

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA LESKOVAR

**MAGISTRSKA NALOGA**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA LESKOVAR

**DOLOČANJE *IN VITRO* AKTIVNOSTI POTENCIALNIH  
ZAVIRALCEV BAKTERIJSKEGA ENCIMA D-ASPARTAT LIGAZA**

**EVALUATION OF *IN VITRO* ACTIVITY OF POTENTIAL  
INHIBITORS OF BACTERIAL ENZYME D-ASPARTATE LIGASE**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, pod mentorstvomizr. prof. dr. Anamarije Zega, mag. farm. Spektroskopske meritve so opravili na Fakulteti za farmacijo.

## **Zahvala**

Najprej iskrena zahvala moji mentorici,izr. prof. dr. Anamariji Zega, mag. farm. Hvala za vso prijaznost, razumevanje, spodbujanje, predano znanje in strokovno pomoč pri izvedbi magistrske naloge.

Zahvaljujem se tudi strokovni sodelavki Katedre za farmacevtsko kemijo, gospe Damijani Zalar, za nasvete in pomoč pri delu v laboratoriju.

Posebna zahvala gre moji družini – mami Angeli, očetu Branku in sestri Tjaši – za vse spodbudne besede in podporo tekom celotnega študija.

Hvala tudi vsem prijateljem in prijateljicam za zelo zanimiva in nepozabna študijska leta.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvomizr. prof. dr. Anamarije Zega, mag. farm.

Janja Leskovar

# VSEBINA

POVZETEK .....	V
KLJUČNE BESEDE .....	V
ABSTRACT .....	VI
KEYWORDS .....	VI
SEZNAM OKRAJŠAV .....	VII
1 UVOD.....	1
1.1 BAKTERIJSKA CELICA .....	3
1.1.1 Po Gramu negativne bakterije .....	3
1.1.2 Po Gramu pozitivne bakterije .....	4
1.2 PEPTIDOGLIKAN .....	5
1.2.1 Zgradba peptidoglikana .....	5
1.2.2 Biosinteza peptidoglikana .....	8
1.3 ATP-grasp NADDRUŽINA ENCIMOV .....	10
1.3.1 D-aspartat ligaza .....	12
2 NAMEN DELA.....	14
3 MATERIALI IN METODE .....	15
3.1 TESTIRANJE POTENCIALNIH ZAVIRALCEV .....	15
3.2 SINTEZA NOVEGA POTENCIALNEGA ZAVIRALCA .....	17
4 EKSPERIMENTALNO DELO .....	19
4.1 TESTIRANJE POTENCIALNIH ZAVIRALCEV Z <i>IN VITRO</i> SPEKTROFOTOMETRIČNIM ENCIMSKIM TESTOM .....	19
4.1.1 Priprava raztopin za testiranje .....	19
4.1.2 Testiranje knjižnice spojin.....	21

4.2 SINTEZA.....	22
4.2.1 Čiščenje izhodne zmesi etil 4-bromo-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilata ( <b>21</b> ).....	23
4.2.2 Sinteza 4-bromo-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilne kisline ( <b>22</b> ).....	24
4.2.3 Sinteza N-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidro-1,3-benzotiazol-6-il)-4-bromo-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida ( <b>24</b> ).....	25
4.2.4 Sinteza etil ((6-(4-bromo-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidro-1,3-benzotiazol-2-il) amino)-2-okso acetata ( <b>25</b> ).....	26
4.2.5 Sinteza ((6-(4-bromo-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidro-1,3-benzotiazol-2-il) amino)-2-okso očetne kisline ( <b>26</b> (ZJL-8)).....	27
5 REZULTATI IN RAZPRAVA .....	29
5.1 KOMENTAR REZULTATOV BIOLOŠKEGA TESTIRANJA POTENCIALNIH ZAVIRALCEV .....	31
5.2 KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV .....	39
5.2.1 Hidroliza estra <b>21</b> do karboksilne kisline <b>22</b> .....	39
5.2.2 Tvorba amida <b>24</b> .....	40
5.2.3 Aciliranje spojine <b>24</b> .....	41
5.2.4 Hidroliza estra <b>25</b> do karboksilne kisline <b>26</b> (ZJL-8).....	41
6 SKLEP.....	42
7 LITERATURA .....	44
8 PRILOGA .....	48

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Zgradba peptidoglikana .....	6
<b>Slika 2:</b> Primerjava zgradbe peptidoglikana v G- bakterijah in v G+ bakterijah.....	7
<b>Slika 3:</b> Biosinteza peptidoglikana v G- bakterijah .....	10
<b>Slika 4:</b> Splošna reakcija ligaz ATP-grasp naddružine.....	11
<b>Slika 5:</b> Reakcija, ki jo katalizira D-aspartat ligaza .....	13
<b>Slika 6:</b> Funkcija D-aspartat ligaze pri prečnem premreženju peptidoglikana .....	13
<b>Slika 7:</b> Določanje aktivnosti D-aspartat ligaze .....	16
<b>Slika 8:</b> Sinteza spojine <b>26</b> (ZJL-8) .....	23
<b>Slika 9:</b> Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine <b>3</b> (THT-21) (250 $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z <i>in vitro</i> spektrofotometričnim encimskim testom .....	32
<b>Slika 10:</b> Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine <b>13</b> (TCF-4b) (100 $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z <i>in vitro</i> spektrofotometričnim encimskim testom .....	34
<b>Slika 11:</b> Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine <b>15</b> (NHM-44) (250 $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z <i>in vitro</i> spektrofotometričnim encimskim testom .....	35
<b>Slika 12:</b> Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine <b>19</b> (THT-11) (250 $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z <i>in vitro</i> spektrofotometričnim encimskim testom .....	35
<b>Slika 13:</b> Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine <b>20</b> (THT-13) (250 $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z <i>in vitro</i> spektrofotometričnim encimskim testom .....	36
<b>Slika 14:</b> Spojina <b>26</b> (ZJL-8) (analog spojin <b>13</b> (TCF-4b) in <b>3</b> (THT-21)) .....	38
<b>Slika 15:</b> Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine <b>26</b> (ZJL-8) (250 $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z <i>in vitro</i> spektrofotometričnim encimskim testom .....	39
<b>Slika 16:</b> Mehanizem alkalne hidrolize estra .....	40
<b>Slika 17:</b> Mehanizem tvorbe amida z uporabo EDC in HOBt.....	40
<b>Slika 18:</b> Mehanizem aciliranja preko kislinskega klorida.....	41

<b>Slika 19:</b> Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine <b>4</b> (THT-20) (250 $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z <i>in vitro</i> spektrofotometričnim encimskim testom .....	48
<b>Slika 20:</b> Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine <b>5</b> (TNM-17) (250 $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z <i>in vitro</i> spektrofotometričnim encimskim testom .....	48
<b>Slika 21:</b> Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine <b>6</b> (KSK-21) (250 $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z <i>in vitro</i> spektrofotometričnim encimskim testom .....	49
<b>Slika 22:</b> Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine <b>7</b> (TNM-12) (250 $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z <i>in vitro</i> spektrofotometričnim encimskim testom .....	49
<b>Slika 23:</b> Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine <b>8</b> (TAK-12) (250 $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z <i>in vitro</i> spektrofotometričnim encimskim testom .....	50
<b>Slika 24:</b> Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine <b>9</b> (ATN-53) (250 $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z <i>in vitro</i> spektrofotometričnim encimskim testom .....	50
<b>Slika 25:</b> Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine <b>10</b> (TCF-8a) (250 $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z <i>in vitro</i> spektrofotometričnim encimskim testom .....	51
<b>Slika 26:</b> Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine <b>11</b> (TNH-7) (250 $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z <i>in vitro</i> spektrofotometričnim encimskim testom .....	51
<b>Slika 27:</b> Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine <b>12</b> (KSK-75) (250 $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z <i>in vitro</i> spektrofotometričnim encimskim testom .....	52

## POVZETEK

Bakterije neprestano razvijajo odpornost proti protibakterijskim učinkovinam, zato je poleg pravilne in upravičene uporabe protibakterijskih učinkovin nujno iskanje novih bakterijskih tarč in njihovih modulatorjev. Zanimiva tarča za načrtovanje novih protibakterijskih učinkovin je bakterijski encim D-aspartat ligaza, ki spada v ATP-grasp naddružino encimov. Prisotna je v številnih po Gramu pozitivnih bakterijah, kjer v citoplazmi na  $\epsilon$ -amino skupino L-lizina peptidoglikanskega prekursorja pripenja D-asparaginsko kislino.

Namen naše magistrske naloge je bil poiskati nove potencialne zaviralce D-aspartat ligaze. Z *in vitro* spektrofotometričnim encimskim testom smo testirali 20 spojin – ATP kompetitivnih zaviralcev bakterijskega encima DNA giraza. Sklepali smo, da bi lahko že poznani zaviralci DNA giraze zavirali tudi delovanje našega tarčnega encima, saj DNA giraza tako kot D-aspartat ligaza spada v ATP-grasp naddružino encimov.

Na podlagi dobljenih rezultatov smo ugotovili, da spojine z dodatnim aromatskim obročem ali 4,5-dibromo-2-pirolamidno skupino niso primerne za testiranje z omenjeno encimsko metodo, saj so v testnih pogojih slabo topne, pri valovni dolžini merjenja imajo previsoko absorbanco ali pa interferirajo s komponentami testnega sistema. Spojine s 4-bromo-5-metilpirolno, 4,5-dikloro-2-pirolno, 3,4-dikloro-5-metilpirolno ali 4-kloro-5-metilpirolno skupino pa so se izkazale kot primerne za testiranje. Na podlagi odnosa med strukturo in delovanjem zaviralcev D-aspartat ligaze smo načrtovali novo spojino (spojino **26** (ZJL-8)), ki vsebuje strukturne elemente, ki so se pri rešetanju knjižnice zaviralcev DNA giraze izkazali za potencialno ugodne. Spojino **26** (ZJL-8) smo sintetizirali in jo biološko ovrednotili. Izkazalo se je, da pri koncentraciji 250  $\mu$ M sicer zavira D-aspartat ligazo, vendar z 82 % rezidualno aktivnostjo encima ni najboljši potencialni zaviralec. Naše delo predstavlja izhodišče za nadaljnje načrtovanje in iskanje novih, še boljših zaviralcev D-aspartat ligaze.

**KLJUČNE BESEDE:** bakterija, odpornost, D-aspartat ligaza, *in vitro* spektrofotometrični encimski test, rezidualna aktivnost



## ABSTRACT

Bacteria constantly evolve resistance to antibacterial agents. Therefore, in addition to appropriate and justifiable use of antibacterial agents, it is urgent to search for new antibacterial targets and their modulators. Interesting target for the design of new antibacterial agents is a bacterial enzyme D-aspartate ligase, that belongs to the ATP-grasp superfamily of enzymes. It is present in many Gram-positive bacteria, where it ligates D-aspartic acid to the  $\epsilon$ -amino group of L-lysine in the cytoplasmic peptidoglycan precursor.

The aim of our thesis was to find new potential inhibitors of D-aspartate ligase. We tested 20 compounds – ATP competitive inhibitors of bacterial enzyme DNA gyrase using *in vitro* spectrophotometric enzyme assay. We predicted, that already known inhibitors of DNA gyrase may also inhibit our target enzyme, because DNA gyrase like D-aspartate ligase belongs to the ATP-grasp superfamily of enzymes.

Based on the obtained results, we found out, that compounds with additional aromatic ring or 4,5-dibromo-2-pyrroleamide group are not suitable for testing with our method, because they are poorly soluble under test conditions, they have too high absorbance at the wavelength of measurement or interfere with the components of the test system. Compounds with 4-bromo-5-methylpyrrole, 4,5-dichloro-2-pyrrole, 3,4-dichloro-5-methylpyrrole or 4-chloro-5-methylpyrrole group showed to be suitable for testing. On the basis of the structure-activity relationship of inhibitors of D-aspartate ligase, we designed a new compound (compound **26** (ZJL-8)), which includes structural elements, that have been identified as potentially favourable in screening library of inhibitors of DNA gyrase. We synthesized compound **26** (ZJL-8) and biologically evaluated it. It has been shown that at a concentration of 250  $\mu$ M compound **26** (ZJL-8) inhibits D-aspartate ligase, but with 82 % of residual activity of the enzyme it is not the best potential inhibitor. Our work represents a starting point for further planning and search for new, even better inhibitors of D-aspartate ligase.

**KEYWORDS:** bacteria, resistance, D-aspartate ligase, *in vitro* spectrophotometric enzymatic assay, residual activity

## SEZNAM OKRAJŠAV

ADP	adenozin difosfat
Ala	alanin
Asl	aspartat ligaza
Asp	asparaginska kislina
ATP	adenozin trifosfat
CoA	koencim A
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid
Et <sub>3</sub> N	triethylamin
G-	po Gramu negativne (bakterije)
G+	po Gramu pozitivne (bakterije)
GlcNAc (NAG)	<i>N</i> -acetilglukozamin
Glu	glutaminska kislina
HOBt	1-hidroksibenzotriazol
LDH	laktat dehidrogenaza
Lys	lizin
MDR	odpornost proti več učinkovinam (multi-drug resistance)
Mra Y	fosfo-MurNAc-pentapeptid-translokaza
MRSA	proti meticilinu odporni <i>Staphylococcus aureus</i>

MurA	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin-enolpiruvil transferaza
MurB	UDP- <i>N</i> -acetilenolpiruvil-glukozamin reduktaza
MurC	UDP- <i>N</i> -acetilmuramat:L-Ala ligaza
MurD	UDP- <i>N</i> -acetilmuramil-L-Ala:D-Glu ligaza
MurE	UDP- <i>N</i> -acetilmuramil-tripeptid ligaza
MurF	UDP- <i>N</i> -acetilmuramil-pentapeptid ligaza
MurG	UDP- <i>N</i> -glukozamin- <i>N</i> -acetilmuramil-pentapeptid-pirofosforil-undekaprenol- <i>N</i> -acetil glukozamin transferaza
MurNAc (NAM)	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
NMM	N-metilmorfolin
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
PEP	fosfoenolpiruvat
Pi	anorganski fosfat
PK	piruvat kinaza
RA	rezidualna aktivnost encima
Ser	serin
tRNA	prenašalna RNA
Tyr	tirozin
UDP	uridin difosfat
UM5K	UDP-MurNAc-pentapeptid
Val	valin
VRE	proti vankomicinu odporni enterokoki
VRSA	proti vankomicinu odporni <i>Staphylococcus aureus</i>

## 1 UVOD

Antibiotiki nedvomno predstavljajo enega izmed največjih medicinskih dosežkov človeštva, vendar je vedno več bakterij, ki so bile včasih občutljive na določene protibakterijske učinkovine, danes pa so proti njim odporne (1, 2). Nevarne infekcije, ki jih povzročajo odporne bakterije, so velik zdravstveni problem 21. stoletja, zdravljenje teh infekcij je zapleteno, dolgotrajno in zelo drago, pogosto pa se konča s smrtnim izidom (2, 3, 4).

Prvi primeri odpornosti so se pojavili v poznih 30. in 40. letih 20. stoletja, kmalu po uvedbi prvih antibiotikov. Na začetku uporabe antibiotikov so odporne bakterije povzročale infekcije predvsem v bolnišnicah. Najbolj so bili infekcijam z odpornimi sevi podvrženi bolniki v kritičnem stanju na intenzivnih oddelkih, bolniki, ki so prejeli steroide, bolniki na imunosupresivni terapiji, kronično bolni in nevtropenični bolniki. Kasneje so se odporne bakterije razširile izven bolnišnic in danes povzročajo hude bolezni tudi pri predhodno zdravih posameznikih (2).

Bakterije so razvile odpornost proti različnim antibiotikom, saj so se izjemno sposobne prilagajati okolju, v katerem živijo (2). Ločimo naravno (oziroma intrinzično) in pridobljeno odpornost. Naravna odpornost je prirojena, pri čemer so vsi sevi določene bakterijske vrste enako odporni na določeno protibakterijsko učinkovino (5). Odpornost jim omogočajo geni za odpornost, ki so se pri teh bakterijah razvili že dolgo nazaj, še preden so se antibiotiki začeli uporabljati v klinični medicini (6). Večjo skrb predstavlja pridobljena odpornost, kjer bakterije, sprva občutljive na določeno protibakterijsko učinkovino, postanejo nanjo odporne (5). Pridobljena odpornost se torej razvije šele po izpostavitvi bakterij antibiotiku (4). Vzrok za pridobljeno odpornost so mutacije ali pa pridobljeni geni, ki kodirajo odpornost (v tem primeru na antibiotik občutljive bakterije prejmejo genetske informacije od odpornih sevov bakterij s procesom konjugacije, transformacije ali transdukcije) (5).

Bakterij, ki so do danes razvile odpornost, je veliko. Odporni so postali različni sevi bakterij *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* itd. (2, 5).

Odpornost je pogosto vzrok neuspešnega zdravljenja. To privede do resnih posledic in večje umrljivosti med bolniki, še posebej pri okužbah krvnega obtoka, transplantaciji, kemoterapiji, intubaciji in kateterizaciji (5, 7). Če bo odpornost še naprej naraščala, se lahko zgodi, da bodo današnji napredni kirurški posegi postali preveč tvegani zaradi nevarnosti infekcij (8). Največjo grožnjo predstavljajo MRSA (proti meticilinu odporni *S. aureus*), VRSA (proti vankomicinu odporni *S. aureus*), VRE (proti vankomicinu odporni enterokoki) in MDR sevi (sevi, odporni proti več učinkovinam) (9, 10). V skupino MDR sevov uvrščamo bakterijske seve, ki so razvili odpornost proti najmanj trem razredom antibiotikov hkrati (5). To so nekateri sevi enterokokov, *Corynebacterium jeikeium*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *M. tuberculosis* itd. (9, 11).

Dejavniki, ki so prispevali k razvoju odpornosti, so številni (2). Največ je k razvoju odpornosti prispevala neprimerna uporaba antibiotikov (1). Zdravniki antibiotike pogosto predpisujejo pri prehladu, gripi, virusni pljučnici in ostalih virusnih boleznih. Glede na ocene v več kot 50 % primerov predpišejo antibiotik brez jasnega dokaza oziroma znaka infekcije (10). Zato bi morali zdravniki antibiotike predpisovati pazljivo in samo takrat, ko je njihova uporaba upravičena (2). Poleg tega mora zdravljenje trajati dovolj dolgo. Bolniki morajo jemati zdravilo do konca, četudi že prej pride do izboljšanja (8). Samo z ustreznim zdravljenjem (pravo zdravilo v dovolj visokih odmerkih zadosti časa) zmanjšamo selektivni pritisk in s tem možnost nastanka odpornih mutantov (5, 6). Poleg slabega sodelovanja bolnikov pri zdravljenju z zdravili so problematični tudi pomanjkljivi preventivni ukrepi, npr. umivanje rok in primerna izolacija bolnikov z odpornimi infekcijami. Veliko je k razširjanju odpornosti doprinesel napredek v medicini, ki omogoča opravljanje invazivnih postopkov in preživetje bolnikov z resnimi boleznimi. Ti bolniki so poleg starejših ljudi rizična skupina za infekcije, zato je pri njih povečana uporaba antibiotikov (2). K nastanku odpornih sevov je pripomogla tudi nemedicinska raba antibiotikov v kmetijstvu. Antibiotike dodajajo v krmo za preprečevanje nastanka bolezni in spodbujanje rasti pri živalih (predvsem v govedoreji, prašičereji in perutninarstvu) (6, 10). Vse to so razlogi, ki so zaradi vsesplošne uporabe antibiotikov v medicini, veterini in kmetijstvu pripomogli k širjenju odpornosti (6).

Zaradi pojava odpornosti je zelo malo verjetno, da bodo pogoste infekcijske bolezni izkoreninjene, kot so mnogi predvidevali v sredini 20. stoletja. Glede na dosedanje izkušnje lahko sklepamo, da bo v prihodnosti število novih infekcijskih bolezni naraslo,

vedno večje pa bo tudi število bakterij, ki so odporne proti več različnim antibiotikom hkrati (2). Kljub nenehnemu naraščanju odpornosti je število novih antibiotikov, odobrenih za klinično uporabo v zadnjih dveh desetletjih, izredno upadlo (12). Mnoga farmacevtska podjetja so ustavila razvoj protibakterijskih učinkovin med drugim tudi zaradi ekonomskih razlogov (2). Predpisovanje antibiotikov je namreč omejeno, uporabljajo se samo za zdravljenje resnih bakterijskih infekcij. Poleg tega zdravljenje z antibiotikom traja kratek čas, za razliko od zdravljenja kroničnih bolezni (9). Ker upravičena raba antibiotikov pomeni zmanjšano uporabo teh zdravil, so farmacevtska podjetja izgubila interes za razvoj novih. Prioriteto dajejo razvoju zdravil za kronične bolezni, saj je na tem področju več poslovnih priložnosti (2).

## **1.1 BAKTERIJSKA CELICA**

Bakterije uvrščamo med prokariote. Za razliko od živalskih celic, ki so evkarionti, bakterijske celice nimajo jedra in ostalih celičnih organelov, zato vsi procesi, ki pri evkariontih potekajo na membranah znotrajceličnih organelov, pri bakterijah potekajo v celični membrani. V celični membrani bakterij tako najdemo membranske proteine, ki so vključeni v proizvodnjo energije, biosintezo lipidov, izločanje in transport (8, 13).

Ker se bakterije od evkariontskih celic razlikujejo tudi po biokemijskih reakcijah, imajo številne encime, ki jih pri evkariontih ne najdemo. Evkarionti imajo samo celično membrano, bakterijske celice pa imajo poleg celične membrane še celično steno (8). Celična stena je pomembna struktura zaradi več razlogov: določa obliko celice, prispeva k patogenosti, bakterijo varuje pred toksičnimi snovmi in ji omogoča, da preživi različne okoljske spremembe (kot so spremembe v osmotskem tlaku, pH in temperaturi) (8, 10). Vse strukture skupaj, ki obdajajo citoplazmo, imenujemo celična ovojnica. Glede na zgradbo celične ovojnice bakterije delimo na dve glavni skupini: po Gramu negativne (G-) in po Gramu pozitivne (G+) bakterije (13).

### **1.1.1 Po Gramu negativne bakterije**

Celično ovojnico G- bakterij sestavljajo tri glavne plasti: citoplazemska oziroma notranja membrana, peptidoglikanska celična stena in zunanja membrana (13). Peptidoglikan v G- bakterijah je debel 2 do 7 nm in ima eno do nekaj plasti. Zunanja membrana, ki ga obdaja, je debela 7 do 8 nm (10, 13). Ker je plast peptidoglikana tanka, predstavlja zunanja

membrana zaščitno bariero in je hkrati tudi dodatna stabilizacijska plast okoli celice (13). Sestavljajo jo predvsem kompleksni lipopolisaharidi, ki imajo več pomembnih funkcij. Prispevajo k negativnemu naboju površine bakterijske celice, ustvarjajo permeabilno bariero, stabilizirajo strukturo zunanje membrane, vplivajo na morfologijo, pomagajo bakterijam pri pripenjanju na površine in sodelujejo pri oblikovanju biofilma. Poleg tega, da določajo serotip, patogene G- bakterije ščitijo pred gostiteljevimi obrambnimi mehanizmi in lahko povzročijo septični šok, saj so endotoksini. Poleg lipopolisaharidov zunanja membrana vsebuje tudi številne encime in porine (4, 10).

### **1.1.2 Po Gramu pozitivne bakterije**

Celična ovojnica G+ bakterij je sestavljena iz citoplazemske membrane, ki jo obdajajo plasti peptidoglikana (14). G+ bakterije za razliko od G- bakterij nimajo zunanje membrane, ki bi jim nudila dodatno zaščito. Da lahko kljub temu nasprotujejo turgorju, so obdane s 30–100 nm debelim, večplastnim peptidoglikanom. Nanj so vezani številni polimeri, ki lahko pri G+ bakterijah predstavljajo več kot 60 % mase celične stene (13). Zato je celična stena G+ bakterij zapleten skupek makromolekul. Vsebuje polisaharide, ki so zelo raznoliki, saj se razlikujejo po sladkorjih, iz katerih so sestavljeni, povezavah med njimi in razvejanosti (14).

Celična stena G+ bakterij običajno vsebuje veliko tehojskih kislin (10). Tehojska kislina je anionski polimer, sestavljen iz ponovitev glicerol fosfata, glukozil fosfata ali ribitol fosfata. Lahko je kovalentno pripeta na peptidoglikan ali pa se veže na membranske lipide. V tem primeru se imenuje lipotehojska kislina (13). Tehojska kislina je vir ionov, ki jih encimi potrebujejo za svoje delovanje. Ima tudi druge pomembne vloge: regulira avtolizine, ohranja morfologijo celice, prepoznava bakteriofage, interagira z gostiteljevim imunskim sistemom in sodeluje pri kolonizaciji gostitelja (14). Tehojska kislina je negativno nabita, zato daje celični steni G+ bakterij negativen naboj. G- bakterije ne vsebujejo tehojske kisline (10). G+ bakterije pa poleg tehojske kisline vsebujejo veliko površinskih proteinov (npr. protein A, fibronektin vezoče proteine), ki so pripeti na peptidoglikan in vključeni v patogene procese (15).

## 1.2 PEPTIDOGLIKAN

Peptidoglikan ali murein je glavna in specifična komponenta bakterijske celične stene (16). Je polimer, po obliki podoben mreži (17). Najdemo ga v večini bakterijskih vrst, odsoten pa je v bakterijah rodu *Mycoplasma* in bakteriji *Orientia tsutsugamushi* (15). Ker ni prisoten v rastlinskih, živalskih in človeških celicah, je pomembna tarča zaviralcev bakterijskih patogenov (3). Čeprav se celične stene različnih bakterijskih vrst med sabo strukturno razlikujejo, so si po sestavi in biosintezi peptidoglikana precej podobne (18).

Peptidoglikan v celoti obdaja citoplazemsko membrano in služi kot mehanska zaščita celice (12). Zaradi turgorja je peptidoglikan v živi celici ves čas pod dinamičnim pritiskom in obstaja meja, do katere se lahko maksimalno razteza (15). Peptidoglikan daje celici značilno obliko. Nanj se pripenjajo proteini in polisaharidi (16). Poleg tega je vpleten v rast in delitev celice (15). Peptidoglikanska mreža mora biti zadosti močna (da lahko nasprotuje turgorju in se ohranja oblika celice) in hkrati zadosti elastična (da lahko celica raste in se deli) (14). Ker se plast peptidoglikana med celično rastjo in delitvijo neprestano spreminja, celična stena ni statična struktura (16). Vseskozi je v dinamičnem stanju, struktura peptidoglikana pa je rezultat zapletenih procesov biosinteze in degradacije (14). Zato so za vzdrževanje strukture peptidoglikana potrebni številni encimi, ki med sabo delujejo usklajeno (17).

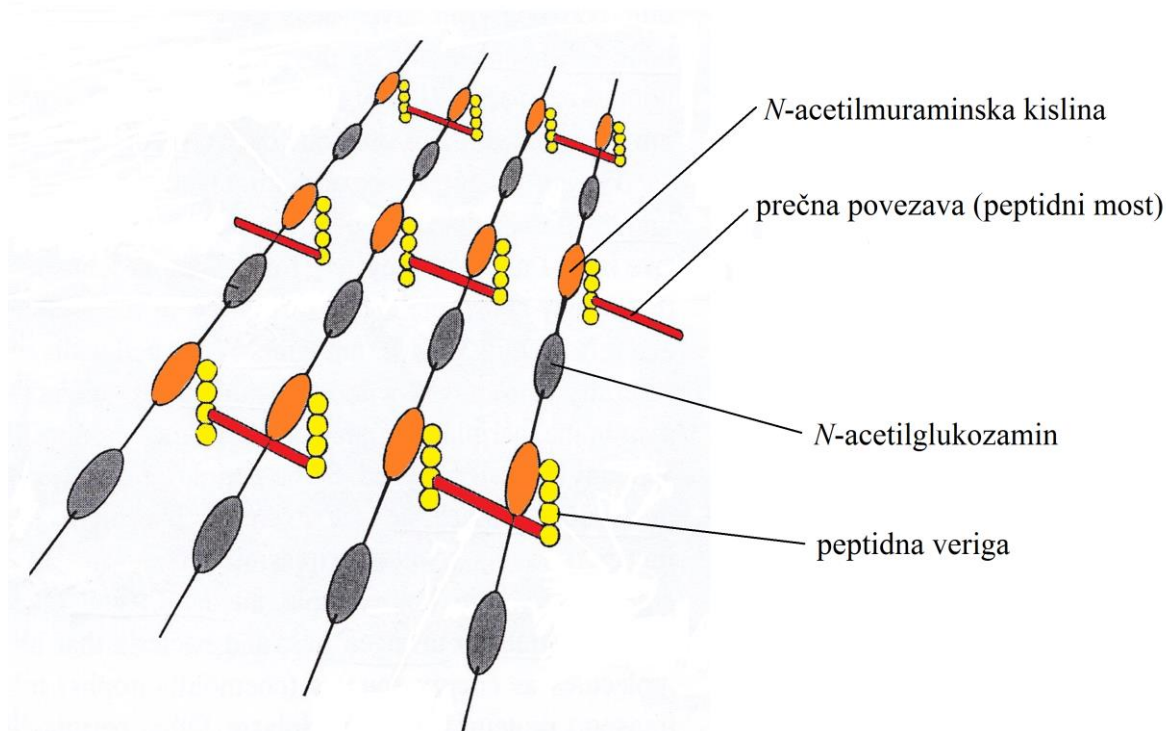
Značilnost peptidoglikana so tudi D-aminokislina (19). Medtem ko v naravi nedvomno prevladujejo L-aminokislina, so D-aminokislina osnovna sestavina bakterijske celične stene (19, 20). D-aminokislina prispevajo k arhitekturi peptidoglikana (19). Poleg tega zagotavljajo odpornost proti peptidazam, saj so peptidaze ponavadi specifične za peptide, ki vsebujejo L-aminokislina (20). D-aminokislina v peptidoglikanu na ta način varujejo nujno potrebne celične strukture in verjetno predstavljajo prilagoditev bakterij (19). Najbolj pogosti D-aminokislina v bakterijski celični steni sta D-alanin (D-Ala) in D-glutaminska kislina (D-Glu) (20).

### 1.2.1 Zgradba peptidoglikana

Peptidoglikan je sestavljen iz linearnih glikanskih verig, ki so med sabo prečno povezane s kratkimi peptidi. Glikanske verige so sestavljene iz enot *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) in *N*-acetilmuraminske kislina (MurNAc) (Slika 1). Enote GlcNAc in MurNAc se med sabo

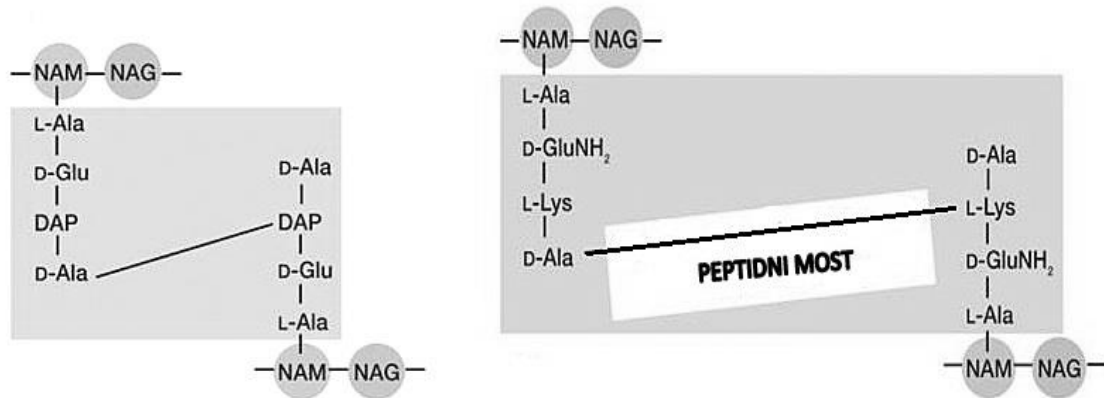


izmenjujejo in so povezane z  $\beta$ -1,4-glikozidnimi vezmi (3, 15). Na D-laktilno skupino vsake MurNAc je vezana peptidna veriga (15).



**Slika 1:** Zgradba peptidoglikana (povzeto po 10).

Peptidne verige se med bakterijskimi vrstami razlikujejo v sestavi in prečnih povezavah (14). Za njih so značilne nekatere nenavadne lastnosti. V njih najdemo D- in L-izomere aminokislin, ki se med sabo izmenjujejo. Vsebujejo  $\gamma$ -vezano D-glutaminsko kislino in neproteinogene aminokislino, kot so diaminopimelinska kislina, lantionin in ornitin (16). Prva aminokislina v peptidni verigi je običajno L-alanin (L-Ala), v redkih primerih pa na tem mestu najdemo tudi glicin (Gly) ali L-serin (L-Ser). Naslednja aminokislina je v vseh bakterijskih vrstah D-glutaminska kislina (D-Glu). Na mestu 3 v peptidni verigi je raznolikost med bakterijskimi vrstami največja. Ponavadi se na tem mestu nahaja diaminokislina. V večini G- bakterij ter v bakterijah iz rodov *Mycobacterium* in *Bacillus* je ta aminokislina *mezo*-diaminopimelinska kislina (*mezo*-DAP), v večini G+ bakterij pa L-lizin (L-Lys) (Slika 2). V določenih bakterijskih vrstah lahko najdemo tudi ostale diaminokislino (L-ornitin, LL-diaminopimelinsko kislino, *mezo*-lantionin, L-diaminobutanojsko kislino ali D-lizin) ali monoaminokislino (L-homoserin, L-alanin ali L-glutaminsko kislino). Na mestu 4 se nahaja D-Ala (15).



**Slika 2:** Primerjava zgradbe peptidoglikana v G- bakterijah (levo) in v G+ bakterijah (desno) (povzeto po 10).

Peptidne verige so med sabo prečno povezane (15). Prečna povezava ponavadi poteka med D-Ala na mestu 4 ene peptidne verige in diaminokislino na mestu 3 druge verige (14). Takšna povezava se imenuje 3–4 prečna povezava in je najpogostejši način povezovanja (15). V večini G- bakterij, bakterijah rodu *Mycobacterium* in nekaterih G+ bakterijah (*Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium* in *Nocardia*) se prosta amino skupina *mezo*-DAP neposredno poveže s prosto karboksilno skupino končnega D-Ala sosednje peptidne verige. V večini G+ bakterij pa se z D-Ala poveže L-Lys. Povezava poteka preko peptidnega mosta (Slika 2) (10). Peptidni mostovi so različno dolgi, saj vsebujejo od 1 do 7 aminokislin. V njih najdemo številne aminokislino (Gly, L-Ala, L- ali D-Ser, L- ali D-Glu itd.) (15). Zaradi peptidnih mostov je zgradba peptidoglikana v mnogih G+ bakterijah bolj zapletena kot v G- bakterijah (16). V nekaterih korinebakterijah srečamo tudi 2–4 prečne povezave. Peptidni most poteka med  $\alpha$ -karboksilno skupino D-Glu na mestu 2 ene peptidne verige in karboksilno skupino D-Ala na mestu 4 druge peptidne verige. Pri tem načinu povezave mora peptidni most vsebovati diaminokislino (10, 15). Poleg 3–4 in 2–4 poznamo še 3–3 prečne povezave, ki prevladujejo v *M. tuberculosis* in *Clostridium difficile* (14).

Bakterijske vrste pa se med sabo ne razlikujejo samo po načinu prečnih povezav, ampak tudi po njihovem številu. V rodu *Bacillus* in večini G- bakterij je med glikanskimi verigami manj prečnih povezav kot v G+ bakterijah. V G+ bakteriji *S. aureus* je skoraj vsaka muraminska kislina prečno povezana z drugo (10). Zaradi prečnih povezav in različnih aminokislin, ki sestavljajo peptidne verige, se bakterije razlikujejo v zgradbi peptidoglikana predvsem zaradi peptidnih delov. Glikanski del peptidoglikana je precej

bolj enoten, vendar se prav tako lahko pojavi nekaj sprememb (16). Osnovna struktura peptidoglikana je pri večini bakterijskih vrst delno spremenjena tudi zaradi N-deacetilacije, N-glikozilacije ali O-acetilacije glikanskih verig in amidacije prostih karboksilnih skupin aminokislin v peptidnih verigah (14, 15).

### 1.2.2 Biosinteza peptidoglikana

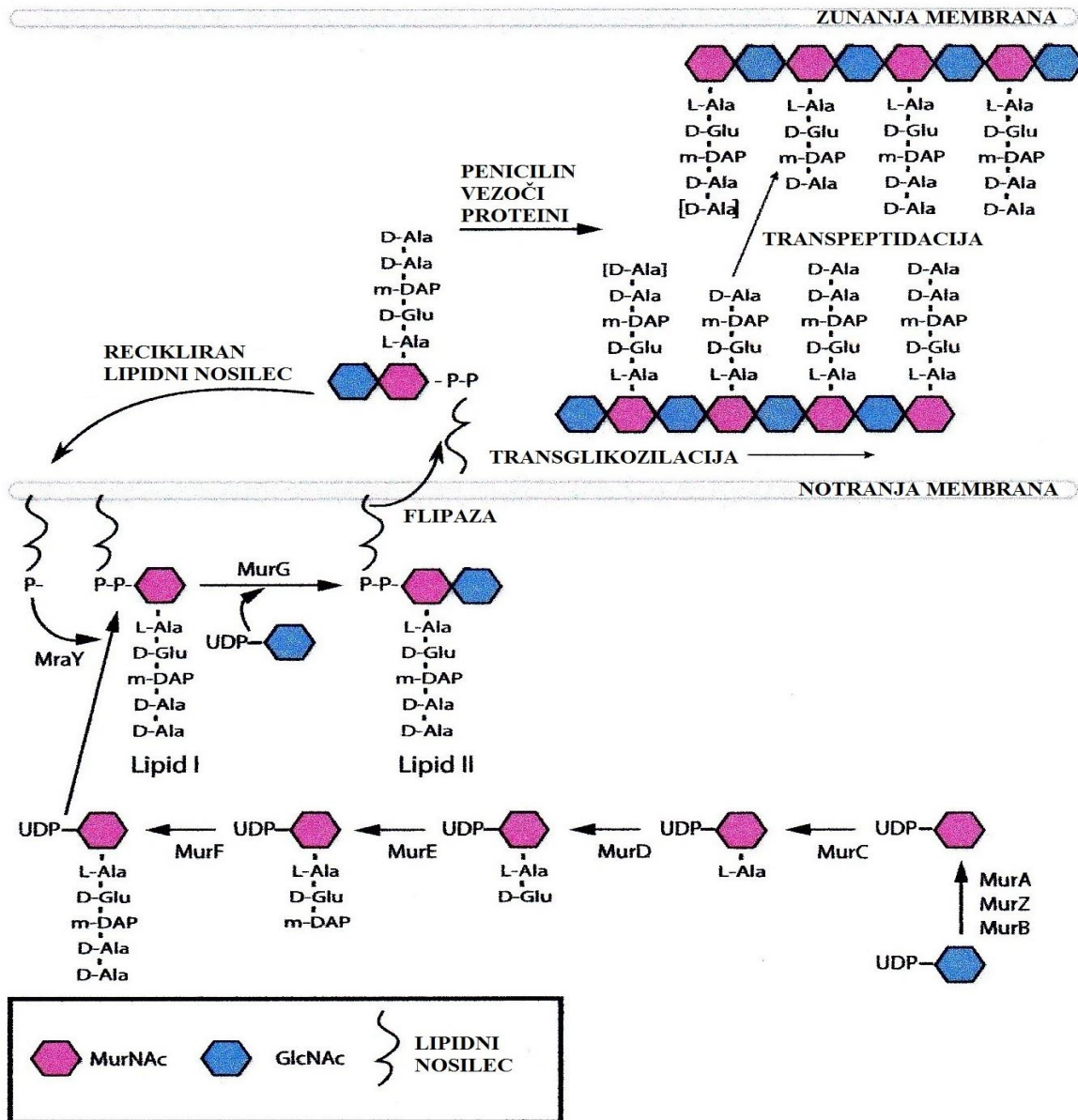
Sinteza peptidoglikana poteka znotraj (v citoplazmi) in zunaj celice (18). Razdelimo jo na 3 stopnje. V prvi stopnji, ki poteka v citoplazmi, nastane lipid II. V drugi stopnji se lipid II prenese na zunanjo stran membrane (14). Tretja stopnja biosinteze peptidoglikana torej v G- bakterijah poteka v periplazemskem prostoru, v G+ bakterijah pa zunaj celice (20). V tej stopnji poteče polimerizacija predhodno sintetiziranih podenot, pri čemer nastane makromolekula (14). V sintezo peptidoglikana so vključeni številni bakterijski encimi (12).

Najprej se v citoplazmi iz fruktoze-6-fosfata v štirih stopnjah sintetizira uridin difosfat N-acetilglukozamin (UDP-GlcNAc). Iz UDP-GlcNAc nato nastane uridin difosfat N-acetilmuraminska kislina (UDP-MurNAc). Nastanek UDP-MurNAc katalizirata encima MurA in MurB. Na UDP-MurNAc nato skupina encimov, ki jih imenujemo Mur ligaze (MurC, D, E in F), postopno doda 5 aminokislin (14, 16). Mur ligaze za svoje delovanje potrebujejo adenozin trifosfat (ATP) (14). Prvo aminokislino v peptidnem delu doda MurC. V večini bakterijskih vrst je ta aminokislina L-Ala. Drugo aminokislino D-Glu doda MurD. Dodajanje tretje aminokislina katalizira MurE. MurE pripne eno izmed diaminokislin. Aminokislini na mestih 4 in 5 sta v verigo dodani skupaj, v obliki dipeptida. V večini primerov je ta dipeptid D-Ala-D-Ala. Pri njegovi sintezi sodeluje encim D-alanil-D-alanin ligaza. D-Ala-D-Ala v peptidno verigo pripne MurF ligaza (15). Tako nastane UDP-MurNAc-pentapeptid (14).

V nadaljevanju se potem UDP-MurNAc-pentapeptid veže na lipidni nosilec in tako nastane lipid I. Za to vezavo je potrebna membranska translokaza Mra Y. Nato glikozil transferaza MurG na lipid I pripne GlcNAc in tako nastane lipid II (14). V peptidni verigi lipida II nato pride do nadaljnjih modifikacij. Spremembe aminokislin predvsem na mestih 2 in 3 so posledica amidacij, hidroksilacij, acetilacij, pripenjanja aminokislin, proteinov ali drugih skupin (15). Pripenjanje dodatnih aminokislin na Lys na mestu 3 pentapeptidne verige lipida II je značilno za nekatere G+ bakterije (21). Sinteza teh stranskih peptidnih verig torej poteka v citoplazmi. Pripnejo se lahko ne samo na lipidni prekurzor, ampak že prej na

nukleotid MurNAc-pentapeptid (odvisno od bakterijske vrste) (14). Aminokislina, ki se pripenja v stranske peptidne verige, razdelimo v dve skupini. Gly in L-aminokislina se aktivirajo v obliki aminoacil-tRNAz. Na prekursor jih nato prenese družina neribosomalnih encimov, ki se imenujejo Fem transferaze. D-aminokislina pa se v prekursor vgradijo z ligacijo, za kar je potreben encim iz ATP-grasp naddružine (15). Lipid II (z ali brez stranske verige) se nato prenese na zunanjo stran citoplazemske membrane, pri tem sodeluje encim flipaza (14).

V zadnji stopnji sinteze peptidoglikana potečejo reakcije transglikozilacije in transpeptidacije (14). Te reakcije katalizirajo na membrano vezani encimi, ki jih imenujemo penicilin vezoči proteini (3). V to skupino encimov spadajo glikoziltransferaze, ki polimerizirajo glikanske verige in DD-transpeptidaze, ki povezujejo peptide (22). L,D-transpeptidaze, ki so potrebne za alternativne 3–3 prečne povezave, pa ne uvrščamo med njih (14). Nekateri penicilin vezoči proteini so bifunkcionalni, saj imajo tako transglikozilazno kot tudi transpeptidazno aktivnost (17). Med transglikozilacijo se lipid II vgradi v že obstoječi peptidoglikan (14). Najprej encimi avtolizini hidrolizirajo vezi med enotami GlcNAc in MurNAc, kar vodi do nastanka majhnih prekinitev v peptidoglikanu. V nastale vrzeli se nato vgradijo na novo sintetizirane enote (6). Nereducirajoči konec lipida II se veže preko  $\beta$ -1,4-glikozidne vezi na reducirajoči konec rastoče verige peptidoglikana (17). Ob tem se z lipidnega nosilca odcepi anorganski fosfat in lipidni nosilec se reciklira nazaj na notranjo stran citoplazemske membrane (14). Nazadnje poteče še transpeptidacija, pri čemer nastanejo prečne povezave med peptidi sosednjih verig (6). Med transpeptidacijo se pretrga vez med dvema D-alaninskima ostanekoma, ki sta v prekursorju peptidoglikana vezana na koncu peptidne verige. Terminalni D-Ala se odcepi v eksergonski reakciji. Energija, ki se pri tem sprosti, se porabi za nadaljnji potek transpeptidacije (6, 8). S tem se zagotovi, da je mreža peptidoglikana okoli celice zadosti stabilna (12). Vse 3 stopnje biosinteze peptidoglikana so prikazane na Sliki 3.



Slika 3: Biosinteza peptidoglikana v G- bakterijah (povzeto po 20).

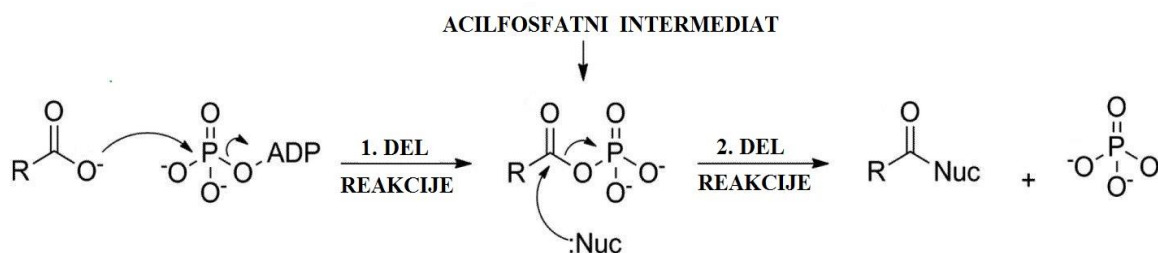
### 1.3 ATP-grasp NADDRUŽINA ENCIMOV

Encimi v številnih bioloških procesih znotraj celice za svoje delovanje pogosto potrebujejo ATP (23). Koncentracija ATP v bakterijski celici je med 0,6 in 18 mM. Koncentracija je odvisna od vrste bakterije, a je običajno enaka znotrajcelični koncentraciji ATP v človeških celicah (1–10 mM) (24). ATP v encimskih reakcijah nastopa kot substrat (v reakcijah, ki jih katalizirajo kinaze) ali pa je vir energije (v reakcijah, ki jih katalizirajo ligaze) (23). Bakterijski genom kodira na stotine ATP-vezavnih proteinov. Poleg mnogih

dobro poznanih encimov (kot je DNA giraza) v to skupino spada tudi množica manj raziskanih encimov (9).

Encimi, ki za svoje delovanje potrebujejo ATP, spadajo v različne naddružine. Te se med sabo razlikujejo glede na reakcijski mehanizem, strukturo encimov in ATP-vezavne motive. Ena izmed takšnih naddružin je ATP-grasp naddružina. ATP-grasp encimi so vpleteni v različne metabolične poti. Sodelujejo pri biosintezi purinov, glukoneogenezi in sintezi maščobnih kislin (23). Prvi encimi, ki so jih uvrstili v to naddružino, so bili biotin karboksilaza, D-alanin-D-alanin ligaza, glutation sintetaza in karbamoil fosfat sintetaza (25). Danes v to skupino spadajo še številni drugi encimi (sukcinil-CoA sintetaza, piruvat fosfat dikinaza ...) (23).

ATP-grasp encimi katalizirajo ligacijo ogljika iz karboksilne skupine prvega substrata na dušik v amino ali imino skupini, kisik v hidroksilni skupini ali na žveplo v tiolni skupini drugega substrata (15, 26). Za reakcijo so poleg ATP potrebni tudi  $Mg^{2+}$  ioni (12). Prvi substrat je lahko protein, kratek peptid, aminokislina ali majhna spojina, kot so organske ali anorganske kisline (npr. citronska kislina). Drugi substrat je lahko aminokislina (Glu, Gly, Val, D-Ala in Tyr), koencim A (CoA), biotiniliran protein ali celo majhna molekula, kot je amonijev ion (26). Kljub raznolikim parom substratov so si ATP-grasp encimi po reakcijskem mehanizmu zelo podobni (27). Splošna reakcija za vse ligaze ATP-grasp naddružine je naslednja (Slika 4):



**Slika 4:** Splošna reakcija ligaz ATP-grasp naddružine (povzeto po 23).

Reakcijo lahko razdelimo na 2 dela. Najprej karboksilna kislina prvega substrata reagira z ATP in pri tem nastane reaktivni acilfosfatni intermediat. S tem se karboksilna kislina spremeni v elektrofil. V drugem delu reakcije acilfosfatni intermediat reagira z nukleofilnim substratom. Predpostavlja se, da gre za neposreden nukleofilni napad na

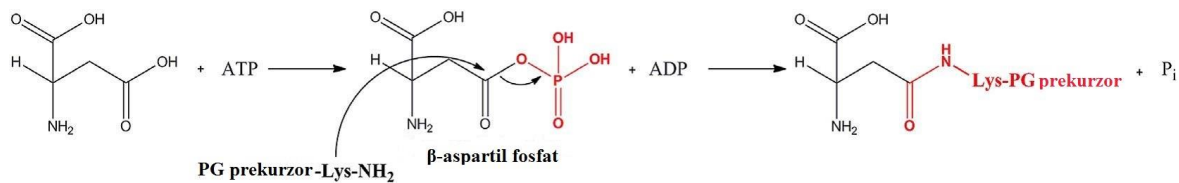
karbonilni ogljik v acilfosfatnem intermediatu. Pri tem nastane tetraedrični intermediat, ki nato razpade na končni produkt in anorganski fosfat (23).

ATP-grasp encimi imajo atipično ATP-vezavno mesto, ki ga poznamo pod imeni GSHazno zvitje, palmatno zvitje ali ATP-grasp zvitje (23, 28). Čeprav imajo ATP-grasp encimi podobno strukturo, so si po sekvenci le malo podobni (ujemajo se le v približno 10–20 %) (26). Obstajajo pa številni aminokislinski preostanki, ki so vključeni v vezavo ATP in jih najdemo pri skoraj vseh ATP-grasp encimih (23). Tako je za ATP-grasp zvitje značilnih 13 aminokislinskih preostankov, ki nam pomagajo pri določanju ATP-grasp motiva (23, 29). ATP-vezavno mesto ATP-grasp encimov se torej razlikuje od ATP-vezavnih mest drugih encimov, zato je ATP-grasp zvitje primerna tarča za načrtovanje zdravilnih učinkovin oziroma zaviralcev (23).

### 1.3.1 D-aspartat ligaza

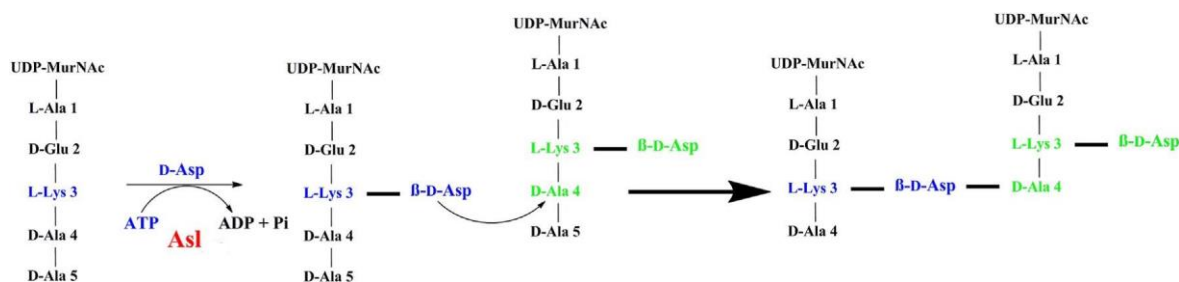
Čeprav sta D-Ala in D-Glu najbolj pogosti D-aminokislini v bakterijski celični steni, najdemo v peptidoglikanu nekaterih bakterij tudi druge D-aminokislino, na primer D-asparaginsko kislino (D-Asp) (19). D-Asp nastane iz L-Asp. Reakcijo katalizira aspartat racemaza. Aspartat racemaza je encim, prisoten v številnih G<sup>+</sup> bakterijah, vključno z *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus fermenti* in *Enterococcus faecalis* (20). D-Asp najpogosteje najdemo v stranskih verigah mlečnokislinskih bakterij (14). V številnih laktobacilih, *E. faecalis* in *Bacillus sphaericus* je peptidni most sestavljen iz ene same D-Asp. V teh bakterijah D-Asp povezuje L-Lys ene peptidoglikanske verige s terminalnim D-Ala na drugi verigi (30).

D-Asp v peptidoglikanski prekursor vgradi encim D-aspartat ligaza (D-Asl), ki ga uvrščamo v ATP-grasp naddružino encimov (31). Zadolžen je za pripenjanje D-Asp na  $\epsilon$ -amino skupino L-Lys v citoplazemskem prekursorju UDP-MurNAc-pentapeptidu. Reakcija poteka tako, da se na D-Asl najprej veže ATP in zatem še D-Asp. Po vezavi poteče fosforilacija D-Asp (12). S tem nastane aktivirana oblika te aminokislino, ki se imenuje  $\beta$ -aspartil fosfat (14). Temu sledi substitucija fosfata z  $\epsilon$ -amino skupino L-Lys, pri čemer nastane amidna vez. Ob tem se sprostita adenzin difosfat (ADP) in anorganski fosfat (Pi) (Slika 5) (12).



**Slika 5:** Reakcija, ki jo katalizira D-aspartat ligaza (povzeto po 12).

Z L-Lys se poveže β-karboksilna skupina D-Asp (Slika 6) (30). Na α-karboksilni skupini pa potem, ko je D-Asp že vgrajena v peptidoglikiški prekurzor, poteče amidacija (32). Amidacija poteče znotraj celice, še preden se peptidoglikiški prekurzor prenese čez citoplazemsko membrano (14).



**Slika 6:** Funkcija D-aspartat ligaze pri prečnem premreženju peptidoglikana (povzeto po 12).



## 2 NAMEN DELA

Odporne bakterije predstavljajo čedalje pogostejši problem, zato je v boju proti odpornim sevom nujno odkrivanje novih tarč in njihovih zaviralcev. Zanimiva tarča za načrtovanje novih protibakterijskih učinkovin je bakterijski encim D-Asl. Zaviralci D-Asl bi preprečili pripenjanje D-Asp v peptidoglikanski prekursor in s tem zavrli rast tistih patogenih G+ bakterij, ki vsebujejo ta encim. Zaviralci D-Asl bi nam koristili predvsem pri zdravljenju okužb z enterokoki, ki so pogosto odporni proti več antibiotikom hkrati in so težko ozdravljivi.

Naš namen je poiskati nove potencialne zaviralce bakterijskega encima D-Asl. Pri iskanju potencialnih zaviralcev bomo upoštevali dejstvo, da D-Asl spada v ATP-grasp naddružino encimov. V to skupino encimov spada tudi dobro poznana DNA giraza. Ker so si ATP-grasp encimi podobni po strukturi, sklepamo, da bi ATP kompetitivni zaviralci DNA giraze lahko zavirali tudi delovanje našega tarčnega encima, zato bomo spojine izbirali iz knjižnice spojin že poznanih ATP-kompetitivnih zaviralcev DNA giraze. Pri izbiranju spojin za rešetanje bomo poskušali zajeti čim več strukturnih tipov zaviralcev DNA giraze in pri tem upoštevali tudi njihovo topnost.

V okviru magistrske naloge bomo izbrane zaviralce DNA giraze ovrednotili z *in vitro* spektrofotometričnim encimskim testom. Na podlagi eksperimentalno dobljenih grafov bomo določili rezidualno aktivnost encima ob prisotnosti zaviralca v reakcijski zmesi in postavili povezavo med strukturo in aktivnostjo. Na podlagi dobljenih rezultatov rešetanja bomo predvideli strukturo novega potencialnega zaviralca D-Asl. Novi potencialni zaviralec bomo sintetizirali in ga biološko ovrednotili.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 TESTIRANJE POTENCIALNIH ZAVIRALCEV

#### Reagenti in topila

Pri pripravi raztopin za merjenje na spektrofotometru smo uporabili  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , Tris-HCl, koncentrirano HCl, D-Asp (proizvajalec Bachem), 0,5 M HCl, ATP (proizvajalec TCI), 2M NaOH, fosfoenolpiruvat (PEP) (proizvajalec Sigma-Aldrich), nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) (proizvajalec Sigma-Aldrich), glicerol, NaCl, UDP-MurNAc-pentapeptid (UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala) (UM5K) (pripravila dr. Helene Barreteau iz IB BMC, Universite de Paris-Sud, Orsay, Francija), dimetilsulfoksid (DMSO) (proizvajalec Fluka) ter encima laktat dehidrogenazo in piruvat kinazo (LDH+PK) (proizvajalec Sigma-Aldrich).

#### Laboratorijska oprema in pribor

Poleg epic smo pri testiranju spojin uporabljali enokanalne pipete z ustreznimi nastavki. Uporabljali smo 1–10  $\mu\text{L}$  pipeto Thermo Scientific<sup>TM</sup> FinnpiPETTE<sup>TM</sup> F2, 10–100  $\mu\text{L}$  pipeto Biohit Kemomed in 100–1000  $\mu\text{L}$  pipeto Thermo Scientific<sup>TM</sup> FinnpiPETTE<sup>TM</sup> F2. Za merjenje absorbance na spektrofotometru smo uporabljali kiveto tip 26.100/LHS/Q/10/Z20 proizvajalca Starna Scientific.

#### Izbrane spojine in encim

Spojine **1** (NHM-47), **2** (TKA-17), **3** (THT-21), **4** (THT-20), **5** (TNM-17), **6** (KSK-21), **7** (TNM-12), **8** (TAK-12), **9** (ATN-53), **10** (TCF-8a), **11** (TNH-7), **12** (KSK-75), **13** (TCF-4b), **14** (TSK-07), **15** (NHM-44), **16** (KSK-16), **17** (KMG-34), **18** (TNH-8), **19** (THT-11) in **20** (THT-13) so sintetizirali raziskovalci Katedre za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo. Spojine so poimenovane s šiframi knjižnice spojin Katedre za farmacevtsko kemijo.

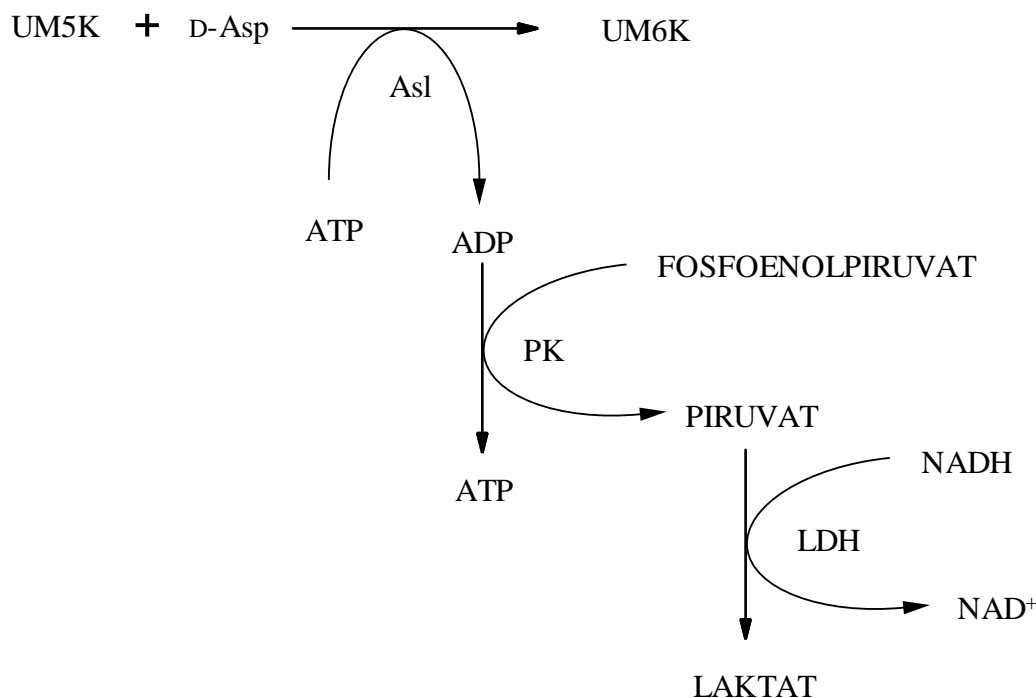
Encim Asl so izolirali na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v okviru magistrske naloge Natalije Potarić (34).

## UV-VIS spektroskopija

Izbrane spojine smo testirali z UV-VIS spektrofotometrom Varian Cary 50 Bio na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

## Določanje inhibitorne aktivnosti spojin

Izbrane spojine smo ovrednotili z *in vitro* spektrofotometričnim encimskim testom. Metoda temelji na osnovi sklopljenega testa z dvema pomožnima encimoma. Pri pripenjanju D-Asp na pentapeptidni substrat se sprosti ADP. Piruvat kinaza (PK) ob prisotnosti nastalega ADP pretvori fosfoenolpiruvat v piruvat. Piruvat nato laktat dehidrogenaza (LDH) ob prisotnosti NADH pretvori v laktat in ob tem se NADH oksidira (Slika 7).



**Slika 7:** Določanje aktivnosti D-aspartat ligaze; UM5K: pentapeptid, UM6K: heksapeptid, PK: piruvat kinaza, LDH: laktat dehidrogenaza (povzeto po 33).

Zaradi oksidacije NADH se pri valovni dolžini 340 nm, kjer ima absorpcijski spekter NADH maksimum, zniža absorbanca. Padec absorbance smo vsakemu vzorcu merili 10 minut. Količina oksidiranega NADH in s tem spremembe v absorbanci so sorazmerne nastajanju ADP v encimsko katalizirani reakciji, torej smo v testu posredno merili časovni potek pripenjanja D-Asp na UM5K oziroma aktivnost D-Asl. Na podlagi eksperimentalno dobljenih grafov, ki prikazujejo absorbanco v odvisnosti od časa, smo določili rezidualno

aktivnost encima (RA) ob prisotnosti posamezne spojine – potencialnega zaviralca v reakcijski zmesi.

### **Risanje grafov in izračun RA**

Grafe, ki prikazujejo absorbanco v odvisnosti od časa, smo narisali z računalniškim programom Microsoft Excel 2010. Z Excelom smo izračunali tudi naklone premic in RA.

## **3.2 SINTEZA NOVEGA POTENCIALNEGA ZAVIRALCA**

### **Reagenti in topila**

Pri eksperimentalnem delu smo za sintezo spojine **26** (ZJL-8) uporabljali reagente in topila proizvajalcev Carlo Erba, Merck in Sigma-Aldrich.

### **Laboratorijska oprema in pribor**

Pri eksperimentalnem delu smo za sintezo spojine **26** (ZJL-8) poleg laboratorijske steklovine in ostalega pribora potrebovali laboratorijsko tehtnico Mettler Toledo® PB403-S, rotacijski uparjevalnik Büchi® R-114, magnetno mešalo IKA® RCT basic in UV svetilko Camag UV-Cabinet II ( $\lambda = 254 \text{ nm}/366 \text{ nm}$ ).

### **Kolonska kromatografija**

Uporabili smo stekleno kolono in silikagel 60 F<sub>254</sub>, z velikostjo delcev 0,063–0,200 mm (proizvajalec Merck). Mobilna faza je bil etilacetat.

### **Tankoplastna kromatografija (TLC)**

Tankoplastno kromatografijo smo izvajali na ploščicah z 0,20 mm nanosom silikagela 60 F<sub>254</sub> na aluminijastem nosilcu (proizvajalec Merck). Mobilne faze, ki smo jih uporabljali, so navedene pri opisu sinteznega postopka. Spojine na kromatografskih ploščicah smo detektirali z UV svetilko pri valovni dolžini 254 nm. S pomočjo tankoplastne kromatografije smo spremljali potek reakcij in izolacijo naših spojin pri ločevanju zmesi s kolonsko kromatografijo.

### **Jedrska magnetna resonanca (NMR)**

<sup>1</sup>H NMR spektre smo posneli na NMR spektrofotometru Bruker Avance III 400 MHz, na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Vzorce smo raztopili v topilu DMSO-d<sub>6</sub>. Kot interni standard smo uporabili TMS (tetrametilsilan). Spektre smo obdelali z računalniškim programom MestReNova.

### **Masna spektroskopija (MS)**

Masni spektri so bili posneti na spektrometru Autospec (VG-Analytical) z ESI tehniko v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani in na masnem spektrometru na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

### **Infrardeča spektroskopija**

Spektre smo posneli na FT-IR spektrofotometru ThermoNicolet Nexus 470, na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

### **Določanje temperature tališča**

Sintetiziranim spojinam smo določili temperaturo tališča s Kofflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica.

### **Poimenovanje in risanje spojin**

Za poimenovanje spojin, določitev njihovih molekulskih formul in molskih mas smo uporabili računalniški program ACD/ChemSketch (Freeware) 2016.1.1. Spojine in kemijske reakcije smo narisali z računalniškima programoma ChemDraw Professional 16.0 in BIOVIA Draw 2017 R2.

## **4 EKSPERIMENTALNO DELO**

### **4.1 TESTIRANJE POTENCIALNIH ZAVIRALCEV Z *IN VITRO* SPEKTROFOTOMETRIČNIM ENCIMSKIM TESTOM**

#### **4.1.1 Priprava raztopin za testiranje**

Za testiranje potencialnih zaviralcev na spektrofotometru smo potrebovali 0,5 M pufer Tris-HCl (pH 8), 1 M MgCl<sub>2</sub>, 100 mM PEP, 20 mM NADH, destilirano H<sub>2</sub>O, 10 mM ATP, 10 mM D-Asp, DMSO, 10 mM potencialne zaviralce, LDH+PK, encim Asl, pufer za encim in UM5K.

##### **Priprava pufra Tris-HCl**

Pripravili smo 100 mL 0,5 M pufra Tris-HCl s pH 8. V čašo smo natehtali 6050 mg Tris-HCl in dodali približno 80 mL destilirane vode. Nato smo po kapljicah dodajali koncentrirano HCl, dokler nismo pH uravnali na 8 (pH smo sproti preverjali s pH metrom). Po uravnanem pH smo raztopino prelili v 100 mL bučko in dopolnili do 100 mL z destilirano vodo.

##### **Priprava MgCl<sub>2</sub>**

Pripravili smo 2 mL 1 M MgCl<sub>2</sub>. V epico smo natehtali 406 mg MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O. Dopolnili smo do 2 mL z destilirano vodo.

##### **Priprava PEP**

Pripravili smo 1,5 mL 100 mM PEP. Stekleničko s PEP smo med tehtanjem hranili na ledu. V 2 mL epico smo natehtali 30,92 mg PEP. Z destilirano vodo smo dopolnili do 1,5 mL.

##### **Priprava NADH**

Pripravili smo 1,5 mL 20 mM NADH. Stekleničko z NADH smo med tehtanjem hranili na ledu. V 2 mL epico smo natehtali 21,25 mg NADH. Nato smo z 0,5 M pufrom Tris-HCl dopolnili do 1,5 mL.

### Priprava ATP

Pripravili smo 1 mL 100 mM ATP. Stekleničko z ATP smo med tehtanjem hranili na ledu. V 2 mL epico smo natehtali 55,1 mg ATP. Nato smo dodali par kapljic destilirane vode in premešali, da se je ATP raztopil. Z 2 M NaOH smo pH uravnali na 7. pH smo določili s pH lističi. Nato smo z destilirano vodo dopolnili do 1 mL. Končni volumen smo razdelili na 5 alikvotov in epice z alikvoti shranili na -80 °C.

### Priprava D-Asp

Pripravili smo 1 mL 100 mM D-Asp. V 10 mL bučko smo natehtali 133 mg D-Asp in nato dopolnili do 10 mL z 0,5 M HCl.

### Priprava pufra za encim

Pripravili smo 50 mL pufra za encim, sestavljenega iz pufra Tris-HCl, glicerola in NaCl. Koncentracija NaCl v pufru je bila 500 mM, koncentracija Tris-HCl 50 mM, volumski delež glicerola pa 50 %. Najprej smo natehtali 1461 mg NaCl in ga presipali v 50 mL bučko. Nato smo v bučko dodali 5 mL 0,5 M pufra Tris-HCl, premešali, dodali še 25 mL glicerola in dopolnili z destilirano vodo do 50 mL.

### Priprava UM5K

Potrebovali smo 4,5 mM raztopino UM5K, zato smo v epico, ki je vsebovala 2 μmol UM5K, dodali 444 μL pufra Tris-HCl in premešali.

$$V = \frac{n}{C} = \frac{2 \mu\text{mol}}{4,5 \text{ mM}} = 444 \mu\text{L}$$

### Priprava spojine 26 (ZJL-8)

Spojino 26 (ZJL-8) smo sintetizirali sami. Po končani sintezi smo spojino 26 (ZJL-8) pripravili za testiranje z našo metodo. Za testiranje smo potrebovali 10 mM raztopino spojine 26 (ZJL-8). V epico smo natehtali 2,28 mg spojine 26 (ZJL-8). Nato smo dodali 533,6 μL DMSO in premešali.

$$M(\text{spojina } \underline{26} \text{ (ZJL-8)}) = 427,27 \text{ g/mol}$$

$$V(\text{DMSO}) = \frac{m}{M \cdot C} = \frac{2,28 \text{ mg}}{427,27 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot 10 \text{ mM}} = 533,6 \mu\text{L}$$

#### 4.1.2 Testiranje knjižnice spojin

Spojine smo testirali z UV/VIS spektrofotometrično encimsko metodo. Vse meritve smo opravili pri valovni dolžini 340 nm in temperaturi 30 °C. Končni volumen posameznega vzorca v kiveti je bil 150  $\mu\text{L}$ . Pred začetkom dela in med posameznimi meritvami smo kiveto sprali z etanolom in jo posušili. Pred začetkom meritev smo najprej izmerili absorbanco slepemu vzorcu (150  $\mu\text{L}$  destilirane vode).

Pred testiranjem spojin z encimskim testom smo vsem izbranim spojinam izmerili absorbanco pri koncentraciji 125  $\mu\text{M}$ . V kiveto smo pipetirali 148,1  $\mu\text{L}$  pufra Tris-HCl in dodali 1,9  $\mu\text{L}$  10 mM izbrane spojine.

$$V_{\text{začeten}} = \frac{C_{\text{končna}} \cdot V_{\text{končni}}}{C_{\text{začetna}}} = \frac{125 \mu\text{M} \cdot 150 \mu\text{L}}{10 \text{ mM}} = 1,9 \mu\text{L}$$

$$V_{\text{dodanega pufra}} = 150 \mu\text{L} - 1,9 \mu\text{L} = 148,1 \mu\text{L}$$

Spojine, ki niso imele previsoke absorbance (pri 125  $\mu\text{M}$  je bila absorbanca nižja od 1), smo nato testirali s spektrofotometričnim encimskim testom (opisanim v poglavju Materiali in metode). Pred začetkom pipetiranja smo odmrznili reagente, ki smo jih hranili v zamrzovalniku (MgCl<sub>2</sub>, PEP, NADH, ATP, D-Asp, LDH+PK, encim Asl in UM5K). Med delom smo te reagente hranili na ledu. Pred začetkom priprave založne raztopine smo vse reagente (Preglednica I) dobro premešali. Založno raztopino smo razdelili na alikvote (v posamezno epico smo pipetirali 72,5  $\mu\text{L}$ ) ter po spodaj naštetih korakih postopoma dodali še preostale reagente:

**Preglednica I:** Priprava založne raztopine (volumni reagentov za 1 vzorec).

	VOLUMEN ( $\mu\text{L}$ )	KONČNA KONCENTRACIJA V 150 $\mu\text{L}$
0,5 M Tris s pH 8	23	77 mM
1 M MgCl <sub>2</sub>	7,5	50 mM
100 mM PEP	3	2 mM
20 mM NADH	1,2	0,16 mM



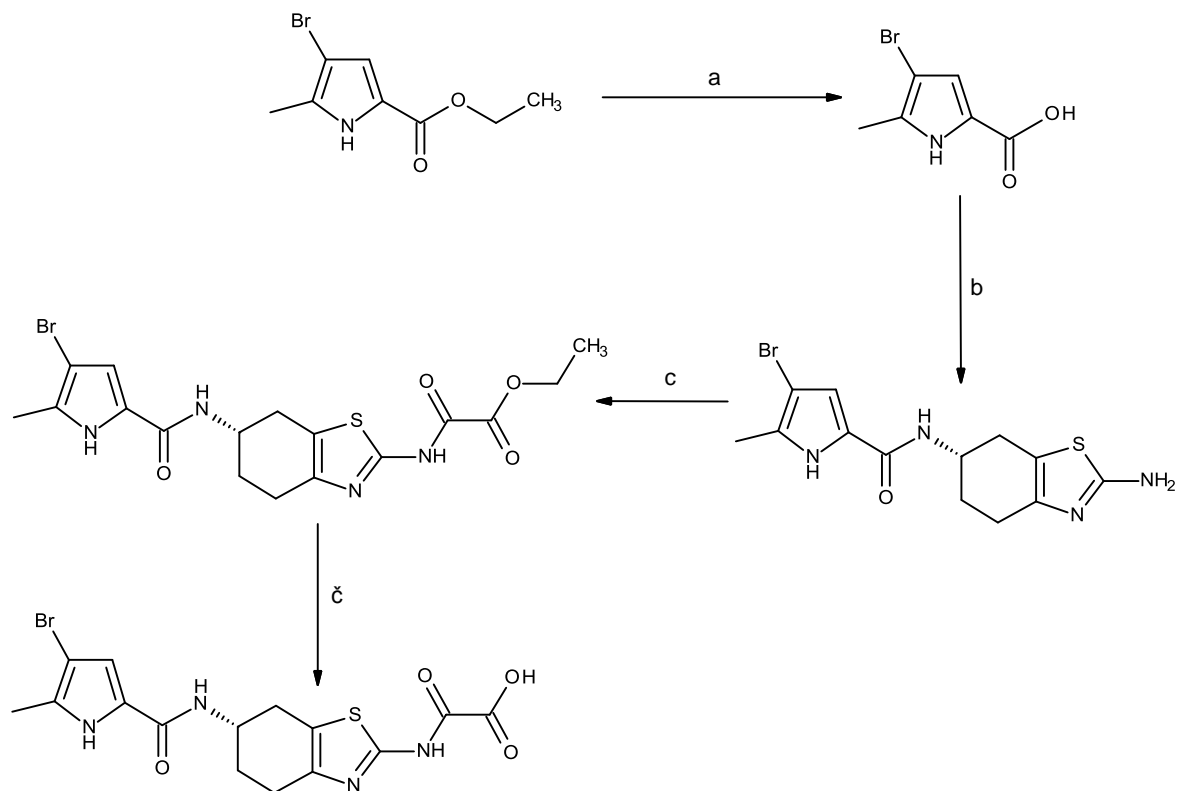
	VOLUMEN ( $\mu\text{L}$ )	KONČNA KONCENTRACIJA V 150 $\mu\text{L}$
Destilirana H <sub>2</sub> O	7,8	
10 mM ATP	15	1 mM
10 mM D-Asp	15	1 mM
Volumen skupaj	72,5	

1. Dodali smo ustrezen volumen DMSO. Vzorci kontrol ne vsebujejo izbrane spojine, zato smo jim dodali 7,5  $\mu\text{L}$  DMSO.
2. Dodali smo ustrezen volumen izbrane spojine. Pri vzorcih kontrol izbrane spojine nismo dodali.
3. Dodali smo 10  $\mu\text{L}$  LDH+PK.
4. Počakali smo 5 minut. Med inkubacijo smo v novo (prazno) epico pipetirali ustrezen volumen pufru za encim in ustrezen volumen Asl. Končni volumen zmesi pufru za encim in Asl je bil pri vseh vzorcih 50  $\mu\text{L}$ .
5. V epico smo dodali 50  $\mu\text{L}$  zmesi pufru za encim in Asl.
6. Dodali smo 10  $\mu\text{L}$  UM5K.

Ko smo v posamezno epico dodali ustrezne količine vseh potrebnih reagentov, smo zmes v epici premešali in jo s pipeto prenesli v čisto in suho kiveto. Kiveto z vzorcem smo vstavili v spektrofotometer in počakali 1 minuto. Po preteku 1 minute smo začeli s spektrofotometričnim encimskim testom meriti absorbanco pri valovni dolžini 340 nm. Absorbanco v odvisnosti od časa smo vsakemu vzorcu merili 10 minut. Graf določene izbrane spojine smo nato primerjali z grafom ustrezne kontrolne meritve in izračunali RA.

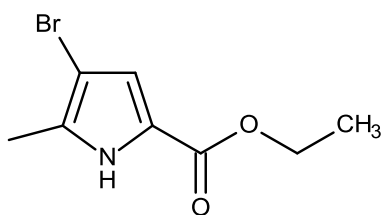
## 4.2 SINTEZA

Spojino, ki smo jo načrtovali na podlagi rezultatov encimskih testov knjižnice spojin, ((6-(4-bromo-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidro-1,3-benzotiazol-2-il)amino)-2-okso očetno kislino (spojina **26** (ZJL-8)), smo sintetizirali po korakih, ki so predstavljeni na Sliki 8 in podrobneje opisani v nadaljevanju poglavja.



**Slika 8:** Sinteza spojine **26** (ZJL-8); reagenti in pogoji: a) NaOH, EtOH; b) (6S)-2,6-diamino-4,5,6,7-tetrahydrobenzotiazol, EDC, HOBt, NMM, DMF; c) etil oksalil klorid, Et<sub>3</sub>N, dioksan; č) 1M NaOH, MeOH/H<sub>2</sub>O.

#### 4.2.1 Čiščenje izhodne zmesi etil 4-bromo-5-metil-1H-pirol-2-karboksilata (**21**)



#### **21**

Zmes spojine **21** (1,338 g) smo očistili s kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili etilacetat. TLC kromatograme smo razvijali v mobilni fazi etilacetat/heksan = 1/2. Vsebinsko penicilink s prisotnim produktom smo združili in pod znižanim tlakom uparili topilo. Dobili smo 0,927 g produkta (očiščene spojine **21**).

### Etil 4-bromo-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksilat (spojina 21)

**Molekulska formula:** C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>BrNO<sub>2</sub>

**Molska masa:** 232,07 g/mol

**Izgled:** beli kristali

**Rf:** 0,52 (MF: etilacetat/heksan = 1/2)

**Izkoristek:** 69,3 %

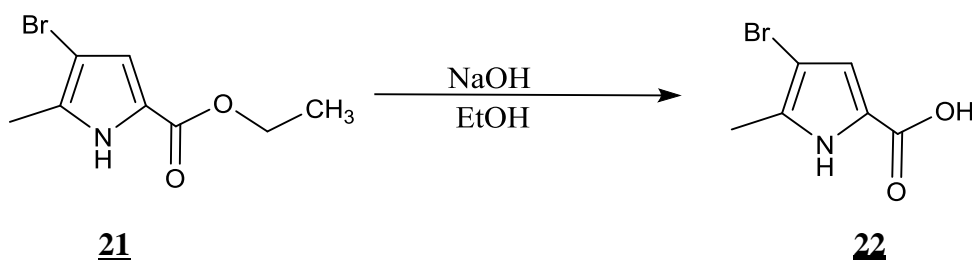
**Temperatura tališča:** 99,7–102,0 °C

**MS (ESI) m/z:** 156,94 (28 %), 158,92 (34 %), 157,94 (98 %), 159,95 (100 %), 201,91 (36 %), 203,9 (34 %), 202,92 (18 %), 204,91 (16 %), 230,0 (36 %), 231,98 (38 %)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 1.26 (t, 3H, *J* = 7,1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.22 (q, 2H, *J* = 7,1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.74 (s, 1H, Ar-H), 12.09 (s, 1H, NH) ppm

**IR (ATR):** ν 3267, 2983, 1670, 1492, 1423, 1264, 1195, 1023, 758

### 4.2.2 Sinteza 4-bromo-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksilne kisline (22)



Spojino 21 (0,427 g, 1,84 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 20 mL etanola, na oljni kopeli segreli na 90 °C in dodali 10 M NaOH (3,3 mL, 33,12 mmol, 18 ekv.). Reakcijsko zmes smo segrevali 2 uri in jo pri tem mešali z magnetnim mešalom. Konec reakcije smo določili s tankoplastno kromatografijo. TLC kromatogram smo razvili v mobilni fazi etilacetat/heksan = 1/2. Reakcijsko zmes smo ohladili na sobno temperaturo in uparili topilo. Vodni ostanek smo ekstrahirali z etilacetatom (2 x 15 mL). Vodno fazo smo po ekstrakciji nakisali z nasičeno HCl. Pri tem je izpadla oborina, ki smo jo filtrirali s presesavanjem. Dobili smo 0,250 g spojine 22.

### 4-bromo-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksilna kislina (spojina 22)

**Molekulska formula:** C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>BrNO<sub>2</sub>

**Molska masa:** 204,02 g/mol

**Izgled:** belo-rožnata oborina

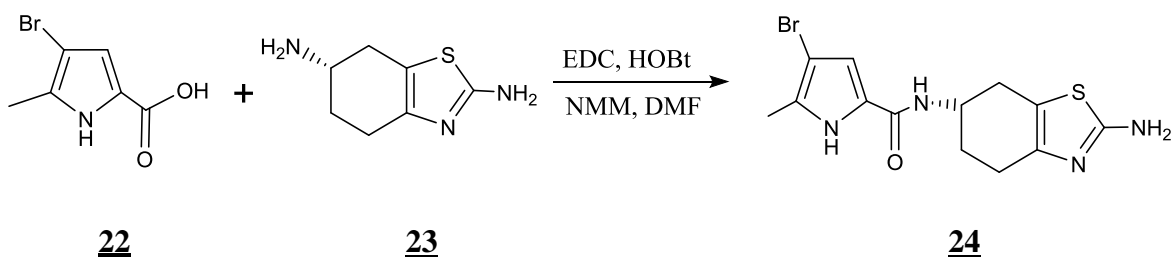
**Rf:** 0,54 (MF: DKM/MeOH = 3/1)

**Izkoristek:** 66,6 %

**MS (ESI) m/z:** 158,06 (26%), 159,94 (24 %), 201,96 (58 %), 203,89 (56 %)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 2.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6.74 (s, 1H, Ar-H), 11.96 (s, 1H, NH), 12.38 (br s, 1H, COOH) ppm

#### 4.2.3 Sinteza N-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidro-1,3-benzotiazol-6-il)-4-bromo-5-metil-1H-pirol-2-karboksamida (**24**)



Izhodno kislino **22** (0,250 g, 1,2254 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v DMF (5 mL) in raztopino ohladili na ledeni kopeli (0 °C). Dodali smo EDC (0,282 g, 1,4705 mmol, 1,2 ekv.), HOBt (0,215 g, 1,5930 mmol, 1,3 ekv.) in NMM (266 µL, 2,4508 mmol, 2 ekv., pH ≈ 8) ter mešali na ledeni kopeli (0 °C) 20 minut, da je potekla aktivacija kisline. Nato smo dodali izhodni amin **23** (0,207 g, 1,2254 mmol, 1 ekv.). Odstranili smo ledeno kopel in mešali čez noč pri sobni temperaturi. Izolacijo smo izvedli tako, da smo najprej uparili topilo (70 °C). Oljnatemu preostanku smo dodali etilacetat (20 mL) in 1 % citronsko kislino (4 mL) ter ga mešali s stekleno palčko, dokler se ni raztopil. Nato smo naredili ekstrakcijo z 1 % citronsko kislino (2 x 15 mL), spirali z nasičenima raztopinama natrijevega hidrogenkarbonata (2 x 10 mL) in natrijevega klorida (1 x 10 mL). Po sušenju z natrijevim sulfatom in sledeči filtraciji smo odparili topilo. Dobili smo 0,142 g spojine **24**.

#### N-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidro-1,3-benzotiazol-6-il)-4-bromo-5-metil-1H-pirol-2-karboksamid (spojina **24**)

**Molekulska formula:** C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>BrN<sub>4</sub>OS

**Molska masa:** 355,25 g/mol

**Izgled:** rumeni kristali

**Rf:** 0,81 (MF: DKM/MeOH = 3/1)

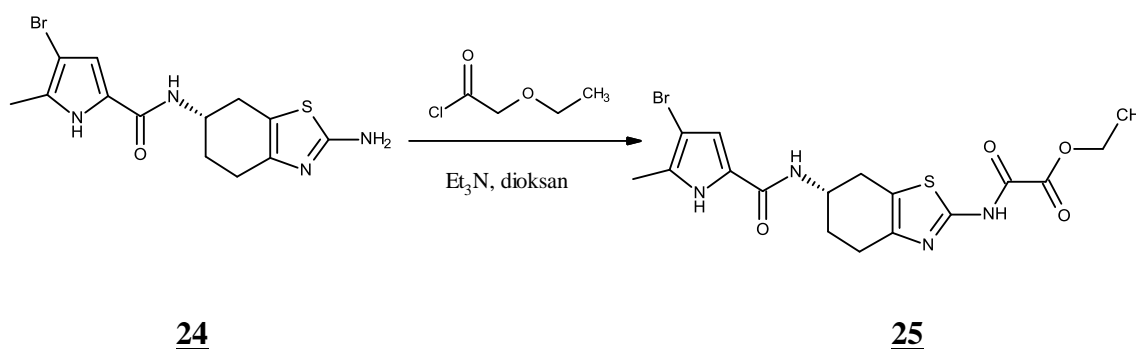
**Izkoristek:** 32,6 %

**Temperatura tališča:** 193,0–195,0 °C

**MS (ESI) m/z:** 353,08 (54 %), 355,07 (54 %)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 1.83–1.94 (m, 1H, H<sub>A</sub>-7), 1.95–2.05 (m, 1H, H<sub>B</sub>-7), 2.15 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.62–2.78 (m, 3H, H-5, H<sub>A</sub>-4), 3.02 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 5,4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 15.8 Hz, H<sub>B</sub>-4), 4.15–4.25 (m, 1H, H-6), 6.76 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.87 (d, 1H, *J* = 2,8 Hz Ar-H), 7.99 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz CONH), 11.76 (s, 1H, NH)

#### 4.2.4 Sinteza etil ((6-(4-bromo-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidro-1,3-benzotiazol-2-il) amino)-2-okso acetata (**25**)



Spojino **24** (0,204 g, 0,5742 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v dioksanu (10 mL) in dodali Et<sub>3</sub>N (120 μL, 0,8613 mmol, 1,5 ekv.), ki je nevtraliziral med reakcijo nastajajoči HCl. 5 minut smo hladili na ledu, nato dodali etil oksalil klorid (96 μL, 0,8613 mmol, 1,5 ekv.) ter pustili mešati na sobni temperaturi do naslednjega dne. Naslednji dan smo pričeli z izolacijo produkta. Reakcijsko zmes smo najprej filtrirali s presesavanjem in se tako znebili oborine trietilamonijevega klorida, ki je nastal pri stranski reakciji nevtralizacije. Nato smo odstranili topilo z uparivanjem pod znižanim tlakom. Surov produkt (viskozen oljnat preostanek) smo očistili s kolonsko kromatografijo, z uporabo etilacetata kot mobilne faze. V epruvete smo zbirali eluate in jih sprti preverjali s pomočjo TLC kromatogramov. TLC kromatograme smo razvijali v dveh različnih mobilnih fazah, v DKM/MeOH = 9/1 in etilacetatu, saj smo tako lažje ločili našo spojino od preostalih neželenih spojin v zbranih eluatih. Vsebinsko vseh epruvet, v katerih je bil prisoten produkt, smo združili in pod znižanim tlakom uparili etilacetat. Dobili smo 0,191 g spojine **25**.

**Etil ((6-(4-bromo-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidro-1,3-benzotiazol-2-il) amino)-2-okso acetat (spojina 25)**

**Molekulska formula:** C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S

**Molska masa:** 455,33 g/mol

**Izgled:** beli kristali

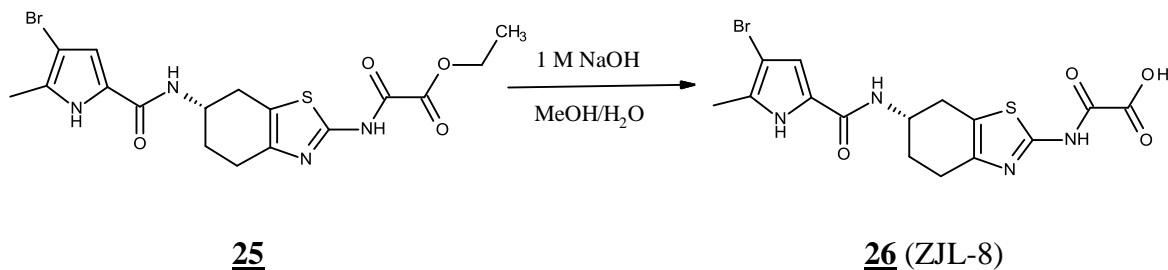
**Rf:** 0,36 (MF: etilacetat) oziroma 0,51 (MF: DKM/MeOH = 9/1)

**Izkoristek:** 73,1 %

**Temperatura tališča:** 132,0–134,5 °C

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 1.31 (t, 3H, *J* = 7,1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.83–1.94 (m, 1H, H<sub>A</sub>-7), 1.95–2.05 (m, 1H, H<sub>B</sub>-7), 2.15 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.62–2.78 (m, 3H, H-5, H<sub>A</sub>-4), 3.02 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 5,4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 15,8 Hz, H<sub>B</sub>-4), 4.15–4.25 (m, 1H, H-6), 4.29 (q, 2H, *J* = 7,1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.87 (d, 1H, *J* = 2,8 Hz Ar-H), 7.98 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz CONH), 11.71 (s, 1H, NH), 12.81 (br s, 1H, COOH) ppm

**4.2.5 Sinteza ((6-(4-bromo-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidro-1,3-benzotiazol-2-il) amino)-2-okso očetne kisline (26 (ZJL-8))**



V bučko smo natehtali spojino 25 (0,191 g, 0,4195 mmol, 1 ekv.). Dodali smo metanol (12 mL), da se je spojina raztopila, in nato še 1 M NaOH (839 μL, 0,8390 mmol, 2 ekv.). Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Potek reakcije smo naslednji dan preverili tako, da smo razvili TLC kromatogram (MF: DKM/MeOH = 9/1). Reakcija je potekla, zato smo se lotili izolacije. Pod znižanim tlakom smo uparili metanol (40 °C). Nato smo produktu dodali destilirano vodo (4 mL). Produkt je bil v obliki soli, zato je bil dobro topen v vodi. Ekstrahirali smo z etilacetatom (12 mL). S tem smo se znebili nečistot, le-te so ostale v organski fazi. Vodni fazi smo dokapavali 1 M HCl do pH 1–2 (pH smo sproti preverjali s pH lističi). Tako smo produkt pretvorili v obliko kisline in s tem zmanjšali topnost v vodi. Nato smo ekstrahirali z etilacetatom (1 x 12 mL). Ker se

organska in vodna faza nista dobro ločili, smo produkt samo filtrirali z odsesavanjem. Produkt (oborino) smo nato sušili na 80 °C v sušilniku 1 uro. Dobili smo 0,086 g spojine **26** (ZJL-8).

**((6-(4-bromo-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidro-1,3-benzotiazol-2-il) amino)-2-okso očetna kislina (spojina **26** (ZJL-8))**

**Molekulska formula:** C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S

**Molska masa:** 427,27 g/mol

**Izgled:** oker kristali

**Rf:** 0 (MF: DKM/MeOH = 9/1)

**Izkoristek:** 48,0 %

**Temperatura tališča:** 202,0–204,5 °C

**MS (ESI) m/z:** 150,92 (22 %), 200,91 (86 %), 202,9 (82 %), 353,0 (94 %), 355,0 (100 %), 353,99 (22 %), 356,06 (24 %), 424,95 (64 %), 426,92 (80 %)

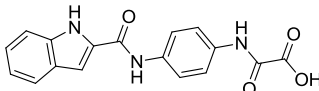
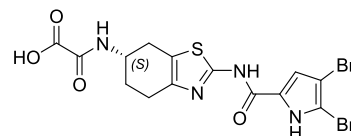
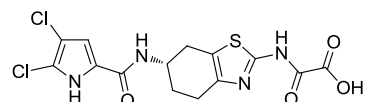
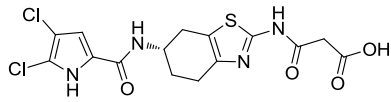
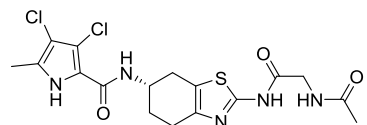
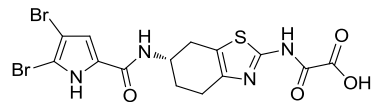
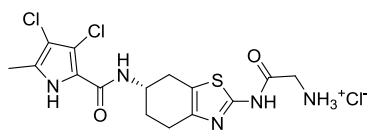
**HRMS ESI<sup>-</sup> za C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S ([M-H]<sup>-</sup>):** izračunana masa: 424,9919; izmerjena masa: 424,9923

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 1.81–1.92 (m, 1H, H<sub>A</sub>-7), 1.96–2.04 (m, 1H, H<sub>B</sub>-7), 2.15 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.62–2.78 (m, 3H, H-5, H<sub>A</sub>-4), 3.01 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 5,4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 15,8 Hz, H<sub>B</sub>-4), 4.15–4.25 (m, 1H, H-6), 6.87 (d, 1H, *J* = 2,8 Hz Ar-H), 7.99 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz CONH), 11.71 (s, 1H, NH), 12.66 (br s, 1H, COOH) ppm

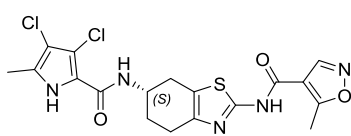
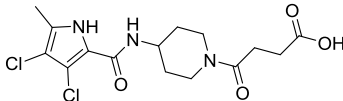
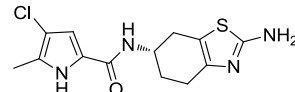
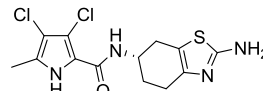
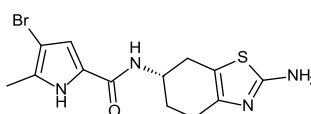
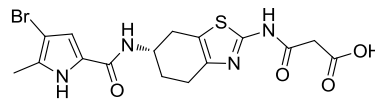
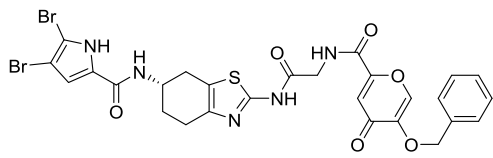
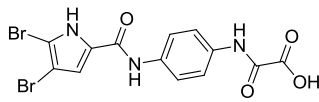
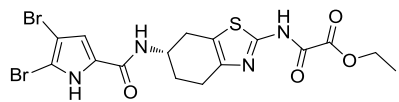
**IR (ATR):** ν 3227, 1702, 1635, 1521, 1419, 1266, 1209, 1048, 822, 681

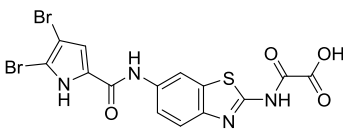
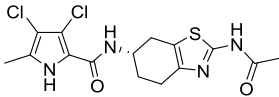
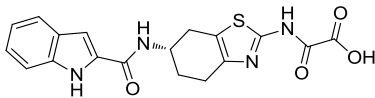
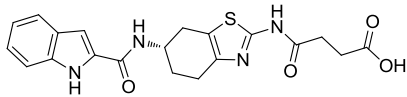
## 5 REZULTATI IN RAZPRAVA

Preglednica II: Strukture, absorbance in RA testiranih spojin.

Oznaka spojine	Struktura spojine	Absorbanca pri 125 $\mu$ M (valovna dolžina 340 nm)	RA pri 250 $\mu$ M
<u>1</u> (NHM-47)		1,3844	/
<u>2</u> (TKA-17)		1,8654	/
<u>3</u> (THT-21)		0,2510	65 %
<u>4</u> (THT-20)		0,0037	84 %
<u>5</u> (TNM-17)		0,1936	81 %
<u>6</u> (KSK-21)		0,1145	neaktivna
<u>7</u> (TNM-12)		0,1566	96 %



<b><u>8</u></b> (TAK-12)		0,0370	81 %
<b><u>9</u></b> (ATN-53)		-0,0060	89 %
<b><u>10</u></b> (TCF-8a)		0,1807	88 %
<b><u>11</u></b> (TNH-7)		0,0171	neaktivna
<b><u>12</u></b> (KSK-75)		0,0163	94 %
<b><u>13</u></b> (TCF-4b)		/	*46 % **96 %
<b><u>14</u></b> (TSK-07)		0,7671	/
<b><u>15</u></b> (NHM-44)		0,7217	/
<b><u>16</u></b> (KSK-16)		0,1931	/

<b>17</b> (KMG-34)		0,9594	/
<b>18</b> (TNH-8)		0,3088	/
<b>19</b> (THT-11)		0,2058	/
<b>20</b> (THT-13)		-0,0811	/

\*RA pri koncentraciji 250  $\mu\text{M}$  je bila izmerjena v okviru magistrske naloge Natalije Potarić (34).

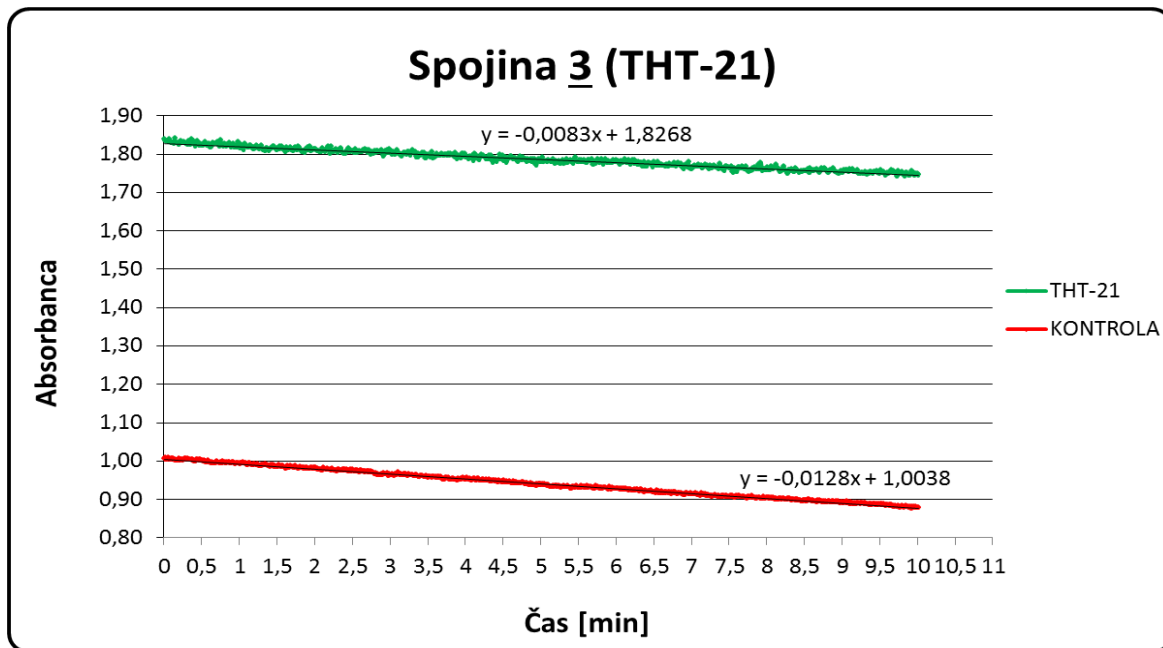
\*\*RA pri koncentraciji 100  $\mu\text{M}$ .

## 5.1 KOMENTAR REZULTATOV BIOLOŠKEGA TESTIRANJA POTENCIALNIH ZAVIRALCEV

Da bi preverili, ali so spojine primerne za testiranje z našim testom, smo jim najprej izmerili absorbanco pri koncentraciji 125  $\mu\text{M}$ , kar je polovična koncentracija spojin v testu (Preglednica II). S predhodnim merjenjem absorbance smo izločili spojine, ki imajo že same previsoko absorbanco za testiranje z našim testnim sistemom, torej spojine, ki močno absorbirajo pri 340 nm, valovni dolžini, pri kateri izvajamo meritev. Previsoko absorbanco (za previsoko vrednost smo določili absorbanco nad 1) sta imeli spojini **1** (NHM-47) in **2** (TKA-17).

Založno raztopino za testiranje spojin (ki je vsebovala pufer Tris,  $\text{MgCl}_2$ , PEP, NADH, destilirano  $\text{H}_2\text{O}$ , ATP in D-Asp) smo pripravili za več vzorcev skupaj in na ta način zmanjšali potencialne napake pri pipetiranju. Grafi spojin **3** (THT-21), **4** (THT-20), **5** (TNM-17), **6** (KSK-21), **7** (TNM-12), **8** (TAK-12), **9** (ATN-53), **10** (TCF-8a), **11** (TNH-7) in **12** (KSK-75) so linearni, zato smo jih lahko primerjali z grafom kontrolne meritve (v kontrolni meritvi testirana spojina – potencialni zaviralec ni prisotna) in določili RA, ki je pokazatelj učinkovitosti inhibicije. RA je razmerje med aktivnostjo encima ob prisotnem

potencialnem zaviralcu in med aktivnostjo encima brez prisotnega potencialnega zaviralca (v kontroli). RA smo izračunali kot razmerje med naklonom premice ob prisotnem potencialnem zaviralcu in naklonom premice brez prisotnega potencialnega zaviralca (naklon premice kontrolne meritve). Naklone premic smo izračunali iz eksperimentalno dobljenih grafov, ki prikazujejo padec absorbance v odvisnosti od časa (Slika 9; Priloga: Slike 19–27). Izračuni RA so prikazani v Preglednici III.



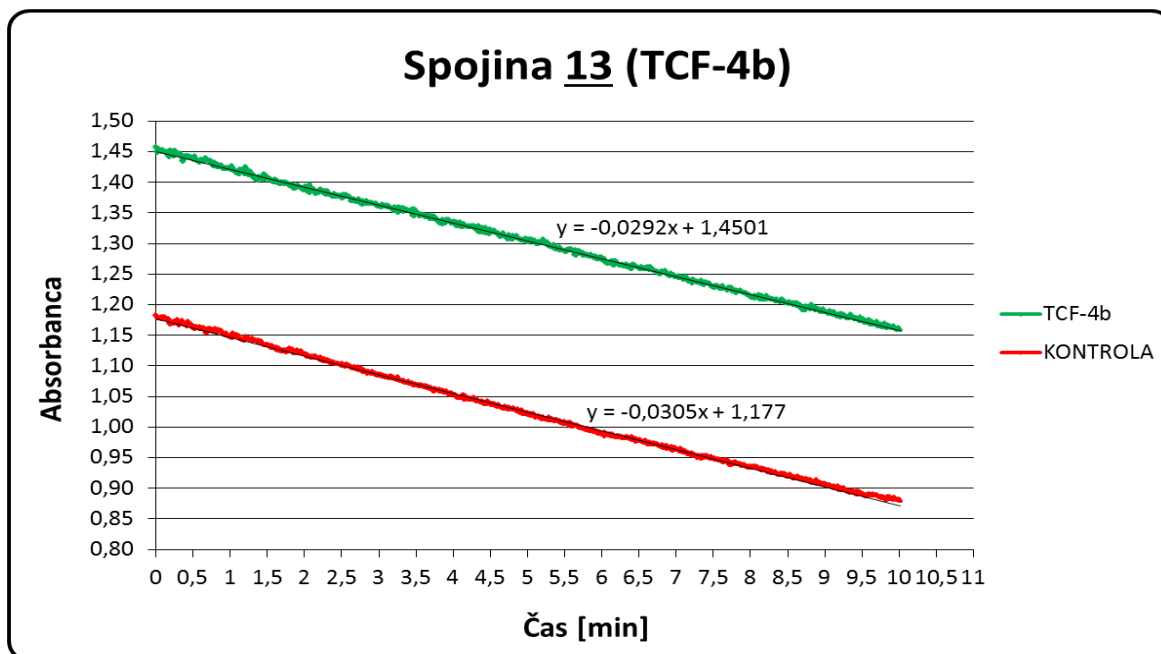
**Slika 9:** Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine 3 (THT-21) (250 μM) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z *in vitro* spektrofotometričnim encimskim testom.

**Preglednica III:** Izračuni RA.

OZNAKA SPOJINE	RA PRI 250 μM
<u>3</u> (THT-21)	$RA = \frac{-0,0083}{-0,0128} = 0,6484 = 65 \%$
<u>4</u> (THT-20)	$RA = \frac{-0,0108}{-0,0128} = 0,8436 = 84 \%$

<u>5</u> (TNM-17)	$RA = \frac{-0,013}{-0,016} = 0,813 = 81 \%$
<u>6</u> (KSK-21)	$RA = \frac{-0,0138}{-0,0113} = 1,2212 = 122 \%$
<u>7</u> (TNM-12)	$RA = \frac{-0,0258}{-0,0268} = 0,9627 = 96 \%$
<u>8</u> (TAK-12)	$RA = \frac{-0,0217}{-0,0268} = 0,8097 = 81 \%$
<u>9</u> (ATN-53)	$RA = \frac{-0,0239}{-0,0268} = 0,8918 = 89 \%$
<u>10</u> (TCF-8a)	$RA = \frac{-0,0297}{-0,0336} = 0,8839 = 88 \%$
<u>11</u> (TNH-7)	$RA = \frac{-0,0336}{-0,0336} = 1,000 = 100 \%$
<u>12</u> (KSK-75)	$RA = \frac{-0,0317}{-0,0336} = 0,9435 = 94 \%$

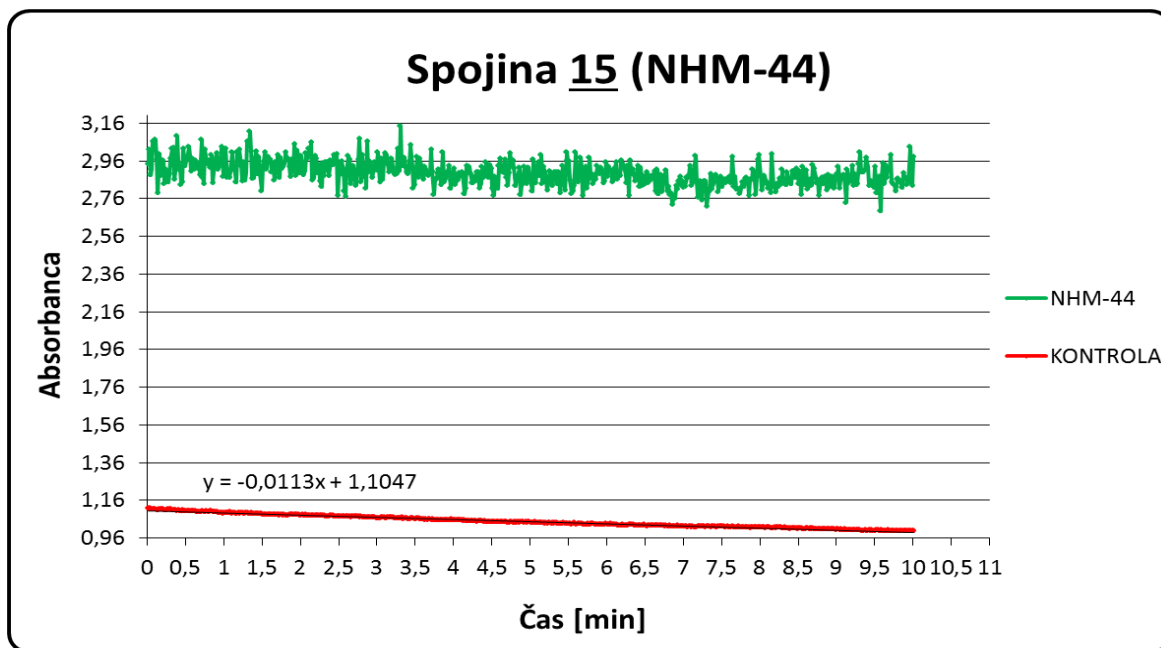
Nazadnje smo z encimskim testom pri koncentraciji 100  $\mu\text{M}$  testirali še spojino **13** (TCF-4b), spojino, ki se je pri koncentraciji 250  $\mu\text{M}$  že izkazala kot potencialni zaviralec z RA 46 %. RA spojine **13** (TCF-4b) pri 250  $\mu\text{M}$  (46 %) je bila izmerjena v okviru magistrske naloge Natalije Potarić (34). Izkazalo se je, da spojina **13** (TCF-4b) pri 100  $\mu\text{M}$  ne zavira delovanja našega encima (RA = 96 %) (Slika 10).



**Slika 10:** Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine **13** (TCF-4b) (100  $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z *in vitro* spektrofotometričnim encimskim testom.

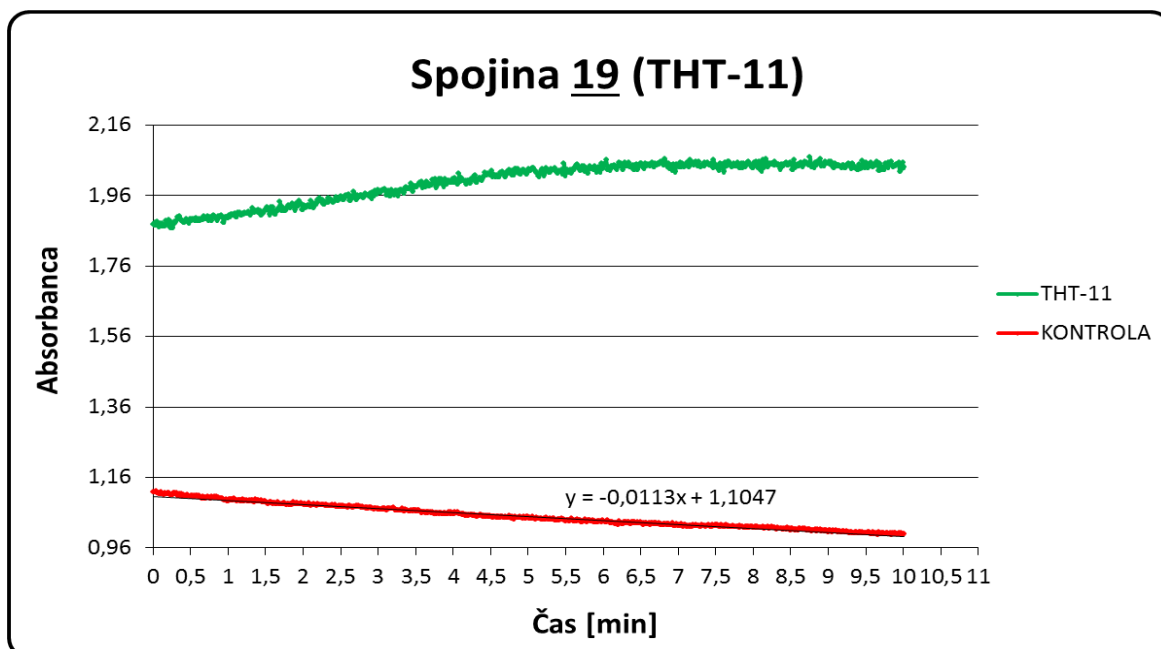
$$RA(\text{spojina } \mathbf{13} \text{ (TCF-4b)}, 100 \mu\text{M}) = \frac{-0,0292}{-0,0305} = 0,9574 = 96 \%$$

Pri spojinah **14** (TSK-07), **15** (NHM-44), **16** (KSK-16), **17** (KMG-34) in **18** (TNH-8) nismo izmerili previsoke izhodne absorbance, vendar je bila absorbanca previsoka pri meritvi z encimskim testom (višja od 2). Spodnji graf (Slika 11) je primer za to skupino spojin.



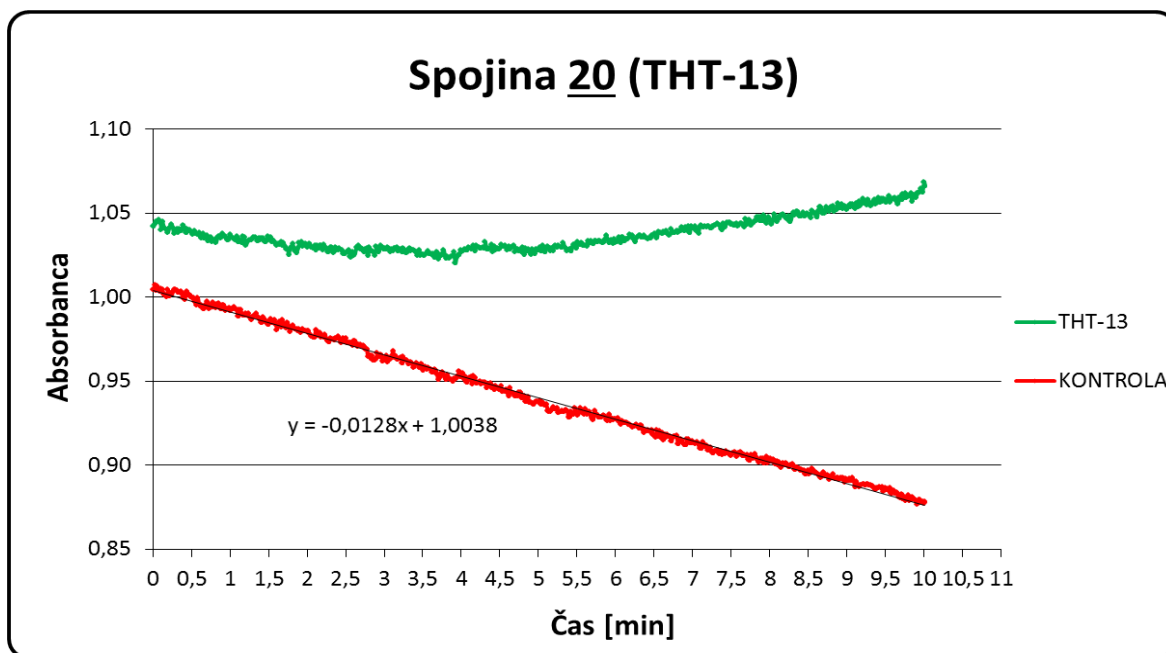
**Slika 11:** Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine 15 (NHM-44) (250  $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z *in vitro* spektrofotometričnim encimskim testom.

Za razliko od spojin 14 (TSK-07), 15 (NHM-44), 16 (KSK-16), 17 (KMG-34) in 18 (TNH-8), kjer je bila absorbanca previsoka že ob pričetku testiranja z encimskim testom, pa je pri spojini 19 (THT-11) absorbanca narasla med testiranjem z encimskim testom (Slika 12).



**Slika 12:** Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine 19 (THT-11) (250  $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z *in vitro* spektrofotometričnim encimskim testom.

Tako kot zgoraj naštetih spojin tudi spojine **20** (THT-13) nismo mogli ovrednotiti. Čeprav je bila absorbanca v mejah normale, graf ni bil linearen (Slika 13).



**Slika 13:** Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine **20** (THT-13) (250  $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z *in vitro* spektrofotometričnim encimskim testom.

Spojina **1** (NHM-47), **2** (TKA-17), **14** (TSK-07), **15** (NHM-44), **16** (KSK-16), **17** (KMG-34), **18** (TNH-8), **19** (THT-11) in **20** (THT-13) nismo mogli določiti RA. Vzrok za nenavadno obnašanje spojin lahko pripišemo slabi topnosti samih spojin oziroma interakciji med komponentami testnega sistema, pri čemer lahko pride do obarjanja spojine ali proteina. Iz navedenih primerov lahko vidimo prednost določanja RA s testom, pri katerem kontinuirano spremljamo padec absorbance v določenem časovnem intervalu, v primerjavi s testom, pri katerem merimo absorbanco le v eni točki, saj imamo pri kontinuiranem testu boljši vpogled v dogajanje v reakcijski raztopini med merjenjem in se tako lahko izognemo morebitnim lažno pozitivnim rezultatom.

Pri vseh spojinah, ki v strukturi vsebujejo dodaten aromatski obroč, smo izmerili previsoko izhodno absorbanco (spojina **1** (NHM-47)), le-ta je bila previsoka ob pričetku meritve (spojine **14** (TSK-07), **15** (NHM-44) in **17** (KMG-34)), ali pa je narasla med meritvijo (spojini **19** (THT-11) in **20** (THT-13)). Aromatski obroč prispeva k absorbanci izbranih spojin pri 340 nm, k povišani absorbanci pri tej valovni dolžini pa lahko prispeva tudi lipofilnost in torej slabša topnost tega tipa spojin. Spojine, ki vsebujejo ta strukturni

element, so torej neprimerne za reševanje z našim testnim sistemom pri koncentraciji 250  $\mu$ M.

Vse izbrane spojine v strukturi vsebujejo substituiran pirolni obroč. Spojine **2** (TKA-17), **6** (KSK-21), **14** (TSK-07), **15** (NHM-44), **16** (KSK-16) in **17** (KMG-34) imajo na pirolni obroč vezana dva atoma broma. Z izjemo spojine **6** (KSK-21) je bila pri vseh spojinah, ki vsebujejo dibromopirol, absorbanca previsoka. Poleg tega sta raztopini spojin **14** (TSK-07) in **16** (KSK-16) postali motni potem, ko smo jima dodali encim. Predvidevamo, da so spojine s 4,5-dibromo-2-pirolamidno skupino v našem testnem sistemu slabo topne. Spojinama **12** (KSK-75) in **13** (TCF-4b), ki imata na pirolni obroč vezano metilno skupino in en atom broma, pa smo lahko določili RA.

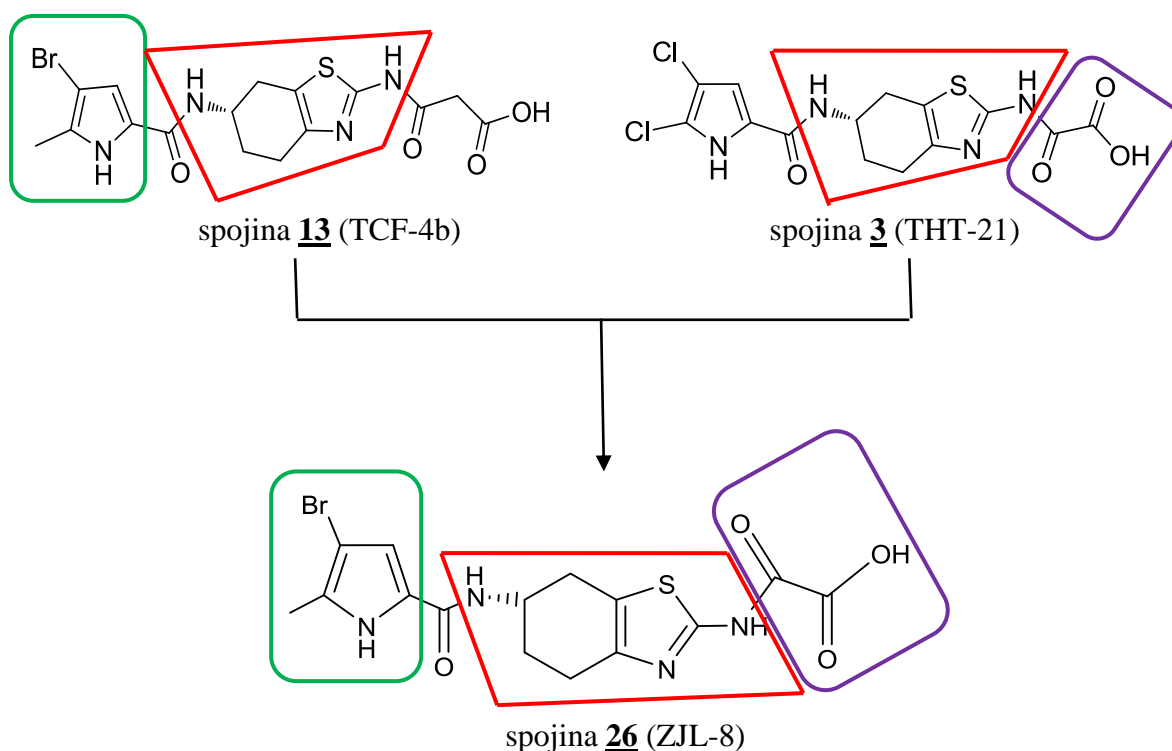
Z izjemo spojine **18** (TNH-8) smo vsem spojinam s 4,5-dikloro-2-pirolno skupino (spojini **3** (THT-21) in **4** (THT-20)) in 3,4-dikloro-5-metilpirolno skupino (spojine **5** (TNM-17), **7** (TNM-12), **8** (TAK-12), **9** (ATN-53) in **11** (TNH-7)) lahko določili RA, torej lahko sklepamo, da dva vezana klor ne vplivata na topnost spojin pri testni koncentraciji. Prav tako smo z encimskim testom lahko ovrednotili spojino **10** (TCF-8a), ki vsebuje 4-kloro-5-metilpirolno skupino. Glede na topnost sklepamo, da so za testiranje z našim encimskim testom spojine s klorom ugodnejše od spojin z bromom.

Iz primerjave spojine **3** (THT-21) s spojino **6** (KSK-21) in primerjave spojine **10** (TCF-8a) s spojino **12** (KSK-75) smo ugotovili, da je za padec encimske aktivnosti klorov substituent na pirolnem obroču ugodnejši od broma. Spojini **10** (TCF-8a) in **12** (KSK-75) se razlikujeta le v halogeni substituenti. Spojina **10** (TCF-8a) ima v primerjavi s spojino **12** (KSK-75) na istem mestu pirolnega obroča vezan klor namesto broma in ima nižjo RA (RA = 88 %) kot spojina **12** (KSK-75) (RA = 94 %). Podobno velja za spojini **3** (THT-21) in **6** (KSK-21), ki sta strukturna analoga, saj imata na osnovni skelet 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2,6-diaminsko ogrodje z vezano oksalilno skupino pripeto 4,5-dikloro-2-pirolamidno skupino (spojina **3** (THT-21)) oziroma 4,5-dibromo-2-pirolamidno skupino (spojina **6** (KSK-21)). Spojina **3** (THT-21) (RA = 65 %) se je izkazala kot potencialni zaviralec našega encima, spojina **6** (KSK-21) pa je neaktivna.

Za bolj verodostojne rezultate bi morali vsako meritev izvesti 3-krat, saj bi tako zmanjšali eksperimentalne napake. Naše ugotovitve bi na kredibilnosti pridobile tudi, če bi ovrednotili večje število strukturno analognih spojin.

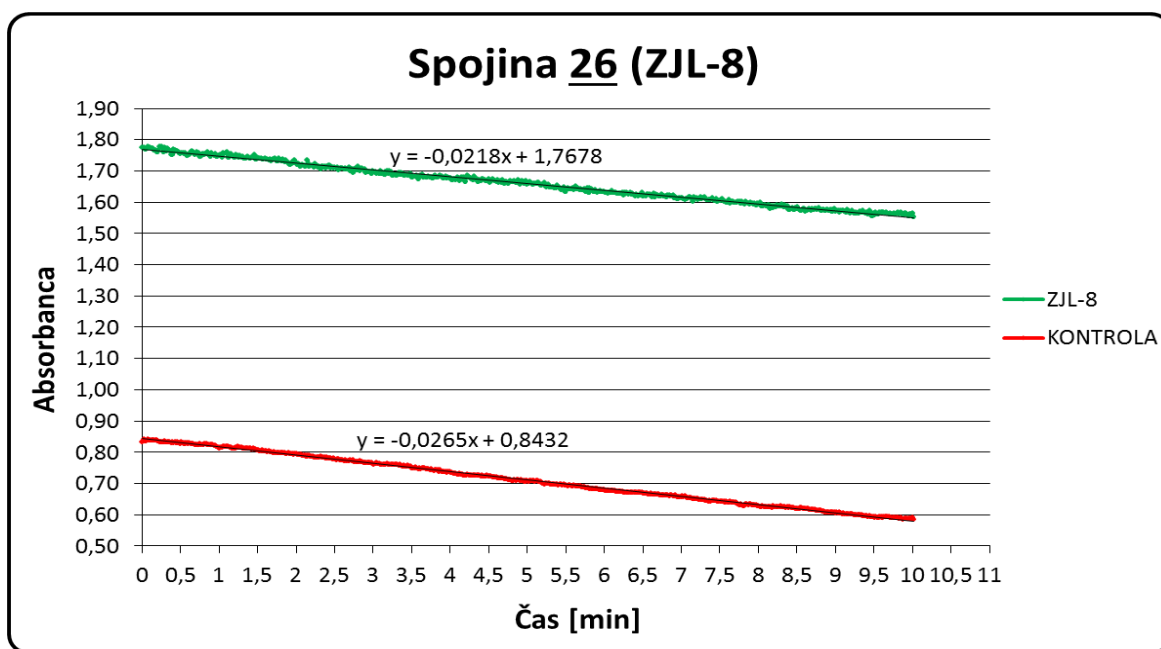


Glede na izračunane RA smo ugotovili, da so pri koncentraciji 250  $\mu$ M najboljše zaviralci D-Asl spojine **13** (TCF-4b) (RA = 46 %), **3** (THT-21) (RA = 65 %), **5** (TNM-17) (RA = 81 %), **8** (TAK-12) (RA = 81 %) in **4** (THT-20) (RA = 84 %). Na podlagi podatkov o odnosu med strukturo in delovanjem smo sklepali, da bi bil dober potencialni zaviralec analog s kombinacijo strukturnih elementov najboljših zaviralcev (analog spojin **3** (THT-21) in **13** (TCF-4b)), spojina z na 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2,6-diaminsko ogrodje vezano oksalilno skupino ter pripeto 4-bromo-5-metilpirolno skupino (Slika 14). Zato smo se odločili, da bomo omenjeno spojino sintetizirali in jo ovrednotili z encimskim testom.



**Slika 14:** Spojina **26** (ZJL-8) (analog spojin **13** (TCF-4b) in **3** (THT-21)).

Po končani sintezi smo spojin **26** (ZJL-8) enako kot ostalim spojinam izmerili absorbanco. Ta je bila 0,2311. Kot smo predvidevali, absorbanca ni bila previsoka, zato smo našo spojino testirali z encimskim testom (Slika 15).



**Slika 15:** Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine 26 (ZJL-8) (250  $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z *in vitro* spektrofotometričnim encimskim testom.

$$RA(\text{spojina } \underline{26} \text{ (ZJL-8)}, 250 \mu\text{M}) = \frac{-0,0218}{-0,0265} = 0,8226 = 82 \%$$

RA spojine 26 (ZJL-8) pri 250  $\mu$ M je 82 %. Spojina 26 (ZJL-8) zavira naš encim, vendar ne tako dobro, kot smo predvidevali.

## 5.2 KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV

### 5.2.1 Hidroliza estra 21 do karboksilne kisline 22

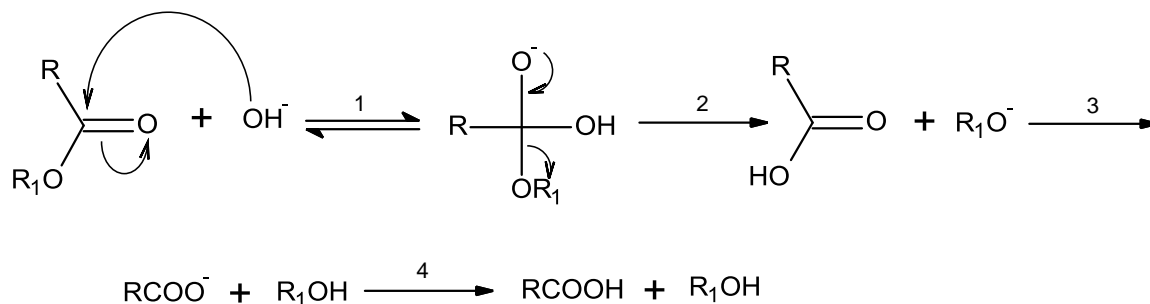
Z alkalno hidrolizo estra 21 smo pripravili natrijevo sol spojine 22. Natrijevo sol smo nakisali z nasičeno HCl in jo s tem pretvorili v kislino (dobili smo spojino 22).

Hidrolize estrov uvrščamo med nukleofilne substitucije, ki so kislinsko ali bazično katalizirane, lahko pa potekajo v prisotnosti nukleofilov ali encimov.

Mehanizem alkalne hidrolize estra je sledeč (Slika 16):

1. Hidroksilna skupina nukleofila napade karbonilno skupino v estru.
2. Prerazporedijo se elektroni, pri tem nastaneta kislina in alkoholatni anion.
3. Ireverzibilno nastaneta karboksilatni anion in alkohol.

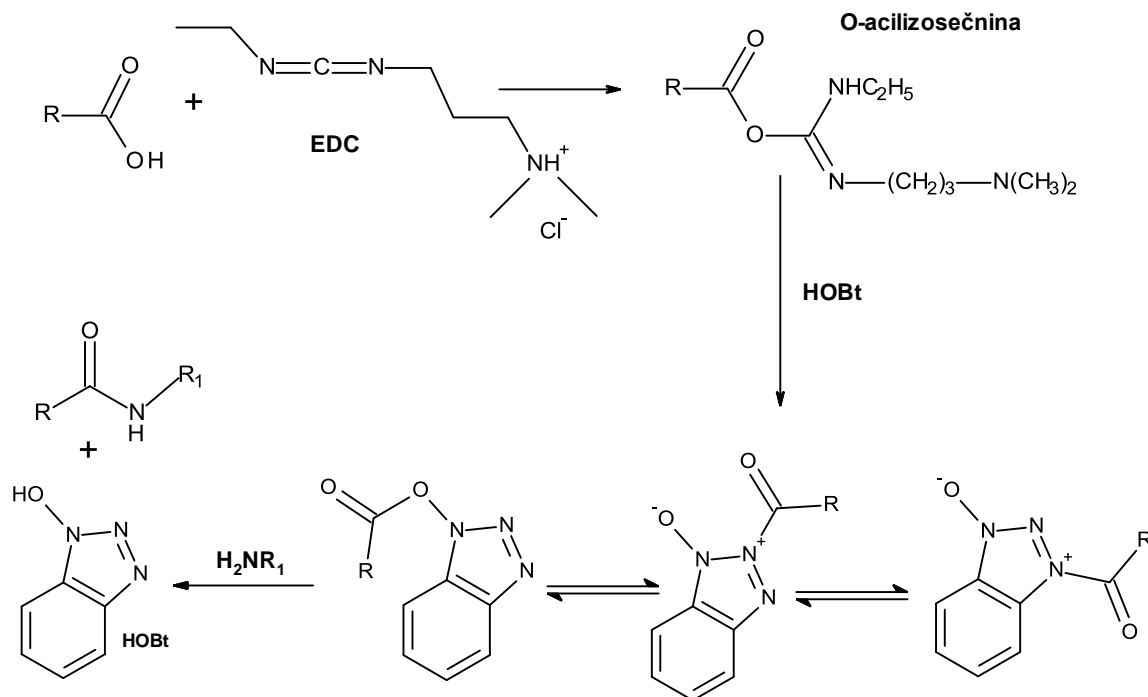
4. V kislem poteče pretvorba soli karboksilne kisline v nedisociirano obliko.



Slika 16: Mehanizem alkalne hidrolize estra.

### 5.2.2 Tvorba amida 24

Gre za nukleofilno substitucijo, ki poteče na ogljiku v karbonylni skupini. Ker karboksilna skupina za reakcijo ni dovolj reaktivna, za njeno aktivacijo potrebujemo reagent EDC. Karboksilni anion se veže na protoniran karbodiimid, pri tem nastane reaktivna O-acilizosečnina, ki reagira z amino skupino. O-acilizosečnina lahko alternativno napade drug karboksilat, pri čemer nastane simetrični anhidrid. Ta je aktiviran za reakcijo z aminsko skupino in tudi v tem primeru nastane amidna vez (Slika 17).



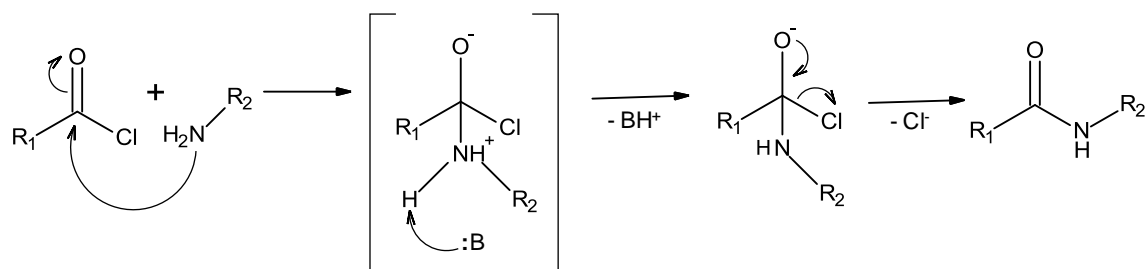
Slika 17: Mehanizem tvorbe amida z uporabo EDC in HOBT.

Premestitev acilne skupine iz O na N v acilizosečnini je neželena reakcija, saj s tem nastane stranski produkt N-acilizosečnina, na kateri hidroliza ne poteče. Z dodatkom HOBt v reakcijski zmesi preprečimo nastanek N-acilizosečnine, saj HOBt z O-acilizosečnino tvori aktivirane benzotriazolne estre. Pri le-teh aminoliza poteče veliko hitreje. S tem zmanjšamo obseg neželenih premestitev, ciklizacij, racemizacij in tvorbe simetričnih anhidridov, kar vodi do večjega izkoristka reakcije.

Izhodno spojino **22** smo raztopili v DMF in dodali EDC, HOBt in NMM. Zaradi NMM je raztopina rahlo alkalna, kar prepreči racemizacijo in omogoči ionizacijo kisline, ki tako lažje napade ogljikov atom karbodiimida EDC.

### 5.2.3 Aciliranje spojine **24**

Spojino **24** smo N-acilirali preko kislinskega klorida z aminom v bazičnih pogojih. Trietilamin deluje kot baza in z nevtralizacijo sproščene HCl preprečuje pretvorbo amina **24** v nereaktivno HCl sol (Slika 18).



Slika 18: Mehanizem aciliranja preko kislinskega klorida.

### 5.2.4 Hidroliza estra **25** do karboksilne kisline **26** (ZJL-8)

Z alkalno hidrolizo estra **25** smo pripravili natrijevo sol spojine **26** (ZJL-8). Natrijevo sol smo nakisali z nasičeno HCl in jo s tem pretvorili v kislino (dobili smo spojino **26** (ZJL-8)).

Mehanizem alkalne hidrolize estra je že opisan v poglavju 5.2.1 Hidroliza estra **21** do karboksilne kisline **22**.

## 6 SKLEP

V okviru magistrske naloge smo z *in vitro* spektrofotometričnim encimskim testom reševali potencialne zaviralce bakterijskega encima D-aspartat ligaze. Zaviralno aktivnost spojin smo ovrednotili s parametrom RA (rezidualna aktivnost encima pri določeni koncentraciji spojine). Glede na izračunane RA smo ugotovili, da so pri koncentraciji 250  $\mu$ M najboljše zaviralci D-aspartat ligaze spojine **13** (TCF-4b) (RA = 46 %), **3** (THT-21) (RA = 65 %), **5** (TNM-17) (RA = 81 %), **8** (TAK-12) (RA = 81 %) in **4** (THT-20) (RA = 84 %). Na podlagi dobljenih rezultatov smo sintetizirali spojino **26** (ZJL-8), za katero smo predvidevali, da bo dober potencialni zaviralec D-aspartat ligaze. Z RA = 82 % spojina **26** (ZJL-8) ni izpolnila naših pričakovanj.

Če izvzamemo spojini **6** (KSK-21) in **18** (TNH-8), smo prišli do naslednjih zaključkov:

- Spojine, ki vsebujejo dodaten aromatski obroč ali 4,5-dibromo-2-pirolamidno skupino, so pri koncentraciji 250  $\mu$ M neprimerne za reševanje z našim testnim sistemom. Spojinam **1** (NHM-47), **2** (TKA-17), **14** (TSK-07), **15** (NHM-44), **16** (KSK-16), **17** (KMG-34), **19** (THT-11) in **20** (THT-13), ki vsebujejo enega ali oba izmed omenjenih strukturnih elementov, namreč z našo metodo nismo mogli določiti RA. Aromatski obroč pri 340 nm (pri valovni dolžini, pri kateri izvajamo meritve) prispeva k absorbanci izbranih spojin. K povišani absorbanci pri tej valovni dolžini pa lahko prispeva tudi povečana lipofilnost in torej slabša topnost tega tipa spojin. Predvidevamo, da so tudi spojine s 4,5-dibromo-2-pirolamidno skupino v našem testnem sistemu slabo topne.
- Spojinam s 4,5-dikloro-2-pirolno skupino (spojini **3** (THT-21) in **4** (THT-20)), 3,4-dikloro-5-metilpirolno skupino (spojine **5** (TNM-17), **7** (TNM-12), **8** (TAK-12), **9** (ATN-53) in **11** (TNH-7)), 4-kloro-5-metilpirolno skupino (spojina **10** (TCF-8a)) ali 4-bromo-5-metilpirolno skupino (spojine **12** (KSK-75), **13** (TCF-4b) in **26** (ZJL-8)) smo lahko določili RA. Spojine z naštetimi strukturnimi elementi so torej primerne za testiranje z našo metodo, saj so dobro topne v našem testnem sistemu.
- Glede na topnost sklepamo, da so za testiranje z našim encimskim testom spojine s klorom ugodnejše od spojin z bromom.

- Za padec encimske aktivnosti je klorov substituent na pirolnem obroču ugodnejši od broma (glede na primerjavo spojine **3** (THT-21) s spojino **6** (KSK-21) in primerjavo spojine **10** (TCF-8a) s spojino **12** (KSK-75)).

Rezultati bi bili bolj verodostojni, če bi testiranja ponovili (vsako izmed spojin smo namreč testirali le enkrat). Zgornje trditve bi na kredibilnosti pridobile tudi, če bi ovrednotili večje število strukturno analognih spojin.

Skoraj polovici spojin nismo mogli določiti RA, saj smo pri testiranju le-teh imeli težave s previsoko absorbanco in slabo topnostjo. Da bi te spojine lahko ovrednotili, bi jih bilo smiselno testirati pri nižji koncentraciji ali testiranja ponoviti z drugim testnim sistemom oziroma s kakšno drugo biofizikalno metodo. Spojine, ki smo jim uspeli določiti RA, pa pripomorejo k spoznavanju povezave med strukturo in aktivnostjo potencialnih zaviralcev D-aspartat ligaze. V pomoč bodo pri nadaljnjem razvoju novih potencialnih zaviralcev.

## 7 LITERATURA

1. Martínez-Rodríguez S, Martínez-Gómez AI, Rodríguez-Vico F, Clemente-Jiménez JM, Las Heras-Vázquez FJ: Natural Occurrence and Industrial Applications of D-Amino Acids: An Overview. *Chem Biodivers* 2010; 7: 1531–1548.
2. Alanis AJ: Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Arch Med Res* 2005; 36: 697–705.
3. Gautam A, Vyas R, Tewari R: Peptidoglycan biosynthesis machinery: A rich source of drug targets. *Crit Rev Biotechnol* 2011; 31: 295–336.
4. Lemke TL, Williams DA, Roche VF, Zito SW: Foye`s Principles of Medicinal Chemistry, 6<sup>th</sup> Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008: 1029, 1033, 1045.
5. Tenover FC: Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Am J Med* 2006; 119: S3–S10.
6. Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA: Brock Biology of Microorganism, 14<sup>th</sup> Edition, Pearson, Boston, 2015: 148–149, 820, 822.
7. Martinez JL, Fajardo A, Garmendia L, Hernandez A, Linares JF, Martínez-Solano L, Sánchez MB: A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2009; 33: 44–65.
8. Patrick GL: An Introduction to Medicinal Chemistry, 5<sup>th</sup>, Oxford University Press, Oxford, 2013: 415, 423–424, 462–463.
9. Fischbach MA, Walsh CT: Antibiotics for Emerging Pathogens. *Science* 2009; 325: 1089–1093.
10. Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ: Prescott, Harley and Klein`s Microbiology, 7<sup>th</sup> Edition, McGraw-Hill Higher Education, Boston, 2008: 55, 57–60, 573–574, 850–851.
11. Murray BE: Vancomycin-resistant Enterococci. *Am J Med* 1997; 102: 284–293.

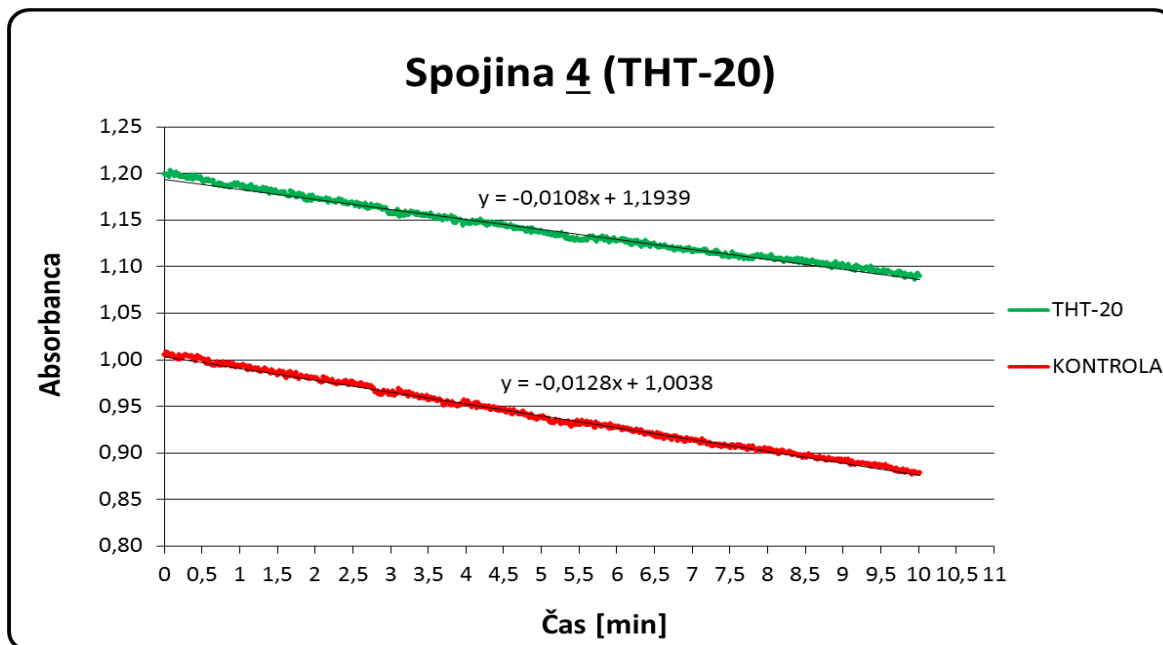
12. Škedelj V, Perdih A, Brvar M, Kroflič A, Dubbée V, Savage V, O'Neill AJ, Solmajer T, Bešter-Rogač M, Blanot D, Hugonnet JE, Magnet S, Arthur M, Mainardi JL, Stojan J, Zega A: Discovery of the first inhibitors of bacterial enzyme D-aspartate ligase from *Enterococcus faecium* (Asl<sub>fm</sub>). *Eur J Med Chem* 2013; 67: 208–220.
13. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S: The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2: a000414.
14. Chapot-Chartier MP, Kulakauskas S: Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microb Cell Fact* 2014; 13: S9.
15. Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA: Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32: 149–167.
16. Mengin-Lecreux D, Lemaitre B: Structure and metabolism of peptidoglycan and molecular requirements allowing its detection by the *Drosophila* innate immune system. *J Endotoxin Res* 2005; 11: 105–111.
17. Sobhanifar S, King DT, Strynadka NC: Fortifying the wall: synthesis, regulation and degradation of bacterial peptidoglycan. *Curr Opin Struct Biol* 2013; 23: 695–703.
18. Lazar K, Walker S: Substrate analogues to study cell-wall biosynthesis and its inhibition. *Curr Opin Chem Biol* 2002; 6: 786–793.
19. Horcajo P, de Pedro MA, Cava F: Peptidoglycan Plasticity in Bacteria: Stress-Induced Peptidoglycan Editing by Noncanonical D-Amino Acids. *Microb Drug Resist* 2012; 18: 306–313.
20. Cava F, Lam H, de Pedro MA, Waldor MK: Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68: 817–831.
21. Bugg TD, Braddick D, Dowson CG, Roper DI: Bacterial cell wall assembly: still an attractive antibacterial target. *Trends Biotechnol* 2011; 29: 167–173.



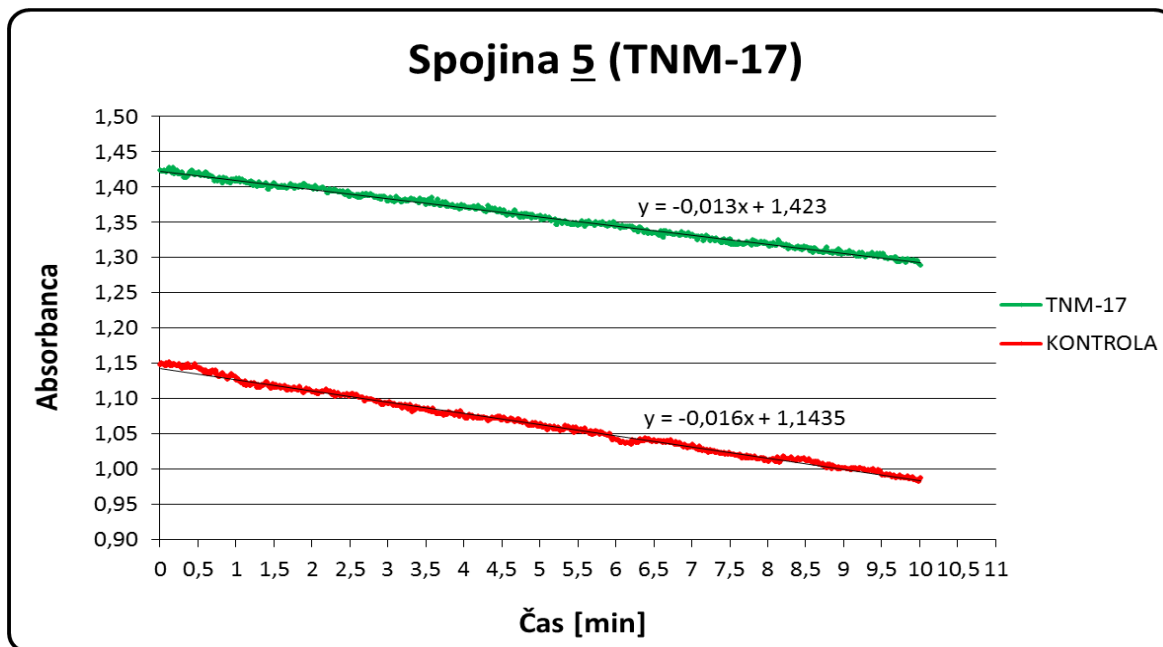
22. Typas A, Banzhaf M, Gross CA, Vollmer W: From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10: 123–136.
23. Fawaz MV, Topper M, Firestine SM: The ATP-Grasp Enzymes. *Bioorg Chem* 2011; 39: 185–191.
24. Škedelj V, Tomašič T, Mašič LP, Zega A: ATP-Binding Site of Bacterial Enzymes as a Target for Antibacterial Drug Design. *J Med Chem* 2011; 54: 915–929.
25. Sloane V, Blanchard CZ, Guillot F, Waldrop GL: Site-directed Mutagenesis of ATP Binding Residues of Biotin Carboxylase. Insight into the mechanism of catalysis. *J Biol Chem* 2001; 276: 24991–24996.
26. Zhao G, Jin Z, Wang Y, Allewell NM, Tuchman M, Shi D: Structure and function of *Escherichia coli* RimK, an ATP-grasp fold, L-glutamyl ligase enzyme. *Proteins* 2013; 81: 1847–1854.
27. Wang W, Kappock TJ, Stubbe J, Ealick SE: X-ray crystal structure of glycinamide ribonucleotide synthetase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 1998; 37: 15647–15662.
28. Galperin MY, Koonin EV: A diverse superfamily of enzymes with ATP-dependent carboxylate-amine/thiol ligase activity. *Protein Sci* 1997; 6: 2639–2643.
29. Miller GJ, Wilson MP, Majerus PW, Hurley JH: Specificity Determinants in Inositol Polyphosphate Synthesis: Crystal Structure of Inositol 1,3,4-Trisphosphate 5/6-Kinase. *Mol Cell* 2005; 18: 201–212.
30. Staudenbauer W, Strominger JL: Activation of D-Aspartic Acid for Incorporation into Peptidoglycan. *J Biol Chem* 1972; 247: 5095–5102.
31. Veiga P, Piquet S, Maisons A, Furlan S, Courtin P, Chapot-Chartier MP, Kulakauskas S: Identification of an essential gene responsible for D-Asp incorporation in the *Lactococcus lactis* peptidoglycan crossbridge. *Mol Microbiol* 2006; 62: 1713–1724.

32. Veiga P, Erkelenz M, Bernard E, Courtin P, Kulakauskas S, Chapot-Chartier MP: Identification of the Asparagine Synthase Responsible for D-Asp Amidation in the *Lactococcus lactis* Peptidoglycan Interpeptide Crossbridge. *J Bacteriol* 2009; 191: 3752–3757.
33. Škedelj V: Načrtovanje, sinteza in vrednotenje inhibitorjev D-aspartat ligaze in D-alanil-D-alanin ligaze, Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2012: 108.
34. Potarić N: Izolacija bakterijskega encima D-aspartat ligaza in biološko vrednotenje njegovih potencialnih zaviralcev, Magistrska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2017.

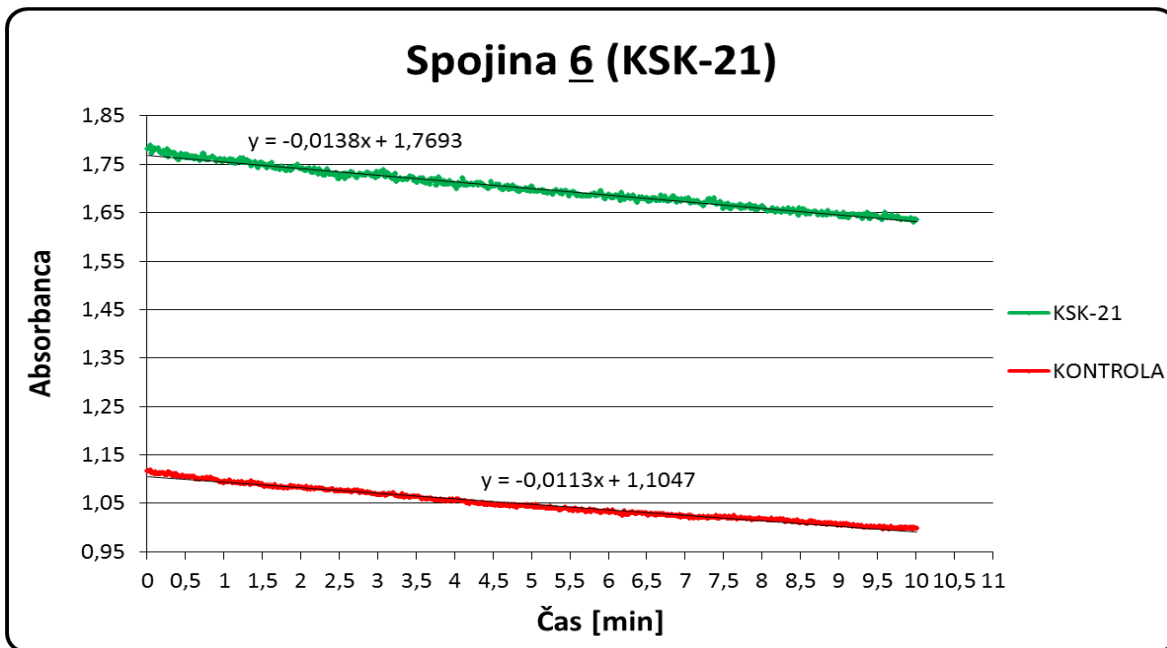
## 8 PRILOGA



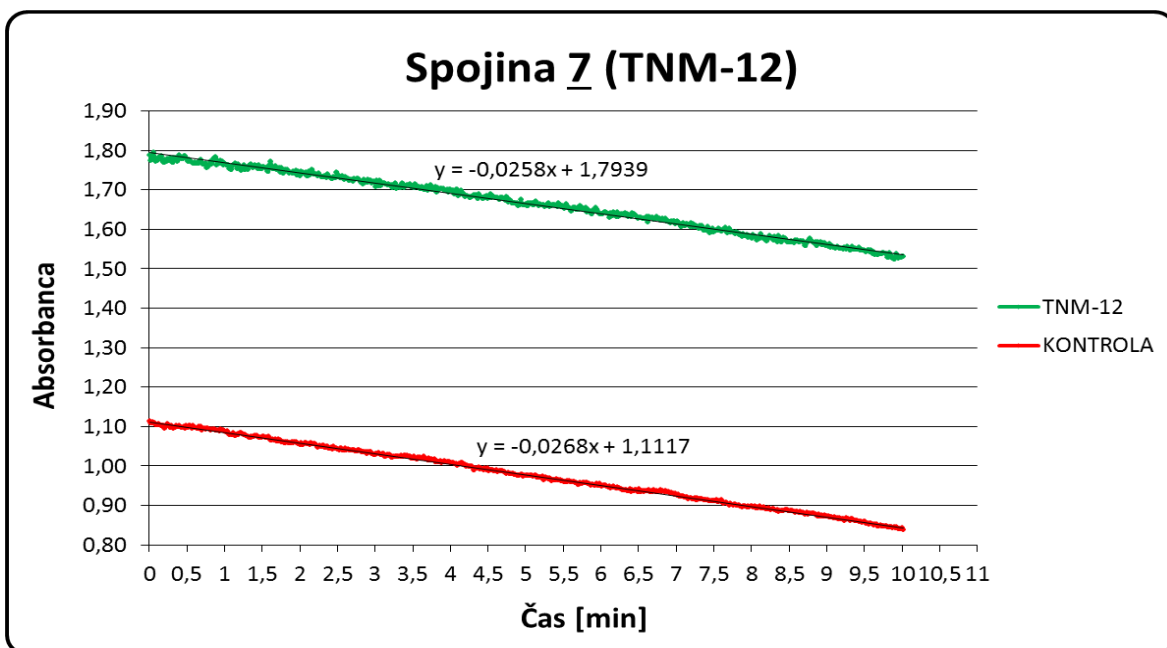
**Slika 19:** Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine 4 (THT-20) (250  $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z *in vitro* spektrofotometričnim encimskim testom.



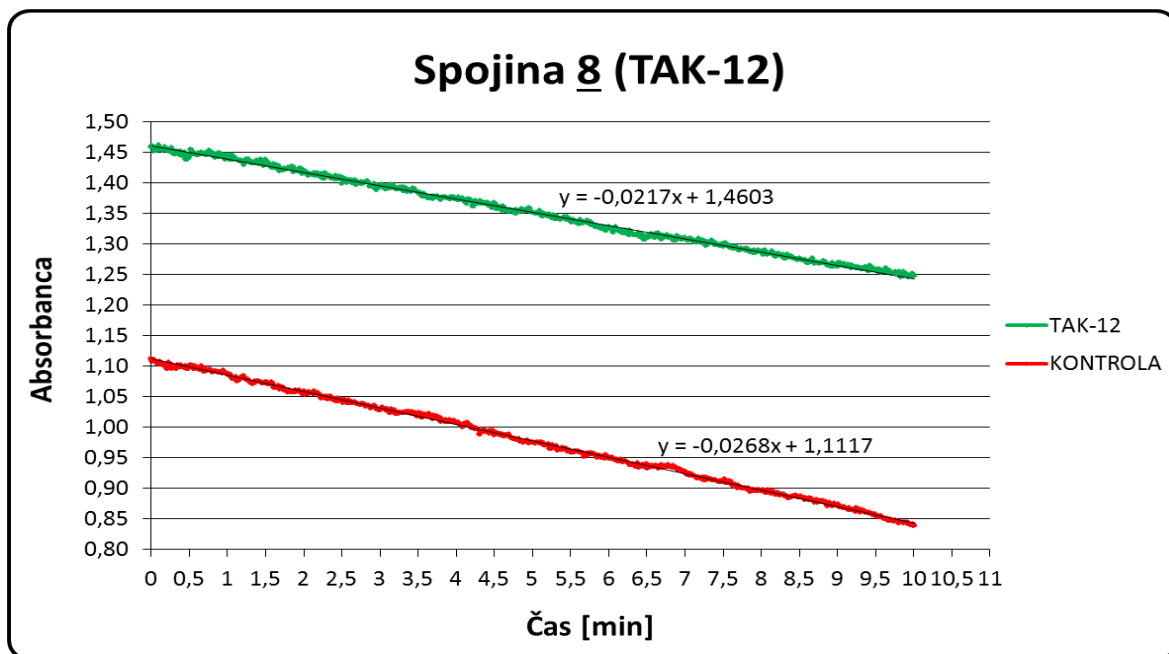
**Slika 20:** Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine 5 (TNM-17) (250  $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z *in vitro* spektrofotometričnim encimskim testom.



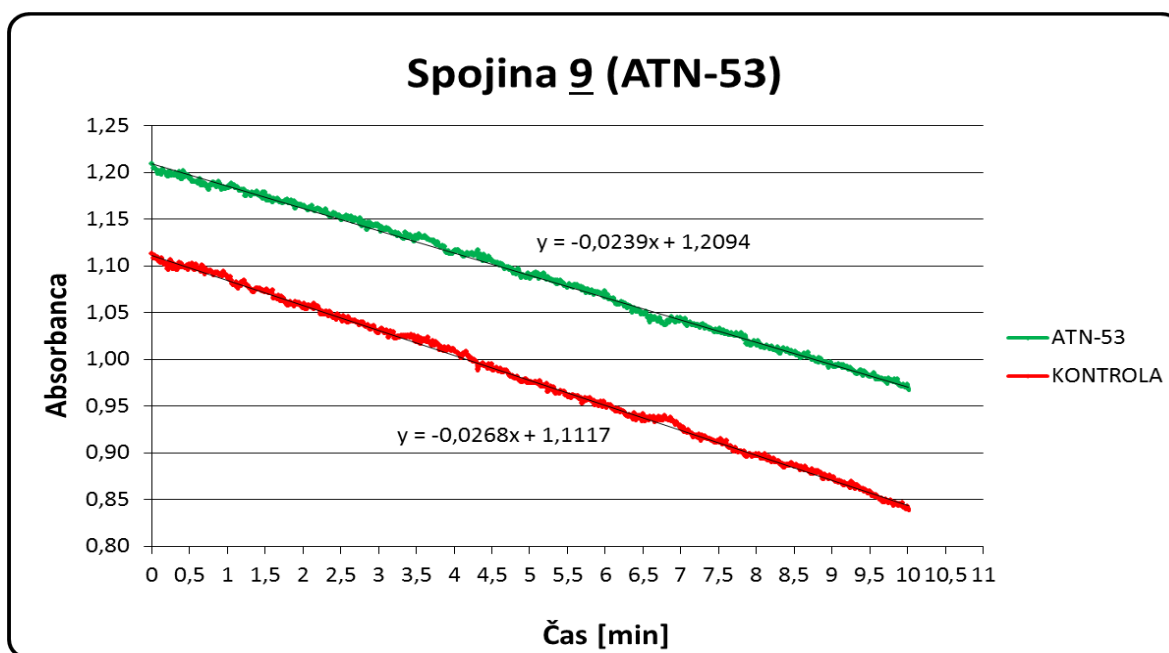
**Slika 21:** Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine 6 (KSK-21) (250  $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z *in vitro* spektrofotometričnim encimskim testom.



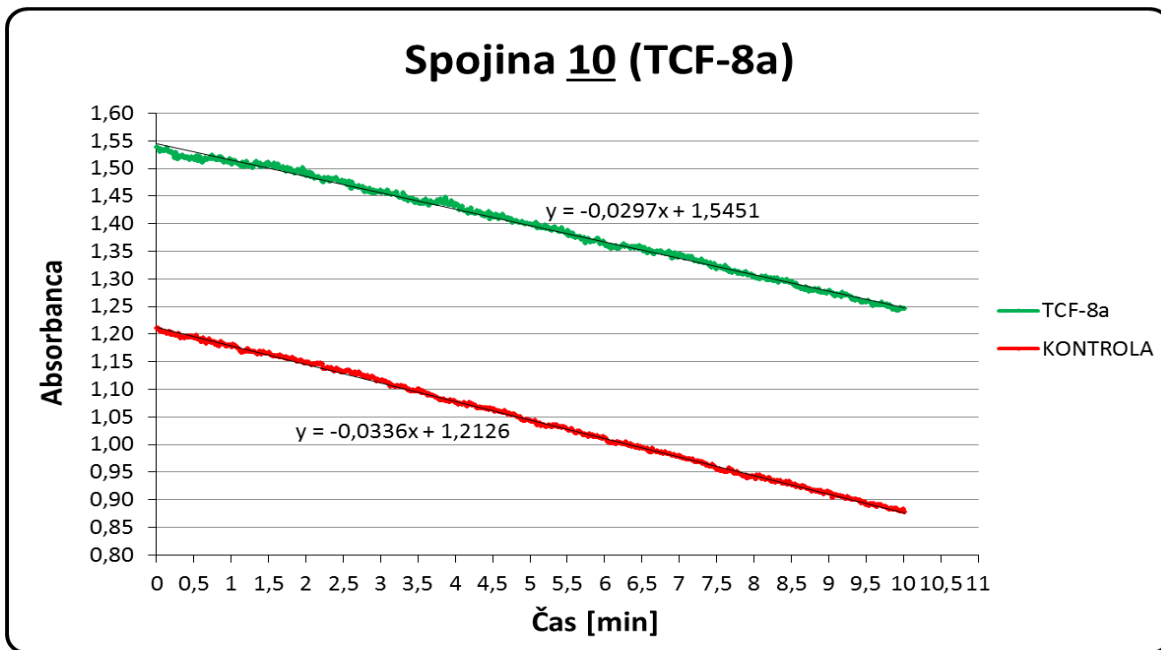
**Slika 22:** Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine 7 (TNM-12) (250  $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z *in vitro* spektrofotometričnim encimskim testom.



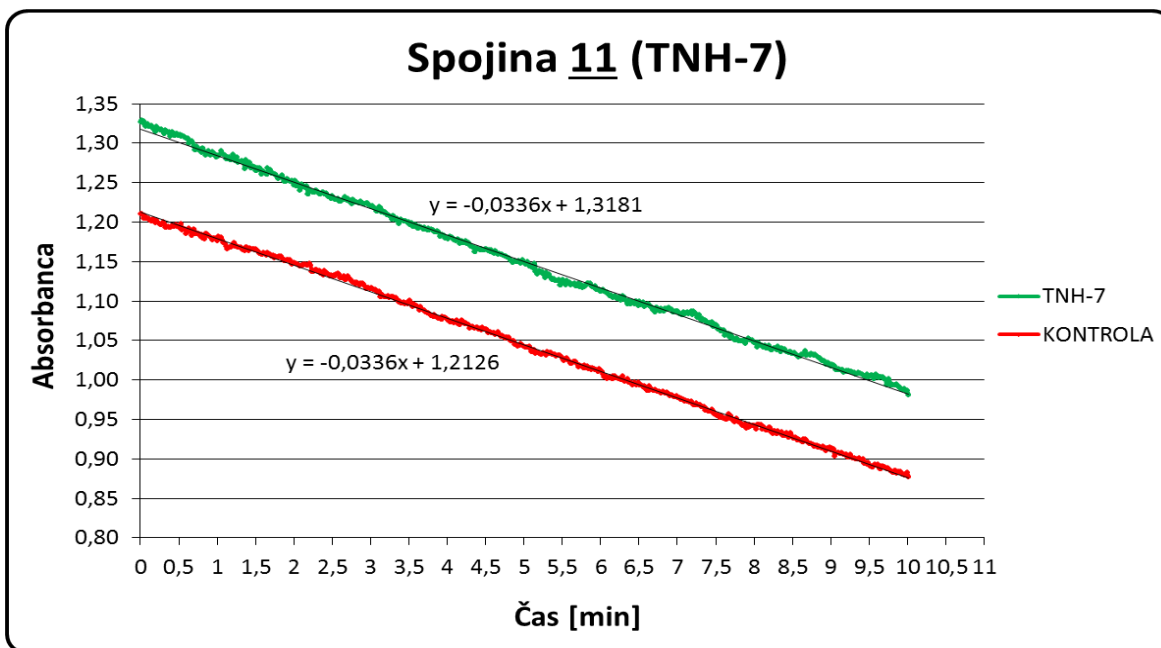
**Slika 23:** Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine 8 (TAK-12) (250  $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z *in vitro* spektrofotometričnim encimskim testom.



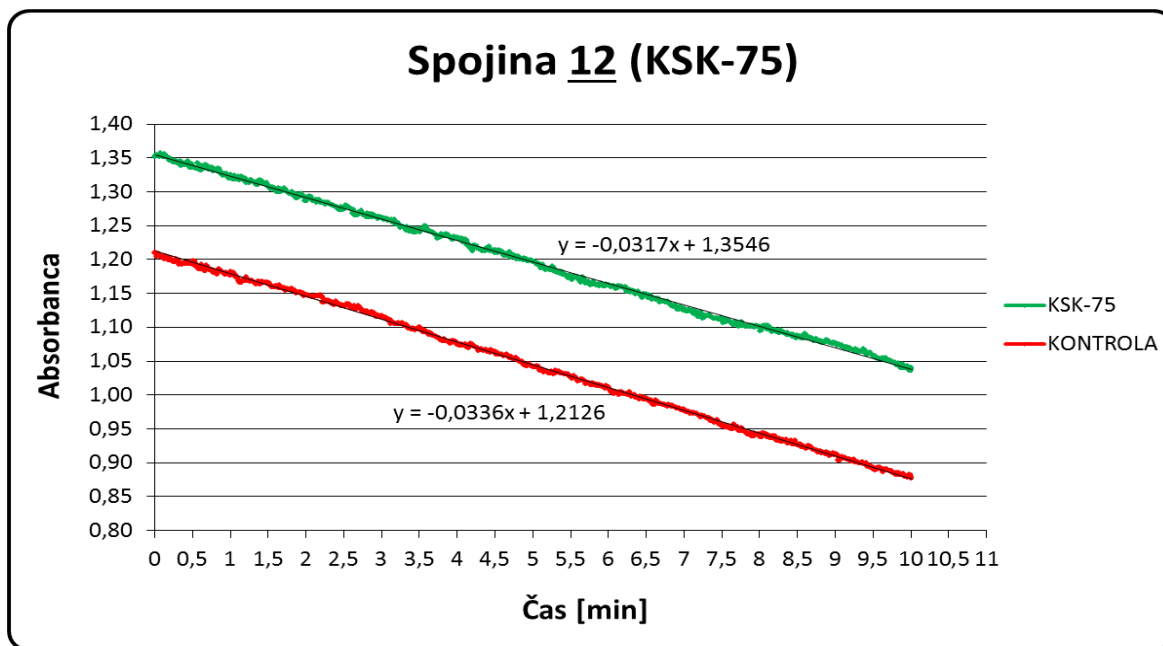
**Slika 24:** Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine 9 (ATN-53) (250  $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z *in vitro* spektrofotometričnim encimskim testom.



Slika 25: Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine 10 (TCF-8a) (250  $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z *in vitro* spektrofotometričnim encimskim testom.



Slika 26: Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine 11 (TNH-7) (250  $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z *in vitro* spektrofotometričnim encimskim testom.



**Slika 27:** Absorbanca v odvisnosti od časa pri vrednotenju spojine 12 (KSK-75) (250  $\mu$ M) in ustrezne kontrolne meritve (kontrolne) z *in vitro* spektrofotometričnim encimskim testom.