Riboprekidači kao nova meta za razvoj lijekova

Pelicarić, Marcela

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:217:137071

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-12**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Marcela Pelicarić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

RIBOPREKIDAČI KAO NOVA META ZA RAZVOJ LIJEKOVA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Morana Dulić

Zagreb, 2023. godina

Datum predaje prve verzije Završnog rada: 16. lipnja 2023.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita: 14. srpnja 2023.

Mentor rada: doc. dr. sc. Morana Dulić Potpis:

Sadržaj

§ 1. UVOD **7**
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME **8**
2.1. Što su riboprekidači? **8**
2.1.1. Otkriće riboprekidača *8*
2.1.2. Struktura i djelovanje *9*
2.1.3. Raznolikost riboprekidača *11*
2.2. Pogodni riboprekidači kao meta za lijekove **14**
2.2.1. FMN riboprekidač *14*
2.2.2. SAM I. riboprekidač *17*
2.2.3. Lizin riboprekidač *20*
2.2.4. TPP riboprekidač *23*
2.2.5. GlmS riboprekidač *28*
2.2.6. Purinski riboprekidač *30*
2.2.7. Kobalamin riboprekidač *31*
2.3. Potencijalni lijekovi? **33**
§ 3. LITERATURNI IZVORI **35**

§ Sažetak

Riboprekidači su nukleotidni sljedovi koji se nalaze u 5' netranslatiranim regijama glasničke RNA i reguliraju gene uključene u biosintetske puteve esencijalnih metabolita putem vezanja malih molekula liganada. Sada, više od 20 godina nakon njihova otkrića, razmatraju se kao mete za antibiotike. U ovom radu će se predstavit pregled nastanka i razmatranja ideje ciljanja riboprekidača za nove lijekove, isto kao i obrada najpogodnijih riboprekidača za tu svrhu. To su: flavin mononukleotid (FMN), S-adenozil metionin (SAM-I), lizin, tiamin pirofosfat (TPP), *GlmS*, purinski te kobalamin riboprekidači. Obradit će se njihove strukture, ligandi, mehanizmi djelovanja, biosintetski putevi u kojima sudjeluju, proteini čiju ekspresiju reguliraju, te će se obrazložiti zašto i koliko su pogodne mete za lijekove.

§ 1. UVOD

Antibiotska rezistencija rastući je problem današnjice. Većina antibiotika koji su u uporabi danas temelje se na desetljećima starim ugljičnim okosnicama (eng. *chemical scaffolds*) koji se adekvatno modificiraju u svrhu nastanka novih lijekova koji isto tako, ciljano ometaju samo četiri procesa unutar bakterija. Problem je nastao kada se ustanovilo da su nakon 80 godina korištenja antibiotika određene bakterijske bolesti postale teško lječive, odnosno da su bakterije koje ih uzrokuju razvile rezistenciju. Ona je direktno korelirana izlaganjem bakterija istim antibioticima. Ovaj problem postao je prioritet farmaceutske industrije od koje se hitno traže novi lijekovi sa novim mehanizmima. Jedan potencijalni put ka novim lijekovima su riboprekidači.[1,2]

Do nedavno se smatralo da molekule RNA nisu zanimljive u kontekstu razvoja novih antibiotika te kako ne bi mogle doprinijeti novim rješenjima protiv rastuće rezistencije. No, ispostavilo se da RNA molekule imaju svoju trodimenzionalnu strukturu te da se kao i proteini mogu smatati i stvarati različite strukture koje imaju potencijal raditi specifične veze s ligandima. Pojam riboprekidača prvotno se koristio kao naziv za mRNA molekule koje kontroliraju ekspresiju gena u bakterijama putem vezanja metabolita. Danas se taj pojam proširio i na razne druge vrste RNA koje su slične ovakvom djelovanju poput RNA koje vežu tRNA, metale ili odgovaraju na promjenu u temperaturi, međutim ovim radom će se pod terminom riboprekidača misliti na prvotnu definiciju pojma. [3,4]

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Što su riboprekidači?

2.1.1. Otkriće riboprekidača

Mehanizmi regulacije ekspresije gena su već dugo poznati te je naše shvaćanje bilo da tu ulogu u glavnini preuzimaju proteini.

Najčešći mehanizmi regulacije ekspresije gena obuhvaćaju signalizaciju proteinima te raznim drugim čimbenicima koji kontroliraju transkripciju i translaciju, te doradu ili razgradnju glasničke RNA (mRNA). Proteini su građeni od 20 aminokiselina koje im nude kemijsku raznolikost, a njihova trodimenzionalna struktura, bolje poznata kao tercijarna struktura, nudi im mogućnost ostvarivanja specifičnih veza s najrazličitijim ligandima. Molekule RNA građene su od 4 različita nukleotida te se dugo smatralo da im osim kemijske raznolikosti nedostaje i tercijarna struktura.

U raspravi svojeg rada o istraživanju rRNA genoma *Tetrahymena thermophila*, Kelly Kruger i sur. pišu: „pročišćena RNA imala je intrinzičnu sposobnost izvođenja triju reakcija cijepanja i najmanje dvije od reakcija ligacije za koje je dokazano da su uključene u prijevremeno rRNA prekrajanje kod *Tetrahymena*“. [5] Iako su ovim radom 1982. godine otkriveni riboprekidači, ime im je dodjeljeno tek 2002. godine od strane Breaker i sur. Oni su svoje istraživanje vršili na *Escherichia coli btuB* mRNA te je njime potvrđeno postojanje 5“-UTR (engl. *untranslated region*) sekvence koja selektivno veže koenzim B_{12}. Ustanovljeno je također da do ovoga dolazi bez utjecaja proteina.[6,7]

Riboprekidači su, dakle, strukturirane nekodirajuće domene RNA koje mnoge bakterije koriste. Nalaze se u 5'-UTR području glasničke RNA (mRNA) te utječu na ekspresiju gena vezanjem malih molekula kao što su vitamini (npr. spomenuti B_{12}), aminokiseline te nukleotidi.

Za njihovo djelovanje nužno je da imaju dvije sposobnosti: prepoznavanje molekula i mijenjanje konformacije (eng. *confirmational switching)*. Ova svojstva su im intrinzična te ne zahtijevaju prisutnost proteina.

Neke od ovih molekula RNA mogući su ostaci prastarog senzorskog i regulatornog sustava koji je bio korišten u „RNA svijetu“ [8] upravo zato što aptameri vežu molekule samostalno, odnosno bez pomoći proteina. [9,10]

Riboprekidači su prisutni u svim domenama života, te reguliraju biosintezu i transport aminokiselina, esencijalnih metabolita kao što su koenzimi, dušične baze i njihovi derivati na način da vežu male molekule. Međutim, ne javljaju se u ljudima. Ova činjenica ih, među ostalima, čine dobrom skupinom molekula za istraživanje novih antibiotika.[11]

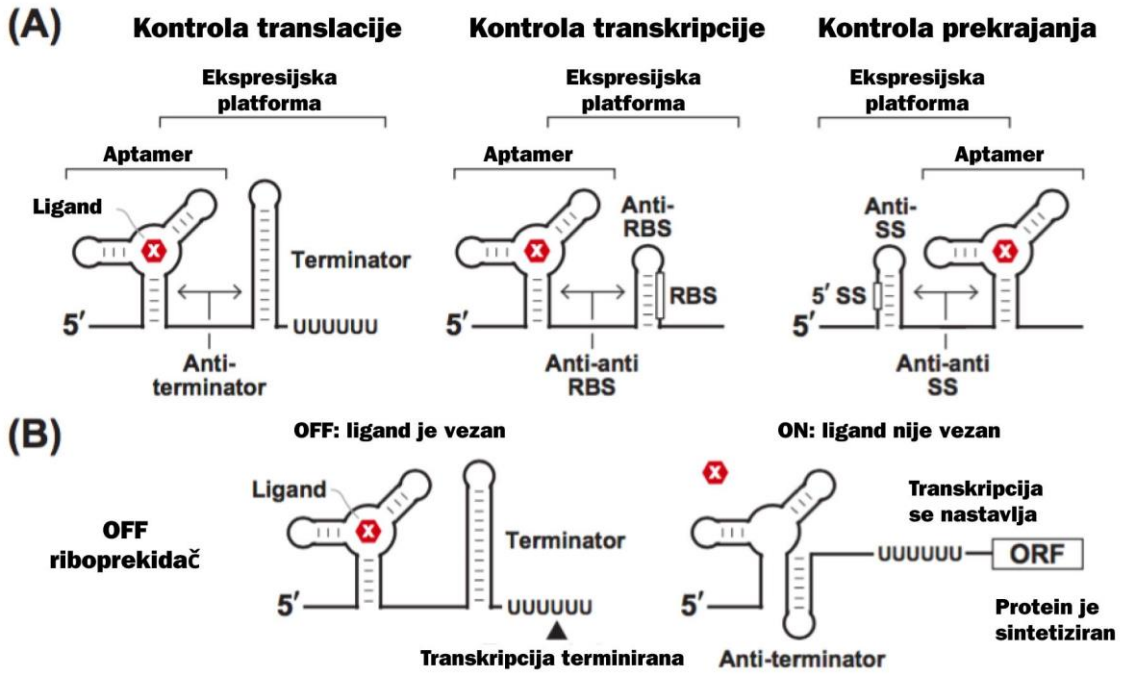
2.1.2. Struktura i djelovanje

Građeni su od dvije domene: senzorske i regulatorne.

Senzorska domena je zapravo kratka, jednolančana DNA ili RNA, bolje poznata kao aptamer. Ona prepoznaje i veže ligande na sebe s visokim afinitetom i specifičnošću. Ovo ostvaruje svojom tercijarnom strukturom koja je smotana na karakterističan način uz postojanje utora odnosno „džepova“ gdje bi ovi ligandi mogli biti specifično vezani.

Nizvodno od aptamera odnosno senzorske domene se nalazi regulatorna domena, odnosno ekspresijska platforma. Ona pretvara specifično vezanje molekula u relevantni regulatorni signal. Ovo se postiže alternativnim smatanjem ekspresijske platforme. Vezanje liganda na senzorsku domenu inducira konformacijske promjene koje onda posljedično utječu na konformacijske promjene ekspresijske platforme, a time i na funkciju. Alternativno smatanje najčešće inducira jedan od tri mehanizama: terminaciju transkripcije, inicijaciju translacije ili neki drugi proces ekspresije gena kao što je to npr. prethodno spomenuto RNA prekrajanje (engl. *RNA splicing*) koje se odvija u eukariotskim stanicama (Slika 1).

Jednostavniji riboprekidači imaju samo jedan aptamer i jednu ekspresijsku platformu. Zato imaju mogućnost prepoznavanja i vezanja samo jednog liganda, a kontrolu u tom slučaju vrše samo jednim mehanizmom.[10,12]



Slika 1. (A) Najčešće korišteni mehanizmi regulacije riboprekidačima kontrolom translacije (lijevo), kontrolom transkripcije (sredina) te kontrolom prekrajanja (desno). (B) Prikaz različitog strukturalnog izgleda RNA molekule kada je ligand vezan (lijevo) koji potiskuje ekspresiju gena, za razliku kada ligand nije vezan (desno) što dozvoljava nastavak i dovršavanje procesa. Skraćenice: ORF, eng. *open reading frame* (otvoreni okvir čitanja); RBS, eng. *ribosome-binding site* (vezno mjesto ribosoma); SS, eng. *splice site* (mjesto prekrajanja)[10]

Mehanizmi prikazani na slici 1 se u suštini mogu svesti na četiri ista koraka: 1. smatanje aptamera, 2. smještanje (eng. *docking*) liganda, 3. inducirano smatanje ekspresijske platforme, 4. prekinuto/nastavljeno djelovanje RNA-polimeraze.

Bitno je za istaknuti (kao što je vidljivo na slici 1) da dolazi do preklapanja aptamera i eskpresijske platforme. Ta činjenica zapravo je ključna za rad tih mehanizama.

Naime, postoje dva moguća slučaja djelovanja riboprekidača na transkripciju i translaciju.

Prvi bi bio da vezanje liganda uzrokuje konformacijsku promjenu aptamera koji posljedično (zbog njihovog preklapanja) uzrokuje konformacijsku promjenu ekspresijske platforme. Prilikom transkripcije dolazi do formiranja intrizične terminacijske drške koja potiče terminaciju transkripcije sa krajem načinjenim od sekvence ponavljajućih uracila (U). Prilikom

translacije dolazi do izdvajanja ribosomskog veznog mjesta (RBS). Oba slučaja dovode do isključivanja nizvodnog gena ili operona. Riboprekidači ovakvog mehanizma djelovanja zovu se OFF-prekidači.

U drugim slučajevima, ligandom inducirana konformacijska promjena dovodi do stvaranja anti-terminatorske peteljke ili oslobađanja RBS-a iz terminatorske peteljke nakon čega slijedi aktivacija nizvodnih gena ili operona. Sukladno tome, riboprekidači ovakvog djelovanja nazivaju se ON-prekidači.

Do aktivacije ovih mehanizama djelovanja dolazi kada koncentracija odgovarajućih liganada prijeđe određeni prag.

Neki manje rašireni, ali također poznati mehanizmi regulacije su: interferencija transkripcije ili moguće *antisense* djelovanje, dvojna kontrola transkripcije i translacije te djelovanje samocijepajućeg ribozima ovisno o ligandu. [10,12]

2.1.3. Raznolikost riboprekidača

Riboprekidači javljaju se u sve tri domene života: *Bacteria, Archaea* i *Eukaryota*.

Kao što je prethodno spomenuto, rijetko se javljaju u eukariotima, poznati je jedino TPP riboprekidač koji je (osim u bakterijama) nađen u nekim gljivama, algama i biljkama. Bakterijski riboprekidači su postojani u Gram-negativnim bakterijama, a često se pojavljuju u Gram-pozitivnim bakterija ma. [13]

Danas postoji preko 55 okarakteriziranih razreda riboprekidača kojima je određena funkcija u stanici[14], ali nisu svi jednako relevantni za istraživanje novih antibiotika. Od interesa su oni riboprekidači koji se javljaju u ljudskim patogenima.

Tablica 1. Distribucija riboprekidača. Tablica prikazuje informacije zastupljenosti 28 najzastupljenijih riboprekidača. (Preuzeto i prilagođeno iz ref 13)

	Vrsta riboprekidača	Broj vrsta	Broj bakterija	Broj ljudskih patogena, %		Sve sekvence	Bakterijske sekvence
1	TPP	6201	5624	48	81.35%	12,593	8762
2	Kobalamin	5174	5140	36	61.02%	14,211	9343
3	FMN	3281	3216	41	69.49%	4153	3672
4	Glicin	3019	2974	21	35.60%	4617	3532
5	SAM I	2503	2461	20	33.90%	6026	3976
6	Fluorid	1561	1460	11	18.64%	2138	1601
7	*c*-di-GMP	1499	1474	16	27.12%	4748	3188
8	Lizin	1379	1356	24	44.68%	2261	1859
9	*C*-di-AMP	1285	1268	2	3.39%	3917	2611
10	ZTP	1414	1212	3	5.08%	1673	1196
11	Purin	985	962	17	28.81%	2703	1730
12	GlmS	920	912	26	40.68%	943	922
13	Gvanidin – II	788	740	5	8.47%	1001	797
14	Moco	775	733	9	15.25%	1270	896
15	Mn^{2+}	736	708	13	22.03%	832	757
16	Gvanidin – I	702	688	5	8.48%	901	736
17	SAH	687	668	3	13.56%	861	736
18	Gvanidin – III	613	607	5	8.48%	665	633
19	SAM II/SAM V	462	456	2	3.39%	593	463
20	PreQ1-I	410	408	15	25.42%	532	462
21	SAM-IV	373	351	5	8.47%	792	342
22	*c*-di-GMP II	339	330	6	10.17%	660	484
23	SAM-SAH	207	203	–	–	251	210
24	AdoCbl	192	189	2	3.39%	341	195
25	Glutamin	105	87	–	–	1125	120
26	PreQ1-II	65	58	4	6.78%	69	58
27	Mg^{2+} senzor	40	33	9	15.25%	42	33
28	PreQ1-III	12	11	–	–	37	20

Imena razreda riboprekidača dana su po molekuli koju oni vežu kao ligand. Ligande se vežu s visokim afinitetom te vrlo specifično. Ovo svojstvo također postavlja dobre temelje za racionalno dizajniranje potentne strukture lijeka koji bi mogli djelovati kao analozi prirodnih liganada koje bi inače vezali. Ovim putem bi se onemogućili procesi koje riboprekidač kontrolira, prekinula bi se ekspresija nekih nužnih gena što bi za posljedicu dovelo do smrti bakterijske stanice.[15]

U tablici 1 prikazana je poveznica između najzastupljenijih 28 okarakteriziranih razreda riboprekidača koji se javljaju u bakterijama s brojnošću pojave istih u patogenim bakterijama za ljude.

Najraširenij je TPP riboprekidač koji se javlja čak u 6201 vrsta, od kojih su 5624 bakterije (Tablica 1), odnosno u određenom udjelu je prisutan i u eukariotima. Javlja se u 48 patogenih bakterija za ljude (Tablica 1.), među kojima se nalaze: *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella typhi*/*Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus pneumoniae*. Većinu ih je Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) navela kao prioritetne patogene za istraživanje i razvoj novih antibiotika, budući da su otporni na antibiotike . [16]

Da bi bio meta novih antibiotika, osim što riboprekidač treba biti prisutan u ljudskim patogenima, treba vršiti kontrolu ekspresije esencijalnih gena, pritom djelujući kao OFF-prekidač.[17] Isto tako, vezno mjesto liganda na riboprekidaču trebalo bi imati džep koji je pogodan za vezanje lijeka sa visokim afinitetom. Nisu sva vezna mjesta jednako pogodna za lijekove, mogu biti prevelika, premala, previše izložena otapalu ili prepolarna. Ono što je dodatno doprinijelo istraživanjima je činjenica da trenutačno postoji više od 300 kristalnih strukura riboprekidača dostupnih u Protein Databank (PDB). [15,18] Također, hoće li neki riboprekidač biti dobra meta za lijekove ovisi o tome u kakvom biosintetskom putu sudjeluju proteini čiju regulaciju on regulira. Ako je put pretjerano razgranat, odnosno ako postoji više biosintetskih puteva kojim bakterija dolazi do željenog produkta, a da ih pritom ne možemo sve utišati djelovanjem riboprekidača, to može biti nepovoljno.

Uzimajući sve ovo u obzir, broj riboprekidača pogodnih za istraživanje lijekova se dodatno suzio.

Tablica 2. Pogodnost riboprekidača da budu antibakterijska meta. Podijeljeni su u 4 kategorije. Najpogodniji (+++) riboprekidači, jako pogodni (++), djelomično pogodni (+), nepogodni (-). Ako je kontroliran import proteina stoji oznaka (-/✓), a ako se odvijaju dva paralelna aerobna i anaerobna biosintetska puta stoji oznaka (*). (Preuzeto i prilagođeno iz ref 16).

Riboprekidač	Put biosinteze kontroliran riboprekidačom	Transportni protein kontroliran rjboprekidačom	Alternativni biosintetski put koji nije pod kontrolom riboprekidača	Pogodnost
FMN	✓	✓	-	+++
SAM-I	✓	✓	-	+++
Lizin	✓	✓	-	+++
TPP	✓	-/✓	-	++/+++
glmS	✓	-	-	++
Purin	✓	-	✓	+
Kobalamin	✓*	-	✓	+
SAH	-	-	✓	–

Najpogodniji su oni kod kojih riboprekidač vrši kontrolu nad sintezom esencijalnih metabolita, ali i kontrolu staničnog unosa te da ne postoji alternativni metabolički put u kojem sudjeluje.

2.2. Pogodni riboprekidači kao meta za lijekove

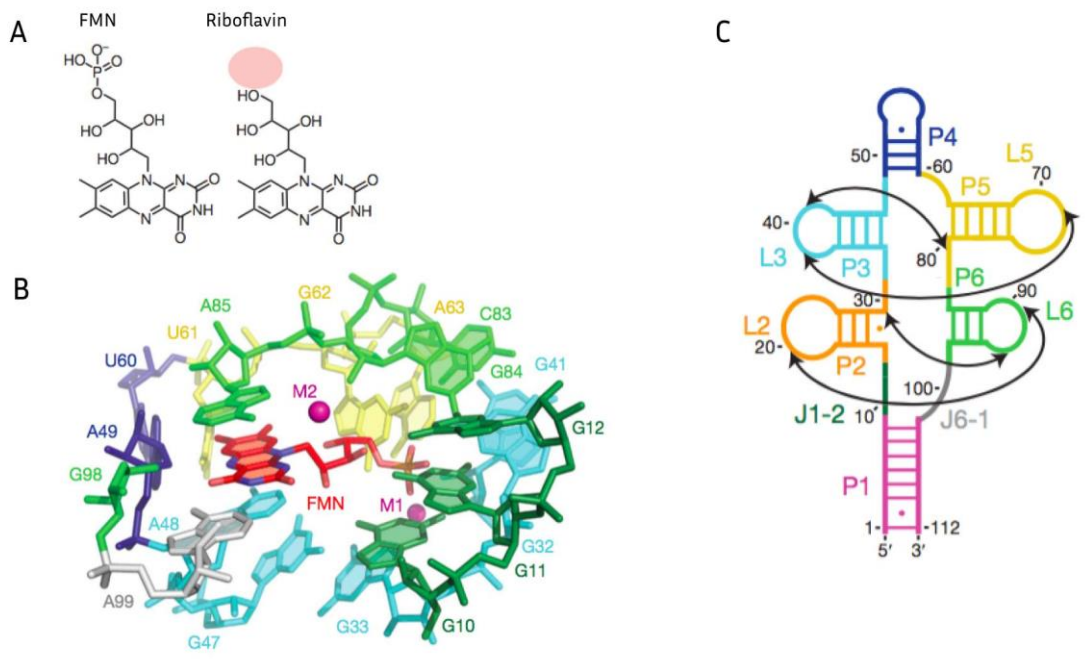
2.2.1. FMN riboprekidač

Flavin mononukleotid (FMN) (Slika 2a) riboprekidač regulira ekspresiju gena koji su uključeni u biosintezi riboflavina te njegovih transportnih proteina.

Riboflavin (B_2) je prekursor za FMN i flavin adenin dinukleotid (FAD). On ima veliku ulogu u oksidativnoj fosforilaciji, β-oksidaciji te Krebsovom ciklusu. Riboflavin i FAD također se mogu vezati za riboprekidač, ali ne sa dovoljnim afinitetom što je nužno kako bi došlo do konformacijske promjene koje bi dovele do regulacije ekspresije gena (kao što to može FMN).

Ovaj riboprekidač je među najraširenijima u ljudskim patogenima, s njih čak 41 (tablica 1) od kojih ih se 7 nalaze na WHO listi prioriteta za borbu protiv antibiotske rezistencije. Činjenice da je aptamer visoko očuvan, da ne postoje njegovi duplikati u ljudskim stanicama te njegova zastupljenost ukazuju na to da je on potencijalno dobra meta antibiotika širokog spektra korištenja. [15,16]

Za razliku od uobičajene strukture riboprekidača – kolerilarno slaganje susjednih heliksa, struktura FMN riboprekidača (slika 2b,c) se sastoji od šest drški spojenih suprotno usmjerenih, ali gotovo identično spojenih perifernih regija čime tvori strukturu nalik leptiru (slika 2c). FMN u ovoj strukturi leži asimetrično spojen tvoreći specifične interakcije s RNA preko izoaloksazinskog prstena te izravnog kontakta sa fosfatnim ostatkom ili kontaktom ostvarenim preko magnezijevih iona. Istraživanja upućuju na to da je naprijed svijena tercijarna struktura RNA i prepoznavanje FMNa posredovano konformacijskim promjenama unutar strukturalnog džepa. Savitljivost njegovog veznog mjesta i postojanost većih otvora u strukturi je ono što ga čini još zanimljivijim i pogodnijim za istraživanje lijekova.[19]



Slika 2. (A) Struktura FMN i riboflavina. Roza sfera predstavlja koji dio strukture riboflavina odstupa od FMN, (B) Trodimenzionalna struktura FMNa u veznom mjestu FMN riboprekidača, Roza kuglice predstavljaju dva Mg^{2+} iona, (C) Shematski prikaz FMN riboprekidača. Strelicama su naznačene bitne dalekosežne interakcije. (Preuzeto i prerađeno iz ref 19)

Terminalna fosfatna grupa FMN-a veže se za aptamer direktno vodikovim vezama kao i posredovano Mg^{2+} ionima te su te interakcije neophodne za ostvarivanje dovoljno jake interakcije sa riboprekidačem. Zbog manjka fosfatne skupine, riboflavin ima puno manji afinitet.

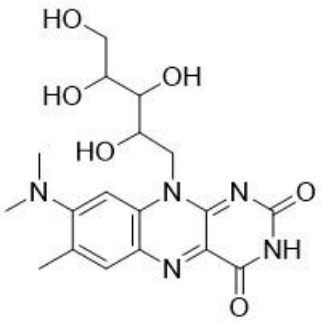
Očekivano bi bilo da vezanje liganda na njegov pripadni riboprekidač inducira veliku konformacijsku promjenu, međutim kod FMN riboprekidača to nije tako. Vezno mjesto ovog riboprekidača ima sličnu konformaciju i u slučaju kada FMN nije vezan i u slučaju kada je.[15,19]

Pokazano je računalno kemijskim metodama da je za očekivati da će se ligandi slični lijekovima vezati na vezno mjesto uzevši u obzir da ono ima potencijal ostvarivati hidrofobne i hidrofilne interakcije. [20]

FMN riboprekidač potvrđena je meta za antibiotsko djelovanje roseoflavina (slika 3). Roseoflavin je prirodni analog kojeg proizvodi *Streptomyces davawensis* te ima potvrđeno

antibiotsko djelovanje. U svojoj fosforiliranoj formi (RoFMN), roseoflavin inhibira rast *Bacillus subtilis, Escherichia coli* i *Listeria monocytogenes* na način da djeluje na FMN riboprekidač. Ovime se prekida proizvodnja riboflavina i transporta. Bez riboflavina, stanica ne može pravilno dobivati i skladištiti energiju, što dovodi do njene smrti. [21]

Antibiotsko djelovanje roseoflavina odvija se putem FMN riboprekidača, međutim otkriveno da je da se roseoflavin, osim na FMN riboprekidač, veže i na flavoenzime. Ostvarivanje interakcija sa neciljnim molekulama u organizmima nepoželjno je te smanjuje efikasnost djelovanja antibiotika. Roseoflavin zbog ovog razloga nije specifičan ligand te samim time nije najbolji kandidat za lijek. Također, jedan od razloga kliničke beskorisnosti roseoflavina je brza pojava rezistentnih spojeva. [15,21,22]



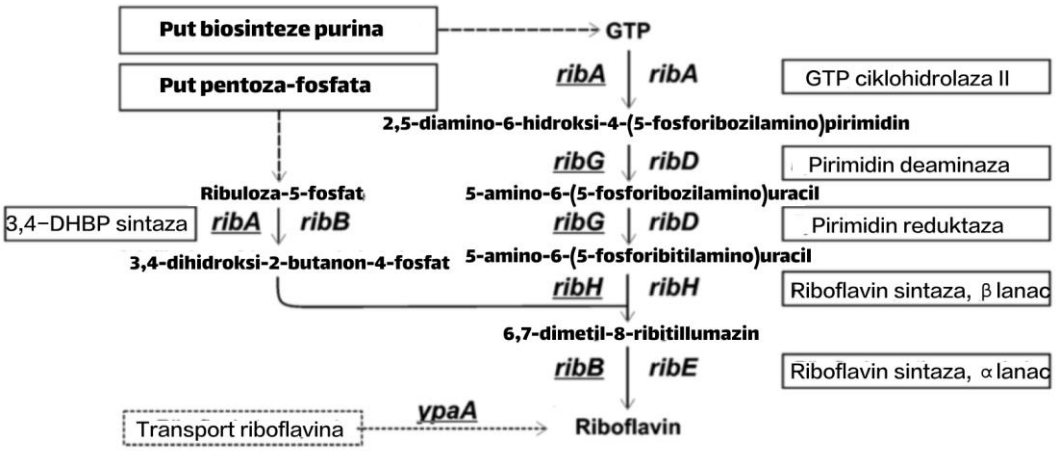
Slika 3. Struktura roseoflavina

FMN riboprekidač regulira ekspresiju gena na dva načina: terminacija transkripcije i inhibicija translacije (slika 1).

Riboprekidač koji djeluje preko mehanizma terminacije transkripcije se nalazi u 5'UTR djelu mRNA *ribDEAHT* (*ribD*) operona koji kodira za 5 enzima potrebnih za sintezu riboflavina: pirimidin deaminaza, pirimidin reduktaza , riboflavin sintaza alfa domene, GTF ciklohidrolaza/ 3,4-dihidroksi-2butanon-4-fosfat sintaza i beta podjedinicu riboflavin sintaze. Vezanjem FMNa dolazi do formiranja terminatora transkripcije s motivom ukosnice što zaustavlja sintezu *ribD* mRNA.

Drugi mehanizam djelovanja je preko inhibicije translacije te se ti riboprekidači nalaze u *uraA* ili *fmnP* genu. Oni kodiraju za transporter riboflavina. Vezanje FMNa dovodi do inhibicije translacije prikrivajući RBS mjesto.[16,23,24]

Sinteza FMNa je linearni biokemijski proces (slika 4) te da bi se prekinuo sintetski put, dovoljno je inhibirati samo jednu reakciju. [16] Linearni biosintetski put je dodatno ono što FMN riboprekidač čini pogodnijim kao metu za lijekove.



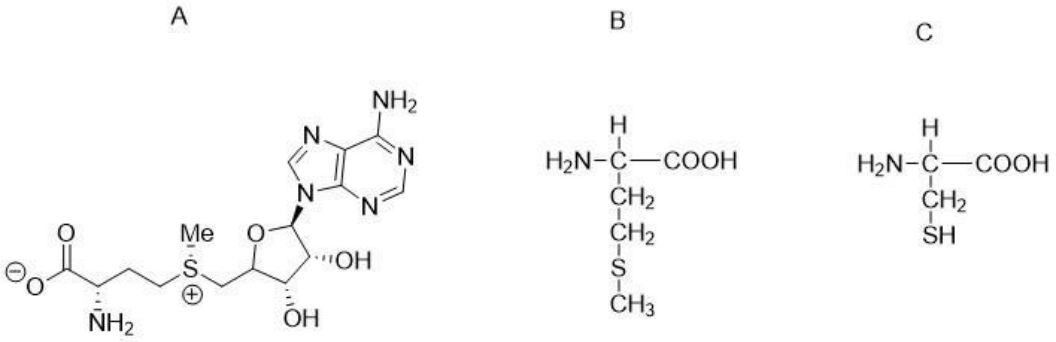
Slika 4. Biosintetski put riboflavina u bakteriji *Bacillus subtilis*. (Preuzeto i prilagođeno iz ref 19).

2.2.2. SAM I. riboprekidač

S-adenozil metionin (SAM) riboprekidač, odnosno SAM-I (ili *S-box leader*) regulira ekspresiju gena koji kodiraju za proteine uključene u biosintezu metionina i cisteina u Gram-pozitivnim bakerijama.

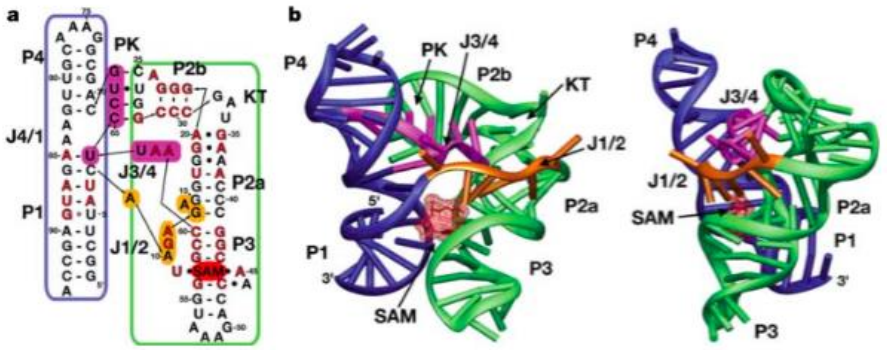
SAM (slika 5a) je esencijalan koenzim u svim organizmima i direktno se sintetizira iz metionina. [16] Aminokiseline koje sadrže sumpor (cistein (slika 5c) i metionin (slika 5b)) su sintetizirane *de novo* u mnogim mikroorganizmima i biljkama nakon asimilacije sumpora homocisteinom ili cisteinom. Osim što je SAM neophodan za razne metiltransferazne reakcije u tijelu, metionin je univerzalna N-terminalna aminokiselina proteina, što ukazuje na važnost prisutnosti metionina u organizmu.[25]

SAM-I riboprekidač je zastupljen u 20 ljudskih patogena (tablica 1), od kojih su 2 na WHO popisu prioriteta osmišljanja novih antibiotika.



Slika 5. Strukture (A) SAM, (B) metionin, (C) cistein

Aptamer ovog riboprekidača je sastavljen od serije strukturnih motiva peteljke i stabljika-petlja koje su povezane u centrirani motiv četverosmjernog spoja (slika 6). [26]



Slika 6. (A) sekundarna struktura aptamera SAM-I riboprekidača. Crveno su označene95% očuvane sekvence. Uokvirene boje pokazuju dvije domene aptamera. (B) trodimenzionalna struktura. Prikaz od naprijed (lijevo), bočni prikaz (desno). (Preuzeto i prilagođeno iz ref 26).

Struktura se stabilizira s dva skupa koaksijalno naslaganih zavojnica. Oni se slažu pod oštrim kutem, a između njih se nalazi vezno mjesto za ligand. Interakcije između dvije domene aptamera se stabiliziraju pakiranjem mali utor-mali utor te sa regijama koje su povezane s petljom druge domene koja tvori tercijarnu strukturu s prvom domenom. Kao što se za puno riboprekidača pretpostavlja, radi se o unaprijed smotanoj strukturi koja se sastoji od

koaksijalnog slaganja spirala i tercijarnih strukturnih elemenata izvan veznog mjesta za ligand koji služe za lakše prepoznavanje liganada, u ovom slučaju SAM.

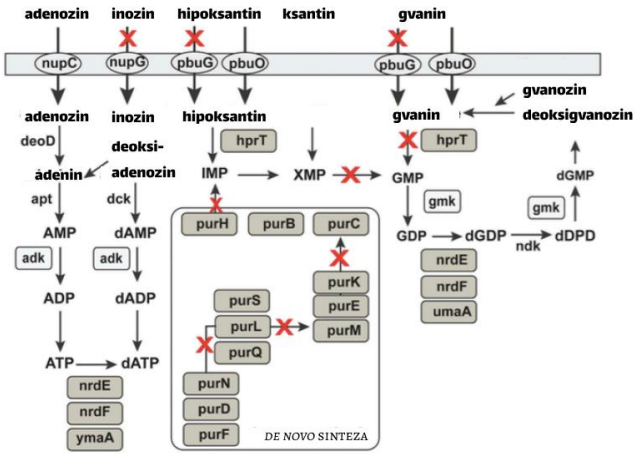
SAM-I riboprekidač uglavnom poprima trans konformaciju tako da su adenozilna i metioninska skupina usmjereni jedan od drugog. [26]

Zanimljivo kod ovog riboprekidača je da ima više njegovih analoga, odnosno riboprekidača koji prepoznaju isti ligand, ali na drugačiji način. SAM-I riboprekidač, kao što smo opisali, veže ligand između dvije zavojnice, dok SAM-II zarobi SAM u RNA tripleks, a SAM-III interkalira SAM u trosmjernoj spojnici. Zapravo se razlikuju u prepoznavanju metioninskog djela: SAM-I interagira direktno i s afinitetom, SAM-II ima manje kontakta, a SAM-III nema nikakvog kontakta s metioninskim djelom.[3]

SAM-I riboprekidač regulira ekspresiju gena preko dva već prethodno spomenuta mehanizma: terminacija transkripcije i inhibicija translacije. Međutim, ti mehanizmi mogu se razlikovati ovisno o kojoj bakteriji je riječ.

U *E. coli*, represor MetJ se veže na ponavljajuću „MET box“ sekvencu: (5'-AGACGTCT-3') i prekida transkripciju većinu gena koji sudjeluju u sintezi metionina. U *B. subtilis*, ovi geni su regulirani stvaranjem terminatora u obliku ukosnice. Do ovoga dolazi vezanjem SAM na očuvanu vodeću sekvencu: „S-box“, što inducira stvaranja ukosnice i dovodi do terminacije transkripcije. U slučaju da SAMa nema, dolazi do stvaranja antiterminatora te se transkripcija nastavlja. [25]

Biosintetski putevi cisteina i metionina nešto su složeniji (Slika 7).



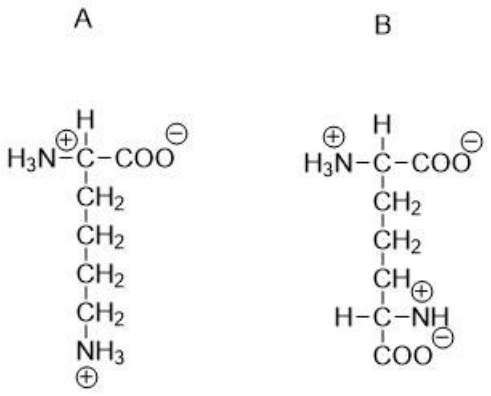
Slika 7. Sintetski putevi cisteina i metionina u *B. subtilis*. Sivim pravokutnicima označeni su enzimi koji su pod regulacijom SAM-I riboprekidača. Crvenim križićima označene su reakcije koje se mogu zaustaviti SAM-I riboprekidačom. (Preuzeto i prilagođeno iz ref 16).

Hickey i sur. shvatili su da ligandi nekih razreda riboprekidača imaju intrinzično svojstvo fluorescencije te sadrže strukturne sličnosti sa fluorescentnim analozima. Napravili su probir visoke protočnosti za ligande SAM-I riboprekidača u svrhu pronalaska najboljeg strukturnog analoga koji može ostvarivati zadovoljavajuće interakcije sa riboprekidačem, slično kao što se radi prilikom istraživanja lijekova. Uspješno je sintetiziran fluorescentni analog SAMa. [27]

2.2.3. Lizin riboprekidač

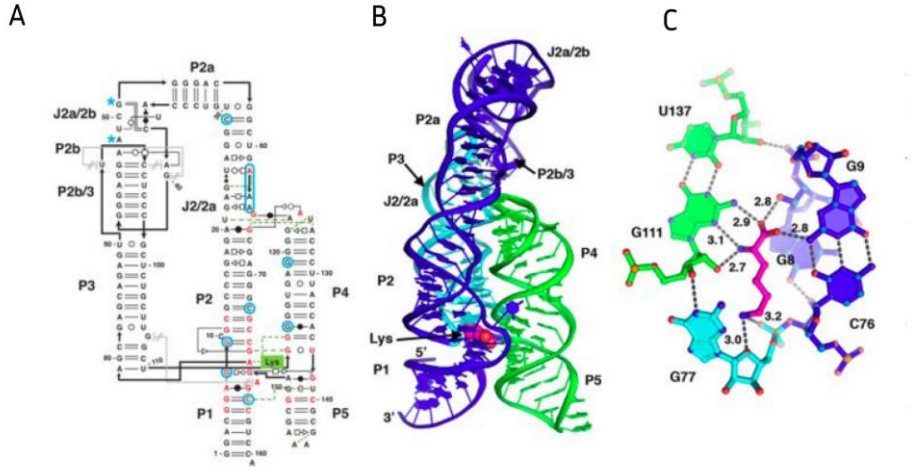
Lizin riboprekidač, ili „*L-box*“, ima senzorsku domenu koja prepoznaje aminokiselinu lizin (Lys).

Bakterije proizvode lizin iz aspartata. Lizin (slika 8) je nužan za proizvodnju proteina kao i sintezu stanične stijenke (sinteza peptidoglikana) te diaminnopimelata (DEP) koji je također kod nekih bakterija nužna komponenta stanične stijenke. [28,29] Lizin riboprekidač se javlja u 25 ljudskih patogena (tablica 1), od kojih je 5 na listi prioriteta WHO-a za razvoj novih antibiotika.



Slika 8. Struktura (A) lizina, (B) DAP

Struktura aptamera je centrirana oko konzerviranog peterostrukog spojnog motiva, čiji su sljedovi nukleotida i preko 90% očuvani. (slika 9)



Slika 9. (A) sekundarna struktura lizin riboprekidača u bakteriji *T. maritima*, (B) tercijarna struktura u tri boje označavajući tri drukčija lanca. Lizin je vezan u središtu strukture (crveno/rozo), (C) vodikove veze koje se ostvaruju izumeđu lizina i nukleotida L-boxa. (Preuzeto i prerađeno iz ref 30).

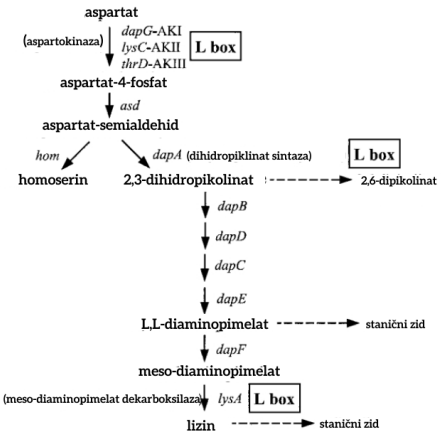
Sastoji se od tri seta koaksijalno naslaganih zavojnica koje su orijentirane gotovo paralelno jedno drugoj. Ovakva struktura je stabilizirana ostvarenim interakcijama terminalnih petlji. Vezno mjesto se nalazi u središtu peterosmjerne petlje. Karboksilna skupina lizina veže se

vodikovim vezama, dok amino skupina uspostavlja elektrostatske interakcije. Diskriminacija liganada ostvarena je zbog indirektnim prepoznavanjem amino skupine na bočnom ogranku [30]

Lizin riboprekidač kodira za gene *lysC*, *asd*, *dapA*, *dapB*, *lysA* te ima drugačije mehanizme regulacije njihove ekspresije ovisno o organizmu u kojem se nalazi.

U Gram-pozitivnim bakterijama, vezanje lizina inducira stvaranje motiva ukosnice koji je popraćen sekvencom bogatom timinima.

U Gram-negativnim bakterijama, ekspresija ovih gena regulirana je inhibicijom translacije. Dolazi do stvaranja motiva ukosnice koji prikrije RBS te sprječava vezanje ribosoma na mRNA i time početak translacije.



Slika 10. Biosintetski put lizina u *B. subtilis*. Geni koji su regulirani lizin riboprekidačem označeni su s „L-box“. (Preuzeto i prerađeno iz ref 28).

Sintetski put lizina (slika 10) je linearni put, slično kao kod FMNa. Moguće je blokirati prvi korak biosinteze lizina. Enzim aspartokinaza kodirana je genima koji su pod regulacijskom kontrolom lizin riboprekidača. Na ovaj način se odmah zaustavlja reakcijski put.

Lizin riboprekidač je bio u središtu istraživanja koje razmatraju potencijal riboprekidača kao mete antimikrobnih sredstava. Razlog ovome je što je zamijećena rezistencija prema

analozima lizina kao što je to S-(2-aminoetil)-L-cistein (AEC) u *E. coli* i *B. subtilis* kao rezultat mutacije unutar lizin riboprekidača koji regluira *lysC* gen.[30]

Ispostavilo se da rezistencija na AEC proizlazi iz toga da je njegova meta lizil-tRNA-sintetaza. Lizin bi bio primarni ligand koji se veže na riboprekidač, ali sličan je u strukturi AEC (a ako je sličan u strukturi, može se vezati na riboprekidač pod točnim okolnostima, zato se i razmatraju kao meta za lijekove). AEC je primarni ligand koji se veže na sintetazu, ali budući da sintetaza loše diskriminira svoje ligande, može se dogoditi da se veže i lizin. Pri povečanoj koncentraciji lizina, sintetaza brže i lakše dolazi do njega, za razliku od AECa. AEC se u tim okolnostima onda veže na riboprekidač, što dovodi do "mutacije" u djelovanju riboprekidača, jer iako su strukturno slični, najvjerojatnije ne ostvaruju najpogodnije interakcije koje bi omogućilo njegovo potpuno djelovanje.[31]

2.2.4. TPP riboprekidač

Tiamin pirofosfat (TPP) riboprekidač jedini je do sada pronađeni riboprekidač koji je prisutan u sve tri domene života, a pritom je najprominentniji te se i javlja čak u 48 ljudskih patogena (tablica 1) među kojima se puno njih nalazi na WHO popisu prioritetnih lijekova što ga čini pogodnim za istraživanje. Kao što je prethodno rečeno, javlja se u eukariotskim organizmima, npr. u gljivama čime se mogu razvijati antimikotici, ali se ne javlja u ljudima. Ovime se eliminira mogućnost nepoželjnih reakcija sa ljudskim tijelom.

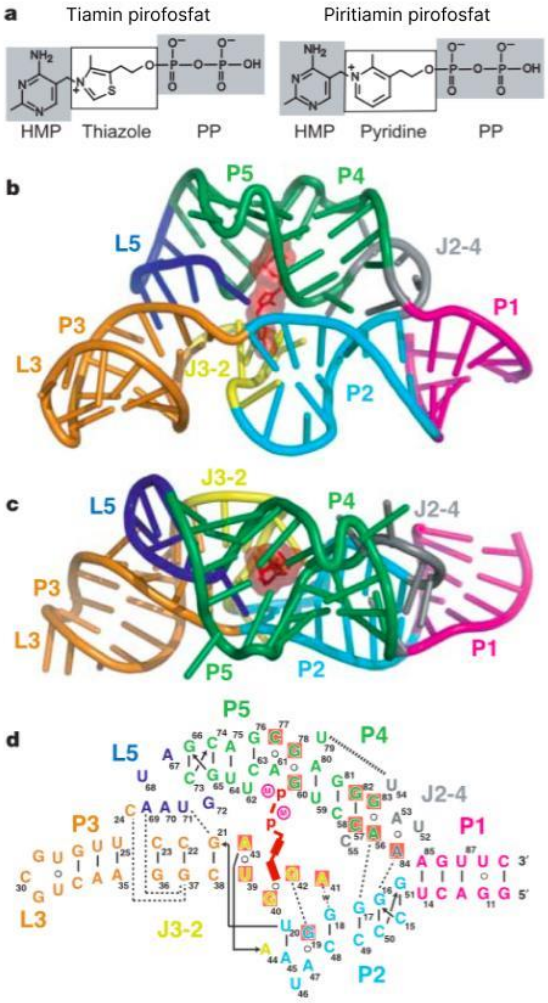
Iako je najzastupljeniji riboprekidač među ljudskim patogenima, kompleksnost biosintetskih puteva na koje djeluje može značajno otežati istraživanje lijekova.

Ovaj riboprekidač regulira ekspresiju gena bitnih za sintezu i transport TPP-a [32] (kao i njegovih fosforiliranih metabolita[33]) koji je esencijalan kofaktor u raznim reakcijama metaboličkih puteva. Poseban je još po tome što ima najraznovrsnije mehanizme regulacije među kojima su regulacije degradacije mRNA, Rho-ovisna terminacije transkripcije, prekrajanja (slika 1), terminacije transkripcije stvaranjem intrinzičnog terminatora (slika 1) i inhibicije translacije kroz prikrivanje ribosomskih veznih mjesta (RBS). [34]

Prilikom istraživanja metabolizma tiamina, kao strukturalni analog se sintetizirao piritiamin (PT). On se u stanicama fosforilirao i tvorio piritiamin pirofosfat (PTPP) (slika 8a) koji ima sličan afinitet vezanja na riboprekidač kao što to ima TPP (slika 8a). PTPP koristio se

kao antimikotik, ali kao i za većinu lijekova, njegov mehanizam djelovanja bio je nepoznat. Nakon otkrića riboprekidača otkriveno je da se mehanizam odvijao upravo preko TPP riboprekidača, terminacijom ekspresije gena. Ovo je potvrdilo TPP riboprekidač kao dobru metu za lijekove. Kao dodatna potvrda, nađeno je da je u bakterijama koje su otporne na PT postoje mutacije u genetskom kodu koji kodira za TPP riboprekidač, što ponovno ukazuje na to da je on zapravo meta. [15] A objašnjenje zašto je PTPP u stanju također terminirati ekspresiju gena leži u strukturi samog riboprekidača.

Postoje detaljni podatci o strukturi TPP riboprekidača te njegovih liganada (slika 11).



Slika 11. Struktura TPP riboprekidača i njegovih liganada. (a) Strukturna formula TPP i PTPP, (b) i (c) struktura senzorske domene TPPa, (b) prikaz od naprijed, (c) prikaz odozgora, (d) shematski prikaz smatanja tercijarne strukture RNA. (Preuzeto i prerađeno iz ref 33).

Za razliku od uobičajenog načina na koji ligandi uspostavljaju interakcije s RNA, preko njenih utora, TPP se postavlja okomito na helikalne domene te koristi odvojene džepove za ostvarivanje interakcija u izduženoj konformaciji.

Radi se o kompleksnoj trodimenzionalno smotanoj strukturi RNA u kojoj jedna domena sadrži džep za interkalaciju 4-amino-5-hidroksimetil-2-metil-pirimidinski (HMP) ostatak TPPa, dok druga domena sadrži širi džep koji koristi dvovalentne metalne ione i molekule vode kako bi ostvario vezu sa ostatkom TPPa vezanim u prvoj domeni. Ova dva džepa pozicionirana su tako da samo vežu krajeve molekula, a ne i središnji dio čime zapravo ne dolazi do vezanja

središnjeg dijela TPPa niti PTPPa, već samo veže krajeve molekula koji su im isti. Osim stvaranja interakcijskog mosta između dvije domene, TPP riboprekidač uspostavlja tercijarni kontakt s drugim dijelovima molekule koji stabilizira cijelu strukturu.

TPP kao negativno nabijena molekula je kod riboprekidača vezan u velikom džepu sa parom Mg^{2+} iona koji su pozicionirani i sa izravnim vodikovim vezama sa RNA te vodikovim vezama koje su posredovane vodom. [33]

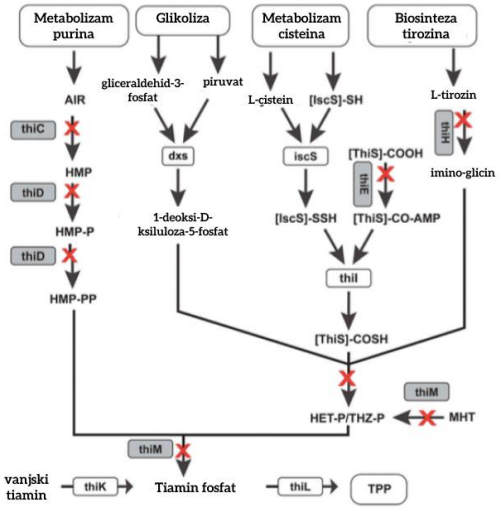
Dva su najčešća mehanizma djelovanja ovog riboprekidača su inhibicija translacije i terminacija transkripcije.[12]

Terminacija transkripcije promatrana je na bakteriji *B. subtilis*. Uzrokovana je vezanjem TPPa na riboprekidač u *tenA* mRNA operonu čime se inducira terminacija transkripcije formiranjem terminatora u obliku ukosnice (slika 1). Kada TPP nije prisutan, dolazi do stvaranja antiterminatora (opet u obliku ukosnice) (slika 1) te se transkripcija neometano nastavlja. [16]

Inhibicija translacije promatrana je na *E. coli*. Domena aptamera TPPa nalazi se u *thiC* genu. Ako je TPP prisutan, veže se na receptor te tvori motiv ukosnice koji svine i prikrije Shine-Dalgarno (SD) sekvencu, onemogućujući ribosomu da započne sa translacijom.

Heliks *thiM* mRNA TPP riboprekidača osjeti hidroksimetilpirimidin (HMP) i veže TPP prepoznavanjem donora i akceptora vodikove veze oko HMPa te također preko specifičnih π interakcija slaganja. Vezanje TPPa zapravo stabilizira aptamer što za posljedicu ima stvaranje terminatora tj. motiva ukosnice. Još jedan nađeni motiv je da umjesto prikrivanja SD sekvence, dođe do prikrivanja veznog mjesta ribosoma čime se onemogućuje translacija. [35]

Biosinteza tiamin difosfata u *E. coli* odvija se preko više metaboličkih puteva (slika 12). Regulacija HET i HMP ostvarena je preko *thiBPQ* ABC transportera i *thiMD* operona. [16,36]



Slika 12. Biosintetski putevi tiamina u *E. coli*. Siva područja označavaju korake koji su enzimatski regulirani jednim od TPP genskih produkata. Crvene križići označavaju korake kojima se mogu spriječiti biosinteza i transport TPPa pomoću regulacije TPP riboprekidača. (Preuzeto i prerađeno iz ref 16).

Biosintetski put proizvodnje TPPa je razgranati te bi bila potrebna inhibicija više koraka u svrhu prekida sinteze (slika 12).

Otkriveno je da postoje bakterije u kojima TPP riboprekidač dodatno regulira i svoj transporter. [37] Ovo postavlja dodatne mogućnosti promatranja mehanizama za potencijalne lijekove, ali predstavlja i potencijalne poteškoće.[16]

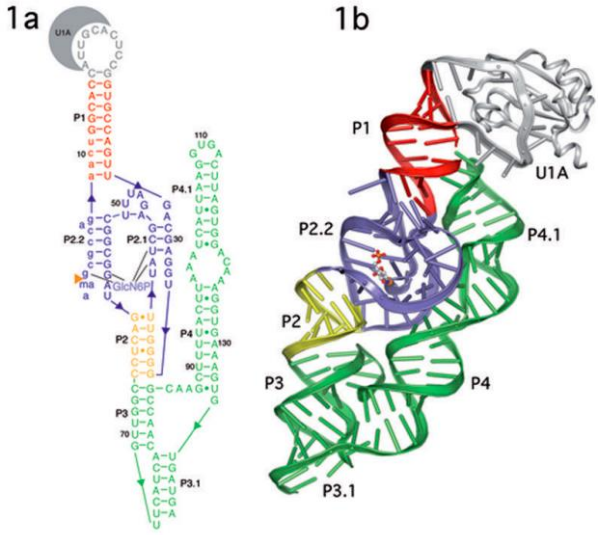
Primjer bakterije kod koje bi se moglo iskoristiti ovo svojstvo je *Treponema denticola*, ljudski oralni patogen. Ona nema *de novo* sintezu tiamin pirofosfata, što bi značilo da joj treba vanjski unos TPPa. Identificiran je klaster gena koji kodira TPP ABC transporter s TPP vezujućim proteinom, transmembranskom permeazom i ATPazom. Ovi geni su zajedno transkribirani i smataju operon čiji promotor inicijaciju prepozna σ 70 podjedinica. J. Bian i sur. pokazali su da je ekspresija ova tri gena negativno regulirana TPPom te da je posredovana TPP riboprekidačem ($Td_{thi\text{-}box}$).[16]

2.2.5. GlmS riboprekidač

GlmS riboprekidač nalazi se u 5-UTR regiji gena za sintezu glukozamin-6-fosfat sintetaze (*glms* gen) koja prevodi glutamin i fruktozu-6-fosfat u glukozamin-6-fosfat (GlcN6P).

GlcN6P je bitan metabolit za normalan rast bakterije, a i bitan prekursor za sintezu stanične stijenke bakterije. Javlja se u 26 ljudskih patogena (tablica 1) te se čak njih 6 nalazi na WHO popisu prioritetnih bakterija za razvoj novih antibiotika. Nije među pogodnijim riboprekidačima kao meta za lijekove jer ne regulira mehanizam transporta esencijalnih proteina, što bi ga činilo još pogodnijim za istraživanje jer bi se stanicu moglo izgladniti i od esencijalnih proteina čiji import bi bio reguliran ciljanjem riboprekidača (tablica 2). Glms riboprekidač je i riboprekidač i ribozim (molekule RNA koje imaju katalitička svojstva).

Struktura mu je određena rentgenskom strukturnom analizom (slika 13).[16,38]



Slika 13. (A) sekundarna struktura i (B) tercijarna struktura GlmS riboprekidača u *B. anthracis*. (Preuzeto i prerađeno iz ref 38).

Struktura je sadržana od 4 molekule koje se nalaze u asimetričnom rasporedu te su povezane intramolekulskim vezama posredovane proteinom te skupa tvore dimer dimera. Tercijarna struktura je kompaktna i sadržana od spiralnog niza naslaganih helikalnih struktura koji se oslanja na susjedni helikazni niz. Vezanje GlcN6P se ostvaruje prepoznavanjem

fosfatnog i šećernog ostatka molekule. Dva hidridana Mg^{2+} iona ostvaruju kontakt s fosfornom grupom dok glukozaminski prsten ostvaruje direktnu interakciju s RNA. Ovaj način prepoznavanja sličan je TPP riboprekidaču. Jezgra riboprekidača je i do 97% očuvana.[38]

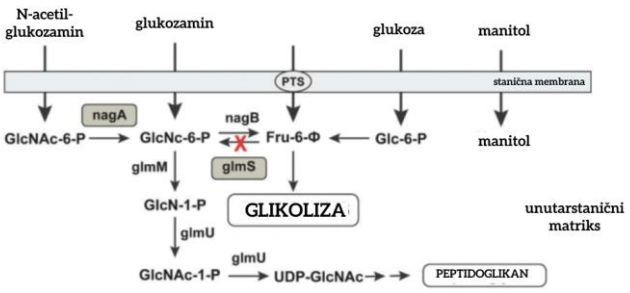
Zanimljivost je da vezanjem liganda ne dolazi do konformacijske promjene niti promjene u strukturi aktivnog mjesta.

GlmS riboprekidač je samoizrezujući (prekrajanje) ribozim koji koristi GlcN6P kao kofaktor da katalizira reakciju izrezivanja. Najčešće se javlja u Gram-pozitivnim bakterijama. Vezanjem GlcN6P na *glmS* riboprekidač inducira se samoizrezivanje koji proizvede uzvodni fragment sa 2',3'-ciklički fosfat te nizvodni fragment sa 5'-OH ostatkom. Ostatak RNA je brzo razgrađen djelovanjem RNaze. Ovo ukazuje na to da GlmS riboprekidač djeluje i na stabilnost mRNA te da je stabilnost povezana s GlcN6P.

McCarthy i sur. su proveli istraživanje o tipovima liganada koje bi GlmS riboprekidač mogao vezati te su ustanovili da je amino grupa GlcN6P esencijalna za katalizu. [39]

Kao analozi GlcN6P, najperspektivniji se čine carba-GlcN6P, 6-deoksi-6-fosfonometil i 6-O-malonil-eter, no njihovo antibakterijsko djelovanje nije potvrđeno. Do sada se računalno-kemijskim metodama nije pronašao spoj koji bi uspostavio dovoljno jake interakcije u svrhu regulacije riboprekidača. [15]

Ovim riboprekidačom može se inhibirati samo jedna reakcija biosintetskog puta GlcN6P (slika 14). Međutim, postoje tri sintetska puta koja omogućavaju da bakterija ipak dođe do željenog produkta.



Slika 14. Biosinteza glukozamin-6-fosfata. Sivim pravokutnicima označeni su geni pod regulacijom GlmS riboprekidača. Crvena križić označava koju reakciju je moguće inhibirati djelovanjem riboprekidača. (Preuzeto i prerađeno iz ref 15).

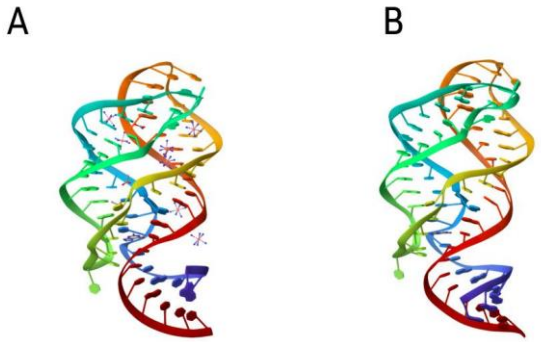
Budući da postoji nedosljednost u dostupnim podatcima, potrebna su daljnja istraživanja.

2.2.6. Purinski riboprekidač

Purinski riboprekidači se javljaju u 17 ljudskih patogena (tablica 1) te se njih 3 nalazi na WHO listi prioriteta istraživanja novih antibiotika.

Purinski riboprekidači se dijele u dvije podskupine, odnosno na adeninski riboprekidač i gvaninski riboprekidač. Oni reguliraju biosintezu proteina koji sudjeluju u sintezi purina. Purini su bitni u sintezi nukleotida i replikaciji DNA. Dio su vitalnih molekula poput ATP, GTP, cikličkog AMP, NADH i koenzima A.

Gvaninski i adeninski aptameri su identični (slika 15), tj. razlikuju se samo u jednom nukleotidu na 74. mjestu, čime se razlikuje specifičnost vezanja liganada. [16]



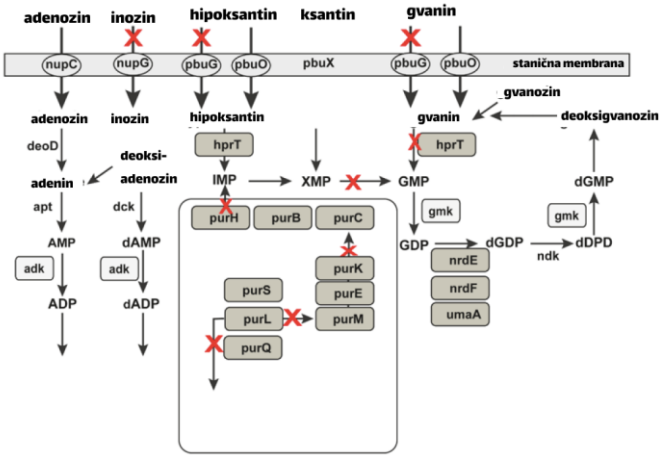
Slika 15. Tercijarne strukture (A) gvaninskog riboprekidača vezanog za gvanin (PDB; ID: 6UBU) i (B) adeninskog riboprekidača (PDB; ID: 5SWE). (Preuzeto i prerađeno iz PDB).

Gvaninski i adeninski riboprekidači imaju očuvane sekvence aptamera i ekspresijske platforme.

U Gram-negativnim bakterijama javlja se mehanizam regulacije inhibicije translacije, dok se u Gram-pozitivnim bakterijama javlja regulacija terminacije transkripcije.

Najviše se istraživao riboprekidač koji kontrolira *pbuE* gen. On kodira za membranski protein koji sudjeluje u prijenosu purina preko membrane. Za gvanin je najviše istražen

riboprekidač koji regulira *xpt* gen. On kodira ksantin-fosforibozil-transferazu, enzim koji sudjeluje u metabolizmu purina.[16,40]

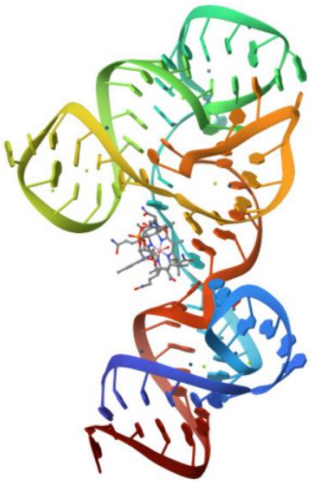


Slika 16. Metabolizam purina u *B. subtilis*. U sivim pravokutnicima nalaze se esencijalni geni. Crveni križići predstavljaju puteve koji se mogu blokirati djelovanjem purinskih riboprekidača. (Preuzeto i prerađeno iz analitičkih podataka ref 16)

2.2.7. Kobalamin riboprekidač

Kobalamin riboprekidač (slika 17) nalazi se u 5'-UTR regiji mRNA koji kodira za proteine koji sudjeluju u biosintezi B12 u bakterijama – *cob* geni.

Vitamin B_{12} je topiv u vodi te je u bakterijama uključen u sintetske puteve klorofila i hema. Kobalamin riboprekidač nađen je u 36 ljudskih patogena.[16]

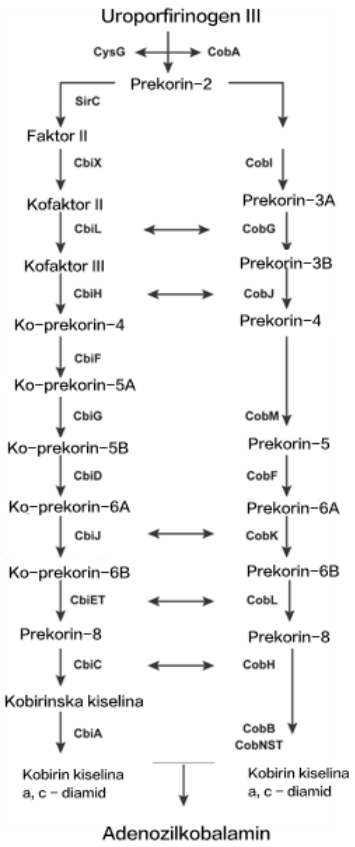


Slika 17. Tercijarna struktura kobalamin riboprekidača (PDB; ID: 4FRG). (Preuzeto i prerađeno iz PDB).

Struktura je sadržana od četiri RNA lanca koje su koaksijalno složene, a između njih leži vezno mjesto. U veznom mjestu, ligand ne ostvaruje vodikove veze punim potencijalom, već se dodatno uspostavljaju van der Waalsove interakcije, hidrofobne i elektrostatske. [41]

Ovaj riboprekidač koristi mehanizam terminacije transkripcije i inhibicije translacije na prethodno opisane načine.

Kobalamin je sintetiziran putem dva biosintetska puta (slika 18.) u aerobnim i anaerobnim bakterijama te i kobalamin riboprekidač regulira drugačije gene u ta dva sintetska puta. Ali ipak, dolazi do sličnih gena u oba sintetska puta, primjeri takvih parova su: CbiET-CobL, CbiA-CobB, Cbic-CobH, CbiJ-CibK, CbiL-CobI i CysG-CobA. Postotak preklapanja ovih parova je između 20% i 40%, što bi značilo da ne bismo uspjeli napraviti molekulu koja bi mogla ciljati oba sintetska puta uspješno. [16]



Slika 18. Aerobni i anaerobni biosintetski but kobalamina. Obostrane strelice označavaju parove gena odvojenih sintetskih puteva koji imaju preklapanje 20-40%. (Preuzeto i prerađeno iz analitičkih podataka ref 16)

2.3. Potencijalni lijekovi?

Riboprekidači su zanimljiva meta za nove lijekove te ima tri temeljna razloga zašto je tome tako.

Prvo, riboprekidači su evoluirali tako da prepoznaju male molekule. Prethodno su mnoge molekule RNA bile podvrgnute istraživanjima u svrhu nalaženja novih lijekova, međutim vezanje malih molekula nije primarna fiziološka funkcija RNA te takva istraživanja nisu uspjela zbog slabe selektivnosti molekula.

Drugo, riboprekidači se dominantno nalaze u bakterijskim stanicama, a ne u eukariotskima (uz izuzetak TPP riboprekidača). Zbog ovoga, vjerojatnost nepoželjnih mehanističkih reakcija je neznatna, odnosno mala je vjerojatnost da će doći do neželjene reaktivnosti u ljudskom tijelu (koji ne sadrži riboprekidače).

Treće, poznati riboprekidači koriste sveprisutne i esencijalne metabolite kao i sekundarne glasnike koji su često povezani sa genetičkim materijalom (mRNA) koje kodiraju bitne proteine za njihov opstanak. [3]

Većina antibiotika koji su u kliničkoj upotrebi koriste ribosom kao metu djelovanja. Strukture kompleksa ribosom-antibiotik pokazuju da skoro svi vežu rRNA, a ne ribosomske proteine. Ovo potvrđuje RNA kao metu za lijekove.[42]

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. K.F. Blount, R.R. Breaker, *Nat Biotechnol* **24** (2006) 1558–1564.
2. F. Edwards, A. MacGowan, E. Macnaughton, *Medicine (United Kingdom)* **49** (2021) 632–637.
3. K.E. Deigan, A.R. Ferré-D'Amaré, *Acc Chem Res* **44** (2011) 1329–1338.
4. A. Serganov, E. Nudler, *Cell* **152** (2013) 17–24.
5. K. Kruger, P.J. Grabowski, A.J. Zaug, J. Sands, D.E. Gottschling, T.R. Cech, Copyright© 1982 by MIT, 1982.
6. A. Nahvi, N. Sudarsan, M.S. Ebert, X. Zou, K.L. Brown, R.R. Breaker, *Chem Biol* **9** (2002).
7. E. Mehdizadeh Aghdam, M.S. Hejazi, A. Barzegar, *Gene* **591** (2016) 244–259.
8. H.B. White, Journal of Molecular Evolution Coenzymes as Fossils of an Earlier Metabolic State, 1976.
9. D. Antunes, L.H.S. Santos, E.R. Caffarena, A.C.R. Guimarães, *Int J Mol Sci* **23** (2022).
10. K. Kavita, R.R. Breaker, *Trends Biochem Sci* **48** (2023) 119–141.
11. C.E. Lünse, A. Schüller, G. Mayer, *International Journal of Medical Microbiology* **304** (2014).
12. R.R. Breaker, *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4** (2012).
13. N. Pavlova, D. Kaloudas, R. Penchovsky, *Gene* **708** (2019) 38–48.
14. P.J. Mccown, K.A. Corbino, S. Stav, M.E. Sherlock, R.R. Breaker, *RNA* **23** (2017).
15. V. Panchal, R. Brenk, (2021).
16. N. Pavlova, R. Penchovsky, *Expert Opin Ther Targets* **23** (2019).
17. J.J. Trausch, Z. Xu, A.L. Edwards, F.E. Reyes, P.E. Ross, R. Knight, R.T. Batey, *Proc Natl Acad Sci U S A* **111** (2014).
18. K.D. Warner, C.E. Hajdin, K.M. Weeks, *Nat Rev Drug Discov* **17** (2018).
19. A. Serganov, L. Huang, D.J. Patel, *Nature* **458** (2009) 233–237.
20. R.J. Melander, D. V. Zurawski, C. Melander, *Medchemcomm* **9** (2018).
21. R. Mora-Lugo, J. Stegmüller, M. MacK, *Microb Cell Fact* **18** (2019).
22. M. Mack, S. Grill, *Appl Microbiol Biotechnol* **71** (2006).
23. E.R. Lee, K.F. Blount, R.R. Breaker, *RNA Biol* **6** (2009).
24. A.G. Vitreschak, D.A. Rodionov, A.A. Mironov, M.S. Gelfand, Regulation of Ribo¯avin Biosynthesis and Transport Genes in Bacteria by Transcriptional and Translational Attenuation, n.d.
25. D.A. Rodionov, A.G. Vitreschak, A.A. Mironov, M.S. Gelfand, *Nucleic Acids Res* **32** (2004).
26. R.K. Montange, R.T. Batey, *Nature* **441** (2006).
27. S.F. Hickey, M.C. Hammond, *Chem Biol* **21** (2014).
28. F.J. Grundy, S.C. Lehman, T.M. Henkin, *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (2003).
29. D.A. Rodionov, A.G. Vitreschak, A.A. Mironov, M.S. Gelfand, *Nucleic Acids Res* **31** (2003).
30. A.D. Garst, A. Héroux, R.P. Rambo, R.T. Batey, *Journal of Biological Chemistry* **283** (2008).
31. S.F. Ataide, S.N. Wilson, S. Dang, T.E. Rogers, B. Roy, R. Banerjee, T.M. Henkin, M. Ibba, *ACS Chem Biol* **2** (2007) 819–827.
32. N. Sudarsan, S. Cohen-Chalamish, S. Nakamura, G.M. Emilsson, R.R. Breaker, *Chem Biol* **12** (2005).

33. A. Serganov, A. Polonskaia, A.T. Phan, R.R. Breaker, D.J. Patel, *Nature* **441** (2006).
34. L. Bastet, P. Turcotte, J.T. Wade, D.A. Lafontaine, *RNA Biol* **15** (2018).
35. L. Bastet, A. Chauvier, N. Singh, A. Lussier, A.M. Lamontagne, K. Prévost, E. Massé, J.T. Wade, D.A. Lafontaine, *Nucleic Acids Res* **45** (2017).
36. E. Webb, K. Claas, D. Downs, *Journal of Biological Chemistry* **273** (1998).
37. J. Bian, H. Shen, Y. Tu, A. Yu, C. Li, *J Bacteriol* **193** (2011).
38. J.C. Cochrane, S. V. Lipchock, S.A. Strobel, *Chem Biol* **14** (2007).
39. T.J. McCarthy, M.A. Plog, S.A. Floy, J.A. Jansen, J.K. Soukup, G.A. Soukup, *Chem Biol* **12** (2005).
40. A. Reining, S. Nozinovic, K. Schlepckow, F. Buhr, B. Fürtig, H. Schwalbe, *Nature* **499** (2013).
41. M.F. Soulière, A. Haller, T. Santner, R. Micura, *Angewandte Chemie - International Edition* **52** (2013).
42. J.A. Sutcliffe, *Curr Opin Microbiol* **8** (2005).