

# Fluor u prirodnim spojevima

---

Očić, Marko

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:217:902841>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-25**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Marko Očić

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

## **Fluor u prirodnim spojevima**

### **Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Zagreb, 2020. godina.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

19.8.2019.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

30.9.2020.

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Potpis:

## Sadržaj

§ SAŽETAK.....	1
§ 1. UVOD.....	2
§ 2. PRIRODNI SPOJEVI S FLUOROM.....	3
<b>2.1 BIOGENI I ABIOGENI SPOJEVI FLUORA.....</b>	<b>3</b>
ABIOTENI SPOJEVI FLUORA.....	3
BIOGENI SPOJEVI FLUORA.....	3
FLUOROACETAT.....	4
FLUOROACETON.....	6
$\omega$ -FLUORIRANE MASNE KISELINE.....	6
NUKLEOCIDIN.....	7
4-FLUOROTREONIN.....	8
<b>2.2 FLUORINAZA I ENZIMI FLUORINACIJSKOG CILKUSA.....</b>	<b>9</b>
STRUKTURA I FUNKCIJA 5-FLUORO-5-DEOKSIADENOZIN-SINTAZE.....	11
5-FLUORO-5-DEOKSIADENOZIN-FOSFORILAZA.....	12
5-FLUORO-5-DEOKSIRIBOZA-1-FOSFAT-IZOMERAZA.....	13
FLUOROACETALDEHID-DEHIDROGENAZA.....	13
FLUOROTREONIN-TRANSALDOLAZA.....	13
<b>2.3 ENZIMI SLIČNI FLUORINAZI.....</b>	<b>14</b>
KLORINAZA.....	14
HIDROLAZA.....	14
<b>2.4 PRIMJENE FLUORINAZA I FLUORIRANIH SPOJEVA.....</b>	<b>15</b>
POLIKETIDNI SPOJEVI S FLUOROM.....	15
RADIOANALITIČKO PRAĆENJE.....	16
§ 3. ZAKLJUČAK.....	18
§ 4. LITERATURNI IZVORI.....	19



## § SAŽETAK

Fluor je izrazito elektronegativan element koji daje specifična svojstva u organskoj kemiji i biokemiji. Takve fluorirani spojevi se koriste kao razni lijekovi i zamjenske molekule u nekim ciklusima odnosno kemijskim reakcijama. Neki fluorirani spojevi mogu nastati u živim bićima, odnosno biogeni spojevi, dok neki mogu nastati i na abiogene načine. Biogeni spojevi nastaju većinom u bakterijama i biljkama gdje su najistraženije bakterije iz roda *Streptomyces*. U tim bakterijama je otkrivena prvi biogeni enzim fluorinaze, enzim koji ima sposobnost fluorirati organske spojeve. Taj enzim predstavlja veliko otkriće u grani biokemije pošto se može koristiti u raznim reakcijama fluorinacije i otvara put za nova otkrića lijekova i biološki važnih spojeva.

## § 1. UVOD

Fluor je kemijski element oznake F s atomskim brojem devet koji spada u skupinu halogenih elemenata. Pri standardnim uvjetima je postojan kao otrovan žuti plin izrazite reaktivnosti. Posebnost fluora je u tome što je on najelektronegativniji element po Pauling-ovoj skali elektronegativnosti (Slika 1), što je odgovorno za velik dio kemije fluora. Elektronegativnost fluora igra veliku ulogu u stvaranju kemijskih veza jer će veze između fluora i većine ostalih elemenata, pogotovo onih niže elektronegativnosti, biti jako polarizirane. Drugim riječima, elektronska gustoća u vezama fluora i manje elektronegativnih elemenata, kao onih u organskoj kemiji tipa ugljik i vodik, će biti lokalizirana većinom oko fluora što dovodi do stvaranja organofluorida određenih svojstva i funkcija u organizmima živih bića. Zbog tih svojstava se povećava potražnja fluoriranih spojeva pogotovo u biokemiji te farmaciji gdje se fluorirani spojevi istražuju kao potencijalni lijekovi.<sup>10</sup>

Do danas je poznato samo nekoliko biogenih fluoriranih organskih spojeva nastalih u organizmima poput biljaka, no postoji mnogo njih sintetiziranih u laboratorijima od strane ljudi. Biogeni fluorirani spojevi najčešće nastaju u metabolizmu bakterija ili biljaka lokaliziranih u tropskim krajevima ili u Australiji. Najveći problem tih spojeva je to što njihovim nagomilavanjem u pojedinim u organizmima, bez načina probave ili razlaganja, dovodi do trovanja kao što je primjer kod fluoroacetata, najjednostavnijeg fluoriranog organskog spoja, čijom probavom dovodi do (2R,3R)-fluorocitrata, otrovnog za sisavce. Za sada većina metaboličkih puteva biogenih fluoriranih spojeva nije poznato, no otkrivena je enzimska aktivnost bakterije *Streptomyces cattleya* koja je zaslužna za stvaranje nekih fluoriranih spojeva. Najvažniji otkriveni enzim je fluorinaza koja katalizira fluoriranje pojedinih reakcija do stvaranja fluoriranih spojeva kao fluoroacetata i 2-fluorotreonina. Zbog rijetkosti biogenih fluoriranih spojeva otkriće tog enzima daje važan uvid u bio-sintezu fluorometabolita te njegovo daljnje istraživanje može doprinijeti ne samo biokemiji, već farmaceutskoj industriji koja može iskoristiti to znanje kao temelj za proučavanje sinteze i probave fluoriranih spojeva u živim bićima.<sup>10,14</sup>



H 2.1																He ---	
Li 1.0	Be 1.5											B 2.0	C 2.5	N 3.0	O 3.5	F 4.0	Ne ---
Na 0.9	Mg 1.2											Al 1.5	Si 1.8	P 2.2	S 2.5	Cl 3.0	Ar ---
K 0.8	Ca 1.0	Sc 1.3	Ti 1.5	V 1.6	Cr 1.6	Mn 1.5	Fe 1.8	Co 1.8	Ni 1.8	Cu 1.9	Zn 1.6	Ga 1.6	Ge 1.8	As 2.0	Se 2.4	Br 2.8	Kr 3.0
Rb 0.8	Sr 1.0	Y 1.2	Zr 1.4	Nb 1.6	Mo 1.8	Tc 1.9	Ru 2.2	Rh 2.2	Pd 2.2	Ag 1.9	Cd 1.7	In 1.7	Sn 1.8	Sb 1.9	Te 2.1	I 2.5	Xe 2.6
Cs 0.7	Ba 0.9	La-Lu 1.1-1.2	Hf 1.3	Ta 1.5	W 1.7	Re 1.9	Os 2.2	Ir 2.2	Pt 2.2	Au 2.4	Hg 1.9	Tl 1.8	Pb 1.8	Bi 1.9	Po 2.0	At 2.2	Rn ---
Fr 0.7	Ra 0.9	Ac-No 1.1-1.7															

Slika 1: Pauling-ova skala elektronegativnosti. Preuzeto s reference Ref. 1.

## § 2. PRIRODNI SPOJEVI S FLUOROM

### 2.1 BIOGENI I ABIOGENI SPOJEVI FLUORA

#### ABIOGENI SPOJEVI FLUORA

Fluorirani spojevi mogu nastati ne samo biogeno, to jest u živim organizmima, već i na abiogen način. Na primjer, u području oko vulkana mogu nastati fluorirani spojevi, a oni nastaju zbog prisutnosti fluorovodika nastalog emisijom plinova iz vulkana. Također u doticaju s ostacima organskih tvari, lava i ekstremni uvjeti poput visoke temperature i promjene u tlaku daju kao rezultat fluorirane spojeve gdje je jedan primjer heksafluoropropan.

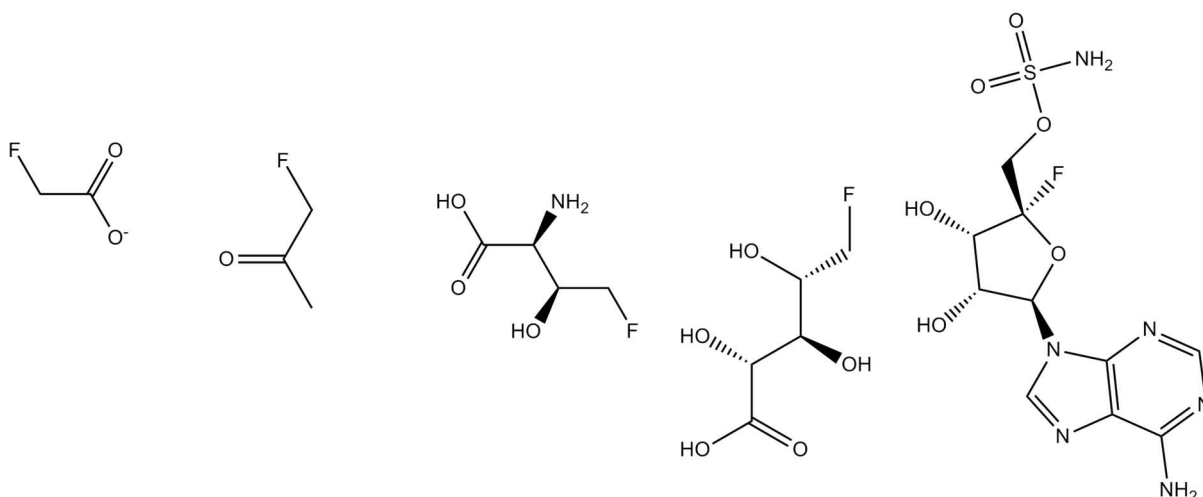
Osim oko područja vulkana, fluorirani spojevi se mogu naći u stjenama i rudama koje su bile korištene u rudarskoj industriji. To se smatra kao jedan od najvećih izvora fluoriranih spojeva u atmosferi, a osim toga još jedan abiogeni izvor su metamorfne stijene.<sup>10</sup>

#### BIOGENI SPOJEVI FLUORA

Biogeni ili prirodni spojevi fluora se smatraju svi spojevi nastali u živim bićima, a kao najčešći izvori spojeva su neke biljake, neke bakterije te u rijetkim slučajevima i neke vrste morskih životinja. Ulazak fluora, to jest fluoridnog aniona u metabolički put biljaka nije u potpunosti

poznat te je kompliciranije istraživanje nego kod bakterija na kojima se bazira većina dosadašnjih istraživanja. Većina tih spojeva ima svojstvo otrovnosti, kao što je primjer kod jednog od najjednostavnijih takvih spojeva: fluoroacetata.<sup>10</sup>

Neke bakterije, kao što je to najviše istražena bakterija *Streptomyces catleya*, koriste enzim fluorinazu ili njemu slične enzime za sintezu fluoriranih spojeva koji se mogu koristiti u razne medicinske i biološki važne svrhe. Biljke koje stvaraju fluorirane spojeve su najčešće locirane na području Australije, Afrike i Južna Amerike koje imaju klimu sličnu tropskoj. Te biljke su uzrok smrti životinja koje su se koristile njima kao izvorom hrane, a time je i bilo štetno za čovjeka koji su kao hranu koristili te životinje. Pošto su ti spojevi otrovni za organizam čovjeka, u ekstremnim slučajevima je došlo i do smrti. Najviše istraženi biogeni spojevi s fluorom su fluoroacetat, fluoroaceton,  $\omega$ -fluorirane masne kiseline, 4-fluortreonin te jedan od prvih pronađenih fluoriranih antibiotika nukleocidin proizveden u bakteriji iz obitelji *Streptomyces*.<sup>9-12</sup>

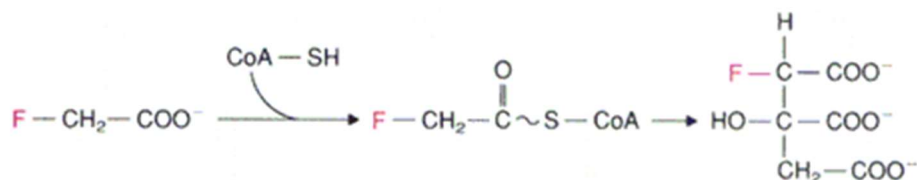


**Slika 2:** Prikaz nekoliko biogenih fluoriranih spojeva. S lijeva na desno prikazani su fluoroacetat, fluoroaceton, 4-fluortreonin, 5-fluoro-2,3,4-trihidroksipentanska kiselina i nukleocidin. Slika je nacrtana pomoću programa *ChemDraw*.

### FLUOROACETAT

Fluoroacetat je prvi primjer fluoriranog spoja nastalog u živim bićima. Pronađen je u nekoliko biljaka u zemljama tropske klime. Fluoroacetat se smatra nervnim otrovom u sisavaca, no to

nije istina. Nervni otrov je zapravo produkt metaboličkog puta fluoroacetata: (2*R*,3*R*)-fluorocitrat. On nastaje kao produkt prelaska fluoroacetata u fluoroacetil-CoA (fluoroacetil koenzim A), koji daljnjom obradom prelazi u (2*R*,3*R*)-fluorocitrat, a taj proces je stereospecifičan pa će samo on nastati kao produkt. (2*R*,3*R*)-fluorocitrat djeluje kao blokator, odnosno inhibitor za Krebsov ciklus prilikom razgradnje masti, šećera i proteina. Prilikom normalnog Krebsovog ciklusa dolazi do stvaranja citrata iz acetata te daljnjim prolaskom kroz ciklus prelazi u cis-akonitat. S druge strane, kao priprema za Krebsov ciklus fluoroacetat prelazi u (2*R*,3*R*)-fluorocitrat koji se ne može dalje razgraditi putem Krebsovog ciklusa, te nagomilava se u tijelu kao nervni otrov.<sup>9-12</sup>



**Slika 3:** Pretvorba fluoroacetata u fluorocitrat tijekom Krebsovog ciklusa. Prikazana je pretvorba iz fluoroacetata u fluoroacetil-CoA pa u fluorocitrat. Preuzeto iz Ref. 2.

Fluoroacetat se stoga razlaže u biljkama i bakterijama putem različitih mehanizmima koji osiguravaju da iako stanica sadrži fluoroacetat, neće doći do narušavanja stanice i organizma. To je moguće pretvorbom fluoriranog spoja u kemijsku vrstu koja neće sudjelovati u važnim kemijskim procesima u tijelu te neće se nagomilavati kao otrov za stanicu. Također postoje i enzimi poput fluoroacetil-koenzim A-tioesteraze koji ima veliku specifičnost za fluoroacetat te ga razgrade kako nebi ušao u važne biološke cikluse bakterije poput ciklusa limunske kiseline.<sup>9,10</sup>

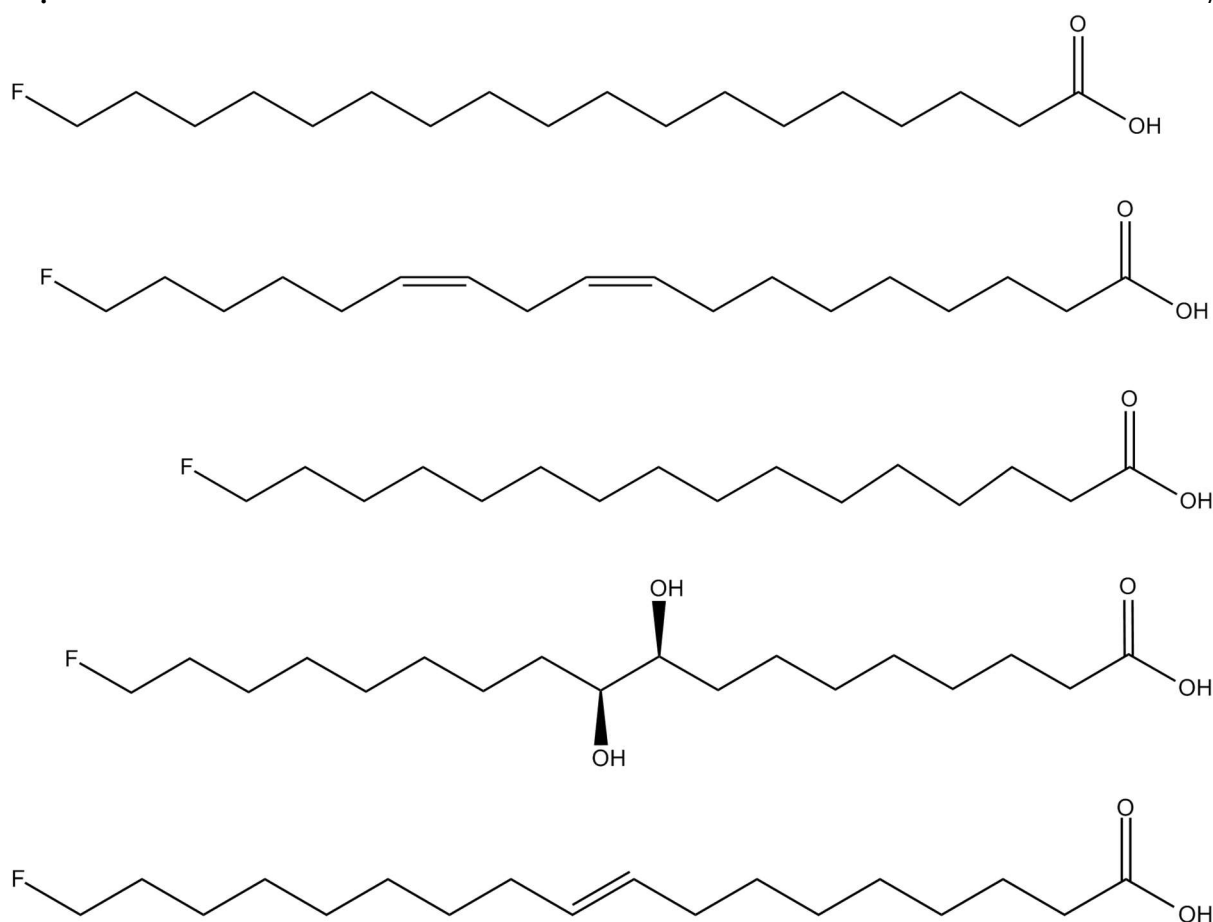
## FLUOROACETON

Fluoroaceton je zanimljiva supstanca jer se ne može odrediti sa sto postotnom sigurnošću kao biogena fluorirana vrsta. Naime, fluoroaceton se smatra za nusprodukt razgradnje  $\omega$ -fluoriranih masnih kiselina te ima svojstvo topljivosti u vodi. Pošto se reakcije razgradnje odvijaju u živom biću, odnosno u vodenom mediju, fluoroaceton prelazi u oblik fluoroaldehida s većom topljivosti i stabilnosti. S time se može zaključiti da se fluoroaceton zapravo ne može smatrati pravom biogenom fluoriranom vrstom već kao rjeđi oblik produkta nastalog razgradnjom  $\omega$ -fluoriranih masnih kiselina.<sup>9-12</sup>

## $\omega$ -FLUORIRANE MASNE KISELINE

$\omega$ -fluorirane masne kiseline su oblici fluoriranih biogenih vrsta koje su nastali u nekim biljkama iz fluoroacetata, u koji se također ponovno mogu razgraditi  $\beta$ -oksidacijom. To svojstvo je prisutno samo kod masnih kiselina s parnim brojem C-atoma jer samo njihovom razgradnjom će se doći do fluoroacetata.  $\omega$ -fluorirane masne kiseline koje nemaju paran broj C-atoma, odnosno imaju neparan broj se neće razgraditi do fluoroacetata i ne mogu iz njega nastati.

Smrtnost kod parnih  $\omega$ -fluoriranih masnih kiselina može biti veća nego kod fluoroacetata. Razlog tome je što su  $\omega$ -fluorirane masne kiseline lipofilne i mogu se za razliku od fluoroacetata apsorbirati čak i kroz kožu. Osim toga, pretvorba  $\omega$ -fluoriranih masnih kiselina do fluorocitrata je efikasnija nego pretvorba fluoroacetata, a budući da je fluorocitrat otrovan, opasnost od smrti je veća za razgradnju  $\omega$ -fluorirane masne kiselina. Jedni od najpoznatijih primjera parnih  $\omega$ -fluoriranih masnih kiselina su: fluorooleinska kiselina, fluoropalmitinska kiselina, fluorolinoleinska kiselina i fluorostearinska kiselina.<sup>9-12</sup>



**Slika 4:** Strukture  $\omega$ -fluoriranih masnih kiselina. Odozgo prema dolje su to: fluorostearinska kiselina, fluorolinoleinska kiselina, fluoropalmitinska kiselina, *threo*-18-fluoro-9,10-dihidroksistearinska kiselina i fluorooleinska kiselina. Slika je napravljena u programu *ChemDraw*.

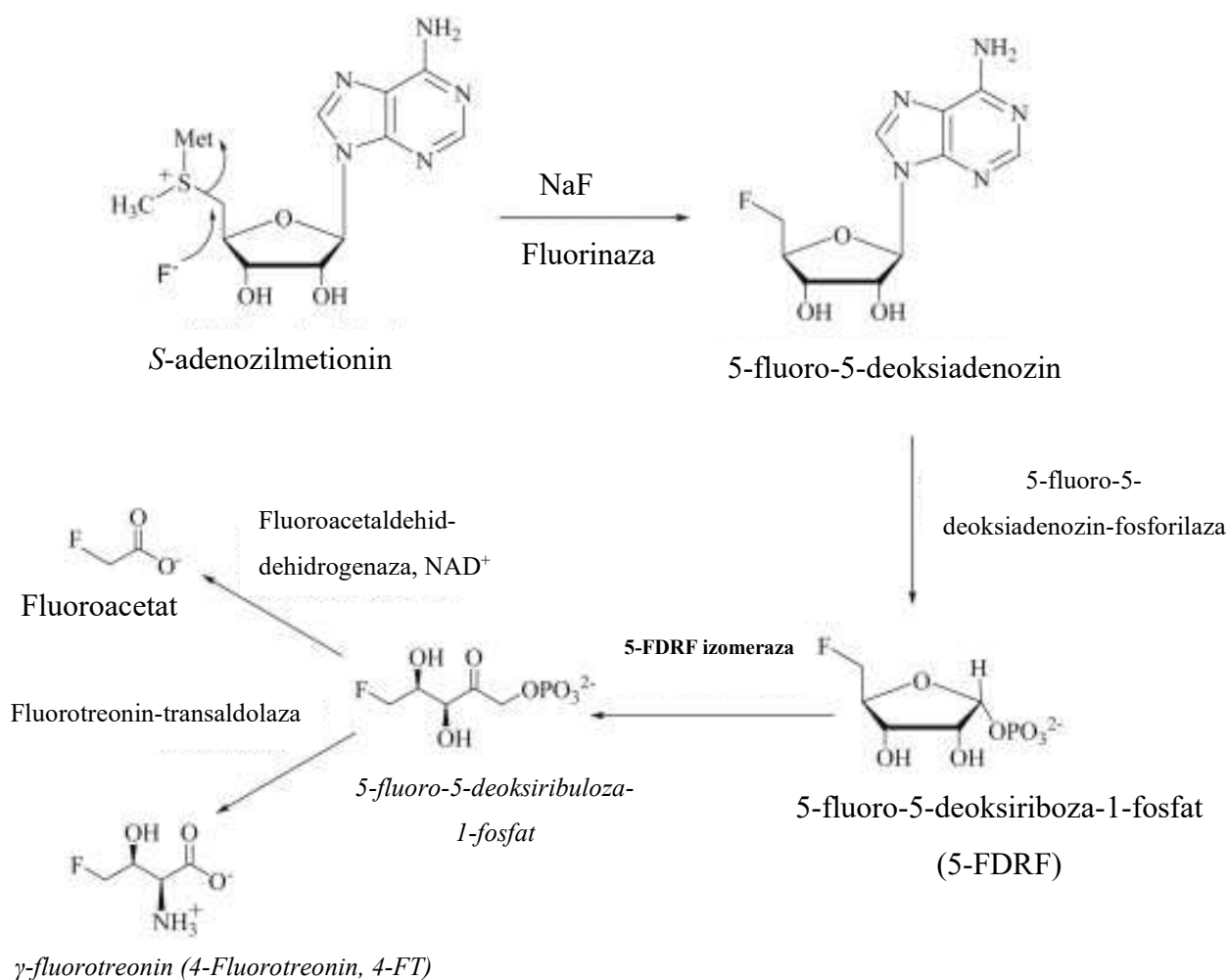
### NUKLEOCIDIN

Nukleocidin je prvi otkriveni antibiotik koji nastaje u živim organizmima, a da posjeduje fluor. Sam antibiotik nastaje u bakteriji iz roda *Streptomyces* pod imenom *Streptomyces calvus*. Nukleocidin ima širok raspon djelovanja, to jest napada velik broj bakterija, no njegova konzumacija može biti fatalna zbog otrovnosti. Kako napreduje biokemija i biologija bakterija, tako se s vremenom povećava korisnost bakterije *Streptomyces calvus*. Mehanizam kojim nastaje nukleocidin nije istražen u potpunosti te se u budućnosti smatra da će se moći ubaciti plazmid s točno određenim genima za nastajanje antibiotika u bakteriju roda *Streptomyces* koji

neće biti otrovni i zadržati širok raspon djelovanja.<sup>10,12</sup>

#### 4-FLUOROTREONIN

4-FT (4-fluorotreonin) je fluorirana aminokiselina koja nastaje u metaboličkim putevima bakterije *Streptomyces cattleya* kao nusprodukt nastajanja antibiotika tienamicina uz nastajanje fluoroacetata. To je moguće samo ako u bakteriji ili na hranjivoj podlozi na kojoj se bakterija uzgaja postoji izvor fluora.<sup>9-12</sup>



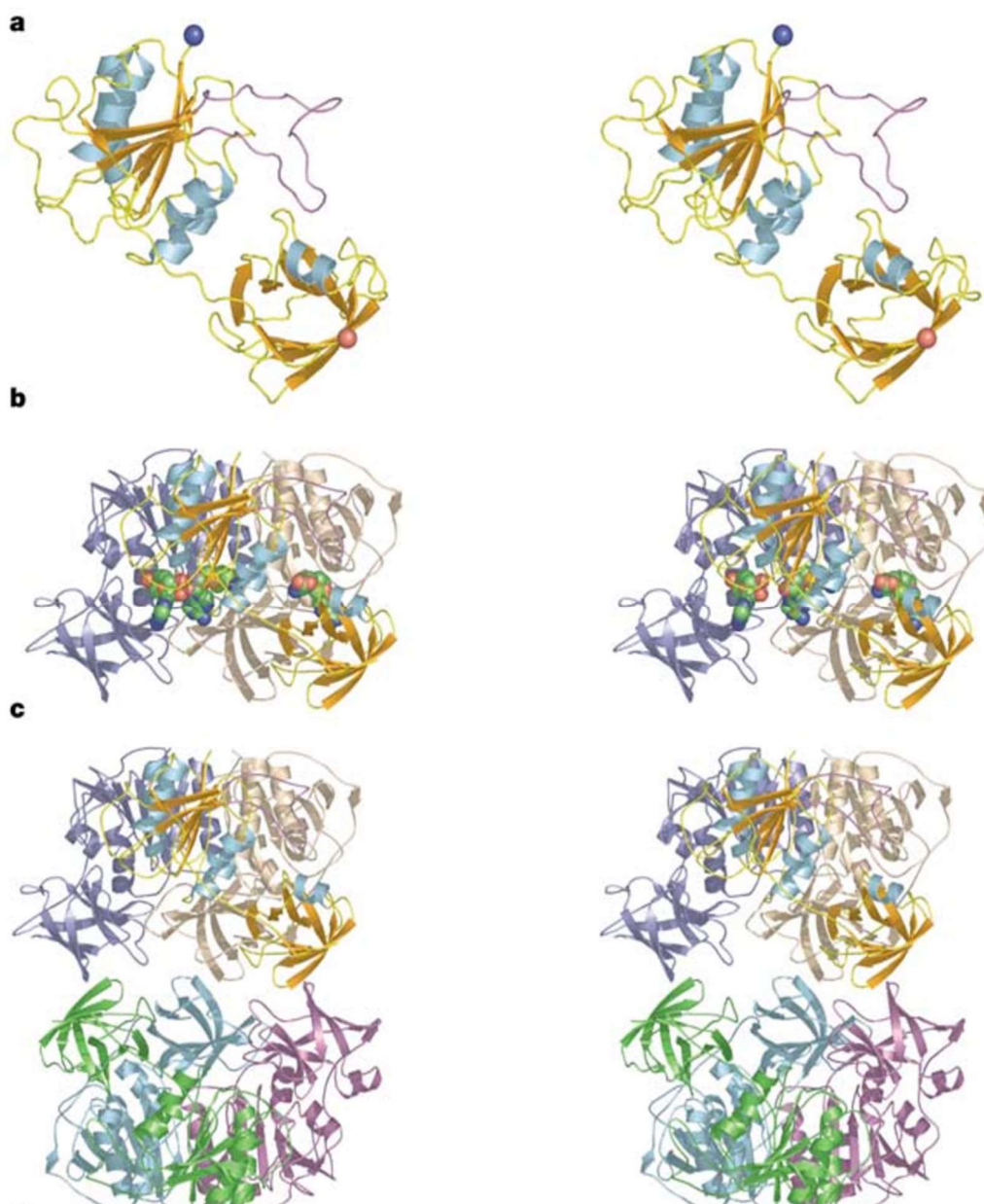
**Slika 5:** Sinteza 4-fluorotreonina ( $\gamma$ -fluorotreonin) i fluoroacetata uz enzim fluorinazu u bakteriji *Streptomyces cattleya*. Prilagođeno i preuzeto iz Ref. 3.

Reakcija sinteze 4-FT i fluoroacetata je praćena markerima  $^{13}\text{C}$  i  $^2\text{H}$  gdje je dokazano da je kao glavni izvor C atoma fluorirajućem enzimu najvjerojatnije piruvat, glicerol ili neki njima sličan intermedijer za stvaranje fluoroacetata, te *S*-adenozilmetionin kao izvorni spoj za nastajanje 4-FT. Stoga se glikolitički proces u bakteriji smatra kao najvjerojatniji put nastanka fluoroacetata, a nastajanje 4-FT je opisano prema slici 5. Enzim koji je pronađen u bakteriji i sudjeluje u nastanku oba fluorirana spoja je fluorinaza. *S*-adenozilmetionin u bakteriji s izvorom fluoridnih iona će djelovanjem fluorinaze osloboditi metionin, a enzim će na njegovo mjesto vezati fluoridni anion. Novonastali 5-fluoro-5-deoksiadenozin će uz djelovanje fosforilitičkog enzima zamijeniti adenozin s fosfatnom skupinom te izomerizirati u ribuloznu formu uz djelovanje enzima 5-FDRF izomeraze. 5-fluoro-5-deoksiribuloza-1-fosfat je spoj iz kojeg može doći do nastajanja fluoroacetata ili 4-fluorotreonina. 4-fluorotreonin će nastati djelovanjem enzima fluorotreonin transaldolaze, no prije toga će djelovati aldolaza na 5-fluoro-5-deoksiribuloza-1-fosfat što daje fluoroacetaldehid. Fluoroacetaldehid će zajedno s treoninom uz djelovanje već prije spomenutog enzima fluorotreonin transaldolaze kao produkt dati 4-fluorotreonin. Otrovnost 4-FT i fluoroacetata se mora regulirati pošto ni same bakterije nisu otporne na njihovu toksičnost, a velik regulator je sam fluoridni anion, to jest njegova količina u bakteriji. Što ima manje fluoridnog aniona, manje će nastajati 4-fluorotreonina.<sup>9-12</sup>

Proučavanje metaboličkih puteva fluoroacetata i 4-fluorotreonina dalo je veliki doprinos istraživanju fluoriranih spojeva u bakterijama roda *Streptomyces*, i dovelo je do otkrića enzima fluorinaze, enzima odgovornog za fluoriranje organskih spojeva.<sup>10,12</sup>

## **2.2 FLUORINAZA I ENZIMI FLUORINACIJSKOG CILKUSA**

Fluorinaza je enzim koji katalizira fluorinaciju organskih spojeva u živim organizmima pomoću anorganskog fluora. Fluorinaza je prvo otkrivena u bakteriji *Streptomyces cattleya* u pretvorbi *S*-adenozilmetionina u 4-fluorotreonin, a ime enzima koji fluorira *S*-adenozilmetionin je 5-fluoro-5-deoksiadenozin sintaza. To je prvi nativni enzim koji pretvara anorganski fluorid u fluor vezan za organsku molekulu o kojem je najviše istraženo. Osim njega je u laboratoriju proizvedeno nekoliko enzima koji mogu zamijeniti njegovu funkciju.<sup>4,7,10</sup>



**Slika 6:** Prostorna struktura enzima fluorinaze, odnosno 5-fluoro-5-deoksiadenozin-sintaze u bakteriji *Streptomyces cattleya*. **a)** monomer enzima čija je struktura opisana kao dvije domene, *N*-domena s *N*-terminalnim krajem (gornja polovica) i *C*-domena (donja polovica) s karboksi terminalnim krajem, povezane s petnaest aminokiselina. **b)** prikaz trimera s tri molekule *S*-adenozilmetionina. **c)** kvartarna, heksamerna struktura 5-fluoro-5-deoksiadenozin-sintaze, sačinjena od dimera trimera. Prilagođeno i preuzeto iz Ref. 4.

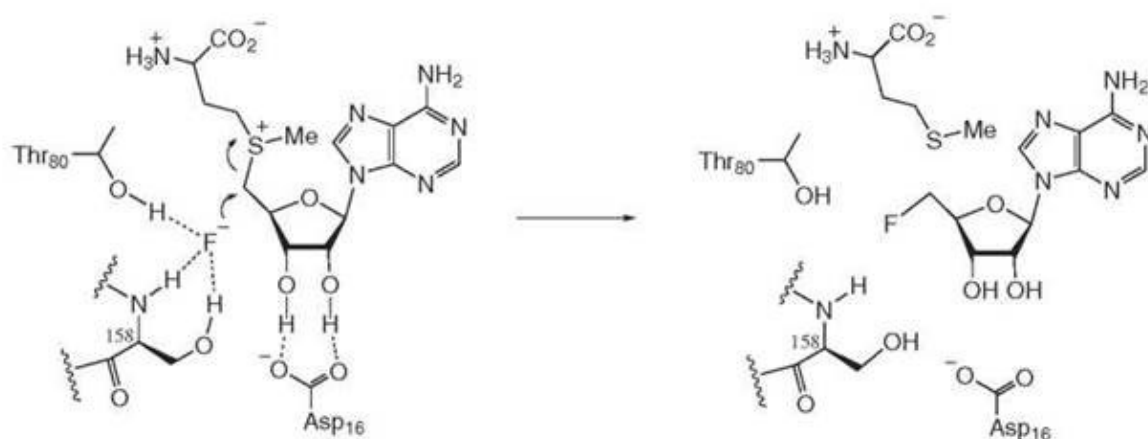


5-fluoro-5-deoksiadenozin-sintaza u obliku monomera je povezana s petnaest aminokiselina u obliku dugog lanca, a dvije domene N- i C- domena su sačinjene od  $\alpha$ -zavojnica i paralelnih te antiparalelnih  $\beta$ -ploča. N-domena koja je na slici 6 prikazana kao gornja polovica ima sedam antiparalelnih i paralelnih  $\beta$ -ploča koje se nalaze između  $\alpha$ -zavojnica. C-domena se sastoji od dvije  $\beta$ -ploče, jedna od četiri druga od pet antiparalelnih lanaca. N-terminalni kraj se nalazi u N-domeni i na slici 6 (a) je prikazan kao kuglica plavo-ljubičaste boje, a C-terminalni kraj se nalazi u C-domeni prikazan narančastom bojom.<sup>4,7,10</sup>

Trimer 5-fluoro-5-deoksiadenozin-sintaze je prikazan na slici 6 (b) te sastoji se od tri podjedinice nalik monomeru enzima 5-fluoro-5-deoksiadenozin-sintaze. U unutrašnjosti trimera se nalaze tri molekule *S*-adenozilmetionina koje su čvrsto vezane vodikovim vezama i neveznim interakcijama poput van der Waalsovih interakcija. Te molekule *S*-adenozilmetionina su dovoljno čvrsto vezane da se prilikom djelovanja enzima neće lagano odvojiti od mjesta vezanja njihovih djelova u trimeru. Ta činjenica nam govori da će se molekula supstrata, odnosno *S*-adenozilmetionina, prilikom djelovanja enzima raspasti na podjedinice, a to su metionin i ribozni prsten na koji je vezan adenin. Taj raspad nam također govori da dolazi do promjene strukture prilikom vezanja, odnosno djelovanja enzima. Kao i kod svakog enzima, vezanje supstrata je izrazito stereospecifično, gdje se podjedinice tijekom raspada supstrata vežu svaka na svoje specifično mjesto, odnosno odvajanja dvije podjedinice na koje se raspada supstrat: metionin i 5-fluoro-5-deoksiadenozin.<sup>4,7</sup>

Proces raspada supstrata se opisuje kao  $S_N2$  supstitucija. Naime, fluoridni anion putem enzima napada *S*-adenozilmetionin tako da veza između metionina i riboznog prstena slabi. Drugim riječima, reakcija mora biti brza, a pošto je metionin dobra izlazna skupina te uz to stabiliziran interakcijama unutar enzima reakcija će se brzo odvijati. Razlog zašto se reakcija treba ubrzati je nepovoljna stereokemijska energija između međustanja vezanja fluora na supstrat i elektrokemijske smetnje između kisika s adenzinskog prstena te fluoridnog iona koji rezultiraju velikom energetsom barijerom preko koje je potrebno prijeći za vezanje fluoridnog aniona, koja bez stabilizacije enzimom nebi bila moguća. Kao i prije navedeno te energije se smanjuju zbog interakcija unutar enzima koje stabiliziraju molekulu supstrata i ion fluora tako da se ta energija smanji dovoljno kako bi došlo do reakcije. Da je to  $S_N1$  supstitucija, energija

međustanja bi bila prevelika da se nadomjesti samo s pozitivnim interakcijama u enzimu pa je vjerojatnost za  $S_N1$  supstituciju vrlo mala. Takav enzim bi vrlo vjerojatno bio spor u stvaranju fluoriranih organskih spojeva što može biti smrtonosno za organizam u slučaju ako se unutar stanice nagomilava fluor u enzimu, a taj fluor se sporo veže ili daje neke neželjene produkte otrovne za stanicu.<sup>4,7</sup>



**Slika 7:** Reakcija  $S_N2$  supstitucije pri djelovanju enzima fluorinaze za nastajanje 5-fluoro-5-deoksiadenozin. Slika prikazuje i neke interakcije stabilizacije između fluora i *S*-adenozilmetionina kada su vezani za enzim Slika je preuzeta i prilagođena po Ref. 5.

#### 5-FLUORO-5-DEOKSIADENOZIN-FOSFORILAZA

5-fluoro-5-deoksiadenozin-fosforilaza je jedan od enzima fluorinacijskog ciklusa opisanog slikom 5 koji je otkriven kao enzim koji katalizira stvaranje 5-fluoro-5-deoksiriboza-1-fosfata iz 5-fluoro-5-deoksiadenozina i fosfata. Otkriven je tijekom istraživanja ciklusa stvaranja 4-fluorotreonina u bakteriji *Streptomyces cattleya*. Taj enzim predstavlja sljedeći korak nakon djelovanja enzima fluorinaze i katalizira važan korak u ciklusu fluoriranja organskih molekula u organizmima.<sup>7</sup>

## 5-FLUORO-5-DEOKSIRIBOZA-1-FOSFAT-IZOMERAZA

Ovaj enzim ima funkciju izomerizacije 5-fluoro-5-deoksiriboza-1-fosfata u njegov ribulozni, to jest lančani oblik. On predstavlja treći korak u nastajanju 4-fluorotreonina. Istraživanja ovog enzima su dovela do zaključka da se bez izomeraze, drugim riječima, bez 5-fluoro-5-deoksiribuloza-1-fosfata ne može nastaviti metabolički put fluora u bakteriji jer će iz njega nastati fluoroacetaldehid djelovanjem aldolaze.<sup>7</sup>

## FLUROACETALDEHID-DEHIDROGENAZA

Sljedeći korak fluorinacije i stvaranja 4-fluorotreonina se odvija grananjem u dva smjera: nastajanje fluoroacetata i nastajanje 4-FT. Fluoroacetat će nastati djelovanjem fluoroacetaldehid-dehidrogenaze na fluoroacetaldehid, zajednički prekursor 4-FT i fluoroacetata. Poput uobičajene dehidrogenaze, kao kofaktor u reakciji se koristi  $\text{NAD}^+$ , a produkti su voda i fluoroacetat te  $\text{NADH}$ .<sup>7</sup>

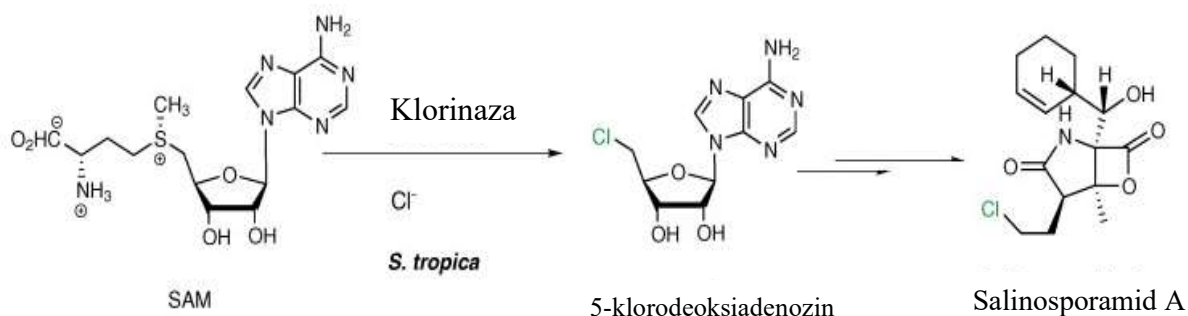
## FLURORTREONIN-TRANSALDOLAZA

Nakon nastanka fluoroacetaldehida, zajedno s treoninom ovaj enzim stvara 4-fluorotreonin. Reakcija se odvija s mehanizmom djelovanja transaldolaze slične onoj u reakciji puta pentoze-fosfata. Fluorotreonin transaldolaza će rekombinirati C-atome između treonina i fluoroacetaldehida kako bi nastao 4-fluorotreonin tako da se C-atom s bočnog ogranka treonina na koji je vezan hidroksilna skupina odvoji i formira acetaldehid na čije će mjesto doći fluoroacetaldehid. Ovaj enzim je poseban po tome što također sadrži i aldolaznu domenu, to jest postoje dvije domene koje najvjerojatnije čine ovaj enzim alosteričkim enzimom, no detalji aldolazne podjedinice nisu detaljno poznate kao djelovanje transferazne podjedinice.<sup>9</sup>

## 2.3 ENZIMI SLIČNI FLUORINAZI

### KLORINAZA

Klorinaza je jedan od najbližih srodnika fluorinaze, a da nije povezana s fluoriranjem i bakterijama roda *Streptomyces*. Iako im homologija aminokiselinskog slijeda nije velika, imaju sličan mehanizam u kojem klorinaza veže na *S*-adenozilmetionin i kloridni ion te daje metionin i 5-kloro-5-deoksiadenozin. Fluorinaza iako je vjerojatnost mala, ima mogućnost vezanja ne samo fluora nego već i klora dok klorinaza veže isključivo samo klor. Kao i kod fluorinaze reakcija vezanja klora je  $S_N2$  reakcija, a nastali produkt se koristi za biološku sintezu salinosporamida, spojeva koji se istražuju kao potencijalni lijekovi za rak. Klorinaza je otkrivena u bakteriji *Salinispora tropica* te u još nekoliko bakterija roda *Salinispora*, a same bakterije su pronađene u oceanskim sedimentima, to jest oceanskom tlu i stijenama.<sup>9</sup>

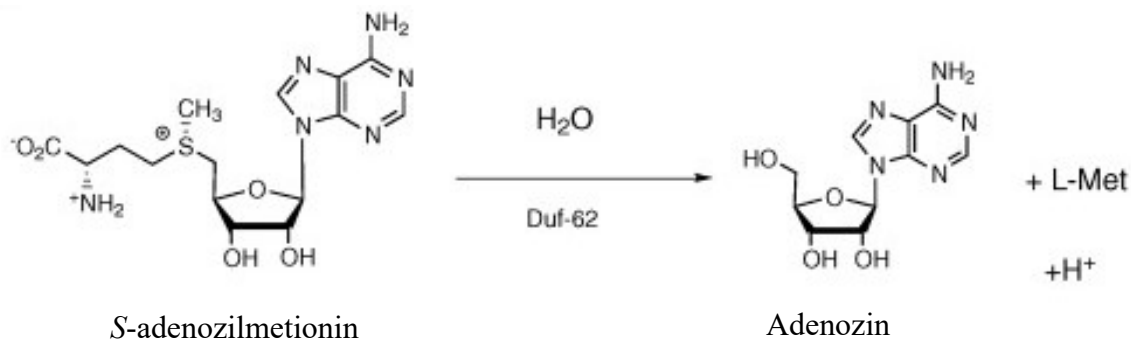


**Slika 8:** Shema native sinteze salinosporamida A djelovanjem enzima klorinaze u bakteriji *Salinispora tropica*. Prvi korak sinteze je nastajanje 5-kloro-5-deoksiadenozina koji ulaze u daljnji metabolički put nastanka salinosporamida. Slika je preuzeta i prilagođena po Ref. 6.

### HIDROLAZA

Hidrolaza, ili enzim obitelji duf-62 je sljedeći najbliži enzim slične funkcije nakon klorinaze. Duf-62 stoji kao kratica za „domains of unknown function“ ili domene nepoznate funkcije i jedan od najviše istraženih enzima je onaj iz arheje *Pyrococcus horikoshii*. Enzim napada *S*-

adenozilmetionin s hidroksidom kao nukleofilom i u procesu daje metionin i adenzin. Kao i klorinaza, hidroliza nema mogućnost korištenja fluora kao nukleofila, niti klora.<sup>9</sup>



**Slika 9:** Enzimatsko djelovanje enzima duf-62 koji koristi vodu kao izvor hidroksidnog iona kao nukleofila. Slika je preuzeta i prilagođena po Ref. 6.

## 2.4 PRIMJENE FLUORINAZA I FLUORIRANIH SPOJEVA

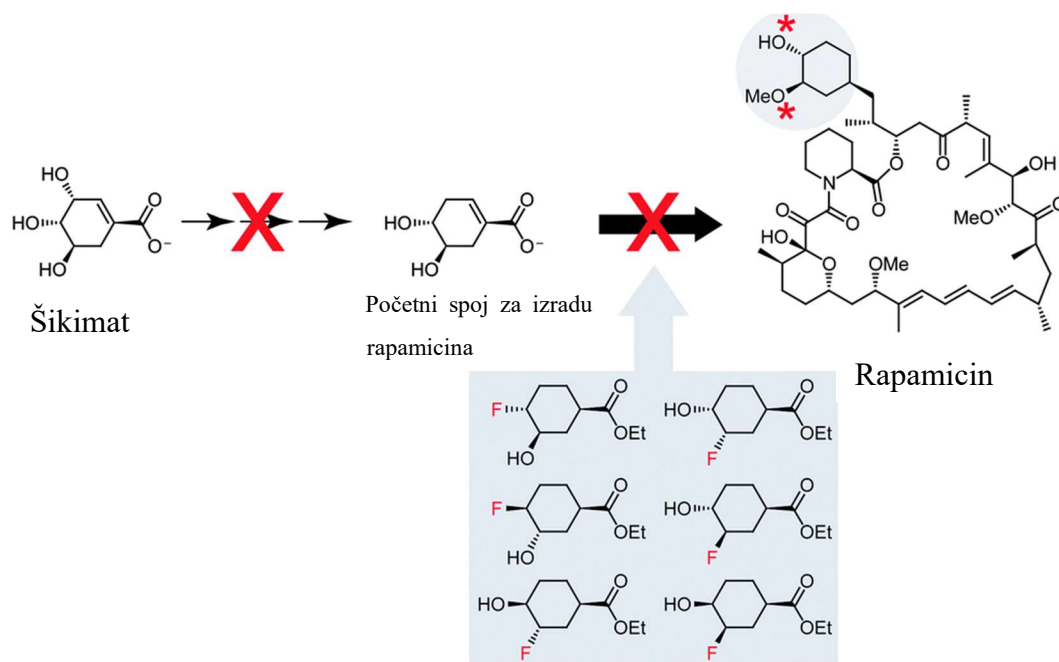
Fluorinaza i njemu slični enzimi se danas koriste u istraživanjima u kemiji primarno u farmakologiji i medicinskoj biokemiji kao potencijalni proizvođači lijekova ili farmakološki važnih spojeva. Nadalje, ti enzimi se mogu koristiti i za proučavanje metaboličkih ciklusa gdje se koristi radioaktivni izotop fluora, <sup>18</sup>F.<sup>7,9,11</sup>

### POLIKETIDNI SPOJEVI S FLUOROM

Poliketidni spojevi su spojevi koji koriste molekulu acetil-koenzima A ili njegovih derivata kao ishodišnu molekulu, a nastaju njegovom kondenzacijom. Kondenzirani oblici sadrže β-keto skupine po čemu dobivaju ime poliketodni spojevi. U slučaju fluoriranih spojeva kao ishodišna molekula se koristi fluoroacetil-koenzim A koji nastaje iz fluoroacetata. Najpoznatiji primjer spojeva nastalih iz acetil-koenzima A su masne kiseline, gdje je ograničenje da mogu nastati samo one masne kiseline koje imaju paran broj C-atoma. Primjeri fluoriranih masnih kiselina nastalih u prirodi bi bile one koje nastaju u sjemenu biljke *Dichapetalum toxicarium*, kao na primjer fluorooleinska, fluorostearinska i fluoropalmitinska kiselina.<sup>7,9,13</sup>

Ova metoda nativnog kondenziranja fluoroacetil-koenzima A se pokušala kopirati korištenjem enzimatskog kompleksa: poliketidne sintaze. Poliketidna sintaza posjeduje

moгуćnost kondenzacije fluoroacetil-koenzima A i derivata acetil-koenzima A u stvaranju fluoriranih poliketidnih vrsta. Takve fluorirane vrste se najčešće koriste u farmakološkoj industriji, kao primjerice imunoblokator rapamicin, koji može kao supstrat u poliketidnoj sintazi koristiti fluorirane vrste. To je primjer u kojem je blokirana nativna sinteza poliketida zbog nedostatka potrebnog metabolita pa se dodaju fluorirani analozi za stvaranje fluoriranih analoga produkta. To se može primijeniti za stvaranje lijekova koji imaju fluor u spoju, što se često koristi u današnjoj farmaceutskoj industriji.<sup>7,9,13</sup>



**Slika 10:** Shema nastanka rapamicina tijekom blokade stvaranja ishodišnog spoja za njegovu sintezu. Fluorirani spojevi označeni plavim kvadratom se koriste kao zamjene sa početni spoj stvaranja rapamicina. Crvenom zvjezdicom su označena moguća mjesta pronalaska fluora u fluoriranim analogima rapamicina. Slika je preuzeta i prilagođena prema Ref. 7.

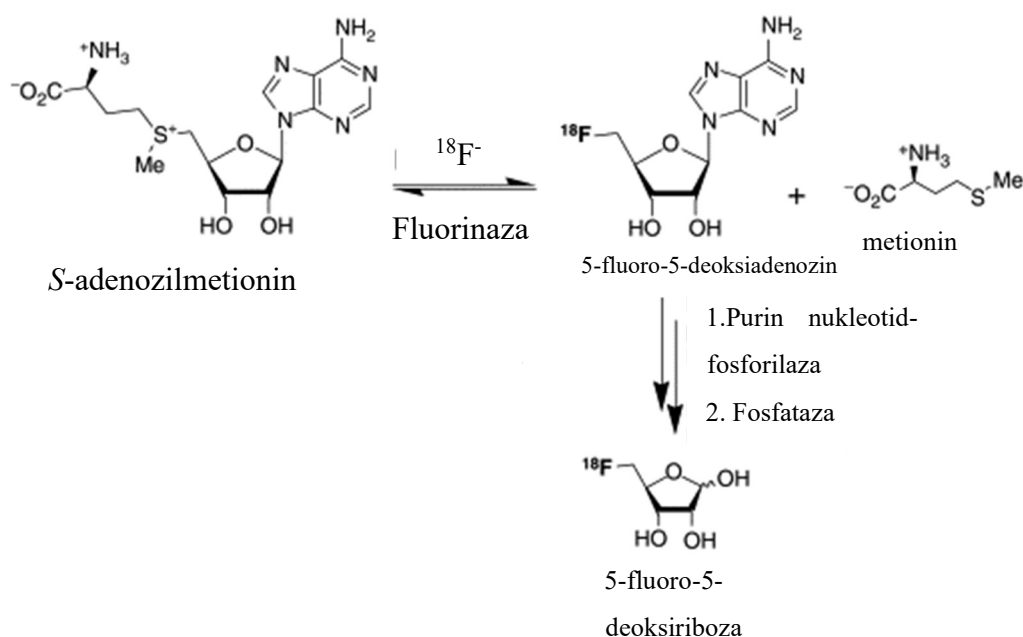
## RADIOANALITIČKO PRAĆENJE

Radioanalitika je grana analitičke kemije koja koristi radioaktivne izotope za razne vrste praćenja kemijskih reakcija. Najpoznatiji izotopi su:  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$  i  $^{18}\text{F}$ . Takvim praćenjem je moguće otkriti razne metaboličke putove i pratiti napredovanje reakcija. Kao jedan od češće korištenih radioaktivnih izotopa u kliničkim istraživanjima je  $^{18}\text{F}$ , kojim se prati djelovanje biomolekula. Fluorinaza može ugraditi  $^{18}\text{F}$  u organski spoj, a također je i za to sposoban

enzimski kompleks poliketidna sintaza ako se u označavanju, to jest stvaranju spojeva koriste fluoroacetyl-koenzim A ili njegovi derivati.<sup>9,11</sup>

Fluorinaza je pogodna za sintezu veza između  $^{18}\text{F}$  i C-atoma jer je to enzim koji je topiv u vodi, a  $^{18}\text{F}$  nastaje pretvorbom ( $^{18}\text{O}$ )  $\text{H}_2\text{O}$ . Tako pogodni enzimi fluorinaze se koriste za označavanje i stvaranje velikog broja fluoriranih biomolekula poput peptida i nukleozida. Moguće je označiti nukleozide s  $^{18}\text{F}$  atomom pomoću fluorinaze otkrivene u bakteriji *Streptomyces cottleya* gdje se uvede izvor  $^{18}\text{F}$  atoma i dolazi do stvaranja 5-fluoro-5-deoksiadenozina s  $^{18}\text{F}$  atomom.<sup>9,11</sup>

Uz označavanje peptida i nukleozida je moguća i izmjena klora i fluora s peptida na bazi specifičnosti fluorinaze iz bakterije *Streptomyces cottleya* koja već prije spomenuto može koristiti kao nukleofil i klor, a ne nužno samo fluor. Kao marker za tumorske stanice se može koristiti fluoroacetat označen s radioaktivnim izotopom fluora koji bi se skupljao u stanicama s ubrzanim metabolizmom šećera, to jest stanice raka. Pošto tumorske stanice neprestano i ubrzano troše glukozu što je završni produkt glukoneoze u čiji ciklus može ući označeni fluoroacetat, korisne su za praćenje razvijanja raka.<sup>9</sup>



**Slika 11:** Proces označavanja nukleozida s radioaktivnim  $^{18}\text{F}$  atomom te pretvorba nukleozida u  $^{18}\text{F}$  označenu ribozu. Slika preuzeta i prilagođena iz Ref. 8.

### § 3. ZAKLJUČAK

Iako neki fluorirani organski spojevi mogu biti otrovni, ipak imaju korisna svojstva za čovjeka. Većina fluoriranih organskih spojeva se u današnje vrijeme koristi kao potencijalni lijekovi ili spojevi kojima se prati razvitak kemijskih reakcija i metabolizma čovjeka ili životinja. Jedno od najvažnijih otkrića za biokemijsko istraživanje, a ujedno i za medicinu je otkriće fluorinaze. Fluorinaza je ime za enzim koji može fluorirati organske spojeve iz anorganskog fluora i time im dati određena svojstva. Također se fluorinaza koristi i za pozitronsku emisijsku topografiju, jednu od metoda označavanja i praćenja metabolizma čovjeka za otkriće bolesti putem radioaktivnih izotopa. Fluorinaza je tu korisna zbog toga što može vezati izotop  $^{18}\text{F}$  koji je idealan za *in vivo* proučavanje i praćenje metabolizma te razvitka bolesti. Zaključno, fluorinaza i fluor u organskim spojevima predstavljaju nove mogućnosti u istraživanju medicinskog i biokemijskog aspekta metabolizma živih bića s njihovim laganim praćenjem i raznolikim svojstvima podarenim vezanjem atoma fluora.



## § 4. LITERATURNI IZVORI

1. [https://www.google.com/search?q=pauling+scale&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi\\_wKj4nJzjAhXB-  
yoKHarWBGwQ\\_AUIECgB&biw=1680&bih=939#imgc=fbKXXkb1Uyz-NM:](https://www.google.com/search?q=pauling+scale&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi_wKj4nJzjAhXB-<br/>yoKHarWBGwQ_AUIECgB&biw=1680&bih=939#imgc=fbKXXkb1Uyz-NM:)  
(Datum pristupa: 1.8.2019.)
2. <https://i1.wp.com/www.namrata.co/wp-content/uploads/2015/06/Activation-of-Fluoroacetate.gif> (Datum pristupa: 1.8.2019.)
3. V. P. Reddy, *Organofluorine Compounds in Biology and Medicine*, Elsevier, Rolla, 2015., str. 29-57.
4. C. Dong, F. Huang, H. Deng, C. Schaffrath, J. B. Spencer, D. O'Hagan, J. H. Naismith, *Nature* **427** (2014) 561-565.
5. [https://schoolbag.info/chemistry/chemical\\_biology/chemical\\_biology.files/image224.jpg](https://schoolbag.info/chemistry/chemical_biology/chemical_biology.files/image224.jpg) (Datum pristupa: 4.8.2019.)
6. H. Deng, D. O'Hagan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5** (2008) 582-592.
7. M. C. Walkert, M. C. Y. Chang, *Chem. Soc. Rev.* **43** (2014) 6527-6536.
8. F. Dolle', D. Roeda, B. Kuhnast, M. C. Lasne, *Fluorine and Health*, Elsevier, Oxford, 2008., str. 44.
9. H. Deng, D. O'Hagan, *Chem. Rev.*, **115** (2015) 634-649.
10. M. F. Carvalho, R. S. Oliviera, *Crit. Rev. Biotechnol.* **37** (2017) 880-897.
11. K. K. J. Chan, D. O'Hagan, *Methods Enzymol*, **51** (2012) 219-235.
12. D. O'Hagan, D. B. Harper, *J. Fluorine Chem.*, **100** (1999) 127-133.
13. S. Swallow, *Progress in Medicinal Chemistry*, Elsevier, Cheshire, 2015., str. 97-165.
14. G. Lewandowski, E. Meissner, E. Milchert, *J. Hazard. Mater.* **136** (2006) 385-391.