

# Biosinteza organskih spojeva fluora u *Streptomyces cattleya*

---

Perić, Kristina

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:217:182971>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-26**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Kristina Perić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

**BIOSINTEZA ORGANSKIH SPOJEVA  
FLUORA U *Streptomyces cattleya***

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Zagreb, 2022 godina.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

29. lipnja 2022.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

15. srpnja 2022.

Mentor rada: doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Potpis:



## Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>2</b>
<b>§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Bakterija <i>Streptomyces cattleya</i> .....</b>	<b>4</b>
2.1.1. Bakterije roda <i>Streptomyces</i> .....	4
2.1.2. Genom bakterije <i>Streptomyces cattleya</i> .....	4
<b>2.2. Mehanizam enzimske fluorinacije kod bakterije <i>Streptomyces cattleya</i>.....</b>	<b>5</b>
2.2.1. Enzim 5'-fluoro-5'-deoksiadenozin sintaza (5'-FDAS) .....	5
2.2.2. Molekula S-adenozil-L-metionina (SAM).....	6
2.2.3. Enzimska fluorinacija u <i>Streptomyces cattleya</i> .....	9
<b>2.3. Fluorirani sekundarni metaboliti bakterije <i>S. cattleya</i> .....</b>	<b>12</b>
2.3.1. Fluoroacetat.....	12
2.3.2. 4-fluorotreonin.....	13
2.3.3. Toksičnost fluoroacetata .....	15
2.3.4. Enzim tioesteraza <i>FLK</i> .....	16
<b>2.4. Antibiotici koje sintetizira bakterija <i>Streptomyces cattleya</i> .....</b>	<b>18</b>
2.4.1. Tienamicin.....	18
2.4.2. Cefamicin <i>C</i> .....	19
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI: .....</b>	<b>21</b>



## § Sažetak

Fluor, element poznat kao najelektronegativniji element u periodnom sustavu elemenata, 13. je najzastupljeniji element u Zemljinoj kori. Činjenica da je zastupljeniji od svih drugih halogenih elemenata stvara dodatnu zbunjenost kada je u pitanju iznimna rijetkost prirodnih spojeva koji sadrže fluor. Takvi spojevi koji sadrže jaku C–F vezu, iako se vrlo teško biosintetiziraju i rijetki su, danas su, zbog pogodnih svojstava, među najzastupljenijim spojevima korištenim u farmaceutici, za izradu velikog broja lijekova, ali i u agrokemiji. Unatoč povećanim zahtjevima u širokim područjima znanosti, sinteza organofluoro spojeva još se uvijek često suočava s problemima kao što su poteškoće u rukovanju fluoriranim reagensima i u kontroli kemijskih reakcija. Većina sintetskih metoda za fluoriranje ima loše utjecaje na okoliš, a nove i možebitno korisne metode u ovom području još su nedovoljno istražene i razrađene. Nove metodologije, koje mogu upotpuniti nedostatke poput niske stabilnosti međuprodukata koji sadrže fluor i niske selektivnosti reakcija (kemo-, regio- i/ili stereo-) u sintezi takvih spojeva, otvorile bi potpuno novu perspektivu za kemiju fluora, a dotad je nužno uvidjeti važnost biosinteze organofluoro spojeva.

Bakterija *Streptomyces cattleya* stoga, zbog svoje rijetke sposobnosti biosinteze organskih spojeva fluora, postaje organizam od velikog interesa. U svom metaboličkom putu bakterija *S. cattleya* koristi enzim za fluoriranje, 5'-fluoro-5'-deoksiadenozin sintazu (dalje u tekstu FDAS), koja katalizira stvaranje C–F veze S<sub>N</sub>2 mehanizmom nukleofilnog napada fluoridnog iona na S-adenozil-L-metionin (SAM), a kao metabolički produkti nastaju 4-fluorotreonin, jedina prirodna aminokiselina koja sadrži fluor, i toksični fluoroacetat.



## § 1. UVOD

Organohalogeni spojevi su oni spojevi koji sadrže barem jedan atom halogena (fluor, klor, jod i brom) vezan na atom ugljika. Međusobno se uvelike razlikuju po kemijskoj reaktivnosti, ovisno o halogenu koji je vezan i skupini kojoj pripadaju (alkil/aril/vinil/acil halogenidi), a mnogi od njih imaju važne primjene u industriji; kao otapala i pesticidi, kao međuprodukti u pripremi boja, lijekova i sintetskih polimera. Mnogi organohalogeni spojevi postoje kao prirodni spojevi koje sintetiziraju razne biljke, gljive, bakterije i morski organizmi, a također postoje i različite sintetske metode kojima se halogeni unose u organske molekule.<sup>1</sup>

Iako je poznato oko 3700 prirodnih organohalogenata, tek nekoliko njih su organski spojevi fluora. Organohalogeni spojevi u prirodi se, s obzirom na izvor, dijele na biogene; one koje proizvode bakterije, gljive, lišajevi, morske biljke i životinje, kopnene biljke, neki insekti, i na abiogene; koji nastaju ili se oslobađaju tijekom geotermalnih procesa kod vulkana i drugih geoloških procesa. Pojedini abiogeni organofluoro spojevi otkriveni su u plinovima vulkanskih otvora, kao i u plinovima hidrotermalnih izvora, a istraživanja su sugerirala da su otkriveni spojevi vjerojatno rezultat reakcija ugljikovodika s fluorovodikom i klorovodikom, anorganskim halogenidima ili mineralima koji sadrže halogenide pod uvjetima visoke temperature koji su prevladavali na izvorima. Većina poznatih biogenih organofluoro spojeva postoje kao fluorirane karboksilne kiseline, a prvi je fluoroacetat izoliran 1986. godine iz biljke *Dichapetalum cymosum*<sup>2</sup> koja je otrovna za goveda i ovce. Do danas je fluoroacetat izoliran i iz nekih drugih biljaka iste porodice, a od drugih organskih spojeva fluora iz biljaka su izolirani fluoroacetaldehid i fluorirane masne kiseline poput 18-fluorooleinske kiseline, 16-fluoropalmitinske kiseline, 14-fluoromiristinske kiseline i *threo*-18-fluoro-9,10-dihidroksistearinske kiseline koje su toksične baš poput fluoroacetata zbog njihove razgradnje  $\beta$ -oksidacijom masnih kiselina do tog toksičnog metaboličkog produkta.<sup>1</sup> Osim iz biljaka, pojedini organofluoro spojevi su u prirodi izolirani i iz *Streptomyces* bakterija od kojih je najpoznatija bakterija *Streptomyces cattleya* koja je zanimljiva zbog svoje sposobnosti proizvodnje različitih antibiotika, a mehanizam koji koristi ta bakterija nužan je za shvaćanje stvaranja C–F veze, što je ujedno i glavna tema ovog rada.

Fluor je najelektronegativniji element periodnog sustava elemenata, a njegova visoka elektronegativnost utječe na distribuciju elektrona u molekuli, utječući time na kiselost ili

bazičnost susjedne skupine, dipolni moment unutar molekule, te ukupnu reaktivnost i stabilnost, a kao posljedica toga dolaze i promjene kemijskih i fizikalnih svojstva spojeva s fluorom. C–F veza najjača je među ugljik-halogen vezama, što organofluoro spojeve čini vrlo termički i oksidativno stabilnima. Poznato je kako elektronegativnost, veličina, lipofilnost i elektrostatičke interakcije fluora mogu drastično utjecati na kemijsku reaktivnost spoja.<sup>3</sup>

Fluor je element malog van der Waalsovog radijusa (1,35 Å), koji nije znatno veći od radijusa vodika (1,20 Å), te stoga s obzirom na steričke zahtjeve može oponašati vodik prilikom vezanja u aktivno mjesto enzima. Također, duljina veze C–F (1,38 Å) usporediva je s duljinom veze C–H (1,10 Å) što dodatno ukazuje na to kako supstitucija atoma vodika vezanog na ugljik, sa atomom fluora, neće imati veliki sterički učinak na samu molekulu. Kako razlog razlike u kemijskim i fizikalnim svojstvima prilikom supstitucije atoma vodika atomom fluora nije dominantno sterički, postavlja se pitanje što to kod fluora ima tako velik utjecaj na vezu s ugljikom.

Velika elektronegativnost fluora, njegova sposobnost stvaranja stabilnih veza s ugljikom i kompaktna veličina, nude dobre mogućnosti u pripravi raznih lijekova. Tako je 1970. godine na tržištu bilo tek oko 2% lijekova koji su sadržavali fluor, dok ga trenutno sadrži čak 25% posto svih dostupnih aktivnih farmaceutskih sastojaka.<sup>4</sup> Čak trećina najčešćih i najučinkovitijih lijekova sadrži atome fluora i stoga je postojanje, kao i sinteza organofluoro spojeva sve važnija.

## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. Bakterija *Streptomyces cattleya*

#### 2.1.1. Bakterije roda *Streptomyces*

*Streptomyces* je rod Gram-pozitivnih bakterija koje rastu u raznim sredinama, nalazeći se pretežno u tlu i raspadnutoj vegetaciji. Svojim oblikom podsjećaju na filamentne (nitaste) gljive, rastu kao micelij razgranatih hifnih filamenata, a razmnožavaju se poput plijesni, stvaranjem zračnih grana koje se pretvaraju u lance spora.<sup>5</sup> Najzanimljivije svojstvo roda *Streptomyces* je sposobnost proizvodnje bioaktivnih sekundarnih metabolita kao što su antifungici, antivirusni i antitumorski lijekovi, antihipertenzivi, imunosupresivi, a posebno antibiotici. Proizvodnja većine antibiotika je specifična za pojedinu vrstu roda *Streptomyces*, a antibiotici su vrlo važni metaboliti tih bakterija iz razloga što pružaju bakterijama svojevrsnu zaštitu prilikom kontakta s drugim mikroorganizmima. Također, druga važna uloga antibiotika za samu bakteriju očitava se kod simbioze između *Streptomyces* bakterija i biljaka, kada antibiotici štite biljku od raznih patogena, a ta ista biljka omogućuje razvoj same bakterije. Povijest antibiotika dobivenih iz bakterija roda *Streptomyces* započela je otkrićem streptotricina 1942. godine, a otkrićem streptomocina dvije godine kasnije znanstvenici su intenzivnije započeli potragu za antibioticima unutar tog roda bakterija. Danas čak 80% antibiotika potječe iz roda *Streptomyces*, a najvažniji su aktinomiceti.<sup>6</sup>

#### 2.1.2. Genom bakterije *Streptomyces cattleya*

Kako je priroda vrlo siromašna organskim spojevima fluora, a fluorirani spojevi su od vrlo važne komercijalne primjene te postaju sve važniji i važniji, biotransformacija anorganskog fluora u organski fluor od velikog je interesa. Baš iz tog razloga veliki značaj ima jedna od bakterija roda *Streptomyces*, *Streptomyces cattleya*, koja ne samo da je poznata kao proizvođač antibiotika tienamicina i cefamicina C, nego je i jedna od rijetkih bakterija koja ima neuobičajenu mogućnost sinteze fluoriranih metabolita, odnosno može sintetizirati jaku C–F vezu.

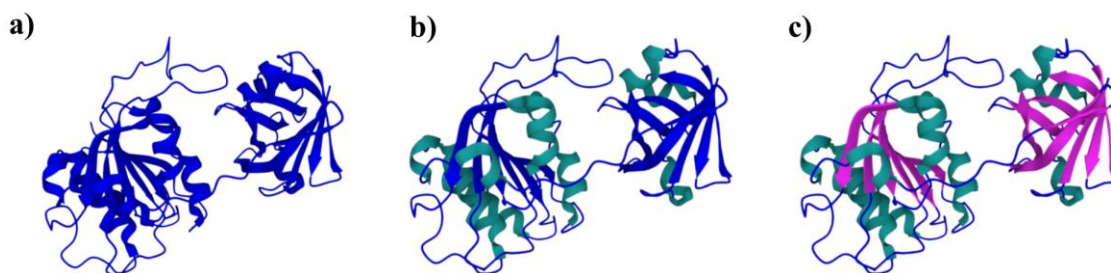
Genom bakterije *S. cattleya* sastoji se od jednog linearnog kromosoma i jednog linearnog megaplazmida. Kromosom sadrži šest rRNA operona, 64 tRNA gena i 5779 protein-kodirajućih gena dok je na plazmidu 1713 protein-kodirajućih gena. Analizama gena bakterije otkrivena su svojstva koja odgovaraju i drugim bakterijama roda *Streptomyces*; bakterija na raspolaganju ima mnoge transportere, brojne kataboličke enzime za složene ugljikohidrate, gene za biosintezu različitih sekundarnih metabolita i raznovrsne metaboličke sposobnosti kojima se prilagođava promjenjivim uvjetima u kojima ti organizmi obično preživljavaju.<sup>7</sup>

## 2.2. Mehanizam enzimske fluorinacije kod bakterije *Streptomyces cattleya*

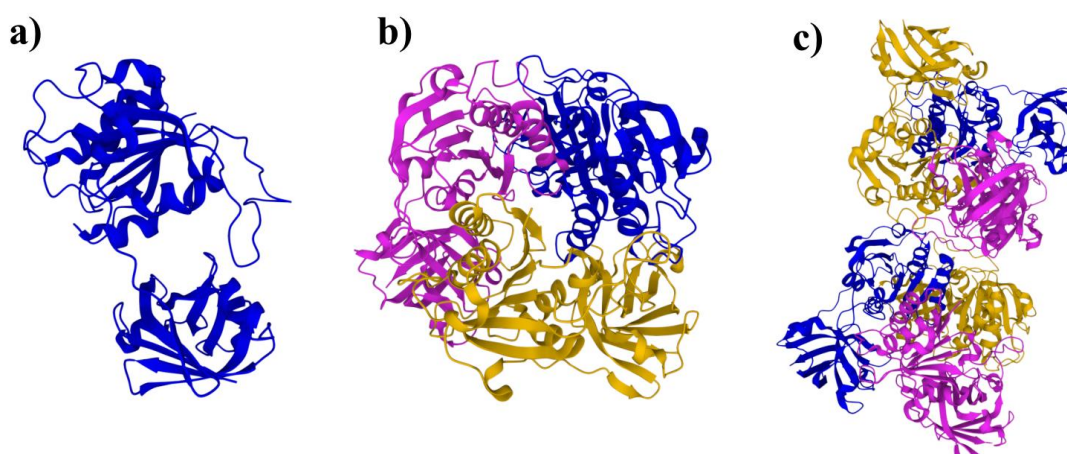
*Streptomyces cattleya*, uzgajana u prisutnosti anorganskog fluora kroz svoj metabolički put omogućuje izolaciju fluoriranih metabolita, 4-fluorotreonina i fluoroacetata, a u prvoj reakciji tog biosintetskog puta sudjeluje enzim 5'-fluoro-5'-deoksiadenozin sintaza (5'-FDAS).

### 2.2.1. Enzim 5'-fluoro-5'-deoksiadenozin sintaza (5'-FDAS)

Enzim 5'-fluoro-5'-deoksiadenozin sintaza (5'-FDAS) omogućuje nukleofilni napad fluoridnog iona na *S*-adenozil-*L*-metionin, pri čemu dolazi do nastanka 5'-fluoro-5'-deoksiadenozina (5'-FDA) i izdvajanja *L*-metionina. Taj prvi izolirani prirodni fluorirajući enzim relativne je molekularne mase ( $M_r$ ) od 32 200, a trivijalno se naziva fluorinaza.<sup>8</sup> Monomer (slika 1) sadržava domenu s N-krajem građenu od aminokiselinskih ostataka 2-180 i manju domenu koja sadrži C-kraj s aminokiselinskim ostacima 195-299. Duga petlja od 15 ostataka međusobno povezuje te dvije domene. U središtu domene koja sadrži N-kraj nalazi se  $\beta$ -ploča od sedam lanaca, postoje paralelni i antiparalelni lanci koji se nalaze između dvije  $\alpha$ -zavojnice čineći model sendviča. Domena koja sadrži C-kraj sastavljena je od peterolančane i četverolančane  $\beta$ -antiparalelne ploče, te sadrži jednu  $\alpha$ -zavojnicu. Asimetrična jedinica kristala sadrži trimer (slika 2b): tri domene koje sadrže N-kraj raspoređene su oko trostruke osi i međusobno su u bliskim kontaktima dok tri domene koje sadrže C-kraj ostvaruju kontakte sa svojim susjednim domenama koje sadrže N-kraj, no ne stvaraju kontakt među sobom. Gel filtracijom je dobiveno da je enzim heksamer (slika 2c), točnije sastoji se od dva trimera.<sup>9</sup>



Slika 1. Model monomerne jedinice enzima 5'-fluoro-5'-deoksiadenozin sintaze. Na prikazu b) svjetlo plavom bojom izražene su  $\alpha$ -zavojnice, dok su na prikazu c) ružičastom bojom dodatno naglašene i  $\beta$ -ploče. Slika napravljena pomoću vizualizacije integrirane u RCSB PDB bazi (<https://www.rcsb.org/>); PDB ID: 1RQP (ref. 9).

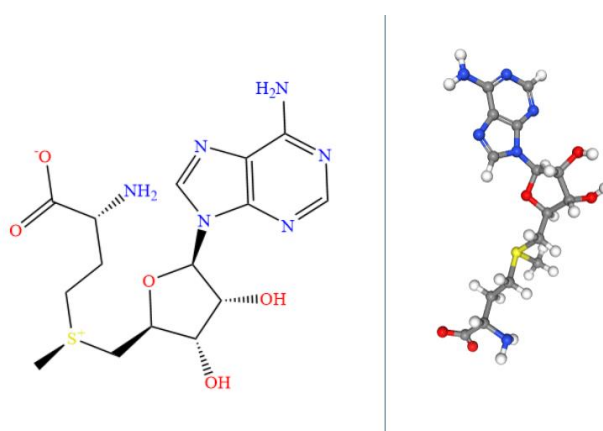


Slika 2. Struktura enzima 5'-fluoro-5'-deoksiadenozin sintaze. a) monomer A obojan u plavo; b) trimer formiran od monomera A (plavo), monomera B (žuto) i monomera C (ružičasto); c) heksamerna struktura koju čine dva trimera. Slika napravljena pomoću vizualizacije integrirane u RCSB PDB bazi (<https://www.rcsb.org/>); PDB ID: 1RQP (ref. 9).

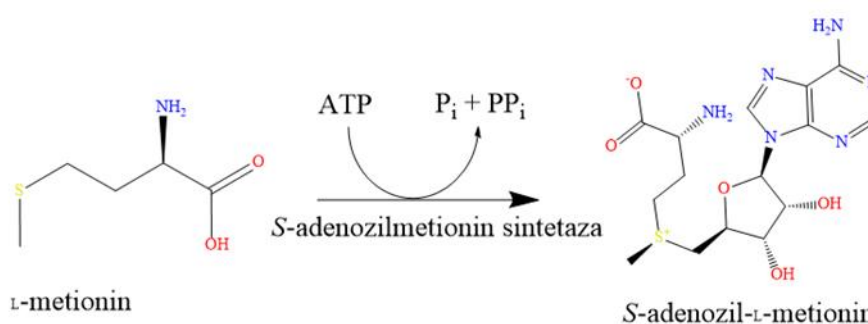
### 2.2.2. Molekula *S*-adenozil-*L*-metionina (SAM)

Enzim 5'-FDAS kristaliziran iz bakterije *S. cattleya* sadrži vezanu molekulu *S*-adenozil-*L*-metionin (SAM), čija struktura je prikazana na slici 3. *S*-adenozil-*L*-metionin prirodna je molekula zastupljena u gotovo svim tjelesnim tkivima i tekućinama. Od temeljne je važnosti u brojnim biokemijskim reakcijama koje uključuju enzimsku transmetilaciju, gdje služi kao donor metilne skupine. Sudjelovanjem u brojnim mehanizmima, molekule *S*-adenozil-*L*-

metionina doprinose sintezi, aktivaciji i/ili metabolizmu spojeva kao što su hormoni, neurotransmiteri, nukleinske kiseline, proteini, fosfolipidi i određeni lijekovi. *S*-adenozil-*L*-metionin sastoji se od adenozilnog kationa vezanog za atom sumpora na metioninu, preko C5' atoma šećera riboze. Sintetizira se iz adenzin-trifosfata (ATP-a) i metionina pomoću enzima *S*-adenozilmetionin sintetaze što prikazuje kemijska reakcija prikazana na slici 4. Sulfonijeva funkcionalna skupina prisutna u SAM-u središte je njegove reaktivnosti, dok se zbog kemijske reaktivnosti metilne skupine vezane na atom sumpora metionina omogućuje uspješan prijenos te metilne skupine na spoj akceptora u reakcijama transmetilacije.<sup>10</sup>

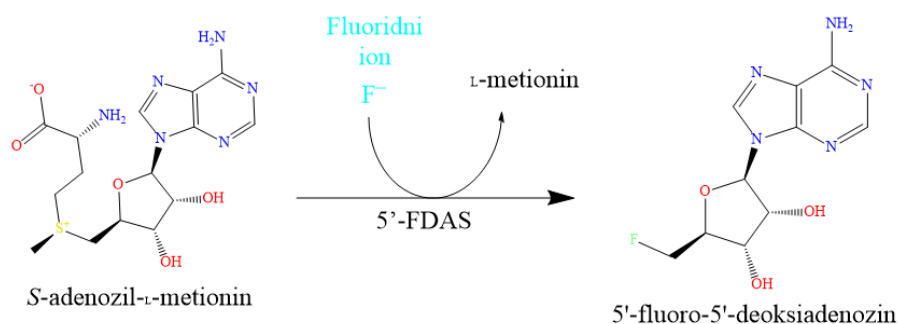


Slika 3. 2D (lijevo) i 3D (desno) strukture molekule *S*-adenozil-*L*-metionina. Slika napravljena pomoću ChemDraw softvera.



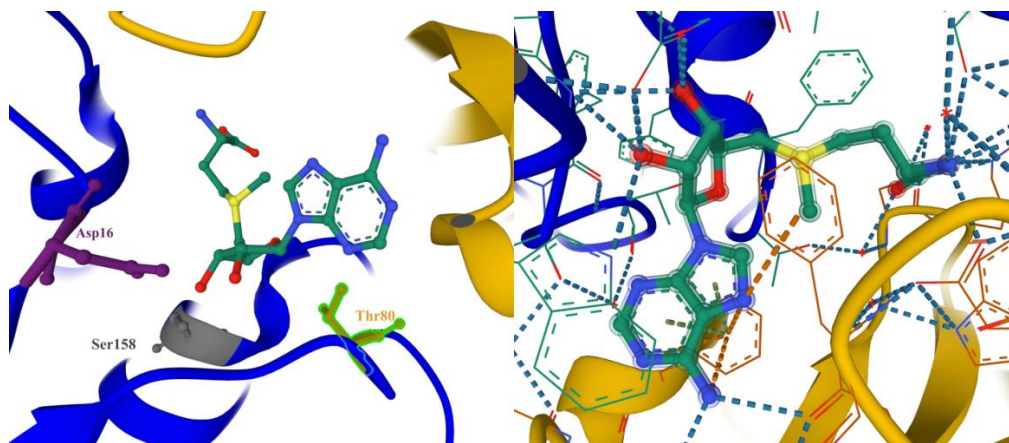
Slika 4. Kemijska reakcija sinteze *S*-adenozil-*L*-metionina iz aminokiseline metionina i adenzin-trifosfata (ATP-a) uz enzim *S*-adenozilmetionin sintetazu. Slika napravljena pomoću ChemDraw softvera.

U mehanizmu bakterije *S. cattleya* SAM ne sudjeluje kao donor metilne skupine već je supstrat enzima 5'-FDAS koji katalizira napad  $F^-$  iona na molekulu SAM-a, točnije na C5' atom šećera riboze pri čemu kao produkt nastaje 5'-fluoro-5'-deoksiadenozin, a kao izlazna skupina iz reakcije izlazi L-metionin (kemijska reakcija prikazana na slici 5). SAM je na enzim 5'-FDAS vezan tako da se smješta u prostor između domene koja sadrži C-kraj jednog monomera i domene koja sadrži N-kraj susjednog monomera (slika 6.), dok trimer enzima ukupno veže tri molekule SAM-a, a enzim prilikom vezanja prepoznaje SAM vrlo specifično. Kao što je već spomenuto, SAM se sastoji od tri komponente: molekule adenina, riboze i metionina, a svaka od te tri komponente prepoznata je od strane enzima, kombinacijom vodikovih veza i van der Waalsovih interakcija. Oba monomera enzima prepoznaju sve tri komponente SAM-a, što ukazuje da je precizna i vjerojatno jedinstvena kvarтерна struktura enzima ključna za prepoznavanje supstrata i katalizu.<sup>9</sup>



Slika 5. Kemijska reakcija nukleofilnog napada iona fluora na molekulu S-adenozil-L-metionina, katalizirana enzimom 5'-fluoro-5'-deoksiadenozin sintazom, uz nastanak L-metionina i 5'-fluoro-5'-deoksiadenozina. Slika napravljena pomoću ChemDraw softvera.



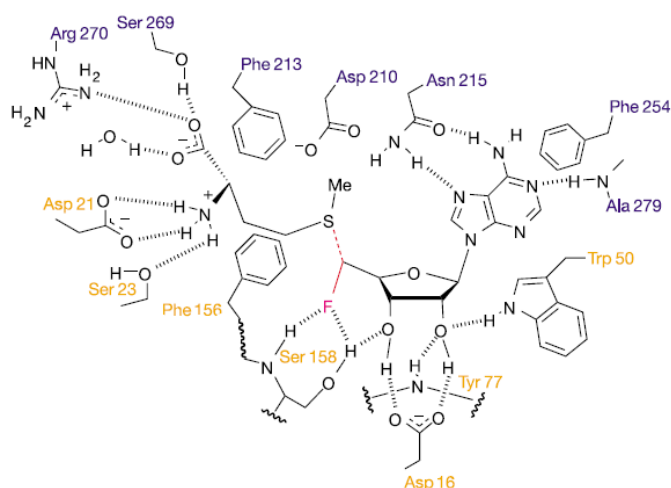


Slika 6. Molekula *S*-adenozil-*L*-metionina vezana na enzim 5'-fluoro-5'-deoksiadenozin sintazu. Slika napravljena pomoću vizualizacije integrirane u RCSB PDB bazi

(<https://www.rcsb.org/>) PDB ID: 1RQP (ref. 9).

### 2.2.3. Enzimaska fluorinacija u *Streptomyces cattleya*

Prilikom izolacije proteina 5'-FDAS iz *S. Cattleya* bakterije otkriveno je mjesto vezanja molekula SAM-a na protein te je pomoću toga određeno potencijalno vezno mjesto na enzimu za ion halogena. Provođenjem eksperimenata specifičnog kemijskog označavanja pokazalo se kako se ugradnja fluora odvija s inverzijom stereokemije na C5' atomu SAM-a, što eksperimentalno odgovara mehanizmu nukleofilnog napada  $S_N2$ , a shematski je prikazano na slici 7.

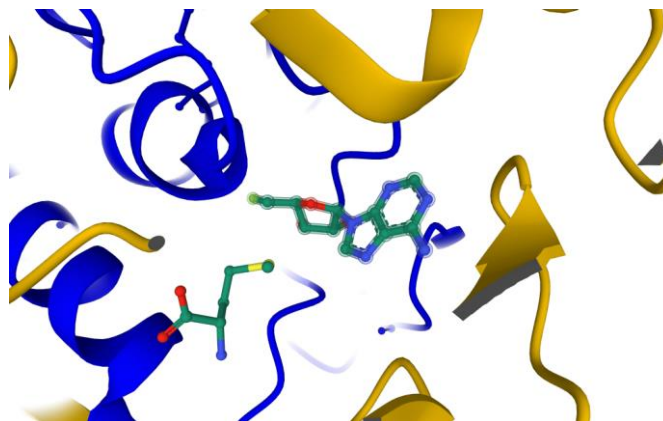


Slika 7. Vezno mjesto enzima 5'-fluoro-5'-deoksiadenozin sintaze s vezanim *L*-metioninom i 5'-fluoro-5'-deoksiadenozinom s prikazanim ključnim aminokiselinskim ostatcima; narančasti



bočni ogranci pripadaju jednom monomeru, plavi drugom. Anti odnos između C–F veze i crvene iscrtkane C–S veze ukazuje na tijek reakcije  $S_N2$ . (ilustracija preuzeta i prilagođena prema ref. 9)

C. Dong i suradnici definirali su molekularni mehanizam enzimske fluorinacije uzgajanjem kristala enzima s dva produkta reakcije; L-metioninom i molekulom 5'-fluoro-5'-deoksiadenozina (5'-FDA).<sup>9</sup> To je učinjeno inkubiranjem 5'-fluoro-5'-deoksiadenozin sintaze koja sadrži selenometionin umjesto metionina s 50 mM kalijeva fluorida i 10 mM SAM 4 h prije same kristalizacije. Dobivena struktura proteina bila je identična onoj uočenoj za SAM kompleks, a iz mape elektronske gustoće uočeno je kako se molekula SAM podijelila na dva fragmenta, pri čemu je mapa elektronske gustoće pripisana molekulama metionina i 5'-FDA (slika 8). Metionin je na protein bio vezan na način vrlo sličan onome koji je uočen u SAM kompleksu; jedina razlika bila je u torzijskim kutovima bočnog lanca, a slično opažanje uočeno je usporedbom 5'-FDA i SAM-a, gdje su položaji adenina i prstena riboze ostali nepromijenjeni. Elektronska gustoća pokazala je da se atom fluora nalazi u džepu definiranom glavnim lancem koji se proteže od Phe156 do Ser158 i bočnim lancima Phe156, Tyr77, Thr80 i Ser158. Uočena je i vodikova veza između NH skupine Ser158 i atoma fluora fluorometilne skupine SAM-a, koja ostvaruje drugi polarni kontakt sa bočnim lancem Ser158. U blizini fluora nisu uočene molekule vode, što sugerira da ion  $F^-$  mora biti potpuno dehidriran prije stvaranja C–F veze. Polumjer ovog džepa je otprilike 1,4-1,6 Å iz čega je zaključeno da se u njega preferencijalno mogu smjestiti  $F^-$  ion i eventualno voda, što isključuje druge halogene i ujedno daje objašnjenje zašto enzim 5'-FDAS ne katalizira stvaranje C–X veze s drugim halogenima. To je istraživanje pokazalo kako nije nađen dovoljno široki kanal kojim bi  $F^-$  difundirao u aktivno mjesto kada je molekula SAM-a već vezana na enzim stoga je zaključeno kako se ion  $F^-$  prvi veže. Vrlo male strukturne promjene između supstrata i kompleksa uvelike su doprinijele istraživanju kao dokaz da reakcija fluoriranja molekule SAM-a uz enzim 5'-FDAS ide mehanizmom  $S_N2$ , a vrlo važna činjenica u mehanizmu je ta da je atom fluora fluorometilne skupine u 5'-FDA vezan na vezno mjesto za  $F^-$  ion i osiguran istim vodikovim vezama koje su uočene i kod sidrenja  $F^-$  u aktivno mjesto enzima.



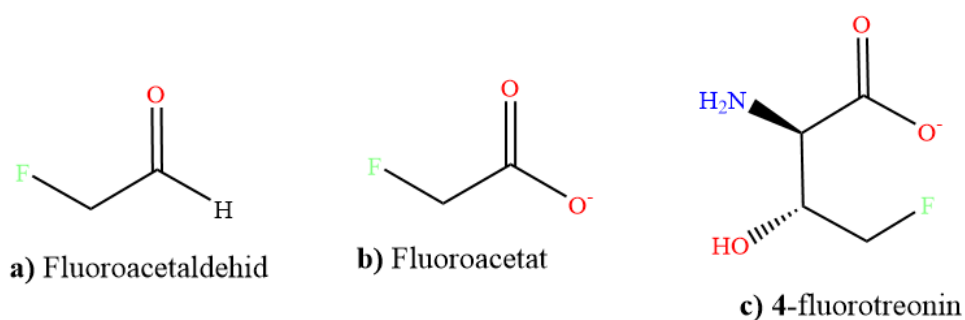
Slika 8. Produkti enzimi kataliziranog nukleofilnog napada iona fluora na molekulu *S*-adenozil-*L*-metionina; *L*-metionin i 5'-fluoro-5'-deoksiadenozin. Slika napravljena pomoću vizualizacije integrirane u RCSB PDB bazi (<https://www.rcsb.org/>); PDB ID: 1RQR (ref. 9).

Ovo se tumačenje temelji na tome da je visokoenergetska konformacija prstena riboze optimalna za nukleofilnu supstitucijsku reakciju posredovanu enzimom. Konformacija prstena riboze djeluje kao sila na C5' atom koja slabi C5'-S te prisiljava ion  $F^-$  da se smjesti ortogonalno na vezu C4–O4 SAM-a, minimizirajući elektrostatičko odbijanje tijekom  $S_N2$  reakcije. Induktivni utjecaj kisika u prstenu ojačava vezu C5'–S, no konformacija riboze sprječava da O4 atom uđe u anomernu interakciju s prstenom adenina i ne nastaje vodikova veza. Oba ova čimbenika značajno bi povećala induktivni utjecaj O4 atoma što bi ometalo samu reakciju. Predviđeno je kako vezanje SAM-a potiče dehidraciju  $F^-$  dok se on smješta u svoj vezni džep. Potpuna desolvatacija  $F^-$  zahtijevala bi otprilike  $400 \text{ kJ mol}^{-1}$  što je vrlo visoka energija aktivacije za enzim, no eksperiment je pokazao da  $F^-$  uspostavlja polarne kontakte s enzimom kroz jaku vodikovu vezu s amidnom skupinom i vodikovu vezu sa –OH skupinom serina, iz čega je jasno da enzim koristi te kontakte kako bi izbjegao tako visoku energiju desolvatacije. Stoga, enzim 5'-FDAS specifično dehidratira ion  $F^-$  i time ga čini vrlo moćnim nukleofilom. Ion  $F^-$  je kolinearano s C–S vezom SAM-a, koju enzim tjera u konformaciju dizajniranu za poticanje nukleofilnog cijepanja C–S veze. Ovo je istraživanje dalo detaljan uvid u biološku fluorinaciju, pri kojoj živi organizmi pretvaraju anorganski fluor u organski fluor, a takav mehanizam otvara mogućnosti u područjima istraživanja koja se fokusiraju na proizvodnji organofluoro spojeva kao biotehnoški i farmaceutski važnih spojeva.

### 2.3. Fluorirani sekundarni metaboliti bakterije *S. cattleya*

Sekundarni metaboliti su organski spojevi koje proizvode bakterije, gljive ili biljke, a koji nisu direktno uključeni u rast, razvoj ili razmnožavanje organizma. Umjesto toga, oni sudjeluju u interakcijama koje organizmu mogu donijeti svojevrsne prednosti, utječući na otpornost i plodnost samog organizma. Sekundarni metaboliti služe kao sustav obrane koji organizam koristi protiv drugih bakterija, gljivica, ameba, biljaka, insekata i velikih životinja, a ulogu imaju i kod stvaranja simbioze između mikroba i biljaka, nematoda, insekata i viših životinja.<sup>11</sup>

Kao sekundarni metaboliti bakterije *Streptomyes cattleya* izolirani su toksin fluoroacetat i antibiotik 4-fluorotreonin (slika 9).<sup>8</sup>



Slika 9. Strukture sekundarnih metabolita bakterije *S. cattleya*; toksičnog fluoroacetata (b) i jedine prirodne aminokiseline koja sadrži fluor, 4-florotreonina (c) čiji je zajednički prekursor fluoroacetaldehyd (a). Slika napravljena pomoću ChemDraw softvera.

#### 2.3.1. Fluoroacetat

Izotopnim obilježavanjem mirujućih kultura stanica bakterije *S. cattleya* otkriveno je kako je fluoroacetaldehyd (slika 9a) posljednji zajednički biosintetski prekursor fluoroacetata (slika 9b) i 4-fluorotreonina (slika 9c). Provedena je analiza s visoko aktivnom NADH-ovisnom aldehyd dehidrogenazom, a navedeni enzim je pročišćen do homogenosti. Analiza N-terminalnog aminokiselinskog slijeda enzima pokazala je kako posjeduje visoku razinu homologije s drugim bakterijskim acetaldehyd dehidrogenazama, međutim, kinetički parametri, prikazani u tablici 1, ukazuju na određenu selektivnost za fluoroacetaldehyd (FAC:

$K_m=80 \mu\text{M}$ ), što ukazuje na to da takva aldehid dehidrogenaza oksidira fluoroacetaldehid do fluoroacetata mnogo učinkovitije od acetaldehida (Ac:  $K_m=810 \mu\text{M}$ )<sup>12</sup>. Enzim također može oksidirati glikoaldehid i kloroacetaldehid, iz čega je zaključeno da preferira supstrate s elektronegativnim supstituentom na  $\alpha$ -položaju u odnosu na karbonilni ugljik aldehidne skupine.<sup>13</sup>

Sekundarni metabolički enzimi nastaju umnažanjem i mutacijom enzima iz primarnih metaboličkih puteva, stoga je moguće da je enzim fluoroacetaldehid dehidrogenaza iz bakterije *S. cattleya* evoluirao iz aldehid dehidrogenaze koja je koristila glikoaldehid, ili sličan spoj, kao prirodni supstrat.<sup>12</sup>

Tablica 1. Specifičnost prema pojedinom supstratu enzima aldehid dehidrogenaze iz bakterije *Streptomyces cattleya* (tablica napravljena prema podacima iz reference 12).

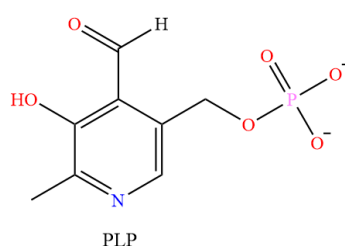
Supstrat	Relativna aktivnost (%)	$V_{\max}$ (U/mg)	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )
<b>Fluoroacetaldehid</b>	100	0,143	80
<b>Glikoaldehid</b>	150	0,206	150
<b>Kloroacetaldehid</b>	80	ND	ND
<b>Acetaldehid</b>	40	0,129	810
<b>Propionaldehid</b>	28	ND	ND
<b>Gliceraldehid</b>	10	ND	ND
<b>Benzenaldehid</b>	65	0,099	320

ND = nije utvrđeno, "not determined"

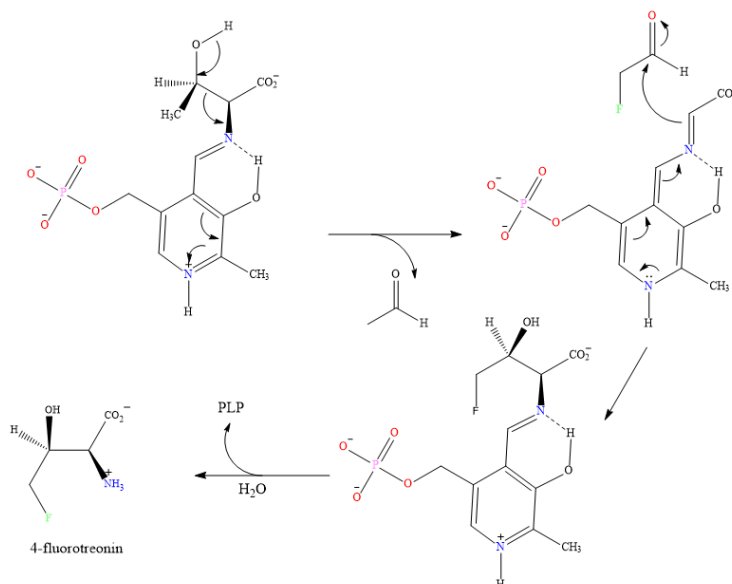
### 2.3.2. 4-fluorotreonin

Nakon analize enzima odgovornog za oksidaciju fluoroacetaldehida do fluoroacetata, istražen je *cell-free* ekstrakt bakterije kako bi se ispitala sposobnost stvaranja 4-fluorotreonina inkubacijom fluoroacetaldehida s različitim aminokiselinama i kofaktorima. Bakterijske treonin aldolaze koriste kofaktor piridoksal-fosfat (PLP) čija struktura je prikazana na slici 10, u reakciji kondenzacije acetaldehida s glicinom za stvaranje L-treonina. Prema tome, PLP je istražen i kao mogući kofaktor za analognu transformaciju u *S. cattleya* bakteriji. Međutim, do *in vitro* sinteze 4-fluorotreonina došlo je kod inkubacije fluoroacetaldehida i PLP-a s

aminokiselinom L-treoninom, a ne glicinom. Glicin prema tome nije bio odgovarajući supstrat za ovaj enzim kao što je bilo prvotno pretpostavljeno. Enzim je pročišćen i pokazalo se da sudjeluje u međupretvorbi L-treonina i fluoroacetaldehida u 4-fluortreonin i acetaldehid, u reakciji transaldolacije (slika 11). Zanimljivo je kako se za svaku molekulu 4-fluortreonina koju bakterija stvara, troši jedna molekula L-treonina što sugerira da postoji određena selekcijska prednost organizma u proizvodnji 4-fluortreonina u odnosu na treonin. Takva se selekcijska prednost ugradnje 4-fluortreonina umjesto ostatka treonina u određeni protein, pretpostavlja se, objašnjava kao obrambeni mehanizam organizma kada je pod metaboličkim stresom.<sup>13</sup>



Slika 10. Struktura piridoksal-fosfata, prostetičke skupine treonin aldolaze, kao i mnogih drugih enzima. Slika napravljena pomoću ChemDraw softvera.

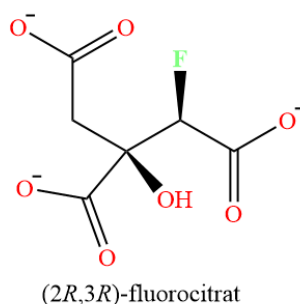


Slika 11. Mehanizam kemijske reakcije transaldolacije L-metionina u 4-fluortreonin uz fluoroacetaldehid i PLP kao prostetičku skupinu. Slika napravljena pomoću ChemDraw softvera.

### 2.3.3. Toksičnost fluoroacetata

Fluoroacetat je najčešći fluorirani spoj koji se nalazi u prirodi. Prvotno je identificiran iz južnoafričkog grma *Dichapetalum cymosum*, koji je poznat kao iznimno otrovna biljka, a njezino svježe lišće i dalje predstavlja opasnost za stoku na ispaši i životinje u potrazi za hranom u rano proljeće. Fluoroacetat naknadno je identificiran i u mnogim drugim biljnim vrstama, uglavnom u Africi, ali i u Australiji te u manjoj mjeri u Južnoj Americi. Osim biljaka, ovaj toksični spoj sintetizira i bakterija *Streptomyces cattleya*.

Visoka toksičnost fluoroacetata leži u njegovoj *in vivo* konverziji u (2*R*,3*R*)-fluorocitrat prikazan na slici 12. Sir Rudolph Peters<sup>14</sup> je prvi skrenuo pozornost na ovu toksičnu reakciju enzimske konverzije fluoroacetyl-CoA i oksaloacetata u (2*R*,3*R*)-fluorocitrat kataliziranu citrat sintazom te ju okarakterizirao kao „smrtonosnu sintezu“ („*lethal synthesis*“). Dobiveni produkt reakcije, (2*R*,3*R*)-fluorocitrat, kompetitivni je inhibitor akonitaze, enzima ciklusa limunske kiseline koji katalizira reakciju izomerizacije citrata u izocitrat preko međuprodukta akonitata. Akonitaza djeluje na (2*R*,3*R*)-fluorocitrat dehidratiranjem kako bi nastao alilni fluoridni intermedijer. Zatim akonitaza katalizira S<sub>N</sub>2 zamjenu fluorida hidroksidnim ionom, što u konačnici rezultira 4-hidroksi-*trans*-akonitatom koji je snažan kompetitivni inhibitor akonitaze. Kao eksperimentalna potvrda ovakvom mehanizmu, metodom difrakcije rentenskog zračenja, riješena je struktura kokristala enzima akonitaze s vezanim inhibitorom. Konverzija toksičnog fluoroacetata u (2*R*,3*R*)-fluorocitrat također inhibira i protein CTP (*citrate transport protein*) koji omogućuje prijenos citrata kroz nepropusnu unutarnju membranu mitohondrija.<sup>13</sup>

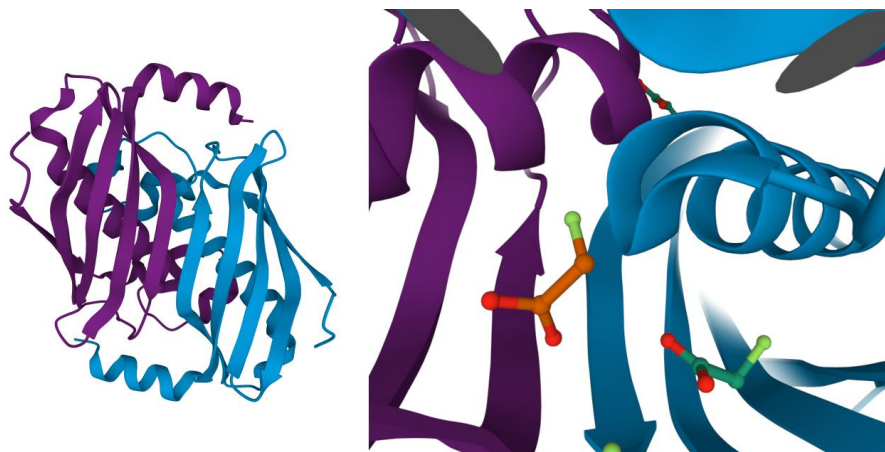


Slika 12. Struktura (2*R*,3*R*)-fluorocitrata nastalog kondenzacijom fluoroacetyl-CoA s oksaloacetatom uz enzim citrat sintazu. Slika napravljena pomoću ChemDraw softvera.

#### 2.3.4. Enzim tioesteraza FIK

Toksični učinci fluoroacetata u bakteriji *Streptomyces cattleya* spriječeni su uz pomoć enzima fluoroacetyl-CoA tioesteraze koja se skraćeno naziva FIK (slika 13), a koji specifično hidrolizira fluoroacetyl-CoA, čime se sprječava nakupljanje toksičnog fluorocitrata.

Karakterizacija 5'-fluoro-5'-deoksiadenozin fosforilaze potvrdila je uključenost genskog klastera fl u biosintezu fluoroacetata. U nastojanjima da se dodatno razjasni funkcija genskog klastera fl, protein kodiran genom flK koji se nalazi blizu 3'-kraja klastera okarakteriziran je kao tioesteraza koja hidrolizira fluoroacetyl-koenzim A kako bi nastali fluoroacetat i koenzim A. Pritom je vrlo važna činjenica da naveda tioesteraza ne cijepa acetyl-CoA koji je supstrat za prvi korak ciklusa limunske kiseline. Kao što je prethodno spomenuto, citrat-sintaza može katalizirati kondenzaciju oksaloacetata i fluoroacetyl-CoA pri čemu nastaje fluorocitrat koji je smrtonosni kompetitivni inhibitor akonitaze, čime se blokira ciklus limunske kiseline. Prisutnost enzima koji hidrolizira fluoroacetyl-CoA, a koji nema utjecaj na metabolički važan intermedijer acetyl-CoA može stoga poslužiti kao mehanizam samoobrane bakterije *S. cattleya* od takvog toksičnog sekundarnog metabolita, fluoroacetata.



Slika 13. Prikaz modela enzima tioesteraze FIK te hidrolizom fluoroacetyl-CoA nastalog fluoroacetata. Slika napravljena pomoću vizualizacije integrirane u RCSB PDB bazi

(<https://www.rcsb.org/>); PDB ID: 3KV8 (ref. 15).

FIK, enzim koji katalizira hidrolizu fluoroacetyl-CoA, enzim je koji pripada obitelji tioesteraza tipa II koje u aktivnim mjestima sadrže ili glutamatni ili aspartatni ostatak koji djeluju kao nukleofili odgovorni za katalitičku funkciju enzima. Analizom proteinskih

sekvenci utvrđeno je da FLK posjeduje devet aminokiselinskih ostataka Gly8, Thr42, Glu50, Leu61, Gly69, His76, Ala78, Gly83 i Gly116 važnih za katalitički mehanizam enzima. Prisutnost Thr42 i His76 zajedno s Glu50 ukazuje na to da enzim koristiti izmijenjeni mehanizam katalitičkih trijada koji koriste i 4-hidroksibenzoil-CoA tioesteraze. Ovo znači da enzim uz His, umjesto Asp i Ser koristi ostatke Glu50 (umjesto Asp) i Thr42 (umjesto Ser). Unatoč svojoj sličnosti s 4-hidroksibenzoil-CoA tioesterazama, slabija oksianionska šupljina i ključna uloga His76 u hidrolizi, čine da enzim FLK tioesteraza više podsjeća na dehidrataze, koje koriste histidin u aktivnom mjestu za uklanjanje protona na C $\alpha$  položaju supstrata.<sup>15</sup>

Razlike u kemijskom mehanizmu između hidrolize fluoracetil-CoA i acetil-CoA osiguravaju mogućnost FLK tioesteraze da kinetički razlikuje dva supstrata koja su oba prisutna u zasićenim koncentracijama u fiziološkim uvjetima. Kinetički podaci dobiveni provođenjem eksperimenata sa istraživanim enzimom ukazuju na dva moguća mehanizma koja osiguravaju selektivnost FLK tioesteraze kako bi hidrolizirala baš fluoroacetil-CoA, a ne neki drugi acil-CoA. Mehanizam započinje nukleofilnim napadom Glu50 na fluoroacetil-CoA čime dolazi do nastanka anhidrida između Glu50 i fluoroacetata (acil-enzim intermedijer). His76 zatim vrši deprotonaciju C $\alpha$  atoma fluoroacetata kovalentno vezanog s Glu50. Jedna je mogućnost da raspad takvog anhidrida ide preko ketenskog intermedijera nakon čega slijedi nastanak produkta, fluoroacetata. Druga je mogućnost da napad vode ide izravno na enolat ili karbanion fluoroacetil-CoA, za što se predviđa da će biti sporije od izravnog napada vode na karbanion acetil-CoA. Takav direktni napad vode teško može objasniti opaženo povećanje brzine za FLK deacilaciju jer se očekuje da prisutnost karbanionskog karaktera deaktivira karbonil prema nukleofilnom napadu na temelju odbijanja naboja između dolazećeg nukleofila i karbaniona, no moguće objašnjenje je da je acilacija enzima jedan spori korak u katalitičkom ciklusu i da su sljedeći koraci brži. Kemijski modeli koji uključuju razgradnju enolata preko karbanionskog međuprodukta, ukazuju na to da je brzina reakcije čak jedan do dva reda veličine sporija od očekivane brzine mehanizma koji se temelji na ketenu. Iako se ove dvije mehaničke mogućnosti u ovom trenutku još ne mogu razlikovati, svi podaci su u skladu s modelom u kojem selektivnost prema fluoriranom supstratu proizlazi iz promjene u kemijskom mehanizmu ili koraku koji ograničava brzinu reakcije između acetil-CoA i fluoroacetil-CoA.<sup>16</sup>

Iako je očekivano da su  $\alpha$ -protoni fluoroacetil-CoA kiseliji od onih od acetil-CoA, njihov niži pK $_a$  nije dovoljno objašnjenje zašto je mehanizam deprotonacije C $\alpha$  u svrhu



deacilacije nedostupan drugim  $\alpha$ -supstituiranim acil-CoA. Primjerice, za acetoacetyl-CoA koji ima  $\alpha$ -proton kiseliji od fluoroacetyl-CoA analizom slobodne energije njegove hidrolize katalizirane FLK ukazano je na to da ne neće doći do deprotonacije C $\alpha$ . Koristeći supstrate sa stereogenim centrima na  $\alpha$ -ugljiku supstrata, pokazano je da polarizacija nije jedina determinanta reakcije deprotonacije C $\alpha$ . FLK koristi kiralno prepoznavanje prokiralne fluorometilne skupine fluoroacetyl-CoA, što ukazuje na to da se specifičnost enzima temelji ne samo na jedinstvenoj reaktivnosti fluoriranih spojeva, već i potencijalno na molekularnom prepoznavanju fluora.<sup>17</sup>

## 2.4. Antibiotici koje sintetizira bakterija *Streptomyces cattleya*

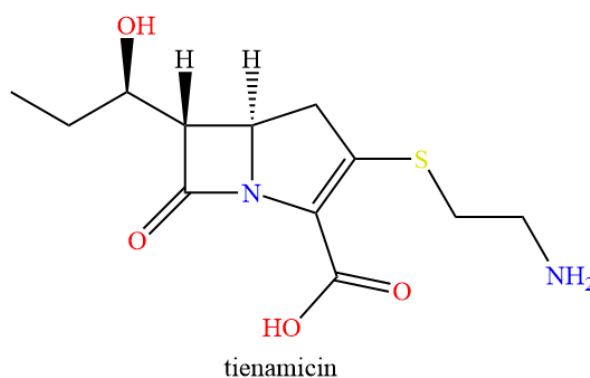
Svi prethodno spomenuti i opisani enzimi, metaboliti i mehanistički putevi važni su kako bi se razumio mehanizam stvaranja u prirodi iznimno rijetke C–F veze, koja trenutno ima velik, a svakim danom i sve veći značaj u farmaceutici, zbog postojanja sve većeg broja fluoriranih antibiotika koji svoju primjenu nalaze u liječenju raznih bolesti, ali i u agrokemiji gdje se organofluoro spojevi koriste kao razni herbicidi, insekticidi, fungicidi i regulatori rasta biljaka.

Bakterija *S. cattleya* proizvođač je beta-laktamskih antibiotika; tienamicina, cefamicina C i penicilina N.  $\beta$ -laktamski antibiotici su antibiotici čije ime dolazi od njihove strukture u kojoj sadrže beta-laktamski prsten, a ta skupina antibiotika uključuje derivate penicilina (pename), cefalosporine i cefamicine (cefeme), monobaktame, karbapeneme i karbacefeme. Većina  $\beta$ -laktamskih antibiotika djeluju tako što su inhibitori biosinteze stanične stjenke u bakterijskim organizmima i poznati su kao najraširenija skupina antibiotika, a u medicini se koriste u prevenciji i liječenju bakterijskih infekcija uzrokovanih osjetljivim, stranim organizmima.<sup>18</sup>

### 2.4.1. Tienamicin

Tienamicin (slika 14) je prvi predstavnik sada već raznolike obitelji prirodnih i sintetskih antibiotika zajedničkog naziva karbapenemi. Karbapenemi sadrže  $\beta$ -laktam (kao i penicilin) spojen s peteročlanim prstenom, no do razlike s penicilinima dolazi zbog zamjene sumpora u peteročlanom prstenu s ugljikom, te postojanja nezasićene veze u peteročlanom prstenu.

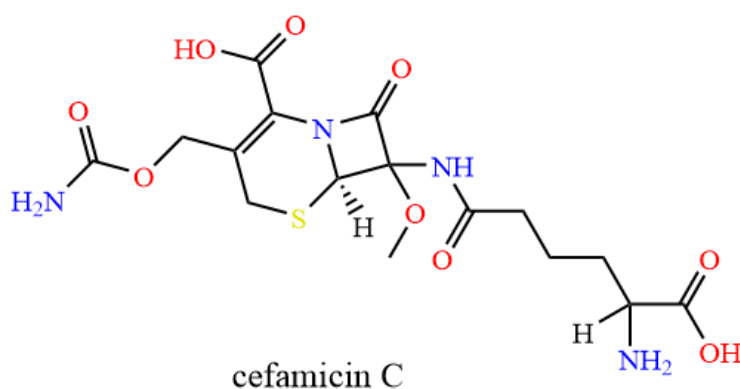
Tienamicin ima sličan način djelovanja kao i penicilini, na način da ometa biosintezu peptidoglikana različitih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Međutim, za razliku od penicilina, koji postaju neučinkoviti zbog njihove brze hidrolize katalizirane enzimom  $\beta$ -laktamaza, koji je prisutan u nekim sojevima bakterija, tienamicin ostaje antimikrobno aktivan. Tienamicin je pokazao visoku aktivnost protiv bakterija koje su otporne na druge spojeve stabilne na  $\beta$ -laktamazu, time naglašavajući superiornost ovog antibiotika među  $\beta$ -laktamima. No, zbog svoje nestabilnosti i razgradnje u prisutnosti vode, tienamicin je nepraktičan za kliničko liječenje bakterijskih infekcija, stoga su stvoreni neki njegovi stabilni derivati, pogodniji za korištenje u medicinske svrhe.<sup>19</sup>



Slika 14. Struktura tienamicina izoliranog iz bakterije *S. cattleya*. Slika napravljena pomoću ChemDraw softvera.

#### 2.4.2. Cefamicin C

Cefamicin C (slika 15) prvi je izolirani član skupine antibiotika cefamicina. Proizvode ga *Nocardia lactamdurans*, nekoliko drugih aktinomiceta i *Streptomyces* bakterije. Otpornost na  $\beta$ -laktamazu i priroda vrsta koje proizvode razlikuju cefamicine od cefalosporina, kao i metoksi supstitucija na položaju 7 $\alpha$  jezgre cefama koja je karakteristična za cefamicine, dok za cefalosporine nije. Cefamicin C nikad nije korišten u kliničkom liječenju, no korišten je za sinteze mnogih drugih medicinski važnih spojeva.<sup>20</sup>



Slika 15. Struktura cefamicina C izoliranog iz bakterije *S. cattleya*. Slika napravljena pomoću ChemDraw softvera.

Tijekom posljednjeg stoljeća, zbog sve veće važnosti spojeva koji sadrže fluor u modernoj tehnologiji i svakodnevnom životu, eksplozivni razvoj fluorokemijske industrije doveo je do enormnog povećanja emisije fluoridnih iona u biosferu. Ta činjenica dovodi do zaključka kako razni učinci fluoridnih iona i organofluoro spojeva, bilo farmaceutskih ili pak agrokemikalija, na zdravlje ljudi i okoliš moraju biti dobro proučeni, za što je ključno i razumijevanje bioloških aktivnosti, metabolizma te razgradnje takvih fluoriranih tvari. Ovaj rad sažeo je tek mali dio kemije organskih spojeva fluora, no može biti dobar pokazatelj o važnosti, manama i prednostima takvih spojeva fluora.

### § 3. LITERATURNI IZVORI:

1. G.W. Gribble, *Organofluorines* **3** (2006) 121–136.
2. N. Grobbelaar, J.J. Marion Meyer, *Journal of Plant Physiology* **135** (1990) 550–553.
3. T. Hiyama, H. Yamamoto, *Organofluorine Compounds* (2000) 137–182.
4. J. Wang, M. Sánchez-Roselló, J.L. Aceña, C. Del Pozo, A.E. Sorochinsky, S. Fustero, V.A. Soloshonok, H. Liu, *Chemical Reviews* **114** (2014) 2432–2506.
5. K.F. Chater, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **361** (2006) 761–768.
6. R.E. de Lima Procópio, I.R. da Silva, M.K. Martins, J.L. de Azevedo, J.M. de Araújo, *Brazilian Journal of Infectious Diseases* **16** (2012) 466–471.
7. V. Barbe, M. Bouzon, S. Mangelot, B. Badet, J. Poulain, B. Segurens, D. Vallenet, P. Marlière, J. Weissenbach, *Journal of Bacteriology* **193** (2011) 5055–5056.
8. C.D. Cadicamo, J. Courtieu, H. Deng, A. Meddour, D. O'Hagan, *ChemBioChem* **5** (2004) 685–690.
9. C. Dong, F. Huang, H. Deng, C. Schaffrath, J.B. Spencer, D. O'Hagan, J.H. Naismith, *Nature* **427** (2004) 561–565.
10. H.A. Friedel, K.L. Goa, P. Benfield, *Drugs* **38** (1989) 389–416.
11. A.L. Demain, A. Fang, *Adv Biochem Eng Biotechnol* **69** (2000) 1–39.
12. C.D. Murphy, S.J. Moss, D. O'Hagan, *Applied and Environmental Microbiology* **67** (2001) 4919–4921.
13. H. Deng, O. Hagan, C. Schaffrath, D.O. Hagan, (2004) 773–784.
14. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences* **139** (1952) 143–170.
15. M.V.B. Dias, F. Huang, D.Y. Chirgadze, M. Tosin, D. Spiteller, E.F.V. Dry, P.F. Leadlay, J.B. Spencer, T.L. Blundell, *Journal of Biological Chemistry* **285** (2010) 22495–22504.
16. A.M. Weeks, M.C.Y. Chang, *Proc Natl Acad Sci U S A* **109** (2012) 19667–19672.
17. A.M. Weeks, N.S. Keddie, R.D.P. Wadoux, D. OHagan, M.C.Y. Chang, *Biochemistry* **53** (2014) 2053–2063.
18. K. Poole, *Cellular and Molecular Life Sciences* **61** (2004) 2200–2223.

19. F.M. Kahan, H. Kropp, J.G. Sundelof, J. Birnbaum, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **12** (1983) 1–35.
20. A.L. Demain, R.P. Blander, *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **75** (1999) 5–19.