

# Struktura i uloga lasso peptida

---

Ožegović, Antonija

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:791329>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-20**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Antonija Ožegović

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **STRUKTURA I ULOGA LASSO PEPTIDA**

## **Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Neposredni voditelj rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Zagreb, 2017. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

22. kolovoz 2017.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

22. rujan 2017.

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Potpis:



## Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VI
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. STRUKTURA I KLASIFIKACIJA LASSO PEPTIDA .....	2
2.1. Struktura lasso peptida .....	2
2.2. Klasifikacija lasso peptida.....	3
§ 3. OTKRIĆE I BIOLOŠKA AKTIVNOST.....	7
3.1. Otkriće lasso peptida .....	7
3.2. Biološka aktivnost .....	8
§ 4. BIOSINTEZA LASSO PEPTIDA.....	11
§ 5. MODIFIKACIJE I PRIMJENA LASSO PEPTIDA.....	14
§ 6. PRIMJERI LASSO PEPTIDA .....	17
6.1. Mikrocini-obrana enterobakterija .....	17
6.2. Mikrocin J25 (MccJ25).....	18
6.3. Acinetodin i Klebsidin .....	26
§ 7. ZAKLJUČAK .....	32
§ 8. LITERATURNI IZVORI.....	XXXIII

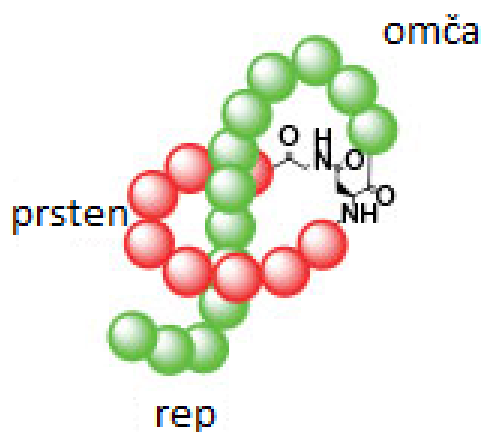


## § Sažetak

Lasso peptidi pripadaju novoj skupini prirodnih produkata koji se odlikuju visokom kompaktnošću i stabilnom strukturom. Posjeduju razne biološke aktivnosti od koji je najbitnija antibakterijska aktivnost. Raznim metodama analize peptida omogućeno je otkrivanje novih vrsta lasso peptida kao i razjašnjavanje njihove biosinteze i uvođenje raznih modifikacija čime dobivaju nova svojstva. Otkrivanjem strukture lasso peptida dobiva se uvid u mehanizam njihova djelovanja i otkrivaju brojne aktivnosti koje posjeduju. Prsten daje kompaktnu, stabilnu strukturu, a petlja se smatra regijom koja se može modificirati. Rep služi za iznošenje peptida van stanice, ali i za zaštitu. Većina otkrivenih lasso peptida nisu patogeni te imaju potencijala za primjenu u medicinske svrhe. U daljnjem tekstu bit će prikazana biosinteza, struktura lasso peptida, njihova aktivnost kao i primjeri nekih poznatijih lasso peptida te primjena i njihove modifikacije.

## § 1. UVOD

Lasso peptidi pripadaju novoj skupini bioloških molekula koja se odlikuje iznimnom stabilnošću i jedinstvenom strukturom. Posjeduju niz različitih bioloških aktivnosti poput antimikrobne djelotvornosti, inhibicije enzimskih aktivnosti ili mogu biti antagonisti različitih receptora. Lasso peptidi pripadaju skupini ribosomski sintetiziranih i posttranslacijski modificiranih bioloških produkata. Posebnost njihovoj strukturi daje prsten nastao povezivanjem N-terminalnog kraja peptida s bočnim ogrankom aspartata ili glutamata kroz koji prolazi C-terminalni dio peptida i tako stvara „omču“ i „rep“ (Slika 1).<sup>1</sup> Upravo je zbog takve strukture velika većina lasso peptida otporna na degradaciju različitim proteazama i stabilna u mnogim ekstremnim biološkim uvjetima. Njihovoj stabilnosti također doprinosi sterički utjecaj velikih bočnih ogranaka aminokiselina koje se nalaze iznad i ispod ravnine prstena i tako održavaju „zapetljanu“ strukturu. Zbog svih ovih karakteristika lasso peptidi imaju različite biološke aktivnosti, a poznavanje njihove biosinteze, strukture i bioaktivnosti može biti od velikog značaja.



Slika 1 Općenita struktura lasso peptida. Adaptirano prema [http://www.publish.csiro.au/temp/CH16499\\_F1.jpg](http://www.publish.csiro.au/temp/CH16499_F1.jpg)

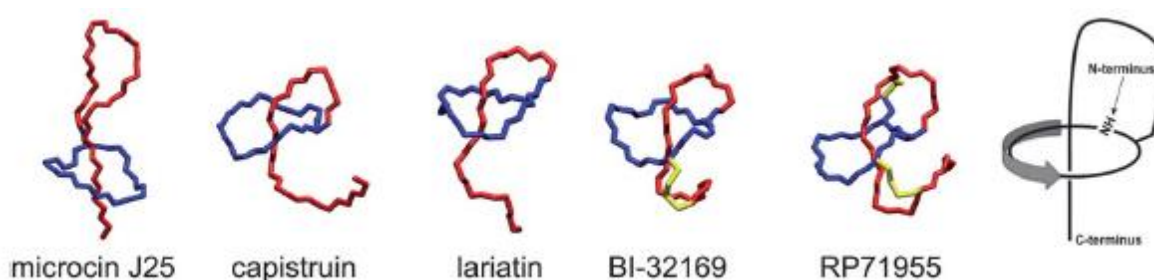


## § 2. STRUKTURA I KLASIFIKACIJA LASSO PEPTIDA

### 2.1. Struktura lasso peptida

Strukturu svih lasso peptida, koji se sastoji od 15-24 različitih aminokiselina, karakterizira „prsten“ sačinjen od 8 ili 9 aminokiselina, C-terminalni „rep“ koji prolazi kroz prsten te „petlja“ između prstena i repa (slika 1).

Prsten je formiran povezivanjem N-terminalnog kraja s bočnim ograncima aspartata ili glutamata. U svim poznatim lasso peptidima N-terminalna aminokiselina je glicin ili cistein dok aminokiselina koja zatvara prsten nužno mora biti aspartat ili glutamat. C-terminalni rep ostaje „zarobljen“ unutar prstena zbog disulfidnih veza koje povezuju petlju ili prsten, ali i zbog steričkih smetnji velikih bočnih ograna nekih aminokiselina koje se mogu nalaziti iznad ili ispod prstena. Zanimljivo je kako unatoč ovim nužnim aminokiselinama, koje su potrebne za stvaranje karakteristične strukture, veličina i sadržaj ostalih aminokiselina kao i topologija može zapravo varirati. Također, svi poznati lasso peptidi su desno zakrećući što znači da prsten zaokreće oko petlje i repa u desno (slika 2). Ispitivanja su pokazala kako, barem za lasso peptid mikrocin J25 (MccJ25), nema razlike u energiji između desno i lijevo zakrećućeg peptida.<sup>1</sup> Koju bi ulogu njihova orijentacija imala još nije poznato.



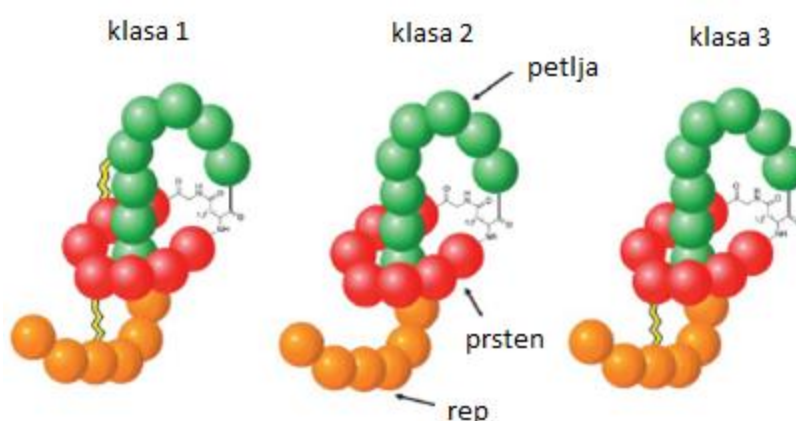
Slika 2 Orijentacija prstena nekih lasso peptida koji se razlikuju veličinom i aminokiselinskim sastavom, a kod svih je prisutno desno zaokretanje prstena. Strelica u shematskom prikazu pokazuje smjer od N-terminusa prema C-terminusu. Prsten je prikazan plavom bojom, rep i petlja crvenom, a disulfidne veze žutom bojom. Prema M. O. Maksimov *et al*, *Nat. Prod. Rep.* (2012) 29:996-1006.

## 2.2. Klasifikacija laso peptida

Klasifikacija laso peptida temelji se na broju disulfidnih veza koje su prisutne (slika 3). Tako klasa 1 ima dvije disulfidne veze dok klasa 2 nema disulfidnih veza. Otkriven je i laso peptid s jednom disulfidnom vezom čime je stvorena još jedna klasa, klasa 3 u kojoj se nalaze laso peptidi sa samo jednom disulfidnom vezom (tablica 1).<sup>1</sup>

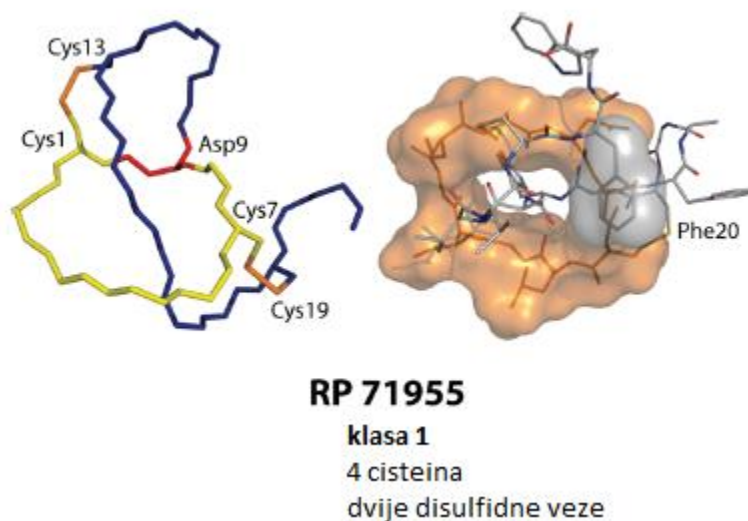
Tablica 1 Nazivi, sekvence i organizmi-proizvođači laso peptida po klasama

Ime	Sekvence	Proizvodni organizam
<b>Klasa 1</b>		
R P 7195/aborycin	CLGIGSCNDFAGCGYAVVCFW	Streptomyces sp.
Siamycin I/MS-271/NP-06	CLGVGSCNDFAGCGYAIVCFW	Streptomyces sp.
Siamycin II	CLGIGSCNDFAGCGYAIVCFW	Streptomyces sp.
SSV-2083	CVWGGDCTDFLGCGTAWICV	Streptomyces sviveus
<b>Klasa 2</b>		
Anantin	GFIGWGNDIFGHYSGDF	Streptomyces coeruleus
Capistruin	GTPGFQTPDARVISRFGFN	Burkholderia thailandensis
Lariat A	GSQLVYREWVGHNSVIKP	Rhodococcus sp. K01-B0171
Lariat B	GSQLVYREWVGHNSVIKPGP	Rhodococcus sp. K01-B0171
Microcin J25	GGAGHVPEYFVGIGTPISFYG	E. coli AY25
Propeptin	GYPWWDYRDLFGGHTFISP	Microbispora sp. SNA-115
RES-701-1	GNWHGTAPDWFNYYW	Streptomyces sp. RE-701
SRO15-2005	GYFVGSYKEYWSRII	Streptomyces roseosporus
<b>Klasa 3</b>		
BI-32169	GLPWGCPDIPGWNTPWAC	Streptomyces sp.



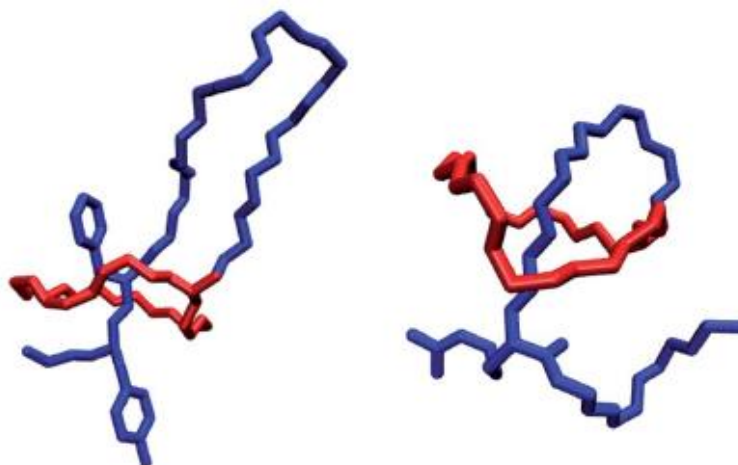
Slika 3 Strukture klasa laso peptida prema broju disulfidnih veza (žute linije) koje ostvaruju. Izopeptidna veza ostvarena je između N-terminusa i bočnog lanca Asp ili Glu. Adaptirano prema M. O. Maksimov *et al*, *Nat. Prod. Rep.* (2012) 29:996-1006.

Klasa 1 ima dvije disulfidne veze, jednu između Cys1 i Cys13, a drugu između Cys7 i Cys19. Također, bitno je naznačiti kako N-terminalni kraj može tvoriti disulfidnu vezu zbog N-terminalnog cisteina. To znači kako je N-terminalni kraj uključen u formiranje prstena, ali i u stvaranje kovalentne veze svojim bočnim ogrankom s petljom lasso peptida (slika 4).<sup>1</sup>



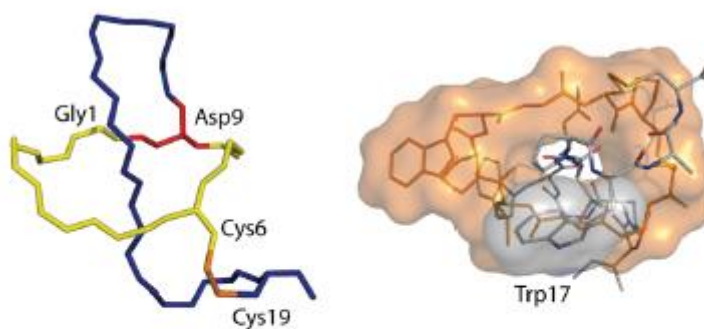
Slika 4 Lasso peptid klase 1, narančaste linije prikazuju disulfidne veze. Lijevo: prikaz okosnice peptida. Desno: površinski prikaz prstena i ključnih aminokiselinskih ostataka. Adaptirano prema J. D. Hegemann *et al*, *Acc. Chem. Res.* (2015) A-K.

Klasa 2 nema disulfidnih veza zbog manjka cisteina, ali zbog aminokiselina velikih bočnih ogranaaka i steričkih smetnji oni mogu održati svoju karakterističnu strukturu. Zbog tih velikih aminokiselina peptidi klase 2 su stabilniji od onih koji čine klasu 1 ili klasu 3. Primjer takve steričke stabilizacije vidljiv je kod MccJ25, koji sadrži fenilalanin odmah iznad prstena kao i tirozinski ostatak ispod prstena što onemogućuje da rep napusti prsten tj. da dođe do otpetljavanja strukture (slika 5). Dokaz stabilnosti te strukture pokazuje i to da proteolitičkim uklanjanjem petlje, rep i dalje ostaje „zarobljen“ unutar prstena. Još jedan primjer steričke stabilizacije vidljiv je kod lasso peptida capistruina, koji sadrži arginin kao i fenilalanine čime rep ostaje unutar prstena.<sup>1</sup>



Slika 5 Sterički utjecaj velikih bočnih ogranaka aminokiselina koji održava zapetljanu strukturu. Lijevo: rep peptida MccJ25 zadržan unutar prstena pomoću Phe ostatka iznad i Tyr ostatka ispod prstena. Desno: rep peptide capistruin zadržan unutar prstena pomoću Arg ostatka. Prsten je prikazan crveno, a petlja i rep plavo. Prema M. O. Maksimov *et al*, *Nat. Prod. Rep.* (2012) 29:996-1006.

Klasu 3 čini do sad samo jedan otkriveni lasso peptid, BI-32169 koji ima samo jednu disulfidnu vezu između Cys6, koji pripada prstenu, i Cys 19 koji se nalazi na C-terminalnom kraju (slika 6).<sup>2</sup>



### BI-32169

klasa 3  
2 cisteina  
1 disulfidna veza

Slika 6 Lasso peptid klase 3 koji sadrži jednu disulfidnu vezu prikazanu narančasto. Lijevo: prikaz peptidne okosnice. Desno: površinski prikaz ključnih ostataka i prstena peptida. Adaptirano prema J. D. Hegemann *et al*, *Acc. Chem. Res.* (2015) A-K.

Zanimljivo je kao se peptidi klase 1 i klase 3 mogu izolirati samo iz *Actinobacteria*. Također, hidrofobni karakter ovisi o klasifikaciji. Tako peptidi klase 1, izolirani iz bakterije *Streptomyces* i nekolicina klase 2 poput MccJ25, propeptin i anantin su uglavnom hidrofobni dok ostatak peptida klase 2, izoliranih iz *Proteobacteria*, su većinom polarni.<sup>2</sup>

## § 3. OTKRIĆE I BIOLOŠKA AKTIVNOST

### 3.1. Otkriće lasso peptida

Prvi otkriveni lasso peptid bio je anatin. Otkriven je prije 20 godina prilikom potrage za prirodnim antagonistom ANF receptora (*eng. atrial natriuretic receptor*).<sup>1</sup> Sljedećih nekoliko lasso peptida otkriveno je „slučajno“ pošto sekvenciranje gena nije bilo dovoljno razvijeno. Do promjene je došlo 2008. godine otkrićem *capistruina* genomskom analizom.<sup>1</sup>

Povijesno gledano, *microcin J25* (MccJ25) smatra se arhetipom lasso peptida jer ne samo što je otkriven među prvima, već je i prvi kojem je otkriven genski klaster zaslužan za biosintezu. Taj klaster (mcjABCD) je pronađen na plazmidu, a heterolognom ekspresijom je dokazano kako je zaslužan za sintezu MccJ25 peptida.<sup>3</sup> Tim otkrićem došlo je do saznanja o genima zaslužnim za sintezu lasso peptida.

Uglavnom svi do danas poznati lasso peptidi potječu iz proteobakterijskog ili aktinobakterijskog izvora.<sup>3</sup> Pretraga genoma pomaže u identificiranju lasso peptida no zbog manjka homologije s poznatim proteinima onemogućeno je dobivanje svih potrebnih informacija o njihovoj strukturi. Posljednji klasteri lasso peptida, otkriveni za peptide kase 1 i klase 2, pronađeni su u genomu dvije vrste *Streptomyces*. Otkriveni su novom metodom koja identificira moguće prirodne produkte MALDI-TOF spektrom ekstrakta bakterije, a potom pronalazi biosintetske klastere kodiranjem njihovog produkta u genomu.<sup>1</sup> Prijašnja otkrića temeljila su se na pronalaženju prirodnog produkta u kojem je prvotno pronađena zanimljiva bioaktivnost, a potom je određena molekularna struktura. Pojavom velikog broja genomskih sekvenci i povećanjem informacija o molekularnoj biosintezi lasso peptida, otkrića počinju davati mnogo informacija o njihovoj biosintezi.

### 3.2. Biološka aktivnost

Lasso peptidi prirodno posjeduju mnoge aktivnosti. Za neke je poznato da su antimikrobalna i antivirulentna sredstva dok ostali mogu biti antagonisti nekih receptora. Također mogu imati i više uloga, tako npr. RP 71955 inhibira HIV-1 aspartil proteazu i nastanak HIV reverzne transkriptaze, antibiotik aboricin pokazuje aktivnost protiv jedne Gram-negativne i nekoliko protiv Gram-pozitivnih bakterija pri mikromolarnim koncentracijama. Propeptin je lasso peptid koji ima antimikrobnu aktivnost, a djeluje i kao inhibitor enzima prolil endopeptidaze. Anantin može djelovati kao antagonist receptora atrijskog natrijuretskog faktora, ali ne posjeduje antimikrobnu ili antifungalnu aktivnost. BI-32169, jedini lasso peptid klase 3, jaki je inhibitor ljudskog receptora glukagona (tablica 2).<sup>1</sup>

Tablica 2 Poznate biološke aktivnosti lasso peptida

lasso peptid	inhibitor/antagonist	antimikrobno djelovanje
anantin	ANF	-
BI-32169	glukagon receptor	-
capistruin	Gram-negativne RNA-polimeraze	da
lariat	-	da
lassomycin	ClpC1	da
MccJ25	Gram-negativne RNA-polimeraze	da
propeptin	prolil-endopeptidaza	da
RES-701 tip	endotelin B-tip receptor	-
Siamicin tip	HIV fuzija i replikacija	da
streptomomicin	-	da
sungsanpin	stanice raka pluća A549	-

Antimikrobna aktivnost je najčešća, a u nekim slučajevima otkrivene su i „mete“ na koje djeluju. Za MccJ25 i capistruin je to Gram-negativna RNA-polimeraza, a za lassomycin su to šaperoni izolirani iz *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>3</sup>

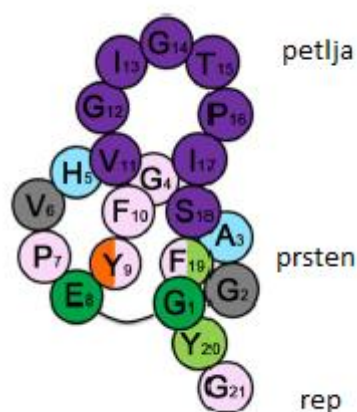
Lasso peptidi koji djeluju samo kao antibiotici su MccJ25, capistruin i lariat. MccJ25 djeluje protiv nekoliko Gram-negativnih bakterija, uključujući *E.coli*, *Salmonella* i *Shigella*. Minimalna količina potreban za inhibiciju ovisi o samom soju bakterija i o mediju u kojem rastu.

Određena istraživanja pokazala su kako je uloga nekih lasso peptida povezana s njihovim genetičkim okruženjem. Klasteri koji sadrže ABC-transportere mogu proizvoditi antimikrobne lasso peptide, klasteri koji su povezani s genima za izopeptidaze mogu imati neku drugu ulogu.

Još ne postoji eksperimentalni dokaz da lasso peptidi selektivno vežu neke male molekule, ali postoje teorije koje objašnjavaju kako su povezivanje male molekule i degradacija iste povezani signalnim putem. U tom slučaju bi takav lasso peptid prvo bio prepoznat od određenog receptora i lineariziran pomoću određenih peptidaza, a signalna molekula bi bila ili lasso peptid ili njegov linearizirani oblik.

MccJ25 djeluje kao antibiotik samo na vrste koje su srodne bakterijama koje ga proizvode. Lasso peptidi dobiveni iz Gram-pozitivnih bakterija *Rhodococcus jostii*, nazivaju se lariatini i mogu se boriti samo protiv *Mycobacteria*, a vezu s njima ostvaruju preko mosta koji uključuje Lys17 i Pro18.<sup>2</sup> Nuklearnom magnetskom rezonancom i molekularnom dinamikom pokazano je kako Lys17 jedne vrste lariatina A smješten na sličnom mjestu kao i His5 kod MccJ25, koji je nužan za inhibiciju rasta bakterija. Određenim mutacijama pokazano je kako promjenom nekih aminokiselina dolazi do promjene u strukturi, a time i do smanjenja stabilnosti lasso peptida no i dalje je zadržana aktivnost peptida. Kao što je već rečeno, MccJ25 djeluje antibakterijski. Jedan od mehanizama je taj da se Ala3 i His5 vežu na vanjsku membranu receptora FhuA koji je odgovoran za unos željeza u bakteriju. Interakcija između MccJ25 i FhuA je specifična, a ključna je beta-ukosnica regija koja služi kao element prepoznavanja od FhuA. Na taj način, posljedično, dolazi do inhibicije RNA-polimeraza pomoću Gly4, Pro7, Tyr9, Phe10, Phe19 i Gly21 koji čine MccJ25 (slika 7).<sup>2</sup> Daljnja istraživanja pokazala su kako MccJ25 blokira ulazak supstrata RNA-polimeraze vezanjem i ometanjem sekundarnog kanala RNA-polimeraze.<sup>1</sup> Za razliku od MccJ25, capistruin se ne veže u vezni džep FhuA i stoga ne može ostvariti interakcije bitne za selektivno povezivanje. Capistruin stoga ne može ući u stanicu te se može pretpostaviti da će ostvarivati interakcije s nekim drugim receptorom. Manjak aktivnosti MccJ25 prema Gram-pozitivnim bakterijama *in vivo* dokazana je pomoću *in vitro* analize i pokazala kako MccJ25 ne može inhibirati transkripciju pomoću RNA-polimeraza kod *Thermusaquaticus* i *Bacillus subtilis*. To otkriće bilo je konzistentno sa pozicijama mutacija kod Gram-negativnih bakterija koje su onda bile otporne na MccJ25.





Slika 7 Povezanost strukture i aktivnosti lasso peptida MccJ25. Ostatci Gly1 (G1) i Glu8 (E8) sudjeluju u stvaranju prstena dok ostatci Ala3 (A3) i His5 (H5) sudjeluju u vezanju za vanjsku membranu FhuA. Gly4, Pro7, Tyr9, Phe10, Phe19 i Gly21 inhibiraju RNA-polimerazu. Adaptirano prema N. Zhao *et al* Springer-Verlag (2016) 1347-1356.

Drugi mehanizam je taj da MccJ25 sudjeluje u inhibiciji respiratornog lanca mikroba. U tom slučaju Try9 ima ključnu ulogu.<sup>2</sup> MccJ25 ometa membranski potencijal kod *Salmonella newport*, ali ne kod *E.coli*. Daljnja istraživanja pokazala su kako je MccJ25 inducirao gubitak membranskog potencijala i poticao nastajanje superoksidnih vrsta kod *S.newport*.<sup>1</sup>

Capistruin ima antimikrobnu aktivnost protiv *Burkholderia caledonica*, *Pseudomonasaeruginosa* i *E.coli*. Nedavna istraživanja pokazala su kako ovaj peptid inhibira i transkripcijsku aktivnost.<sup>1</sup> Manjak sličnosti u sekvencijama MccJ25 i capistruina pokazuje kako je lasso topologija bitna za njihovu mogućnost inhibicije RNA-polimeraza. To daje mogućnost da se i za ostale lasso peptide, koji imaju antimikrobnu aktivnost, interakcije mogu opisati kao one između MccJ25 i RNA-polimeraza.

Supstitucija repa MccJ25, G12, I13 i T15 će povećati njegovu antibakterijsku aktivnost. Kod nekih drugih lasso peptida modifikacije mogu smanjiti antibakterijsku aktivnost. Iako su modificirani lasso peptidi manje stabilni od onih native strukture, raznolikost okosnice pruža brojne mogućnosti koje se mogu primijeniti u raznolike svrhe. MccJ25 i capistruin su visoko selektivni antibiotici koji utječu na uzak spektar Gram-negativnih bakterija. Peptidi klase 1 utječu na Gram-pozitivne bakterije. Lariatini utječu na soj *Mycobacterium* uključujući *M. tuberculosis*. Drugo bitno svojstvo je i to da mogu biti antagonisti nekih receptora. Tako kompetitivni inhibitor endothelina-1 može biti koristan u liječenju kardiovaskularnih bolesti. Slično, BI-32169 ima potencijala u liječenje dijabetesa.<sup>1</sup>

## § 4. BIOSINTEZA LASSO PEPTIDA

Generalno, za nastanak lasso peptida su potrebna tri gena koja kodiraju prekursorski peptid A, cisteinsku proteazu B i ATP-ovisnu laktam sintetazu C. Genski klasteri mogu sadržavati i dodatne gene, ali nije pokazano kako su nužni za sintezu zrelog lasso peptida. Izuzetak su klasteri koji služe za dobivanje lariatina, lasomicina, streptomomicina i onih mogućih, dobivenih na temelju genomske analize, koji sadrže kratkeokvire čitanja. Bioinformatičkom analizom odgovarajućih mali proteina, otkriveno je kako dolazi do cijepanja B proteina na dva odvojena okvira čitanja koji kodiraju N-terminalne i C-terminalne domene cijelog B proteina.<sup>3</sup> Mali proteini koji dolaze od N-terminalnog dijela nazivaju se B1, a oni koji dolaze od C-terminalnog dijela B2.

Zbog strukturne stabilnosti i karakterističnog antimikrobnog svojstva, MccJ25 je poslužio kao model promatranja biosinteze lasso peptida. Nastao je iz soja *E. coli* koji doprinosi visokoj produkciji peptida i lakoći ispitivanja za razliku od ostalih lasso peptida.

Kako su lasso peptidi ribosomski sintetizirani i posttranslacijski modificirani peptidi koristi se ABCD nomenklatura radi jednostavnosti. Homologno ostalim ribosomski sintetiziranim i posttranslacijski modificiranim peptidima, sintetiziraju se kao linearni peptidi prekursori koji potom prolaze kroz niz posttranslacijskih modifikacija i transformacija kako bi nastali oni zrelog, konačnog oblika.

Gen A služi za kodiranje peptida prekursora dok geni B i C služe za dobivanje enzima koji sudjeluju u stvaranju konačnog lasso peptida. Klaster ABC je temeljni klaster za biosintezu lasso peptida. U teoriji postoje tri klastera: 1. samo ABC klaster; 2. ABC genski klaster uz koji postoji gen za ATP-veznu kazetu (gen D); 3. ABC genski klaster uz koji su vezani i neki drugi pomoćni geni koji su smješteni uzvodno ili nizvodno od ABC klastera. Također, postoje i neke devijacije u ABC genskom klasteru. Tako npr. gen A može biti udvostručen ili čak utrostručen, a gen B je podijeljen na dva gena: B1 i B2 koji su istodobno potrebni tijekom biosinteze lasso peptida.

Genski klaster MccJ25 pronađen u plazmidu *E. coli* AY25 izmeta novorođenča sastoji se od četiri gena: *mcjA*, *B*, *C* i *D*.<sup>2</sup> Strukturni gen *mcjA* kodira prekursor MccJ25, McjA koji ima 58 aminokiselina i sadrži 37 aminokiselinski N-terminalni vodeći peptid i 21

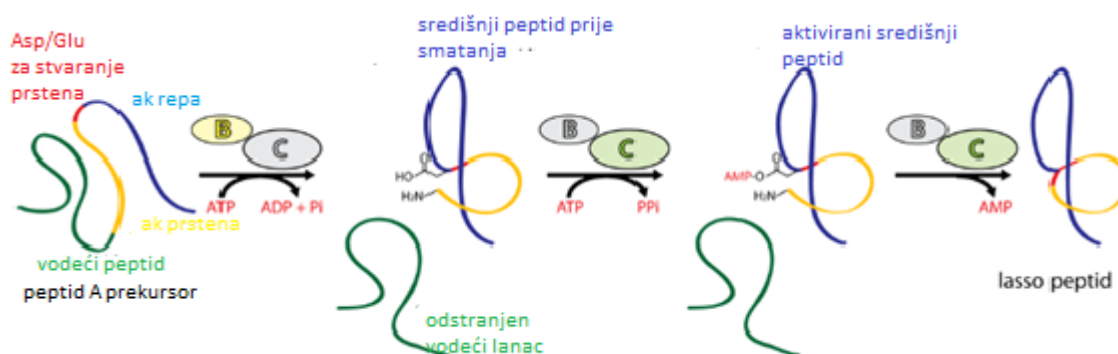
aminokiselinski C-terminalni središnji peptid. Taj središnji peptid i posljednjih osam aminokiselina vodećeg peptida imaju ključnu ulogu u produkciji MccJ25. U procesu transkripcije, McjA stvara razgranate, cikličke topoizomere, a jedna od funkcija vodećeg peptida je reduciranje nastalih topoloških izomera. Vodeći peptid sudjeluje u strukturiranju prekursor peptida i omogućuje pravilnu orijentaciju središnjeg peptida te tako olakšava nastajanje trodimenzionalne strukture. Za različite lasso peptide, postoje razlike u aminokiselinskom sastavu vodećeg peptida, no Thr jedini ostaje na predzadnjem mjestu. Zamjenom aminokiselina serinom, cisteinom, fenilalaninom, valinom ili izoleucinom opada produkcija MccJ25 što ukazuje na mogućnost kako je vodeći peptid element prepoznavanja za lasso sintazu koja preferentno prepoznaje Thr za daljnji nastanak lasso strukture.<sup>3</sup>

Ponašajući se kao enzimi za rast McjA, McjB i McjC su odvojeno kodirani genima *mcjB* i *mcjC* koji su u okolini strukturnog gena *mcjA*, ali se transkribiraju odvojeno. Biokemijska modifikacija McjA uključuje rezanje vodećeg peptida i ciklizaciju središnjeg peptida. McjB sadrži 208 aminokiselina, a C-terminalni dio McjB-a se ponaša slično kao ATP-ovisna cistein proteaza. C150, S154 i H182 enzima McjB stupaju u interakciju i vežu ATPte čine Cys-His-Asp katalitičku trijadu koja utječe na cijepanje između K37 i G38 kod McjA, a N-terminalni dio McjB sudjeluje u prepoznavanju McjA.

McjC ima 513 aminokiselina, a između 31 i 376 su homologne s C-terminalnom domenom asparagin sintetaze B koja katalizira nastanak asparagina iz aspartata uz prisutnost ATP-a i omogućuje nastanak prstena lasso peptida tako što katalizira nastanak izopeptidne veze između N-terminalnog glicina središnjeg peptida i bočnog ogranka Glu8 uz utrošak ATP-a. Posebno se ostatci S199, D203, S2044, G298 i D302 McjC-a povezuju s veznim mjestom za ATP-Mg<sup>2+</sup>, a S199, D203, D302 su usko povezani s nastajanjem MccJ25. McjB, McjC kao i ATP, MgCl<sub>2</sub> i 1,4-ditiotreitol su potrebni za razvoj McjA koji stvara aktivirani lasso peptid. To ukazuje da su McjB i McjC nužni za posttranslacijske modifikacije. Supstitucijom C150 i H182 kod McjB ili S199, D203 i D302 kod McjC s alaninom ne dolazi do nastajanja linearnog ili razgranatog cikličkog MccJ25 in vivo što je u skladu s predviđanjima napravljenim na temelju analize sekvenci. Nadalje, pretvorba linearnog prekursora McjA u zreli MccJ25 može *sein vitro* dogoditi uz prisutnost McjB i McjC. Kada se prekursor McjA izrazi zajedno s McjB ili McjC nastane samo linearni MccJ25 ili ne nastane uopće. To sugerira kako su funkcije McjB i McjC međusobno ovisne i neophodne za sintezu lasso peptida MccJ25.<sup>2</sup>

McjD je transportni protein koji strukturno jako nalikuje bakterijskim proteinima s ATP-veznim kazetama. Kod bakterija ABC vezne kazete se sastoje od transmembranske domene koja uključuje 4-6 transmembranskih zavojnica za vezanje i otpuštanje liganda. Dimer C-terminalne vezne domene veže i hidrolizira ATP kako bi osigurao dovoljno energije za transport liganda. Kod McjD postoji šupljina unutar transmembranske domene u koju se može smjestiti MccJ25. Transmembranska domena na citoplazmatskoj strani stanične membrane hidrolizom ATP-a osigurava dovoljno energije za proces prijenosa zrelog lasso peptida. Nakon vezanja ATP-a dolazi do konformacijske promjene i otvaranja kanala kroz koji peptid može izaći na citoplazmatsku stranu. Ukoliko dođe do ekspresije McjA, McjB, McjC ali ne dođe do ekspresije McjD stanica može umrijeti. To ukazuje da je McjD nužan za sigurnost stanica koje proizvode MccJ25.<sup>2</sup>

Kombinacijom funkcija McjB i McjC dobijamo mogućí model biosinteze lasso peptida koji uključuje neke stupnjeve strukturiranja peptida-prekursora. Njihovim djelovanjem iz linearanog oblika nastaje konačni oblik lasso peptida (slika 8).



Slika 8 Pretpostavljeni mehanizam sinteze lasso peptide. Adaptirano prema J. D. Hegemann *et al*, *Acc. Chem. Res.* (2015) A-K.

## § 5. MODIFIKACIJE I PRIMJENA LASSO PEPTIDA

Kako bi se povećala produkcija, biološka aktivnost i funkcionalnost prirodnih lasso peptida uvode se brojne modifikacije. Inženjerstvo genskih klastera uglavnom se koristi za modificiranje lasso peptida. Zamjenom nekodirajućih dijelova između terminatora klastera za proizvodnju lasso peptida i sekvenci zrelih enzima optimizirane *E. coli* sa sekvencama odgovornim za vezanje na ribosom, može se povećati produkcija capistraina sa 0.2 na 1.6 mg/L.<sup>2</sup> Razumijevanjem regulacije proizvodnje lasso peptida je ključ njihovog poboljšavanja putem genetičkog inženjeringa.

MccJ25 je sintetiziran kako bi uništavao druge, usko povezane vrste, prilikom nedostatka hranjivih tvari. Stanice *E. coli*, koje sadrže genske klastere za sintezu MccJ25, proizvode taj peptid tijekom stacionarne faze rasta. MccJ25 je sintetiziran pomoću genskih klastera *mcjA* i *mcjB* koji su prilikom transkripcije razdvojeni što ne utječe na formiranje lasso peptida. To je navelo na zaključak kako *mcjA* može slijediti još nekoliko gena koji bi stvorili lasso peptid s dugačkim repom koji bi imao više funkcija. Nedavno su dodani geni za spajanje proteina na 3' kraj gena prekursora kako bi nastao lasso peptid veće funkcionalnosti. Potvrđeno je kako se astexin-1, koji je spojen sa zelenim fluorescirajućim proteinom putem fleksibilne spojnice, može koristiti u praćenju produkcije i pozicije lasso peptida. Također, pokazano je kako ukoliko se *mcjA* stavi pod utjecaj *lac*-reguliranog T5 promotora, može se inducirati ekspresija gena i tijekom eksponencijalne faze.<sup>1</sup> Takva modifikacija genskog klastera dovodi do povećane sinteze peptida u odnosu na prirodni klaster.

Zbog toga što je većina danas poznatih lasso peptida ne-patogena i relativno otporna na visoke temperature, kiseluokolinu većinu proteaza imaju potencijalnu promjenu u medicinske svrhe. Na primjer, integrini su velika klasa heterodimernih receptora koji se nalaze na vanjskoj strani stanice i sastoje se od 18  $\alpha$  i 8  $\beta$  podjedinica. Arginin, gicin i aspartat (RGD) je vezni motivi integrina koji je prekomjerno eksprimirani u mnogim tumorima. MccJ25 s G12, I13 i G14 kojima je petlja zamijenjena s RGD veznim motivom može koristiti u prepoznavanju brojnih tumora i terapiji. Prsten RES-701-1 lasso peptida ima široku primjenu kao antagonist endothelin B receptora koji je prekomjerno eksprimiran kod

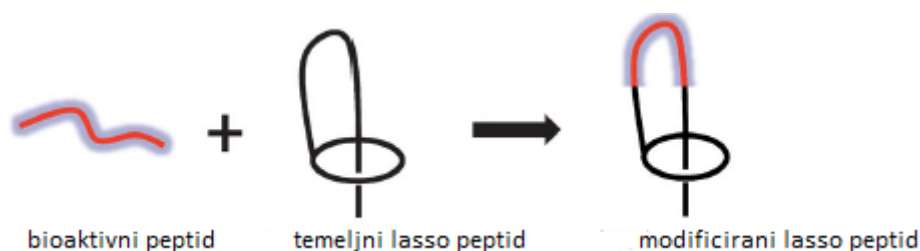
karcinoma gušterače. Udruživanjem RGD i RES-701-1 može se povećati biološka aktivnost i strukturna stabilnost lasso peptida.<sup>2</sup>

Ova istraživanja pokazuju kako lasso peptidi mogu biti dizajnirani i modificirani genetskom rekombinacijom, ali i kemijskim reakcijama kako bi se upotrijebili u medicinske svrhe. Njihova mogućnost redizajniranja ovisi o broju sekvenci koji sudjeluju u namatanju peptida kao i o supstratima tj. tome koliko se oni mogu vezati na enzime koji sudjeluju u razvoju lasso peptida.

Supstitucijom svake aminokiseline, osim Glu8 koji sudjeluje u stvaranju amidne veze prstena, i skeniranjem takvih mutacija kod MccJ25, došlo se do zaključka kako su samo tri ostatka nužna za biosintezu, razvoj i eksport zrelog lasso peptida. To su: Gly1 i Glu8, koji stvaraju amidnu vezu potrebnu za nastajanje prstena, i susjedni Gly2.

Provedeno je i istraživanje u kojem je istovremeno uvedeno više mutacija. Tri aminokiseline su supstituirane te su im računskim algoritmima određene energije. Inačice peptida su rangirane po minimumu energije i specifičnosti namotaja. Šest od osam rangiranih lasso peptida su *in vivo* nastali u jednakoj količini kao i divlji tip. U drugom istraživanju proizvedene su mutacije koje su utjecale na prsten ili petlju kod MccJ25 što je rezultiralo otkrićem stotinjak novih funkcionalnih inačica MccJ25.<sup>1</sup>

Lasso struktura je također okarakterizirana analiziranjem insercija i delecija aminokiselinskih ostataka koji utječu na veličinu prstena i repa. Zaključeno je kako veličina prstena mora biti zadržana kako bi se očuvala lasso struktura s repom koji prolazi kroz prsten. Ipak, petlja može biti malo skraćena, a rep može biti malo uvećan. Ti se peptidi, zbog velikog broja inačica koje se mogu napraviti, čine kao dobar „temelj“ na kojem se mogu graditi razni drugi oblici molekula koji bi imali raznovrsnu primjenu (slika9).



Slika 9 Modificiranje lasso peptide. Regija petlje može biti modificirana tj. može biti zamijenjena aktivnim peptidom čime nastaje novi, modificirani lasso peptid s novim funkcijama. Adaptirano prema M. O. Maksimov *et al*, *Nat. Prod. Rep.* (2012) 29:996-1006.

Bitno je reći kako zadnje aminokiseline repa lasso peptida mogu biti kemijski modificirane kako bi se povezale s brojnim drugim molekulama čime bi se lasso peptidi mogli koristiti u razne medicinske svrhe. Određeni ligandi se mogu koristiti za modificiranje lasso peptida putem genetskom inženjeringa, kao što je prethodno rečeno. Stoga konjugirani lasso peptidi imaju potencijala biti nosioci lijekova ili signalne molekule.

Kako su prekursori lasso peptida genetski kodirani i ribosomski sintetizirani omogućeno je nastajanje njihovih raznih inačica putem metoda rekombinantne DNA. Međutim kemijska sinteza i biosinteza više lasso peptida ostaje nepristupačna zbog manjka dostupnih sintetičkih metoda i produkcijskih sojeva. S druge strane, funkcije mnogih aminokiselina u lasso peptidima nisu sasvim jasne što otežava odabir mjesta za daljnje modificiranje. Također, kao ciljne molekule potrebno je procijeniti može li modificirani lasso peptid na kojem je vezan određeni ligand, prepoznati i vezati ciljnu molekulu u kompleks u in vivo biološkim uvjetima. Svi ti problemi moraju se temeljito istražiti kako bi lasso peptidi mogli imati širu uporabu.

## § 6. PRIMJERI LASSO PEPTIDA

### 6.1. Mikrocini-odbrana enterobakterija

Antimikrobna sredstva se proizvode širom svijeta, od životinja, biljaka do mikro organizama. Ribosomski sintetizirani prirodni antibiotici doprinose uređenom imunitetu viših vrsta i kompetiraju u mikro svijetu. Antimikrobni peptidi se kod eukariota i prokariota razlikuju uglavnom po efikasnosti i specifičnosti. Oni nastali iz bakterija su uglavnom bolji od onih koje proizvode eukarioti. Mnogi su aktivni u piko- ili nanomolarnim koncentracijama, a također imaju i bolji mehanizam djelovanja koji uključuje dva načina djelovanja.

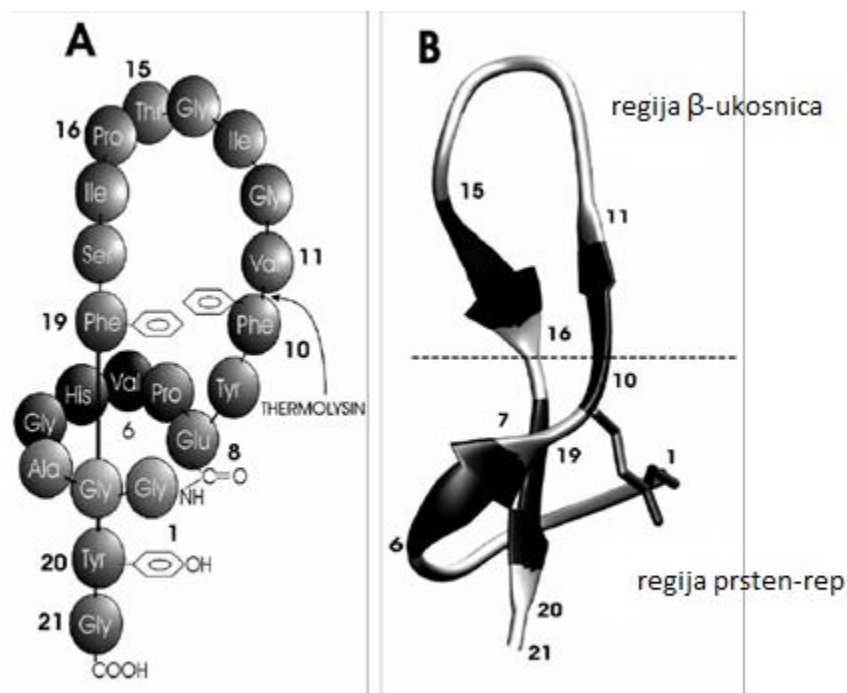
Mikrocini su ribosomski sintetizirani peptidi koji u nekim slučajevima mogu biti i post-translacijski modificirani. Napravljeni su prekursori koji se sastoje od produljenog N-terminalnog vodećeg lanca i središnjeg peptida.<sup>4</sup> Uglavnom su hidrofobni i stvaraju ograničenu, ali heterogenu klasu bakteriocina-otrovnih molekula koje nastaju uslijed manjka hranjivih tvari. Dije se u dvije skupine ovisno o molekularnoj masi i prisutnosti disulfidnih veza kao i o post-translacijskim modifikacijama. Lasso peptid MccJ25 pripada klasi I koji su kodirani plazmidom i imaju molekularnu masu manju od 5 kDa te su podvrgnuti brojnim posttranslacijskim modifikacijama. Neke modifikacije koje imaju zreli mikrocini mogu biti posljedica i ne-ribosomskog puta čime je ostvarena veza između ribosomski i ne-ribosomskih puteva.<sup>4</sup> Zreli mikrocini se iz stanice izbacuju putem ABC transportera ili pumpi koje su kodirane njihovim genetskim sustavom.

Mikrocini su molekule male molekulske mase, antibiotici koje proizvode *Enterobacteria* uglavnom soj *E. coli*.<sup>5</sup> Njihova sinteza nije smrtonosna ili kontrolirana SOS regulatornim lancem, a sinteza se odvija tijekom stacionarne faze rasta.<sup>5</sup> Kada su unutar ciljane bakterije, vežu se na esencijalne enzime ili interagiraju s unutrašnjom membranom kako bi ubili suparnike. Čine obećavajući model za proučavanje mehanizama transporta peptida i regulacije ekspresije gena u stanicama koje se ne razmnožavaju.



## 6.2. Mikrocin J25 (MccJ25)

Kao što je već rečeno, MccJ25 je arhetip lasso peptida koji čini razred bioaktivnih peptida sintetiziranih od *Proteobacteria* i *Actinobacteria*. Sastoji se od prstena koji je stvoren povezivanjem N-terminalnog dijela i karboksilne skupine bočnog lanca aspartata ili glutamata na poziciji 8 ili 9 kroz koji prolazi C-terminalni rep te ostaje zarobljen u obliku lasa. Lasso struktura je očuvana pomoću dva velika bočna ogranka aromatskih aminokiselina Phe i Tyr koji onemogućavaju micanje repa van prstena (slika 10). Ovakva čvrsta struktura omogućava mu visoku stabilnost pri visokim temperaturama i otpornost prema proteazama. Nepogodni uvjeti, jako kisela stanja itd. utječu na petlju dok prsten s repom unutar njega ostaje nepromijenjen. Otvaranje prstena moguće je samo u bazičnim uvjetima. Mccj25 djeluje uglavnom na soj *Salmonella* i *E. coli* s minimalno potrebnom koncentracijom za inhibiciju.<sup>4</sup>

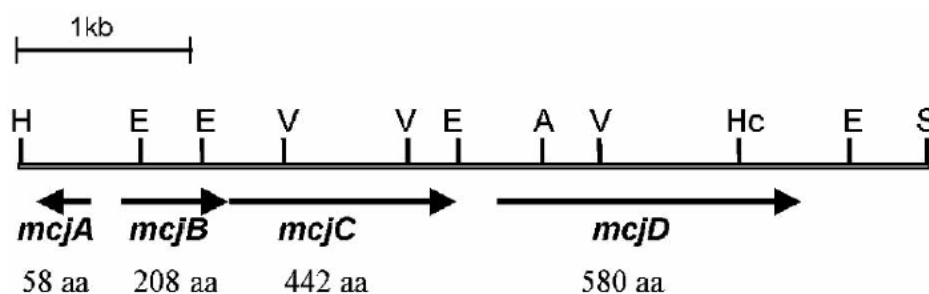


Slika 10 Struktura MccJ25 s aminokiselinama ključnim za održavanje lasso strukture (A) i struktura najniže energije s elementima sekundarne strukture: dvije antiparalelne  $\beta$ -ploče (B). Adaptirano prema S. Rebuffat, *Biochem. Soc. Trans* (2012) 1456-1462.

## 6.2.1. Određivanje klastera gena za nastajanje mikrocinu MccJ25

*E. coli* AY25 je otporna na ampicilin, ali osjetljiva na ostale konvencionalne antibiotike. Fizičkom analizom soja *E. coli* ustanovljeno je kako sadrži pet plazmida. Daljnjim eksperimentima s etidijevim bromidom omogućilo je izoliranje mikrocinu koji nisu bili produktivni. Supernatant te kulture nije pokazivao nikakvu antibiotsku aktivnost, a gubitak stvaranja mikrocinu bio je popraćengubitkom imuniteta na antibiotik. Gel elektroforezom utvrđeno je kako izgubljen plazmid od oko 60 kb. Kako bi se potvrdilo da je MccJ25 određeni plazmid, plazmid DNA je izoliran iz soja AY25 i korišten za transformaciju soja *E. coli* DH5 $\alpha$ . Transformirani oblici koji proizvode mikrocin, probranisu na temelju otpornosti koju daje plazmid. Analizom plazmidne DNA utvrđeno je kako sadrže jedan plazmid od oko 60 kb koji je nazvan pTUC100. Plazmid je naknadno premješten u soj MC4100 koji je bio stabilan. Produkcija MccJ25 iz transformiranog soja pTUC100 bila je ista kao i ona iz originalno izoliranog.<sup>5</sup>

Analizom genetičke komplementarnosti utvrđeno je kako se razne mutacije mikrocinu mogu klasificirati u tri različite grupe koje definiraju tri različita gena nužna za uspješnu sintezu MccJ25 (slika 11). Klasificirani su kao *mcjA*, *mcjB* i *mcjC*. Regija *mcjC* bila je klonirana što je pokazalo kako sadrži gen nazvan *mcjD*, koji daje otpornost na MccJ25.<sup>5</sup>



Slika 11 Organizacija genetskog klastera za sintezu MccJ25. Strelice ispod linije označavaju sekvence i duljinu gena te smjer transkripcije gena. Prema S. Rebuffat, *Biochem. Soc. Trans* (2012) 1456-1462.

Sekvenciranje DNA fragmenta koji sadrži genetičku informaciju o MccJ25 otkrilo je četiri okvira čitanja čija veličina i lokacija odgovaraju četirima genima utvrđenim u eksperimentima komplementarnosti.<sup>5</sup> Geni *mcjB*, *mcjC* i *mcjD* tvore operon dok je *mcjA* transkribiran u suprotnom smjeru (slika 11).

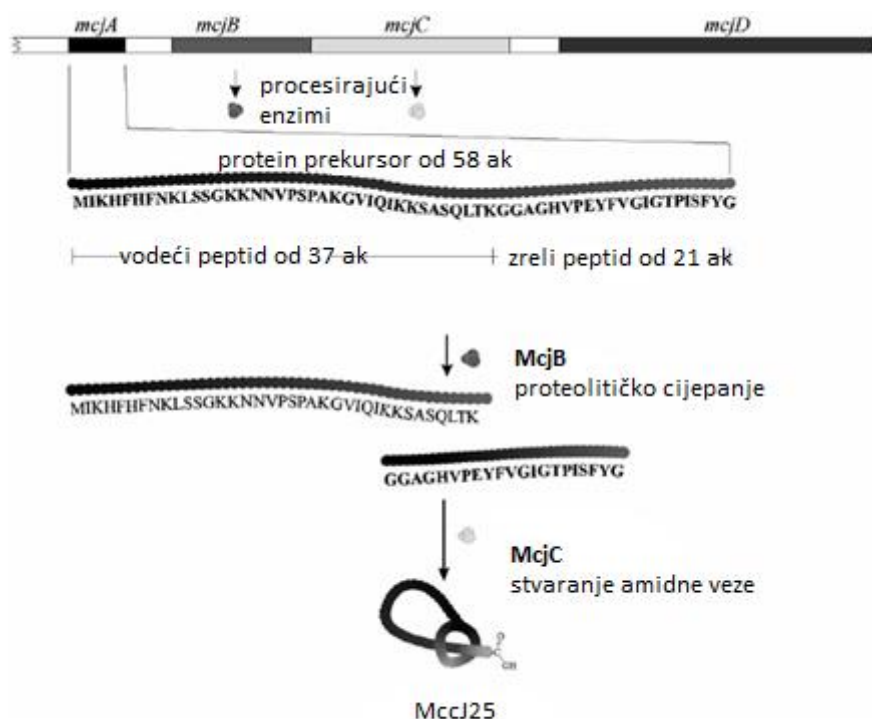
### 6.2.2. Struktura MccJ25

O strukturi je već dosta rečeno u prijašnjem tekstu. Potrebno je dodati kako posjeduje dvije antiparalelne  $\beta$ -ploče. Prva se sastoji od ostataka 6-7 i 18-19 i formirana je između dijela prstena i prodiranja C-terminalnog dijela. Druga ploča se sastoji od ostataka 10-11 i 15-16 te je spojena s  $\beta$ -okretom koji ima ostatke 11-14 te takva struktura stvara oblik ukosnice (slika 10). Glavne interakcije koje klasificiraju takvu strukturu su Van der Waalove između bočnih ogranaka amino kiselina, koje su uglavnom hidrofobne, i polarnih skupina okosnice. Dvije glavne hidrofobne interakcije ostvaruju se na površini, a uključuju Tyr20, Val6 i metilensku skupinu bočnog lanca Glu8 kao i one između bočnih ogranaka Pro7, Phe10, Pro16 i Phe19. MccJ25 nosi samo dva naboja, ona od His5i C-terminusa. Ti naboji su vrlo blizu te dolazi do elektrostatičkih interakcija. Takve interakcije mogu igrati veliku ulogu u stabilizaciji strukture tog lasso peptida.

MccJ25 je slabo topljiv u vodi pa je struktura određena u metanolu, alizbog svoje kompleksnosti struktura ne ovisi previše o otapalu. Kao što je već rečeno, takva struktura daje veliku stabilnost koju slične male molekule, bez disulfidnih veza nemaju.

### 6.2.3. Biosinteza MccJ25

Kao što je rečeno u prethodnim poglavljima, za biosintezu MccJ25 su potrebna četiri gena *mcjABCD*. Gen *mcjA* stvara linearan peptid koji je prekursor MccJ25 i ima 58 aminokiselinskih ostataka dok *mcjD* stvara transporter koji sudjeluje u prijenosu zrelog peptida kao i u zaštiti od štetnih učinaka mikrocin. Geni *mcjC* i *mcjB* su također bitni, a sudjeluju u pretvorbi *McjA* do zrelog MccJ25. Proces uključuje cijepanje prekursora i ciklizaciju do konačnog oblika MccJ25. Vjerojatno na početku dolazi do proteolitičkog cijepanja između Lys1 i Gly1 linearnog prekursora nakon čega slijedi nastajanje C-terminalnog repa i prstena (slika 12). U nekim slučajevima procesiranje se odvija pomoću specifične serinske proteaze koja pripada klasteru antibiotika.<sup>5</sup>



Slika 12 Sekvence peptida MccJ25 i kodirajući geni. Peptid od 21 aminokiselinu čini konačni lasso peptid uz djelovanje gena McjB i McjC. Adaptirano prema S. Rebuffat, *Biochem. Soc. Trans* (2012) 1456-1462.

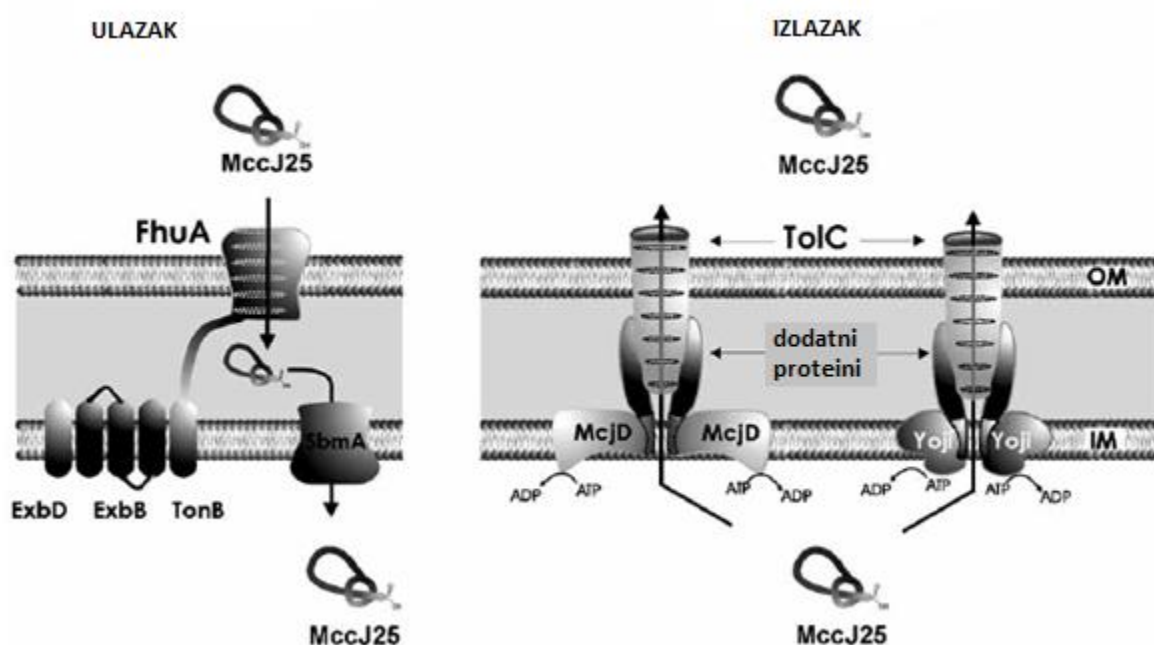
#### 6.2.4. Regulacija produkcije MccJ25

Izoliranjem *lacZ*, koji je mješavina *mcjA*, *mcjB* i *mcjC*, pokušalo se otkriti koji faktori utječu na kontrolu ekspresije tih gena. Gen *mcjA* bio je drastično induciran kako je stanica ušla u stacionarnu fazu rasta. Ekspresija *mcjA* može se i inducirati zaustavljanjem eksponencijalne faze stanice, koja ne potiče ekspresiju gena *mcjA*, uz utrošak supernatanta koji je dobiven iz rane stacionarne faze stanice. Pokazano je kako na induciranje ekspresije *mcjA* ne utječe gustoća stanice, pH promjene ili anaerobni uvjeti kao ni nakupljanje tvari koje induciraju ekspresiju.

Nedostatak ugljika i anorganskog fosfata potiče ekspresiju *mcjA* gena dok pri nedostatku dušika nema uopće ekspresije gena. Može se zaključiti kako u stacionarnoj fazi rasta stanice, ekspresija gena *mcjA* je potaknuta nedostatkom hranjivih tvari. Geni *mcjB* i *mcjC* su također regulirani fazom rasta stanice, no za razliku od *mcjA* oni se eksprimiraju tijekom eksponencijalne faze.

6.2.5. Unos i iznos *MccJ25* u stanicu i van stanice

Gen *mcjD* kodira prijenosnik koji je zaslužan za sekreciju *MccJ25* (slika 13). Kompjuterskom analizom aminokiselinskog sastava je pokazano kako taj gen ima sve strukturne karakteristike kao i ostali bakterijski ABC transporteri. Najveća sličnost pronađena je kod C-terminalnog dijela *McjD*-a koji okružuje petlju za vezanje nukleotida. Amino polovica *McjD* prolazi kroz unutarnju membranu šest puta dok karboksi polovica sadrži ATP-veznu domenu. Istraživanja su pokazala kako nedostatak *mcjD* može biti smrtonosan za stanicu točnije uslijed sinteze toksične tvari koja bi se u nedostatku *McjD* nakupljala u stanici i time ju uništila. Zaključilo se kako je *McjD* dio pumpe za izbacivanje *MccJ25* van stanice.<sup>5</sup>



Slika 13 Shematski prikaz ulaska i izlaska *MccJ25* u stanicu. Adaptirano prema S. Rebuffat, *Biochem. Soc. Trans* (2012) 1456-1462.

*MccJ25* je predodređen za okolni medij stoga mora prijeći unutarnju i vanjsku membranu kao i međumembranski prostor. Generalno, ABC transportni sustav kod Gram-negativnih bakterija zahtjeva dva dodatna proteina. Jedan je tzv. dodatni protein iz obitelji proteina membranske fuzije koji je usidren u unutarnjoj membrani dok je drugi van membranski protein. Postoji hipoteza kako je dodatni protein trimer te služi kao adapter koji povezuje

transporter unutarnje membrane s komponentama vanjske membrane i na takav način sudjeluje u prijenosu supstrata.<sup>5</sup>

Sekrecija MccJ25 je znatno smanjena u stanicama kojima nedostaje TolC upućuje da je TolC, kromosomski sintetiziran mali van-membranski protein, dio sustava za izbacivanje MccJ25 (slika 13). TolC formira kanal kroz vanjsku membranu i tunel koji se proteže kroz periplazmu. Time je osiguran prolaz kroz koji protein može izaći kao i male molekule poput deterdženta ili antibakterijskih lijekova.<sup>5</sup>

Proučavanje sustava za izbacivanje MccJ25 uvelike je potpomognuto izolacijom mutanata otpornim na antibiotike. Većina mutacija *E. coli* koja su dovela do otpornosti na van-membranski MccJ25, imaju gen koji kodira protein vanjske membrane FhuA i proteine TonB, ExbB, ExbD i SbmA unutrašnje membrane. FhuA je multifunkcionalni protein koji se nalazi na vanjskoj membrani *E. coli* i iako mu je prvotna uloga prijenos specifičnih heksapeptida koje proizvode gljivice, djeluje i kao receptor nekih bakteriofaga. Također sudjeluje u prijenosu albomicina, rifamicina i MccJ25 pepida. Proučavanjem njegove kristalne strukture pronađeno je kako se sastoji od dvadeset i dvije antiparalelne  $\beta$ -ploče koje formiraju C-terminalnu  $\beta$ -bačvu.<sup>5</sup>

Aktivnost FhuA ovisi o energiji stanice koju prima putem proton-motorne sile citoplazmatske membrane jer vanjska membrana ne posjeduje nikakav izvor energije. Energija se prenosi s unutarnje na vanjsku membranu putem kompleksa koji se sastoji od tri proteina: TonB, ExbB, ExbD koji zajedno čine Ton sustav. Pretpostavljeno je kako Ton sustav interagira s FhuA pri čemu dolazi do konformacijske promjene kao odgovor na proton-motornu silu i alosterički dolazi do otvaranja kanala FhuA. MccJ25 je klasificiran kao TonB-ovisan mikrocin.<sup>5</sup>

Daljnja istraživanja su pokazala kako je FhuA receptor za MccJ25 i kako dolazi do ligand-receptor interakcija koje se mogu pojaviti i u odsutnosti drugih komponenti bakterijske membrane. Konformacijska promjena, koju uzrokuje proton-motorna sila, prenosi se preko TonB do FhuA čime se otvara FhuA kanal te se vezani MccJ25 otpušta i međumembranski prostor gdje će se pomoću SbmA proteina prenijeti kroz citoplazmatsku membranu van stanice.

### 6.2.6. Mehanizam djelovanja MccJ25

MccJ25 ima dvije unutarstanične mete: 1. RNA-polimerazu, što je utvrđeno kod *E. coli* i *Salmonella enterica*; 2. respiratorni lanac, prvo pronađeno kod *S. enterica*, a kasnije i kod *E. coli*.<sup>5</sup> Pokazano je kako razlike u djelovanju mikrocina na respiratorni lanac *E. coli* i *S. enterica* ovise o tome je li FhuA kromosomski kodiran ili plazmidno. Veća ekspresija FhuA koji je kodiran plazmidno omogućuje veći unos MccJ25 kod *E. coli* inhibira potrošnju kisika. Pokazano je kako ta dva mehanizma djelovanja nisu ovisna jedna o drugom. Daljnjom analizom je pokazano kako MccJ25 stimulira proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta koja uzrokuju oštećenja u respiratornom lancu.

Bakterijska RNA-polimeraza je veliki, kompleksni enzim koji se sastoji od nekoliko polipeptidnih lanaca. Srž enzima čine dvije  $\alpha$ , jedna  $\beta$ , jedna  $\beta'$  i jedna  $\omega$  podjedinica. RNA-polimeraza je u potpunosti aktivna i sposobna za katalizu sinteze RNA kada je na nju povezana  $\sigma$  podjedinica. MccJ25 inaktivira RNA-polimerazu vezanjem u njezin sekundarni kanal čime blokira pristup supstratu u katalitički centar.<sup>5</sup> Biokemijska istraživanja ukazuju da inhibicija transkripcije ovisi o unosu NTP-a ili o vezanju NTP-a pomoću RNA-polimeraze. Genetska istraživanja pokazala su da inhibicija transkripcije zahtjeva dodatnu domenu od 50 aminokiselina unutar sekundarnog kanala RNA-polimeraze. Molekularnim modeliranjem potvrđeno je kako vezanje MccJ25 unutar sekundarnog kanala RNA-polimeraze ometa rad sekundarnog kanala. Takvo ometanje i zatvaranje sekundarnog kanala otvara mogućnosti razvijanja novih lijekova..

Istraživanja su pokazala kako MccJ25 utječe i na citoplazmatsku membranu *S. enterica* gdje uzrokuje alternacije u membranskoj propusnosti kao i rasipanjem gradijenta čime se inhibira proces potrošnje kisika. Nedavna istraživanja su pokazala kako MccJ25 utječe i na staničnu membranu *E. coli* kada bakterije prekomjerno ekspimiraju MccJ25-FhuA receptor.<sup>5</sup> Istraživanja su pokazala kako MccJ25 dovodi do povećanja proizvodnje ROS, koje su zaslužne za inhibiciju respiratornog lanca. *In vivo* eksperimenti su pokazali kako inhibitori efekta MccJ25 na respiratorni lanac ovise o ekspresiji i/ili aktivnosti transportnog proteina FhuA, koji je uključen u unos peptida i zapravo zaslužan za održavanje koncentracije peptida u citoplazmi.

### 6.2.7. Strukturna i funkcijska istraživanja

Antibiotska aktivnost MccJ25 ovisi o mogućnosti peptida da inhibira RNA-polimerazu ili potrošnju kisika pomoću reaktivnihkisikovih vrsta. Moguće je kemijskim putem ili genetskim mutacijama izmijeniti molekularnu strukturu te tako odrediti regije koje su bitne za potpunu aktivnost peptida.

MccJ25 se može hidrolizirati termolizinom pri čemu nastane peptid (MccJ25-Th19) sastavljen od dva nerazdvojiva lanca aminokiselina od 10 i 9 ostataka. Analizom netaknutog MccJ25 i onog hidroliziranog termolizinom pokazala su kako dvije odvojene regije sudjeluju u inhibiciji transkripcije i o unosu u stanicu. MccJ25-Th19, s velikim modifikacijama u  $\beta$ -ukosnica regiji, nije imao utjecaja na rast *E. coli*, ali je i dalje inhibirao RNA-polimerazu *in vitro* potrošnju kisika kod soja *Salmonella*. MccJ25-Th19 imao je antibiotsku aktivnost kod *E. coli* transformiranu s plazmidima koji sadrže gene *fhuA* ili *sbmA*. Ti rezultati su pokazali kako je netaknuta regija  $\beta$ -ukosnica bitna za unos MccJ25, ali nije bitna za inhibiciju RNA-polimeraze kod *E. coli* ili za respiratorni lanac kod *Salmonella* stanica.<sup>5</sup> Daljnjim pokusima s derivatima MccJ25 koji su imali modificiranu regiju  $\beta$ -ukosnica pokazano je kako su jednako učinkovito, kao i divlji tip, inhibirali RNA-polimerazu. Tim rezultatima je zaključeno kako ta regija ne sudjeluje u vezanju na RNA-polimerazu već to čini prsten i rep lasso peptida. Manjak bakterijske aktivnosti u jednom od derivata MccJ25 pokazuje kako regija petlje kod MccJ25 bitna za unos tj. kako gubitkom strukture u toj regiji MccJ25 postaje proteolitički labilan u stanici. Ta regija stoga može biti zanimljiva meta genetskih i kemijskih modifikacija koje bi poboljšale aktivnost peptida.

Dvije nabijene grupe, His5 lokaliziran na prstenu i Gly21 na C-terminusu, su blizu jedna drugoj i bitne su za aktivnost MccJ25. Stvaranjem amida glicina na C-terminalnom kraju prstena specifično blokira inhibiciju RNA-polimeraze, ali ne i inhibiciju respiratornog lanca. S druge strane, karbetoksilacija prstena povećava inhibitorski efekt. Može se zaključiti kako je polarni histidinski ostatak potreban za prijenos MccJ25 i inhibiciju RNA-polimeraze.

Na temelju još nekoliko eksperimenata i analiza dobiveni su sljedeći zaključci: 1. determinante inhibicije RNA-polimeraze su različite; 2. lokalizirane su dalje od regije  $\beta$ -ukosnica; 3. His5 je smješten na prstenu i ključan za interakcije s SbmA; 4. C-terminus je bitan za inhibiciju RNA-polimeraze. Na temelju tih zaključaka moguće je razviti nove modele MccJ25 koji će se koristiti u medicinske svrhe.



### 6.2.8. Primjene MccJ25 u terapeutske svrhe

MccJ25 ima brojne prednosti koje mu omogućuju upotrebu u terapeutske svrhe, a to su : 1. nije toksičan za ljude pošto je izoliran iz fekalija zdravog novorođenčca; 2. podnosi ekstremne temperature; 3. stabilan je u veliko rasponu pH; 4. otporan je na proteolizu. No i dalje ostaje pitanje bi li djelovao na RNA-polimeraze raznih bakterijskih sojeva. Možemo zaključiti kako je većina RNA-polimeraza inhibirana peptidima no veliko ograničenje MccJ25 je to što ima mali spektar antibiotske aktivnosti. Samo su Gram-negativne bakterije osjetljive na MccJ25, a pokusima *in vitro* određeno je kako djeluje na *E. coli*, *P.aeruginosa* i *Xanthomonas oryzae*.<sup>5</sup> Antibiotska otpornost ovisi samo o propusnosti stanične membrane stoga bi bilo korisno kada bi se pronašao način da se antibiotik prenese kroz staničnu membranu, a da se pri tome ne izgubi njegova aktivnost. Zanimljiva mogućnost je povezivanje MccJ25 i nekog hidrofobnog polipeptida ili fuzija s drugim antibiotikom koji djeluje na Gram-pozitivne bakterije. Daljnje studije mogle bi otkriti povoljan način liječenja nekih infekcija otpornih na antibiotike.

## 6.3. Acinetodin i klebsidin

### 6.3.1. Određivanje genskih klastera

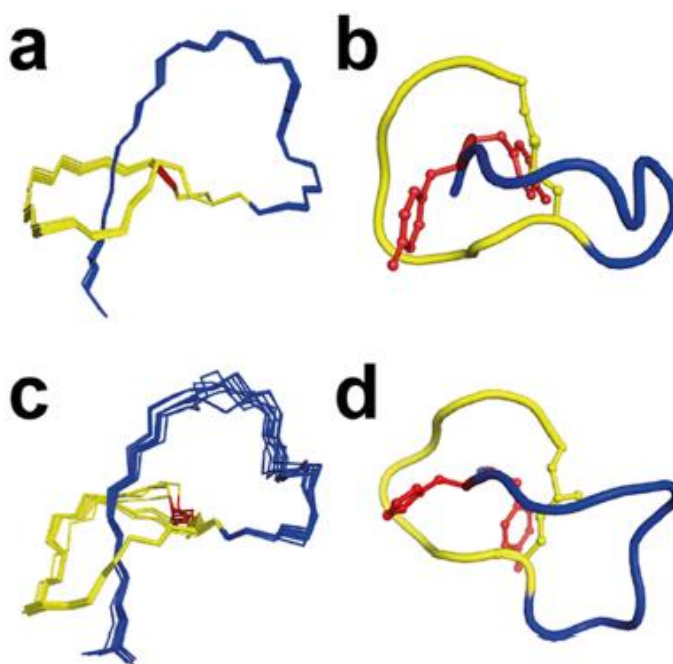
Prilikom određivanja genetskog klastera lasso peptida izoliranih iz *Acinetobacter* i *Klebsiella*, korištena je analiza pomoću cistein-proteaze. Iako su dio normalne ljudske mikrobiote, neki predstavnici tih vrsta postali su važni patogeni. Analizom je pokazano kako postoje homolozi *mcjA*, *mcjC* i *mcjD* koji su organizirani u klaster. U svim slučajevima određeni su prekursorilasso peptida koji pripadaju klasi 2. Također, svi geni (ABCD) su bili pod utjecajem jednog operona dok kod MccJ25 je ekspresija gena bila pod utjecajem različitih operona.<sup>6</sup> Analizom je dobiveno nekoliko homologa : *Acinetobacter gyllenbergii*, *Klebsiell variicola*, *Klebsiella pneumoniae*. Kod *A. gyllenbergii* pronađeni su geni koji moguće sudjeluju u inaktivaciji enzima biosinteze. Klaster *K.variicola* sadrži stop-kodone koji ometaju okvire čitanja homologa *mcjC* i *mcjDi* pokazuju da je klaster inaktivan.

Primarna struktura tih lasso peptida se može predvidjeti analizom središnjih regija i sekvenci koje su nužne za nastajanje lasso peptida. Gly ostatak nalazi se na prvom mjestu središnjeg dijela, interni je Glu ili Asp na poziciji 8 ili 9, a Thr ostatak je predzadnji kod

vodećeg lanca.<sup>6</sup> Mogu imati 18-19 aminokiselina slično kao i MccJ25, a Gly1-Glu8 povezivanjem čine prsten. Veliki bočni ogranci Tyr16 i Tyr17 kod acinetodina i His17 i Tyr18 klebsidina drže C-terminalni dio „zarobljen“.

### 6.3.2. Određivanje strukture korištenjem NMR spektroskopije

Kako bi se kod acinetodina i klebsidina odredila lasso struktura određena je trodimenzionalna struktura korištenjem NMR NOESY i CYANA algoritama.<sup>6</sup> NOESY metoda koristila se s parametrima koji povećavaju broj poprečnih pikova, ali ignoriraju rasipanje spina. Iterativnim postupkom molekularne dinamike i usporedbom dobivenih rezultata određivala se trodimenzionalana struktura. Dobiveni rezultati pokazali su kako oba peptida imaju lasso strukturu (slika 14). Lasso struktura acinetodina pokazuje veliku, ali dobro strukturiranu petlju, a lasso strukturu održava Tyr motiv. Klebsidin je pokazao malo drugačiju strukturu od acinetodina s petljom koja je malo uža i prstenom koji je malo savijen. Stabilnost također održavaju velike aminokiseline His17 i Tyr18.



Slika 14 Kalkulacije 3D strukture acinetodina (a, b) i klebsidina (c, d). Izopeptidna veza prikazana je crveno (a,c), aminokiseline Tyr16 i Tyr17, koje održavaju strukturu lasa kod acinetodina, prikazane su crveno (b), aminokiseline His8 i Tyr19, koje održavaju laso strukturu klebsidina, prikazane su crveno (d). Prsten svakog peptida prikazan je žuto dok su petlja i rep prikazani plavo. Prema M. Metelev *et al*, *ACS Chem. Biol.* 12 (2017) 814-824

Kod MccJ25 pronađeno je kako nastaje hidrofobni džep s ostacima Tyr9/Phe10 i Phe19/Tyr20 uz koje se i nalazi vezno mjesto. Iako klebsidin i acinetodin zapravo imaju vrlo malo sličnosti sa strukturom MccJ25, ovaj hidrofobni džep ostao je i kod njih očuvan. Kod klebsidina, ostatci Phe9/Phe10 i Tyr18 pridonose džepu koji je manje je hidrofoban nego MccJ25 zbog nedostatka dodatnog aromatskog bočnog ogranka C-terminusa. U slučaju acinetodina, Trp10 i Tyr16/Tyr17 stvaraju hidrofoban namotaj, a prisutnost Thr9 pridonosi njegovoj hidrofobnosti.

### 6.3.3. Temperaturna i proteolitička stabilnost acinetodina i klebsidina

Termalna stabilnost ovih peptidapokazana je njihovom inkubacijom na 95°C tijekom 4h. Kod acinetodina nije došlo do nikakve promjene što je potvrdilo retencijsko vrijeme tokom kromatografije kao i MS/MS analiza. Kod klebsidina je došlo do promjene retencijskog vremena i promjena u pikovima prilikom MS/MS analize, a zaključeno je kako su te promjene posljedica hidrolize Asn-karboksamida do karboksilne kiseline. Zaključeno je kako acinetodin i klebsidin imaju očuvanu strukturu i nakon inkubacije na visokoj temperaturi. Također acinetodin, zagrijana i normalan, kao klebsidin nisu bili podložni peptidazama što je potvrdilo njihovu stabilnu strukturu.

Izlaganje klebsidina proteazi K došlo je do cijepanja peptidne veze između Asn13 i Gly14 čime je nastao novi linearni dio repa koji je bio zarobljen unutar prstena. Kod acinetodina nije došlo do značajnih promjena tj. ponašao se slično kao MccJ25 kod kojeg nastanu dva polipeptidna lanca, ali i dalje spojena.

### 6.3.4. Antibakterijska aktivnost

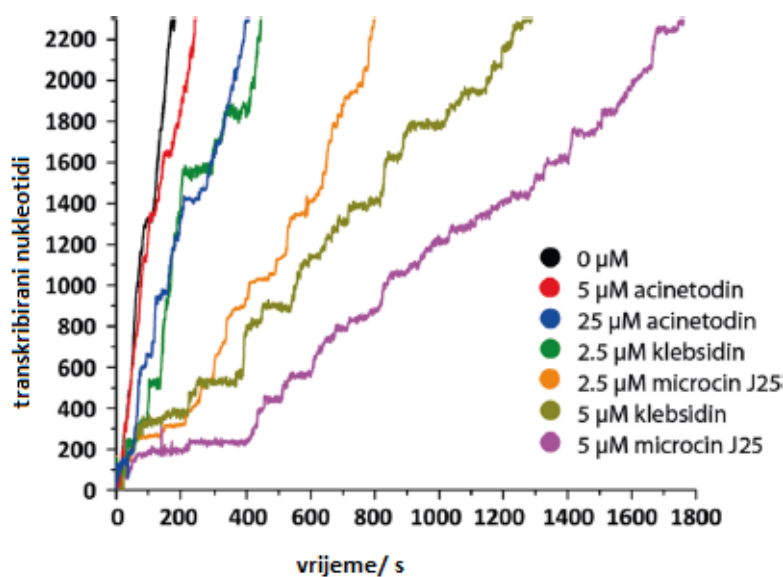
Acinetodin nije pokazao inhibiciju nekih Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija dok je klebsidin bio aktivan samo protiv soja *K.pneumoniae* pri visokim koncentracijama. S obzirom da je antimikrobna aktivnost mikrocina u mnogim slučajevima bila specifična napravljeno je ispitivanje unutarstanične toksičnosti rekombinantnog acinetodina i klebsidina prema akumulaciji stanica *E. coli*.<sup>6</sup> Sekrecija mikrocina J25 ovisi o aktivnosti transportera ATP-vezne kazete, a ekspresija *mcjABC* je toksična za stanicu. Napravljen je plazmid koji sadrži klaster za biosintezu klebsidina, izmjenjen *kleD* gen i sličan plazmid koji nosi *aciABC* gene.

Ekspresija *aciABC* gena značajno je usporila rast bakterije, a heterologna ekspresija *aciABCD* rezultirala je produkcijom acinetodina koji nije bio toksičan. Zaključeno je kako da unutarstanična akumulacija acinetodina i klebsidina inhibira rast stanice.<sup>6</sup>

Ekspresija *fhuA* iz *E. coli* daje otpornost stanicama *S. typhumurium* koje su osjetljive na MccJ25. Pretpostavljeno je kako ekspresija homologa *fhuA* iz soja koji kodira acinetodin i klebsidin može u *E. coli* onemogućiti ulazak lasso peptida i tako inhibirati rast. Istraženo je kako će ekspresija *fhuA* iz *K. pneumoniae* kod *E. coli* utjecati na osjetljivost prema klebsidinu i acinetodinu. Potvrđeno je kako je *E. coli*, koja eksprimira *fhuA* iz *K. pneumoniae*, osjetljiva na klebsidin, ali ne i na acinetodin

#### 6.3.5. Acinetodin i klebsidin kao inhibitori RNA-polimeraze

Testirana je mogućnost inhibicije elongacije RNA pomoću jedne molekule divljeg tipa RNA-polimeraze koristeći se metodom AFS (*eng. acoustic force spectroscopy*).<sup>6</sup> Ta tehnika omogućava rastezanje molekule DNA različitim silama dok istovremeno može mjeriti njezinu duljinu točnosti do nanometra. Korištenjem ove metode napravljen je medij u kojem se mogla napraviti kinetička analiza transkripcije te je pokazano kako acinetodin kao i klebsidin inhibiraju transkripciju kao i to da acinetodin slabije inhibira RNA-polimerazu što je vidljivo u razlici koncentracija između acinetodina i klebsidina koja je potrebna za približno istu razinu inhibicije. (slika 15).



Slika 15 Inhibicija RNA-polimeraze pri različitim koncentracijama MccJ25, klebsidina i acinetodina. Povećanjem koncentracije peptide dolazi do porasta inhibicije. Adaptirano prema *ACS Chem. Biol.* 12 (2017) 814-824

### 6.3.6. RNA-polimeraza otporna na inhibiciju

MccJ25 kao i capistruin vezanjem u sekundarni kanal RNA-polimeraze inhibiraju njen rad. Mutacijom u najvećoj podjedinici RNA-polimeraze onemogućuje se vezanje lasso peptida čime postaje otporna na MccJ25 i capistruin. Kako bi se otkrilo djeluje li ta mutacija i na klebsidin i acinetodin, testirala se transkripcija kod divljeg tipa i mutanta RNA-polimeraze *E. coli*. Kao transkripcijski predložak koristio se linearan fragment DNA s jakim promotorom i intrinzičnim terminatorom koji je bio nizvodno pozicioniran.

Kada je u uzorak bio izložen MccJ25 nije došlo do transkripcije kod divljeg tipa, dok kod mutanta MccJ25 nije imao utjecaja. Slično, je klebsidin inhibirao divlji tip pri svim koncentracijama, ali nije imao utjecaja na mutirani oblik. Acinetodin slabije inhibira RNA-polimerazu pa je bila potrebna veća koncentracija no također kod mutiranog oblika nije došlo do inhibicije. Može se zaključiti kako i klebsidin i acinetodin inhibiraju RNA-polimerazu putem sekundarnog kanala vezno mjesto im se djelomično ili u potpunosti preklapa s MccJ25.

Acinetodin slabije inhibira RNA-polimerazu od MccJ25 ili klebsidina. Osim RNA-polimeraze *E. coli*, MccJ25 inhibira i RNA-polimeraze iz gama-proteobakterija *P. aeruginosa* i *X. oryzae*, ali ne inhibira iz drugih gama-proteobakterija *Francisella tularensis*.<sup>6</sup> Capisturin iz *Burkholderia thailandensis* E264 također inhibira RNA-polimerazu iz *E. coli* i *P. aeruginosa*, ali ne iz *F. tularensis*.<sup>6</sup> Postoji mogućnost kako lasso peptidi koji inhibiraju RNA-polimeraze

drugih bakterija mogu djelomično korelirati sa genetičkom udaljenosti između bakterija i soja koji proizvodi lasso peptid. Dok  $\beta'$  podjedinica RNA-polimeraze *K. pneumoniae* ima 98% sličnosti s RNA-polimerazom *E. coli*,  $\beta'$  podjedinica RNA-polimeraze *Acinetobacter gillenbergii* CIP 110306 je svega 72% slična. Daljnjim testiranjem RNA-polimeraza različitih bakterija može se otkriti točno meta tj. specifičnost MccJ25, capistraina, klebsidina i acinetodina, spojeva koji nisu slični u sekvencama, ali se opet vežu na ista vezna mjesta barem jedne RNA-polimeraze.

## § 7. ZAKLJUČAK

Lasso peptidi su bioaktivni, kratki peptidi koji imaju jedinstvenu strukturu. Njihov se C-terminalni kraj provlači kroz vlastiti prsten nastao spajanjem N-terminusa s bočnim ograncima aminokiselina pri čemu nastaje karakteristična petlja. Ovakva struktura ih čini vrlo stabilnima. Uglavnom su otporni na visoke temperature, kisela stanja i većinu proteaza. Njihova sinteza i optimizacija su predmet proučavanja zadnjih nekoliko godina, kao i otkrića novih lasso peptida. Otkriće strukture, aminokiselinskog sastava kao i mehanizama djelovanja može uvelike rasvijetliti njihovu antibakterijsku aktivnost i inhibitorску aktivnost, razjasniti njihovo djelovanje kao blokatora određenih receptora ili HIV antagonista. Najbolje istražen lasso peptid je mikrocin J25, to je ribosomski sintetiziran i post-translacijski modificiran peptid koji ima iznimno veliku petlju i do danas je jedini poznati peptid čiji prsten i rep ostaju nepromijenjeni čak i nakon kidanja kovalentne veze.

Modificiranjem lasso peptida moguća je njihova upotreba u medicinske svrhe, no još uvijek je nepoznato do koje se mjere mogu modificirati, a da njihova struktura ostane donekle nepromijenjena. Postoje brojni problemi koje treba riješiti prije nego ih bude moguće upotrebljavati u medicinske svrhe. Treba razjasniti njihovu ulogu u prirodi, kada i kako se točno proizvode, upotpuniti njihovu biološku aktivnost kako bi se u potpunosti razumjela na molekularnoj razini. Ta istraživanja su tek na početku, a nema sumnje kako je to veliko područje puno potencijala o kojem se može još dosta toga saznati.

## § 8. LITERATURNI IZVORI

1. M. O. Maksimov, S. J. Pan, A. J. Link, *Nat. Prod. Rep.* **29** (2012) 996-1006.
2. N. Zhao, Y. Pan, Z. Cheng, H. Liu, *Springer-Verlag* **48** (2016) 1347-1356.
3. J. D. Hegemann, M. Zimmermann, X. Xie, M. A. Marahiel, *Acc. Chem. Res* (2015) A-K
4. P. A. Vincent, R. D. Morero, *Current Medicinal Chemistry* **16** (2009) 538-549
5. S. Rebuffat, *Biochem. Soc. Trans* **40** (2012) 1456-1462.
6. M. Metelev, A. Arseniev, L. B. Bushin, K. Kuznedelov, T. O. Artamonova, R. Kondratenko, M. Khodorkovskii, M. R. Seyedsayamdost, K. Severinov, *ACS Chem. Biol.* **12** (2017) 814-824
7. [http://www.publish.csiro.au/temp/CH16499\\_F1.jpg](http://www.publish.csiro.au/temp/CH16499_F1.jpg) (preuzeto 5.svibanj 2017.)