

Fluorescentno obilježavanje aminokiselina u svrhu in situ praćenja bioloških procesa

Kaličanec, Mislav

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:217:198831>

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

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



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Mislav Kaličanec

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

**FLUORESCENTNO OBILJEŽAVANJE
AMINOKISELINA U SVRHU *IN SITU*
PRAĆENJA BIOLOŠKIH PROCESA**

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Đani Škalamera

Zagreb, 2021.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

1. srpnja 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

5. veljače 2021.

Mentor rada: doc. dr. sc. Đani Škalamera

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Fluorescencija.....	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	3
2.1. Bakterije.....	3
2.1.1. <i>Struktura stanične stijenke</i>	<i>3</i>
2.2. Aminokiseline	5
2.2.1. <i>Miller-Ureyev eksperiment.....</i>	<i>5</i>
2.2.2. <i>L i D-aminokiseline</i>	<i>5</i>
2.2.3. <i>Sinteza D-aminokiselina</i>	<i>6</i>
2.2.4. <i>Upotreba D-aminokiselina.....</i>	<i>7</i>
2.3. Tehnika FDAA	7
2.3.1. <i>Koncept</i>	<i>7</i>
2.3.2. <i>Fluorescentne D-aminokiseline</i>	<i>7</i>
2.3.3. <i>Sinteza fluorescentnih D-aminokiselina.....</i>	<i>8</i>
2.3.4. <i>Implementacija FDAA u strukturu peptidoglikana</i>	<i>10</i>
2.3.5. <i>Detekcija fluorescentnih D-aminokiselina.....</i>	<i>11</i>
2.3.6. <i>Provjera implementacije fluorescentnih D-aminokiselina.....</i>	<i>12</i>
2.4. Antibiotici temeljeni na D-aminokiselinama.....	13
2.4.1. <i>Mehanizam djelovanja antibiotika.....</i>	<i>14</i>
2.5. Zaključak	16
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XVII

§ Sažetak

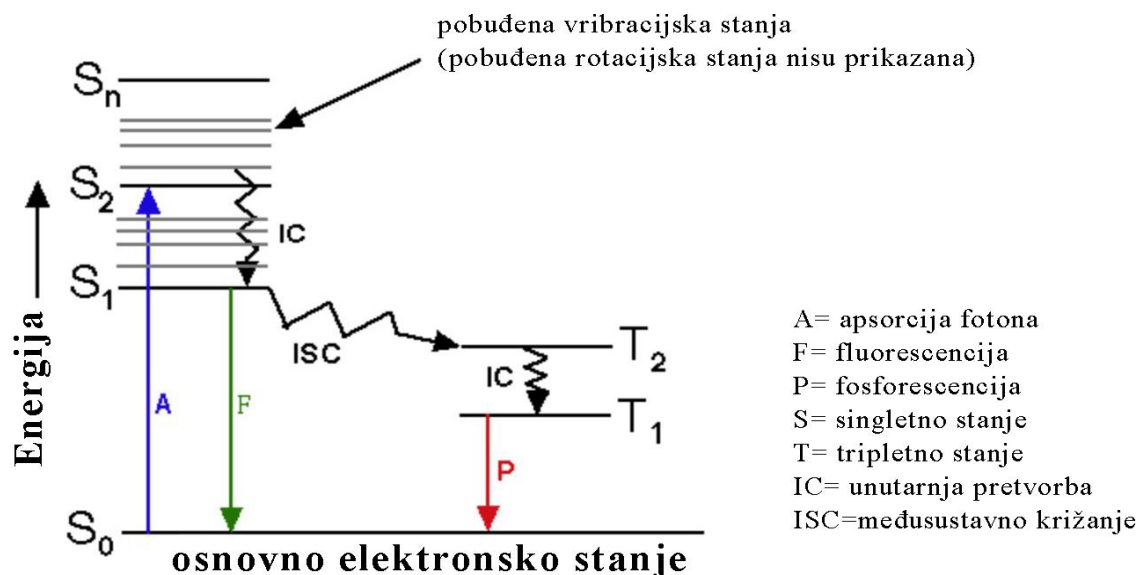
Proteini imaju temeljnu ulogu u svim metaboličkim procesima. Istraživanje proteinske strukture, funkcije, oblika i enzimskih mehanizama od velikog je značaja za (daljnje) shvaćanje bioloških procesa. Mnoge metode razvijene su upravo tako da bi se različiti procesi mogli pratiti na razini proteina: radioaktivno označavanje, izotopni markeri i elektrokemijski testovi. Danas se najviše koristi metoda fluorescentnog označavanja proteina jer omogućuje detaljno promatranje molekularnih mehanizama i testovi se mogu provoditi *in vivo* u stvarnom vremenu, u otopini te s velikom osjetljivošću.

Metode fluorescentnog označavanja aminokiselina puno se koriste u svrhu proučavanja kompleksne strukture peptidoglikana i njegove biosinteze. Istraživanja sinteze peptidoglikana od velikog su interesa. Razlog tome je to što patogene bakterije posjeduju sve veću otpornost i na najnovije antibiotike koji djeluju upravo na sintezu peptidoglikana. Razvijanje novih fluorescentnih D-aminokiselina zasigurno je od velikog značaja, vodeći se činjenicom da nam upravo one omogućuju vizualizaciju sinteze peptidoglikana. Različite FDAA (fluorescentne D-aminokiseline) posjeduju različita fizikalna i fotokemijska svojstva te na taj način mogu dovesti do različitih informacija o sintezi peptidoglikana.

§ 1. UVOD

1.1. Fluorescencija

Svjetlost je oblik elektromagnetskog zračenja koji se može ponašati i kao čestica i kao val što ukazuje na njezinu dualnu prirodu. Elektromagnetsko zračenje kao val sastoji se od električnog i magnetskog polja koji su međusobno okomiti. To je val koji putuje konstantnom brzinom kroz vakuum, odnosno brzinom svjetlosti. Za svoje širenje nije mu potreban medij. Elektromagnetsko zračenje kao čestica, dolazi u paketima energije koje zovemo fotonima. Interakcijom materije i elektromagnetskog zračenja dolazi do apsorpcije, emisije ili raspršivanja zračenja. Kako bi došlo do emisije zračenja prvo mora doći do apsorpcije elektromagnetskog zračenja, odnosno pobude elektrona iz osnovnog stanja u pobuđeno stanje. Energija fotona prenosi se na određeni elektron koji potom može prijeći iz osnovnog stanja u vibracijsko stanje pobuđenog stanja za koji ima dovoljno energije te su moguće apsorpcije samo onih valnih duljina svjetlosti koje odgovaraju razlici energija ta dva energetska stanja.^{1,2}



Slika 1. Dijagram Jablonskog. Apsorpcija i emisija zračenja te neradijativni fotofizički procesi.³

Nakon što se elektron pobudi, postoji više načina kako se apsorbirana energija može rasporediti. Neradijativni procesi, vibracijska relaksacija i unutarnja pretvorba, puno su brži od radijativnih procesa te se oni odvijaju neposredno nakon apsorpcije. Vibracijska relaksacija događa se između vibracijskih stanja istog elektronskog stanja. S druge strane unutarnja pretvorba odvija se pri preklapanju elektronskih i vibracijskih stanja prilikom čega postoji mogućnost prelaska elektrona iz vibracijskog stanja jednog elektronskog stanja u vibracijsko stanje nižeg elektronskog stanja.^{1,2}

Fluorescencija i fosforescencija svrstavaju se u radijativne procese. U procesima radijativnih prijelaza apsorbirana energija otpušta se u obliku fotona. Fluorescencija se odvija tipično u vremenu između 10^{-9} - 10^{-7} sekundi, prema čemu je svrstavamo među najbrže procese prijelaza elektrona, dok s druge strane fosforescencija u nekim slučajevima može trajati i danima. Fluorescencija se odvija između stanja istog multipliciteta, npr. prvog pobuđenog singletnog stanja i osnovnog singletnog stanja ili u rijetkim slučajevima iz drugog pobuđenog singletnog stanja u osnovno singletno stanje. Na višim pobuđenim elektronskim stanjima prvo će se odvijati neradijativni procesi koji su puno brži od radijativnih procesa. Priroda pobuđenih stanja i prijelazima među njima određivat će koji će se od radijativnih procesa odvijati, fluorescencija ili fosforescencija.^{1,2,4}

Energija fotona emitiranog fluorescencijom manja je od energije fotona koji je pobudio elektron. Dakle, valna duljina emitiranog fotona veća je obzirom da je energija proporcionalna frekvenciji.^{1,2}

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Bakterije

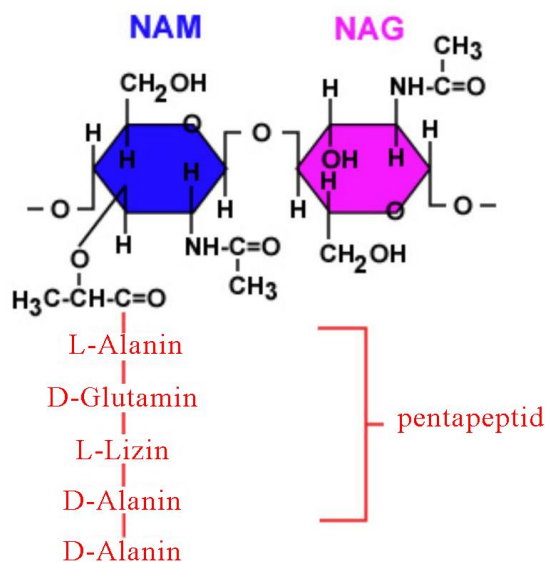
Bakterije su jedna velika zasebna skupina jednostaničnih organizama, odnosno organizama na granici između najjednostavnijih biljaka (jednostanične alge) i najnižih životinja (praživotinja). Prave bakterije su najsitniji živi organizmi. Razmnožavaju se dijeljenjem stanice, odnosno jednostavnom diobom. Izuzevši plave alge, bakterije u odnosu na sve ostale organizme nemaju membranu koja dijeli staničnu jezgru od citoplazme, čime spadaju u skupinu prokariota. Prema obliku stanica bakterije mogu biti okruglastog, štapićastog, izvijenog ili končastog oblika. Gledajući staničnu stijenku koja štiti stanicu od negativnih djelovanja i daje joj stalan oblik, prema građi stanične stijenke razlikujemo Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije.

Zanimljivo je da su bakterije raširene po cijeloj zemlji. Nalaze se u vodi, tlu, zraku i po svim predmetima. Kako je njihovo prvotno stanište zemlja, ističe se podatak da u plodnoj oraničkoj zemlji dolazi do 2,5 milijuna bakterija na 1 gram. Obzirom na snažno djelovanje i golemu rasprostranjenost bakterija proizlazi da su bakterije malih dimenzija stanica u usporedbi s velikom površinom stanice (time je omogućena aktivna izmjena tvari i brzo razmnožavanje) i da su silno otporne prema životnim uvjetima i posebno prilagodljive u nepovoljnim uvjetima okoline. Bakterije su izrazito pogodan istraživački organizam na području suvremenih genetičkih istraživanja. Bitna karakteristika bakterija jest brzo i lako dijeljenje bakterijskih stanica, što je od izuzetne koristi kad se koriste kao modelni organizam za promatranje genetičkih promjena.^{5a}

2.1.1. *Struktura stanične stijenke*

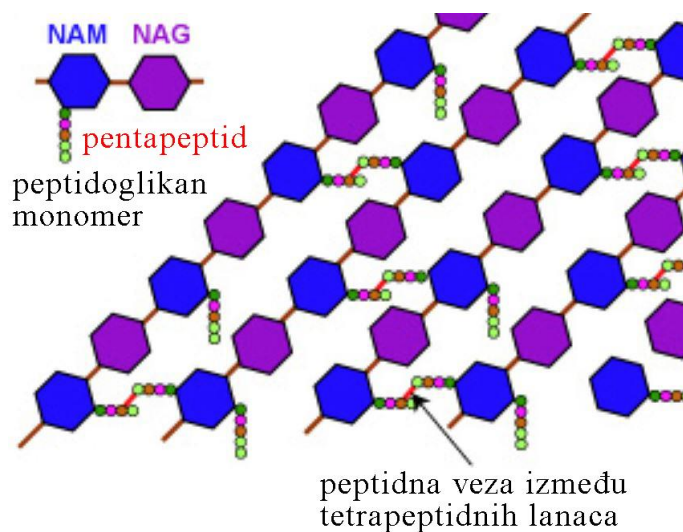
Struktura peptidoglikanske stanične stijenke predstavlja glavni element bakterijske stanične stijenke. Smatra se jednom od najvažnijih i do sada nedovoljno istraženih bakterijskih struktura u biokemiji, upravo zbog njezine vrlo kompleksne strukture.^{6,7} Peptidoglikan je golemi polimer rigidne strukture sastavljen od identičnih peptidoglikanskih monomera (NAG-NAM-pentapeptidi) međusobno povezanih u lance. Monomer NAG-NAM-pentapeptid sačinjavaju 2

amino šećera, *N*-acetil glukozamin i *N*-acetil muraminska kiselina s pentapeptidom povezanih $\beta(1-4)$ glikozidnom vezom.⁸



Slika 4. Peptidoglikanski monomer pentapeptid.⁸

Sinteza peptidoglikanskih monomera pentapeptida odvija se u citosolu bakterije gdje spajanjem na membranski nosač, zvani baktoprenol, peptidoglikan pentapeptid biva prenešen preko citoplazmatske membrane. Pomoću enzima, trasglikozidaze i traspeptidaze sintetizirani monomer umeće se u postojeći polimer peptidoglikana omogućavajući daljnji rast bakterije.⁸



Slika 5. Struktura peptidoglikana⁸

2.2. Aminokiseline

Aminokiseline su organski spojevi koji su glavne gradivne jedinice svih proteina. Sastoje se od centralnog ugljikovog atoma na koji su izravno vezane amino-skupina, karboksilna skupina, vodikov atom te skupina R, odnosno bočni ogranak po kojem se razlikuju same aminokiseline. Aminokiseline posjeduju svojstvo kiralnosti zbog četiri različita supstituenta vezana na α -ugljikov atom. Prema tome, aminokiseline mogu postojati kao α -D enantiomer i α -L enantiomer, tj. odnose se kao zrcalno simetrični oblici. Sve α -L aminokiseline, osim cisteina, imaju apsolutnu konfiguraciju S, a ne R. Ovisno o bočnom ogranku, aminokiseline razlikujemo prema naboju, obliku, polarnosti, hidrofobnosti, reaktivnosti i mogućnosti stvaranja vodikovih veza. Razlikujemo 20 aminokiselina od kojih su građeni svi proteini u svim eukariotskim, arhejskim i bakterijskim vrstama uz pokoju iznimku.²⁰

2.2.1. Miller-Ureyev eksperiment

Stanley Miller 1952. godine izveo je kemijski eksperiment u kojem je simulacijom različitih vremenskih uvjeta na ranoj Zemlji htio dokazati kemijsko podrijetlo života. U atmosferi sačinjenoj od metana, amonijaka, vode i vodika pod utjecajem visoke temperature, električnog pražnjenja i visokog tlaka htio je sintetizirati organske komponente koje čine temelj života na zemlji. Pomoću papirne kromatografije uspio je sa sigurnošću identificirati α -alanin, β -alanin i glicin, dok su slabi tragovi ukazivali i na prisutnost asparaginske i α -amino-n-maslačne kiseline. ⁹ Ideja eksperimenta bila je pokazati da je pri početnim, vrlo teškim uvjetima na Zemlji, moguć spontani nastanak organskih tvari nužnih za sintezu peptida.⁹

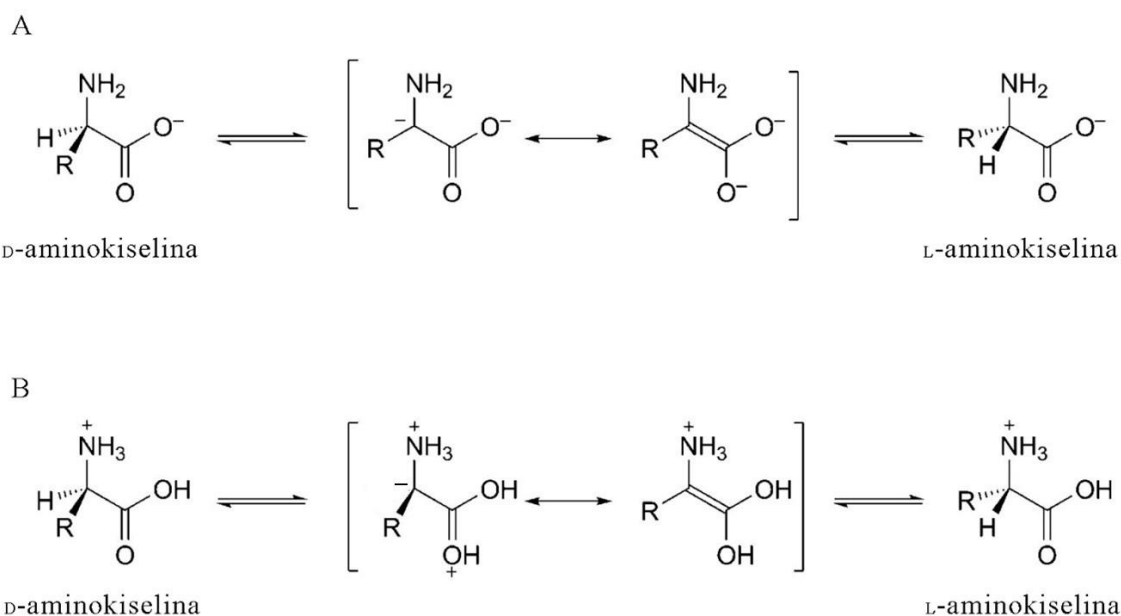
2.2.2. L i D-aminokiseline

Pitanje koje se postavlja jest zašto je evolucija izabrala L-izomer α -aminokiselina. Prema svemu sudeći izbor je vrlo vjerojatno bio slučajan. No, pretpostavlja se da kada je izbor bio učinjen, da je kao takav bio i zadržan tijekom cijele evolucije te L-konfiguracija α -aminokiselina prevladava u svim živim organizmima. Zbog evolucijskog izbora D-aminokiseline su bile smatrane laboratorijskim tvorevinama, tj. neprirodnim aminokiselinama koje se ne nalaze u višim organizmima. Razvojem vrlo osjetljivih metoda odjeljivanja omogućena je detekcija D-aminokiselina. ¹⁰ D-Aminokiseline možemo pronaći u tlu te u mnogobrojnim prehrambenim proizvodima gdje zbog svojih svojstava sudjeluju u stvaranju različitih aroma i okusa.¹¹

Težnja za razvojem enantioselektivnih osjetljivih analitičkih metoda uslijedila je zbog potrebe za analizom D-aminokiselina nastalih kemijskom racemizacijom uslijed procesa prerade hrane te proučavanja njihovog utjecaja na zdravlje ljudi i životinja.¹⁰

2.2.3. Sinteza D-aminokiselina

U prirodi, kao mogući izvor D-aminokiselina koje nastaju izvan stanice navodi se bazom ili kiselinom katalizirana racemizacija L-aminokiselina, koja se odvija na kiralnom ugljikovom atomu u aminokiselini uz keto/enolnu tautomerizaciju. Reakcija kemijske racemizacije ovisi o pH i temperaturi.¹⁰



Slika 6. A- bazom katalizirana racemizacija; B- kiselinom katalizirana racemizacija¹⁰

Osim navedene racemizacije izvan same stanice, ona se može odvijati i *in vivo* prateći činjenicu da D-aminokiseline postoje u nekim rijetkim proteinima. Svojevrsan alternativni način sinteze D-aminokiselina u bakterijama jest pomoću enzima D-aminokiselinskih trasaminaza procesom trasaminacije gdje dolazi do prelaska jedne D-aminokiseline u drugu.¹⁰

2.2.4. *Upotreba D-aminokiselina*

Sudjelovanje D-aminokiselina u procesu stvaranja peptidoglikana zapravo je jedna od najjasnije i najtemeljnije opisanih upotreba D-aminokiselina. Obzirom da je peptidoglikan usko povezan s brzinom rasta stanice, ubrzo je postao važan predmet za istraživanje biosintetskih puteva u svrhu zaustavljanja daljnjeg rasta i razmnožavanja bakterijskih stanica. Povijesno gledano, još od vremena starog Egipta znalo se kako plijesnivi kruh pomaže pri zacjeljivanju rana. Tek u 19. stoljeću otkrićem i upotrebom penicilina shvaćeno je da antibiotici djeluju antimikrobno. Početkom 20. stoljeća toksičnost antibiotskih komponenti dobivenih izolacijom iz bakterija dovela je do odgode početka upotrebe antibiotika. Slijedom navedenog upotreba D-aminokiselina izoliranih iz bakterija, kao antibiotika, temelji se na svojstvu, koje predstavlja temelj djelovanja, da veliki broj prirodnih antibiotika sadrži D-aminokiseline.¹⁰

2.3. Tehnika FDAA

2.3.1. *Koncept*

Peptidoglikani uz strukturnu i zaštitnu ulogu imaju ključnu važnost u razmnožavanju i širenju bakterija. Veliki interes za istraživanje biosinteze peptidoglikana potaknut je činjenicom da biosinteza peptidoglikana predstavlja mjesto djelovanja antibiotika. Iako djeluje vrlo jednostavno, biosintetski put i enzimi nisu u potpunosti opisani, tj. način na koji djeluju i kontroliraju biosintezu još uvijek nije poznat. Istraživanje, promatranje i modificiranje biosinteze peptidoglikana značajno je olakšano razvojem tehnika snimanja i brojnih molekularnih ispitivanja. Prvotna istraživanja bila su usmjerena na specifične antibiotike i proteine, poput fluorescentnog vankomicina i aglutinina, razvijanih za specifična ispitivanja biosinteze peptidoglikana. Uslijed toksičnih efekata na bakterijsku stanicu i slabe membranske propusnosti stanice, počela su se ravijati nova molekularna ispitivanja pomoću fluorescentnih D-aminokiselina.¹³

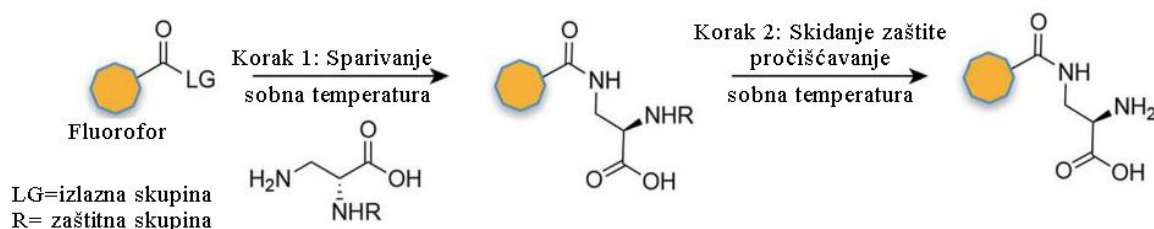
2.3.2. *Fluorescentne D-aminokiseline*

Fluorescentne D-aminokiseline postale su izrazito važan istraživački instrument zbog svoje biokompatibilnosti i specifičnosti prema peptidoglikanima. Pomoću fluorescentnih D-aminokiselina, odnosno njihove karakteristične enzimске ugradnje, možemo prvi puta u

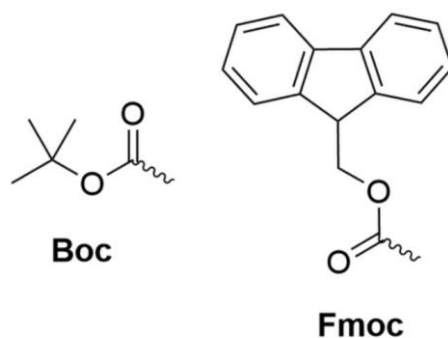
realnom vremenu direktno proučavati stvaranje peptidoglikana u živoj stanici i aktivnost enzima koji sudjeluju u biosintezi peptidoglikana.¹³ Navedene prednosti fluorescentnih D-aminokiselina primarni su razlog velikog interesa za razvijanje novih fluorescentnih D-aminokiselina u svrhu boljih ispitivanja.¹⁴

2.3.3. Sinteza fluorescentnih D-aminokiselina

Opći princip sinteze fluorescentnih D-aminokiselina sastoji se od tri koraka. U prvom koraku potrebno je spariti aktivirani fluorofor (prethodno sintetiziran ili kupljen) s N^α-zaštićenom-D-aminokiselinom u bazičnim uvjetima pri sobnoj temperaturi. *tert*-Butiloksikarbonil (Boc) i 9-fluorenilmetoksikarbonil (Fmoc) neke su od najčešćih α-amino zaštitnih skupina. U drugom koraku dolazi do uklanjanja N^α-zaštitne skupine upotrebom trifluoroctene kiseline (TFA) u diklormetanu (DCM) u omjeru 1:1, kroz 2 sata miješanja pri sobnoj temperaturi. Ako se koristila Fmoc-zaštitna grupa, uklanjanje zaštitne grupe izvodi se otapanjem produkta u diklormetanu i dodatno se obrađuje otopinom 1,8-diazabicyklo (5.4.0)undek-7-ena (DBU). Koristeći HPLC (eng. *high performance liquid chromatography*) s obrnutom fazom, gdje pokretnu polarnu fazu čine 1:1, voda i acetonitril, može se pročistiti pripravljena FDAA.¹⁵

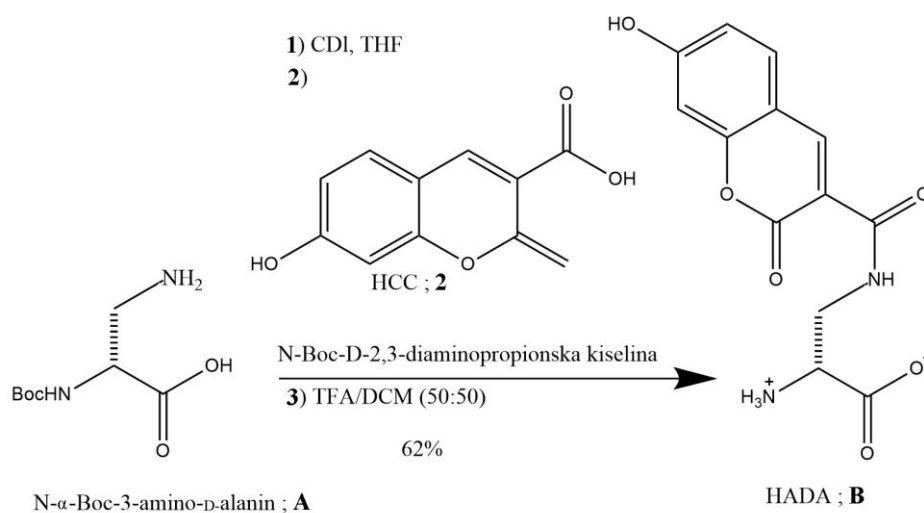


Slika 7. Shema sinteze FDAA¹⁵

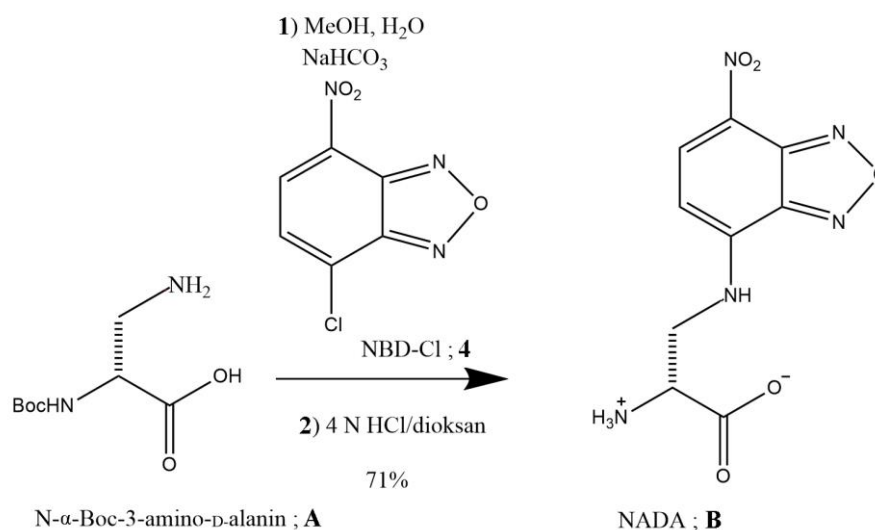


Slika 8. Struktura najčešćih α -amino zaštitnih skupina: *tert*-butiloksikarbonil (Boc) i 9-fluorenilmetoksikarbonil (Fmoc)

Spajanjem 7-hidroksikumarinas D-2,3-diaminopropionskom kiselinom sintetizirana je prva fluorescentna D-aminokiselina, HADA (engl. *7-hydroxycoumarincarboxylamino-D-alanin*).¹⁴



Slika 9. Sinteza FDAA – HADA B, dodavanje komercijalno dostupnih fluorofora - 7-hidroksikumarin-3-karboxilne kiseline (HCC-OH; 2) na *N*-Boc-D-2,3-diaminopropionsku kiselinu (*N*- α -Boc-3-amino-D-alanin; A). CDI (karbonildimidazol); THF (tetrahidrofur); TFA (trifluoroctena kiselina); DCM (diklormetan)¹⁴



Slika 10. Sinteza FDAA – NADA B, dodavanje komercijalno dostupnog fluorofora 4-kloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl; **4**) na *N*-Boc-D-2,3-diaminopropionsku kiselinu (*N*-α-Boc-3-amino-D-alanin; **A**)¹⁴

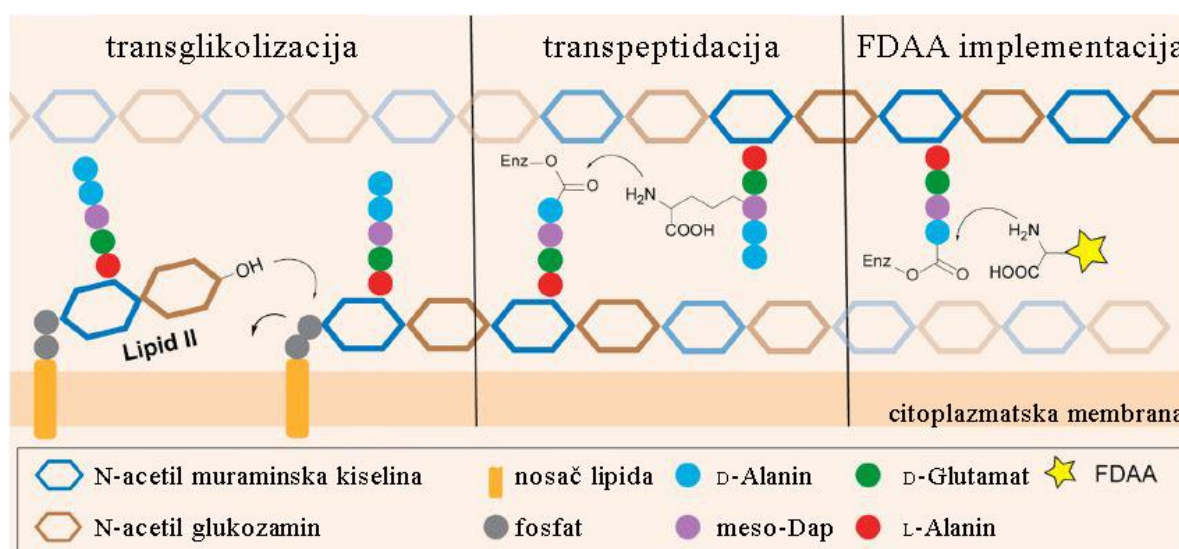
2.3.4. Implementacija FDAA u strukturu peptidoglikana

Mehanizam nadogradnje peptidoglikanskog lanca započinje u citoplazmi sintezom nosača lipida, pomoću enzima iz Mur obitelji koji kataliziraju biosintezu peptidoglikanskih prekursora. Nosač lipida potom putuje preko citoplazmatske membrane te pomoću reakcije trasglikolizacije i traspeptidacije ulazi u već postojeći peptidoglikanski lanac. Unatoč činjenici da postoje drugi enzimi s istom ili sličnom funkcijom, glavni protein koji katalizira dvije navedene reakcije jest PBP (engl. penicilin-binding protein), protein koji veže peniciline. U reakciji trasglikolizacije gdje nosač lipida koji na sebi nosi monomer peptidoglikan pentapeptid, događa se nukleofilni napad hidroksilne skupine *N*-acetil glukoamina na anomerni fosfat koji se nalazi na kraju već postojećeg peptidoglikanskog lanca.

Rezultat reakcije trasglikolizacije predstavlja spajanje peptidoglikanskog pentapeptidnog monomera u peptidoglikanski lanac i otpuštanje nosača lipida. Temelj traspeptidacijske reakcije jest cijepanje terminalnog D-alanina s peptidnog lanca koji se nalazi na *N*-acetil muraminskoj kiselini kako bi se generirao acil enzim međuprodukt, koji će nakon dodatnog nukleofilnog napada amino skupine susjednog peptidnog lanca tvoriti peptidnu vezu

između dva međusobno nasuprotna peptidna lanca. Bitno je napomenuti kako aminokiseline s L apsolutnom konfiguracijom ne mogu sudjelovati u reakciji traspeptidacije zbog stereospecifičnosti proteina koji veže peniciline (PBP), što bi drugim riječima značilo da su D-aminokiseline neophodne element za odvijanje traspeptidacijske reakcije (slika 11).¹³

Mehanizam implementacije fluorescentnih D-aminokiselina predložen je kao posredna reakcija u reakciji traspeptidacije gdje fluorescentne D-aminokiseline kompetitivno obuhvaćaju acil enzim intermedijer. Navedeni mehanizam je zapravo reakcija izmjene terminalnog D-alanina, u peptidnoglikanskom lancu, s drugom D-aminokiselinom.¹³



Slika 11. Shema trasglikolizacijskih i traspeptidacijskih reakcija biosinteze peptidoglikana i predložen mehanizam implementacije FDAA. Zbog jednostavnosti prikazivanja i lakšeg razumijevanja strukture enzima nisu prikazane¹³

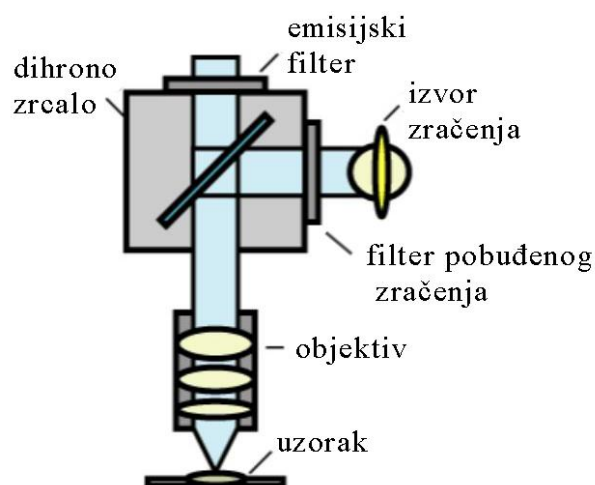
2.3.5. Detekcija fluorescentnih D-aminokiselina

Detekcija fluorescentnih D-aminokiselina vrši se uz pomoć fluorescentnog mikroskopa. Tehnika povećavanja slike predmeta od starog vijeka vršila se uz korištenje staklenih kugli napunjenih vodom, ali i lećama, a dokaz tome jesu prvi zabilježeni pokusi koji datiraju iz davnog 11. stoljeća. Tek 300 godina kasnije počeli su se koristiti sustavi za povećanje s dvije ili više leća, sustavi koji predstavljaju temelj modernog optičkog mikroskopa.¹⁶

Fluorescencijska mikroskopija temelji se na pobudi elektrona zračenjem, nakon kojeg se pobuđeni elektron vraća u osnovno, nepobuđeno stanje. Vraćanjem u osnovno stanje elektron emitira energiju u obliku fotona. Prema Stokesovom pomaku valna duljina emitiranog zračenja veća je od valne duljine zračenja koje se koristi za pobudu elektrona.¹⁶

Kao izvor ultraljubičastog zračenja fluorescentnog mikroskopa najčešće se koriste ksenonova i živina lampa. Emitirana svjetlost prvo prolazi kroz filter pobuđenog zračenja kako bi se transmitiralo zračenje one valne duljine koje fluorofor može apsorbirati. Potom, transmitirano zračenje pada na dihrono zrcalo koje ima funkciju reflektiranja zračenja potrebnog za pobudu, dok ostali spektar valnih duljina propušta kroz zrcalo. Ultraljubičasto zračenje reflektira se prema uzorku u kojem će zatim izazvati fluorescenciju. Emisija fluorescentnog zračenja transmitira kroz leće objektiva, odnosno kroz dihrono zrcalo.

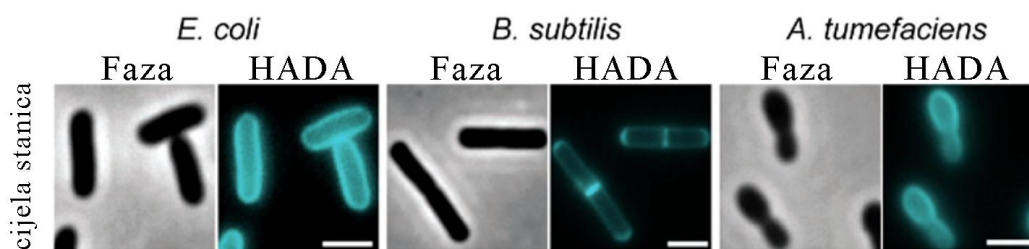
Kako bi se otklonile sve valne duljine koje ne pripadaju emisiji fluorescentnog zračenja, zračenje prolazi kroz emisijski filter stvarajući pritom sliku vidljivu ljudskom oku.¹⁷



Slika 13. Pojednostavljeni prikaz epifluorescentnog mikroskopa¹

2.3.6. Provjera implementacije fluorescentnih D-aminokiselina

Kao rezultat udruživanja fluorescentne D-aminokiseline, HADA-e, s raznolikim živim organizmima (*E. Coli*, *B. Subtilis*, *A. Tumefaciens*), u samo jednoj diobi, dolazi do vrlo jakog fluorescentnog signala, koji se pojavljuje na mjestima podjele i staničnim stijenkama.¹³



Slika 12. Označavanje peptidoglikanske strukture u različitim vrstama bakterijske stanice pomoću FDAA, HADA-e.¹⁴

U slučaju korištenja HALA-e, koji je zapravo L-enantiomer fluorescentne D-aminokiseline HADA-e, neće doći do emisije zračenja, fluorescencije, što ukazuje na selektivnu prirodu bakterijskog enzima traspeptidaze prema D-aminokiselinama u traspeptidacijskoj reakciji.¹³

Kako bi provjerili da se fluorescentna D-aminokiselina, HADA, specifično i kovalentno povezala u peptidoglikanski lanac potrebno je označenu bakterijsku stanicu tretirati etanolom i bakterijske stanice prokuhati u otapalu koje sadrži deterdžent. Navedenim postupkom izolirat ćemo peptidoglikansku strukturu i otkloniti stanične membrane. Nakon što su otklonjene stanične membrane, pomoću enzima pronaze E, RNaze i DNaze razgrađuju se sve makromolekule osim peptidoglikana. Ako peptidoglikanska struktura koju smo izolirali zadrži fluorescentni signal, to je potvrda da se fluorescentna D-aminokiselina HADA uspješno kovalentno vezala u peptidoglikansku strukturu.¹³

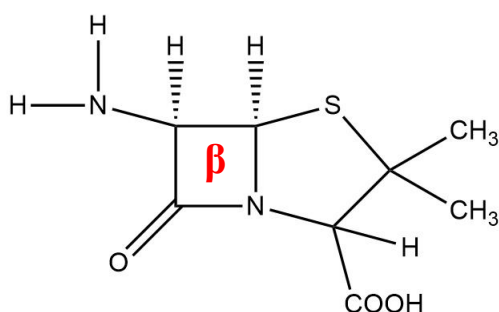
2.4. Antibiotici temeljeni na D-aminokiselinama

Antibiotici kao produkti metabolizma nekih nižih organizama poput plijesni, gljivica ili bakterija predstavljaju složene organske spojeve. Njihova funkcija je sprječavanje razvoja i množenja mikroorganizama, tj. uništavanje istih.^{5b} Drugim riječima antibiotici su lijekovi koji djeluju specifično na samo određene stanice bakterija.

Prvi antibiotik, *penicilin*, otkrio je škotski znanstvenik Alexander Fleming 1928. godine. Naime, ostavio je otvorenu Petrijevu zdjelicu s bakterijama pored prozora te je učio kako su bakterije u blizini razvijenih spora plijesni umirale. Od otkrića penicilina, kao prvog

antibiotika, započelo je razdoblje njegove široke upotrebe u suvremenim terapijama mnogih zaraznih bolesti. Unatoč činjenici da je do dan danas otkriveno je više stotina antibiotika, samo se manji broj istih upotrebljava. Osim u medicinske svrhe, antibiotici se upotrebljavaju i kao dodatak prehrani domaćih životinja, u fitopatologiji, u mesnoj i ribljoj industriji u svojstvu konzervansa itd.

Penicilin se svrstava u skupinu najčešće korištenih antibiotika, odnosno u skupinu β -laktamskih antibiotika koji su dobili ime po jedinstvenom četveročlanom β -laktamskom prstenu koji je sastavni dio njihove kemijske strukture.¹⁸



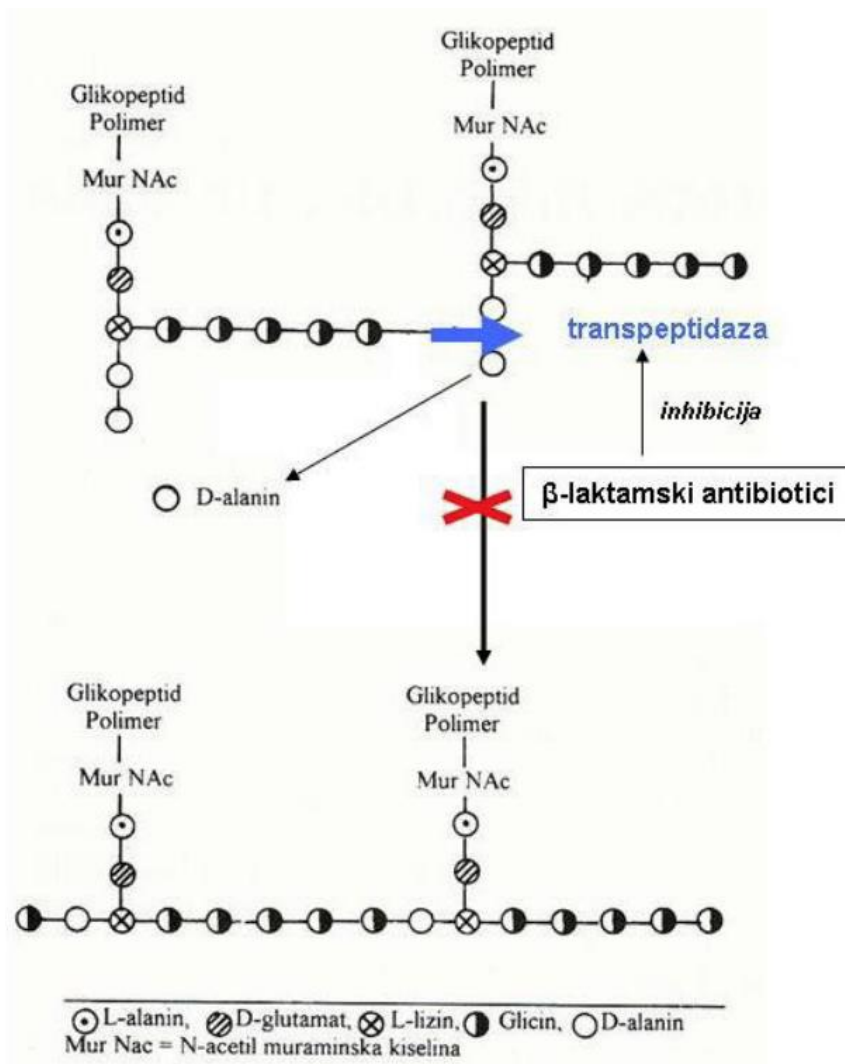
Penicilini

Slika 14. Kemijska struktura penicilina¹⁸

2.4.1. Mehanizam djelovanja antibiotika

Mehanizam djelovanja antibiotika opisujemo kao baktericidno djelovanje. Dakle, antibiotici inhibiraju daljnu sintezu bakterijske stijenke, peptidoglikanskog polimera i na taj način zaustavljaju rast i razmnožavanje bakterija. Zbog svoje analogne sličnosti terminalnom slijedu pentapeptidnog lanca smještenog na *N*-acetilmuraminskoj kiselini u peptidoglikanskom polimeru i zbog vrlo visoke reaktivnosti beta-laktamske strukture, penicilin može ireverzibilno acilirati aktivno mjesto enzima transpeptidaze koji katalizira zadnji korak u biosintezi peptidoglikana. Inhibicijom enzima transpeptidaze, bakterija više nije u mogućnosti stvarati unakrsne peptidne veze između međusobno nasuprotnih pentapeptidnih lanaca. U nemogućnosti stvaranja stanične stijenke, odnosno peptidoglikana bakteriji je onemogućen rast te bakterija postaje osjetljiva na vanjske faktore kao što su voda i tlak te bakterija ubrzo umire.¹⁹

Isto tako, treba naglasiti kako ljudska stanica u svojoj strukturi ne sadrži peptidoglikan što bi značilo da antibiotici nemaju štetan utjecaj na ljudski organizam.



Slika 15. Prikaz kako uz pomoć β -laktamskih antibiotika dolazi do inhibicije sinteze peptidoglikana iz stanične stijenke bakterija¹⁸

2.5. Zaključak

Osim što je otkriće antibiotika označilo pozitivnu prekretnicu u modernom liječenju, neposredno nakon samog otkrića i sam znanstvenik, Alexander Fleming, upozoravao je medicinsku i farmaceutsku industriju na problem prekomjernog i u velikom broju slučajeva bez potrebe korištenja antibiotika koji bi mogao dovesti do otpornosti bakterija na korištene antibiotike.

Otkako su antibiotici ušli u široku medicinsku upotrebu, pojava rezistentnosti bakterija na njih bila je samo pitanje vremena. Zbog lošeg načina primjene antibiotika (korištenje antibiotika bez potrebe, odnosno prekomjerna upotreba istih), vrlo moćnog oružja u borbi protiv mikroorganizama, danas znanstvenici ulažu velike napore kako bi razvili različite tehnike koje bi omogućile bolje i detaljnije proučavanje biosintetskih puteva u bakterijskog stanici. Tehnika fluorescentnog označavanja D-aminokiselina te njihova implementacija u strukturu stanične stijenke bakterija, zadnjih 10 godina uvelike pomaže odgovoriti na pitanja vezana uz enzime, regulaciju i sintezu stanične stijenke bakterijske stanice. Za daljnje razvijanje novih antibiotika i pronalazak odgovora na mnogo preostalih pitanja o sintezi i strukturi stanične stijenke bakterije bit će potrebno uložiti mnogo truda, vremena i znanja za razvoj novih i boljih FDAA, pa isto tako i novih tehnologija.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. H. H. Jaffe, A. L. Miller, *J. Chem. Edu.* **43** (1966) 469.
2. E. B. Priestley, A. Haug, *J. Chem. Phys.* **49** (1968) 622.
3. https://www.shsu.edu/chm_tgc/chemilumdir/JABLONSKI.html (datum pristupa 26.09.2020.)
4. H. Vančik, *Molekularna kemija*, Kemijski odsjek, PMF, Zagreb, 2011.
5. M. Krleža, J. Šentija, I. Ajanović, D. Bidjin, N. Bogdanov, Ž. Domljan, B. Feldbauer, V. Fišter, F. Gospodnetić, B. Grlić-Justinijanović, D. Grlić, Lj. Grlić, M. Hanžeković, Lj. Ilijanić, V. Kljaković, K. Krstić, T. Ladan, M. Lazić, T. Macan, M. Marinović, M. Matošić, M. Mirković, O. Oppitz, V. Podlesnik, M. Polić, M. Prcić, M. Sikirić, A. Stipčević, D. Šepić, K. Šimek-Škoda, A. Vereš, B. Vranjican, A. Vujić, *Opća enciklopedija jugoslavenskog leksikografskog zavoda*, 1, A-Bzu, Jugoslavenski leksikografski zavod, Zagreb, 1977, str. (a) 385-386; (b) 188.
6. S. O. Meroueh, K. Z. Bencze, D. Heseck, M. Lee, J. F. Fisher, T. L. Stemmler, S. Mobashery, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **103** (2006) 4404–4409.
7. E. Kuru, H. Velocity Huges, P. J. Brown, E. Hall, S. Tekkam, F. Cava, M. A. de Pedro, Y. V. Brun, M. S. VanNiuwenhze, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51** (2012) 2550–2260.
8. [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3AMicrobiology_\(Kaiser\)/](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3AMicrobiology_(Kaiser)/) (datum pristupa 23.09.2020.)
9. S. L. Miller, *Science* **117** (1953) 528.-529.
10. S. Martínez-Rodríguez, A. I. Martínez-Gómez, F. Rodríguez-Vico, J. M. Clemente-Jiménez, F. J. Las Heras-Vázquez, *Chem. & Biodiver.* **7** (2010) 1531-1548.
11. G. L. Marcone, E. Rosini, E. Crespi, L. Pollegioni, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **104** (2020) 555-574.
12. N. Ercal, X. Luo, R. H. Matthews, D. W. Armstrong, *Chira.* **8** (1996) 24-29.
13. Y. Hsu, G. Booher, A. Egan, W. Vollmer, M. S. VanNiuwenhze, *Acc. Chem. Res* **52** (2019) 2713-2722.
14. E. Kuru, S. Tekkam, E. Hall, Y. V. Brun, M. S. VanNiuwenhze, *Nat. Protoc.* **10** (2015) 33-52.
15. Y. Hsu, J. Rittichier, E. Kuru, J. Yablonowski, E. Pasciak, S. Tekkam, E. Hall, B. Murphy, T. K. Lee, E. C. Garner, K. C. Huang, Y. V. Brun, M. S. Van Nieuwenhze, *Chem. Sci.* **8** (2017) 6313-6321.
16. Z. Jakobović, T. Premerl, An. Sentić, D. Štefanović, Ž. Viličić, Ž. Pavunić, R. Smrečki, J. Živković, D. Bazjanac, Z. Vrkljan, E. Nonvailer, N. Čubranić, Z. Bonačić Mandinić, H. Požar, S. Šilović, M. Mumirski, M. Herak, M. Žerdik, A. Paolin, R. Marušić, D. Popović, *Tehnička enciklopedija 8, Meh-Mos*, Jugoslavenski leksikografski zavod, Grafički zavod Hrvatske, Zagreb, 1982, str. 556-559.

-
17. <https://science.howstuffworks.com/light-microscope4.htm> (datum pristupa 27.09.2020.)
 18. M. Šalković- Petrišić, V. Bradamante, *Beta–laktamski antibiotici (1) Penicilini*, e-nastavni članak, Katedra za farmakologiju Medicinskog fakulteta, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2010.
 19. G. Kapoor, S. Saigal, A. Elongavan, *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol*, **33** (2017) 300-305.
 20. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, New York, 2007, str. 26-27.