

# tRNA-ovisna ugradnja aminokiselina u komponente stanične stijenke i membrana

---

Tišma, Patrik

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:521617>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-26**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Patrik Tišma

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **tRNA-ovisna ugradnja aminokiselina u komponente stanične stijenke i membrana**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: prof.dr. sc. Ita Gruić Sovulj

Zagreb, 2023. godina



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

27.8.2023

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

22.9.2023

Mentor rada: dr. sc. Ita Gruić Sovulj, red. prof.      Potpis:



## Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD .....	1
1.1. Stanica.....	3
1.3. Aminoacil-tRNA-sintetaze .....	5
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME.....	6
2.1. Modifikacije komponenata bakterijske membrane .....	6
2.1.1. Fem transferaze.....	6
2.1.2. Aminokiselinske-fosfatidilglicerol sintaze .....	12
2.2. Modifikacije gljivične membrane .....	17
2.2.1. Ergosteril-aminokiselinske sintaze.....	17
2.2.2. Uloge ergosterola i aminoaciliranog ergosterola .....	17
§ 3. ZAKLJUČAK.....	22
§ 4. LITERATURNI IZVORI.....	XXIII



## § Sažetak

Mogućnost ugradnje aminokiselina u stanične membrane (pa i stanične stijenke) način je modificiranja lipida i sinteze peptidoglikana, krutog omotača odgovornog za zaštitu i održavanje strukturnog integriteta stanice. U ugradnji i prijenosu aminokiselina ključnu ulogu ima prijenosna RNA (tRNA). Svaka od 20 aminokiselina veže se na vlastitu tRNA, a enzimi koji kataliziraju cijeli proces nazivaju se aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS). Aminoacilacija tRNA je važan korak u procesu translacije ali produkt te reakcije, aminoacilirana tRNA, može poslužiti i kao supstrat enzima odgovornih za modificiranje lipida i sintezu peptidoglikana. Izmjene u sastavu staničnih membrana putem aminoacilirane tRNA donedavno je bilo ograničeno samo na prokariote, ali otkrićem enzima sličnih struktura pa shodno tome i funkcija, određene vrste gljiva pokazale su da i eukarioti posjeduju dosad neotkrivene atribute. Važnost saznanja o izmjenjivanju staničnih membrana bakterija i gljiva očituje se u potencijalnim antimikrobnim i antifungalnim agensima koji bi svoju primjenu mogli naći u liječenju raznih bolesti uzrokovanih patogenim vrstama. Ciljevi tih agensa su upravo određeni koraci u tRNA-ovisnoj ugradnji aminokiselina odnosno inhibicija enzima koji kataliziraju ključne reakcije.





## § 1. UVOD

### 1.1. Stanica

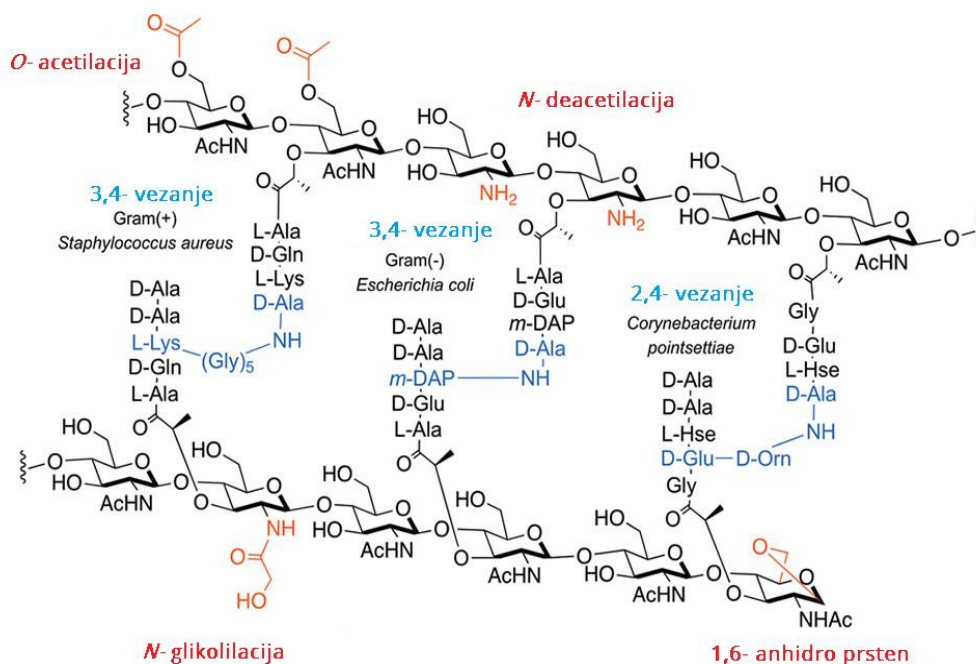
Prema staničnoj teoriji, stanica je osnovna gradivna i funkcionalna jedinica živog svijeta. Teorija također nalaže da stanice potječu od prethodno multipliciranih stanica, „*omnis cellula ex cellula*“ (lat. sve stanice su od stanica). Ovu je teoriju predložio njemački fiziolog i liječnik Theodor Schwann 1839. godine koja se kasnije proširila uz doprinose Matthiasa Schleidena i Rudolfa Virchowa.

Stanicu dijelimo na dva osnovna tipa: prokariotske i eukariotske stanice. Veličina prokariotskih stanica se kreće od promjera veličine od 0.1 do 5.0  $\mu\text{m}$  dok su eukariotske nešto veće (od 10 do 100  $\mu\text{m}$ ). Takva stanica je podijeljena u manje podjedinice, organele, koji se razlikuju na temelju funkcije koju obavljaju. Prokarioti, jednostanični organizmi, ovakvu organizaciju stanice ne posjeduju. Prokariotska stanica nema ni membranom odijeljene organele ni pravu jezgru. Sva genetska informacija sadržana je u nukleoidu, nepravilnoj strukturi nalik jezgri no bez jezgrine ovojnice.

Svaka stanica je okružena plazma membranom (PM) koja tvori selektivnu barijeru omogućavajući protok različitih tvari kroz stanicu. Stanična membrana posreduje u migraciji tvari unutar i izvan stanice ili organela. U eukariotskoj stanici, svaka podjedinica ima svoj vlastiti sastav lipida. Membrana je semipermeabilna te je protok tvari kroz nju reguliran nizom različitih proteinskih kanala i prenositelja. Ima ulogu u staničnoj signalizaciji i u oblikovanju citoskeleta stanice. Membrane su izrazito savitljive strukture te su sastavljene od karakterističnog fosfolipidnog dvosloja. Molekula fosfolipida sastoji se od hidrofobnog repa (nenabijeni ili nepolarni dio molekule) i hidrofilne glave (negativno nabijeni dio molekule) koja omogućuje interakciju ovog dijela fosfolipida sa vodom, kako na unutarstaničnoj tako i na izvanstaničnoj razini. Osim fosfolipidnog dvosloja, membranu čine i: kolesterol, raspoređen između fosfolipida kao regulator krutosti membrane, različite vrste proteina, integralni proteini koji se protežu kroz membranu i služe kao prijenosnici i periferni proteini koji su labavo pričvršćeni na vanjsku stranu membrane koji djeluju kao enzimi olakšavajući interakciju sa staničnom okolinom. Glikoproteini i glikolipidi, također prisutne komponente, posjeduju oligomere ugljikohidrata vezane na vanjski lipidni sloj i sudjeluju u međustaničnoj

signalizaciji. Bakterijske stanice osim dvoslojne lipidne membrane imaju i staničnu stijenku, čija je glavna komponenta peptidoglikan (PGN), također zvan i kao murein. PGN je heteropolimer ugljikohidrata koji tvori mrežasti sloj izvan plazma membrane. Glavna uloga peptidoglikana je očuvanje rigidnosti i integriteta stanice odolijevajući turgoru, unutarnjem tlaku stanice.<sup>1</sup>

PGN se sastoji od glikanskih lanaca umreženih peptidima. Glikansku okosnicu sačinjavaju alternirajuće jedinice *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) i *N*-acetilmuraminske kiseline (MurNAc) povezane  $\beta$ -1,4-glikozidnim vezama. Glikanski lanci nisu ravni, već slijede „cik-cak“ uzorak formirajući sloj sa šesterokutnim „teserama“ kao najmanjim porama.<sup>2</sup> Peptidi su povezani amidnom vezom na laktilnu skupinu MurNAc te njihova neobičnost leži u tome što uz L-aminokiseline posjeduju i biološki rijetke D-aminokiseline.<sup>3</sup>



**Slika 1.** Struktura i modifikacije peptidoglikana.

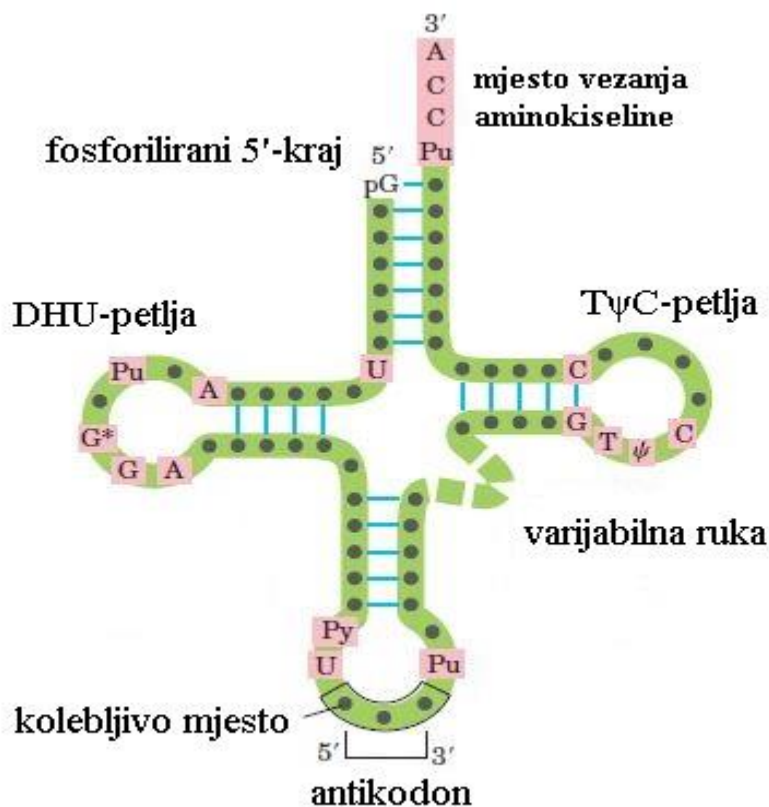
Plavo prikazuje različito vezanje peptidnog bočnog lanca a crveno označava izmjene ugljikohidratne okosnice u bakterijskom peptidoglikanu. (Prilagođeno prema referenci<sup>4</sup>).

Bakterije mogu imati jednu (monoderm) ili dvije (diderm) membrane. Monoderm posjeduje jednu jedinu plazma membranu dok diderm ima i vanjsku membranu (OM) koja dodatno ograđuje stanicu tvoreći periplazmatski prostor, multifunkcionalni odjeljak koji omogućuje raznolikije mehanizme oksidacije i smatanja proteina. Na temelju tih karakteristika razlikujemo podjelu bakterija na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. Bakterije s tanjim slojem peptidoglikana i s vanjskom membranom daju negativan rezultat na test zvan „Gram mrlja“ te su one Gram-negativne, ne zadržavaju plavo-ljubičastu boju i crvene su ili ružičaste boje.

Lipopolisaharidi (LPS) su glavne komponente vanjske membrane Gram-negativnih bakterija. LPS su kompleksne strukture koje se sastoje od tri različite komponente: i) O-antigena ili O-polisaharida, koji predstavlja najudaljeniji dio strukture, ii) polisaharidne srži i iii) lipida A, pomoću kojeg su LPS usidreni na vanjskoj membrani i strše van stanice u okolinu. Poznato je da LPS imaju različite funkcije u stanici poput: doprinosa ukupnom negativnom naboju stanice, stabilizacije vanjske membrane i zaštite od određenih supstanci fizički blokirajući njihov ulaz u stanicu. LPS su podložni raznim modifikacijama što ih čini zanimljivim za daljnja istraživanja.

## 1.2. Struktura i uloga tRNA

Prijenosna RNA (tRNA) je RNA koja se sastoji od 70 do 90 nukleotida. Njezina zadaća je dovesti aminokiselinu do mjesta sinteze proteina i omogućiti ugradnju na određeno mjesto u proteinu, diktirano kodonima na mRNA. Vodikova veza između komplementarni baza dovodi do smatanja tRNA, stvarajući petlje i dvolančane dijelove.



**Slika 2.** Opća sekundarna struktura molekula tRNA. (Prilagođeno prema referenci<sup>5</sup>).

3D prikaz tRNA obično je L-oblika dok 2D prikaz podsjeća na djetelinu. Sekundarna struktura tRNA uključuje: DHU petlju, T $\psi$ C petlju, antikodonsku petljupetlju antikodona i varijabilnu ruku koja predstavlja blago ispupčenje između T $\psi$ C petlje i petlje antikodonaantikodonske petlje.

Na 3' kraju tRNA dolazi do vezanja specifične aminokiseline sa slobodnom 2' ili 3'-OH skupinom adenzinskog nukleotida. Reakcija se odvija uz utrošak energije ATP-a te pomoću enzima aminoacil-tRNA-sintetaze. Postoje različite aminoacil-tRNA-sintetaze za svaku tRNA. Na antikodonskoj petlji, nalazi se antikodon (slijed od 3 nukleotida) čija je uloga prepoznavanje njemu komplementarnog slijeda glasničke RNA (mRNA). Prepoznavanje između slijedova nukleotida je od iznimne važnosti za proces translacije i shodno tome, biosinteze proteina u ribosomu.

DHU petlja i T $\psi$ C petlja doprinose važnim interakcijama za smatanje i ostvarivanje trodimenzionalne strukture tRNA što igra ulogu u njenoj specifičnosti. T $\psi$ C petlja stupa u

interakciju i s velikom podjedinicom rRNA.<sup>5</sup> 3'-kraj tRNA uvijek ima adenzin (A) nakon kojeg slijede dva citozina (C), tzv. CCA slijed.

### 1.3. Aminoacil-tRNA-sintetaze

Svaka od 20 aminokiselina kovalentno se veže na specifičnu tRNA uz utrošak ATP-a, koristeći aktivirajuće enzime ovisne o  $Mg^{2+}$  poznate kao aminoacil-tRNA sintetaze (aaRS). Kada su tRNA vezane na odgovarajuću aminokiselinu (aminoacilirana tRNA), za njih se kaže da su „nabijene“.

Rezultat prethodno spomenutog vezanja, aminoacil-tRNA (aa-tRNA), isporučuje se uz pomoć elongacijskog faktora do ribosoma kako bi sudjelovala u sintezi proteina. AaRS ispunjavaju dvije iznimno važne uloge u translaciji: osiguravaju gradivne elemente za sintezu proteina te su to također jedini sposobni enzimi za implementaciju genetskog koda. Osim svoje ključne uloge u translaciji, aaRS se također pokazuju neizostavnima u velikom broju staničnih procesa, s dubokim posljedicama na homeostazu organizma. Reakcija aminoacilacije se odvija u dva koraka. Prvi korak je aktivacija aminokiseline. Koristeći molekulu ATP-a, aaRS aktivira aminokiselinu i tvori aaRS-aminoacil-adenilatni kompleks, oslobađajući anorganski pirofosfat kao nusprodukt. U drugom koraku dolazi do prijenosa. Aminoacilni dio se prenosi ili na 2'- ili 3'-hidroksilnu skupinu terminalnog adenina akceptorskog kraja tRNA stvarajući aminoacil-estersku vezu. AaRS se mogu podijeliti u dva međusobno isključiva razreda, I i II, na temelju njihove strukturalne, funkcionalne i evolucijske povezanosti.

AaRS pokazuju širok spektar prilagodbi te su kod mnogih bakterija prisutne nediskriminirajuće aaRS koje nadoknađuju manjak onih koje nisu prisutne (npr. AsnRS i/ili GlnRS).

## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. Modifikacije komponenata bakterijske membrane

Bakterije se ne mogu izolirati od okoline i na sve fluktuacije reagiraju promjenom vlastitih fizioloških funkcija. Membrana je mjesto primarnog kontakta stanice s okolinom. Odražava prirodu unutarstaničnih komponenti i uvjeta izvan stanice. Neki od čimbenika koji potiču prilagodbu biokemijskih svojstava komponenata membrane su: temperatura, tlak, pH, enzimске aktivnosti, nutrijenti ili toksične tvari. Glavni motiv ovih prilagodbi je održavanje fluidnosti membrane. Ovakve izmjene unutar citoplazmatske membrane posebno nastaju zbog promjena u sastavu masnih kiselina lipida što se odražava i na interakcije s membranskim proteinima. Fleksibilnost i sposobnost prilagodbe uvelike određuju mogućnost preživljavanja bakterija.<sup>7</sup>

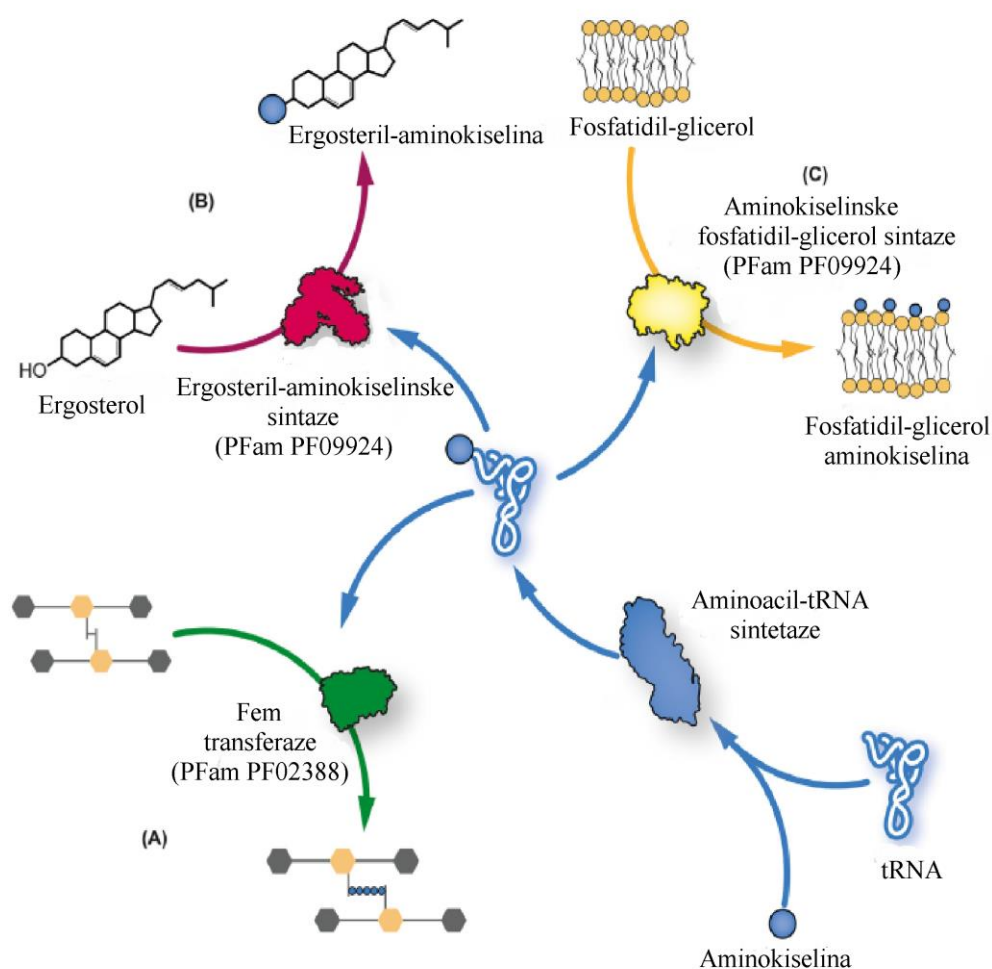
Enzimi FemABX su odgovorni za preuređivanje bakterijskog peptidoglikana. Fem transferaze koriste aa-tRNA za stvaranje peptidnih mostova koji povezuju niti peptidoglikana. Ti se mostovi razlikuju među vrstama bakterija u kojima su prisutni i igraju ulogu u otpornosti na antibiotike koji ciljaju staničnu stijenku. Stvaranje skraćenih peptida rezultira kraćim peptidnim mostovima i gubitkom razgranatih veza što čini bakterije osjetljivijima na antimikrobne agense.

ErxS enzimi, pronađeni isključivo u gljivama i zasad jedini s ovakvom ulogom u eukariota, vežu aspartat ili glicin na ergosterol. Ovaj sterol se nalazi u staničnoj membrani gljiva te oponaša mnoge funkcije koje obavlja i kolesterol u životinjskim stanicama. Pomaže u održavanju strukture, funkcije, fluidnosti i propusnosti stanične membrane.

Aminokiselinske fosfatidil-glicerol-sintaze (aaPGS) modificiraju naboj fosfolipida prenoseći aminokiseline na fosfolipide ili diacil-glicerol. To su veliki integralni membranski proteini koji kataliziraju modifikaciju negativno nabijenog lipida fosfatidilglicerola (PG) s L-lizinom čime se neutralizira površina membrane i pruža otpornost na CAMP (*eng.* cationic antimicrobial peptides). Produkt reakcije je lizil-fosfatidilglicerol (Lys-PG), do kojeg se dolazi neuobičajenim putem koji koristi PG i Lys-Trna<sup>Lys</sup> kao supstrate molekule. Modifikacija PG, komponente lipidnog dvosloja, vezanjem lizina u obliku lizilfosfatidilglicerola (LysPG) prvi je put otkrivena u bakteriji *Staphylococcus aureus*. Enzim odgovoran za ovu reakciju nazvan je

faktor višestruke peptidne rezistencije (*eng.* Multiple peptide resistance Factors, MprF) zbog opažanja da poremećaji gena *mprF* povećavaju osjetljivost *S. aureus* na antimikrobne agense.<sup>8</sup>

Navedene skupine enzima (FemAB, ErxS i MprF) koriste aa-tRNA sintetiziranu pomoću srodne aaRS kao supstrat i prenose određenu aminokiselinu na velik broj akceptorskih supstrata, tj. lipidnih supstrata.

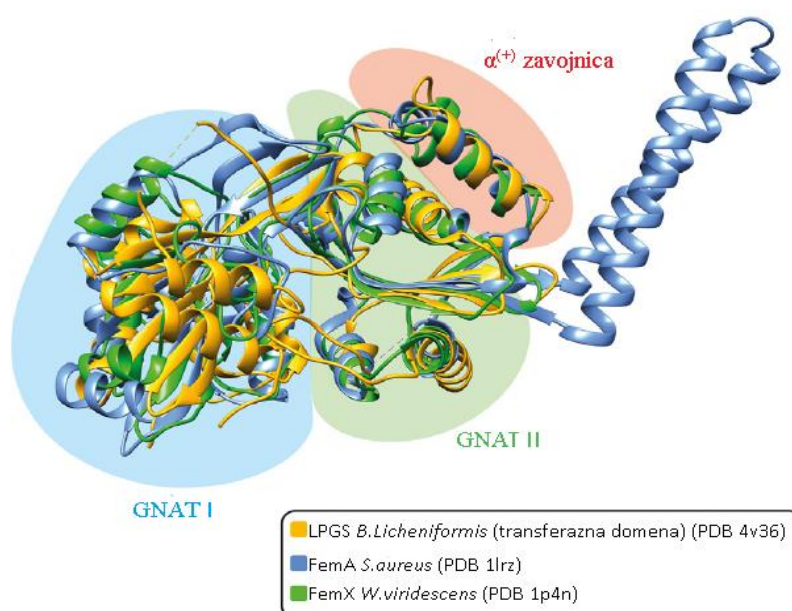


**Slika 3.** Prikaz glavnih obitelji aminoacil-tRNA transferaza (ATT): A) Fem transferaze. B) ErxS transferaze. C) Transferaze tipa MprF. (Prilagođeno prema referenci<sup>9</sup>).

Aminoacil-tRNA-transferaze (ATT) su klasa enzima koji se nalaze u citoplazmi bakterija i sisavaca te kataliziraju konjugaciju lipida prijenosom određenih aminokiselina koristeći aa-tRNA kao supstrat. Iznimno, FemABX enzimi prenose aminokiseline sa aa-tRNA na rastući lanac peptida PGN podjedinica. Širok raspon bakterija posjeduje faktore virulencije



te kao primjer mogu poslužiti upravo ATT, sposobne za preusmjerenje aa-tRNA iz uobičajenog puta sinteze proteina prema konjugaciji aminokiselina na glicerolipide.<sup>10</sup> Sve ATT dijele zajedničku strukturnu domenu koja se naziva GNAT domenom (*eng. General control non-repressible 5-related N-acetyltransferases*) čija je funkcija prijenos acilnog ostatka s acilkoenzima A (acil-CoA) na velik broj različitih supstrata.<sup>11</sup> Dva GNAT modula su razdvojena pomoću male, pozitivno nabijene alfa zavojnice. Združena struktura dvaju modula i zavojnice naziva se GNAT $\alpha^{(+)}$ . Prema Slici 3. naglašena je podjela glavnih obitelji ATT tipa enzima te iako dijele isti dvostruki GNAT $\alpha^{(+)}$ , ne posjeduju značajne sličnosti u sljedovima što nije neuobičajeno za proteine koji posjeduju GNAT domenu.



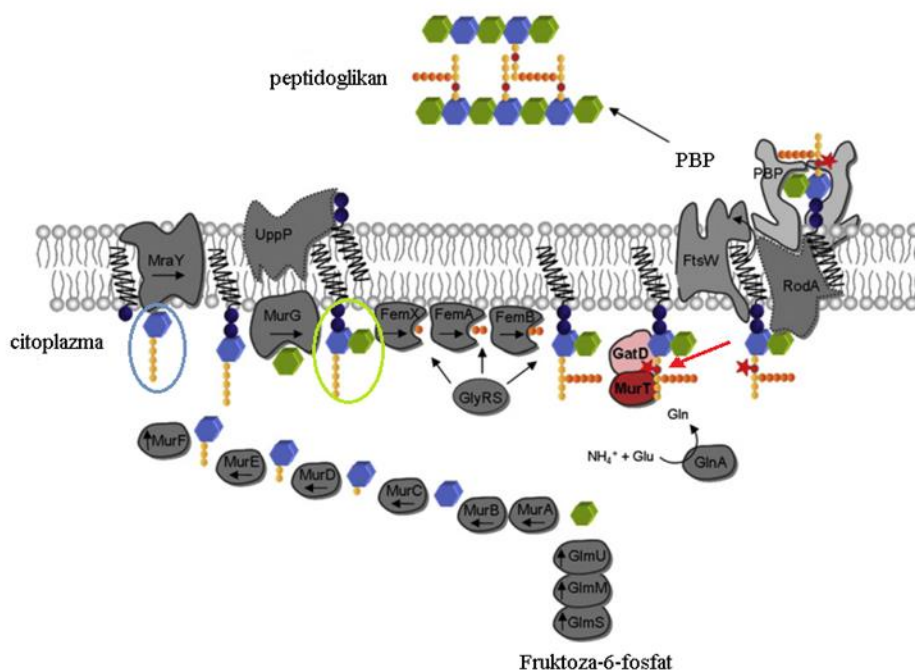
**Slika 4.** Usporedba trodimenzionalnih struktura triju različitih aminoacil-tRNA-transferaza.

Struktura GNAT II i  $\alpha^{(+)}$  je velikim dijelom slična što se očituje u zajedničkom supstratu kojeg te domene dijele. Shodno tome, strukturne različitosti domene GNAT I se odražavaju u prepoznavanju i odabiru drugačijih supstrata. (Prilagođeno prema referenci<sup>9</sup>).

### 2.1.1. Fem transferaze

Klinički relevantne bakterije, uključujući *S. aureus* otpornu na meticilin ( $\beta$ -laktamski antibiotik uskog spektra iz klase penicilina) postale su predmet intenzivnog istraživanja u svrhu otkrivanja novih inhibitornih agensa koji bi služili kao antibakterijski lijekovi. Otpornost bakterije *S. aureus* na meticilin i druge  $\beta$ -laktame razvila se stjecanjem gena za penicilin vezajući protein, PBP2' (ili PBP2a), koji funkcioniра u prisutnosti  $\beta$ -laktama.

U nizu genetskih istraživanja, identificirano je nekoliko drugih gena sličnih karakteristika koji utječu na rezistenciju na meticilin. Ti geni odnosno faktori poznati su i kao *fem* (faktori bitni za otpornost na meticilin) ili *aux* (sporedni) geni te se pokazalo da su izravno uključeni u biosintezu stanične stijenke ili sintezu povezanih faktora. Tri takva *fem* gena (FemX, FemB i FemA) igraju ključnu ulogu u kasnijim fazama biosinteze peptidoglikana specifične za *Staphylococci* i mogu poslužiti kao prikladne mete antibakterijskih agensa.<sup>12</sup>

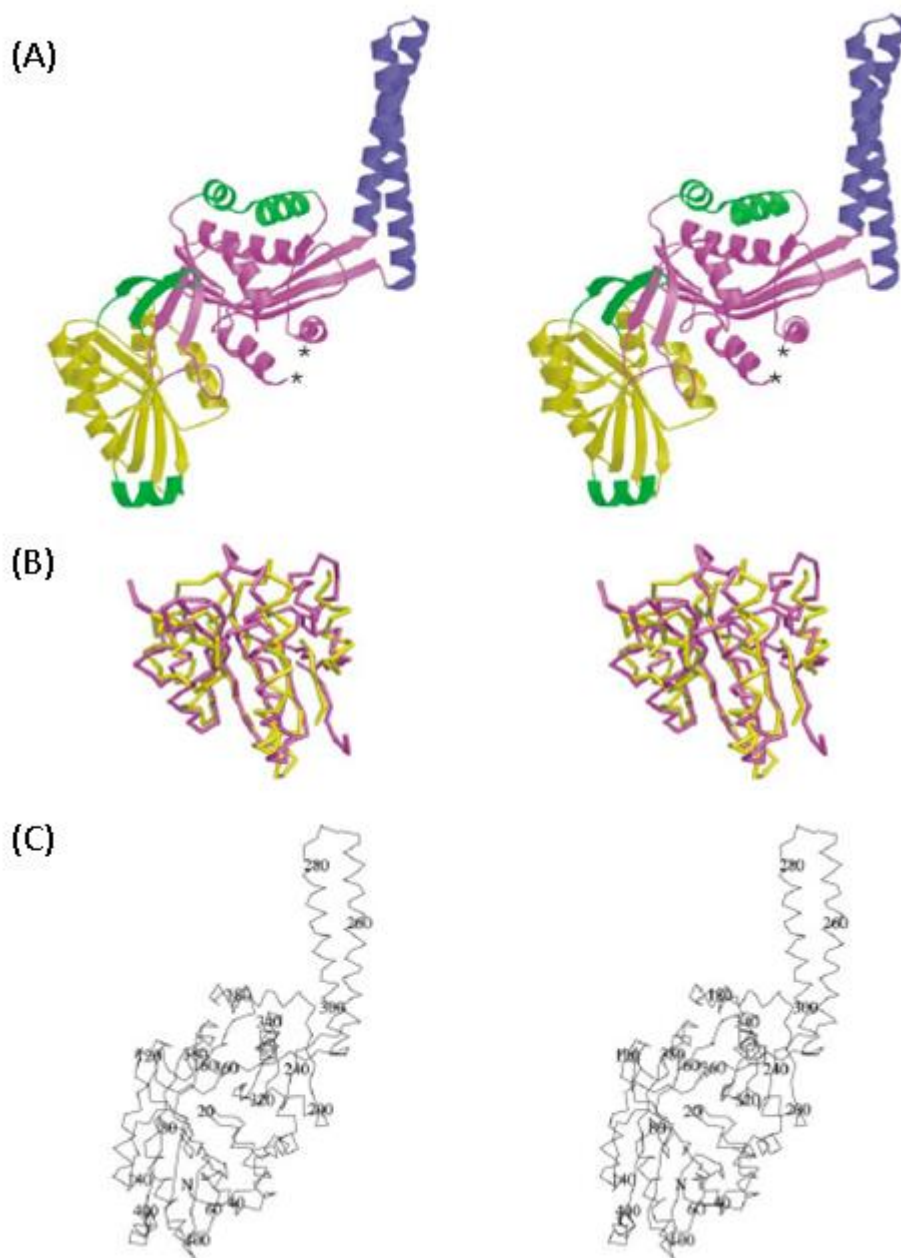


**Slika 5.** Prikaz biosinteze stanične stijenke karakteristične za gram-pozitivnu bakteriju *S. aureus*. (Prilagođeno prema referenci<sup>16</sup>).

Sinteza započinje u citoplazmi pretvorbom UDP-N-acetil-glukoamina (UDP-GlcNAc) u konačni topivi prekursor UDP-MurNAc-pentapeptid (na slici označeno plavo). Reakciju kataliziraju enzimi MurA-MurF. Fosfo-N-acetilmuramoil-pentapeptid-transferaza (MurA) prenosi novonastali lipid I na lipidni nosač undekaprenilfosfat. MurG translokaza veže UDP-GlcNAc na muramoilni dio lipida I te tako nastaje lipid II (na slici označeno zeleno).

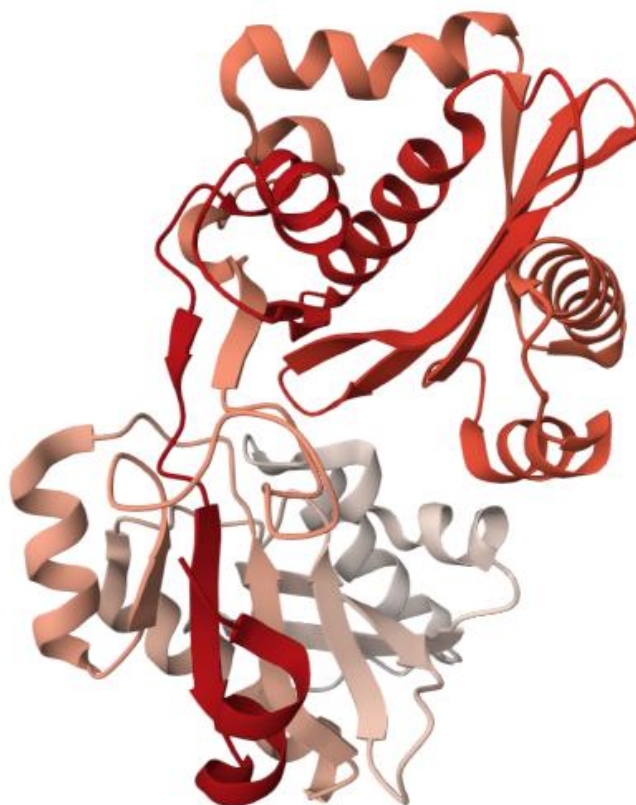
Biokemijskom karakterizacijom ustanovljeno je da FemX djeluje prvi, koristeći Gly-tRNA<sup>Gly</sup> da prenese Gly na svoj jedini supstrat, lipid II (na ε-amino skupinu Lys3 ostatka izvornog peptida, žuti lanac). Lipid II-Gly služi kao supstrat za FemA koji uzastopno koristi 2 Gly-tRNA<sup>Gly</sup> kako bi produžio izmjenjeni lipid za još 2 Gly ostatka. U konačnici, supstrat za FemB je lipid II-Gly<sub>3</sub> te FemB dodaje posljednja 2 glicina na isti način kao FemX i FemA u prethodna dva koraka i terminira sintezu međupeptidnog mosta.<sup>15</sup> Glutamat na drugoj poziciji (na slici označeno crvenom strelicom) se amidira do glutamina enzimskim kompleksom MurT/GatD. Lipid II se zatim translocira s unutrašnje na vanjsku stranu membrane zasada još nepoznatim mehanizmom i ugrađuje se u rastuću mrežu peptidoglikana transglikozilacijom i transpeptidacijom penicilin-vezujućeg proteina (eng. Penicilin-binding protein). Obustava biosinteze peptidoglikana je jedna od važnijih meta djelovanja antibiotika te inhibicija enzima koji kataliziraju tu reakciju (FemABX-peptidil-transferaze) u većini slučajeva ima baktericidni učinak.

Struktura FemA (*S. aureus*) riješena je 2002. godine te poput domena aa-PGS-sintaze posjeduje dvostruki GNAT. Dodatno, u GNAT II poddomeni, FemA posjeduje dodatan spiralni krak (Slika 4.) koji je odsutan u aaPGS-sintazi, a ima određenu ulogu u vezanju Gly-tRNA<sup>Gly</sup>. Struktura FemB nije opisana niti riješena a između 2003. i 2004. godine struktura FemX je opisana iz *W. viridescens*.<sup>9</sup> Genetskom analizom ustanovljeno je da su FemX i FemA esencijalni za preživljavanje *S. aureus* dok se FemB nije pokazao takvim.



**Slika 6.** Pregled trodimenzionalne strukture *S. aureus* FemA.

(A) Dva asteriksa označavaju položaj neuređene petlje između ostataka 209 i 220. Domena 1A (žuto), domena 1B (crvenoljubičasto i zeleno), domena 2 (plavo). (B) Superpozicija domena 1A i 1B. (C) Okosnica *S. aureus* FemA sa ostacima numeriranim svakih 20 aminokiselina.<sup>12</sup>



**Slika 7.** Pregled trodimenzionalne strukture *W. viridescens* FemX.

Enzim FemX veličine je 38 kDa te je sastavljen od dvije domene odvojene rascjepom. FemX je 36% homologan i 23% identičan FemA enzimu.<sup>14</sup>

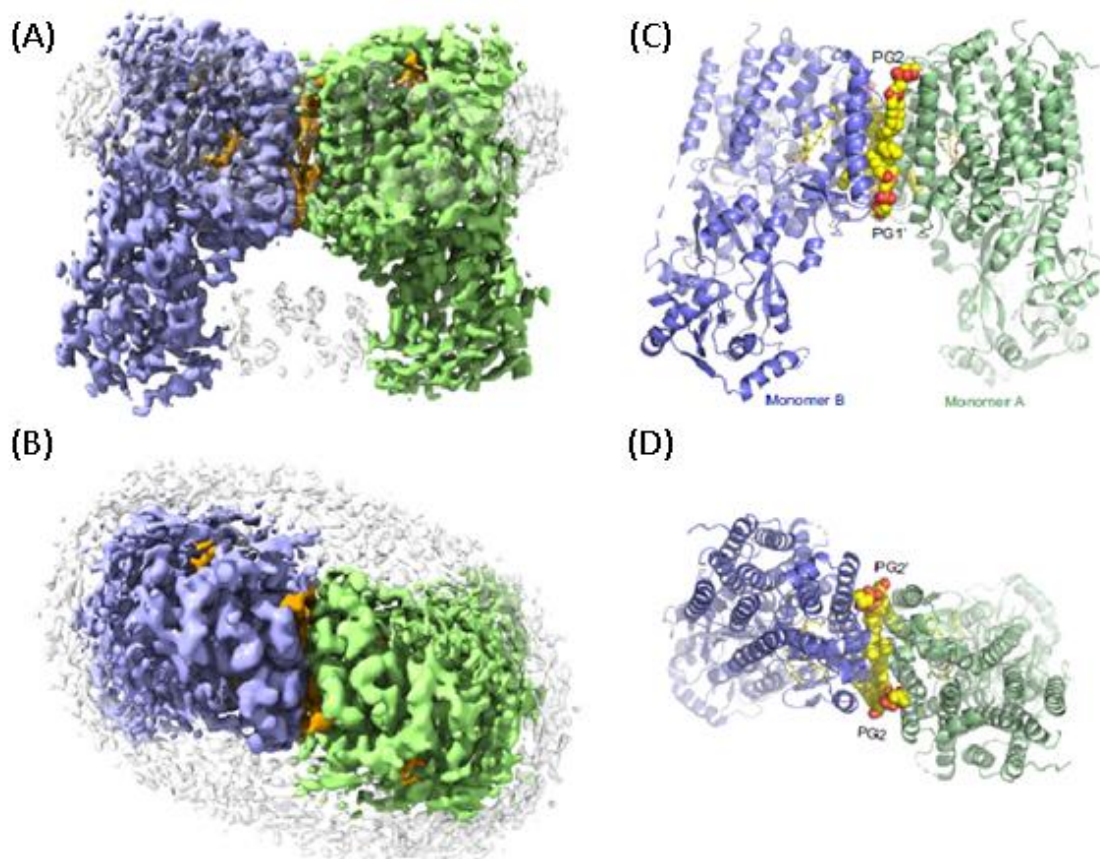
### 2.1.2. Aminokiselinske fosfatidil-glicerol sintaze

Adicija aminokiselina fosfatidilglicerolu (PG) bakterijske membrane je jedan od mehanizama kojim bakterije smanjuju ukupni negativni naboj stanične ovojnice. Time se afinitet ovojnice prema nekim antimikrobnim agensima poput CAMP smanjuje. CAMP posjeduju antimikrobna svojstva i pokazuju visok afinitet za negativno nabijene komponente bakterijske stanične stijenke. Ovaj proces zahtijeva posredovanje integralnog proteina, aminokiselinske fosfatidil-glicerol-sintaze (aaPGS), kako bi se ostvario prijenos aminokiseline s aa-tRNA na PG smješten u membrani.<sup>17</sup> Kondenzacijom dvije molekule PG formira se di-PG, poznat i kao kardiolipin (CL). Molekule PG i CL imaju negativan naboj koji potječe od fosfatne skupine polarne glave (PG (-1) i CL (-2)). Aminoacilacija PG i CL s L-lizinom (dvije amino

skupine) ili L-alaninom (jedna amino skupina) tako stvara kationske ili neutralne zwitterionske molekule (LysPG (+1), AlaPG (0), LysCL (0)). Ove izmjene mijenjaju površinska svojstva membrane i smanjuju njenu propusnost i afinitet za CAMP. Modificirani PG/CL pružaju stanici niz promjena koje mogu utjecati na opća svojstva membrane kao što su površinski naboj, fluidnost i morfologija.

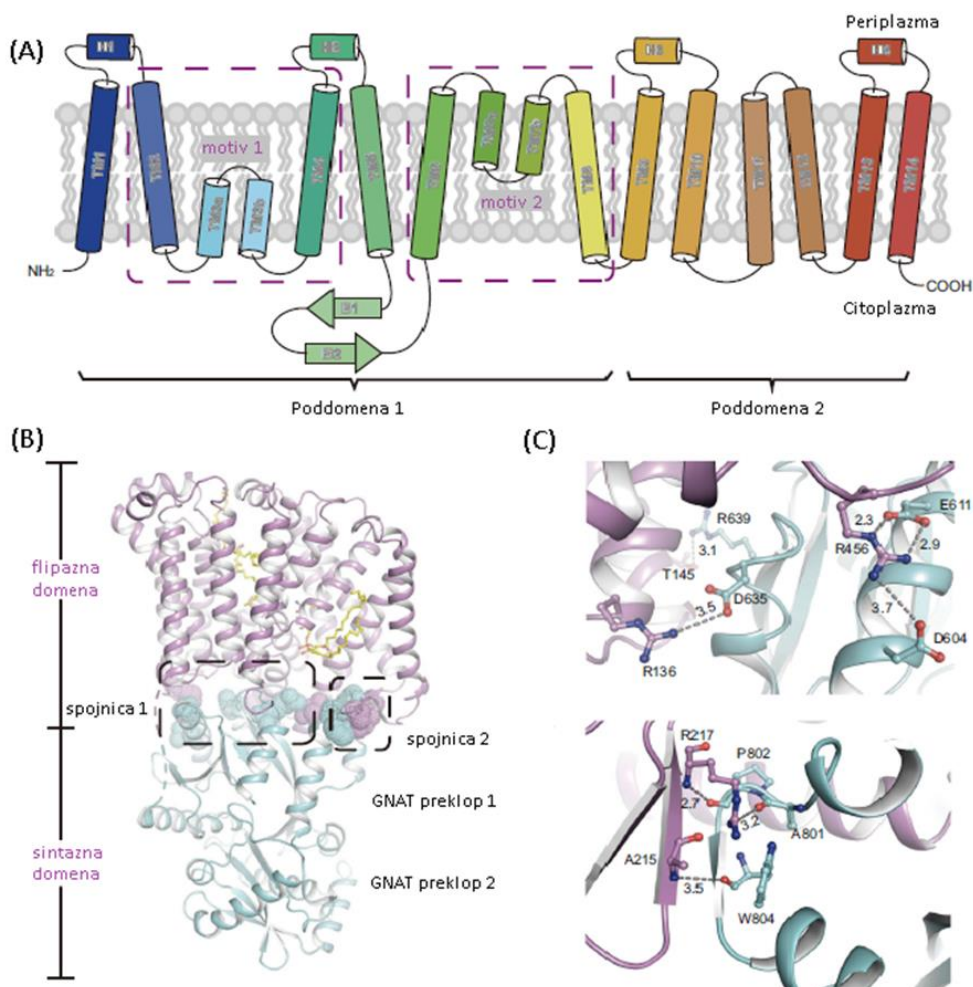
Aminokiselinske-fosfatidilglicerol-sintaze (aaPGS) ili MprF su integralni membranski proteini odgovorni za sintezu aminoacil-fosfatidilglicerola (aa-PG) na citoplazmatskoj strani membrana bakterija. Hidrofilna domena aaPGS, smještena u citoplazmi, nosi aktivno mjesto transferazne aktivnosti i koristi aa-tRNA kao donor aminokiseline i fosfatidilglicerol kao akceptor aminokiseline. Prvobitno otkriven u bakteriji *S. aureus*, gen *mprF* kodira LysPGS, koji povezuje lizin s PG, povećavajući virulentnost organizma i otpornost na različite klase antibakterijskih agensa. Do danas je okarakterizirana ili izravno *in vitro* ili analizom aminoaciliranih lipida proizvedenih *in vivo* specifičnost ukupno 23 aaPGS-a. Trenutno su Lys-tRNA<sup>Lys</sup>, Ala-tRNA<sup>Ala</sup> i Arg-tRNA<sup>Arg</sup> jedini poznati donori aminokiselina za sintezu aa-PG, dok je PG jedini poznati akceptor uz iznimku di-fosfatidilglicerola (tj. kardiolipina), koji također djeluje kao akceptor (pored PG) kod bakterije *L. monocytogenes*. AaPGS obitelj proteina ovisnih o tRNA transferazama pokazuje različite specifičnosti prema supstratima poveznica između strukture i funkcije homologa aaPGS nije ustanovljena. Funkciju pojedinačnih enzima nije moguće predvidjeti isključivo na temelju primarnog slijeda.<sup>18</sup>

Struktura MprF je riješena 2021. godine. Ekspimirana u *E. coli*, LysPGS iz bakterije *Rhizobium tropici* poprima strukturu homodimera unutar PM uglavnom kroz interakcije membranskih domena. Krio-elektronskom mikroskopijom (cryo-EM) dobivene su strukture MprF iz *R. Tropici* (RtMprF) u dvama različitim stanjima, otkrivajući važne atribute povezane s prepoznavanjem i translokacijom LysPGS te antibiotskom rezistencijom.<sup>19</sup>



**Slika 8.** Prikaz Cryo-EM gustoće dimera RtMprF ugrađenog u nanodisk duž smjera membrane (A) i okomito na membranu (B). Dva susjedna monomera RtMprF dimera su prikazani svijetlo zelenom i svijetlo plavom bojom, lipidne molekule su prikazane žutom bojom a okviri nanodiska, neprotumačene i lipidne gustoće susjednog dimera RtMprF su prikazane sivom bojom. Slikoviti model RtMprF dimera duž smjera membrane (C) i okomito na membranu (D). (Preuzeto prema referenci<sup>19</sup>).

Svaki monomer RtMprF se sastoji od flipazne domene utkane u membranu pomoću 12 dugačkih transmembranskih zavojnica i dva para kraćih  $\alpha$ -zavojnica koje se polovično pružaju kroz membranu. Domena flipaze na citoplazmatskoj strani uglavnom nosi pozitivan elektrostatski potencijal, dok ona na periplazmatskoj strani nosi negativan. Sučelje flipazne i sintazne domene može se podijeliti u dvije poddomene, poddomenu 1 i 2.



**Slika 9.** Prikaz topologije flipazne domene RtMprF proteina (A). Isprekidani ljubičasti okviri označavaju dva motiva (1 i 2) u poddomeni 1 s obrnutom topologijom. Dva veća kontaktna mjesta (spojnice 1 i 2) između flipazne i sintazne domene RtMprF obilježena su crnim isprekidanim okvirima (B). Specifične interakcije aminokiselinskih ostataka susjednih domena (C). Označeni brojevi u blizini crtica su udaljenosti (Å) između dvije susjedne grupe. (Preuzeto i prilagođeno prema referenci<sup>19</sup>).

Neke aaPGS imaju širu specifičnost odnosno nisu fiksirane na jedan supstrat. Na primjer, aaPGS iz *Pseudomonas aeruginosa* i *S. aureus* sintetizira samo LysPG odnosno AlaPG, dok MprF2 iz bakterije *Enterococcus faecalis*, koristeći 3 različite aa-tRNA, sintetizira AlaPG i LysPG zajedno s malim količinama ArgPG. Izuzeci supstratne specifičnosti pojavljuju se i kod akceptora aminokiselina. Za primjer se uzima aaPGS iz bakterije *Listeria monocytogenes* koja sintetizira i LysPG i LysCL. LysPGS iz *Clostridium perfringens* i *S.*



*aureus* može translocirati i AlaPG i LysPG što ukazuje na smanjenu specifičnost i flipazne domene.<sup>20,21</sup>

Poliformizmi jednog nukleotida (*eng.* Small nucleotide polymorphisms, SNP) kod MprF igraju važnu ulogu u mehanizmima otpornosti no njihov utjecaj je, donedavno, bio nejasan zbog različitih izvješća o fenotipovima povezanih s otpornošću. Strukturna otkrića MprF i nova saznanja o izogenim mutantima dovela su do modela otpornosti na daptomicin posredovanim MprF-om. Daptomicin postaje sve relevantniji antibiotik koji se koristi kod liječenja infekcija uzrokovanih bakterijom *S. aureus* koja je otporna na meticilin (*eng.* Methicillin-Resistant *S. aureus*, MRSA). To je antimikrobni peptid te dijeli mnoga svojstva s CAMP-ovima. Kako bi se daptomicin vezao za bakterijske membrane, potrebni su mu  $\text{Ca}^{2+}$  ioni. Oni jačaju interakciju između peptida i membranskog dvosloja te su svojevrsni okidač za određene strukturne promjene. Uloga MprF u virulenciji *S. aureus* dobro je utvrđena. MprF daje otpornost širokog spektra na peptide iz porodice CAMP koju čine obrambeni peptidi koje proizvodi ljudski domaćin i bakteriocini koje proizvode konkurentni mikroorganizmi, čime je omogućeno da *S. aureus* kolonizira i zarazi ljudskog domaćina. Dodatna funkcija MprF se postiže transmembranskom domenom. LysPG se prebacuje s unutarnje na vanjsku stranu citoplazmatske membrane. Ovaj proces je bitan za elektrostatsko odbijanje CAMP i za pružanje minimalne zaštite od daptomicina bez postizanja određenog stupnja rezistencije na terapiju daptomicinom.<sup>22</sup>

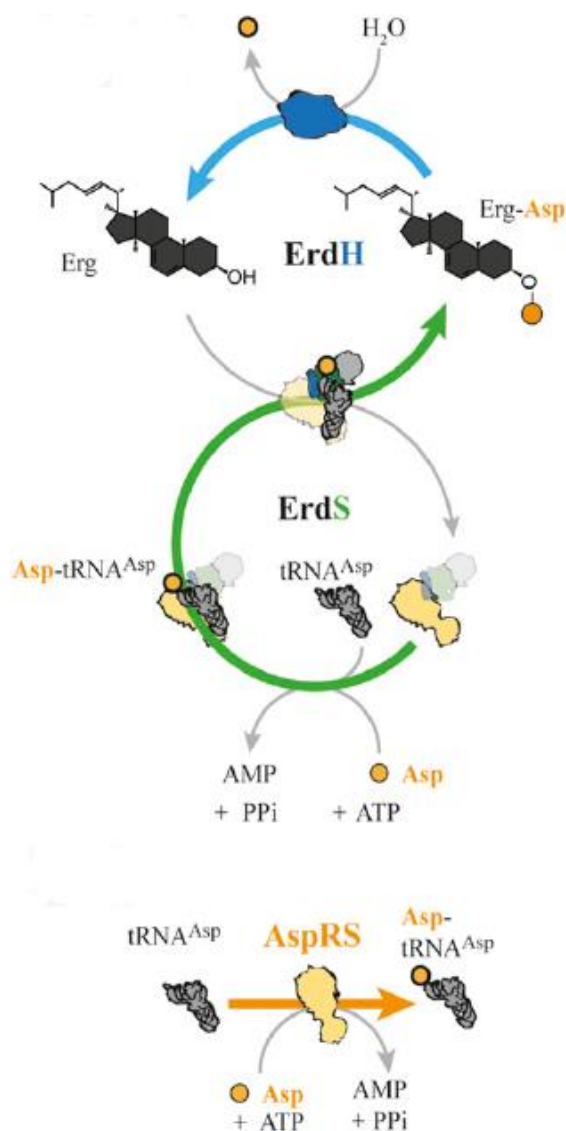
Antimikrobni peptidi (AMP) dio su urođenog imuniteta i predstavljaju prvu liniju obrane od patogenih mikroorganizama. Dugi su od 20 do 40 aminokiselinskih ostataka i posjeduju amfipatsku sekundarnu strukturu što omogućuje interakciju i permeabilizaciju bakterijskih membrana. Biofizična istraživanja pokazala su da su modelne membrane koje se sastoje od anionskih lipida poput PG posebno osjetljive na AMP. S druge strane membrane eukariotskog zwitterionskog fosfolipida lecitina su otporne na AMP. Već spominjani patogen *S. aureus* je posebno zahtjevan za tretiranje sa AMP-ovima, posebno zbog djelomično modificiranog PG dodatkom L-lizinskog ostatka što rezultira s LysPG. Promjena naboja iz -1 u +1 poremećuje inicijalne elektrostatske interakcije peptida s bakterijskom membranom. Sojevi *S. aureus* s mutacijama u *mprF* genu pokazuju veću osjetljivost na AMP-ove poput: protegrina, tahiplesina, katelicidina itd.<sup>23</sup> Lizinilacija PG je postignuta posredovanjem MprF te se opet može vidjeti

koliki utjecaj ima ovaj membranski protein te koliko inhibicija istog oslabljuje proces patogeneze.

## 2.2. Modifikacije gljivične membrane

### 2.2.1. Ergosteril-aminokiselinske sintaze

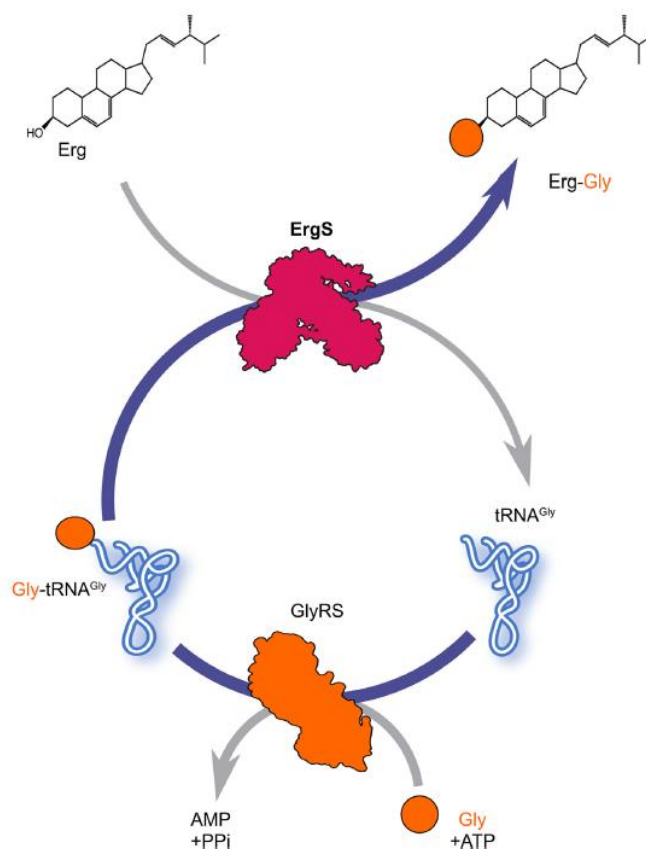
Dodavanjem aminokiselina na glicerolipide preko tRNA, bakterije mijenjaju svojstva stanične površine i dobivaju na patogenosti, virulentnosti te otpornosti na antimikrobne lijekove. Do 2020. godine, ekvivalentnih aminoaciliranih lipida nije bilo pronađeno u sklopu istraživanja eukariotskih vrsta. To je dalo naslutiti da je tRNA-ovisno nadograđivanje lipida stanične membrane proces ograničen na prokariote. Otkrićem ergosteril-3 $\beta$ -O-L-aspartata (Erg-Asp), konjugiranog sterola nastalog tRNA-ovisnom adicijom aspartata na 3 $\beta$ -OH skupinu ergosterola (najzastupljenijeg sterola u staničnim membranama gljiva), ta se činjenica mijenja. Za sintezu Erg-Asp odgovoran je bifunkcionalan enzim ergosteril-3 $\beta$ -O-L-aspartat-sintaza (ErdS). Enzim se sastoji od AspRS paraloga na N-kraju i DUF2156 (*eng.* Domain of Unknown Function 2156) na C-kraju koja prenosi aspartat sa Asp-tRNA<sup>Asp</sup>. Strukturna predviđanja i analiza sljedova pokazala su da transferazna domena ErdS posjeduje istu dvostruku GNAT  $\alpha$ (+) topologiju kao Fem transferaze i aaPGS. Također je dokazano postojanje Erg-Asp  $\alpha/\beta$  hidrolaze (ErdH) kod brojnih gljiva. Ovaj enzim katalizira uklanjanje Asp s konjugiranog sterola. Ekstracitoplazmatske hidrolaze ovakvog tipa deaciliraju aminoacilirani glicerolipid (aaGL), i njihovo postojanje je dokazano i u gram-pozitivnim i u gram-negativnim bakterijama.<sup>10</sup> Ergosteril-aspartat sintaza koristi dva supstrata; Asp i tRNA te preko svoje sintetazne domene sintetizira Asp-tRNA.



**Slika 10.** Shematski model koji prikazuje obrt između sinteze i hidrolize Erg-Asp. Zelena strelica prikazuje aktivnost ErdS (sinteza Asp-tRNA<sup>Asp</sup> i dodatak Asp na Erg). Plava strelica ukazuje na ErdH-ovisnu hidrolizu Erg-Asp. Sve gljive koje sadrže ErdS uvijek posjeduju kanonsku AspRS kako bi se osigurala tvorba Asp-tRNA<sup>Asp</sup> za sintezu proteina. (Prema referenci<sup>24</sup>).

Asp se prenosi na ergosterol na sličan način kao i Gly, putem sličnih no ne istih enzima. Jedina razlika je dodatan proces hidrolize, odsutan kod prijenosa Gly, koju katalizira ErdH što bi mogao biti način regulacije u količini Erg-Asp. Treba napomenuti da određen broj Ascomycota posjeduje ErdS i ErgS, sintetizirajući na taj način i Erg-Asp i Erg-Gly. Ova dva enzima predstavljaju novu klasu aa-tRNA-transferaza koje koriste lipide kao supstrate specifične za gljive odnosno ergosteril-3 $\beta$ -O-aminokiselinske sintaze (ErxS, a 'x' označava bilo koju aminokiselinu).

Drugi tip enzima nalik aaPGS, nazvan ErgS, opisan je 2022. godine. Odgovara samostalnoj DUF2156 domeni, povezanoj s bakterijskim aaPGSs. Rasprostranjenost ErgS-a je manja nego u slučaju ErdS te je ograničena na najveće koljeno u carstvu gljiva, Ascomycota, dok je ErdS prisutan i kod Ascomycota i Basidiomycota. ErgS mora odvojiti Gly-tRNA<sup>Gly</sup> od citoplazmatskog prostora prije prenošenja Gly na 3 $\beta$ -OH skupinu ergosterola, dajući Erg-Gly.<sup>24</sup>



**Slika 11.** Prikaz prijenosa Gly na 3 $\beta$ -OH skupinu ergosterola i tvorbe esterskog produkta, glicil-ergosterola. (Prema referenci<sup>9</sup>).

### 2.2.2. Uloge ergosterola i aminoaciliranog ergosterola

Steroli su nužne komponente eukariotske stanične membrane koje održavaju strukturalni integritet, fluidnost i propusnost membrane. Funkcije im se pružaju od regulacije aktivnosti enzima vezanih za membranu, stvaranja lipidnih splavi pa do transporta određenih tvari. Biljni steroli se nazivaju fitosteroli od kojih su najistaknutiji stigmasterol, sitosterol i kampesterol. Najvažniji sterol u životinja pa tako i ljudi je kolesterol koji je poznat i kao prekursor vitamina D, žučnih kiselina i steroidnih hormona. Ergosterol ili još poznat i kao „gljivični hormon“, glavni je sterol gljiva. Stimulira rast i proliferaciju stanice. Biosinteza ergosterola je složen put koji zahtijeva mnogo energije i sudjelovanje brojnih enzima. Razine ergosterola su strogo kontrolirane bioraspoloživošću određenih metabolita (npr. sterola, kisika i željeza) jer nedostatak (pa i višak) istog uzrokuje pleiotropne defekte koji ograničavaju staničnu proliferaciju i prilagodbu na stres.<sup>25</sup>

Ergosterol se sintetizira u endoplazmatskom retikulumu sekvencijalnom aktivnošću 25 različitih enzima. Regulator transkripcije *Upc2*, inače odgovoran za piroptozu (vrsta visokoupalne programirane stanične smrti potaknute na primjer mikrobnim infekcijama) aktivira gene potrebne za unos i biosintezu sterola ovisno o unutarstaničnim razinama sterola. Prekomjernom ekspresijom svih 25 gena koji kodiraju za enzime potrebne za biosintezu ergosterola okarakterizirana su fenotipska svojstva u prisutnosti različitih stresora. Uvjeti poput: nedostatka željeza ili kalcija, perturbacije stanične stijenke ili povećane osmotske koncentracije soli doveli su do negativnog utjecaja na metabolizam ergosterola kod većine sojeva. Izlaganje prekomjerno ekspimiranih sojeva lovastatinu, terbinafinu, flukonazolu ili fenpropimorfu pokazalo je da prethodno otkrivene primarne mete lijekova nisu jedini geni uključeni u antifungalno djelovanje. Istraživanja puta sinteze ergosterola zorno prikazuju da postoji više meta antifungalnih lijekova nego što se prethodno smatralo.<sup>26</sup>

Istraživanja su pokazala da je ergosterol bitan i za održivost mitohondrijske DNA u gljivama poput kolesterola kod ljudi. Farmakološka ili genetska inhibicija biosinteze ergosterola dovodi do gubitka mitohondrijske DNA u bakteriji *Saccharomyces cerevisiae* ako se ne doda egzogeni ergosterol, ističući poveznicu između mitohondrija i biosinteze ergosterola.<sup>25</sup> Iako je potrebno još informacija, analogno aminoacilaciji lipida bakterija, aminoacilirani steroli bi mogli imati određenu ulogu u modificiranju membrana, interakciji

domaćin/patogen, virulenciji te izbjegavanju imunskog odgovora organizama. Poznato je nekoliko vrsta modifikacija ergosterola. Modifikacije mogu biti važne za središnje procese homeostaze kod gljiva. Neke od njih su: acetilacija, glikozilacija, aminoacilacija te su identificirane u patogenim gljivama, čineći enzime odgovorne za modifikaciju ergosterola pogodnim metama antifungalnih lijekova.<sup>27</sup>

### § 3. ZAKLJUČAK

Enzimi koji kataliziraju prijenos aminokiselina u svrhu izmjene ili dorade stanične membrane ili stanične stijenke igraju ključnu ulogu u staničnoj adaptaciji i homeostazi. Glavna karakteristika tih enzima tj. aminoacil-tRNA-transferaza (ATT) jest sposobnost korištenja aa-tRNA kao donora amino skupine. Fem-transferaze neposredno sudjeluju u sintezi bakterijskog peptidoglikana, aaPGS izmjenjuju naboj fosfolipida a ErxS enzimi pak vežu Asp ili Gly na ergosterol. Vezane aminokiseline mijenjaju ukupan naboj lipida i oblikuju lipidni dvosloj što rezultira prilagodbom organizama na nepovoljne okolišne uvjete poput temperature, dostupnosti hranjivih tvari ili potencijalnih stresora (CAMP kao prva linija obrane ljudskog domaćina i bakteriocini konkurentnih mikroorganizama). Kada su bakterije izložene djelovanju antibiotika, dio će preživjeti zbog određenih predispozicija za rezistenciju koje su stečene putem raznih mutacija. Upravo taj problem motivira za kontinuirana istraživanja, a razumijevanjem funkcija proučavanih enzima te njihovog doprinosa samoj prilagodbi mikroorganizama „popločava se put“ k novim biotehnološkim i medicinskim otkrićima.

## § 4. LITERATURNI IZVORI

1. W. Vollmer, D. Blanot, Miguel A. De Pedro, Peptidoglycan structure and architecture FEMS Microbiology Reviews, **32**, (2008), 149–167.
2. A.L. Koch, Orientation of the peptidoglycan chains in the sacculus of Escherichia coli, Res. Microbiol., **149** (1998) 689–701.
3. W. Vollmer, U. Bertsche, Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in Escherichia coli, Biochimica et Biophysica Acta (BBA), **1778**, (2008), 1714-1734
4. K. L. Bersch, K. E. DeMeester, R. Zagani, S. Chen, K. A. Wodzanowski, S. Liu, S. Mashayekh, Hans-Christian Reinecker, and C. L. Grimes, Bacterial Peptidoglycan Fragments Differentially Regulate Innate Immune Signaling, ACS Central Science, **7**, (2021), 688-696
5. D. L. Nelson, M. M. Cox, Principles of biochemistry, 5th Edition, 2008, 1079-1080
6. M.A. Rubio Gomez , M. Ibba , Aminoacyl-tRNA synthetases, RNA, **26**, (2020) 910-936
7. A. Mroziak, Z. Piotrowska-Seget, S. Łabużek, Cytoplasmatic Bacterial Membrane Responses to Environmental Perturbations, Polish Journal of Environmental Studies, **13**, (2004), 487-494
8. C.M. Ernst, P. Staubitz, N.N. Mishra, S.J. Yang, G. Hornig, H. Kalbacher, A.S. Bayer, D.Kraus, A. Peschel, The bacterial defensin resistance protein MprF consists of separable domains for lipid lysinylation and antimicrobial peptide repulsion. PLoS Pathog., **5**, (2009)
9. G. Grob, M. Hemmerle, N. Jakobov, N. Mahmoudi , F. Fischer , B. Senger, H.D. Becker, tRNA-dependent addition of amino acids to cell wall and membrane components, Biochimie, **203**, (2022) 93-105
10. N. Jakobov, N. Mahmoudi, G. Grob, D. Yokokawa, Y. Saga, T. Kushiro, D. Worrell, H. Roy, H. Schaller, B. Senger, L. Huck, G. R. Gascon, H. D. Becker, F. Fischer, RNA-dependent synthesis of ergosteryl-3 $\beta$ -O-glycine in Ascomycota expands the diversity of steryl-amino acids, Journal of Biological Chemistry, **298**(2022)101657



11. A. Salah Ud-Din, A. Tikhomirova, A. Roujeinikova, Structure and Functional Diversity of GCN5-Related N-Acetyltransferases (GNAT). *Int J Mol Sci.*, **17**, (2016) 1-45
12. T.E. Benson , D.B. Prince, V.T. Mutchler, K.A. Curry, A.M. Ho, R.W. Sarver, J.C. Hagadorn, G.H. Choi, R.L. Garlick. X-ray crystal structure of Staphylococcus aureus FemA. *Structure*, **10**, (2002) 1107-1115
13. <http://pfam-legacy.xfam.org/family/PF02388#tabview=tab0>,Pristupljeno 1.8.2023
14. <http://www.rcsb.org/3d-view/1NE9?preset=validationReport>,Pristupljeno 5.8.2023
15. T. Schneider, M.M. Senn, B. Berger-Bächli.,A. Tossi, H.-G. Sahl, I. Wiedemann. In vitro assembly of a complete, pentaglycine interpeptide bridge containing cell wall precursor (lipid II-Gly5) of Staphylococcus aureus, *Molecular Microbiology*, **53**, (2004) 675-685.
16. D. Münch, H.G. Sahl, Structural variations of the cell wall precursor lipid II in Gram-positive bacteria — Impact on binding and efficacy of antimicrobial peptides, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1848**, (2015) 3062-3071
17. H. Roy, Tuning the properties of the bacterial membrane with aminoacylated phosphatidylglycerol. *IUBMB Life*. **61**, (2009) 940-953.
18. A.M. Smith, J.S. Harrison, C.D. Grube, A.E.F. Sheppe, N. Sahara, R. Ishii, O. Nureki and H. Roy, Lipid alanylation in *C. glutamicum*. *Molecular Microbiology*, **98**, (2015) 681-693
19. D. Song, H. Jiao & Z. Liu, Phospholipid translocation captured in a bifunctional membrane protein MprF. *Nat Commun*, **12**, (2021) 2927
20. P. Staubitz, H. Neumann, T. Schneider, I. Wiedemann, A. Peschel, MprF-mediated biosynthesis of lysylphosphatidylglycerol, an important determinant in staphylococcal defensin resistance *FEMS Microbiology Letters*, **231**, (2004) 67–71
21. H. Roy, M. Ibba, Monitoring Lys-tRNA<sup>Lys</sup> phosphatidylglycerol transferase activity, *Methods*, **44**, (2008) 164-169
22. C. M. Ernst, A. Peschel, MprF-mediated daptomycin resistance, *International Journal of Medical Microbiology*, **309**, (2019) 359-363
23. J. Andrä , T. Goldmann, C.M. Ernst, A. Peschel, T. Gutschmann, Multiple peptide resistance factor (MprF)-mediated Resistance of Staphylococcus aureus against antimicrobial peptides coincides with a modulated peptide interaction with artificial

- membranes comprising lysyl-phosphatidylglycerol. *J Biol Chem.*, **286**, (2011) 18692-18700
24. N. Yakobov, F. Fischer, N. Mahmoudi, Y. Saga, C.D. Grube, H. Roy, B. Senger, G. Grob, S. Tatematsu, D. Yokokawa, I. Mouyna, J.P. Latgé, H. Nakajima, T. Kushiro, H.D. Becker, RNA-dependent sterol aspartylation in fungi, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **117**, (2020) 14948-14957
25. T. Jordá, S. Puig, Regulation of Ergosterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genes*, **11**, (2020) 795
26. M.L. Rodrigues, The Multifunctional Fungal Ergosterol. *mBio*, **9**, (2018) e01755-18
27. T.G. Normile, K. McEvoy, M. Del Poeta, Steryl Glycosides in Fungal Pathogenesis: An Understudied Immunomodulatory Adjuvant. *J Fungi*, **6**, (2020) 25