

# Izoleucil-tRNA-sintetaza kao meta za razvoj antibiotika

---

Kokić, Goran

Undergraduate thesis / Završni rad

2012

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:217:818065>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI  
FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

**Isoleucil-tRNA-sintetaza kao meta za  
razvoj antibiotika**

*Isoleucyl-tRNA synthetase as a target for antibiotic  
development*

SEMINARSKI RAD: Goran Kokić

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

Zagreb, 2012.

## **POPIS KRATICA ZA AMINOKISELINE:**

|     |   |             |
|-----|---|-------------|
| Ala | A | alanin      |
| Arg | R | arginin     |
| Asn | N | asparagin   |
| Asp | D | aspartat    |
| Cys | C | cistein     |
| Gln | Q | glutamin    |
| Glu | E | glutamat    |
| Gly | G | glicin      |
| His | H | histidin    |
| Ile | I | izoleucin   |
| Leu | L | leucin      |
| Lys | K | lizin       |
| Met | M | metionin    |
| Phe | F | fenilalanin |
| Pro | P | prolin      |
| Ser | S | serin       |
| Thr | T | treonin     |
| Trp | W | triprofan   |
| Tyr | Y | tirozin     |
| Val | V | valin       |

## **SADRŽAJ:**

|                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. UVOD.....</b>                                           | <b>1</b>  |
| <b>2. AMINOACIL-tRNA-SINTETAZE (aaRS).....</b>                | <b>3</b>  |
| 2.1. Uloga i osnovna obilježja.....                           | 3         |
| 2.2. Podjela na dvije klase.....                              | 3         |
| <b>3. IZOLEUCIL-tRNA-SINTETAZA (IleRS).....</b>               | <b>4</b>  |
| 3.1. Strukturna obilježja i mehanizam popravka.....           | 4         |
| 3.2. IleRS karakteristične za pojedine domene života.....     | 5         |
| 3.3. Prokariotske IleRS koje nalikuju eukariotskim.....       | 6         |
| <b>4. aaRS KAO METE ZA RAZVOJ ANTIBIOTIKA.....</b>            | <b>7</b>  |
| <b>5. IleRS KAO META ZA RAZVOJ ANTIBIOTIKA.....</b>           | <b>8</b>  |
| 5.1. Mupirocin.....                                           | 8         |
| 5.1.1. Opća obilježja mupirocina.....                         | 8         |
| 5.1.2. Klinička primjena i spektar djelovanja.....            | 9         |
| 5.1.3. Biosinteza mupirocina.....                             | 10        |
| 5.1.4. Način djelovanja i tipovi otpornosti na mupirocin..... | 10        |
| 5.1.5. Potraga za uspješnijim analozima.....                  | 13        |
| 5.1.6 Analози tiomarinola.....                                | 16        |
| 5.2. Reveromicin A.....                                       | 17        |
| <b>6. ZAKLJUČAK.....</b>                                      | <b>19</b> |
| <b>7. POPIS LITERATURE.....</b>                               | <b>20</b> |
| <b>8. SAŽETAK.....</b>                                        | <b>22</b> |
| <b>9. SUMMARY.....</b>                                        | <b>23</b> |

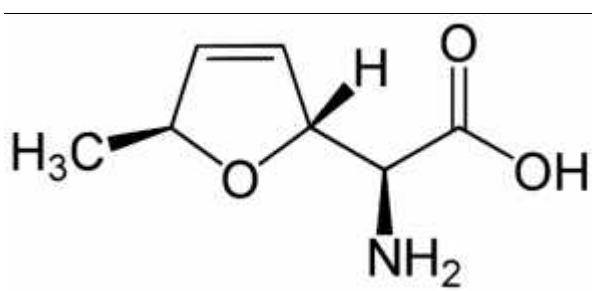
# 1. UVOD

Dosad eksploatirane velike skupine antibiotika, poput glikopeptida, makrolida, aminoglikozida, tetraciklina i rifampicina, pokazale su se kao neprocenjivo oružje u borbi protiv mikrobioloških patogena, zaustavljajući sintezu stanične stijenke bakterija ili inhibirajući sintezu esencijalnih makromolekula: proteina, DNA i RNA.<sup>(1)</sup> No aktivna klinička primjena navedenih antibiotika selektirala je brojne rezistentne sojeve, dok horizontalni prijenos gena katalizira širenje otpornosti među dalekosrodnim organizmima. U potrazi za novim antibioticima i njihovim potencijalnim metama, zanimanje je privuklo 20 obitelji aminoacil-tRNA-sintetaza (aaRS), enzima koji kataliziraju nastajanje esterske veze između pripadnog para aminokiseline i tRNA u procesu neophodnom za vijabilnost stanica. Zrakasta evolucija ovih enzima proizvela je značajne razlike u primarnoj strukturi eukariotskih i prokariotskih ortologa, što čini osnovu za diskriminatornu inhibiciju. Usprkos značajnim naporima uložnim u razvijanje potentnih selektivnih inhibitora aaRS, ideja nije zaživjela u praksi. Mupirocin, agens koji inaktivira bakterijski tip izoleucil-tRNA-sintetaze (IleRS), uz 10 000 puta slabije djelovanje na eukariotkog ortologa, jedini je trenutno takav komercijalno dostupan lijek.<sup>(1, 2)</sup>

Neke su se aaRS pokazale kao prikladnije mete za razvoj antibiotika. Razlog tome jest povećanje hidrofobnosti i veličine veznog džepa za supstrate u tih aaRS, kako bi u njih smjestile glomaznije aminokiseline, što dozvoljava veći energetski prinos pri vezanju inhibitora. IleRS se unutar obitelji aaRS izdvojila kao jedna od potentnijih meta za razvoj antibiotika. Razlikujemo više tipova ovog enzima; arhealni, bakterijski i eukariotski, među kojima u aktivnom mjestu postoje diskretne, no dovoljno velike razlike za sintezu selektivnih inhibitora. Problem predstavlja IleRS otkrivena u nekih prokariota koja pokazuje veće sličnosti s eukariotskim tipom enzima, uključujući i otpornost na antibiotike. Velik entuzijazam pokrenulo je otkriće mupirocina, antibiotika koji zaustavlja sintezu proteina u prokariota, okupirajući supstrat-vezno mjesto IleRS. Pokazao se kao jedan od rijetkih antibiotika učinkovitih protiv meticilin-rezistentnog soja bakterije *Staphylococcus aureus*. No, nedavne su studije pokazale kako je 12 % izolata spomenutog soja u španjolskim, odnosno čak 45% u turskim bolnica, već otporno na visoke koncentracije mupirocina, upravo zbog brzog horizontalnog širenja gena koji kodira IleRS nalik eukariotskom tipu.<sup>(3)</sup>

Mupirocin i reveromicin A, najistraživaniji inhibitori IleRS, identificirani su među produktima koje u prirodi luči bakterija *Pseudomonas fluorescens*, odnosno bakterije roda *Actinomyces*. Iako u prirodnoj formi pokazuju značajnu baktericidnu aktivnost, organska sinteza otkrila je kako postoji ogroman potencijal razvoja još potentnijih analoga. Prilikom optimizacije antibiotika nužno je imati u vidu različite faktore: selektivnost i stabilnost spoja, toksičnost, vezanje na proteine i biodostupnost, citoplazmatsku koncentracija kompetirajuće aminokiseline, mogućnost ulaska u stanicu i mikrobicidan potencijal spram ključnih patogena.<sup>(1, 2)</sup>

Ikofungipen (PLD-118), oralni antifungalni agens, predstavlja primjer uspješnog sintetskog inhibitora IleRS. Spoj je pokazao veliku sklonost aktivnog koncentriranja u stanicama kvasca gdje inhibira sintezu proteina.<sup>(1)</sup> Osim toga, klinička ispitivanja ikofugipena pokazala su uspjeh tog antibiotika u liječenju fungalnih infekcija središnjeg živčanog sustava i orofaringealne kandidijaze u HIV-pozitivnih pacijenata.<sup>(4)</sup> Nепroteinska aminokiselina furanomicin (sl. 1) također je potentni antibiotik koji svoju aktivnost ispoljava u interakciji s *E. coli* IleRS. Pokazano je kako IleRS veže furanomicin gotovo jednakim afinitetom kao i L-izoleucin.<sup>(5)</sup> Štoviše, enzim proizvodi furanomicil-tRNA<sup>Ile</sup> koja uspješno izbjegava mehanizme popravka pogreške, usprkos značajnoj razlici u kemijskoj strukturi furanomicina i prirodnog supstrata.<sup>(5)</sup> *In vitro* sinteza β-laktamaze uz prisutnost radioaktivno obilježenog furanomicina, pokazuje kako se ovaj spoj uspješno ugrađuje u proteine.<sup>(5)</sup> Ugradnja furanomicina u proteine *in vivo* narušava njihovu fiziološku aktivnost, što je i osnova za njegova antimikrobicidna svojstva.



**Slika 1.** Strukturna formula furanomicina (prilagođeno na temelju Ochsner *i sur.* 2007.)<sup>(1)</sup>

## 2. AMINOACIL-tRNA SINTETAZE (aaRS)

### 2.1. Uloga i osnovna obilježja

Prijevod genetičkog koda iziskuje medijatora koji će uspješno sparivati triplet nukleotida u mRNA-ribosomskom kompleksu i odgovarajuću aminokiselinu. Tu ulogu preuzela je skupina molekula tRNA, a posredno i aaRS, skupina enzima koja sparuje izoakceptorske molekule tRNA sa specifičnom aminokiselinom u stupnjevitom ATP-ovisnom reakcijskom mehanizmu. Najprije dolazi do aktivacije aminokiseline pomoću ATP-a pri čemu nastaje intermedijer aminoacil-adenilat (aa-AMP). Slijedi prijenos aminokiseline na molekulu tRNA nukleofilnim napadom hidroksilne skupine na 2'- ili 3'-C atomu riboznog prstena terminalnog adenoza ( $A^{76}$ ) molekule tRNA na karbonilni centar aminokiselinskog dijela adenilata. Većina organizama posjeduje 20 aaRS, svaka specifična za jednu od 20 aminokiselina. Budući da ovi enzimi sudjeluju u procesu o čijoj točnosti ovise svi stanični sustavi i procesi, jasno je kako su aaRS trebale razviti posebne mehanizme izbjegavanja i/ili popravka pogrešaka (većina napravi tek jednu grešku u 10 000 događaja). Osobiti problem čini precizno razlikovanje strukturno vrlo sličnih aminokiselina, što predstavlja izazov aktivnom mjestu u smislu finog molekuskog prepoznavanja. Uspoređujući tako aminokiseline izoleucin i valin, slab energetski doprinos Van der Waalsovih interakcija s dodatnom metilnom skupinom u aktivnom mjestu IleRS (1 kcal/mol prema Paulingovim izračunima) u teoriji bi trebao uzrokovati jednu pogrešnu aminoacilaciju (nastajanje Val-tRNA<sup>Ile</sup>) na pet uspješnih.<sup>(6)</sup> No, zbog razvoja efikasnih mehanizama popravka, stopa ugradnje valina u proteine na mjesto izoleucina smanjuje se na 1 u 3000 događaja.<sup>(6)</sup> Imajući stoga na umu važnu ulogu aaRS, ne iznenađuju pokušaji pronalaska antibiotika koji specifičnom inhibicijom samo jednog tipa tog enzima nepovratno narušavaju, čini se, delikatnu ravnotežu u stanici.

### 2.2. Podjela na dva razreda

aaRS dijelimo u dva razreda (svaki s deset članova), ovisno o arhitekturi katalitičke domene, očuvanim motivima koji sudjeluju u vezanju ATP-a, vezanju tRNA i reakcijskom mehanizmu.<sup>(7)</sup> Prijenos aminokiseline na molekulu tRNA u slučaju aaRS razreda I (u koji ubrajamo i IleRS) započinje nukleofilnim napadom 2'-OH skupine terminalnog adenoza na karbonilni centar aminoacil-adenilata, dok istu ulogu kod aaRS razreda II preuzima susjedna

3'-OH skupina.<sup>(8)</sup> Razred I sadrži katalitičku domenu s utkanim Rossmannovim strukturnim motivom u aminoterminalnoj polovici enzima. Rossmannov motiv sastoji se od šest  $\beta$ -ploča povezanih  $\alpha$ -zavojnica i podijeljen je u dvije simetrične polovice ( $\beta_3\alpha_2$ ), vjerojatno kao posljedica genske duplikacije. U prvoj polovici nailazimo na očuvan aminokiselinski slijed od 11 aminokiselina koji završava s HIGH tetrapeptidom, dok je u drugoj polovici lociran ustaljeni KMSKS pentapeptid. Između te dvije polovice umetnuta je domena za popravak (ili CP1 domena od eng. *connective polypeptide 1*). Drugu insercijsku domenu (CP2) pronalazimo u drugoj polovici Rossmannovog motiva u samo nekih sintetaza razreda I i njena uloga još nije razjašnjena.<sup>(9)</sup> Razred I nadalje možemo podijeliti u 3 podklase (Ia, Ib i Ic), ovisno o strukturnim obilježjima i homologiji u nukleotidnom slijedu gena koji ih kodiraju.<sup>(9)</sup> Podklasa Ia uključuje (uz metionil-, cisteinil- i arginil-tRNA-sintetaze) izoleucil-, leucil- i valil-tRNA-sintetaze koje su osobito srodne i pretpostavlja se da su evoluirale iz „enzima-pretku“ koji nije diskriminirao između te tri aminokiseline.<sup>(7)</sup> U enzimima razreda II, domena izgrađena od antiparalelnih  $\beta$ -ploča čini rigidnu podlogu za vezanje ATP-a i aminokiseline, s tri karakteristična motiva potrebna za dimerizaciju i vezanje supstrata.<sup>(1)</sup>

### 3. IZOLEUCIL-tRNA-SINTETAZA (IleRS)

#### 3.1. Osnovna strukturna obilježja i mehanizam popravka

IleRS katalizira esterifikaciju izoleucina i pripadne tRNA<sup>Ile</sup> u sintetskom aktivnom mjestu, kao i hidrolizu pogrešno aminoacilirane tRNA u domeni za popravak (popravak nakon prijenosa). Pokazan je i značajan doprinos popravka prije prijenosa sveukupnoj vjernosti procesa aminoacilacije. Aminoacil-adenilat, nastao aktivacijom pogrešne aminokiseline, u popravku prije prijenosa hidroliziran je u sintetskom aktivnom mjestu. Štoviše, kinetička kompeticija između vode i 2'-OH skupine terminalnog adenzina molekule tRNA uravnotežuje popravak prije i nakon prijenosa.<sup>(10)</sup> Enzim pokazuje kompleksnu modularnu arhitekturu koju, ovisno o funkciji, možemo podijeliti u tri regije. Prvu regiju, koja prepoznaje neuobičajenu konformaciju antikodonske petlje, formiraju tri domene na karboksilnom i jedna domena na samom aminoterminalnom kraju molekule. Rossmannov motiv u N-terminalnoj polovici enzima obilježava regiju koja aktivira aminokiselinu i prenosi ju na tRNA, i konačno,



regija za popravak (editing domena ili CP1 domena) uklanja pogriješno prenesenu aminokiselinu.<sup>(6)</sup>

Kako bi enzim tRNA<sup>Ile</sup> molekuli pridružio pripadnu aminokiselinu, najprije mora prepoznati elemente koji ju diskriminiraju od mnogobrojnih sličnih molekula. Enzim pomoću dvije antiparalelne  $\alpha$ -zavojnice veže mali utor akceptorske peteljke, a zamijećena je i interakcija okosnice tRNA molekule s lizinom iz konzerviranog KMSKS aminokiselinskog slijeda, čija bi promjena orijentacije uslijed vezanja tRNA<sup>Ile</sup> mogla ukazivati na važnost tog procesa u popravku prije prijenosa (odmicanje KMSKS omče od adenilata nepripadne aminokiseline u sintetskom mjestu povećala bi njegovu konstantu disocijacije).<sup>(6)</sup> Riješena kristalna struktura IleRS u kompleksu s tRNA<sup>Ile</sup> iz *S. aureus*, te njena usporedba sa strukturom GlnRS i tRNA<sup>Gln</sup>, ukazuje na mogući mehanizam popravka pogriješno aminoacilirane tRNA<sup>Ile</sup>. Model pretpostavlja dvije konformacije 3' kraja tRNA<sup>Ile</sup>: konformaciju nalik ukosnici koja omogućuje aminoacilaciju u sintetskom mjestu (C<sup>75</sup> iz 3'CCA kraja interreagira s argininom iz WCISR slijeda konzerviranog unutar Ia podklase aminoacil-tRNA-sintetaza) te izduženu helikalnu konformaciju koja pozicionira 3' kraj tRNA<sup>Ile</sup> u domenu za popravak.<sup>(6)</sup> Dakle, model uključuje translokaciju 3' kraja tRNA<sup>Ile</sup> između dva aktivna mjesta u kompeticiji, što podsjeća na mehanizam popravka kod DNA-polimeraze.<sup>(6)</sup>

### 3.2. IleRS karakteristične za pojedine domene života

Analiza 18 sekvenciranih gena za IleRS iz različitih organizama ukazala je na neke razlike između tih enzima, ovisno o domeni života kojoj organizam pripada, tako da IleRS možemo podijeliti na eukariotske, prokariotske i arhealne. Temeljna značajka bakterijskih i IleRS iz mitohondrija eukariota (koje prema endosimbiontskoj teoriji svoje evolucijsko podrijetlo vuku od bakterija) jest prisutnost kratke C-terminalne domene s klasterom od četiri cisteina koji koordiniraju ion cinka.<sup>(11)</sup> Pokazalo se kako je spomenuti motiv, oblika C<sup>902</sup>PRC...C<sup>921</sup>GRC, esencijalan za aktivnost enzima kod *E. coli*.<sup>(9)</sup> Naprotiv, C-terminalna domena citoplazmatskih eukariotskih te arhealnih analoga je dulja i ne sadrži cink-vezni motiv. Bakterijski i eukariotski tipovi također se razlikuju u očuvanim sljedovima aminokiselina kao što je NKIL kod bakterijskih te MPY, HYPF i YTLXV motivi kod eukariotskih IleRS.<sup>(9)</sup>

Daljnja usporedba pokazala je kako nema značajne razlike u aminokiselinskom slijedu Rossmannova motiva u katalitičkoj domeni svih istraživanih IleRS. Usprkos tome, mupirocin (antibiotik koji proizvodi *Pseudomonas fluorescens* i veže se u aktivno sintetsko mjesto IleRS) selektivno inhibira bakterijski i arhealni, a ne i eukariotski tip enzima, što pokazuje da između promatranih enzima postoje fine strukturne razlike u veznom mjestu za supstrat. Na temelju riješenih struktura te sravnjenja DNA sekvenci, prepoznata su dva aminokiselinska ostatka koja bi mogla imati ključnu ulogu u spomenutoj diskriminaciji: H581 i F583, očuvani u bakterija i arheja, no zamijenjeni asparaginom ili serinom, odnosno izoleucinom u eukariota (prva zamjena kod eukariota dovodi do slabljenja hidrofobnih interakcija s antibiotikom, dok druga zamjena uzrokuje slabljenje *stacking* interakcija između aromatskog prstena fenilalanina i konjugativnog sustava antibiotika).<sup>(12)</sup> Opisan sustav diskriminacije potvrđen je mjesno-specifičnom mutagenezom.<sup>(12)</sup> Budući da tako suptilne promjene mogu određivati osjetljivost na djelovanje specifičnih inhibitora, lako je zaključiti kako postoji ogroman, zasad još nedovoljno iskorišten, potencijal za razvoj selektivnih antibiotika.

### 3.3. Prokariotske IleRS koje nalikuju eukariotskim

Pronađene su bakterijske IleRS koje više nalikuju eukariotskim nego prokariotskim, ne samo prema rezultatima sravnjivanja njihovih nukleotidnih sljedova, već i prema nedostatku ranije spomenutog motiva za vezanje iona cinka. Horizontalan jednosmjerni prijenos aaRS iz eukariota u prokariote pokazan je za nekoliko različitih obitelji tog enzima. Budući da se izoakceptorske tRNA iz različitih domena života razlikuju u elementima koje prepoznaju enzimi koji ih aminoaciliraju, bilo je nužno da se prenesene aaRS koadaptiraju kako bi u novom domaćinu ispoljile svoju funkciju. Tako *S. aureus* kodira dva tipa IleRS-a, IleRS1 i IleRS2. IleRS1 možemo smatrati divljim tipom enzima pošto pokazuje uobičajene karakteristike prokariotskog oblika, dok IleRS2 pokazuje značajke eukariotskog tipa enzima, a kodiran je genom u bakterijskom kromosomu ili na plazmidu.<sup>(13)</sup> Osim toga, IleRS2 iz *S. aureus* (kao i iz *Methanobacterium thermoautotrophicum*), za razliku od sintetaza tipa I i tipa II, sadrži klaster cisteina u CP2 insercijskoj domeni.<sup>(9, 13)</sup>

Ne samo da je soj stekao alternativni enzim za aminoaciliranje tRNA<sup>Ile</sup>, već novostečeni enzim nije osjetljiv na djelovanje mupirocina, antibiotika koji snažno inhibira djelovanje bakterijske IleRS1. IleRS2 je također vrlo raširen među Gram-pozitivnim bakterijama s visokim udjelom GC baznih parova u genomu, kao što su *Bacillus anthracis* i *B. cereus* (oba

soja sadrže i divlji tip enzima).<sup>(13)</sup> Smatra se kako je upravo jedan od tih sojeva horizontalnim transferom donirao gen za IleRS rezistentnom soju *S. aureus* prilikom kohabitacije kod istog domaćina (geni analiziranih sojeva *B. anthracis* i soja *S. aureus* pokazuju sličnost u čak 61% nukleotidnog slijeda), a gen je fiksiran uslijed snažnog selektivnog pritiska.<sup>(13)</sup> U prilog navedenom ide i činjenica da IleRS2 sadrže uglavnom patogene bakterije uz par izuzetaka, kao što su *Thermus thermophilus* i *Oceanobacillus iheyensis*, za koje se smatra da su upravo ekstremni uvjeti staništa (visoka temperatura i salinitet) pripomogli horizontalnom transferu gena.<sup>(13)</sup> Aminoacilacijski pokusi s IleRS2 izoliranom iz *Mycobacterium tuberculosis* pokazuju kako taj enzim jednako uspješno aminoacilira tRNA<sup>Ile</sup> iz *E. coli* i iz kvasca, što je omogućilo horizontalan prijenos gena iz domaćina u patogene (prepoznavanje izoakceptorskih tRNA molekula iz različitih domena života bila je prepreka takvog prijenosa za neke druge aaRS).<sup>(9)</sup> Navedeni primjeri pokazuju kako se rezistentnost koja je slučajno „procurila“ iz jedne domene života u drugu, lako i brzo horizontalno širi, što je i jedan od najvećih problema pri uvođenju novog antibiotika u kliničku primjenu.

#### 4. aaRS KAO METE ZA RAZVOJ ANTIBIOTIKA

Male razlike među strukturama temeljno očuvanog aktivnog mjesta dovoljne su za razvoj selektivnih antibiotika koji ciljano djeluju na inhibiciju aaRS patogena, bez ozbiljnijeg utjecaja na aktivnost aminoacil-tRNA-sintetaza kod ljudi. Iako su katalitičke domene tih enzima fiksirane unutar dva osnovna razreda, slijed aminokiselina katalitičke domene unutar razreda, idući od prokariota do viših eukariota, varira za više nego 70 %, što pruža dovoljno prostora za proizvodnju selektivnih inhibitora aaRS bilo koje vrste.<sup>(9)</sup> Ostale karakteristike koje ih čine potentnim metama za djelovanje antibiotika jesu njihova omniprezentnost, nezamjenjiva uloga u procesu sinteze proteina (samim time i u staničnoj/bakterijskoj vijabilnosti) te vrlo dobra strukturna i biokemijska okarakteriziranost. Zanimljivo je kako većina Gram-pozitivnih bakterija i arheja ne posjeduje cijeli set aaRS, već im najčešće nedostaju asparaginil- (AsnRS) i glutaminil-tRNA-sintetaza (GlnRS).<sup>(1)</sup> U slučaju nedostatka GlnRS, u organizmima pronalazimo nediskriminatornu glutamil-tRNA-sintetazu (GluRS) koja aminoacilira glutamatom tRNA<sup>Gln</sup>. Tako nastala Glu-tRNA<sup>Gln</sup> u transamidacijskom putu prevodi se u amid - Gln-tRNA<sup>Gln</sup> koji se može uključiti u biosintezu proteina. Kako je taj put specifičan za svijet prokariota i arheja, potencijalna je meta novih antimikrobnih agensa. tRNA-ovisna amidotransferaza specifična za bakteriju *Pseudomonas aeruginosa* (Asp-

tRNA<sup>Asn</sup> pretvara u Asn-tRNA<sup>Asn</sup>) nadoknađuje nedostatak AsnRS te ujedno omogućuje selektivnu eliminaciju tog patogena.<sup>(1)</sup> Također je kao meta za razvoj antibiotika predložena domena za popravak, čija bi narušena funkcija uzrokovala pogrešnu ugradnju aminokiselina u rastuće polipeptide. Potencijal opravdava i pokus u kojem su mutanti *E. coli* koji su kodirali IleRS s defektnom domenom za popravak, pokazivali značajno usporen i abnormalan rast.<sup>(1)</sup> Također, lektorirajuća aktivnost *E. coli* prolil-tRNA-sintetaze (ProRS) uključuje popravak prije i nakon prijenosa aminokiseline na tRNA, dok ljudska ProRS ne posjeduje takve aktivnosti, što otvara vrata razvoju selektivnih antibiotika koji bi ciljali domenom za popravak prokariotskog tipa ProRS.<sup>(1)</sup> Lizil-tRNA-sintetaza (LysRS) je jedina aaRS čije članove pronalazimo u razredu I (arhealni tip te spirohete poput *Treponema palidum*, uzročnik sifilisa i *Borrelia burgdorferi*, uzročnik Lajmske bolesti) i razredu II (eukariotski i bakterijski tip), kao posljedica njihove neovisne evolucije.<sup>(1)</sup> Razlika u veznom mjestu dva spomenuta oblika IleRS ponovno može poslužiti za sintezu diskriminatornih antibiotika.

Među najnovije pokušaje svrstava se korištenje kombinacije dvaju inhibitora različitih aaRS, što značajno proširuje spektar djelovanja i smanjuje mogućnost razvoja otpornosti na antibiotike. Najviše se istražuje kombinacija RE8839 (inhibitor bakterijske MetRS) i mupirocina (inhibitor bakterijske IleRS) u borbi protiv visokorezistente bakterije vrste *S. aureus*.<sup>(1)</sup> Nakon tretmana bakterija navedenim antibioticima, uspješno su izolirane subpopulacije bakterija koje su razvile otpornost na pojedinačne agense, ali ne i na njihovu kombinaciju.<sup>(1)</sup>

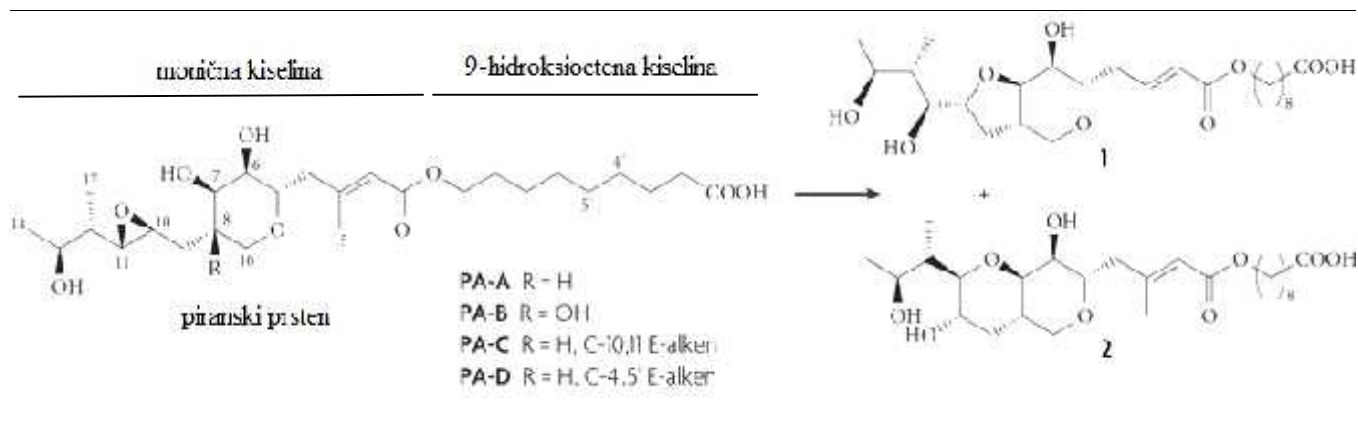
## 5. IleRS KAO META ZA RAZVOJ ANTIBIOTIKA

### 5.1. Mupirocin

#### 5.1.1. Opća obilježja mupirocina

Bakterija *Pseudomonas fluorescens* luči mješavinu antibiotika kako bi eliminirala mikroorganizme s kojima kohabira rizosferu i ulazi u kompeticiju za hranjivim tvarima.<sup>(3)</sup> Identificirana su četiri aktivna sastojka, pseudomonična kiselina A, B, C i D, iako pseudomonična kiselina A (kasnije nazvana mupirocin) čini 90% mješavine. Mupirocin proizvode još barem dva soja *Pseudomonas* spp. i morske bakterije iz roda *Alteromonas*. Kemijski se identificira kao ester monične kiseline (C<sub>17</sub>) i 9-hidroksinonanske kiseline (C<sub>9</sub>, zasićena masna kiselina).<sup>(2)</sup> Monična se kiselina sastoji od piranske jezgre koja je veznim

dijelom (tzv. linker) povezana s masnom kiselinom i bočnog lanca koji sadrži epoksid.<sup>(2)</sup> Antibiotik ne tolerira prekisele ili lužnate uvjete te izvan područja pH vrijednosti od 4 do 9 dolazi do napada 7-hidroksilne skupine na 10,11-epoksid, ireverzibilno producirajući dva ciklička etera.<sup>(2)</sup> (sl. 2)



**Slika 2.** Struktura pseudomonične kiseline A (mupirocin), B, C i D; produkti razgradnje pseudomonične kiseline A u kiselim, odnosno bazičnim uvjetima (prilagođeno na temelju Brown i sur. 2000.)<sup>(2)</sup>

### 5.1.2. Klinička primjena i spektar djelovanja

Mupirocin je pronašao svoju kliničku primjenu u liječenju kožnih infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim streptokokima i stafilokokima. Gotovo svi klinički izolati visokorezistentnih bakterija *S. aureus* i *Streptococcus pyogenes* pokazali su se osjetljivim na djelovanje mupirocina i nije uočena križna rezistencija mupirocina i bilo koje druge velike skupine antibiotika.<sup>(3)</sup> Nadalje, pojačana aktivnost mupirocina u kiseljoj sredini (minimalna inhibitorna koncentracija poraste do 100 puta pri porastu pH s 5 na 8) te rezistentnost obrambene kožne flore koju čine korinebakterije, mikrokoki te anaerobne bakterije roda *Propionibacterium*, čine ga još pogodnijim za liječenje kožnih infekcija.<sup>(3)</sup> Gram-negativne bakterije pokazuju znatno veću otpornost zbog slabe penetracije antibiotika kroz njihovu vanjsku membranu.<sup>(14)</sup>

Glavni nedostatak mupirocina jest nemogućnost oralne primjene. Iako pokazuje dobru apsorpciju, u tjelesnim tekućinama dolazi do brze hidrolize esterske veze između monične i 9-hidroksinonanske kiseline pri čemu nastaju biološki inaktivni produkti, dok mu njegov velik afinitet prema serumskim proteinima značajno smanjuje biodostupnost. Mupirocin također inhibira rast brojnih patogenih gljivica *in vitro*, uključujući dermatofite.<sup>(14)</sup> Pokazana je i uspješna inhibicija IleRS izolirane iz vrste *Candida albicans*, dok model sa zamorcima inficiranim gljivicom *Trichophyton mentagrophytes* ukazuje na mogućnost primjene antibiotika i *in vivo*.<sup>(14)</sup>

### 5.1.3. Biosinteza mupirocina

Budući da je mupirocin nestabilan i slabo dostupan, otkrivanje njegovog biosintetskog puta potencijalno otvara vrata u smjeru proizvodnje uspješnijih analoga. Svi geni uključeni u biosintezu nalaze se na jedinstvenom DNA traktu veličine 75kb, nazvanom *mup* klaster.<sup>(3)</sup> Najznačajniju ulogu imaju mupirocin-multifunkcionalni polipeptidi (*mmpA* do *mmpF*) koji su poliketid-sintaze tipa I (jedan polipeptidni lanac služi kao nosač acilne skupine i sadrži ketosintetsku funkciju). Monična kiselina i 9-hidroksinonanska kiselina vjerojatno se sintetiziraju odvojeno, iako oba spoja sazrijevaju kroz puteve biosinteze masnih kiselina i poliketida.<sup>(3)</sup> Eksperimenti s radioaktivno obilježenim prekursorima pokazali su kako su ugljikovi atomi C16 i C17 podrijetlom od S-adenozil metionina, dok je kostur preostalog dijela molekule izgrađen od acetata. MmpA i MmpB pokazuju modularnu građu s tri, odnosno četiri domene s funkcijama poliketid-sintaze I, tako da monična kiselina raste u nekoliko krugova u kojima se na startnu jedinicu (acetat) sukcesivno dodaju elongacijske jedinice (malonat ili metilmalonat).<sup>(3)</sup> Zanimljivo je da MmpC koji posjeduje tandem aciltransferaznih domena *in trans* aktivira početnu i nanosi elongacijske jedinice, što je neuobičajeno za poliketid-sintaze koje obično imaju integriranu i aciltransferaznu aktivnost. Nastali nusprodukt mupirocin H prepoznaju MupG, MupH, MupJ, MupK i mAcpC (engl. *mupirocin acyl carrier protein C*) te uvode C15 metilnu skupinu na C3 atom nusprodukta.<sup>(3)</sup> Preostaje korigiranje oksidacijskog stanja atoma piranskog prstena.

Biosintezu 9-hidroksinonanske kiseline katalizira MmpB, a kreće od 3-hidroksipropionata i uključuje tri sukcesivne kondenzacije s malonomatom.<sup>(3)</sup> MmpB sadrži tri domene koje služe kao nosači acilne skupine, što omogućuje maksimalan protok kroz metabolički put. Još je nejasno spajaju li se 3-hidroksipropionat i monična kiselina prije prijenosa na MmpB ili se

spajanje odvija nakon sinteze 9-hidroksinonanske kiseline. *mup* klaster reguliran je gustoćom bakterijskih stanica (signal je homoserin lakton) kako bi se osigurala aktivacija ovog skupog biosintetskog puta samo kada ima dovoljno bakterija za postizanje optimalne koncentracije antibiotika za eliminaciju konkurencije.<sup>(3)</sup>

#### 5.1.4. Način djelovanja i tipovi otpornosti na mupirocin

Mupirocin je bifunkcionalni inhibitor IleRS koji objedinjuje karakteristike izoleucina i ATP-a, odnosno svojom strukturom oponaša reakcijski intermedijer u procesu aminoaciliranja tRNA<sup>Ile</sup>, izoleucil-adenilat (IleAMP). Bočni ogranak piranske jezgre koji sadrži epoksid, rasporedom ugljikovih atoma oponaša L-izoleucin te se, kao analog tog prirodnog supstrata, s njime natječe za okupaciju jedinstvenog veznog mjesta.<sup>(15)</sup> Dihidroksitetrahidropiranski prsten analog je riboze adenilata, dok  $\alpha,\beta$ -nezasićeni ester (linker) IleRS prepoznaje kao adenin.<sup>(2)</sup> Među prvim dokazima koji potvrđuju ovakvo ponašanje mupirocina, bila je parcijalna digestija divljeg tipa *E. coli* IleRS tripsinom. Pokazalo se kako mupirocin, ovisno o koncentraciji, štiti IleRS od hidrolize blizu očuvanog aminokiselinskog slijeda KMSKS koji sudjeluje u vezanju ATP-a pri normalnom reakcijskom mehanizmu IleRS. Nadalje, pokazalo se kako je potrebna tri reda veličine manja koncentracija mupirocina u odnosu na ATP za zaštitu od razgradnje IleRS blizu KMSKS slijeda tripsinom, što ukazuje na velik afinitet mupirocina za vezanje na IleRS, ali i dodatne interakcije koje pritom ostvaruje.<sup>(16)</sup>

Postoje dva tipa otpornosti na mupirocin različite genetičke pozadine. Otpornost na niske koncentracije mupirocina (MIC, minimalna inhibitorna koncentracija: 8 - 256  $\mu\text{g/ml}$ ) rezultat je točkaste mutacije u genu *ileS* koji kodira divlji, prokariotski tip IleRS. S druge strane, otpornost na visoke koncentracije antibiotika (MIC: > 256  $\mu\text{g/ml}$ ) rezultat je stjecanja novog gena *mupA*, vrlo vjerojatno horizontalnim prijenosom, koji kodira IleRS eukariotskog tipa.<sup>(17)</sup> Ispitivanja provedena na 19 sojeva *S. aureus* otpornih na niske koncentracije mupirocina pokazuje kako svi osim jednog posjeduju mutaciju koja valin zamjenjuje fenilalaninom (V588F), i to sedam aminokiselinskih ostataka uzvodno od KMSKS regije. Zanimljivo, jedini mutant koji nije pokazivao aminokiselinsku zamjenu na toj poziciji, imao je identičnu zamjenu aminokiselina u nešto udaljenijoj regiji enzima (V631F). Strukturna je analiza pokazala kako se obje mutacije nalaze unutar Rossmanova motiva, udaljeni 14 Å od KMSKS slijeda (aminokiselinski ostaci 595 do 599) gdje pozicioniraju karboksilnu skupinu mupirocina, odnosno  $\gamma$ -fosfat ATP-a.<sup>(17)</sup> Razgranati alifatski lanac V588, zajedno s bočnim

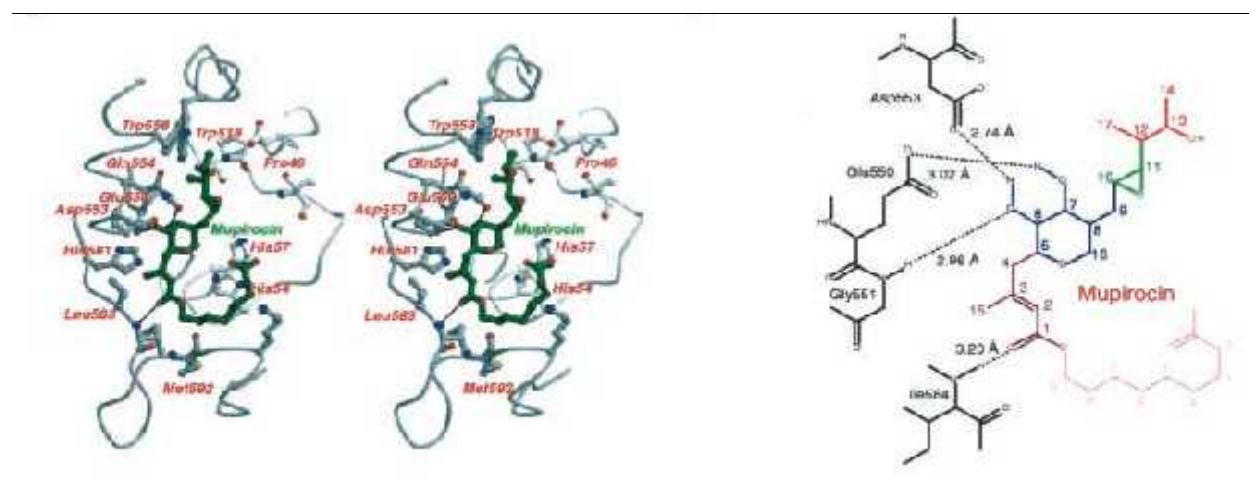
ograncima okolnih aminokiselinskih ostataka, formira snažan hidrofoban džep unutar Rosmannova motiva. Zamjena valina fenilalaninom rezultira unosom većeg aromatskog bočnog lanca koji pri vezanju mupirocina rotira u smjeru dodatnog izlaganja benzenskog prstena otapalu. Uz smanjenu mogućnost deformiranog hidrofobnog džepa da precizno pozicionira izduženi alifatski lanac mupirocina, moguće je i da rotacija bočnog ogranka fenilalanina uzrokuje konformacijske promjene koje uzrokuju gubitak vodikove veze koja je postojala između funkcionalnih skupina glavnog lanca V588 i mupirocina, dodatno smanjujući afinitet tog antibiotika prema IleRS. Supstitucija V631F vjerojatno dovodi do niskodozne otpornosti na mupirocin na sličan način. Detektirano je još nekoliko mutacija povezanih s otpornošću na mupirocin izvan aktivnog sintetskog mjesta (distalno od veznog mjesta za tRNA<sup>Ile</sup> i u editing domeni), no njihov značaj još nije do kraja razriješen.<sup>(17)</sup>

Istraživanja na rezistentnom soju bakterije *M. thermoautotrophicum* pokazuje kako je otpornost posljedica zamjene glicina aspartatom, i to u blizini KMSKS regije koja povezuje tRNA-veznu domenu s mononukleotid-veznom domenom.<sup>(18)</sup> Snažan učinak na vezanje antibiotika (konstanta disocijacije povećava se 10 puta) uzrokovan insercijom nabijene aminokiseline na mjesto nepolarnog glicina ukazuje na hidrofobne interakcije inhibitora i divljeg tipa enzima, interakcije koje su u analiziranom mutantu očigledno narušene. Zanimljiv je i aminokiselinski slijed PYVPGWDCHGL koji je u divljem tipu *E. coli* IleRS određen kao vezno mjesto za izoleucin, a pronađen je i u IleRS vrste *P. fluorescens* koja je razvila visokodoznu otpornost na mupirocin, pošto ga sama prizvodi.<sup>(17)</sup> Kako je mupirocin kompetitivni inhibitor izoleucina, njihova se vezna mjesta moraju barem djelomice poklapati. Određena konstanta disocijacije mupirocina za IleRS vrste *P. fluorescens* 10<sup>6</sup> je puta veća od one za IleRS iz *E. coli*, što ukazuje na to da vezno mjesto za izoleucin slabo sudjeluje u vezanju mupirocina i upućuje na postojanje drugog mjesta značajnije uloge.<sup>(17)</sup>

Riješena kristalna struktura IleRS izolirane iz termofilne bakterije *T. thermophilus* u kompleksu s mupirocinom, konačno otkriva kako ovaj antibiotik značajno drugačije kemijske strukture uspješno oponaša Ile-AMP.<sup>(12)</sup> Dio mupirocina koji morfološki nalikuje bočnom ogranku L-izoleucina (C-12 do C-14 te C-17) prepoznat je od strane već spomenutog hidrofobnog džepa kojeg ovdje formiraju P46, W518 i W588 (sl. 3, desno).<sup>(12)</sup> Usprkos istom mjestu vezanja, mupirocin pokazuje drukčiju orijentaciju u odnosu na L-izoleucin, vjerojatno zbog dodatne hidroksilne skupine na C-14 i kratke epoksi skupine. Piranski prsten mupirocina ulazi u *stacking* interakciju s imidazolnim prstenom H581, dok su njegove hidroksilne



skupine prepoznate na isti način kao i hidroksilne skupine riboze Ile-AMP-a; hidroksilna skupina na C-6 atomu mupirocina sparuje se vodikovim vezama s amidnom skupinom glavnog lanca G551 te Oδ bočnog ogranka D553, dok se hidroksilna skupina na C-7 sparuje s Oε bočnog ogranka E550 (sl. 3, lijevo).<sup>(12)</sup> Konjugirani sustav od C-1 do C-3 ulazi u van der Waalsovu interakciju s bočnim ogrankom L583, dok karbonilni kisik interreagira s amidnom skupinom glavnog lanca I584, čime mupirocin oponaša adeninski prsten IleAMP-a (sl. 3, desno) i upotpunjuje cijeli set interakcija koje pomažu mupirocinu da blokira vezno mjesto tog „visokoenergetskog“ intermedijera.<sup>(12)</sup> 9-hidroksinonanska kiselina sjeda na enzim uzduž katalitičke petlje koja nosi KMSKS motiv, što objašnjava ranije spomenutu zaštitu tog motiva od razgradnje tripsinom. Uslijed vezanja ATP-a ili Ile-AMP-a dolazi do pokretanja petlje prema unutrašnjosti katalitičkog rasjeda s Rosmannovim motivom, no nonanska kiselina molekulskim interakcijama priječi spomenuto kretanje i fiksira otvorenu konformaciju, što bi mogao biti dodatan inhibitorni mehanizam mupirocina.<sup>(12)</sup>



**Slika 3.** Molekula mupirocina (zeleno) vezana u katalitičko mjesto IleRS iz eubakterije *T. thermophilus*, aminokiselinski ostaci koji prepoznaju mupirocin prikazani su *ball-and-stick* modelom (lijevo); shematski prikaz prepoznavanja mupirocina od strane IleRS, dio mupirocina koji nalikuje bočnom lancu L-izoleucina prikazan je crveno, dio koji sadrži epoksid zeleno, piranska jezgra plavo, vezna regija (linker) ljubičasto i 9-hidroksinonanska kiselina svijetlo ljubičasto (desno) (prilagođeno na temelju Nakama *i sur.*, 2001.)<sup>(12)</sup>

Ciljana mutagenaza gena koji kodiraju IleRS porijeklom iz *T. thermophilus* (divlji tip i IleRS nalik eukariotskoj) i *S. aureus* (IleRS2) pokazala je kako zamjena aminokiselinskih ostataka koji variraju između bakterijskih/arhealnih i eukariotskih IleRS značajno mijenjaju osjetljivost prema mupirocinu.<sup>(19)</sup>

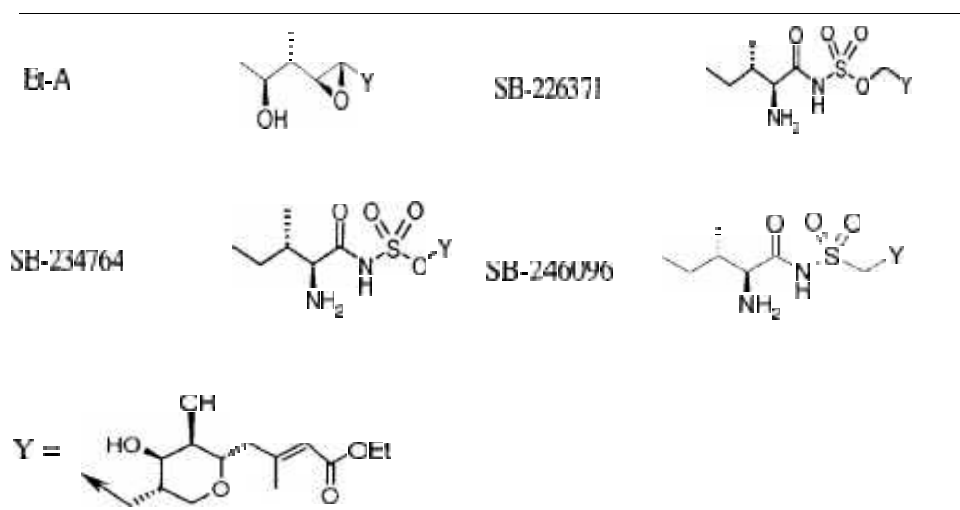
### 5.1.5. Potraga za uspješnijim analozima

Kao što je već ranije spomenuto, mupirocin nalikuje reakcijskom intermedijeru Ile-AMP u više aspekata, no čini se kako ipak postoje odstupanja. Bočni ogranak koji sadrži epoksid nije dobar analog izoleucina jer mu nedostaje zwitterionska forma, dok je razmak između piranskog prstena i dijela koji oponaša bočni ogranak L-izoleucina nepovoljan.<sup>(2)</sup> Utvrđena su četiri glavna dijela derivata pseudomonične kiseline koja su bitna za prepoznavanje od strane IleRS: aminokiselinski bočni lanac, linker (C-1 do C-5), monatna jezgra i monatni bočni ogranak. Monatna jezgra sastoji se od piranskog prstena i 3-metilakrilatnog ogranka te se pokazala kao neophodan element za diskriminaciju između bakterijskih i eukariotskih IleRS.<sup>(2)</sup> Uspješnost sintetiziranih analoga utvrđuje se određivanjem konstante disocijacije inhibitora ( $K_i$ , što je vrijednost veća, analog je slabiji inhibitor), dok se za potentnije analoge određuje inhibicija izmjene ATP/PPi pri maksimalnom zasićenju enzima supstratom.<sup>(2)</sup>

Promjene uvedene u linker i aminokiselinski bočni lanac omogućuju proučavanje molekulskih interakcija unutar aktivnog mjesta IleRS te pronalazak uspješnijih inhibitora tog enzima. Varijacije u polarnosti i duljini fosfatnih i sulfamatnih linkera istražuju se kako bi se aminokiselinskom ogranku omogućilo što bolje zauzimanje hidrofobnog džepa u aktivnom mjestu. Kao osnova za proizvodnju inhibitora svih proučavanih spojeva koristi se etil-monat (Et-A, sl. 4) zbog relativno jednostavne sinteze.<sup>(2)</sup> Nadalje, kako nijedan derivat Et-A ne posjeduje bočni ogranak s epoksidom, a svi pokazuju vremenski ovisnu inhibiciju, može se zaključiti kako taj farmakofor nije odgovoran za daljnje „sidrenje“ inhibitora u aktivno mjesto nakon inicijalnog vezanja.<sup>(2)</sup>

Kao najuspješniji analog mupirocina pokazao se spoj SB-234764 (sl. 4) pokazujući za više nego dva reda veličine jači afinitet prema IleRS u usporedbi s roditeljskim spojem. Udaljenost aminokiselinskog ogranka i dihidroksitetrahidropiranskog prstena spomenutog kimernog konstrukta odgovara udaljenosti između izoleucina i riboznog prstena adenilata, što potvrđuje da ta dva prstena okupiraju isto mjesto na enzimu.<sup>(2)</sup> Povećanje udaljenosti između izoleucina i šećernog dijela analoga (primjerice spoj SB-226371, sl. 4) dramatično reducira njegov inhibitorski potencijal. Sličan efekt postiže se zamjenom sulfamatnog linkera fosfatnim, pošto fosfatnom linkeru nedostaje karbonilni centar aminoacilne skupine, za kojeg se ispostavilo da ima važnu ulogu u povećanju afiniteta inhibitora.<sup>(2)</sup> S druge strane, stereoelektronska svojstva sulfamata su toliko povoljna jer oponašaju prijelazno stanje

fosfoanhidrida tijekom adenilacije.<sup>(2)</sup> Također je uočen negativan efekt dokidanja polarnosti linkera, primjerice zamjenom veznog kisika ugljikom (SB-246096, sl. 4). Variranje aminokiselinskog dijela analoga mupirocina pokazalo je kako je najuspješniji upravo onaj koji oponaša L-izoleucin, dodatno potvrđujući činjenicu da inhibitori iskorištavaju izrazito stereoselektivni vezni džep za prirodni supstrat.<sup>(2)</sup>

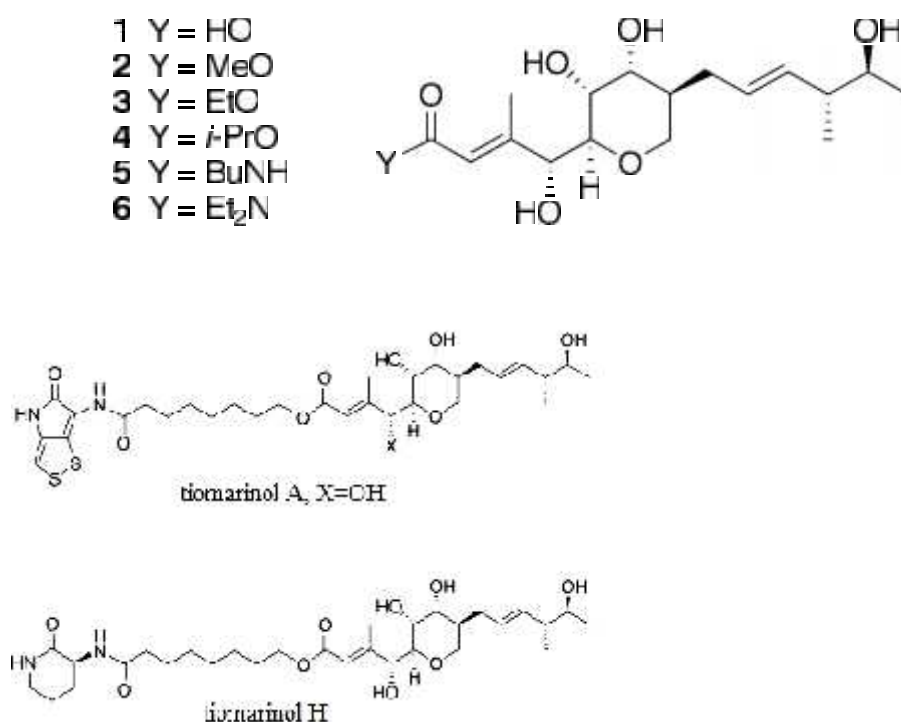


**Slika 4.** Strukturne formule analoga mupirocina (prilagođeno na temelju Brown *i sur.* 2000.)<sup>(2)</sup>

Vezno mjesto za aminokiselinu omeđeno je s dva triptofana (sl. 2) što omogućuje praćenje promijene triptofanske fluorescencije uslijed vezanja supstrata ili njegovih analoga. Vezanje kraćeg bočnog lanca koji sadrži mupirocin ne mijenja značajno stupanj solvatacije bočnog ogranka triptofana, što se očitava kao mali porast u njegovoj fluorescenciji. Konstrukcija analoga koji bolje oponašaju izoleucin dovodi do stvaranja snažnijeg hidrofobnog kontakta s bočnim ograncima triptofana i izbacivanja molekula vode iz hidrofobnog okoliša, što pojačava afinitet inhibitora te dovodi do značajnijeg porasta fluorescencije. Smatra se kako su interakcije s navedenim aminokiselinskim ostacima bitne pri selektivnom prepoznavanju izoleucina od strane IleRS.<sup>(2)</sup> Bilo je i pokušaja sinteze analoga mupirocina s aminokiselinskim ogrankom koji oponaša neku drugu aminokiselinu kako bi se inhibirala odgovarajuća aminoacil-tRNA-sintetaza, no čini se kako je interakcija monatne strukture s aktivnim mjestom karakteristična samo za IleRS. O učinkovitosti proučavanih inhibitora svjedoči i činjenica kako se afinitet najpotentnijih inhibitora može izmjeriti samo kalorimetrijskim metodama (konstanta disocijacije iznosi oko 10 fM ).<sup>(2)</sup>

### 5.1.6. Analizi tiomarinola

Kao što je već ranije napomenuto, mupirocin pokazuje izrazito slabu metaboličku stabilnost, što onemogućuje oralnu primjenu tog antibiotika. Nedavno je iz morske bakterije *Alteromonas rava* izolirana skupina antibiotika visokosrodnih mupirocinu, no koja pokazuje bolju oralnu biodostupnost. Razlika u strukturi tiomarinola A i tiomarinola H (sl. 5) u usporedbi s mupirocinom uključuje prisutnost C4-hidroksilne skupine, kraći C1-alkoksi lanac te zamjenu C10-C11 epoksida *E* alkenom jedinicom.<sup>(19)</sup>



**Slika 5.** Strukturne formule najjednostavnijih tiomarinolnih analoga (1-6), tiomarinola A i tiomarinola H (prilagođeno na temelju Marion *i sur.* 2009.)<sup>(19)</sup>

Na temelju riješene kristalne strukture IleRS u kompleksu s mupirocinom, pretpostavlja se kako dodatna C4-hidroksilna skupina ostvaruje vodikovu vezu s H64 i D557 u aktivnom mjestu enzima, što bi mogla biti osnova za pojačanu antimikrobicidnu aktivnost analoga tiomarinola.<sup>(19)</sup> Tiomarinol A i tiomarinol H su specifični jer sadrže heterocikličke terminalne skupine (holotin, odnosno anhidroornitin-C1-amid; sl. 5). Oba antibiotika pokazala su se jednako učinkovita kao i mupirocin, s time da tiomarinol A pokazuje čak i širi spektar djelovanja, kako protiv Gram-pozitivnih, tako i protiv Gram-negativnih bakterija. U želji za poboljšanjem oralne biodostupnosti antibiotika, sintetizirani su analozi u kojima je bočni

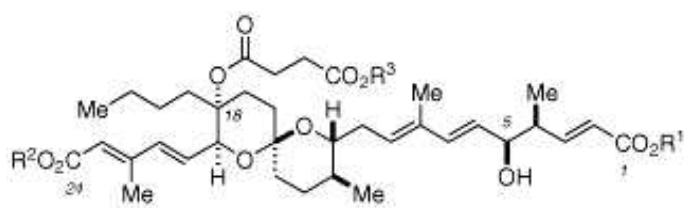
ogranak koji sadrži estersku vezu zamijenjen surogatima karboksilne skupine, kao što su diazoli i triazoli, no takvi derivati su se pokazali inaktivnim.<sup>(19)</sup> Nadalje, pojednostavljeni analozi bez terminalne heterocikličke skupine odlikuju se većom biološkom aktivnošću u usporedbi s tiomarinolom H, iz čega se može zaključiti kako ta skupina nije esencijalna za mikrobicidnu aktivnost.<sup>(19)</sup>

## 5.2. Reveromicin A

Reveromicin A, antibiotik koji je otkriven u mediju u kojem su uzgajane bakterije roda *Actinomycetes* zbog opaženog inhibitornog djelovanja na stimulaciju mišjih epidermalnih stanica epidermalnim faktorom rasta, zaustavlja ciklus stanica sisavaca u G1 fazi.<sup>(20)</sup> Praćenje ugradnje radioaktivnog L-[<sup>35</sup>S]-metionina u stanicama kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*) u prisutnosti reveromicina A, otkrilo je trenutno zaustavljanje sinteze proteina uzrokovano tim antibiotikom. Genetička analiza rezistentnih sojeva identificirala je IleRS kao metu djelovanja reveromicina A. Rezistenciju je uzrokovala supstitucija asparagina-660, očuvane aminokiseline koja se nalazi u blizini KMSKS slijeda u kvasaca i ljudi, aspartatom.<sup>23</sup> *In vitro* praćen prijenos radioaktivno obilježenog izoleucina na tRNA pokazao je kako koncentracija reveromicina A, dva reda veličine manja od one potrebne za inhibiciju rasta kvasaca, uzrokuje smanjenje aktivnosti enzima IleRS za 20%.<sup>(21)</sup>

Nadalje, reveromicin A se pokazao kao snažan antitumorski agens u borbi protiv tumora jajnika BG-1 te mikrocelularnog karcinoma pluća (SCLC), tako da je većina daljnjih istraživanja tekla u tom smjeru. SCLC je invazivan tumor koji lako metastazira, posebno se brzo širi na kosti gdje se zavlači u šupljine uzrokovane djelatnošću osteoklasta. Osteoklasti razgrađuju kosti i tako oslobađaju brojne tvari koštanog matriksa koje pospješuju rast tumora te su odlične mete za usporavanje širenja metastaza u kostima.<sup>(20)</sup> Te stanice izrazito su osjetljive na djelovanje reveromicina A koji ih lako uvodi u apoptozu indukcijom otpuštanja citokroma c i aktivacijom kaspaze 3.<sup>(22)</sup> Izrazita selektivnost koju reveromicin A pokazuje prema osteoklastima rezultat je kiselog mikrookoliša koji te stanice stvaraju radi olakšanja demineralizacije kostiju i aktivacije enzima za razgradnju koštanog matriksa. Reveromicin posjeduje tri karboksilne skupine (sl. 6) čija  $pK_a$  vrijednost odgovara pH vrijednosti okoline osteoklasta. Kada taj antibiotik dospije u blizinu ciljnih stanica, dolazi do protonacije njegovih karboksilnih skupina i povećanja udjela njegovih neutralnih formi, što mu olakšava ulazak u stanicu.<sup>(22)</sup>

Također je proučavano djelovanje antibiotika na staničnu liniju SBC-5, humane SCLC stanice koje proizvode peptid srodan tireoidnom hormonu (PTHrP) i vaskularni endotelijalni faktor rasta (VEGF), molekule ključne za resorpciju kostiju i angiogenezu kod tumora. Tretman reveromicinom A inhibira lučenje PTHrP, što promjenom mikroatmosfere indirektno inhibira aktivnost osteoklasta.<sup>(20)</sup> Budući da reveromicin A ne pokazuje nikakav učinak na SBC-5 stanice, preostaje pronaći analoge koji će objediniti antitumorsku - citotoksičnu i antiosteoklastnu aktivnost.



**Slika 6.** Strukturna formula reveromicina A;  $R^1=R^2=R^3=H$  (prilagođeno na temelju Woo i sur. 2005.)<sup>(22)</sup>

Reveromicin A je spoj složene molekulske arhitekture te sadrži 6,6-spiroketalnu jezgru koja nosi hemisukcinat, dva nezasićena lanca s terminalnim karboksilnim skupinama i dvije alkilne jedinice (sl. 6). Spoj, kao i njegovi brojni derivati, uspješno je sintetiziran u laboratoriju. Ispitivanja analoga reveromicina A otkrivaju kako dvije od tri karboksilne skupine te slobodne hidroksilne skupine na ugljikovim atomima C5 i C24 značajno doprinose biološkoj aktivnosti, dok vodikova veza između C5-hidroksilne i C24-karboksilne skupine povećava stabilnost spoja.<sup>(23)</sup>

## 6. ZAKLJUČAK

Iscrpna istraživanja s ciljem pronalaska uspješnog selektivnog inhibitora prokariotskog tipa IleRS iznjedrila su mupirocin kao najpotentniji i jedini takav antibiotik u kliničkoj primjeni. Riješena kristalna struktura kompleksa mupirocina i IleRS iz bakterije *S. aureus* identificirala je mupirocin kao analog intermedijera u reakciji aminoacilacije (Ile-AMP). Iako analozi tog intermedijera inhibiraju sve poznate tipove IleRS, mupirocin pokazuje izrazitu selektivnost preferentno inhibirajući prokariotski tip, što opravdava velik potencijal, ne samo IleRS, već i ostalih obitelji enzima unutar aaRS, za razvoj visokoselektivnih antibiotika. Kako potentni antibiotik mora zadovoljiti brojne kriterije, uključujući kemijsku stabilnost, selektivnost, biodostupnost i sl., nužna je manipulacija kemijske strukture prirodnih antibiotika s ciljem sinteze uspješnijih analoga.

Učestala uporaba antibiotika omogućila je razvoj visokorezistentnih bakterijskih sojeva, čiju potencijalnu pandemiju mogu spriječiti samo antibiotici s novim mehanizmom djelovanja, poput ciljane inaktivacije aaRS. IleRS ne služe samo kao meta za razvoj baktericidnih agensa. Spojevi poput ikofungipena pokazuju antifungalnu aktivnost inaktivirajući eukariotski tip enzima. Osim toga, reveromicin A je u kliničkim ispitivanjima pokazao jako antitumorsko djelovanje, posebice na karcinom jajnika i metastaze mikocelularnog karcinoma pluća u kostima. Njegova selektivnost ne staje na pronalasku IleRS unutar cijele mreže staničnih bioloških katalizatora, već ciljano ulazi u točno određeni tip stanica, osteoklaste.

Osnovne ideje za sintezu novih antibiotika čija je meta IleRS crpe se iz informacija koje proizlaze iz biokemijske analize, uključujući proučavanje strukture enzima i kinetičku karakterizaciju. U daljnjim istraživanjima i otkrivanju finih molekulskih interakcija u osebujnom mehanizmu djelovanja IleRS, krije se lijek na brojne bolesti, kao i odgovor čovjeka na sve glasniju prijetnju visokorezistentnih bakterijskih sojeva.

## 7. POPIS LITERATURE

1. **Ochsner UA, Sun X, Jarvis T, Critchley I, Janjic N.** Aminoacyl-tRNA synthetases: essential and still promising targets for new anti-infective agents. *Expert Opin Investig Drugs*. [Review]. 2007 May;16(5):573-93.
2. **Brown MJ, Mensah LM, Doyle ML, Broom NJ, Osbourne N, Forrest AK, et al.** Rational design of femtomolar inhibitors of isoleucyl tRNA synthetase from a binding model for pseudomonic acid-A. *Biochemistry*. 2000 May 23;39(20):6003-11.
3. **Thomas CM, Hothersall J, Willis CL, Simpson TJ.** Resistance to and synthesis of the antibiotic mupirocin. *Nat Rev Microbiol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2010 Apr;8(4):281-9.
4. **Petratis V, Petraitiene R, Kelaher AM, Sarafandi AA, Sein T, Mickiene D, et al.** Efficacy of PLD-118, a novel inhibitor of candida isoleucyl-tRNA synthetase, against experimental oropharyngeal and esophageal candidiasis caused by fluconazole-resistant *C. albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Oct;48(10):3959-67.
5. **Kohno T, Kohda D, Haruki M, Yokoyama S, Miyazawa T.** Nonprotein amino acid furanomycin, unlike isoleucine in chemical structure, is charged to isoleucine tRNA by isoleucyl-tRNA synthetase and incorporated into protein. *J Biol Chem*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1990 Apr 25;265(12):6931-5.
6. **Silvian LF, Wang J, Steitz TA.** Insights into editing from an ile-tRNA synthetase structure with tRNA<sup>ile</sup> and mupirocin. *Science*. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1999 Aug 13;285(5430):1074-7.
7. **Cusack S, Yaremchuk A, Tukalo M.** The 2 Å crystal structure of leucyl-tRNA synthetase and its complex with a leucyl-adenylate analogue. *Embo J*. 2000 May 15;19(10):2351-61.
8. **Nelson DL, Cox MM.** Principles of Biochemistry. W H Freeman and Company. 2008:1079-81.
9. **Sassanfar M, Kranz JE, Gallant P, Schimmel P, Shiba K.** A eubacterial *Mycobacterium tuberculosis* tRNA synthetase is eukaryote-like and resistant to a eubacterial-specific antisynthetase drug. *Biochemistry*. [Comparative Study Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1996 Aug 6;35(31):9995-10003.
10. **Dulic M, Cvetic N, Perona JJ, Gruic-Sovulj I.** Partitioning of tRNA-dependent editing between pre- and post-transfer pathways in class I aminoacyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Jul 30;285(31):23799-809.
11. **Shiba K, Motegi H, Schimmel P.** Maintaining genetic code through adaptations of tRNA synthetases to taxonomic domains. *Trends Biochem Sci*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1997 Dec;22(12):453-7.
12. **Nakama T, Nureki O, Yokoyama S.** Structural basis for the recognition of isoleucyl-adenylate and an antibiotic, mupirocin, by isoleucyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2001 Dec 14;276(50):47387-93.



13. **Brown JR, Gentry D, Becker JA, Ingraham K, Holmes DJ, Stanhope MJ.** Horizontal transfer of drug-resistant aminoacyl-transfer-RNA synthetases of anthrax and Gram-positive pathogens. *EMBO Rep.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2003 Jul;4(7):692-8.
14. **Sutherland R, Boon RJ, Griffin KE, Masters PJ, Slocombe B, White AR.** Antibacterial activity of mupirocin (pseudomonic acid), a new antibiotic for topical use. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985 Apr;27(4):495-8.
15. **Nicholas RO, Berry V, Hunter PA, Kelly JA.** The antifungal activity of mupirocin. *J Antimicrob Chemother.* 1999 Apr;43(4):579-82.
16. **Yanagisawa T, Kawakami M.** How does *Pseudomonas fluorescens* avoid suicide from its antibiotic pseudomonic acid?: Evidence for two evolutionarily distinct isoleucyl-tRNA synthetases conferring self-defense. *J Biol Chem.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2003 Jul 11;278(28):25887-94.
17. **Antonio M, McFerran N, Pallen MJ.** Mutations affecting the Rossman fold of isoleucyl-tRNA synthetase are correlated with low-level mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2002 Feb;46(2):438-42.
18. **Jenal U, Rechsteiner T, Tan PY, Buhlmann E, Meile L, Leisinger T.** Isoleucyl-tRNA synthetase of *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg. Cloning of the gene, nucleotide sequence, and localization of a base change conferring resistance to pseudomonic acid. *J Biol Chem.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1991 Jun 5;266(16):10570-7.
19. **Marion O, Gao X, Marcus S, Hall DG.** Synthesis and preliminary antibacterial evaluation of simplified thiomarinol analogs. *Bioorg Med Chem.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Feb 1;17(3):1006-17.
20. **Muguruma H, Yano S, Kakiuchi S, Uehara H, Kawatani M, Osada H, et al.** Reveromycin A inhibits osteolytic bone metastasis of small-cell lung cancer cells, SBC-5, through an antiosteoclastic activity. *Clin Cancer Res.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 Dec 15;11(24 Pt 1):8822-8.
21. **Miyamoto Y, Machida K, Mizunuma M, Emoto Y, Sato N, Miyahara K, et al.** Identification of *Saccharomyces cerevisiae* isoleucyl-tRNA synthetase as a target of the G1-specific inhibitor Reveromycin A. *J Biol Chem.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2002 Aug 9;277(32):28810-4.
22. **Woo JT, Kawatani M, Kato M, Shinki T, Yonezawa T, Kanoh N, et al.** Reveromycin A, an agent for osteoporosis, inhibits bone resorption by inducing apoptosis specifically in osteoclasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2006 Mar 21;103(12):4729-34.
23. **Shimizu T, Usui T, Fujikura M, Kawatani M, Satoh T, Machida K, et al.** Synthesis and biological activities of reveromycin A and spirofungin A derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2008 Jul 1;18(13):3756-60.

## 8. SAŽETAK

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su enzimi koji proizvode molekule aminoacilirane tRNA potrebne za biosintezu proteina. Tijekom neovisne evolucije unutar tri glavne domene života; bakterijske, arhealne i eukariotske, neke aaRS nakupile su značajne strukturne razlike. Izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS), dio obitelji aaRS, dobar je primjer takve divergentne evolucije. Prokariotski i mitohondrijski oblici enzima eukariota pokazuju kraću C-terminalnu domenu s klasterom od 4 cisteina koji koordiniraju ion cinka. Eukariotski i arhealni ortolozi sadrže dulju C-terminalnu domenu bez cink-veznog motiva. Usprkos značajno većoj očuvanosti katalitičke domene, otkriveni su inhibitori koji uspješno diskriminiraju navedene tipove IleRS i ukazuju na velik potencijal za razvoj antibiotika.

Mupirocin, prirodni produkt bakterije *Pseudomonas fluorescens*, potentni je inhibitor bakterijskog tipa IleRS i jedini je takav antibiotik koji je uveden u medicinsku praksu. Velik afinitet prema proteinima seruma i laka hidroliza u tjelesnim tekućinama, ograničile su njegovu primjenu na liječenje kožnih infekcija. Mupirocin se veže u aktivno mjesto enzima oponašajući prirodne supstrate tog enzima. Nakon vezanja, mupirocin sprječava pomicanje katalitičke petlje prema aktivnom mjestu fiksirajući otvorenu konformaciju enzima, što je dodatan mehanizam inhibicije aktivnosti IleRS. Manipulacija kemijskom strukturom tog antibiotika dovela je do otkrića još potentnijih analoga. Derivati tiomarinola, skupina antibiotika srodnih mupirocinu, pokazuju širi spektar djelovanja i poboljšanu oralnu biodostupnost. Lijekovi koji ciljaju IleRS ne koriste se samo kao baktericidni agensi. Reveromicin A specifično inducira apoptozu osteoklasta, pokazujući potencijal za liječenje osteoporoze i osteolitičkih metastaza u kostima. Ikofungipen inhibira eukariotski tip IleRS i u kliničkim ispitivanjima pokazuje dobre rezultate u liječenju diseminirajuće kandidijaze i gljivičnih infekcija središnjeg živčanog sustava.

## 9. SUMMARY

Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) are enzymes that produce aminoacylated tRNA molecules needed in protein biosynthesis. During independent evolution in three primary kingdoms; archaeal, bacterial and eukaryotic, some aaRS accumulated recognizable structural differences. Isoleucyl-tRNA synthetase (IleRS) is a good example of such divergent evolution. Shorter C-terminal domain of prokaryotic and eukaryotic mitochondrial IleRS contains cluster of four cysteine residues coordinating a zinc ion. In contrast, eukaryotic and archaeal orthologs possess longer C-terminal domain deprived of the zinc binding motif. Catalytic domain was shown to be much more conserved than the C-terminal domain. Nevertheless, selective inhibitors that discriminate between prokaryotic and eukaryotic catalytic domains have been discovered, revealing potential for drug design.

Mupirocin, a natural product produced by *Pseudomonas fluorescens*, is a potent inhibitor of bacterial IleRS and the only antibiotic targeting this enzyme that is used in medical practice. It is restricted to topical use, given its lack of oral bioavailability. Mupirocin occupies enzyme's active site by mimicking its natural substrates, L-isoleucine and ATP. When bound to IleRS, it prevents catalytic loop bearing conserved KMSKS signature motif to access the active site, representing additional inhibitory mechanism. Changes introduced in its chemical structure (modification of aminoacyl moiety and phosphate linker) provided much more potent analogs. Thiomarinol derivatives, group of antibiotics closely related to mupirocin, exhibit even wider spectrum of activity and better oral bioavailability. Drug-targeting IleRSs are not being used only as antibacterial agents. Reveromycin A induces apoptosis specifically in osteoclasts, revealing its potential in treating bone disorders, including osteoporosis and osteolytic bone metastasis. Icofungipen inactivates eukaryotic IleRS and shows good results in treating disseminated candidiasis and fungal CNS infection.