

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](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2022-08-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI
FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

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

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

SEMINARSKI RAD: Goran Koki

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	triptofan
Tyr	Y	tirozin
Val	V	valin

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. AMINOACIL-tRNA-SINTETAZE (aaRS)	3
2.1. Uloga i osnovna obilježja.....	3
2.2. Podjela na dvije klase.....	3
3. IZOLEUCIL-tRNA-SINTETAZA (IleRS)	4
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
4. aaRS KAO METE ZA RAZVOJ ANTIBIOTIKA	7
5. IleRS KAO META ZA RAZVOJ ANTIBIOTIKA	8
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 analogima.....	13
5.1.6. Analози tiomarinola.....	16
5.2. Reveromicin A.....	17
6. ZAKLJUČAK	19
7. POPIS LITERATURE	20
8. SAŽETAK	22
9. SUMMARY	23

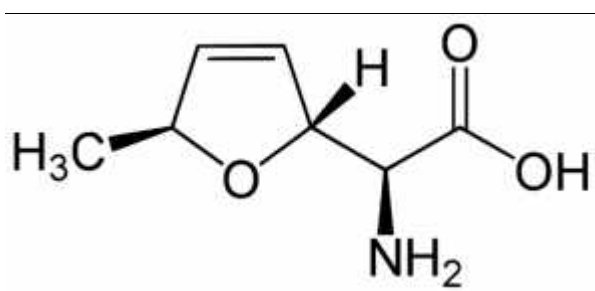
1. UVOD

Dosad eksploatirane velike skupine antibiotika, poput glikopeptida, makrolida, aminoglikozida, tetraciklina i rifampicina, pokazale su se kao neprocjenjivo oružje u borbi protiv mikrobioloških patogena, zaustavljaju i sintezu stanične stijenke bakterija ili inhibiraju i sintezu esencijalnih makromolekula: proteina, DNA i RNA.⁽¹⁾ No aktivna klinička primjena navedenih antibiotika selektirala je brojne rezistentne sojeve, dok horizontalni prijenos gena katalizira širenje otpornosti među u dalekosrodnim organizmima. U potrazi za novim antibioticima i njihovim potencijalnim meta, 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 je osnova 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 eukariotskog ortologa, jedini je trenutno takav komercijalno dostupan lijek.^(1, 2)

Neke su se aaRS pokazale kao prikladnije mete za razvoj antibiotika. Razlog tome jest povećanje hidrofobnosti i veličine veznog džepa za supstrate u tim aaRS, kako bi u njih smjestile glomaznije aminokiseline, što dozvoljava veći i 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 nekim 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 i 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 bolnicama, već otporno na visoke koncentracije mupirocina, upravo zbog brzog horizontalnog širenja gena koji kodira IleRS nalik eukariotskom tipu.⁽³⁾

Mupirocin i reveromicin A, najistraživaniji inhibitori IleRS, identificirani su među produktima koje u prirodi lu i 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.^(1,2)

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.⁽¹⁾ Osim toga, klinička ispitivanja ikofungipena pokazala su uspjeh tog antibiotika u liječenju fungalnih infekcija središnjeg živčanog sustava i orofaringealne kandidijaze u HIV-pozitivnih pacijenata.⁽⁴⁾ 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.⁽⁵⁾ Štoviše, enzim proizvodi furanomicil-tRNA^{Ile} koja uspješno izbjegava mehanizme popravka pogreške, usprkos značajnoj razlici u kemijskoj strukturi furanomicina i prirodnog supstrata.⁽⁵⁾ *In vitro* sinteza β-laktamaze uz prisutnost radioaktivno obilježenog furanomicina, pokazuje kako se ovaj spoj uspješno ugrađuje u proteine.⁽⁵⁾ 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.)⁽¹⁾

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 odgovaraju u 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 adenzina (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 otkrivanja i popravke pogrešaka (većina napravi tek jednu grešku u 10 000 događaja). Osobiti problem je precizno razlikovanje strukturno vrlo sličnih aminokiselina, što predstavlja izazov aktivnom mjestu u smislu finog molekuskog prepoznavanja. Uspoređujući i 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^{Ile}) na pet uspješnih.⁽⁶⁾ No, zbog razvoja efikasnih mehanizama popravke, stopa ugradnje valina u proteine na mjesto izoleucina smanjuje se na 1 u 3000 događaja.⁽⁶⁾ Imaju i 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, o uvjetnim motivima koji sudjeluju u vezanju ATP-a, vezanju tRNA i reakcijskom mehanizmu.⁽⁷⁾ Prijenos aminokiseline na molekulu tRNA u slučaju aaRS razreda I (u koji ubrajamo i IleRS) započinje nukleofilnim napadom 2'-OH skupine terminalnog adenzina na karbonilni centar aminoacil-adenilata, dok istu ulogu kod aaRS razreda II preuzima susjedna

3'-OH skupina.⁽⁸⁾ Razred I sadrži katalitičku domenu s utkanim Rossmannovim strukturnim motivom u aminoterminalnoj polovici enzima. Rossmannov motiv sastoji se od šest β -ploča povezanih α -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.⁽⁹⁾ 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.⁽⁹⁾ 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 „enzimopretka“ koji nije diskriminirao između te tri aminokiseline.⁽⁷⁾ U enzimima razreda II, domena izgrađena od antiparalelnih β -ploča ima rigidnu podlogu za vezanje ATP-a i aminokiseline, s tri karakteristična motiva potrebna za dimerizaciju i vezanje supstrata.⁽¹⁾

3. IZOLEUCIL-tRNA-SINTETAZA (IleRS)

3.1. Osnovna strukturna obilježja i mehanizam popravka

IleRS katalizira esterifikaciju izoleucina i pripadne tRNA^{Ile} 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, kinetika kompeticija između vode i 2'-OH skupine terminalnog adenzina molekule tRNA uravnotežuje popravak prije i nakon prijenosa.⁽¹⁰⁾ Enzim pokazuje kompleksnu modularnu arhitekturu koju, ovisno o funkciji, možemo podijeliti u tri regije. Prvu regiju, koja prepoznaje neobičajenu 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 pogrešno prenesenu aminokiselinu.⁽⁶⁾

Kako bi enzim tRNA^{Ile} molekuli pridružio pripadnu aminokiselinu, najprije mora prepoznati elemente koji ju diskriminiraju od mnogobrojnih sli nih molekula. Enzim pomaže u dvije antiparalelne α -zavojnice veže mali utror akceptorske peteljke, a zamijena je i interakcija okosnice tRNA molekule s lizinom iz konzerviranog KMSKS aminokiselinskog slijeda, ija bi promjena orijentacije uslijed vezanja tRNA^{Ile} mogla ukazivati na važnost tog procesa u popravku prije prijenosa (odmicanje KMSKS om e od adenilata nepripadne aminokiseline u sintetskom mjestu pove ala bi njegovu konstantu disocijacije).⁽⁶⁾ Riješena kristalna struktura IleRS u kompleksu s tRNA^{Ile} iz *S. aureus*, te njena usporedba sa strukturom GlnRS i tRNA^{Gln}, ukazuje na mogu i mehanizam popravka pogrešno aminoacilirane tRNA^{Ile}. Model pretpostavlja dvije konformacije 3' kraja tRNA^{Ile}: konformaciju nalik ukosnici koja omogućuje aminoacilaciju u sintetskom mjestu (C⁷⁵ 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^{Ile} u domenu za popravak.⁽⁶⁾ Dakle, model uključuje translokaciju 3' kraja tRNA^{Ile} između dva aktivna mjesta u kompeticiji, što podsjeća na mehanizam popravka kod DNA-polimeraze.⁽⁶⁾

3.2. IleRS karakteristike 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.⁽¹¹⁾ Pokazalo se kako je spomenuti motiv, oblika C⁹⁰²PRC...C⁹²¹GRC, esencijalan za aktivnost enzima kod *E. coli*.⁽⁹⁾ 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 obojanim sljedovima aminokiselina kao što je NKIL kod bakterijskih te MPY, HYPF i YTLXV motivi kod eukariotskih IleRS.⁽⁹⁾

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, oboje zamjenjivi u bakteriji i arheji, 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).⁽¹²⁾ Opisan sustav diskriminacije potvrđen je mjesno-specifičnom mutagenezom.⁽¹²⁾ Budući da tako suptilne promjene mogu odrediti osjetljivost na djelovanje specifičnih inhibitora, iako 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 slijedova, 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.⁽¹³⁾ 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.^(9, 13)

Ne samo da je ovaj stekao alternativni enzim za aminoaciliranje tRNA^{Ile}, već novoste ni 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).⁽¹³⁾ 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.⁽¹³⁾ U prilogu 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.⁽¹³⁾ Aminoacilacijski pokusi s IleRS2 izoliranom iz *Mycobacterium tuberculosis* pokazuju kako taj enzim jednako uspješno aminoacilira tRNA^{Ile} 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).⁽⁹⁾ 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 najvažnijih problema pri uvođenju novog antibiotika u kliničku primjenu.

4. aaRS KAO METODE ZA RAZVOJ ANTIBIOTIKA

Male razlike među u strukturama temeljno obojenog 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.⁽⁹⁾ Ostale karakteristike koje ih čine potentnim metama za djelovanje antibiotika jesu njihova omniprezentnost, nezamjenjiva uloga u procesu sinteze proteina (samim time i u stanju/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).⁽¹⁾ U slučaju nedostatka GlnRS, u organizmima pronalazimo nediskriminatornu glutamil-tRNA-sintetazu (GluRS) koja aminoacilira glutamatom tRNA^{Gln}. Tako nastala Glu-tRNA^{Gln} u transamidacijskom putu prevodi se u amid - Gln-tRNA^{Gln} 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^{Asn} pretvara u Asn-tRNA^{Asn}) nadokna uje nedostatak AsnRS te ujedno omogu uje selektivnu eliminaciju tog patogena.⁽¹⁾ Tako er je kao meta za razvoj antibiotika predložena domena za popravak, ija bi narušena funkcija uzrokovala pogrješnu ugradnju aminokiselina u rastu e polipeptide. Potencijal opravdava i pokus u kojem su mutanti *E. coli* koji su kodirali IleRS s defektnom domenom za popravak, pokazivali zna ajno usporen i abnormalan rast.⁽¹⁾ Tako er, lektoriraju a aktivnost *E. coli* prolil-tRNA-sintetaze (ProRS) uklju uje popravak prije i nakon prijenosa aminokiseline na tRNA, dok ljudska ProRS ne posjeduje takve aktivnosti, što otvara vrata razvoju selektivnih antibiotika koji bi ciljali domenu za popravak prokariotskog tipa ProRS.⁽¹⁾ Lizil-tRNA-sintetaza (LysRS) je jedina aaRS ije lanove pronalazimo u razredu I (arhealni tip te spirohete poput *Treponema palidum*, uzro nik sifilisa i *Borrelia burgdorferi*, uzro nik Lajmske bolesti) i razredu II (eukariotski i bakterijski tip), kao posljedica njihove neovisne evolucije.⁽¹⁾ Razlika u veznom mjestu dva spomenuta oblika IleRS ponovno može poslužiti za sintezu diskriminatornih antibiotika.

Me u najnovije pokušaje svrstava se korištenje kombinacije dvaju inhibitora razli itih aaRS, što zna ajno proširuje spektar djelovanja i smanjuje mogu nost 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*.⁽¹⁾ Nakon tretmana bakterija navedenim antibioticima, uspješno su izolirane subpopulacije bakterija koje su razvile otpornost na pojedina ne agense, ali ne i na njihovu kombinaciju.⁽¹⁾

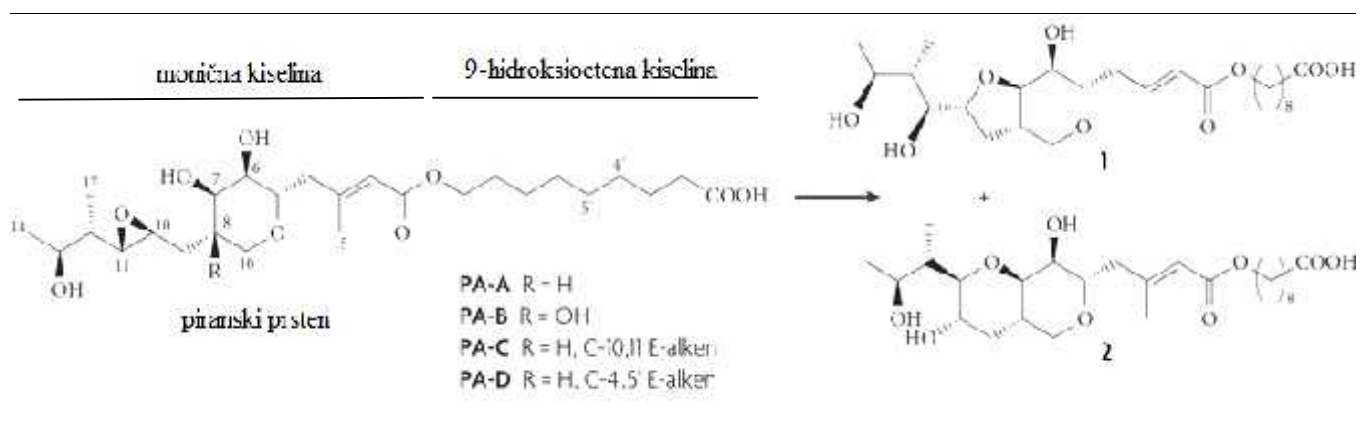
5. IleRS KAO META ZA RAZVOJ ANTIBIOTIKA

5.1. Mupirocin

5.1.1. Op a obilježja mupirocina

Bakterija *Pseudomonas fluorescens* lu i mješavinu antibiotika kako bi eliminirala mikroorganizme s kojima kohabira rizosferu i ulazi u kompeticiju za hranjivim tvarima.⁽³⁾ Identificirana su etiri aktivna sastojka, pseudomoni na kiselina A, B, C i D, iako pseudomoni na kiselina A (kasnije nazvana mupirocin) ini 90% mješavine. Mupirocin proizvode još barem dva soja *Pseudomonas* spp. i morske bakterije iz roda *Alteromonas*. Kemijski se identificira kao ester moni ne kiseline (C₁₇) i 9-hidroksinonanske kiseline (C₉, zasi ena masna kiselina).⁽²⁾ Moni na se kiselina sastoji od piranske jezgre koja je veznim

dijelom (tzv. linker) povezana s masnom kiselinom i bo nog lanca koji sadži epoksid.⁽²⁾ 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 produciraju i dva cikla katera.⁽²⁾ (sl. 2)



Slika 2. Struktura pseudomoni ne kiseline A (mupirocin), B, C i D; produkti razgradnje pseudomoni ne kiseline A u kiselim, odnosno bazi nim uvjetima (prilago eno na temelju Brown i sur. 2000.)⁽²⁾

5.1.2. Klini ka primjena i spektar djelovanja

Mupirocin je pronašao svoju klini ku primjenu u lije enju kožnih infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim streptokokima i stafilokokima. Gotovo svi klini ki izolati visokorezistentnih bakterija *S. aureus* i *Streptococcus pyogenes* pokazali su se osjetljivim na djelovanje mupirocina i nije uo ena križna rezistencija mupirocina i bilo koje druge velike skupine antibiotika.⁽³⁾ Nadalje, poja ana aktivnost mupirocina u kiseloj sredini (minimalna inhibitorna koncentracija poraste do 100 puta pri porastu pH s 5 na 8) te rezistentnost obrambene kožne flore koju ine korinebakterije, mikrokoki te anaerobne bakterije roda *Propionibacterim*, ine ga još pogodnijim za lije enje kožnih infekcija.⁽³⁾ Gram-negativne bakterije pokazuju znatno ve u otpornost zbog slabe penetracije antibiotika kroz njihovu vanjsku membranu.⁽¹⁴⁾

Glavni nedostatak mupirocina jest nemogućnost oralne primjene. Iako pokazuje dobru apsorpciju, u tjelesnim tekućinama dolazi do brze hidrolize esterske veze između 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 i dermatofite.⁽¹⁴⁾ 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*.⁽¹⁴⁾

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.⁽³⁾ Najvažniju 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). Monononanska kiselina i 9-hidroksinonanska kiselina vjerojatno se sintetiziraju odvojeno, iako oba spoja sazrijevaju kroz puteve biosinteze masnih kiselina i poliketida.⁽³⁾ 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 monononanska kiselina raste u nekoliko krugova u kojima se na startnu jedinicu (acetat) sukcesivno dodaju elongacijske jedinice (malonat ili metilmalonat).⁽³⁾ Zanimljivo je da MmpC koji posjeduje tandem aciltransferaznih domena *in trans* aktivira potetno 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.⁽³⁾ Preostaje korigiranje oksidacijskog stanja atoma piranskog prstena.

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

spajanje odvija nakon sinteze 9-hidroksinonanske kiseline. *mup* klaster reguliran je gusto om 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.⁽³⁾

5.1.4. Na in 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^{Ile}, izoleucil-adenilat (IleAMP). Bo ni ogranak piranske jezgre koji sadži epoksid, rasporedom ugljikovih atoma oponaša L-izoleucin te se, kao analog tog prirodnog supstrata, s njime natječe za okupaciju jedinstvenog veznog mjesta.⁽¹⁵⁾ Dihidroksitetrahidropiranski prsten analog je riboze adenilata, dok α,β -nezasi eni ester (linker) IleRS prepoznaje kao adenin.⁽²⁾ Me u 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 ovanog aminokiselinskog slijeda KMSKS koji sudjeluje u vezanju ATP-a pri normalnom reakcijskom mehanizmu IleRS. Nadalje, pokazalo se kako je potrebna tri reda veće 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.⁽¹⁶⁾

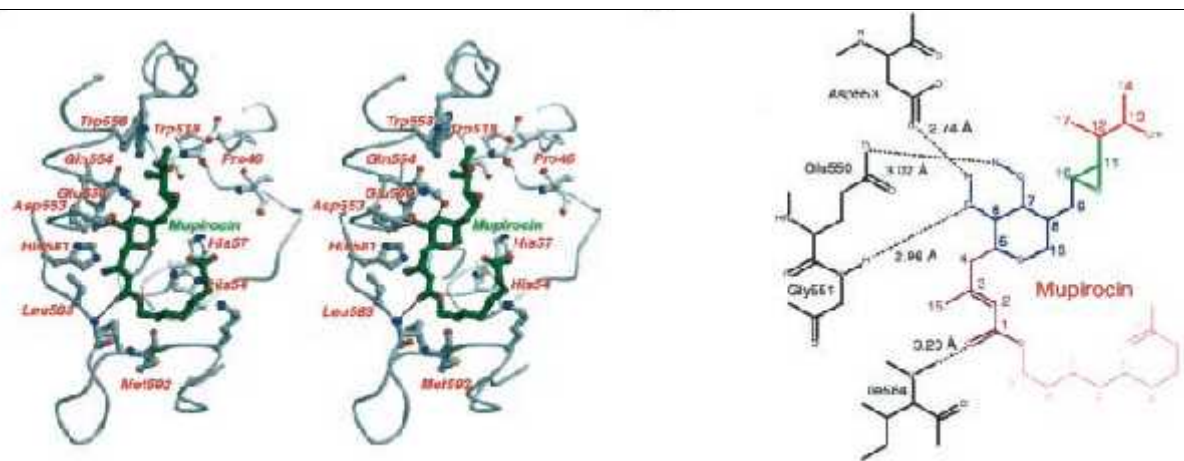
Postoje dva tipa otpornosti na mupirocin različite genetičke pozadine. Otpornost na niske koncentracije mupirocina (MIC, minimalna inhibitorna koncentracija: 8 - 256 $\mu\text{g/ml}$) rezultat je točke mutacije u genu *ileS* koji kodira divlji, prokariotski tip IleRS. S druge strane, otpornost na visoke koncentracije antibiotika (MIC: > 256 $\mu\text{g/ml}$) rezultat je stjecanja novog gena *mupA*, vrlo vjerojatno horizontalnim prijenosom, koji kodira IleRS eukariotskog tipa.⁽¹⁷⁾ 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 Rossmannova motiva, udaljeni 14 Å od KMSKS slijeda (aminokiselinski ostaci 595 do 599) gdje pozicioniraju karboksilnu skupinu mupirocina, odnosno -fosfat ATP-a.⁽¹⁷⁾ Razgranati alifatski lanac V588, zajedno s bočnim

ograncima okolnih aminokiselinskih ostataka, formira snažan hidrofoban džep unutar Rosmannova motiva. Zamjena valina fenilalaninom rezultira unosom veće aromatskog bojnog 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 bojnog ogranka fenilalanina uzrokuje konformacijske promjene koje uzrokuju gubitak vodikove veze koja je postojala između funkcionalnih skupina glavnog lanca V588 i mupirocina, dodatno smanjujući i afinitet tog antibiotika prema IleRS. Supstitucija V631F vjerojatno dovodi do niskodozne otpornosti na mupirocin na slici 3. Detektirano je još nekoliko mutacija povezanih s otpornošću na mupirocin izvan aktivnog sintetskog mjesta (distalno od veznog mjesta za tRNA^{Ile} i u editing domeni), no njihov značaj još nije do kraja razriješen.⁽¹⁷⁾

Istraživanja na rezistentnom soju bakterije *M. thermoautotrophicum* pokazuju kako je otpornost posljedica zamjene glicina aspartatom, i to u blizini KMSKS regije koja povezuje tRNA-veznu domenu s mononukleotid-veznom domenom.⁽¹⁸⁾ Snažan u inak 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 proizvodi.⁽¹⁷⁾ Kako je mupirocin kompetitivni inhibitor izoleucina, njihova se vezna mjesta moraju barem djelomice poklapati. Određena konstanta disocijacije mupirocina za IleRS vrste *P. fluorescens* 10⁶ 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.⁽¹⁷⁾

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.⁽¹²⁾ Dio mupirocina koji morfološki nalikuje bojnog 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).⁽¹²⁾ 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 na in 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 bo nog ogranka D553, dok se hidroksilna skupina na C-7 sparuje s Oε bo nog ogranka E550 (sl. 3, lijevo).⁽¹²⁾ Konjugirani sustav od C-1 do C-3 ulazi u van der Waalsovu interakciju s bo nim ogrankom L583, dok karbonilni kisik interreagira s amidnom skupinom glavnog lanca I584, ime mupirocin oponaša adeninski prsten IleAMP-a (sl. 3, desno) i upotpunjuje cijeli set interakcija koje pomažu mupirocinu da blokira vezno mjesto tog „visokoenergetskog“ intermedijera.⁽¹²⁾ 9-hidroksinonanska kiselina sjeda na enzim uzduž kataliti ke 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 kataliti kog rasjeda s Rosmannovim motivom, no nonanska kiselina molekulskim interakcijama prije i spomenuto kretanje i fiksira otvorenu konformaciju, što bi mogao biti dodatan inhibitorski mehanizam mupirocina.⁽¹²⁾



Slika 3. Molekula mupirocina (zeleno) vezana u kataliti ko 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 bo nom lancu L-izoleucina prikazan je crveno, dio koji sadži epoksid zeleno, piranska jezgra plavo, vezna regija (linker) ljubi asto i 9-hidroksinonanska kiselina svijetlo ljubi asto (prilago eno na temelju Nakama *i sur.*,2001.)⁽¹²⁾

Ciljana mutageneza 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 izme u bakterijskih/arhealnih i eukariotskih IleRS zna ajno mijenjaju osjetljivost prema mupirocinu.⁽¹⁹⁾

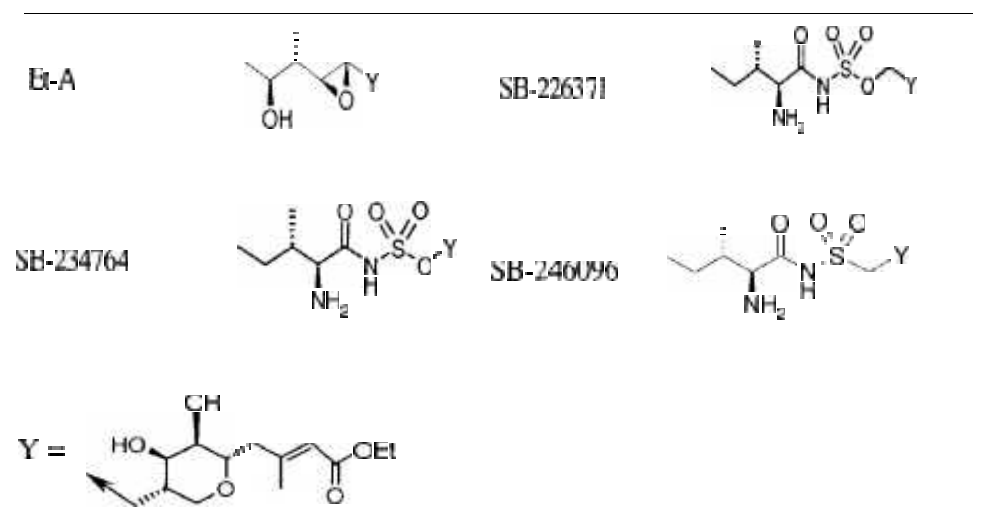
5.1.5. Potraga za uspješnijim analogima

Kao što je već ranije spomenuto, mupirocin nalikuje reakcijskom intermedijeru Ile-AMP u više aspekata, no i ni se kako ipak postoje odstupanja. Bo ni ogranak koji sadrži epoksid nije dobar analog izoleucina jer mu nedostaje zwitterionska forma, dok je razmak između piranskog prstena i dijela koji oponaša bo ni ogranak L-izoleucina nepovoljan.⁽²⁾ Utvrđena su četiri glavna dijela derivata pseudomonasne kiseline koja su bitna za prepoznavanje od strane IleRS: aminokiselinski bo ni lanac, linker (C-1 do C-5), monatna jezgra i monatni bo ni 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.⁽²⁾ Uspješnost sintetiziranih analoga utvrđuje se određivanjem konstante disocijacije inhibitora (K_i , što je vrijednost v_e , analog je slabiji inhibitor), dok se za potentnije analoge određuje inhibicija izmjene ATP/PPi pri maksimalnom zasićenju enzima supstratom.⁽²⁾

Promjene uvedene u linker i aminokiselinski bo ni lanac omogućuju proučavanje molekularnih 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.⁽²⁾ Nadalje, kako nijedan derivat Et-A ne posjeduje bo ni 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.⁽²⁾

Kao najuspješniji analog mupirocina pokazao se spoj SB-234764 (sl. 4) pokazujući i 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.⁽²⁾ Povećanje udaljenosti između izoleucina i šećernog dijela analoga (primjerice spoj SB-226371, sl. 4) dramatično reducira njegov inhibični 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.⁽²⁾ S druge strane, stereoelektronska svojstva sulfamata su toliko povoljna jer oponašaju prijelazno stanje

fosfoanhidrida tijekom adenilacije.⁽²⁾ Također je uočeno negativan efekt dokidanja polarosti 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 i činjenicu da inhibitori iskorištavaju izrazito stereoselektivni vezni džep za prirodni supstrat.⁽²⁾

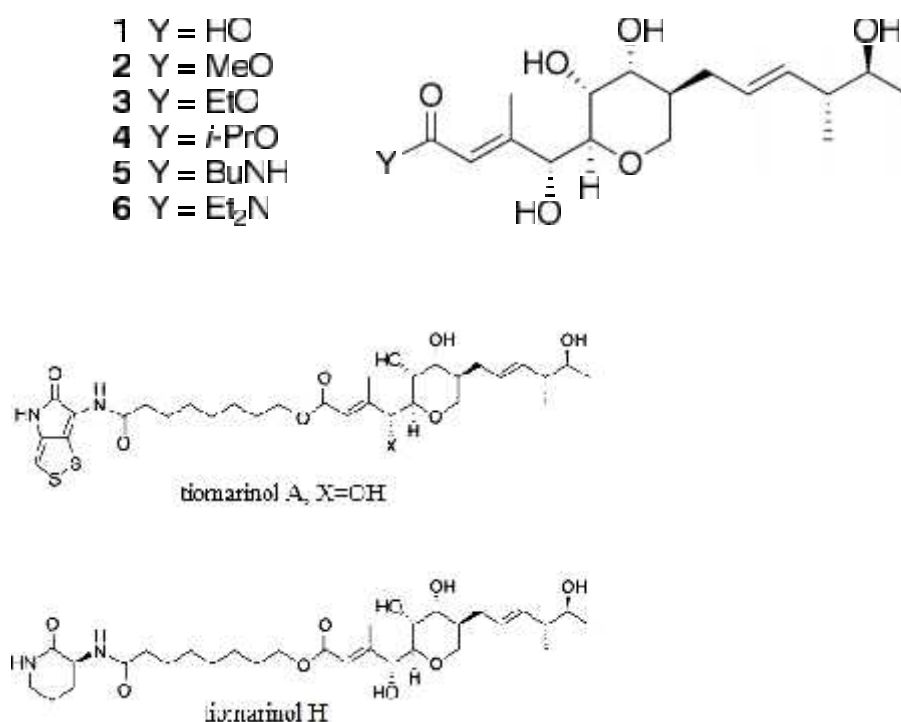


Slika 4. Strukturne formule analoga mupirocina (prilagođeno na temelju Brown *i sur.* 2000.)⁽²⁾

Vezno mjesto za aminokiselinu omeđeno je s dva triptofana (sl. 2) što omogućuje promijenu triptofanske fluorescencije uslijed vezanja supstrata ili njegovih analoga. Vežanje kraćeg bojnog lanca koji sadrži mupirocin ne mijenja značajno stupanj solvatacije bojnog ogranka triptofana, što se očituje kao mali porast u njegovoj fluorescenciji. Konstrukcija analoga koji bolje oponašaju izoleucin dovodi do stvaranja snažnijeg hidrofobnog kontakta s bojnim 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.⁽²⁾ 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 monomernih struktura s aktivnim mjestom karakteristična samo za IleRS. Otkrivanjem proučavanjih inhibitora svjedoči činjenica kako se afinitet najpotentnijih inhibitora može izmjeriti samo kalorimetrijskim metodama (konstanta disocijacije iznosi oko 10 fM).⁽²⁾

5.1.6. Analози 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, kraćeg i C1-alkoksi lanca te zamjenu C10-C11 epoksida *E* alkenom jedinicom.⁽¹⁹⁾



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

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.⁽¹⁹⁾ 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 bilo

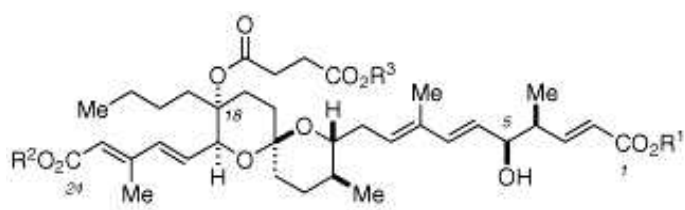
ogranak koji sadrži estersku vezu zamijenjen surogatima karboksilne skupine, kao što su diazoli i triazoli, no takvi derivati su se pokazali inaktivnim.⁽¹⁹⁾ Nadalje, pojednostavljeni analozi bez terminalne heterocikličke skupine odlikuju se većom biološkom aktivnošću u usporedbi s tiomarinolom H, iz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

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.⁽²⁰⁾ Praćenje ugradnje radioaktivnog L-[³⁵S]-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, obojavane aminokiseline koja se nalazi u blizini KMSKS slijeda u kvasca i ljudi, aspartatom.²³ *In vitro* praćenje prijenosa radioaktivno obilježenog izoleucina na tRNA pokazao je kako koncentracija reveromicina A, dva reda veličine manja od one potrebne za inhibiciju rasta kvasca, uzrokuje smanjenje aktivnosti enzima IleRS za 20%.⁽²¹⁾

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.⁽²⁰⁾ Te stanice izrazito su osjetljive na djelovanje reveromicina A koji ih lako uvodi u apoptozu indukcijom otpuštanja citokroma c i aktivacijom kaspaze 3.⁽²²⁾ 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.⁽²²⁾

Tako er je prou avano djelovanje antibiotika na stani nu liniju SBC-5, humane SCLC stanice koje proizvode peptid srodan tireoidnom hormonu (PTHrP) i vaskularni endotelijalni faktor rasta (VEGF), molekule krucijalne za resorpciju kostiju i angiogenezu kod tumora. Tretman reveromicinom A inhibira lu enje PTHrP, što promjenom mikroatmosfera indirektno inhibira aktivnost osteoklasta.⁽²⁰⁾ Budu i da reveromicin A ne pokazuje nikakav u inak na SBC-5 stanice, preostaje prona i analoge koji e objediniti antitumorsku - citotoksi nu i antiosteoklastnu aktivnost.



Slika 6. Strukturna formula reveromicima A; $R^1=R^2=R^3=H$ (prilago eno na temelju Woo i sur. 2005.)⁽²²⁾

Reveromicin A je spoj složene molekulske arhitekture te sadrži 6,6-spiroketalnu jezgru koja nosi hemisukcinat, dva nezasi ena 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 zna ajno doprinose biološkoj aktivnosti, dok vodikova veza izme u C5-hidroksilne i C24-karboksilne skupine pove ava stabilnost spoja.⁽²³⁾

6. ZAKLJUČAK

Iscrpna istraživanja s ciljem pronalaska uspješnog selektivnog inhibitora prokariotskog tipa IleRS iznjedrila su mupirocin kao najpotentniji i jedini takav antibiotik u klini koji 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 inhibiraju i 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 i kemijsku stabilnost, selektivnost, biodostupnost i sl., nužna je manipulacija kemijske strukture prirodnih antibiotika s ciljem sinteze uspješnijih analoga.

U estala 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 inaktiviraju i 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 to određeni tip stanica, osteoklaste.

Osnovne ideje za sintezu novih antibiotika čija je meta IleRS crpe se iz informacija koje proizlaze iz biokemijske analize, uključujući i proučavanje strukture enzima i kinetiku karakterizaciju. U daljnjim istraživanjima i otkrivanju finih molekularnih interakcija u posebnom mehanizmu djelovanja IleRS, krije se lijek na brojne bolesti, kao i odgovor uvijek na sve glasiju 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^{ile} 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, Cvetesic 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, Kano 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 krak u 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 ovisnosti 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 i prirodne supstrate tog enzima. Nakon vezanja, mupirocin sprječava pomicanje katalitičke petlje prema aktivnom mjestu fiksirajući i 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 i potencijal za liječenje osteoporoze i osteolitičkih metastaza u kostima. Iko fungipen inhibira eukariotski tip IleRS i u kliničkim ispitivanjima pokazuje dobre rezultate u liječenju diseminirane 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.