

# Ugljična anhidraza iz bakterija - potencijana meta za razvoj antibiotika

---

**Belas, Mihael**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*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:217:370704>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-25**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Mihael Belas

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **UGLJIČNA ANHIDRAZA IZ BAKTERIJA – POTENCIJALNA META ZA RAZVOJ ANTIBIOTIKA**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju

Mentor rada: Doc. dr. sc. Ivana Kekez

Zagreb, 2024.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

15. srpnja 2024.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

6. rujna 2024.

Mentor rada: Doc. dr. sc. Ivana Kekez

Potpis:



# Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>V</b>
<b>§ 1. UVOD .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Ugljične anhidraze (UA) .....</b>	<b>7</b>
1.1.1. <i>Općenito .....</i>	7
1.1.2. <i>Podjela .....</i>	8
1.1.3. <i>Katalitička aktivnost .....</i>	12
<b>1.2. Ugljične anhidraze kod ljudi.....</b>	<b>13</b>
1.2.1. <i>Klasifikacija i rasprostranjenost .....</i>	13
1.2.2. <i>Medicinski poremećaji vezani uz ugljične anhidraze.....</i>	14
1.2.3. <i>Kristalne strukture .....</i>	14
<b>1.3. Rezistencija na antibiotike .....</b>	<b>15</b>
1.3.1. <i>Lista bakterija prioriteta Svjetske zdravstvene organizacije .....</i>	15
<b>§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1. Bakterijske ugljične anhidraze .....</b>	<b>17</b>
2.1.1. <i>Fiziološka važnost ugljičnih anhidraza.....</i>	17
2.1.2. <i>Inhibitori ugljičnih anhidraza.....</i>	18
2.1.3. <i>Inhibicija bakterijskih ugljičnih anhidraza .....</i>	19
2.1.4. <i>Inhibicija in vivo .....</i>	20
<b>2.2. Bakterije rezistentne na antibiotike.....</b>	<b>21</b>
<b>§ 3. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>24</b>
<b>§ 4. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XXV</b>

## § Sažetak

Uloga ugljičnih anhidraza (UA) u životnom ciklusu i virulentnosti bakterija potaknula je istraživače na ispitivanje učinaka poznatih inhibitora UA na bakterije. Analiza genoma omogućuje identifikaciju specifičnih tipova UA koje bakterije kodiraju te odabir prikladnih inhibitora. Inhibicija UA može značajno smanjiti proliferaciju bakterijskih kolonija i njihovu virulentnost. Dokazano je da inhibitori, osobito oni na bazi sulfonamida, smanjuju razine CO<sub>2</sub> i bikarbonata u stanicama bakterija, čime ometaju ključne biosintetske procese.

Eksperimenti su pokazali da acetazolamid, u koncentraciji od 31,2 µg mL<sup>-1</sup>, smanjuje utrošak glukoze i proliferaciju *Escherichia coli* dok etoksizolamid pokazuje nešto slabiji učinak. *In vivo* studije potvrdile su učinkovitost inhibitora UA u liječenju bakterijskih infekcija, uključujući vankomicin-rezistentne sojeve *Enterococcus faecium* (VRE). Kako je prenamjena lijekova zadnjih godina postala jedna od ključnih metoda otkrića i dizajna novih lijekova u medicinskoj kemiji, isti pristup primijenjen je na već postojeće inhibitore UA koji se koriste u liječenju bolesti kao što je npr. glaukom. Modifikacijom acetazolamida razvijeni su kandidati s većom djelotvornošću. Klinička ispitivanja pokazala su da acetazolamid povećava osjetljivost *E. faecalis* na gentamicin, smanjujući minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIC).

Glavni izazov ostaje specifičnost inhibitora UA, jer mnogi također inhibiraju ljudske UA što uzrokuje nuspojave i utječe na učinkovitost inhibitora kao potencijalnog antibiotika. Buduća istraživanja fokusirana su na razvoj specifičnih inhibitora bakterijskih UA, osobito β–klase, klasa UA koje nisu prisutne kod ljudi, koji bi mogli izbjeći probleme nuspojave i rezistencije na antibiotike.



## § 1. UVOD

### 1.1. Ugljične anhidraze (UA)

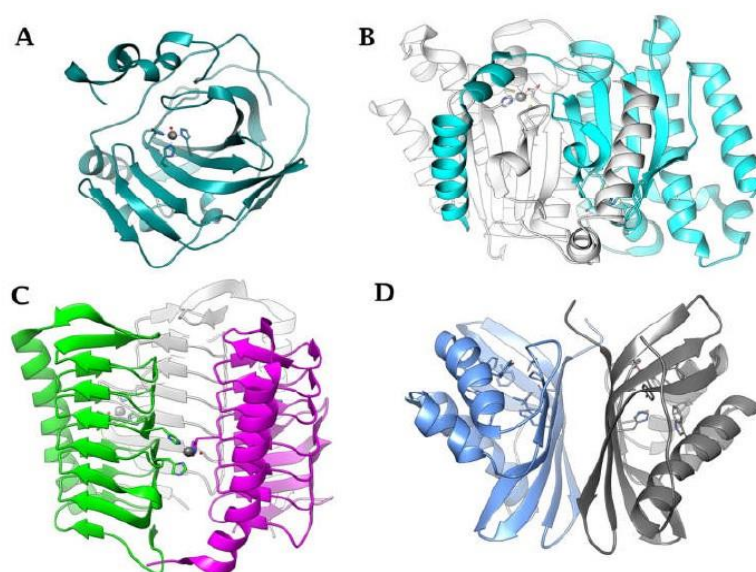
#### 1.1.1. Općenito

U živim organizmima, metabolički procesi kao što su stanično disanje rezultiraju oslobađanjem ugljikova(IV) oksida ( $\text{CO}_2$ ). Nastali ugljikov(IV) oksid, otpušta se primarno pasivnim transportom (difuzija) iz organizma, no nezanemarivi udio biva preveden u njegov u vodi topljivi oblik, hidrogenkarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ). Biološke molekule zaslužne za taj proces su ugljične anhidraze. Ugljične anhidraze široka su klasa enzima čija aktivnost podrazumijeva katalizu reverzibilne reakcije hidratacije ugljikova(IV) oksida dajući hidrogenkarbonat i  $\text{H}^+$  ion ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ ). Ova reakcija bi se pri fiziološkom pH bez prisutnosti enzima odvijala nedovoljnim brojem puta da bi ispunila metaboličke potrebe organizma<sup>1,2</sup>.



### 1.1.2. Podjela

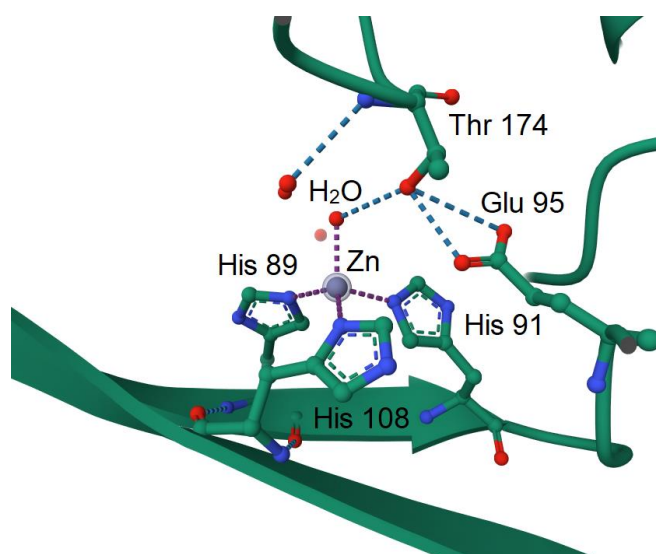
Ugljične anhidraze prema najnovijim spoznajama svrstane su u osam različitih klasa:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\theta$  i  $\iota$ . Sve klase imaju zajedničko evolucijsko podrijetlo, no međusobno se strukturno značajno razlikuju (Slika 1A–D).



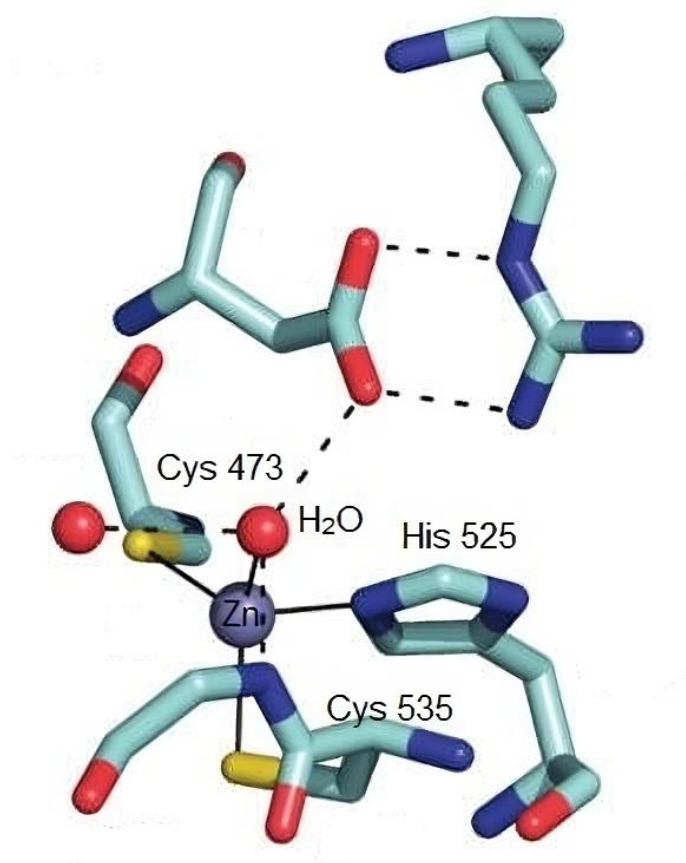
Slika 1. Kristalne strukture (A)  $\alpha$ -UA iz bakterije *Neisseria gonorrhoeae* (PDB kod: 1KOQ) (B)  $\beta$ -UA iz bakterije *Escherichia coli* (PDB kod: 1I60), (C)  $\gamma$ -UA iz bakterije *Burkholderia pseudomallei* (PDB kod: 7ZW9), (D)  $\iota$ -UA iz bakterije *Burkholderia territorii* modelirane na temelju strukture kalmodulin ovisne protein kinaze iz vrste *Xanthomonas campestris* (PDB kod:3H51)<sup>1</sup>

Pokazano je da aminokiselinski sljedovi polipeptida koji sačinjavaju spomenute UA međusobno imaju minimalno sličnosti, a značajno se razlikuju i po načinju smatanja, tj. konformaciji proteina. Unatoč velikoj strukturnoj različitosti, sve ugljične anhidraze imaju isti mehanizam djelovanja<sup>2</sup>. U aktivnom mjestu ugljičnih anhidraza, nalazi se centralni metalni ion (spadaju u skupinu metaloenzima) tetraedarske geometrije. Najčešće to je cink ( $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\delta$ -UA), ali umjesto cinka u aktivnom mjestu može se naći željezo(II) (u slučaju  $\gamma$ -UA), dok  $\zeta$ -UA za katalizu koriste Zn(II) ili Cd(II) ione. Najnovije otkrivena  $\iota$ -klasa ugljičnih anhidraza reakciju

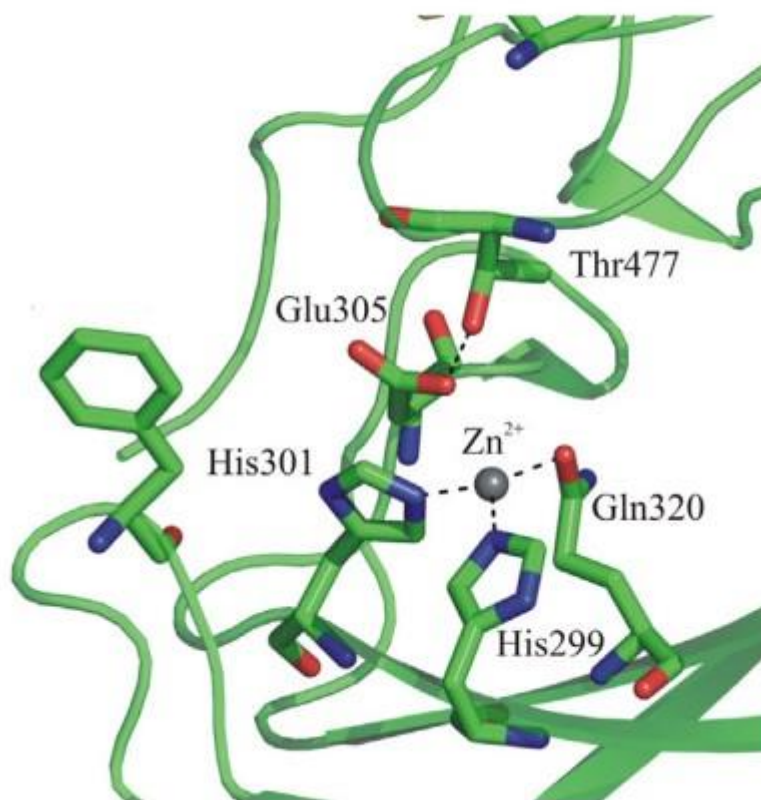
katalizira bez metalnog iona<sup>1,3</sup>. Centralni metalni ion u aktivnom mjestu koordiniran je trima aminokiselinskim ostatcima, dok četvrtu koordinativnu vezu metal tvori s molekulom vode. Za različite klase UA, metalni centar koordiniran je različitim aminokiselinama, npr. u  $\alpha$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ -UA koordiniran je trima histidinima (koordinacija se ostvaruje preko  $sp^2$  hibridiziranog dušika imidazola), Slika 2, dok dva cisteina i jedan histidin koordiniraju metalni centar kod  $\beta$  i  $\zeta$ -UA. Metalni centar  $\eta$ -UA koordiniran je dvama histidinima i jednim glutaminom, za  $\theta$  anhidraze pretpostavlja se da je koordinacija ista kao i za  $\alpha$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ -klase<sup>2</sup>.



Slika 2 Struktura aktivnog mjesta  $\alpha$ -UA iz bakterijske vrste *N. gonorrhoeae*; metalni centar (cink) koordiniran trima histidinima i molekulom vode. PDB kod: 1KOQ<sup>4</sup>



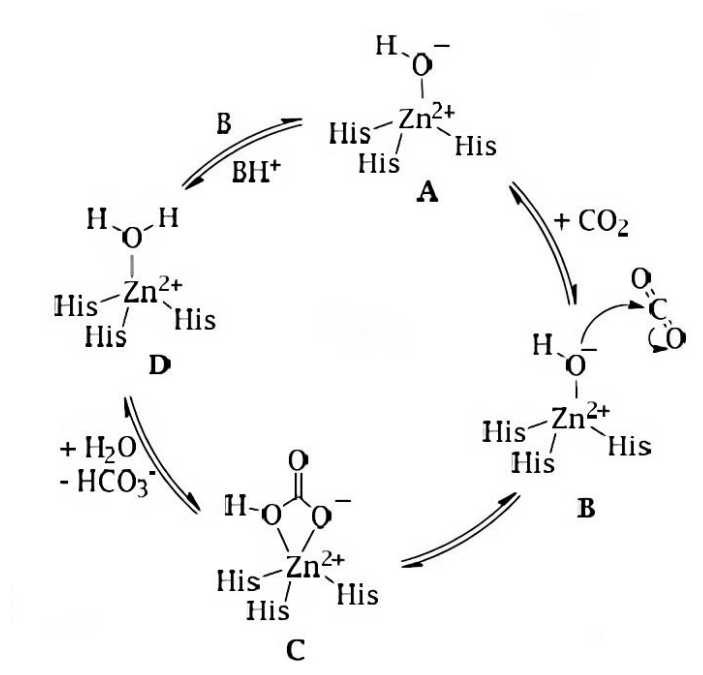
Slika 3. Struktura aktivnog mjesta  $\zeta$ -UA iz bakterijske vrste *Sulfolobus solfataricus*; metalni centar (cink) koordiniran molekulom vode, dvama cisteinima i jednim histidinom<sup>5</sup>.



Slika 4. Struktura aktivnog mjesta  $\gamma$ -UA bakterije *Plasmodium falciparum* modelirana programom Phyre; cink koordiniran dvama histidinima i jednim glutaminom<sup>6</sup>.

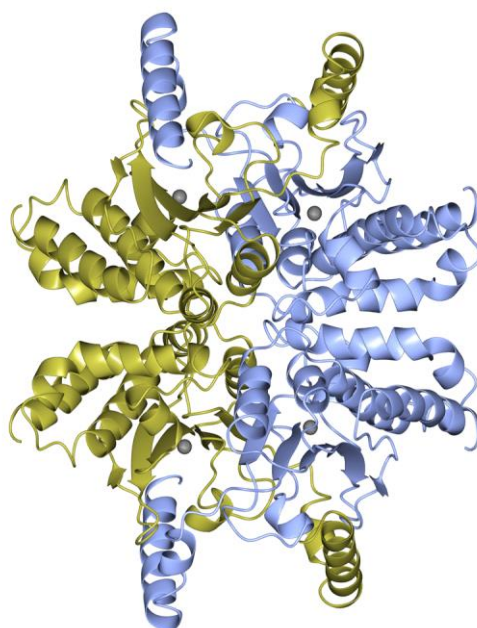
## 1.1.3. Katalitička aktivnost

Mehanizam hidratacije ugljikova(IV) oksida kataliziran ugljičnim anhidrazama dobro je poznat i očuvan je kroz sve klase UA u svim organizmima. Mehanizam se odvija preko hidroksilne skupine vezane na tetraedarski koordinirani metal u aktivnom mjestu na način da ona nukleofilno napada ugljikov atom molekule  $\text{CO}_2$ , tvoreći pentakoordinirani međuprodukt čijom hidrolizom nastaje hidrogenkarbonat i regenerirani metalni centar (mehanizam detaljnije prikazan slikom 5)<sup>1,7</sup>.



Slika 5. Katalitički mehanizam ugljičnih anhidraza: vrsta B katalitički je aktivan metalni hidroksid koji nukleofilno napada molekulu  $\text{CO}_2$ , nastaje pentakoordinirani međuprodukt manje stabilnosti i njegovom hidrolizom oslobađa se bikarbonat i nastaje tetrakoordinirani metal koji je katalitički neaktivan, vrsta D; korak deprotonacije vrste D u vrstu A (metalni hidroksid) korak je koji određuje brzinu reakcije hidratacije  $\text{CO}_2$ <sup>1</sup>.

Metalni hidroksid katalitički je aktivna vrsta, ona nastaje deprotonacijom molekule vode koordinirane na metal<sup>7</sup>. Proces deprotonacije korak je koji određuje brzinu reakcije katalizirane ugljičnom anhidrazom.  $\alpha$ -ugljične anhidraze katalitički su aktivne kao monomeri (Slika 1A) ili dimeri, dok  $\beta$ -UA kristaliziraju kao dimeri (Slika 1B), tetrameri (Slika 6) i oktameri. Za  $\alpha$ -UA katalitički aktivan je monomer, ali u nekih vrsta aktivne su u obliku dimera, dok kod  $\beta$ -UA katalitičku aktivnost pokazuju dimerne i tetramerne forme<sup>1,3,7</sup>.



Slika 6. Tetramerna struktura  $\beta$ -UA iz bakterije *E. coli*, različitim bojama prikazani su dimeri u kristalnoj strukturi, sivim kuglicama prikazani su metalni centri (Zn(II)) u aktivnim mjestima monomera (svaki monomer po jedno aktivno mjesto); PDB kod: 1I6O<sup>8</sup>.

Za  $\gamma$ -UA, katalitički aktivna struktura jest trimer (Slika 1C) i svaki od monomera sadrži po jedno aktivno mjesto smješteno uz sučelja monomera. Kristalna struktura  $\theta$ -UA veoma je slična  $\beta$ -UA, a  $\zeta$ -UA gradi jedan polipeptidni lanac, dok za  $\delta$  i  $\eta$  klase struktura nije određena<sup>1,3,9</sup>.  $\iota$ -UA izolirana iz bakterijske vrste *B. territorii* katalitički je aktivna kao dimer (Slika 1D). Za  $\iota$ -UA karakteristično je postojanje tipova UA u kojima u aktivnom mjestu izostaje metalni ion, ali je katalitička aktivnost zadržana. Svi tipovi  $\iota$ -UA katalitički aktivni su kao homodimeri s izrazito visokim stupnjem homolognosti strukture<sup>10</sup>.

## 1.2. Ugljične anhidraze kod ljudi

### 1.2.1. Klasifikacija i rasprostranjenost

U sisavaca su okarakterizirane isključivo  $\alpha$ -klase ugljičnih anhidraza. Kod ljudi, zastupljeno je 15 različitih izoformi ovog enzima od kojih je 12 katalitički aktivno<sup>11</sup>. Ovisno o funkciji, razlikuju se po zastupljenosti u tkivima i po lokalizaciji unutar stanica. Postoji osam citosolnih (UA I, II, III, VII, VIII, X, XI i XIII), dvije mitohondrijske (UA VA i VB), tri transmembranske

(UA IX, XII i XIV). UA IV usidrena je za membranu preko glikozil-fosfatidilinozitola (GPI-sidra), a UA VI izlučuje se u slini. Ugljične anhidraze VIII, X i XI, poznatije kao CARPs (engl. *Carbonic Anhydrase Aelated Proteins*), katalitički su neaktivne zbog izostanka jednog ili više histidinskih liganada na centralnom metalnom ionu. Zbog njihove visoke evolucijske očuvanosti u genomima višestaničnih organizama (očuvaniji su nego katalitički aktivne UA), pretpostavlja se da posjeduju značajnu staničnu funkciju, no ona još uvijek nije otkrivena. Izoforme ljudske ugljične anhidraze, ovisno o staničnoj funkciji i vrsti tkiva u kojoj su zastupljeni, razlikuju se prema katalitičkoj efikasnosti<sup>11,12</sup>.

### 1.2.2. Medicinski poremećaji vezani uz ugljične anhidraze

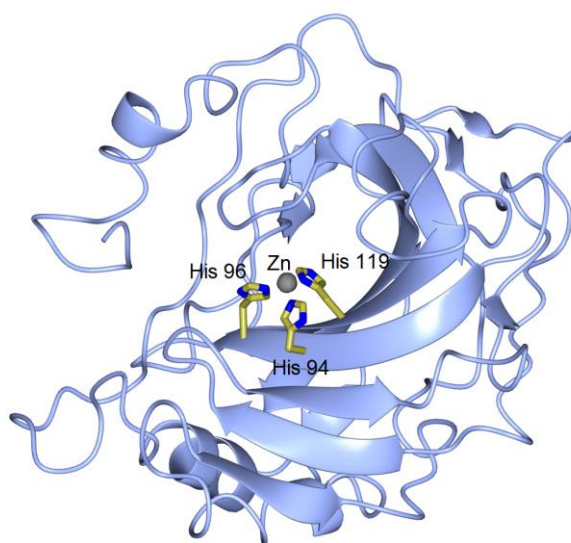
Funkcije ugljičnih anhidraza razlikuju se ovisno o lokalizaciji u tkivima, odnosno unutar stanice, no primarno obuhvaćaju regulaciju homeostaze pH u stanicama regulacijom omjera  $[\text{HCO}_3^-]$  i  $[\text{H}^+]$ , regulaciju dostupnosti  $\text{CO}_2$ , odnosno bikarbonata za metaboličke procese u stanicama (mnogi metabolički putevi uključuju korake ugradnje  $\text{CO}_2$  u molekule koji najčešće započinju aktivacijom bikarbonata)<sup>2</sup>. Poremećaji u aktivnosti ovih enzima posljedično uzrokuju različite bolesti.

Poremećaj koji se najčešće vezuje uz nepravilnu funkciju ugljičnih anhidraza je glaukom. Zbog visokog očnog tlaka, dolazi do oštećenja optičkog živca koji je ključan za vid. Posljedično, dolazi do postepenog gubitka vida. U svrhu borbe protiv bolesti uzrokovanih nepravilnim radom ugljičnih anhidraza, istraživani su i razvijani inhibitori (engl. *Carbonic Anhydrase Inhibitors*, CAIs)<sup>12,13</sup>. Postoje dvije klase inhibitora ugljičnih anhidraza: kelatni anioni koji koordiniraju centralni metalni ion i inhibitori na bazi sulfonamida. Oba tipa inhibitora djeluju istim mehanizmom, svojim donorskim atomima istiskuju katalitički aktivnu molekulu vode iz koordinacijske sfere metalnog iona i tako deaktiviraju enzim<sup>14</sup>. Najzastupljeniji i u medicinske svrhe najkorišteniji inhibitori ugljičnih anhidraza upravo su lijekovi za liječenje glaukoma, kao što su: acetazolamid, metazolamid, brinzolamid (AZOPT), dorzolamid (Trusopt)<sup>15</sup>. Navedeni spojevi spadaju u skupinu inhibitora na bazi sulfonamida, a konkretno djeluju kao inhibitori UA II. U svrhu terapije konzumiraju se u obliku tableta ili kapi za oči<sup>13</sup>.

### 1.2.3. Kristalne strukture



Za većinu ljudskih ugljičnih anhidraza riješena je kristalna struktura. Rješavanje kristalne strukture enzima omogućuje uvid u strukturu aktivnog mjesta i pregled prostornog rasporeda aminokiselina u proteinu, informacija ključnih za dizajn molekula koje bi s danom molekulom proteina potencijalno mogle stvarati interakcije. U slučaju ugljičnih anhidraza, fokus istraživanja je na dizajnu molekula inhibitora (CAIs). Do danas, riješene su strukture ljudskih ugljičnih anhidraza I, II, III, IV, VI, VII, IX, XII i XIV. Za UA I, II, IV, VII i XIV osim same kristalne strukture enzima, riješena i kristalna struktura kompleksa enzim inhibitor za više različitih tipova inhibitora. Za UA IX, riješena je kristalna struktura molekule koja mimificira ugljičnu anhidrazu IX (enzimski mimetik mala je molekula koja modelira molekulsku strukturu i reaktivnost enzima<sup>16</sup>), dok je za UA XII (transmembranski protein) struktura riješena samo za izvanstaničnu domenu enzima (također riješena struktura kompleksa enzim inhibitor). Kako su ljudske UA isključivo  $\alpha$ -klase, uglavnom su one sve monomeri (na Slici 7 dan je primjer strukture ljudske ugljične anhidraze II), a manji broj aktivan je kao dimer.



Slika 7. Struktura ljudske ugljične anhidraze II; kao i sve UA u sisavaca, ona je  $\alpha$ -UA što je vidljivo po koordinaciji cinka u aktivnom mjestu (PDB kod: 3KS3)<sup>12</sup>.

### 1.3. Rezistencija na antibiotike

#### 1.3.1. Lista bakterija prioriteta Svjetske zdravstvene organizacije

2024. godine, Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) revidirala je listu prioriteta patogenih bakterija (engl. *Bacterial Priority Pathogens List*, BPPL) koja sadrži 15 sojeva bakterija otpornih na antibiotike za koje se predlaže pojačano istraživanje



u svrhu razvijanja novih antibiotika, tj. alternativnih antimikrobnih lijekova. Bakterijski sojevi, podijeljeni su u grupe kritičnog, visokog i srednjeg prioriteta. U skupinu kritičnog prioriteta spadaju vrste *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacteriaceae*, dok u skupinu visokog prioriteta ubrajamo dobro poznati *Staphylococcus aureus*, zatim *Enterococcus faecium*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria gonorrhoeae*, itd<sup>17</sup>.

Među mogućim načinima borbe protiv rezistentnih sojeva bakterija ubrajaju se svakako dizajn i sinteza inhibitora ugljičnih anhidraza patogenih bakterija. Inhibitori ugljičnih anhidraza, kako je već spomenuto, dobro su istraženi kao potencijalni lijekovi jer su korišteni za tretiranje različitih poremećaja u ljudi (npr. acetazolamid u liječenju glaukoma), no njihovo korištenje u liječenju bakterijskih bolesti relativno je novo područje. Svrha ovog rada je dati kratki pregled provedenih istraživanja i otkrića u ovom polju. Cilj je također istražiti opseg podataka dostupnih o ugljičnim anhidrazama rezistentnih sojeva bakterija, konkretno za koje sojeve su riješene strukture UA i postoje li riješene strukture tih enzima u kompleksu s inhibitorom.

## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. Bakterijske ugljične anhidraze

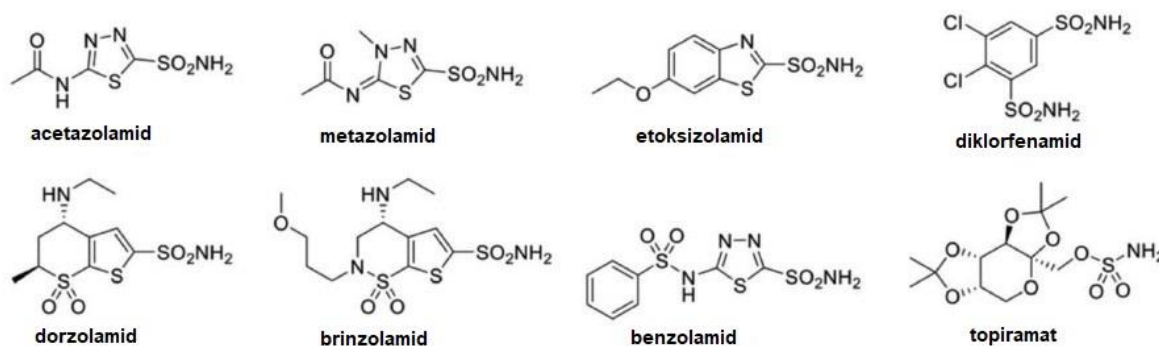
#### 2.1.1. Fiziološka važnost ugljičnih anhidraza

Ugljične anhidraze imaju vrlo važnu ulogu u održavanju za život povoljnih uvjeta u bakterijskim stanicama. Sudjeluju u održavanju homeostaze pH u stanici regulacijom omjera  $[\text{HCO}_3^-] / [\text{H}^+]$ , izlučivanju elektrolita i toksina. Sudjeluju također u transportu molekula  $\text{CO}_2$ , odnosno bikarbonata u stanici u svrhu biosintetskih procesa. Za mnoge bakterije, dokazano je da je aktivnost ugljičnih anhidraza ključna za njihovu virulentnost, ponajviše kroz regulaciju pH<sup>2</sup>. Na primjeru bakterije *H. pylori*, patogenog mikroorganizma koji kolonizira sluznicu želuca, uočena je ključna uloga regulacije pH ugljičnom anhidrazom za njezinu adaptaciju izrazito kiselim uvjetima želuca. Još zanimljiviji i izravniji primjer poticanja virulentnosti bakterije jest kod vrste *Vibrio cholerae*, uzročnika kolere, infekcije probavnog trakta. Specifični soj *V. cholerae* luči toksin kolere (TK), proteinski kompleks koji spada u skupinu enterotoksina, koji u organizmu domaćinu potiče pojačano lučenje vode i elektrolita iz sluznice tankog crijeva što u konačnici uzrokuje dijareju i povraćanje. Regulatorni protein ToxT, u *V. cholerae* izravni je aktivator transkripcije gena za sintezu i lučenje TK. Pokazano je da je ToxT inaktivan bez prisutnosti bikarbonata i dokazano da je bikarbonat glavni aktivator proteina ToxT. Kako je udio bikarbonata u stanici reguliran aktivnošću UA, smatra se da ugljične anhidraze igraju ključnu ulogu u proliferaciji *V. cholerae* u tankom crijevu. Bakterija *Salmonella enterica*, uzročnik salmoneloze (infekcija probavnog trakta), za vrijeme infekcije pokazuje izrazito visoku ekspresiju gena koji kodira za jedan tip UA. Također, kod *Pseudomonas aeruginosa*, delecija gena za UA značajno smanjuje patogenost ove bakterije<sup>2,18</sup>.

Ovi rezultati značajno idu u prilog istraživanju inhibitora ugljične anhidraze kao potencijalnih antimikrobnih terapija, a pogotovo u smjeru liječenja sojeva bakterija rezistentnih na klasične antibiotike.

## 2.1.2. Inhibitori ugljičnih anhidraza

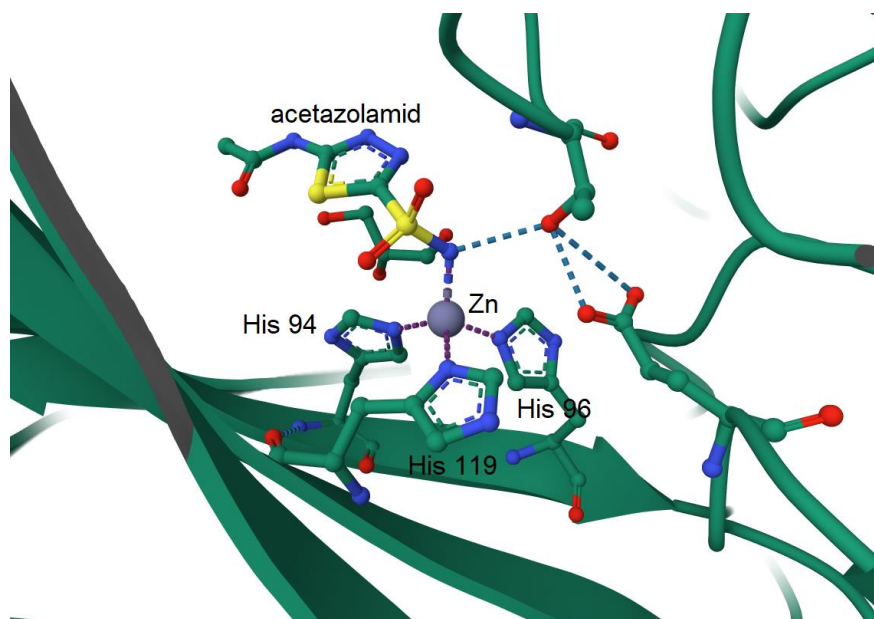
Inhibitore ugljičnih anhidraza razlikujemo po načinu djelovanja. Molekule inhibitori mogu se vezati na metalni centar UA, katalitički aktivnu molekulu vode u koordinacijskoj sferi metala u aktivnom mjestu, blokirati ulaz u aktivno mjesto enzima ili vezati se izvan aktivnog mjesta<sup>2,9,14,19</sup>. U kontekstu potencijalnih lijekova, najveću primjenu nalaze inhibitori koji koordiniraju metalni centar, konkretno sulfonamidi i njima slični spojevi<sup>11,12,14</sup>. Spojeve na bazi sulfonamida karakterizira funkcijska skupina  $R-X-SO_2-NH_2$ , gdje je R aromatska, alifatska ili heterociklička srž molekule. X-om, predstavljen je kisik (O) ili dušik (NH), ili X izostaje i  $SO_2$  skupina vezana je izravno na R (Slika 8). Sulfonamidi medicinski su vrlo važni spojevi i u opticaju su već desetljećima pa su izrazito pogodni prekursori za sintezu novih lijekova. Prenamjena lijekova među popularnijim je metodama u istraživanju i dizajnu novih terapeutika u medicinskoj kemiji. Budući su inhibitori UA na bazi sulfonamida dobro poznati i istraženi, zasigurno predstavljaju područje visokog interesa. Među takve, ubrajaju se već prije spomenuti acetazolamid, metazolamid, dorzolamid i brinzolamid kao lijekovi za liječenje glaukoma (pribrajaju im se i diklorfenamid i benzolamid), također topiramata kao antiepileptik<sup>2,11</sup>.



Slika 8. Kemijske strukture inhibitora UA na bazi sulfonamida; na svakoj strukturi vidljiva karakteristična funkcijska skupina  $R-X-SO_2-NH_2$ ; svi spojevi osim topiramata su sulfonamidi (X izostaje, atom sumpora izravno vezan na „srž“ molekule), topiramata je ester amidosulfonske kiseline (X je atom kisika)<sup>2</sup>.

Svi navedeni inhibitori u srži imaju isti mehanizam djelovanja, vežu se za metalni centar u aktivnom mjestu istiskujući katalitički aktivnu molekulu vode iz koordinacijske sfere metala (enzim gubi aktivnost, Slika 9). Metalni centar zadržava tetraedarsku geometriju, a molekula acetazolamida stabilizirana je međumolekulskim interakcijama aromatske, tj. heterocikličke

srži inhibitora sa hidrofobnim, odnosno hidrofilnim aminokiselinskim ostacima u aktivnom mjestu što u konačnici daje stabilan adukt i enzim je inhibiran.



Slika 9. Aktivno mjesto ljudske UA II u kompleksu s acetazolamidom; acetazolamid preko atoma dušika  $\text{NH}_2$  skupine ostvaruje koordinativnu vezu s atomom cinka. PDB kod: 3HS4<sup>20</sup>

### 2.1.3. Inhibicija bakterijskih ugljičnih anhidraza

Uloga ugljičnih anhidraza na životni ciklus i virulentnost bakterija navela je istraživače da ispituju utjecaj poznatih inhibitora UA na bakterije. Kako ispitivanja ne bi provodili na slijepo, nužno je prethodno analizom genoma ispitivanih bakterija odrediti za koje tipove ugljičnih anhidraza genomi bakterija kodiraju i na temelju poznatih podataka odabrati prikladni inhibitor. Utjecaj inhibitora na bakteriju promatra se najčešće praćenjem njezine proliferacije ili količine utrošenih metabolita. Zadnjih godina, provedena su *in vitro* istraživanja utjecaja inhibitora na UA bakterija i pokazano je da pojedini spojevi (pogotovo oni na bazi sulfonamida) učinkovito inhibiraju bakterijske UA. Osim što inhibiraju, za neke je spojeve pokazano da značajno smanjuju proliferaciju bakterijskih kolonija, tj. potencijalno i njihovu virulentnost. Inhibiranjem normalnih funkcija UA, razine  $\text{CO}_2$  i bikarbonata u stanici padaju ( $\text{CO}_2$  difundira iz stanice) i posljedično ti spojevi nisu dostupni za biosintetske procese koje bakterijska stanica mora provoditi da bi ostala živa. Pokazano je npr. da etoksizolamid (komercijalno korišten kao diuretik) *in vitro* ubija stanice *H. pylori*<sup>1,9</sup>. Jedna grupa, istraživala je utjecaj acetazolamida na

životni ciklus *E. coli*. Kultura je uzgojena na hranjivoj podlozi uz glukozu kao jedini izvor ugljika dok je za vrijeme pokusa praćen utrošak glukoze. Uz dodatak acetazolamida u koncentraciji  $31,2 \mu\text{g mL}^{-1}$  uočen je pad utroška glukoze i pad proliferacije kolonije. Acetazolamid inhibira dva tipa ugljičnih anhidraza, konkretno  $\beta$  i  $\gamma$ , prisutnih u promatranom soju *E. coli*, izmjerene konstante inhibicije iznose  $227 \text{ nmol L}^{-1}$  ( $\beta$ -UA), odnosno  $248 \text{ nmol L}^{-1}$  ( $\gamma$ -UA). Eksperiment je naknadno dokazan korištenjem slabijeg inhibitora UA od acetazolamida (etoksizolamid) u istim eksperimentalnim uvjetima. Uočen je slabiji utjecaj na utrošak glukoze i proliferaciju<sup>2</sup>.

Provedeni pokusi zahtjevaju uvjete *in vitro*, no kako bi se ustvrdilo jesu li navedeni inhibitori doista primjenjivi u liječenju, pokusi moraju biti uspješno provedeni *in vivo*.

#### 2.1.4. Inhibicija *in vivo*

Eksperiment sa sojem *E. coli* opisan u prethodnom poglavlju uspješno je proveden *in vivo*<sup>2</sup>. To otkriće afirmiralo je status inhibitora UA kao potencijalnih novih lijekova u borbi protiv bakterijskih bolesti. Bakterije iz roda Enterokoka veoma su opasni patogeni koji uzrokuju mnogo po život opasnih dijagnoza. Vrste *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis* spadaju u skupine bakterija rezistentnih na antibiotike, konkretno na vankomicin (engl. *Vancomycin-Resistant Enterococci*, VRE) i predstavljaju zato velik problem medicinskoj zajednici (*E. faecium* na listi bakterija visokog prioriteta WHO). Modificiranjem acetazolamida, istraživači Flahertyeve grupe<sup>21</sup> razvili su dva kandidata koji su pokazali djelotvornost na VRE sojeve tako što su smanjili minimalnu inhibitornu koncentraciju (engl. *Minimal Inhibitory Concentration*, MIC) za acetazolamid sa  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  na od  $0,007$  do  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Nadalje, skupina inhibitora 1, 3, 4 – tiadiazola pokazala je inhibitornu aktivnost *in vivo* u miševa inficiranim VRE sojevima<sup>2</sup>. Pokazano je da *in vivo* imaju veću efikasnost od linezolida, antibiotika inače korištenog za tretiranje rezistentnih sojeva. Nedavno je kod pacijenta inficiranog sojem *E. faecalis* uočena pojačana osjetljivost na antibiotik gentamicin. Nakon što je soj izoliran i sekvenciran mu genom, uočeno je da posjeduje mutaciju na genu koji kodira za  $\alpha$ -UA. Uočeno je također da navedena mutacija značajno povećava permeabilnost membrane što omogućava lakši ulazak gentamicina u stanicu. Po uzoru na to, provedena su klinička ispitivanja utjecaja acetazolamida na sklonost bakterije antibiotiku za osam genetski različitih sojeva *E. faecalis*. Studija je pokazala da acetazolamid u svim sojevima snižava MIC gentamicina povećavajući

permeabilnost membrane. Ovi rezultati otvaraju nove mogućnosti kombiniranih terapija antibiotika s inhibitorima UA.

Problematika koja se javlja implementacijom inhibitora UA u postupke liječenja rezistentnih bakterija jest ta što *in vivo*, inhibitori UA nedovoljno su specifični. Budući se velika većina njih razvija prenamjenom dosad poznatih lijekova, osim što inhibiraju bakterijske UA, inhibiraju i ljudske. To sa sobom nosi neželjene nuspojave, a također i utječe na efikasnost samog lijeka u obrani protiv bakterija. Da bi neki od tih spojeva mogao proći pretkliničku fazu, mora se postići dovoljno visoka specifičnost prema bakterijskim UA. U prilog tome ide činjenica da su ugljične anhidraze sisavaca isključivo  $\alpha$ -klase, dok su kod bakterija, osim  $\alpha$ , prisutni i ostali tipovi. Zbog jako velikih strukturnih razlika između  $\alpha$  i  $\beta$ -klasa,  $\beta$ -klase vrlo vjerojatno imaju najveći potencijal kao mete lijekova. Također problem s kojim se susreće ovo novo razvijeno polje jest sve veća incidencija alergija na derivate sulfonamida u općoj populaciji. Zadnjih godina, u ispitivanju su nestandardni inhibitori UA. Spojevi koji daju zadovoljavajuće rezultate su fenoli, poliamini, kumarini, karboksilne kiseline i njihovi derivati<sup>1-3</sup>. Od standardnih inhibitora, osim strukturno, razlikuju se po mehanizmu inhibicije, mnogi od njih vežu se neposredno uz aktivno mjesto i blokiraju ulaz supstratima UA.

## 2.2. Bakterije rezistentne na antibiotike

Lista prioriteta patogenih bakterija koju je ove godine revidirala Svjetska zdravstvena organizacija daje smjernice za daljnja istraživanja novih antibiotika, tj. alternativa antibioticima, no ugljične anhidraze u izvještaju nisu spomenute. Prethodnim poglavljem ustanovljena je važnost inhibitora UA kao potencijalnih alternativa antibioticima, stoga će autor ovim poglavljem nastojati dati pregled informacija dostupnih o važnijim bakterijama s ovog popisa.

U kritičnoj skupini bakterija WHO-ove liste prioriteta smješteni su *Enterobacterales* otporni na karbapeneme, tj. *Enterobacterales* otporni na cefalosporine treće generacije, *Acinetobacter baumannii* i kasnijom revizijom, nadodane su bakterije vrste *Mycobacterium tuberculosis* otporne na rifamicine. Strukture ugljičnih anhidraza određene su samo za *A. baumannii* (PDB kod: 8GPM<sup>22</sup>, Slika 8) i *M. tuberculosis* (PDB kod: 1YM3<sup>23</sup>).



Slika 10. Struktura  $\gamma$ -ugljične anhidraze *A. baumannii*; ljubičaste kuglice su ioni cinka u aktivnom mjestu, središnja zelena kuglica je ion kalcija. PDB kod: 8GPM<sup>22</sup>

U skupinu *Enterobacteriales* između ostalog pripada *E. coli* koja je daleko najistraživanija bakterija na cijeloj listi. Poznato je iz prethodnih poglavlja da su vršeni *in vivo* pokusi inhibicije UA *E. coli*.

Među skupinom bakterija visokog prioriteta najviše se ističu *Staphylococcus aureus* (otporan na meticilin, engl. *Methicilin-Resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) i *Enterococcus faecium* (otporan na vankomicin). Zanimljivo je da ni za jednu od tih bakterija strukture ugljičnih anhidraza nisu dostupne u bazi, no poznato je iz prethodnog poglavlja da je Flahertyeva grupa<sup>21</sup> provela *in vivo* eksperiment u kojem je UA *E. faecium* uspješno inhibirana derivatima acetazolamida. Jedna grupa dobila je uspješne rezultate inhibicije za što se misli da su inhibirane  $\beta$  i  $\gamma$ -UA *S. aureus* s više tipova inhibitora od kojih je najuspješnije rezultate davao antihistaminik famotidin, po strukturi sulfamid<sup>21,24</sup>.

Od ostalih rezistentnih bakterije za vrstu *P. aeruginosa* u PDB bazi dostupne su strukture UA za različite kristalne forme (PDB kodovi: 4RXY<sup>25</sup>, 5JJ8<sup>26</sup>), dok je za *N. gonorrhoeae* dostupno sedam kristalnih struktura ugljične anhidraze, među kojima su strukture kompleksa enzima s četiri različita inhibitora. Slikom 9 prikazana je kristalna struktura UA bakterijske vrste *N. gonorrhoeae* u kompleksu s inhibitorom acetazolamidom.



Slika 3. Struktura ugljične anhidraze *N. gonorrhoeae* u kompleksu s acetazolamidom. Sivom kuglicom prikazan je atom cinka, PDB kod: 8DPO<sup>27</sup>

Provedeni su *in vivo* eksperimenti u kojima je praćen utjecaj acetazolamida i etoksizolamida na rast *N. gonorrhoeae*<sup>2</sup>. Obje molekule smanjile su proliferaciju s time da se etoksizolamid pokazao kao bolji inhibitor.



## § 3. ZAKLJUČAK

Ugljične anhidraze pokazale su svoju ključnu ulogu u životnom ciklusu bakterija, a posljedično i u njihovoj proliferaciji. Inhibitori UA, bilo sami ili u kombiniranoj terapiji s antibioticima pokazuju potencijal kao učinkoviti antimikrobni lijekovi. Inhibitori na bazi sulfonamida, poput acetazolamida, daju pozitivne rezultate inhibicije bakterijskih UA što dovodi do smanjenja bakterijske aktivnosti: umnožavanja bakterijskih kolonija, odnosno smanjenja njihove virulentnosti u organizmu domaćinu. Još uvijek je po pitanju inhibitora UA provedeno premalo istraživanja in vivo, također izazovi ostaju u postizanju specifičnosti inhibitora prema bakterijskim UA u odnosu na ljudske sa svrhom povećanja učinkovitost inhibitora i izbjegavanja neželjenih nuspojava u pacijenata.

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) u svojoj listi prioriteta patogenih bakterija ne spominje ugljične anhidraze kao metu potencijalnih terapija u borbi protiv rezistentnih bakterija. Uzevši u obzir rezultate koje daju ovi spojevi, čiji pregled je dan ovim radom, inhibitori UA trebali bi biti razmotreni u daljnjim istraživanjima alternativa klasičnim antibioticima. Uključivanje UA kao ciljeva u budućim smjernicama moglo bi unaprijediti istraživanja i razvoj novih antimikrobnih strategija, pogotovo u kontekstu borbe protiv bakterijske rezistencije.

Da bi došlo do značajnijih napredaka u navedenom polju, nužno je podrobnije istražiti ulogu ugljičnih anhidraza u bakterijskom metabolizmu. Također, pretraživanje PDB baze upućuje na činjenicu da velik broj struktura za bakterije visokog prioriteta kao što su npr. *S. aureus* i *E. faecium* nije riješen. Rješavanje struktura omogućilo bi veću specifičnost pri izboru potencijalnih inhibitora, dok bi dublje razumijevanje UA u vidu bakterijskog metabolizma dalo bolji uvid pri selekciji bakterija na koje je ova metoda terapije uopće primjenjiva, odnosno hoće li kod nekih vrsta terapiju biti potrebno modificirati.

## § 4. LITERATURNI IZVORI

1. A. Nocentini, C. Capasso, and C. T. Supuran, *Antibiotics* **12** (2023).
2. C. Capasso, and C. T. Supuran, *Expert Opin Ther Pat* **34** (2024) 465–474.
3. C. T. Supuran, and C. Capasso, *Metabolites* **7** (2017).
4. S. Huang, Y. Xue, E. Sauer-Eriksson, L. Chirica, S. Lindskog, and B.H. Jonsson, *Journal of molecular biology*, **283** (1998) 301–310.
5. V. Alterio, E. Langella, M. Buonanno, D. Esposito, A. Nocentini, E. Berrino, S. Bua, M. Polentarutti, C. T. Supuran, S. M. Monti, and G. De Simone, *Comput Struct Biotechnol J* **19** (2021) 3427–3436.
6. G. De Simone, A. Di Fiore, C. Capasso, and C. T. Supuran, *Bioorg Med Chem Lett* **25** (2015) 1385–1389.
7. S. Lindskog, *Pharmacology & therapeutics* **74** (1997) 1–20.
8. J. D. Cronk, J. A. Endrizzi, M. R. Cronk, J. W. O’neill, and K. Y. J. Zhang, *Protein Science* **10** (2001) 911–922.
9. C. T. Supuran, *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **20** (2024) 143–155.
10. A. Nocentini, C. T. Supuran, and C. Capasso, *J Enzyme Inhib Med Chem* **36** (2021) 1988–1995.
11. C. T. Supuran, *Bioorg Med Chem Lett* **20** (2010) 3467–3474.
12. M. A. Pinard, B. Mahon, and R. McKenna, *Biomed Res Int* **2015** (2015).
13. S. C. Frost, and R. McKenna (eds.), *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2014, str. 349–359.
14. C. Capasso, and C. T. Supuran, *J Enzyme Inhib Med Chem* **29** (2014) 379–387.
15. *How Do Antiglaucoma Carbonic Anhydrase Inhibitors Work?*, 12. svibnja 2021., RxList, [https://www.rxlist.com/how\\_do\\_antiglaucoma\\_carbonic\\_anhydrase\\_inhibitors/drug-class.htm](https://www.rxlist.com/how_do_antiglaucoma_carbonic_anhydrase_inhibitors/drug-class.htm) (datum pristupa 12.07.2024.).
16. R. Breslow, *Acc. Chem. Res.* **28** (1995) 146–153.
17. *WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance*, 17. svibnja 2024., World Health Organisation, <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461> (datum pristupa 10.07.2024.).

18. M. Šišić, *Mehanizam Djelovanja Toksina Difterije i Kolere*, Završni rad, Prirodoslovno–matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2019, str. 24–26.
19. A. B. Murray, M. Aggarwal, M. Pinard, D. Vullo, M. Patrauchan, C. T. Supuran, and R. McKenna, *ChemMedChem* **13** (2018) 2024–2029.
20. K. H. Sippel, A. H. Robbins, J. Domsic, C. Genis, M. Agbandje-Mckenna, and R. McKenna, *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **65** (2009) 992–995.
21. W. An, K. J. Holly, A. Nocentini, R. D. Imhoff, C. S. Hewitt, N. S. Abutaleb, X. Cao, M. N. Seleem, C. T. Supuran, and D. P. Flaherty, *J Enzyme Inhib Med Chem* **37** (2022) 1838–1844.
22. <https://www.rcsb.org/structure/8GPM> (datum pristupa: 11.07.2024.).
23. A. S. Covarrubias, A. M. Larsson, M. Högbom, J. Lindberg, T. Bergfors, C. Björkelid, S. L. Mowbray, T. Unge, and T. A. Jones, *Journal of Biological Chemistry* **280** (2005) 18782–18789.
24. L. J. Urbanski, S. Bua, A. Angeli, M. Kuuslahti, V. P. Hytönen, C. T. Supuran, and S. Parkkila, *J Enzyme Inhib Med Chem* **35** (2020) 1834–1839.
25. M. A. Pinard, S. R. Lotlikar, C. D. Boone, D. Vullo, C. T. Supuran, M. A. Patrauchan, and R. McKenna, *Bioorg Med Chem* **23** (2015) 4831–4838.
26. M. A. Pinard, J. J. Kurian, M. Aggarwal, M. Agbandje-Mckenna, and R. McKenna, *Acta Crystallographica Section: F Structural Biology Communications* **72** (2016) 573–577.
27. <https://www.rcsb.org/structure/8DPO> (datum pristupa: 13.07.2024.).