

# Purinska nukleozidna fosforilaza iz bakterije *Helicobacter pylori*

---

Perić, Dora

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:217:042497>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Dora Perić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **PURINSKA NUKLEOZIDNA FOSFORILAZA IZ BAKTERIJE *HELICOBACTER PYLORI***

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Zagreb, 2022.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

30. kolovoza 2022.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

23. rujna 2022.

Mentor rada: doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Potpis:



## Sadržaj

§ SAŽETAK.....	6
§ 1. UVOD .....	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME .....	2
2.1. <i>Helicobacter pylori</i> .....	2
2.1.1. Opis infekcije.....	3
2.1.2. Svojstva bakterije .....	3
2.1.3. Dijagnoza i liječenje .....	3
2.1.4. Targeti u borbi protiv <i>H. pylori</i> .....	4
2.2. Purinska nukleozidna fosforilaza, PNP.....	5
2.2.1. Struktura purinske nukleozidne fosforilaze.....	7
2.2.2. Aktivnost i specifičnost za supstrate enzima PNP iz <i>H. pylori</i> .....	8
2.2.3. Struktura aktivnog mjesta purinske nukleozidne fosforilaze iz <i>H. pylori</i> .....	9
2.2.4. Inhibitori purinske nukleozidne fosforilaze iz <i>H. pylori</i> .....	10
2.2.5. Ljudska purinska nukleozidna fosforilaza.....	11
2.2.6. Usporedba purinske nukleozidne fosforilaze iz ljudi i <i>H. pylori</i> .....	12
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	14



## § Sažetak

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) je bakterija koja ima važnu ulogu u etiopatogenezi najčešćih bolesti gornjeg dijela probavnog sustava. Otprilike polovica svjetske populacije zaražena je ovom bakterijom za koju se vjeruje da ima presudni utjecaj za nastanak i razvoj kroničnog gastritisa, želučanog i duodenalnog ulkusa te na patogenezu karcinoma želuca kao i niskomalignog MALT limfoma. Infekcija s *H. pylori* raširena je po cijelom svijetu i jedna je od najčešćih infekcija. Postoje brojni lijekovi za bolesti uzrokovane ovom bakterijom, no zbog porasta broja sojeva bakterije *H. pylori* koje su rezistentne na lijekove, potrebne su nove strategije za eradikaciju ove bakterije.

Purinska nukleozidna fosforilaza jedan je od ključnih enzima u metaboličkom putu razgradnje purina. Budući da *H. pylori* ne može sintetizirati *de novo* purine, enzimi iz metaboličkog puta za spašavanje nukleotida (engl. *nucleotide salvage pathway*), a osobito purinska nukleozidna fosforilaza, predstavljaju moguće targete za lijekove protiv *H. pylori*.





## § 1. UVOD

Purinska nukleozidna fosforilaza (PNP) iz bakterije *Helicobacter pylori* heksamerni je enzim koji katalizira reverzibilno cijepanje glikozidne veze ribonukleozida. Razlikuju se dvije glavne vrste purinskih nukleozidnih fosforilaza: homotrimeri koji se najčešće nalaze u eukariota i nekih bakterija poput *Cellulomonas sp.* te homoheksameri koji su karakteristični za bakterije. Purinska nukleozidna fosforilaza jedan je od najvažnijih enzima u metaboličkom putu razgradnje purinskih nukleotida. Purinski razgradni metabolički put kod patogena smatra se dobrom metom za djelovanje kemoterapeutika već više od 20 godina. Naime, *Helicobacter pylori* ne može sintetizirati purine *de novo*, već je jedini način na koji ih može sintetizirati purinski razgradni metabolički put. Purinski metabolizam ključan je za rast prokariotskih i eukariotskih stanica.

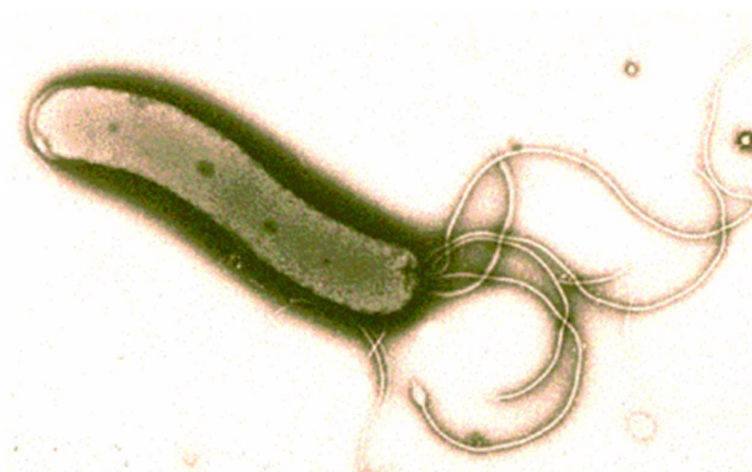
*Helicobacter pylori* otkrivena je na početku 1980-ih. Trenutno je otprilike polovica svjetske populacije zaražena ovom bakterijom. Epidemiološka istraživanja također su otkrila poveznicu između infekcije s *H. pylori* i mnogih drugih bolesti koje ne zahvaćaju probavni sustav, poput idiopatske sidropenične anemije i idiopatske trombocitopenične purpure. Nedostatak vitamina B12 također je povezan s infekcijom *H. pylori*.<sup>1</sup>

## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) spiralna je patogena bakterija (Slika 1.) koja kolonizira epitel želuca u ljudi, a procjenjuje se da je njome zaraženo oko 50 % cjelokupne populacije. Prvi put je izolirana 1982., za što su Robin Warren i Barry Marshall 2005. godine dobili Nobelovu nagradu za medicinu. Iako je većina zaraženih ovom bakterijom asimptomatska (oko 80 %), ovaj patogen može uzrokovati bolesti gornjeg gastrointestinalnog trakta kao što su kronični gastritis, peptički ulkus, duodenalni ulkus i karcinom želuca.

Socioekonomski čimbenici u velikoj mjeri utječu na rasprostranjenost infekcije. U zemljama s niskim higijenskim standardom i lošim životnim uvjetima prevalencija doseže i do 100 %. Tako je broj zaraženih odraslih osoba srednje dobi u zemljama u razvoju oko 80 %, dok je taj postotak 20 – 50 % kod razvijenih zemalja.<sup>2</sup> Postoji razlika u dobivanju infekcije u razvijenim i nerazvijenim zemljama. U nerazvijenim zemljama sa slabim socioekonomskim standardom zaraza s *H. pylori* započinje u djetinjstvu. Većina djece iz tih zemalja je već do četvrte godine zaražena tom bakterijom. U razvijenim zemljama postotak djece zaražene *H. pylori* je vrlo malen do pete godine života, dok s porastom životne dobi raste i prevalencija infekcije. Spontana eradikacija je vrlo rijetka. Međutim, u većini zaraženih simptomi nisu izraženi. Samo 10 do 20 % inficiranih kasnije oboli, najčešće od peptičkog ulkusa. Vrlo malen broj njih (manje od 5 na 10 000) oboli od karcinoma želuca, MALT-limfoma ili primarnoga non-Hodgkin limfoma želuca. U Hrvatskoj prevalencija infekcije u dobi između 20 i 70 godina je 60 %.<sup>3</sup> Postoje brojne terapije koje se koriste za liječenje bolesti uzrokovanih ovom bakterijom, a razlog tog mnoštva terapija je to što nijedna terapija nije univerzalna i učinkovita u svim slučajevima i u svim dijelovima svijeta. Procjenjuje se da terapija protiv *H. pylori* nije učinkovita u više od 20 % slučajeva.<sup>4</sup>



Slika 1. Bakterija *Helicobacter pylori* pod elektronskim mikroskopom. Slika preuzeta iz literaturnog izvora.<sup>5</sup>

### 2.1.1. Opis infekcije

*Helicobacter pylori* je dobro prilagođena uvjetima u sluznici želuca te ima specifična svojstva koja joj omogućuju ulazak u sluznicu želuca, pričvršćivanje na epitelne stanice, izbjegavanje imunološkog odgovora te kao rezultat trajnu kolonizaciju. Genom *H. pylori* kontinuirano se mijenja prilikom kolonizacije domaćina tako da unosi dijelove strane DNA iz drugih sojeva *H. pylori*.

Sinteza ureaze je prvi korak pri infekciji. Ureaza hidrolizira ureju na ugljikov dioksid i amonijak koji dovodi do lokalnog porasta pH te na taj način omogućuje da *H. pylori* preživi u kiselim uvjetima želuca. Većina sojeva *H. pylori* eksprimira citotoksin VacA koji se ugradi u epitelne stanice membrane i formira heksamerni kanal kroz koji mogu prolaziti bikarbonatni ioni i organski anioni te tako opskrbljivati bakteriju nutrijentima. Patogena uloga proteina VacA je još uvijek diskutabilna, ali bi mogao biti jedan od mogućih uzroka pojave gastritisa. Pojava gastritisa bi mogla biti izravna posljedica i stvaranja amonijaka ili djelovanje patogenog proteina CagA.

*H. pylori* uzrokuje upalu želuca u gotovo svih zaraženih osoba. Ovaj upalni odgovor u početku se sastoji od mobilizacije neutrofila, zatim T i B limfocita, plazma stanice i makrofaga te dolazi do oštećenja epitelnih stanica. Želučani epitel zaraženih osoba ima povećane razine određenih interleukina, od kojih je najznačajniji interleukin-8.<sup>2</sup> Interleukini su skupina citokina koji posreduju u komunikaciji između različitih limfatičnih stanica.

### 2.1.2. Svojstva bakterije

*Helicobacter pylori* je Gram-negativna bakterija, duljine oko 3 µm, a promjera oko 0,5 µm. Iako je obično spiralnog oblika, može se pojaviti i u štapićastom obliku, dok se kokoidni oblik pojavljuje nakon tretiranja antibioticima. Ovaj patogen ima dva do šest bičeva, duljine otprilike 3 µm. Bičevi osiguravaju pokretljivost i omogućuju brzo kretanje u viskoznoj sluzi koja prekriva želučane epitelne stanice. Dijeli se 4-6 puta po satu, a prestaje se dijeliti pri pH = 3,5. U nepovoljnim uvjetima pretvara se u okruglasti oblik te se u tom obliku ne može uzgajati u kulturi. Kako bi preživjela u kiselom pH želuca, bakterija se svojim bičevima ukopava u sluznicu stijenke želuca i negativnom kemotaksijom se kreće do epitelnih stanica želuca gdje se veže adhezivima na membrane.

*Helicobacter pylori* nema nekoliko biosintetskih putova koje obično imaju manje specijalizirane bakterije poput crijevnih bakterija. Tako primjerice ne može sintetizirati aminokiseline: fenilalanin, metionin, leucin, izoleucin, arginin, histidin i valin. Zato se u uzgoju te bakterije trebaju dodati te aminokiseline. Ova bakterija sintetizira enzime ureazu, katalazu i oksidazu, a prisutnost tih enzima može se iskoristiti u identificiranju te bakterije. *H. pylori* može katabolizirati glukozu, dok druge šećere ne može.

### 2.1.3. Dijagnoza i liječenje

*H. pylori* 2015. godine formalno je prepoznata kao uzročnik infekcije od strane gastroenterologa. Preporuka stručnjaka je proaktivno testiranje na *H. pylori* i njezino iskorjenjivanje. Tako je primjerice preporučeno testiranje pacijenata s nedijagnosticiranom dispepsijom, pacijenata koji imaju ili su imali želučani ili duodenalni ulkus, pacijenata s dijagnozom MALT limfoma, onih koji su u obiteljskoj anamnezi imali peptički ulkus ili karcinom želuca te onih koji redovito upotrebljavaju nesteroidne protuupalne lijekove (NSAID).

Preporučeno je i testiranje prve generacije useljenika koji dolaze iz zemalja s velikom učestalošću te bolesti.<sup>6</sup> Primjerice, u Sjedinjenim Američkim Državama pojavnost *H. pylori* je

2,6 puta veća kod Hispanoamerikanaca te 3,2 puta veća kod useljenika iz istočne Azije u odnosu na opću populaciju.<sup>7</sup> Jednom kada se utvrdi postojanje infekcije, preporuča se testiranje ostalih članova obitelji kako bi ih se zaštitilo od infekcije ili bolesti povezanih s *H. pylori*.

Postoji više načina testiranja na *H. pylori*, a najčešće korištene metode su neinvazivni testovi: ureja izdisajni test i dokaz antigena *H. pylori* u stolici. Ureja izdisajni test temelji se na svojstvu bakterije da razgrađuje ureju na ugljikov dioksid i amonijak. Provodi se tako da testirana osoba popije otopinu ureje obogaćene izotopom ugljika <sup>13</sup>C. Nakon nekog vremena, u prisutnosti bakterije, ureja će se razgraditi do ugljikova dioksida koji će osoba izdahnuti. Povećani udio izotopno obilježenog ugljikova dioksida u izdisaju bit će dokaz prisutnosti bakterije. Izbor dijagnostičke tehnike ovisi o kliničkoj situaciji. Primjerice, najbolja pretraga za pacijenta s izraženim simptomima koji upućuju na bolest gornjeg probavnog sustava, kao što je peptički ulkus ili karcinom želuca, bila bi endoskopija s testiranjem na *H. pylori*. Nasuprot tome, asimptomatskom članu obitelji pacijenta s peptičkim ulkusom bilo bi preporučeno testiranje neinvazivnim testovima poput ureja izdisajnog testa ili dokaz antigena u stolici.<sup>6</sup>

Postoji cijeli niz lijekova za *H. pylori*, a najpopularnija i jedna od najčešće korištenih terapija je trojna terapija koja sadrži inhibitor protonske pumpe (IPP), amoksicilin i klaritromicin ili metronidazol. Ova terapija traje 10-14 dana, a prihvatljiva je jedino u područjima s niskom rezistencijom na klaritromicin. Budući da postoji sve veća rezistencija *H. pylori* na antimikrobna sredstva, osobito na klaritromicin i metronidazol, često se koriste drugi antimikrobnici, na primjer levoflaksacin, sitafoksacin ili rifabutin. Tako je u područjima s visokom otpornošću na klaritromicin moguće koristiti levofloksacin. Nažalost, čak i sa svim tim modifikacijama, standardna trojna terapija više nije učinkovita u većini zemalja. Druga linija liječenja je primjena dvostruke doze, četverostruke terapije s bizmutom i četverostruke terapije bez bizmuta. Četverostruka terapija s bizmutom uključuje inhibitor protonske pumpe, bizmut, metronidazol i tetraciklin, a pacijenti je dobro podnose i pokazuje učinkovitost čak i kod sojeva *in vitro* rezistentnih na metronidazol. Ako bizmut nije dostupan, može se koristiti istodobna četverostruka terapija, koja se sastoji od inhibitora protonske pumpe, amoksicilina, metronidazola i klaritromicina. Četverostruka terapija bez bizmuta ima nekoliko varijanti, poput sekvencijalne, hibridne i obrnuto hibridne terapije. U sekvencijalnoj terapiji, inhibitor protonske pumpe i amoksicilin se primjenjuju u prvoj polovici terapije (5 dana), a metronidazol ili klaritromicin u zamjeni za amoksicilin u drugoj polovici terapije.<sup>8</sup>

Četverostruka terapija s bizmutom osobito se preporučuje osobama koje su alergične na penicilin. Konsenzusno izvješće iz Maastrichta iz 2016. i Konsenzus iz Toronta iz 2016. preporučili su četverostruku terapiju s bizmutom kao prvu liniju liječenja, osobito kod pojave rezistencije na klaritromicin.

#### 2.1.4. Targeti u borbi protiv *H. pylori*

S porastom upotrebe antibiotika dolazi do razvijanja sve veće rezistencije bakterija na lijekove, kao što je slučaj i s *H. pylori*. Iz tog razloga, javila se potreba pronalaska novih meta za lijekove protiv *H. pylori*.<sup>8</sup> Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) nedavno je proglasila soj *H. pylori* otporan na klaritromicin kao jedan od 12 prioritetnih patogena za koje su novi antibiotici hitno potrebni.<sup>9</sup> Uspješnost terapija ovisi o osjetljivosti na dane lijekove, dozi, formulaciji, dodatnoj primjeni lijekova koji imaju aditivni i/ili sinergistički utjecaj s antibiotskom terapijom, trajanju terapije i stopama ponovne infekcije. Testiranje osjetljivosti na antimikrobne lijekove čini se najboljim rješenjem za optimizaciju i smanjenje upotrebe antibiotika u terapiji protiv *H. pylori*. Metaanaliza koju su proveli Chen i suradnici 2016. godine, koja se sastoji od 13 kontroliranih kliničkih ispitivanja s 3512 sudionika, pokazala je bolju učinkovitost prilagođenih terapija u usporedbi s empirijski odabranim terapijama. Međutim, preporučeno testiranje osjetljivosti na

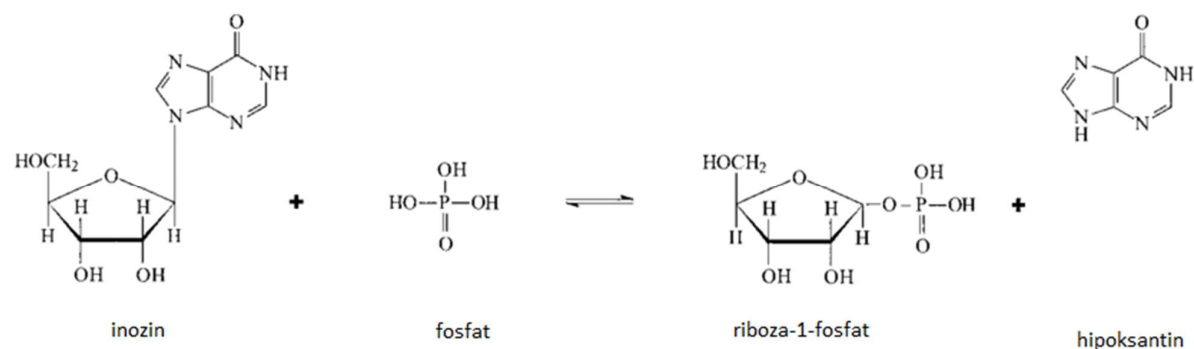
antibiotike može biti izazovno jer obično zahtijeva biopsiju za početak bakterijske kulture, a sama kultura bakterije *H. pylori* je skupa i složena. Opet, empirijske terapije su manje učinkovite i suočavaju se s izazovima porasta otpornosti *H. pylori* na antibiotike diljem svijeta. Nepotrebna upotreba antibiotika u liječenju *H. pylori* treba se izbjegavati zato što utječe kako na samu učinkovitost terapije, tako i na povećanu vjerojatnost nastajanja novih sojeva bakterija otpornih na lijekove.<sup>8</sup>

Brojna istraživanja u ovom području dovela su do novih terapija koje bi trebale ograničiti porast rezistencije bakterija na antibiotike. Neki od tih terapija uključuju probiotike, ekstrakte biljaka i inhibitore stvaranja biofilma. Ipak, potrebni su i novi pristupi koji bi služili kao alternativa trenutnim terapijama.

Budući da *H. pylori* nema *de novo* sintezu purinskih nukleotida, za dobivanje purinskih nukleotida oslanja se isključivo na metabolički put spašavanja nukleotida. Upravo su enzimi iz tog metaboličkog puta moguće mete za nove antibiotike. Jedan od primjera takvih novih kandidata lijekova je DADMe-imucilin-G, inhibitor ključnog enzima u purinskom razgradom metaboličkom putu, purinske nukleozidne fosforilaze (PNP), koji predstavlja potencijalni lijek i protiv parazita malarije *Plasmodium falciparum*.<sup>9</sup>

## 2.2. Purinska nukleozidna fosforilaza, PNP

Purinska nukleozidna fosforilaza (PNP) je enzim koji katalizira reverzibilno fosforilitičko cijepanje glikozidne veze purinskih nukleozida u prisutnosti ortofosfata kao drugog supstrata kako bi nastala purinska baza i riboza(deoksiriboza)-1-fosfat (Slika 2.). Termodinamička ravnoteža ove reakcije pomaknuta je u smjeru nastanka nukleozida. Međutim, *in vivo* fosforilaza je znatno povoljnija od sinteze budući da je spregnuta s dvije dodatne enzimske reakcije, oksidacijom i fotoribozilacijom, koje kataliziraju enzimi ksantin oksidaza i hipoksantin-gvanin fosforiboziltransferaza. Ovaj enzim je vrlo važan u metaboličkom putu spašavanja purinskih nukleotida, koji je važan za ravnotežu između sinteze defosforiliranih purina i detoksikacije daljnjom razgradnjom do mokraćne kiseline.<sup>10</sup>



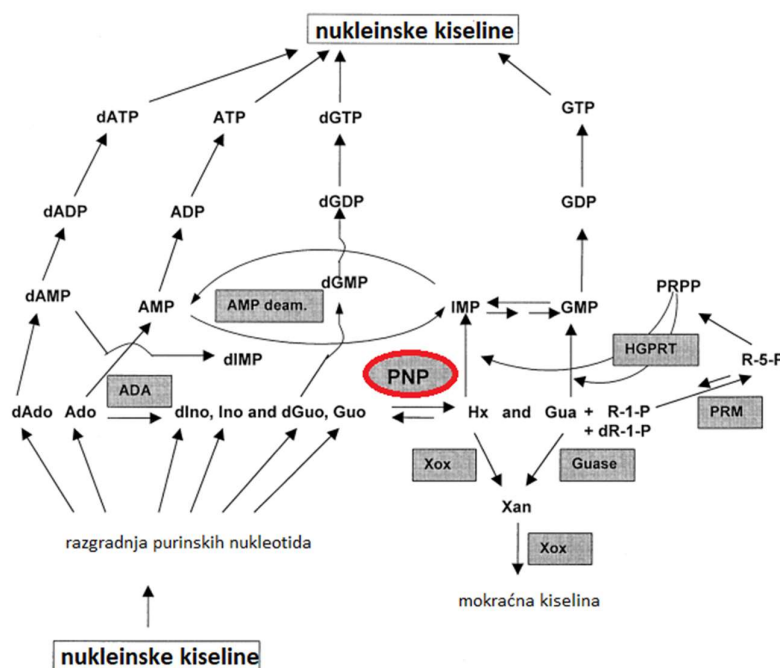
Slika 2. Reakcija katalizirana purinskom nukleozidnom fosforilazom (PNP). Umjesto inozina, PNP može koristiti gvanozin ili adenzin pri čemu nastaje gvanin odnosno adenin. Slika preuzeta iz literaturnog izvora.<sup>11</sup>

Purinsku nukleozidnu fosforilazu otkrili su i ukratko okarakterizirali Friedkin i Kalckar. Počelo se razmišljati o njoj kao o mogućoj meti za antitumorske lijekove od otkako se otkrilo (1975.) da je dijete kojemu je bila dijagnosticirana limfopenija s izrazito defektivnim T-stanicama, ali normalnim B-stanicama imalo potpuni nedostatak aktivnosti PNP-a.<sup>12</sup>

Purinska nukleozidna fosforilaza prisutna je u raznim dijelovima ljudskog organizma, a njezina najveća aktivnost pronađena je u bubrezima, limfocitima periferne krvi i granulocitima.

Ljudski eritrociti najbogatiji su izvor PNP-a, dok je razina PNP-a u eritrocitima znatno niža kod miševa, štakora i drugih životinja. Te životinje najveću razinu PNP-a imaju u tankom crijevu. Uloga purinske nukleozidne fosforilaze u purinskom metabolizmu vidljiva je na Slici 3.

Razlike u specifičnosti PNP-a iz *E. coli* i ljudi dovele su do razvitka genske terapije usmjerene na tumore. To je potaknulo istraživanja purinske nukleozidne fosforilaze iz različitih izvora koji se svojom specifičnošću razlikuju od ljudskog PNP-a.<sup>10</sup>



Slika 3. Uloga purinske nukleozidne fosforilaze (PNP) u purinskom metabolizmu. Slika je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.<sup>10</sup>

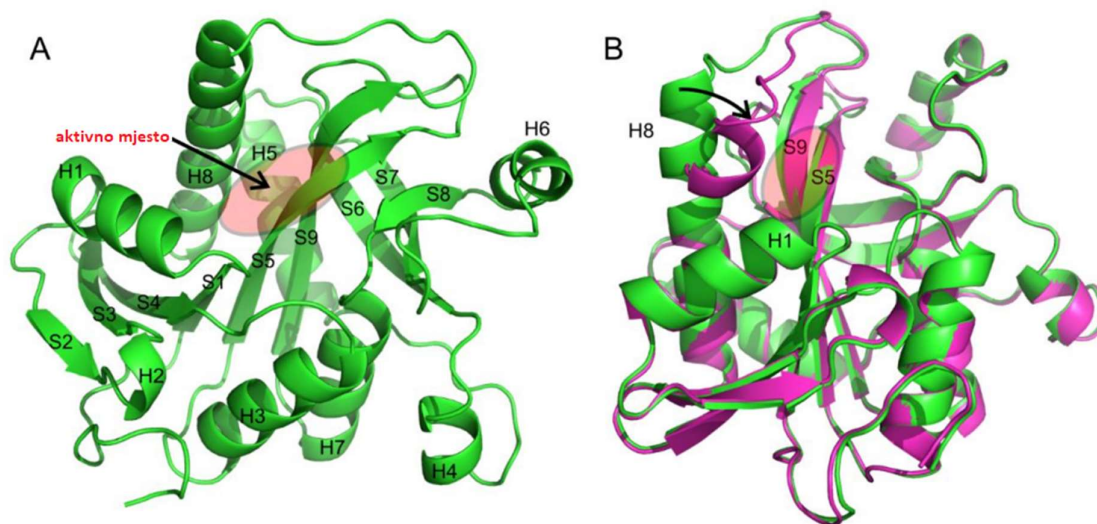
Purinski metabolizam je iznimno važan proces u eukariotskim i prokariotskim stanicama o kojemu ovisi brzina rasta stanica. Brzina rasta kod bakterija često je direktno povezana s brzinom kojom stvaraju gvanozin-monofosfat (GMP) i adenozin-monofosfat (AMP). Glavni način za stvaranje purinskih nukleotida je *de novo* biosintetski put, u kojem je fosforibozil-pirofosfat (PRPP) početni metabolit, a u nizu enzimskih reakcija se dobiva inozin-monofosfat (IMP). IMP se onda dalje može koristiti ili za stvaranje GMP-a pomoću IMP-dehidrogenaze i GMP-sintaze ili za stvaranje AMP-a pomoću adenilosukcinat-sintaze i adenilosukcinat-liaze. Ovaj metabolički put prvenstveno koristi energiju iz metabolizma aminokiselina i stoga ima relativno visoku metaboličku cijenu. Alternativni metabolički put za sintezu purinskih nukleotida je sinteza purina iz metaboličkog otpada, koji se još naziva i metabolički put spašavanja purinskih nukleotida. Naziva se tako jer, umjesto da sintetizira nove purinske prstenove, reciklira slobodne purinske baze i nukleozide koji su oslobođeni tijekom razgradnje nukleinskih kiselina. Ovaj metabolički put može biti direktan i tako sintetizirati GMP iz gvanina i AMP iz adenina ili indirektan (IMP se sintetizira iz hipoksantina, a XMP iz ksantina). Većina organizama ima i *de novo* put i put sinteze iz metaboličkog otpada. Sekvencijska analiza genoma pokazala je da *H. pylori* nedostaje većina enzima potrebnih za sintezu purina *de novo*, tako da je jedini način na koji ih može sintetizirati sinteza iz metaboličkog otpada.<sup>13</sup>

### 2.2.1. Struktura purinske nukleozidne fosforilaze

Purinska nukleozidna fosforilaza može se podijeliti u dvije glavne klase. Prva klasa su homotrimeri s malom molekularnom masom ( $M_r = 80-100$  kDa), koji su specifični za 6-okso purinske nukleozide. Često se nazivaju „Ino-Guo“ fosforilaze. Enzimi ovog tipa izolirani su iz mnogih tkiva sisavaca i iz nekih mikroorganizama. Druga klasa su homoheksameri ( $M_r = 110-160$  kDa) s manjom specifičnošću, s obzirom da kao supstrat prihvaćaju 6-okso i/ili 6-amino purinske nukleozide. Ovaj tip enzima može se pronaći u mikroorganizmima, primjerice u *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella* i *Sulfolobus solfataricus*.

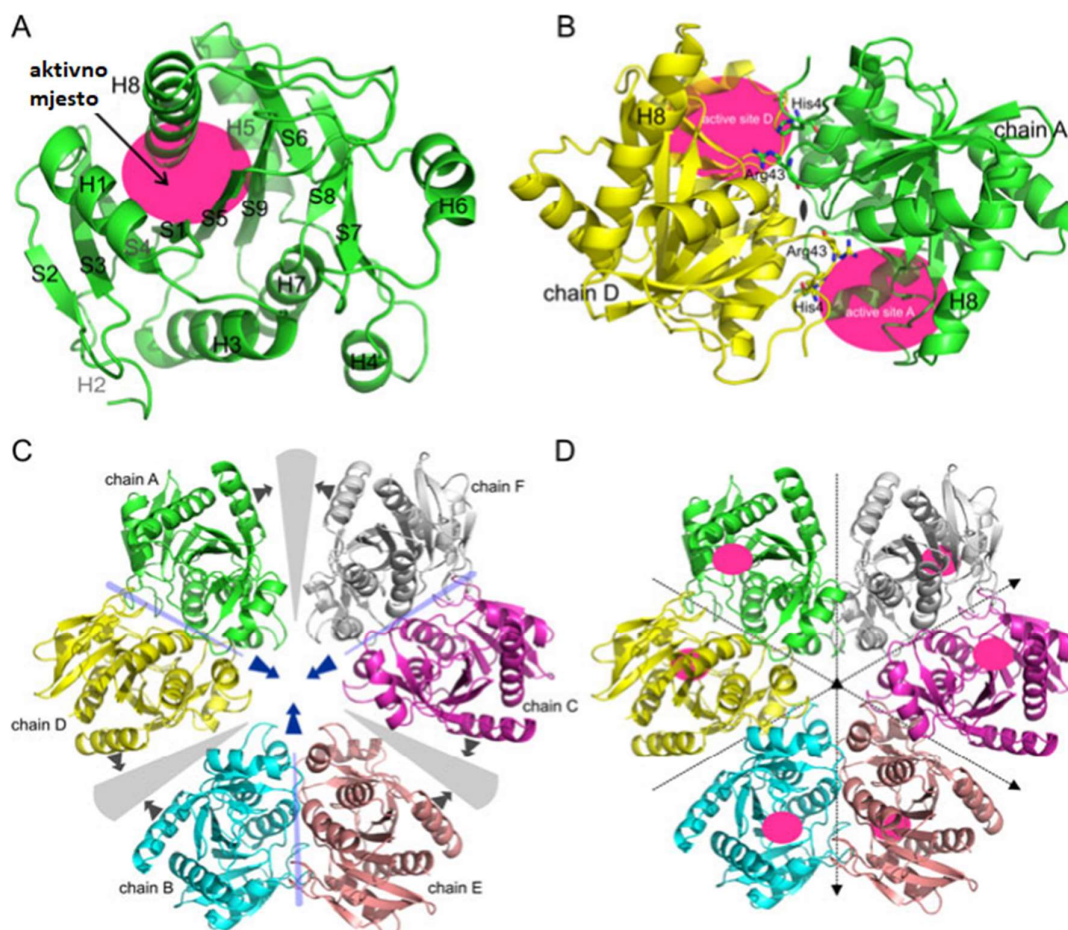
PNP iz *H. pylori* heksamerni je enzim koji sadrži šest identičnih monomera od 233 aminokiselina (Slika 4.). Heksamer ima oblik diska, promjer mu je oko 100 Å, a širina oko 40 Å. Za stvaranje aktivnog mjesta potrebna su dva kemijskim vezama povezana monomera. Svaki monomer upotpunjava aktivno mjesto drugog monomera tako da donira dvije aminokiseline (His4 i Arg43) u aktivno mjesto. Takva tri dimera čine cijeli homoheksamer PNP-a (Slika 5.).

Svaki monomer je globularnog oblika i sastoji se od izdužene  $\beta$ -ploče u središnjem dijelu okružene s osam  $\alpha$ -zavojnica različite duljine. Središnja regija sastoji se od devet  $\beta$ -lanaca. Prva četiri  $\beta$ -lanca samo su blago savijena, dok se zadnjih pet okreću i tvore malu  $\beta$ -bačvu koja se povezuje s prva četiri preko dva najuža  $\beta$ -lanca koji se nalaze u sredini. Svaki monomer ima jedno aktivno mjesto koje se nalazi između  $\alpha$ -zavojnica H1 i H8 na jednoj strani i  $\beta$ -lanaca S5 i S9 na drugoj.<sup>1</sup>



Slika 4. Sekundarna struktura monomera PNP-a iz *H. pylori* i razlika između otvorene i zatvorene konformacije. (A) Aktivno mjesto nalazi se između  $\alpha$ -zavojnica H1 i H8 na jednoj strani i  $\beta$ -lanaca S5 i S9 na drugoj (ovalni oblik). (B) Preklapanje lanca A (zeleno) i lanca B (ljubičasto) u strukturi prikazuje konformacijsku promjenu početnog dijela  $\alpha$ -zavojnice H8 (dio označen sa strelicom) što rezultira otvorenom konformacijom monomera A i zatvorenom konformacijom monomera C. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.<sup>1</sup>





Slika 5. Ukupna struktura i pozicije aktivnih mjesta apo enzima purinske nukleozidne fosforilaze iz *H. pylori*. (A) Struktura monomera s označenim elementima sekundarne strukture. (B) Dimer između monomera A i D s približnom osi simetrije drugog reda. Dvije aminokiseline iz jednog monomera (His4 i Arg43) upotpunjuju aktivno mjesto drugog monomera. (C) Tri dimera se spajaju i tvore heksamer. Prikazane su dvije vrste dodirnih površina: intradimerna dodirna površina (plavo) i interdimerna dodirna površina (sivo). (D) Cijeli heksamer može imati približnu ili egzaktnu točkastu grupu (2, 3 ili 32). Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.<sup>14</sup>

### 2.2.2. Aktivnost i specifičnost za supstrate enzima PNP iz *H. pylori*

Uspoređivanjem aktivnosti enzima purinske nukleozidne fosforilaze iz *H. pylori* s aktivnosti istog enzima iz *E. coli* uočene su neke neobične razlike. Naime, kao što je bilo i za očekivati, oba enzima pokazuju sličnu aktivnost s inozinom i gvanozinom kao supstratom. Međutim, ono što je bilo iznenađujuće je značajno manja aktivnost PNP-a iz *H. pylori* u odnosu na isti enzim iz *E. coli* kada se upotrijebi adenozin kao supstrat. Neuobičajeno je da purinske nukleozidne fosforilaze s malom molekulskom masom pokazuju nizak afinitet prema adenzinu. Heksamerni PNP iz nekih parazita, poput primjerice *Plasmodium falciparum*, pokazuje izrazito nizak afinitet prema adenzinu. Međutim, takvi paraziti posjeduju neke strukturne karakteristike koje se razlikuju od tipične bakterijske purinske nukleozidne fosforilaze. Primjerice, u aktivnom mjestu enzima PNP iz tog parazita nalazi se Asn204 umjesto inače

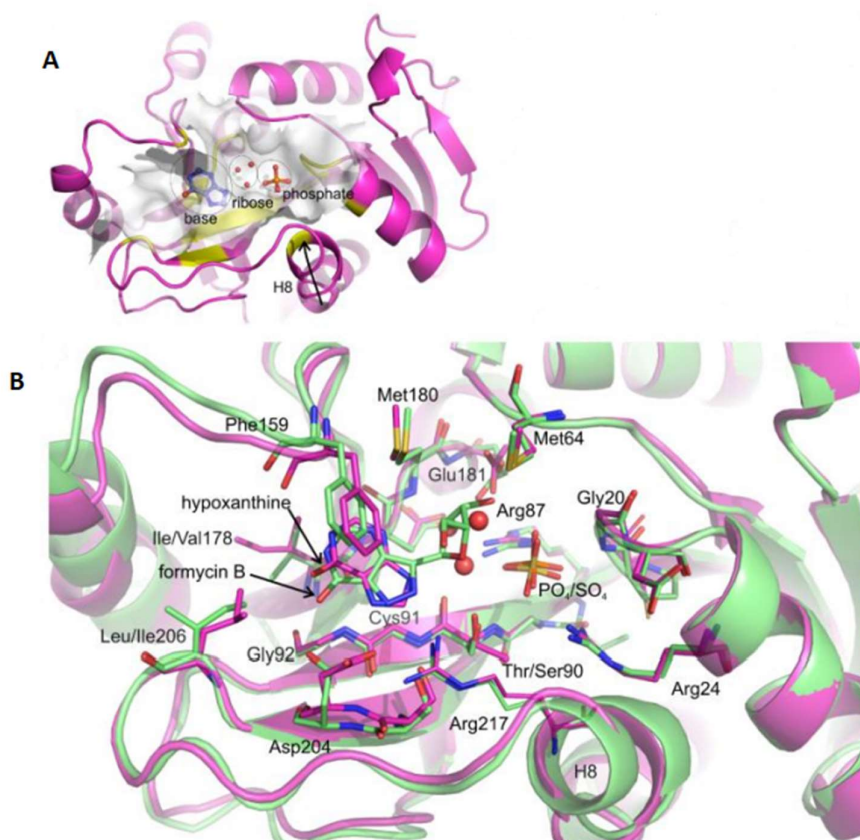
dobro očuvanog Asp te to uzrokuje promjenu katalitičkih svojstava. PNP iz *H. pylori* je stoga jedina do sada poznata bakterijska purinska nukleozidna fosforilaza koja ima tipičnu heksamernu strukturu s očuvanim aminokiselinama u aktivnom mjestu, a koja pokazuje nizak afinitet prema adenozinu.<sup>1</sup>

### 2.2.3. Struktura aktivnog mjesta purinske nukleozidne fosforilaze iz *H. pylori*

Aktivno mjesto purinske nukleozidne fosforilaze iz *H. pylori* nalazi se blizu površine proteina, a formiraju ga centralna  $\beta$ -ploča s jedne strane i  $\alpha$ -zavojnice H1 i H8 s druge strane, pri čemu je djelomično otvoren prema površini kako bi se omogućio ulazak supstrata. Sastoji se od 3 glavna dijela: dio za vezanje fosfata, riboze i baze (Slika 6.). Mjesto za vezanje fosfata se nalazi u najdubljem mjestu džepa aktivnog mjesta. Pozitivno je nabijen zbog pozitivno nabijenih arginina u aktivnom mjestu (Arg24, Arg87 i Arg43). Arg43 tvori dimer sa susjednim monomerom. Osim kontakata s ovih šest argininskih ostataka, fosfat također tvori jednu vodikovu vezu s Gly20 preko dušikovog atoma te dvije vodikove veze s Thr90 (preko dušika i kisika). Simulacije metodom molekularne dinamike potvrđuju da aminokiseline Arg24, Thr90 i Arg 43 iz susjednog monomera imaju najveću ulogu u vezanju fosfata. Svaki kisikov atom iz fosfatnog iona tvori vodikovu vezu s navedenim aminokiselinama što pokazuje da ovaj dio enzima ima veliki afinitet za fosfatni ion.

Pokraj fosfatnog veznog mjesta nalazi se vezno mjesto za ribozu, u koje se smješta šećer (riboza ili 2'-deoksiriboza), a sastoji se od aminokiselina Arg87, Thr90, Met64, Met190 i Glu181. Vezno mjesto za bazu je dio aktivnog mjesta koji je najviše izložen otapalu. Supstrat je okružen s aminokiselinama Cys91, Gly92, Ile178 i Ile206 s kojima tvori hidrofobne interakcije, a Asp204 tvori jednu ili dvije vodikove veze s bazom.

Phe159 s gornje strane prekriva aktivno mjesto i tvori hidrofobne interakcije s bazom. Phe159 se također nalazi na vrhu duge neuređene petlje tako da može olakšati kretanje ove regije i napraviti mjesto za supstrat. Aktivno mjesto jednog monomera nadopunjuju dvije aminokiseline iz susjednog monomera (His4 i Arg43) unutar dimera. Aminokiseline His4 i Arg 43 se nalaze na krajevima dugih petlji što im omogućuje da imaju veliki stupanj kretanja prema i od aktivnog mjesta.<sup>1</sup>

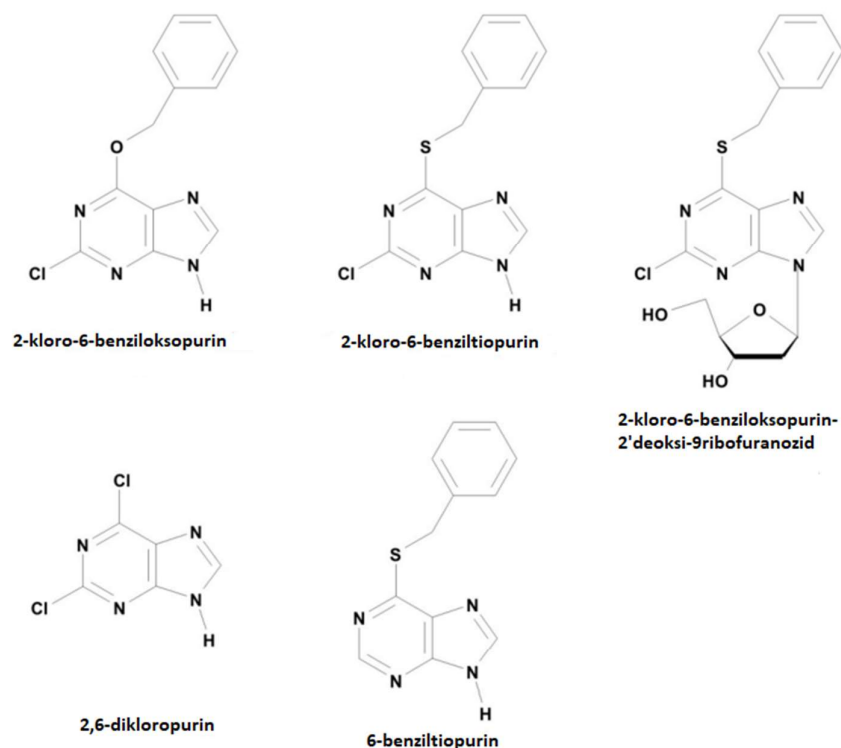


Slika 6. Aktivno mjesto monomera u strukturi PNP-a iz *H. pylori*. (A) Prikazane su tri regije aktivnog mjesta: vezna mjesta za fosfat, ribozu i bazu. Tri molekule vode (crveno) nalaze se u centralnom dijelu aktivnog mjesta otprile na poziciji veznog mjesta za ribozu. (B) Preklapanje aktivnog mjesta enzima PNP iz *E. coli* (zeleno) i enzima PNP iz *H. pylori* (ljubičasto). Fosfat je pozicioniran na istom mjestu i u istoj orijentaciji u obje strukture. Slika je obrađena i preuzeta iz literaturnog izvora.<sup>1</sup>

#### 2.2.4. Inhibitori purinske nukleozidne fosforilaze iz *H. pylori*

Velika važnost targetiranja enzima iz metaboličkog puta spašavanja purinskih nukleotida ogleda se u tome da je to jedini metabolički put iz kojeg bakterija može dobiti purinske nukleotide koji su ključni za izgradnju DNA i RNA molekula. Upravo iz tog razloga se pokušavaju pronaći najučinkovitiji inhibitori ključnog enzima tog metaboličkog puta, purinske nukleozidne fosforilaze.

U jednom takvom istraživanju proučavana je inhibicija PNP-a iz *H. pylori*, sa 2- i/ili 6-supstituiranim purinima i s 2'-deoksiribozidom 2-kloro-6-benziltiopurina. U tom istraživanju zaključeno je da su purini supstituirani na položajima 2 i/ili 6 efektivni inhibitori PNP-a iz *H. pylori* (prikazani na Slici 7.), s inhibicijom u mikromolarnom području. Najučinkovitiji inhibitor pokazao se 2-kloro-6-benziltiopurin, koji je gotovo u potpunosti zaustavio rast bakterije, s 92%-tnom inhibicijom.<sup>9</sup>



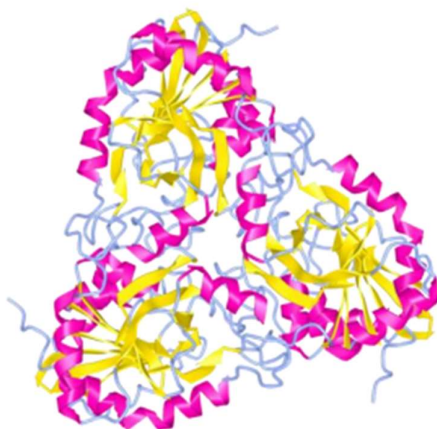
Slika 7. Strukture purinskih derivata kao potencijalnih inhibitora PNP-a iz *H. pylori*. Slika je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.<sup>9</sup>

#### 2.2.5. Ljudska purinska nukleozidna fosforilaza

Ljudska purinska nukleozidna fosforilaza (HsPNP) je homooligomerni enzim koji je kodiran genom koji se nalazi u pericentričnoj regiji veće ruke 14. kromosoma (Slika 8.). Aktivno mjesto tog enzima nalazi se na dodirnim površinama između monomera. Jedan monomer formira većinu aktivnog mjesta, dok drugi donira nekoliko aminokiselinskih ostataka važnih za katalizu i specifičnost supstrata. HsPNP je trimer u kojem su monomeri posloženi „od glave do repa.“ HsPNP ima os simetrije C3 i kristalizira po tipu trigonske strukture.

Cjelokupna struktura HsPNP uključuje dvije  $\beta$ -nabrane ploče koje tvore iskrivljenu  $\beta$ -bačvu. Sekundarna struktura  $\beta$ -nabrane ploče je okružena sa sedam  $\alpha$ -zavojnica. Nekoliko petlji povezuje  $\alpha$ -zavojnice i  $\beta$ -nabrane ploče. Debljina enzima je oko 6 nm, a promjer 7 nm.

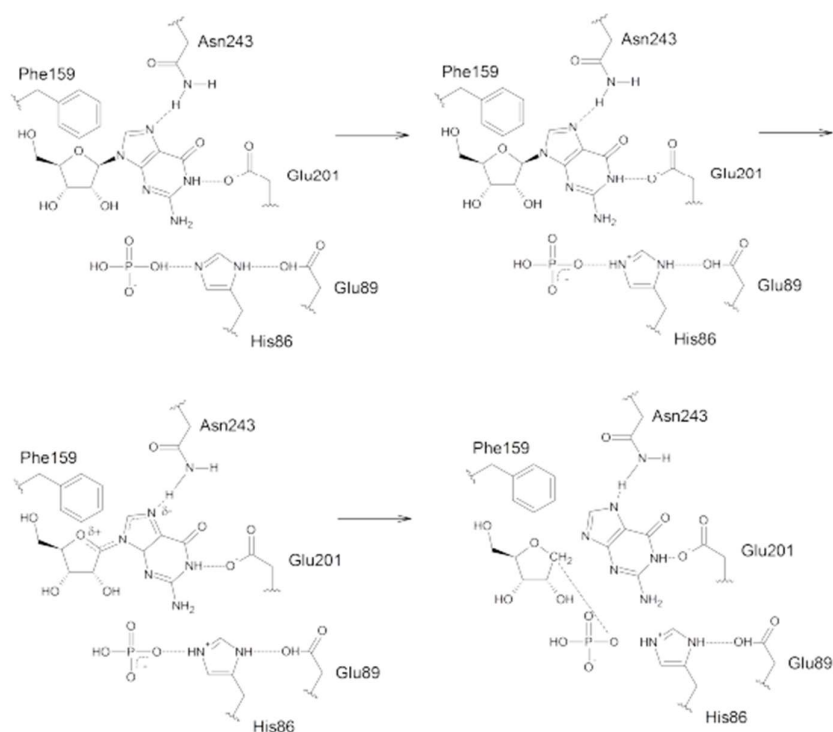
Ljudska purinska nukleozidna fosforilaza selektivnija je za supstrate od primjerice PNP-a iz *E. coli*. Gotovo uopće nema afinitet za 6-aminopurinske nukleozide (adenozin i njegovi derivati), dok se 6-oksopurinski nukleozidi normalno razgrađuju (gvanozin, inozin i derivati). Ova specifičnost javlja se zbog aminokiselina Glu201 i Asn243 u aktivnom mjestu enzima HsPNP. Glu201 može akceptirati vodikovu vezu od purinskog N1 atoma. 6-oksopurini imaju donor vodikve veze na toj poziciji (N1-H), dok 6-aminopurini nemaju. Amidni dušikov atom iz Asn243 donira vodikovu vezu O6 i N7 atomima purinskog prstena 6-oksopurina, ali teže akceptira vodikovu vezu od N6 i 6-aminopurina.<sup>15</sup>



Slika 8. Struktura ljudske purinske nukleozidne fosforilaze. Ljubičasto:  $\alpha$ -zavojnice, žuto:  $\beta$ -nabrane ploče, plavo: petlje. Slika preuzeta iz literaturnog izvora.<sup>16</sup>

HsPNP je također selektivna za šećerni prsten. Riboza interagira primarno s Phe159 iz susjedne podjedinice pomoću disperznih interakcija te s His257 koji tvori vodikovu vezu s 5'-hidroksilnom skupinom. Supstitucija riboze s nekom drugom pentozom (ksilozilom, liksozilom ili arabinozilom) značajno smanjuje katalitičku aktivnost HsPNP-a.

Pretpostavljeni mehanizam enzima HsPNP (Slika 9.) je uređen: nukleozid ulazi u aktivno mjesto nakon čega se veže purinska baza. Započinje deprotonacijom dihidrogenfosfata pomoću His86 na način koji podsjeća na katalitičke trijade. Purinski nukleozid vezan je u anti-konformaciji, koja olakšava cijepanje glikozidne veze. Cijepanje glikozidne veze inducirano je protonacijom dušika N7 preko Asn243 i ostvarivanjem elektrostatskih interakcija s hidrogenfosfatom u susjedstvu glikozidne veze. Nastali karbenijev kation stabilizira se negativnim nabojem hidrogenfosfata. Nastaje kovalentna veza između karbenijevog kationa i hidrogenfosfata, pri čemu nastaje i 1-fosforiboza.<sup>15</sup>



Slika 9. Pretpostavljeni mehanizam ljudske purinske nukleozidne fosforilaze. Slika preuzeta iz literaturnog izvora.<sup>15</sup>

#### 2.2.6. Usporedba purinske nukleozidne fosforilaze iz ljudi i *H. pylori*

Prilikom usporedbe ljudske i bakterijske purinske nukleozidne fosforilaze vidljive su tri osnovne razlike, a to su razlike u primarnom nizu aminokiselina, stupnju oligomerizacije u nativnom stanju te specifičnosti prema supstratima. Ljudska purinska nukleozidna fosforilaza je, kao što je gore navedeno, trimer, a PNP iz *H. pylori* je homoheksamer. PNP iz bakterije *H. pylori* dijeli značajnu sličnost s PNP-om iz bakterije *E. coli*, najviše istraženom purinskom nukleozidnom fosforilazom (u aminokiselinskom slijedu uočava se 50 % identičnosti, a 70 % sličnosti). Bakterijska purinska nukleozidna fosforilaza kao supstrat može prepoznati i 6-okso i 6-amino purinske nukleozide (gvanozin, inozin i adenzin), dok ljudski PNP može prepoznati jedino 6-amino purinske nukleozide (inozin i gvanozin). Još jedna važna razlika je to što ljudi, uz put spašavanja purinskih nukleotida, imaju i sintezu purina *de novo*, dok *H. pylori* ima samo metabolički put spašavanja purinskih nukleotida.

Razlike u svojstvima i specifičnosti između purinskih nukleozidnih fosforilaza iz različitih izvora ključ su u mogućem pronalasku lijekova protiv *H. pylori* ili nekih drugih bakterija, poput *E. coli*. Neke prolijekove, kao što je 2-deoksi-6-metilpurin, ljudska purinska nukleozidna fosforilaza ne može cijepati kad se injektiraju u tumorske stanice. Međutim, u stanicama u kojima se nalazi PNP gen iz *E. coli*, netoksični 2-deoksi-6-metilpurin bakterijski PNP pretvara u visoko citotoksičnu bazu, 6-metilpurin. Ta slobodna purinska baza onda može difundirati iz stanice što je toksično za stanice u kojima se nalazi PNP gen, kao i za susjedne tumorske stanice.<sup>17</sup> U ovom radu navedena su neka od najvažnijih svojstava ovog važnog enzima i njegova moguća primjena u sintezi lijekova protiv *H. pylori*, no još uvijek postoje neistraženi aspekti na tom putu te prostor za istraživanje.

### § 3. LITERATURNI IZVORI

1. Z. Štefanić, G. Mikleušević, M. Luić, A. Bzowska, I. Leščić Ašler, *Int J Biol Macromol* **101** (2017) 518–526.
2. C.M. den Hoed, E.J. Kuipers, *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease: Ninth Edition* **347** (2012) 437–441.
3. J. Pavelić, *Medix* (2014) 113–115.
4. M.I. Wojtyś, R. Jaźwiec, S. Kazazić, I.L. Ašler, P. Knežević, V.A. Sabo, M. Luić, E.K. Jagusztyn-Krynicka, A. Bzowska, *Appl Microbiol Biotechnol* (2021) 7949–7967.
5. <https://borneosurgery.com/2018/01/08/peptic-ulcer-disease/> (datum pristupa: 22. kolovoza 2002.)
6. Y.C. Lee, M.P. Dore, D.Y. Graham, *Annu Rev Med* **73** (2022) 183–195.
7. A. Sonnenberg, K.O. Turner, R.M. Genta, *American Journal of Gastroenterology* **115** (2020) 1145.
8. P. Roszczenko-Jasińska, M.I. Wojtyś, E.K. Jagusztyn-Krynicka, *Appl Microbiol Biotechnol* **104** (2020) 9891–9905.
9. M. Narczyk, M.I. Wojtyś, I. Leščić Ašler, B. Žinić, M. Luić, E.K. Jagusztyn-Krynicka, Z. Štefanić, A. Bzowska, *J Enzyme Inhib Med Chem* **37** (2022) 1083–1097.
10. A. Bzowska, E. Kulikowska, D. Shugar, *Pharmacol Ther* **88** (2000) 349–425.
11. ([https://www.researchgate.net/publication/11072840\\_Purine\\_Nucleoside\\_Phosphorylase\\_as\\_a\\_Cytosolic\\_Arsenate\\_Reductase](https://www.researchgate.net/publication/11072840_Purine_Nucleoside_Phosphorylase_as_a_Cytosolic_Arsenate_Reductase) (datum pristupa: 20. kolovoza 2022.)
12. A. Bzowska, E. Kulikowska, D. Shugar, *Pharmacol Ther* **88** (2000) 349–425.
13. G. Liechti, J.B. Goldberg, *J Bacteriol* **194** (2012) 839–854.
14. M. Narczyk, B. Bertosa, L. Papa, V. Vukovi, I.A. Lečić Ašler, B. Wielgus-Kutrowska, A. Bzowska, M. Luić, Z. Štefanić, *The FEBS Journal* **285** (2018) 1305–1325.
15. D. Grantor, (2022).
16. R. Gurbanov, S. Tunçer, *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* **22** (2018) 431–438.
17. C. Mao, W.J. Cook, M. Zhou, G.W. Kozalka, T.A. Krenitsky, S.E. Ealick, (n.d.) 1373–1383.