijetki ili nepostojeći. Dapače, inhibitor koji bi se vezao istovremeno u ATP-, aminokiselinsko i tRNA-vezno mjesto nije sintetiziran. Za takvu rijetkost postoji zapravo više logičnih objašnjenja: kao prvo, inhibitori koji se vežu u tri vezna mjesta na aaRS su razmjerno velike i složene molekule koje zbog steričke slobode imaju malu vjerojatnost povoljnog vezivanja u sva tri vezna mjesta istovremeno, kao drugi razlog može se reći da ta povećana kompleksnost nužno sa sobom donosi i složenu sintezu i često teške i neefikasne metode pročišćavanja. Treći razlog, vjerojatno i najvažniji je činjenica da su *single site* inhibitori već dovoljno potentni, a *dual site* inhibitori i u malim koncentracijama u potpunosti zaustavljaju proces aminoacilacije. Isti razlozi su primjenjivi i za objašnjavanje malog broja *multisite inhibitora.* Dosad jedini poznati *multisite inhibitor* je borelidin, antibiotik kojeg sintetiriraju

bakterije roda *Streptomyces sp.*. Radi se o izuzetno potentnom inhibitoru većine prokariotskih i eukariotskih treonil-tRNA-sintetaza (ThrRS) što može zahvaliti istovremenom vezivanju u četiri vezna mjesta za supstrate na aaRS. Radi se o makrocikličnom 18-atomnom prstenu s dodatnim peteročlanim prstenom koji istovremno ostvaruje interakciju s $tRNA^{Thr}$, aminokiselinskim, ATP- i pomoćnim (eng. *auxiliary*) veznim mjestom ThrRS. Strukturni elementi ThrRS zaslužni za ostvarivanje interakcija sa supstratima su visokoočuvani i kod prokariota i kod eukaritota, zbog čega borelidin ima malu specifičnost i širok spektar djelovanja.[32] Shematski prikaz vezivanja borelidina u pojedina vezna mjesta ThrRS prikazan je na slici 25.



Slika 25. Shematski prikaz vezivanja borelidina na ThrRS (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (26))

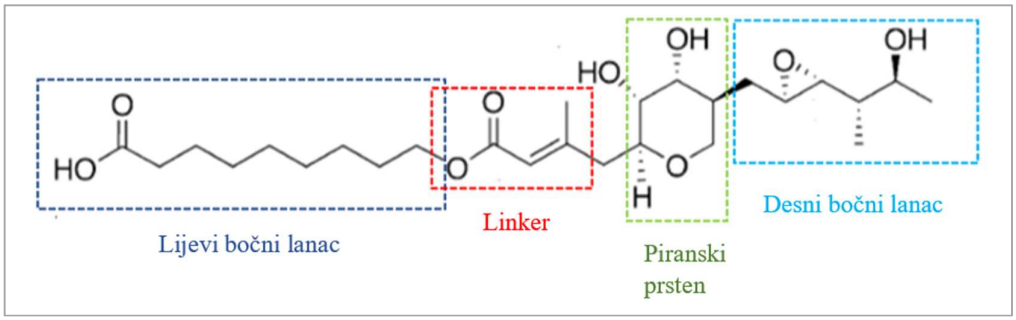
2.1.4 Inhibitori netrasnlacijske funkcije aminoacil-tRNA-sintetaza

Istraživanja na aaRS pokazuju da ovi važni enzimi u procesu biosinteze proteina sudjeluju i u brojnim imunološkim procesima kakvi su primjerice kontrola upalnih procesa, tumorogeneza i neurodegenerativne bolesti poput hipomijelacije živčanih vlakana.[27,33] Ti se procesi zajedničkim imenom nazivaju netranslacijski procesi i u njima važnu ulogu ima pomoćno (eng. *auxiliary*) vezno mjesto na aaRS. Do sad je dizajnirano nekoliko specifičnih inhibitora koji se vežu u pomoćno mjesto i tako spriječevaju stanični odgovor na upalne procese, eliminirajući simptome upale.[26]

2.2. Mupirocin

Mupirocin je antibiotik koji sintetizira bakterija *Pseudomonas fluorescens* i u kliničkim istraživanjima pokazao je značajnu antibiotsku aktivnost protiv više sojeva eubakterija i arhebakterija, posebice streptokoka i stafilokoka, ali i nekih gram-pozitivnih sojeva. Na gram-negativne bakterije ima malog utjecaja ili je njegova aktivna doza prevelika. Za mupirocin se zna već neko vrijeme, zapravo prvu izolaciju antibiotika iz *P. fluorescens* prijavili su još 1971. godine Fuller i suradnici.[34] Danas je to jedan od najvažnijih lokalno primjenjivih antibiotika za liječenje infekcija kože, komercijalno dostupan pod trgovačkim nazivom Bactroban® farmaceutske tvrtke GalaxoSmithKline.[35] U aktivnoj je primjeni za za tretmane kožnih infekcija kao što je primjerice kandida, inficiranih posjekotina i opeklina. Svoju aktivnost mupirocin zahvaljuje vrlo snažnoj inhibiciji izoleucil-tRNA-sintetaze (IleRS) bakterijskih sojeva na koje djeluje. IleRS kao što je ranije spomenuto osigurava vezivanje aminokiseline, u ovom slučaju izoleucina na odgovarajuću tRNA. Odmah je vrlo jasno da je inhibicija bakterijske sinteze proteina zbog nemogućnosti ugradnje izoleucina u proteine bakterijske stanice uzrok kliničke aktivnosti mupirocina.

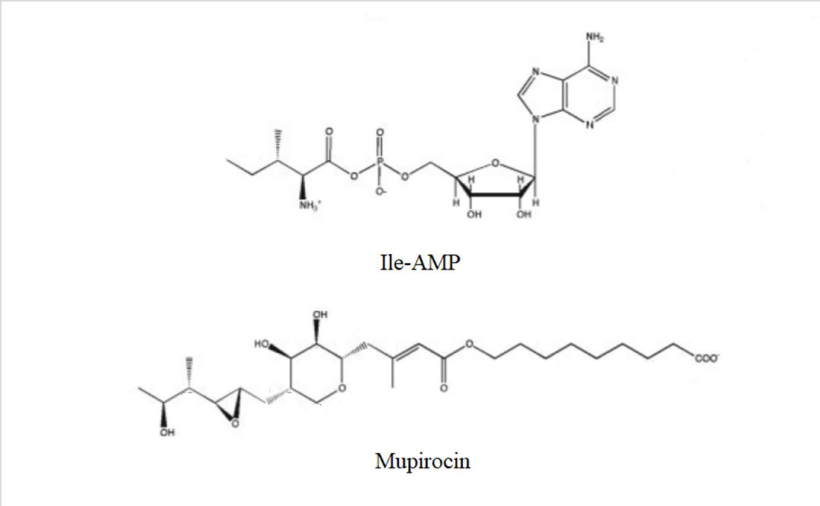
Zbog lakše sistematike, u strukturi mupirocina može se razlikovati tri regije: lijevi bočni lanac, linker regiju, piranski prsten i desni bočni lanac. Lijevi bočni lanac je preko esterske veze s linkerom vezan na piranski prsten. Linker je po svojoj strukturi α,β-nezasićeni spoj i pokazano je da dvostruka veza u linkeru ima vrlo važnu ulogu u pozicioniranju mupirocina u IleRS.[36] Piranski prsten po svojoj strukturi i veličini oponaša ribozu, a desni bočni ogranak, koji sadžava epoksidni prsten pomaže u pravilnom vezivanju mupirocina u katalitičko mjesto IleRS. Lijevi bočni ogranak u mupirocinu je načelno varijabilan i njegova supstitucija otvara mogućnost dizajna poboljšanih antibotika na bazi mupirocina. Struktura mupirocina prikazana je na slici 26. na kojoj su označeni pojedini funkcionalni dijelovi molekule.



Slika 26. Struktura mupirocina

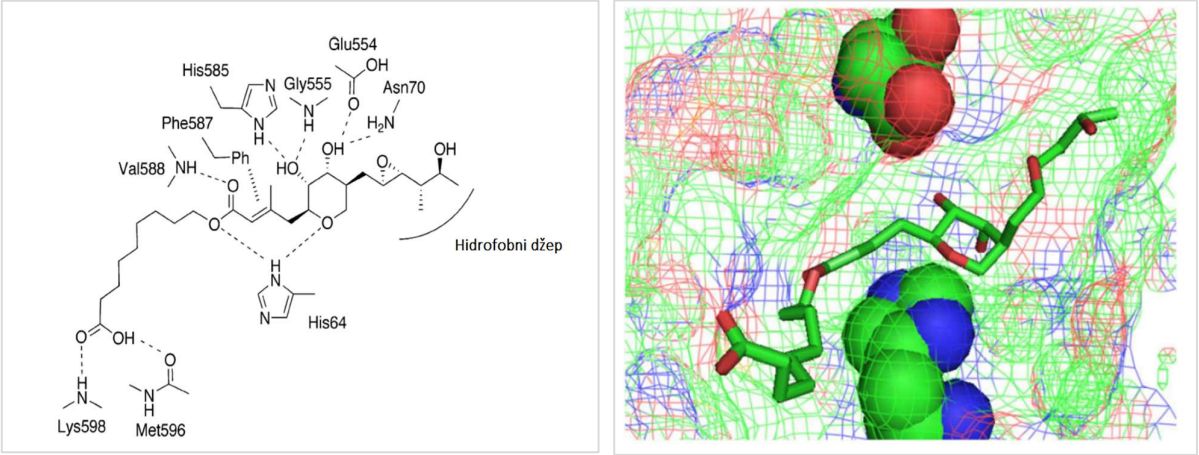
2.3. Kinetička i strukturna istraživanja na mupirocinu

Zbog svoje antibiotske potentnosti za najčešće kožno-infektivne bakterijske sojeve, mupirocin je u proteklim desetljećima dosta istraživan. Kinetička istraživanja na mupirocinu pokazala su da je mupirocin kompetitivni inhibitor izoleucin-adenilata, vezujući se u aktivno mjesto izoleucil-tRNA-sintetaze (IleRS). To je vezivanje kod bakterijske IleRS oko 10000 puta izraženije nego kod ljudskog enzima, što upravo mupirocin čini tako atraktivnim antibiotikom.[37] Manje promjene u topologiji aktivnog mjesta, ali i u sljedovima aminokiselina u očuvanim motivima HIGH i KMSKS kod eukariotske IleRS su potencijalni uzrok različite osjetljivosti na mupirocin. Pokazano je da te razlike u sljedovima aminokiselina polipeptidnih lanaca koji oblikuju katalitička mjesta IleRS tri nadcarstva nisu ogromne, što sugerira da vezivanje mupirocina osjeća vrlo blage razlike u strukturi veznih mjesta u tri homologa.[38] Iako se unatoč značajnoj razlici u strukturi Ile-AMP i mupirocina (što je ilustrirano na slici 27.), dugo smatralo da mupirocin nije analog Ile-AMP, tek je prije par godina pokazano suprotno. Rentgenska strukturna anliza mupirocina vezanog na IleRS bakterije *T. thermophilus* pokazala je da epoksidni prsten desnog bočnog lanca mupirocina ostvaruje interakcije s bočnim ogrankom histidina His64 koji kod bakterijske IleRS stabilizira fosfatni anion Ile-AMP međuprodukta. Lijevi bočni lanac mupirocina prvenstveno djeluje kao analog adeninske baze ATP-a. Piranski prsten mupirocina djeluje kao analog riboze, dok desni bočni ogranak s atomima C13 i C14 djeluje kao analog izoleucina. Mupirocin djeluje dakle kao analog izoleucil-adenilata.



Slika 27. Usporedba struktura mupirocina i Ile-AMP

Mapa elektrostatskih interakcija mupirocina s elementima HIGH motiva iz IleRS bakterije *T. thermophilius* prikazana je na slici 28. Ona oslikava pravu prirodu vezivanja mupirocina. Važne interakcije koje su zapravo zaslužne za farmakološku aktivnost mupirocina su interakcije koje ostvaruju bočni ogranak Phe587, bočni ogranak Val588 te Met596 kao i amidni dušik iz peptidne veze Lys598, budući da oni stabiliziraju mupirocin u aktivnom mjestu IleRS.[36]



Slika 28. Mapa elektrostatskih interakcija mupirocina s elementima motiva HIGH u aktivnom mjestu IleRS iz bakterije *T. thermophilius* (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (36))

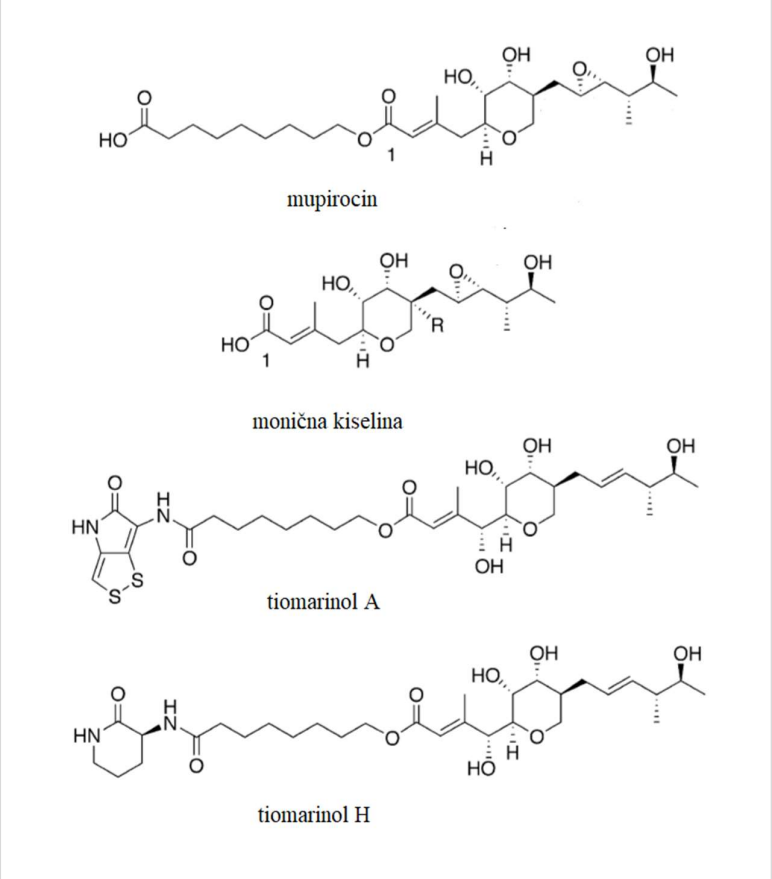
2.4. Sintetički derivati mupirocina poboljšane efikasnosti

Zbog svoje specifičnosti za bakterijsku izoleucil-tRNA-sintetazu (IleRS), ali ne i za ljudsku, mupirocin je izvrstan antibiotik i na dizajnu analoga mupirocina se aktivno radilo. Kao najveći problem mupirocina pokazala se njegova slaba apsorpcija u probavnom traktu nakon oralne primjene i njegova niska metabolička stabilnost. Pri niskim pH vrijednostima u želudcu, esterska veza linkera s lijevim bočnim ogrankom mupirocina sklona je brzoj hidrolizi prevodeći ga tako u neaktivni intermedijer, moničnu kiselinu.[39] Kao posebno zanimljivi derivati mupirocina pokazali su se tiomarinoli, skupina antibiotika izoliranih iz bakterijskog soja *Alteromonas rava*. Strukture dva najznačajnija predstavnika porodice antibiotika, tiomarinola H i tiomarinola A kao i mupirocina prikazane su na slici 29. Minorne strukturne razlike tiomarinola u odnosu na mupirocin uključuju izostanak epoksidnog prstena prisutnog u desnom bočnom lancu mupirocina, dodatnu hidroksilnu skupinu na C4 koja nije prisutna u mupirocinu

kao i postojanje amidno vezanih skupina (anhidroornitin kod tiomarinola A i holotin kod tiomarinola H) na lijevom bočnom lancu koje nisu prisutne u mupirocinu.

Tiomarinoli su se pokazali boljim antibioticima od mupirocina pokazujući širi spektar djelotvornosti, a kako su derivati mupirocina, njihovo otkrivanje potaklo je dizajn poboljšanih derivata mupirocina pri čemu je glavni cilj bio popraviti lošu oralnu primjenjivost mupirocina.

Derivati koji su dobiveni iz mupirocina su imali najčešće zamijenjenu estersku skupinu lijevog bočnog lanca sklonu hidrolizi, skupinama koje teško hidroliziraju (alilni eteri, diazolni i triazolni derivati, ketonski derivati), no takvi nisu pokazali zadovoljavajući farmakološki učinak.[36,40,41] Značajno pojednostavljeni derivati tiomarinola s jednostavnim esterima ili amidima kao skupinama pokazivali su čak i jaču inhibiciju IleRS. [36]



Slika 29. Strukturne sličnosti mupirocina i odabranih predstavnika obitelji tiomarinola (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (39))

2.5. Intrinzična otpornost bakterije *Pseudomonas fluorescens* prema mupirocinu

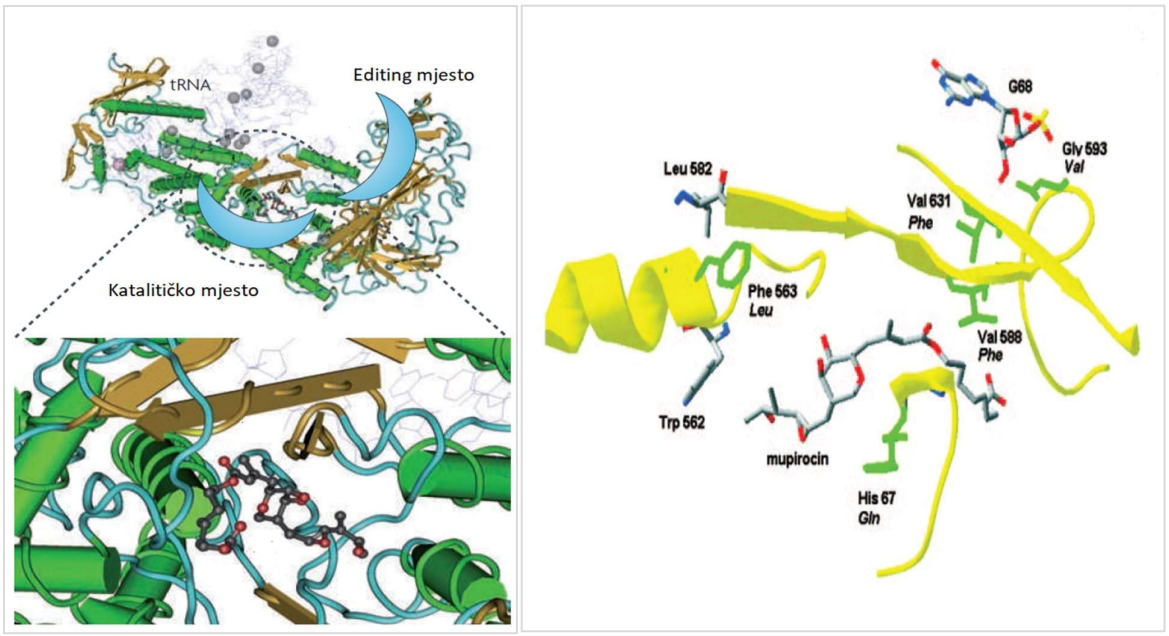
Bakterije su evolucijski razvile sposobnost sinteze antibiotika kako bi stekle prednost pred kompetirajućim bakterijskim sojevima. Ni bakterija *P. fluorescens* koja sintetizira mupirocin nije iznimka. Budući da obitava u rizoferi, u kojoj ima prirodno veliku kompeticiju, proizvodnjom mupirocina osigurava sebi veću dostupnost tvari iz hranjivog medija inhibirajući rast drugih bakterijskih sojeva, neotpornih na mupirocin. Naravno, zanimljivo je da ne inhibira sama svoju biosintezu proteina mupirocinom koji proizvodi što je, iako točan mehanizam rezistentnosti neko vrijeme nije bio poznat, zapravo potpuno razumljivo jer bi bilo biološki neracionalno sintetizirati suicidalni antibiotik. Na pitanju otpornosti *P. fluorescens* na mupirocin se radilo proteklo desetljeće i istraživanja su čini se dala odgovor na to pitanje. Kod bakterija su pronađene dvije distinktne IleRS (IleRS1 i IleRS2), različitih kinetičkih parametara i primarne strukture, kromatografskih i imunoloških svojstava, koje su kodirane dvama različitim genima (*ileS1 i ileS2*). Dvije sintetaze imaju nevjerojatno različitu otpornost prema mupirocinu, IleRS2 može neinhibirano katalizirati sintezu Ile-tRNA^{Ile} pri koncentracijama mupirocina oko sto tisuća puta većim od onih pri kojima je IleRS1 snažno inhibirana. Svoju neosjetljivost na mupirocin IleRS2 bakrerije *P. fluorescences* zahvaljuje genu *ileS2* koji je sličan eukariotskom genu koji kodira za na mupirocin neosjetljivu eukariotsku IleRS. Dapače, transformacija bakterijskih kultura *E. coli* genom *ileS2* davala je sojeve koji su visokorezistentni na mupirocin, za razliku od sojeva koji su transformirani genom *ileS1* i koji su imali umjerenu rezistenciju na mupirocin. Transformacija *E. coli* obama genima davala je sojeve koji su na mupirocin rezistentni kao i *P. fluorescens*. Tim je eksperimentom pokazano kako intrinzičnu otpornost na mupirocin *P. fluorescens* duguje upravo IleRS2 . Primanje gena *ileS2* tijekom evolucije nedvojbeno je doprinijelo otpornosti *P. fluorescens* na mupirocin, no nije u potpunosti razjašnjeno zašto *P. fluorescens* nije zadržala samo jednu, nego obije sintetaze. Odgovor vjerojatno leži u činjenici da je IleRS1 izrazito osjetljiva na nagle fluktuacije mupirocina i neinhibirana je samo do koncentracija mupirocina do 100 μg/ml. Tolike koncentracije mupirocina ne dobivaju se prilikom normalnog rasta bakterijske kolonije *in vitro*, no u stresnim uvjetima moglo bi doći do povećane sinteze mupirocina i time suicida stanice. Zbog toga se vjeruje da je *P. fluorescens* još tijekom rane evolucije asimilirala *ileS1* gen ranih eukariota i time si osigurala zaštitu od tih fluktuacija u koncentraciji mupirocina.

Preneseni eukariotski gen je asimiliran tijekom dugog evolucijskog perioda u bakterijski kromosom u oblik kakav ima danas. U uvijetima normalnog rasta katalitički je dakle aktivna IleRS1, dok se IleRS2, aktivira samo u uvjetima povećane sinteze mupirocina. Aktivnost gena *ileS2* je pod kvorum regulacijom (eng. *quorum sensing*) pri kojoj bakterija gen za IleRS2 aktivira samo onda kada poraste gustoća medija na kojem raste što signalizira prisustvo jake kompeticije na hranjivoj podlozi i zbog toga mora povećati sintezu i lučenje antibiotika.[42]

2.6. Razvijena otpornost prema mupirocinu

Eksperimenti transformacije bakterijske kulture *E. coli* genima *ileS1* i *ileS2* u procesu ispitivanja otpornosti *P. fluorescens* na mupirocin pokazali su da i bakterijske kulture koje nisu srodne *P. fluorescens* mogu razviti otpornost prema mupirocinu. Razvijena otpornost prema antibioticima nije nešto što već nije poznato u farmaceutskoj industriji, dapače razvoj multirezistentnih sojeva predstavlja veliku prijetnju za zdravstveni sustav. Razvijena rezistentnost na mupirocin kod nekih bakterijskih sojeva je istraživana.[43,44] Pokazano je da se blaga rezistencija na antibiotik može razviti kod bakterijskih kultura *S. aureus, E. coli* i *Methanothermobacter thermautotrophicus* promjenama u sljedovima aminokiselima IleRS, ukoliko točkaste mutacije zahvaćaju područje Rossmannove petlje koja je važna za vezivanje ATP-a, ali ima ulogu i u vezivanju desnog bočnog lanca mupirocina u aktivno mjesto IleRS što je vidljivo na slici 30.[31,44] Važnost aminokiselina Rossmannove petlje za postojanje rezistentnosti na mupirocin pokazana je tehnikama genetičkog inžinjerstva mutiranjem IleRS te praćenjem kompetitivnosti takvih mutanata u odnosu na divlji tip. Dodatno, korištene su i tehnike molekularnog modeliranja i to najčešće u dva koraka: prvo simuliranjem točkastih mutacija tehnikama molekularnog modeliranja prateći promjenu vezne energije mupirocina u aktivnom mjestu IleRS, a zatim i *in vitro* mjerenjem kinetičkih parametara molekularno-genetičkim metodama modificiranih enzima. Istraživanja temeljena na mjerenju kompetitivnosti bakterijske kulture *S. aureus*, bakterije koja je zbog mupA plazmida koji kodira IleRS sličnu eukariotskoj izrazito otporna na mupirocin, pokazala su ispravnost pretpostavke o važnosti točkastih mutacija u procesu stjecanja ili gubitka otpornosti na mupirocin. Eksperimentom je određen utjecaj mutacija aminokiselina Val588, Val631 te Gly593 u Rossmannovoj petlji polarnijim ili sterički zahtjevnijim aminokiselinama. Kompetitivnost mutiranih kultura *S. aureus* na podlozi impregniranoj mupirocinom izrazito se promjenila kao posljedica promjene otornosti na na mupirocin, što je bilo i očekivano uz pretpostavku da su

aminokiseline Rossmannove petlje važne za otpornost prema mupirocinu. Gornje mutacije su povećale afinitet veznog mjesta IleRS prema mupirocinu, čime je povećana njegova sposobnost inhibicije.[31] Iako se blaga otpornost na mupirocin nastala kao posljedica točkastih mutacija koje vode povećanju povećanju afiniteta prema mupirocinu u aktivnom mjestu IleRS ne smatra ozbiljnim problemom koji bi mogao dovesti do pojave visokorezistentnih sojeva bakterija (jer su takve mutacije malo vjerojatne) postoje drugi razlozi za zabrinutost. Naime, postojanje visokokonjugativnih plazmida kao što je mupA, otvara mogućnost za razvoj na mupirocin otpornih sojeva. Dapače, uočena je rastuća tendencija pojavljivanja na mupirocin i meticilin otpornih sojeva *S. aureus* koji su mupA plazmid stekli konjugacijom.[43, 45]



Slika 29. Rossmannova petlja s mupirocinom vezanim na IleRS bakterije *S. aureus*. Na lijevoj je polovici slike shematski naznačen položaj aktivnog mjesta i mjesta za popravak pogreške IleRS.[43] Na desnoj polovici slike naznačene su aminokiseline Rossmannove petlje koje su važne za ostvarivanje interakcija s mupirocinom te tako djelomično zaslužne i za otpornost *S. aureus* na mupirocin (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. (31))

2.7. Važnost istraživanja aminoacil-tRNA-sintetaza za razvoj novih lijekova

Otkriće antimikrobijalnih agensa od svojih je početaka primarno fokusirano na uklanjanje simptoma infekcija koje uzrokuju patogeni. U tom procvatu farmaceutske industrije, sintetizirani su brojni moćni antibiotici prve generacije. Nažalost, prilagodljivost bakterijskih stanica otvorila je mogućnost pojave rezistentnih sojeva bakterija koji zbog neosjetljivosti na postojeće antibiotike, ponovno predstavljaju opasnost za ljudsko zdravlje. Ta je opasnost vrlo stvarna, budući da se ne pruža mogućnost liječenja konvencionalnim antibioticima pa posljedično, liječenje zahtjeva i dizajn novih antibiotika koji ciljaju nove mete, što je problem, uzme li se u obzir vrijeme koje je potrebno da se prototipni lijek dovede na tržište. Povijesno, najčešći ciljevi antibiotika su bili sinteza bakterijske membrane ili njezina modifikacije, replikacija DNA ili sinteza RNA te sinteza proteina na ribosomu.
Za inhibiciju tih meta, razvijeno je nekoliko visokoučinkovitih klasa antibiotika kakvi su: β-laktami, glikopeptidi, aminoglikozidi, tetraciklini, makrolidi, itd.. [46]

Aminoacil-tRNA-sintetaze, nezamjenjivi enzimi u procesu bisinteze proteina prepoznate su kao potencijalno vrlo efektivno mjesto za razvoj novih generacija antibiotika tek devedesetih godina prošlog stoljeća. Razlog takvom zanemarivanju potencijalno vrlo važne mete za dizajn antibiotika je bila ograničena količina informacija o strukturi i katalitičkim parametrima aaRS. Značajan zamah u proteinskoj rentgenskoj strukturnoj analizi i NMR-metodama omogućio je da se aaRS ponovno aktivno istražuju kao efektivna meta za napredne antibiotike u budućnosti. Postojanje 20 različitih aaRS s više potencijalnih mjesta za inhibiciju, budući da se radi o višesupstratnim enzimima omogućava dizajn ogromnog broja selektivnih antibiotika, no do današnjeg dana, samo je mupirocin, inhibitor IleRS komercijaliziran i odobren od strane *WHO* kao human antibiotik. Velika prednost aaRS inhibitora je postojanje strukturne razlike aktivnog mjesta prokariotskih i eukariotskih aaRS, što omogućava razvoj visokoselektivnih antibiotika bez toksikološkog utjecaja na eukariotske stanice. Nadalje, kako su aaRS usko vezane samo uz metabolički put aktivacije i transporta aminokiselina, ukoliko se zanemari njihova uloga u upalnim procesima zbog interakcije s proteinima preko pomoćnog veznog mjesta (eng. *auxiliary*), moguće je, barem u teoriji dizajnirati vrlo specifične antibiotike koji će djelovati samo na taj metabolički put, bez ili s malim utjecajem na druge metaboličke puteve. Iako je razvoj, a posebice komercijalizacija

antibiotika koji ciljaju na aaRS, od njihovog otkrića pa sve do danas, razmjerno slab, ipak uzimajući u obzir zdravstvene prijetnje s kojima se moderna farmaceutska industrija susreće, čini se razumnim pretpostaviti da će se istraživanja na ovoj neisrpljenoj meti za inhibiciju rasta patogena sve više intenzivirati, kako vrijeme bude prolazilo. U tome će od velike pomoći definitivno biti dosadašnja saznanja o kinetičkim i strukturnim parametrima aaRS, ali na velika vrata u farmaceutsku industriju i biokemiju ulaze i računalne metode i simulacije koje su renesansu doživile razvojem brzih računala i njihovu važnost i potencijal ne može se zanemariti.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. J. J. Perona, I. Gruic-Sovulj, *Top Curr. Chem.* **334** (2014) 1 - 41.

2. RCSB Protein Data Bank (Datum pristupa: 15. 5 2017.)
http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4C2M

3. C. W. Pratt, K. Cornely, *Essential Biochemistry*, 3. izdanje, Wiley & Sons Inc., 2014

4. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija,* 6. izdanje (englesko), 1. izdanje (hrvatsko), Zagreb, Školska knjiga, 2013, 821 – 892.

5. H. Hope, F. Frolow, K. von Böhlen, I. Makowski, C. Kratky, Y. Halfon, K. Danz, P. Webster, K. S. Bartels, H. G. Wittmann, A. Yonath, *Acta Crystallogr* **B45** (1979) 190-199.

6. S. Klinge, F. Voigts-Hoffmann, M. Leibundgut, N. Ban, *Trends Biochem. Sci* **37** (2012) 189 - 198.

7. J. P. McCutcheon, R. K. Agrawal, S. M. Philips, R. A. Grassucci, *J. Mol. Biol*. **228** (1992) 366 - 368.

8. U. Maitra, E. A. Stringer, A. Chaudhuri, *Ann. Rev. Biochem*. **51** (1982) 869–900.

9. Center for Molecular Biology of RNA, University of California, 2017.
(Datum pristupa: 15. 5 2017.)
http://rna.ucsc.edu/rnacenter/ribosome_images.html

10. J. Ortiz, W. Baumeister, *Cell* **136** (2009) 261 - 271.

11. M. Ibba, D. Söll, *EMBO reports* **2** (2001) 382 - 387.

12. J. Stephen, J. Schaack, L. Cooley, D. Burke, J. Deborah, D. Soll, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol* **19** (1985) 107–144.

13. Y. Motorin, M. Helm, *Biochemistry* **49** (2010) 4934 - 4944.

14. http://www.atdbio.com/content/14/Transcription-Translation-and-Replication
(Datum pristupa: 5. 5 2017.)

15. O. Nureki, G. D. Vassylyev, M. Tateno, A. Shimada, T. Nakama, S. Fukai, M. Konno, L. T. Hendrickson, P. Schimmel, S. Yokoyama, *Science* **280** (1998) 578 – 582 .

16. A. Sauerwald, W. Zhu, A. T. Mayor, H. Roy, S. Palioura, D. Jahn, B. W. Whitman, R. Jates 3rd, M. Ibba, D. Soll, *Science* **207** (2005) 1969 - 1972.

17. G. J. Arnez, D. Moras, *Encyclopedia of Life Sciences* (ELS), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2009.

18. RCSB Protein Data Bank (Datum pristupa: 17. 5 2017.)
www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1qtq
19. S. Cusack, *Biochem.* **75** (1993) 1077 - 1081.
20. J. G. Arnez, D. Moras. 1997, *Trends Biochem. Sci.* **22** (1997) 211-216.
21. RSCB Protein Data Bank (Datum pristupa: 17. 5 2017.)
http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1c0a
22. F. L. Silvian, J. Wang, A. T. Steitz, *Science* **285** (1999) 1074-1077.
23. O. Nureki. T. Kohno, K. Sakamoto, T. Miyazawa, S. Yokoyama, *J. Biol. Chem*. **268** (1993) 15368-15373.
24. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112729/1/WHO_TRS_985_eng.pdf
(Datum pristupa: 19. 5 2017.)
25. T. L. Keller, M. S. Sundrud, M. Hendrick, M. Edenius, J. Yum, Y. Kim, H. Lee, J. F. Cortese, D. F. Wirth, J. D. Dignam, A. Rao, C. Yeo, R. Mazitschek, M. Whitman, *Nature Chem. Biol.* **8** (2012) 311 – 317.
26. P. Fang, M. Guo, *Life* **5** (2015) 1703 - 1725.
27. C. R. Warrington, D. W. Fang, U. L. Zhang, *Anticancer Res*. **16** (1996) 3641–3646.
28. V. Busiello, M. Di Girolamo, C. De Marco, *Biochim. Biophys. Acta* **561** (1979) 206 - 214.
29. R. Fukunaga, S. Yokoyama, *J. Mol. Biol.* **359** (2006) 901–912.
30. L. F. Rock, W. Mao, A. Yaremchuk, M. Tukalo, T. Crepin, H. Zhou, K. Y. Zhang, V. Hernandez, T. Akama, *Science* **316** (2007) 1759 – 1761.
31. G. J. Hurdle, J. Ingham, C. Fishwick, I. Chopra, *Animicrob. Agents Chemother* **49** (2005) 4366 - 4376.
32. P. Fang, X. Yue, S. J. Jeong, A. Mirando, K. Chen, X. Chen, S. Kim, C. S. Francklyn, M. Guo. 2015, Nature *Commun*. **6** (2015) 6402 - 6412.
33. I. N. Wolf, S. G. Salomons, J. R. Rodenburg, J. P. Pouwels, H. J. Schieving, G. T. Derks, M. J. Fock, P. Rump, D. M. van Beek, S. M. Knaap, *Ann. Neurol*. **76** (2014) 134 – 139.
34. A. T. Fuller, G. Mellows, M. Woolford, G. T. Banks, K. D. Barrow, E. B. Chain, *Nature* **234** (1971) 416.
35. R. Sutherland, R. J. Boon, K. E. Griffin, P. J. Masters, B. Slocombe, A. White, *Antimicrob. Agents Chemother*. **27** (1985) 495.

36. O. Marion, X. Gao, S. Marcus, D. G. Hall. 2009, *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **17** (2009) 1006 - 1007.

37. J. Hughes, G. J. Mellows, *Antibiot.* **31** (1978) 330.

38. M. Sasanfar, M. Kranz, J. E. Gallant, P. Schimmel, K. Shiba. 1996, *Biochem.* **35** (1996) 9995 - 10003.

39. J. Clayton, S. R. Oliver, P. N. Rogers, J. T. King, *J. Chem. Soc., Svez.* **1** (1979) 838.

40. M. J. Crimmin, P. J. O`Hanlon, N. H. Rogers, J. G. Walker, *J. Chem. Soc.* **1** (1979) 2047.

41. P. J. N. Broom, R. Cassels, Y. H. Cheng, S. J. Elder, T. C. P. Hannan, N. Masson, A. Pope, M. J. Wilson, *J. Med. Chem.* **39** (1996) 3596.

42. T. Yanagisawa, M. Kawakami, *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 25887 - 25894.

43. C. M. Thomas, J. Hothersal, C. L. Willis, T. J. Simpson, *Nature Rev. Microbiol*. **8** (2010) 1 - 9.

44. H. T. Farmer, J. Gilbart, W. S. Elson, *J. Antimicrob. Chemother*. **30** (1992) 587 - 596.

45. B. Sareyyupoglu, M. Ozyurt, T. M. Hanzedaroglu, N. Ardic, *Folia Microbiol*. **53** (2008) 363 - 367.

46. U. O. Ochsner, X. Sun, J. T. Jarvis, I. Critchley, N. Janjic, *Expert Opin. Investig. Drugs* **16** (2007), 573 - 593.

47. J. Hughes, G. Mellows. 1980, *J. Biochem*. **191** (1980) 209 - 219.

48. RCSB Protein Data Bank (Datum pristupa: 16. 5 2017.) http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1L9Z