

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

UROŠ MESEC

**ISKANJE NOVIH POTENCIALNIH ZAVIRALCEV
N-ACETILGLUKOZAMIN ENOLPIRUVIL TRANSFERAZE Z
REŠETANJEM KNJIŽNICE SPOJIN FAKULTETE ZA FARMACIJO**

SEARCHING FOR NOVEL POTENTIAL INHIBITORS OF
N-ACETYLGLUCOSAMINE ENOLPYRUVYL TRANSFERASE BY
SCREENING A COMPOUND LIBRARY OF FACULTY OF PHARMACY

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2014

Diplomsko naložko sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Martine Hrast, mag. farm.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko naložko samostojno izdelal pod vodstvom mentorja prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. in somentorice asist. dr. Martine Hrast, mag. farm.

Uroš Mesec

Predsednica: prof. dr. Marija Bogataj, mag. farm.

Mentor: prof. dr. Stanislav Gobec, mag. farm.

Somentorica: asist. dr. Martina Hrast, mag. farm.

Članica: doc. dr. Petra Kocbek, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se prof. dr. Stanislavu Gobcu za mentorstvo, nasvete in strokovno pomoč.

Zahvaljujem se asist. dr. Martini Hrast za ves trud, pomoč pri delu in posredovanu znanje.

Zahvaljujem se vsem, ki so kakorkoli pripomogli k nastanku te diplomske naloge.

Zahvaljujem se mami, očetu in ostali družini, da so me podpirali in mi stali ob strani tekom študija.

Zahvaljujem se tudi prijateljem in sošolcem, ki so bili z mano celoten čas študija in ki so naredili študentska leta nepozabna.

Kazalo vsebine

1. UVOD	- 1 -
1.1. ANTIBIOTIKI IN PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVINE	- 1 -
1.1.1. Zgodovina in princip selektivne toksičnosti	- 1 -
1.1.2. Inhibitorji sinteze celične stene	- 3 -
1.1.3. Inhibitorji sinteze proteinov	- 3 -
1.1.4. Inhibitorji sinteze nukleinskih kislin	- 4 -
1.1.5. Antimetaboliti	- 4 -
1.1.6. Odpornost bakterij na protibakterijske učinkovine	- 6 -
1.2. BAKTERIJE	- 7 -
1.2.1. Zgradba bakterijskih celic	- 7 -
1.2.2. Gram-pozitivne bakterije	- 8 -
1.2.3. Gram-negativne bakterije	- 9 -
1.3. PEPTIDOGLIKAN	- 10 -
1.3.1. Zgradba peptidoglikana	- 11 -
1.3.2. Biosinteza peptidoglikana	- 12 -
1.4. MurA	- 14 -
1.4.1. Fosfomicin	- 15 -
2. NAMEN DELA	- 16 -
3. MATERIALI IN METODE	- 17 -
3.1. MATERIALI	- 17 -
3.2. KNJIŽNICA SPOJIN FAKULTETE ZA FARMACIJO	- 17 -
3.3. METODE	- 18 -
4. EKSPERIMENTALNI DEL	- 19 -
4.1. UMERITVENA KRIVULJA ZA FOSFAT	- 19 -
4.2. DOLOČANJE K_M	- 20 -
4.2.1. Določanje K_M za UDP-GlcNAc	- 20 -
4.2.2. Določanje K_M za PEP	- 23 -
4.3. VPLIV DMSO IN TRITONA X114 NA AKTIVNOST ENCIMA	- 25 -

4.4. TESTIRANJE SPOJIN	- 26 -
4.5. DOLOČANJE IC ₅₀ VREDNOSTI	- 27 -
5. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	- 29 -
5.1. ZAVIRANJE KATALITSKE AKTIVNOSTI MurA.....	- 29 -
5.2. UMERITVENA KRIVULJA ZA FOSFAT	- 30 -
5.3. DOLOČANJE K _M	- 30 -
5.4. VPLIV DMSO IN TRITONA X114	- 30 -
5.5. TESTIRANJE SPOJIN	- 31 -
5.6. DOLOČANJE IC ₅₀ VREDNOSTI	- 32 -
5.7. REZULTATI TESTIRANJA	- 33 -
6. ZAKLJUČEK	- 48 -
7. VIRI	- 49 -

Kazalo slik

Slika 1: Splošna struktura predstavnikov različnih razredov protibakterijskih učinkovin.....	- 5 -
Slika 2: Mehanizmi odpornosti na antibiotike	- 6 -
Slika 3: Zgradba bakterijske celice	- 8 -
Slika 4: Celična ovojnica Gram-pozitivnih bakterij.....	- 9 -
Slika 5: Celična ovojnica Gram-negativnih bakterij	- 10 -
Slika 6: Struktura peptidoglikana	- 11 -
Slika 7: Primerjava strukture peptidoglikana Gram-negativne in Gram-pozitivne bakterije.....	- 11 -
Slika 8: Biosinteza UDP-MurNAc-pentapeptida iz UDP-GlcNAc	- 13 -
Slika 9: Reakcija UDP-GlcNAc in PEP z MurA.....	- 14 -
Slika 10: Struktura fosfomicina	- 15 -
Slika 11: Struktura malahit zelenega	- 18 -
Slika 12: Umeritvena krivulja za fosfat	- 19 -
Slika 13: Lineweaver-Burkov diagram za UDP-GlcNAc	- 22 -
Slika 14: Lineweaver-Burkov diagram za PEP.....	- 24 -
Slika 15: Hillov diagram za spojino 4H2	- 28 -
Slika 16: Zaviranje katalitske aktivnosti MurA	- 29 -

Seznam kratic

ADP	adenozin difosfat
ATP	adenozin trifosfat
A	absorbanca
C115D	mutacija pri kateri je Cys115 zamenjan z asparaginsko kislino
Cys115	cistein na mestu 115 v MurA iz <i>E. coli</i>
Cys117	cistein na mestu 117 v MurA iz <i>H. influenzae</i>
D-Ala	D-alanin
D-Glu	D-glutaminska kislina
D-GluNH₂	D-glutamin
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DTT	ditiotreitol
EP	enolpiruvat
G-	Gram-negativne bakterije
G+	Gram-pozitivne bakterije
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
γ	masna koncentracija
H	Hillov koeficient
I	koncentracija inhibitorja
IC₅₀	koncentracija zaviralca, pri kateri je zavrite 50 % aktivnosti encima
K_d	konstanta disociacije
K_M	Michaelis-Mentenova konstanta
L-Ala	L-alanin
L-Lys	L-lizin
mezo-DAP	<i>mezo</i> -diaminopimelinska kislina
mRNA	informacijska RNA (ang. messenger RNA)

MurNAc	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
n	množina
NADP⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfat
NADPH	reducirana oblika NADP ⁺
NAG	<i>N</i> -acetilglukozamin
NAM	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
P_i	anorganski fosfat
PABA	<i>para</i> -aminobenzojska kislina
PEP	fosfoenolpiruvat
RA	rezidualna aktivnost
RNA	ribonukleinska kislina
rRNA	ribosomska RNA (ang. ribosomal RNA)
S	substrat
t	čas
tRNA	prenašalna RNA (ang. transfer RNA)
UDP	uridin difosfat
v	hitrost
V_{max}	maksimalna hitrost encimske reakcije
V	volumen

Povzetek

Odkritje antibiotikov je močno spremenilo zdravljenje bakterijskih okužb. Resne ali celo smrtne okužbe so postale ozdravljive. Na žalost se je zaradi neprimerne uporabe antibiotikov hitro razširila odpornost bakterij. Odpornost bakterij danes predstavlja velik problem v zdravstvu, zato v prihodnosti nujno potrebujemo nove učinkovine za boj proti odpornim bakterijam. Veliko raziskav v farmacevtski industriji je zaradi tega že usmerjenih v iskanje novih mehanizmov delovanja protibakterijskih učinkovin.

Eden izmed potencialnih mehanizmov delovanja novih protibakterijskih učinkovin je inhibicija začetnih stopenj biosinteze peptidoglikana, ki je glavni gradnik bakterijske celične stene. V začetnih stopnjah biosinteze serija Mur encimov iz UDP-*N*-acetilglukozamina sintetizira znotrajcelični prekurzor UDP-MurNAc-pentapeptid, ki po adiciji *N*-acetilglukozamina postane monomerni gradnik peptidoglikanskih verig. Mur encimi iz različnih vrst bakterij so si po zgradbi zelo podobni in so bistvenega pomena za njihovo preživetje. Zaradi tega pričakujemo, da bi zaviralec Mur encimov deloval baktericidno in širokospikalno.

V okviru diplomske naloge smo si za cilj zadali vzpostavitev eksperimentalnega *in vitro* sistema, ki nam bo omogočil hitro in enostavno testiranje večjega števila spojin na encimu *N*-acetilglukozamin enolpiruvil transferazi oz. MurA. Ta v prvi stopnji biosinteze peptidoglikana na *N*-acetilglukozamin pripne enolpiruvatno skupino. Edini do sedaj uveljavljen inhibitor MurA je fosfomicin, na katerega se je žal že pojavila odpornost. Testirali smo več kot 1600 spojin na MurA, da bi ugotovili, ali katera izmed njih zavre njegovo katalitsko aktivnost. Spojine smo vzeli iz knjižnice spojin Fakultete za farmacijo, ki vsebuje struktурno različne spojine, ki so bile kupljene ali sintetizirane za različne projekte na fakulteti v preteklih letih.

Od približno 1600 spojin, ki smo jih testirali, smo dobili 45 takšnih, pri katerih je imel MurA rezidualno aktivnost pri 50 µM koncentraciji spojine nižjo od 75 %. Najmočnejši zaviralec MurA je spojina **42**, ki je derivat 5-benzilidentiazol-4-ons in ima IC₅₀ vrednost 7 µM. Spojina **38**, ki je derivat 2-tioksotiazolidin-4-ons, ima IC₅₀ vrednost 10 µM. Spojina **16**, ki je derivat 3-cianotiofena, pa ima IC₅₀ vrednost 15 µM. Vse tri spojine imajo več aktivnih analogov in so primerne za nadaljnje raziskave.

Abstract

Discovery of antibiotics has drastically changed the treatment of bacterial infections. Serious or potentially lethal infections have become curable. Unfortunately, improper use of antibiotics has caused a rapid spread of bacterial resistance which now poses a great threat to healthcare systems; therefore there is an urgent need for new antibiotics for treatment of resistant bacterial infections. This is why the research in pharmaceutical industry is already focused on searching for new mechanisms of action of antibacterial drugs.

One of the new potential mechanisms of action is the inhibition of the first steps in the biosynthesis of the bacterial cell wall peptidoglycan. Here, a series of Mur enzymes converts UDP-*N*-acetylglucosamine into UDP-MurNAc-pentapeptide, which yields monomeric structural component of the peptidoglycan chains after addition of another *N*-acetylglucosamine molecule. In general, Mur enzymes are highly homologous among various bacterial species and are of vital importance for their survival. Therefore the potential Mur inhibitor is expected to be broad-spectrum and bactericidal.

The goal of this thesis was to establish an assay system that will allow us to quickly and easily biochemically evaluate a large number of compounds for the inhibition of *N*-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA). MurA attaches enolpyruvyl moiety to the *N*-acetylglucosamine in the first committed step of peptidoglycan biosynthesis. So far the only MurA inhibitor used in clinic is fosfomycin, to which, unfortunately, resistance has already developed. We evaluated more than 1600 compounds for their inhibition of MurA. The compounds were taken from the in-house library of compounds at the Faculty of Pharmacy, which contains structurally different compounds that have been purchased or synthesized during various projects over the past years.

Among approximately 1600 compounds evaluated, 45 inhibited MurA at 50 µM concentration with residual activities of the enzyme below 75 %. The most potent MurA inhibitor is compound **42**, which is a derivative of 5-benzylidenethiazol-4-one and has an IC₅₀ value of 7 µM. The second best inhibitor is compound **38**, which is a derivative of 2-thioxothiazolidin-4-one and has an IC₅₀ value of 10 µM. The third best MurA inhibitor is compound **16**, which is a derivative of 3-cyanothiophene and has an IC₅₀ value of 15 µM. All three compounds have several active analogues and are promising candidates for further development.

1. UVOD

1.1. ANTIBIOTIKI IN PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVINE

V našem okolju živimo skupaj z bakterijami. Bakterije uspevajo in se množijo tudi znotraj živih organizmov, kar lahko povzroči bolezen ali celo smrt organizma. Zaradi tega je nadzor nad rastjo in možnost uničenja bakterij, ki povzročajo bolezni pri človeku ali živalih, velikega pomena (1). Zdravilne učinkovine, s katerimi se borimo proti bakterijskim okužbam, razdelimo v dve skupini - na antibiotike in sintezne protibakterijske učinkovine. Antibiotiki so naravne protibakterijske učinkovine, ki jih proizvajajo mikroorganizmi. Poznamo več vrst bakterij in gliv, ki proizvajajo antibiotike in zdi se, da je njihov edini namen uničenje ali inhibicija rasti drugih mikroorganizmov (2). Z namenom doseganja širšega protibakterijskega spektra, večje jakosti, manjše toksičnosti, peroralne aplikacije ali izboljšanja drugih farmakokinetičnih lastnosti, velikokrat uporabljamo njihove polsintezne analoge. Sintezne snovi, ki jih prav tako uporabljamo za uničenje ali inhibicijo rasti bakterij in ki niso izpeljane iz naravnih produktov mikroorganizmov, pa uvrščamo v skupino sinteznih protibakterijskih učinkovin (3).

1.1.1. Zgodovina in princip selektivne toksičnosti

Ljudje smo tarče bakterijskih okužb že od samega začetka oz. pojava človeka. Lahko bi rekli, da že enako dolgo iščemo ustrezni način in zdravila za boj proti bakterijam. To je bilo zaradi akutne narave bakterijskih okužb in skoraj popolne nevednosti o izvoru bolezni, vse do začetka 20. stoletja, praktično nemogoče (3).

Prve sistematične raziskave na področju protibakterijskih zdravil je začel nemški raziskovalec Paul Ehrlich (2). Ehrlich je bil navdušen nad barvili, ki se selektivno vežejo na celice bakterij in jih obarvajo. Predvideval je, da bi katero od barvil lahko bila spojina, ki bi selektivno uničila bakterijo, ne da bi pri tem poškodovala človeške celice. To teorijo je poimenoval »magic bullet« oz. magični izstrelek (1). Ehrlich je s pomočjo svojega asistenta leta 1909 odkril, da je spojina 606 - arsfenamin, kasneje v prodaji pod imenom Salvarsan, učinkovita proti spirohetam, katerih podvrsta *Treponema pallidum* povzroča sifilis (4).

Obdobje protibakterijskih učinkovin se je začelo leta 1936 z odkritjem sulfonamidov v Nemčiji in Franciji, ki je izhajalo iz temeljev, ki jih je postavil Paul Ehrlich (3). Leta 1927

so pri velikanu nemške kemične industrije I. G. Farbenindustrie začeli z dolgoročnim načrtom iskanja novih »magičnih izstrelkov«. Gerhard Domagk je testiral veliko število kemikalij in odkril, da je prontozil rdeče, novo barvilo za barvanje usnja, popolnoma zaščitilo miši pred streptokoki in stafilocoki, brez opaženih znakov toksičnosti. Kasneje sta Jacques in Therese Trefouel dokazala, da se barvilo v telesu metabolizira do sulfanilamida, Domagk pa je za odkritje sulfonamidov leta 1939 prejel Nobelovo nagrado. Že pred tem, septembra 1928, je Alexander Fleming opazil, da na petrijevkah okrog plesni *Penicillium notatum* ni kolonij stafilokokov. Fleming je pravilno sklepal, da plesen v agar izloča spojino, ki deluje protibakterijsko in jo poimenoval penicilin. V nadalnjih raziskavah je dokazal, da spojina lahko difundira v agar in že v majhnih količinah uniči vrsto patogenih bakterij, tudi *Staphylococcus aureus*. Žal Fleming ni mogel dokazati, da penicilin ostane aktiven v človeškem organizmu dovolj dolgo, da uniči bakterije, zato je raziskave opustil. Kasneje sta Howard Florey in Ernst Chain injicirala izoliran in očiščen penicilin v miši okužene s streptokoki in stafilokoki ter dokazala njegovo učinkovitost *in vivo*. Uspeh sta objavila leta 1940 in sledile so prav tako uspešne študije na ljudeh. Fleming, Florey in Chain so leta 1945 prejeli Nobelovo nagrado za odkritje in proizvodnjo penicilina (1).

Ehrlich je že zelo zgodaj vedel, da mora imeti dobra protibakterijska učinkovina selektivno toksičnost, kar pomeni, da mora uničiti ali inhibirati rast bakterij, hkrati pa čim manj poškodovati celice gostitelja. Stopnjo selektivne toksičnosti lahko opredelimo s pomočjo terapevtskega in toksičnega odmerka. Terapevtski odmerek je odmerek učinkovine potreben za uspešno terapijo bakterijske okužbe, toksičen odmerek pa je odmerek učinkovine pri katerem postane terapija prenevarna za gostitelja. Razmerje med toksičnim in terapevtskim odmerkom imenujemo terapevtski indeks. Višji terapevtski indeks pomeni večjo selektivno toksičnost. Protimikrobne učinkovine imajo v splošnem visok terapevtski indeks, saj, na primer penicilini, inhibirajo sintezo celične stene, s tem pa ne škodujejo človeškim celicam, ki celične stene nimajo (1).

Vse vrste bakterij niso enako občutljive na določeno vrsto antibiotika oz. protibakterijske učinkovine. Kot primer vzemimo Gram-pozitivne bakterije, ki so zaradi specifične zgradbe celične stene občutljive na β -laktamske antibiotike, medtem ko so Gram-negativne naravno odporne proti β -laktamom (2). Učinkovine, s katerimi se borimo proti bakterijam, zato delimo še na ozkospektralne, ki delujejo le proti omejenemu številu bakterij, in širokospektralne, ki delujejo proti več vrstam bakterij (1). Širokospektralni antibiotiki, kot

so tetraciklini in tudi nekateri β -laktami, so učinkoviti tako proti Gram-pozitivnim kot tudi Gram-negativnim bakterijam (2).

1.1.2. Inhibitorji sinteze celične stene

Največjo selektivno toksičnost med antibiotiki imajo inhibitorji sinteze celične stene. Njihov visok terapevtski indeks je posledica njihovega mehanizma delovanja – inhibirajo namreč sintezo celične stene, ki je evkarijntske celice nimajo. V to skupino spadajo penicilini, cefalosporini in glikopeptidi (1).

Penicilini so derivati 6-aminopenicilanske kisline in se razlikujejo med seboj po stranski verigi pripeti na amino skupino (Slika 1a). Najpomembnejši del molekule je β -laktamski obroč, ki je odgovoren za njihovo delovanje, hkrati pa tudi tarča β -laktamaz – bakterijskih encimov, ki so odgovorni za razgradnjo β -laktamskih antibiotikov. Strukturno so podobni terminalnemu aminokislinskemu zaporedju D-Ala-D-Ala, ki tvori konč peptidnih verig peptidoglikana, ki gradi bakterijsko celično steno (1). Zaradi te podobnosti se lahko vežejo v aktivno mesto encima transpeptidaze in acilirajo aminokislino serin. Encim je s tem inhibiran, hidroliza aciliranega encima pa poteka zelo počasi (5).

Cefalosporini so derivati 7-aminocefalosporanske kisline in so zelo podobni penicilinom (Slika 1b). Tako kot penicilini imajo v strukturi β -laktamski obroč in s tem tudi enak mehanizem delovanja (1). Skupno β -laktamski antibiotiki predstavljajo več kot polovico letne proizvodnje in porabe antibiotikov na svetu (2).

Vankomicin je predstavnik glikopeptidnih antibiotikov. Strukturno je vankomicin velika molekula, ki se specifično veže na terminalno D-Ala-D-Ala zaporedje pentapeptida in onemogoči prečno povezovanje osnovnih enot peptidoglikana. Teikoplanin je po strukturi in mehanizmu delovanja podoben vankomicinu, ima pa manj stranskih učinkov (1).

1.1.3. Inhibitorji sinteze proteinov

Protibakterijske učinkovine, ki inhibirajo sintezo proteinov, se vežejo na prokarijntske ribosome. Imajo relativno visok terapevtski indeks, vendar ne tako visokega kot inhibitorji sinteze celične stene, saj razlikujejo med evkarijntsksimi in prokarijntsksimi ribosomi. Lahko se vežejo na manjšo 30S ali večjo 50S podenoto prokarijntskega ribosoma (1).

Aminoglikozidi se strukturno razlikujejo med seboj, vendar vsi vsebujejo cikloheksanski obroč in amino sladkorje. Vežejo se na manjšo 30S podenoto bakterijskega ribosoma in direktno inhibirajo sintezo proteinov ali pa povzročajo napake pri branju mRNA (1).

Tetraciklini imajo skupno strukturo iz štirih obročev, na katero so vezane različne stranske verige (Slika 1c). Podobno kot aminoglikozidi se vežejo na manjšo 30S podenoto bakterijskega ribosoma, vendar tetraciklini preprečijo vezavo tRNA v aktivno mesto ribosoma. So širokospektralni antibiotiki, ki delujejo bakteriostatično, zato je uspešnost terapije odvisna tudi od posameznikovega imunskega sistema (1).

Makrolidni antibiotiki vsebujejo laktonski obroč sestavljen iz 12-22 ogljikovih atomov. Predstavnik eritromicin običajno deluje bakteriostatično in se veže na 23S rRNA večje 50S podenote bakterijskega ribosoma (1).

Kloramfenikol se, tako kot eritromicin, veže na 23S rRNA večje 50S podenote bakterijskega ribosoma in na ta način zavre sintezo proteinov (Slika 1d). Najprej so ga pridobivali iz kulture *Streptomyces venezuelae*, danes pa se zaradi enostavne strukture pridobiva sintezno (1). Na žalost je kloramfenikol toksičen in se uporablja le še v mazilih za oči. Najresnejši stranski učinek je depresija kostnega mozga, ki vodi do aplastične anemije (6).

1.1.4. Inhibitorji sinteze nukleinskih kislin

Inhibitorji sinteze nukleinskih kislin nimajo tako velike selektivne toksičnosti, kot prej omenjeni antibiotiki, saj je sinteza nukleinskih kislin pri prokariontih in evkariontih zelo podobna. Kinoloni so sintezne protibakterijske učinkovine, ki vsebujejo 4-kinolonski obroč (Slika 1e). Mehanizem delovanja kinolonov je inhibicija bakterijskih encimov DNA giraze in topoizomeraze II. Oba encima imata podobno vlogo in povzročita negativno zvitje DNA ter tako olajšata ločitev verig med podvojevanjem. Kinoloni delujejo širokospektralno in baktericidno (1).

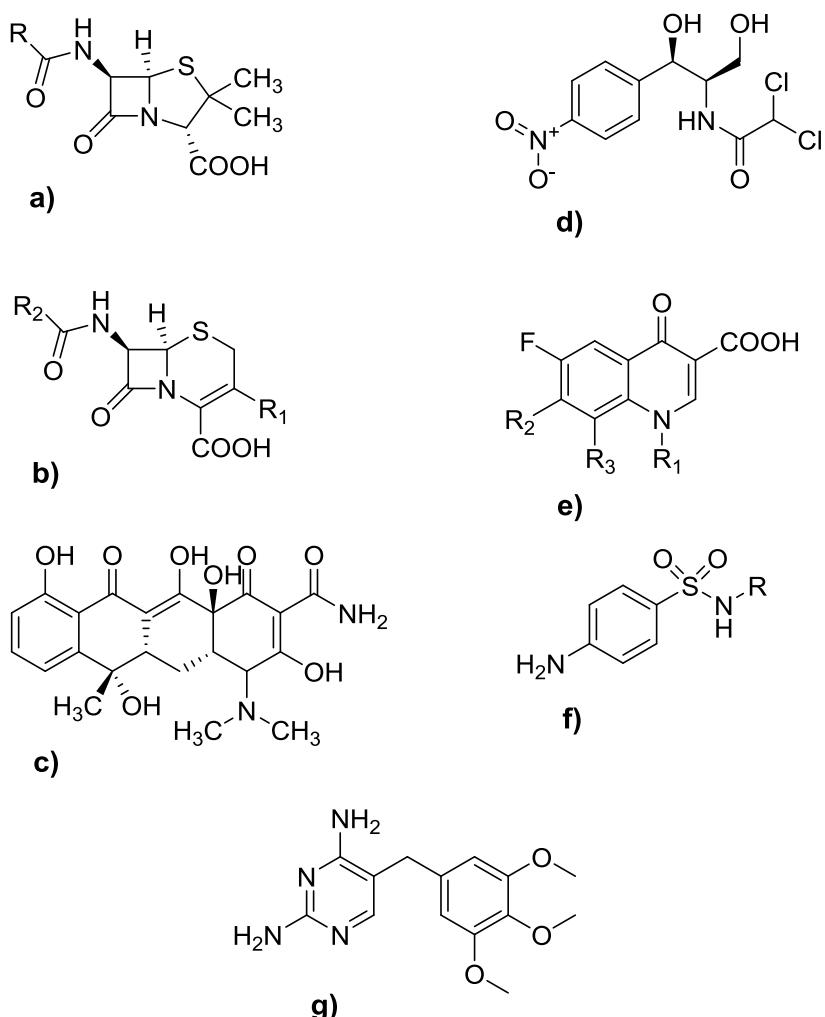
1.1.5. Antimetaboliti

Tovrstne protibakterijske učinkovine delujejo kot strukturni analogi naravnih intermediatov, ki nastopajo v metabolnih procesih. Antimetaboliti zaradi svoje podobnosti tekmujejo z naravnimi intermediati v raznih metabolnih procesih, hkrati pa so dovolj različni, da onemogočijo normalen potek teh procesov. Antimetaboliti so v splošnem širokospektralni in bakteriostatični (1).

Prvi antimetaboliti so bili sulfonamidi, ki jih je odkril Gerhard Domagk (Slika 1f). V svoji strukturi imajo sulfanilamidni fragment, ki je analog *para*-aminobenzojske kisline (PABA). PABA je potrebna za sintezo folne kisline, ki je prekurzor purinskih in pirimidinskih baz, ki gradijo DNA. Sulfonamidi so torej kompetitivni inhibitorji dihidropteroat sintetaze - encima

odgovornega za vezavo PABA v procesu sinteze folne kisline. Posledica je zmanjšana sinteza purinskih in pirimidinskih baz, brez katerih se bakterije ne morejo deliti. Njihova selektivna toksičnost je posledica dejstva, da bakterije sintetizirajo svojo folno kislino, medtem ko jo moramo ljudje dobiti s hrano. Sulfonamidi imajo visok terapevtski indeks, saj sinteza folne kisline v človeških celicah ne poteka (1).

Trimetoprim je sintezna protibakterijska učinkovina, ki, podobno kot sulfonamidi, zavira sintezo folne kisline v bakterijah (Slika 1g). Deluje tako, da inhibira encim dihidrofolat reduktazo. Dihidrofolat reduktaza je eden izmed naslednjih encimov v sintezi folne kisline in je odgovoren za redukcijo dihidrofolne kisline v tetrahidrofolno kislino (1).

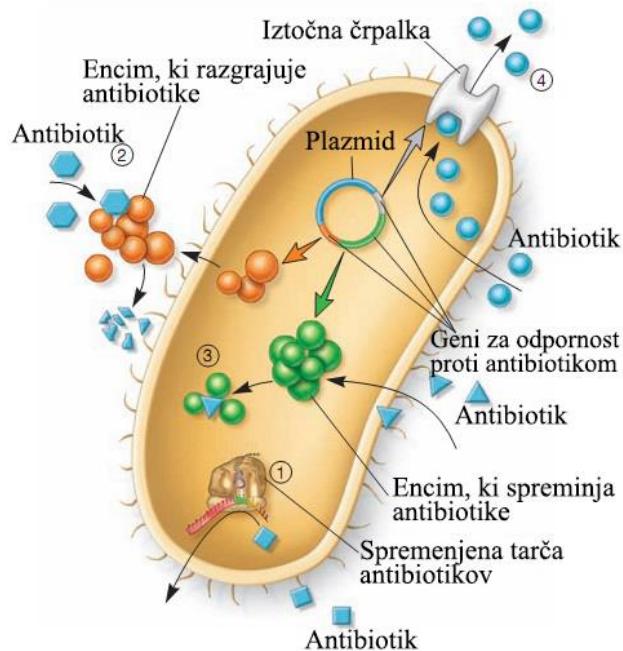


Slika 1: Splošna struktura predstavnikov različnih razredov protibakterijskih učinkovin: a) penicilini b) cefalosporini c) tetraciklini d) kloramfenikol e) kinoloni f) sulfonamidi g) trimetoprim

1.1.6. Odpornost bakterij na protibakterijske učinkovine

Odkritje in uporaba antibiotikov sta v 20. stoletju drastično spremenila položaj ljudi in živali v boju z bakterijskimi okužbami. Paradoksalno pa prav ta uspeh pri zdravljenju nalezljivih bolezni ogroža nadaljnjo koristnost antibiotikov (7). Širjenje odpornosti bakterij na zdravila predstavlja eno najresnejših nevarnosti za javno zdravje v 21. stoletju (1). Odpornost bakterij na zdravila je sposobnost, da se zoperstavijo učinkom protibakterijskih učinkovin na katere so bile v preteklosti občutljive (2). Medtem ko bakterije, ki so bile nekoč občutljive, postajajo vse bolj odporne na današnje protimikrobne terapije, se v bolnišnicah srečujejo še s problemom oportunističnih bakterij, ki prav tako kažejo nizko občutljivost na antibiotike. Vse to prinaša tveganje v javno zdravje, saj se s tem spremeni potek in izid bakterijskih okužb. Nevarnosti pa se pojavljajo tudi v rutinskih postopkih in stanjih, kot so imunosupresija, intubacija, kateterizacija, ki temeljijo na uspešni antibiotični terapiji bakterijskih okužb, ki so lahko posledica teh stanj oz. postopkov (8).

Poznamo več vrst bakterijske odpornosti (Slika 2). Prva je naravna odpornost, ki je kontrolirana kromosomsko in je odraz lastnosti bakterije. Naravna odpornost je lahko posledica kompleksne zgradbe celične stene, iztočnih črpalk, ki antibiotike črpajo iz celice, ali encimske razgradnje antibiotika. Primer naravne odpornosti so Gram-negativne bakterije, ki so zaradi kompleksne zgradbe celične stene v splošnem bolj odporne na antibiotike od Gram-pozitivnih. Iz istega razloga so Gram-negativne bakterije odporne na peniciline, saj zunanjega membrana preprečuje, da bi penicilini dosegli peptidoglikan, kjer je njihovo mesto delovanja (7, 9). Mikoplazme, na primer, pa sploh nimajo celične stene, ki je potrebna za delovanje penicilinov (2). Druga vrsta odpornosti je pridobljena odpornost. Pridobljena odpornost je rezultat genskih sprememb, ki nastanejo z mutacijami ali sprejemom genskega materiala. Posledica mutacij je



Slika 2: Mehanizmi odpornosti na antibiotike
(povzeto po 1)

sprememba tarče protibakterijskih učinkovin in s tem njihova neučinkovitost. Druga oblika pridobljene odpornosti je sprejem genskega materiala v obliki plazmidov in transpozonov, ki vsebujejo gene za odpornost proti eni ali več vrstam protibakterijskih učinkovin. Na ta način lahko bakterija pridobi na primer gen za β -laktamazo, ki odpre β -laktamski obroč penicilinov in cefalosporinov, ali pa gen za mutirano podenoto DNA giraze, ki onemogoča vezavo kinolonov. Preko plazmida lahko bakterija pridobi tudi gen za iztočno črpalko, ki iz bakterijske celice črpa ksenobiotike in tako postane odporna proti več vrstam protibakterijskih učinkovin naenkrat. Pridobljena odpornost je najpogostejša vrsta odpornosti bakterij na protibakterijske učinkovine. Bakterije pa se lahko, če jih izpostavimo naraščajočim koncentracijam antibiotika, tudi prilagodijo. Ta vrsta bakterijske odpornosti je nestabilna, kar pomeni, da jo lahko bakterije izgubijo, če jih prestavimo v medij brez antibiotika in tako zopet postanejo občutljive (7).

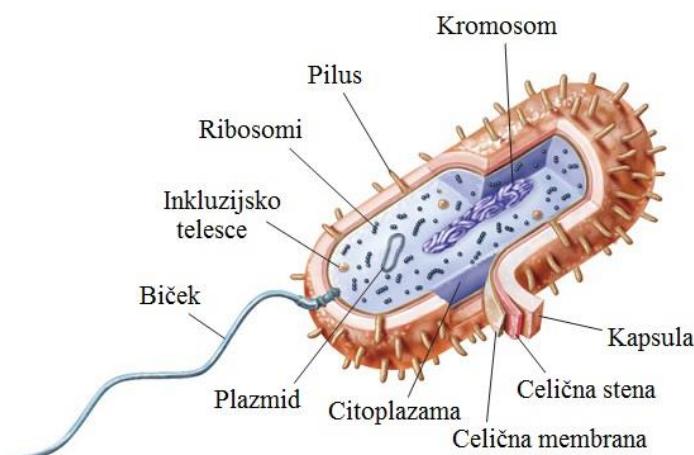
1.2. BAKTERIJE

Bakterije so mikroskopski organizmi veliki od 0,1 do 20 μm . Običajno so enocelične, njihove oblike pa segajo od majhnih kroglic do paličic (10). Večina bakterij ima celično steno, ki je zgrajena iz peptidoglikana. Veliko jih živi v tleh, vodi in v zraku, naseljene pa so tudi po naši koži, ustih in črevesju. Nekatere živijo v okoljih z ekstremno temperaturo, pH-jem ali slanostjo. Čeprav nekatere bakterije povzročajo bolezni, jih ima veliko tudi koristnejše vloge, kot so kroženje elementov v biosferi, razgrajevanje odmrlih rastlin in poginulih živali ter proizvodnja vitaminov. Cianobakterije pa s pomočjo fotosinteze proizvajajo celo znatne količine kisika (1).

1.2.1. Zgradba bakterijskih celic

Celice delimo na prokariontske, kar v Grščini pomeni »pred jedrom«, in evkariontske, kar v Grščini pomeni »pravo jedro«. Vse bakterijske celice so prokariontske, kar pomeni, da nimajo z membrano obdanega jedra in da njihova DNA prosto plava v citoplazmi (Slika 3). Prokariontske celice prav tako nimajo organelov, ki so obdani z membranami, katere najdemo v evkariontskih celicah (11). Oba tipa celic imata celično membrano, ki loči intracelularno tekočino od ekstracelularne tekočine. Zraven celične membrane imajo bolj krhkje rastlinske in bakterijske celice še dodatno zaščito, ki jo imenujemo celična stena. Celična stena je toga struktura, ki pomaga ohranjati obliko in celovitost celic, tako da preprečuje nabrekanje in lizo ali pa skrčenje celic, kadar se osmotski tlak zunanjega medija

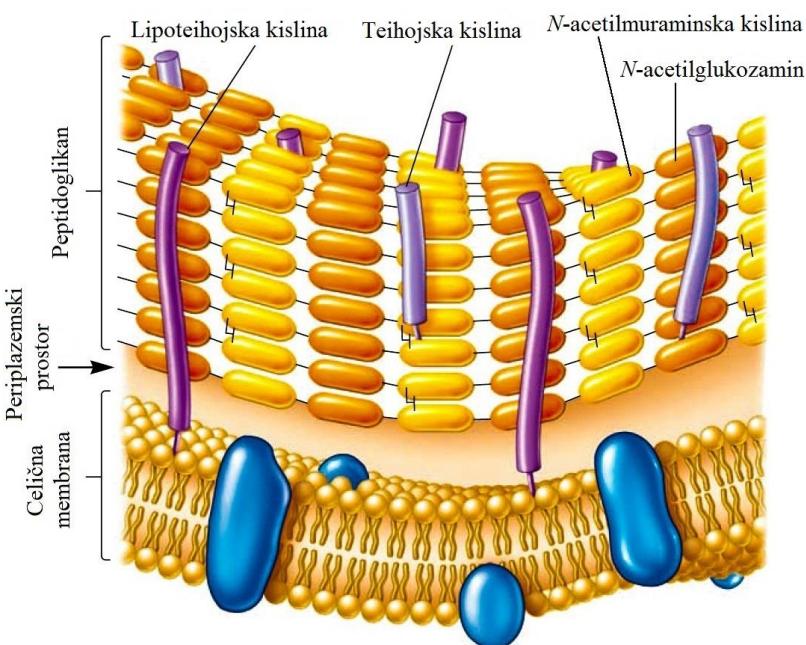
spreminja. Celotno strukturo bakterije, ki ločuje citoplazmo od okolja, imenujemo celična ovojnica (10, 12). Kljub svoji togosti in čvrstosti je celična stena zelo porozna in navadno ne omejuje vstopa snovem v bakterijsko celico (11). Encimi v zunanjem mediju jo nenehno razgrajujejo, bakterijski encimi pa posledično nenehno obnavljajo. Ta proces nenehne izgradnje bakterijske celične stene ponuja dobro tarčo za protibakterijska zdravila, saj oviranje ponovne izgradnje celične stene poruši celovitost bakterijske celice in privede do smrti bakterije (10, 12).



Slika 3: Zgradba bakterijske celice (povzeto po 11)

1.2.2. Gram-pozitivne bakterije

Gram-pozitivne bakterije imajo običajno debelo celično steno, ki je sestavljena predvsem iz peptidoglikana. Celična stena Gram-pozitivnih bakterij je sestavljena iz 20 do 80 nm debele homogene plasti peptidoglikana, ki leži na zunanjji strani celične membrane (Slika 4). Kemična analiza kaže, da peptidoglikan predstavlja od 60 do 90 % celične stene Gram-pozitivnih bakterij. V celični steni Gram-pozitivnih bakterij so še večje količine teiholske kislinske, ki je polimer glicerola ali ribitol ali fosfatnih skupin. Teiholska kislina je kovalentno vezana na peptidoglikan ali na lipide v celični membrani. Kadar je vezana na lipide jo imenujemo lipoteiholska kislina. Molekule teiholske kislinske segajo vse do površja peptidoglikana in ker so negativno nabite, prispevajo k negativnemu naboju celične stene Gram-pozitivnih bakterij. Vloga teh molekul še ni popolnoma poznana, verjetno pa so pomembne za vzdrževanje strukture celične stene. Periplazemski prostor je pri Gram-pozitivnih bakterijah majhen in leži med celično membrano in peptidoglikanom. Periplazma vsebuje malo proteinov, kar je verjetno posledica prepustnosti celične stene. Encime, ki jih izločajo Gram-pozitivne bakterije, imenujemo eksoencimi in so običajno zadolženi za razgradnjo polimernih hranil, ki bi bila drugače prevelika za transport skozi celično membrano (1, 12).

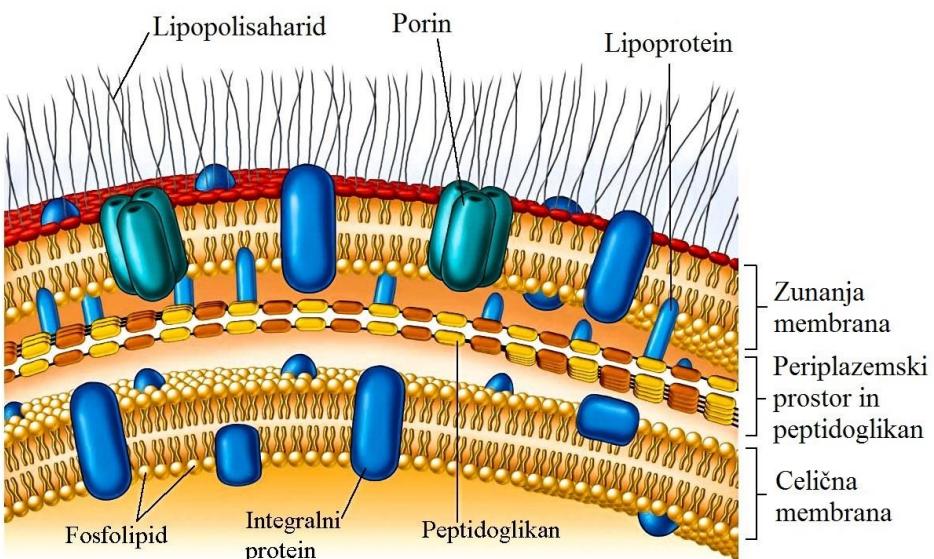


Slika 4: Celična ovojnica Gram-pozitivnih bakterij (povzeto po 1)

1.2.3. Gram-negativne bakterije

Za razliko od Gram-pozitivnih bakterij je celična stena Gram-negativnih bakterij tanjša in bolj kompleksna. Peptidoglikan predstavlja samo 10 do 20 % celične stene (11). Celična stena Gram-negativnih bakterij ima 2 do 7 nm debelo plast peptidoglikana, ki je pokrita s 7 do 8 nm debelo zunanjim membranom (Slika 5). Zaradi tanjše plasti peptidoglikana so celične stene Gram-negativnih bakterij bolj občutljive na osmotski tlak kot celične stene Gram-pozitivnih bakterij, ki vsebujejo debelo plast peptidoglikana. Periplazemska prostora z obeh strani obdaja tanko plast peptidoglikana. Njegova debelina sega od 1 nm pa vse do 71 nm. Novejše študije so pokazale, da lahko predstavlja od 20 do 40 % celotnega celičnega volumna. Nekateri encimi periplazemskega prostora so, podobno kot pri Gram-pozitivnih bakterijah, zadolženi za lažjo absorpcijo hranil, drugi pa sodelujejo pri izgradnji peptidoglikana in odstranjevanju toksičnih snovi, ki bi lahko škodovale bakteriji. Na zunani strani peptidoglikana leži zunanjaja membrana, ki je s celico povezana na dva načina. En način je preko Braunovih lipoproteinov, ki povezujejo zunanjajo membrano in peptidoglikan tako močno, da ju lahko izoliramo kot eno strukturo. Na spodnji strani so Braunovi lipoproteini kovalentno povezani s peptidoglikanom, na zgornji pa s svojim hidrofobnim delom zasidrani v zunanjji membrani. Drugi način povezave je preko številnih adhezivnih mest, ki povezujejo zunanjjo in celično membrano. Verjetno najbolj nenavadna struktura zunanjje membrane so

lipopolisaharidi. Sestavljeni so iz lipida A, polisaharidnega jedra in O stranske verige. Lipid A vsebuje dva derivata glukozamina, vsakega s po tremi maščobnimi kislinami, ki celoten lipopolisaharid zasidrajo v zunanjo membrano. Lipid A je pomemben gradnik zunanje membrane in pripomore k njeni stabilizaciji. Polisaharidno jedro, ki se dviguje s površine membrane, je povezano z lipidom A in je sestavljeno iz okrog 10 sladkorjev neobičajne strukture. O stranska veriga je pripeta na polisaharidno jedro in se razlikuje glede na vrsto bakterij, sestavljena pa je iz več neobičajnih sladkorjev. Imenujemo jo tudi O antigen, saj izzove imunski odgovor in sintezo protiteles v okuženem organizmu. Lipopolisaharidi zaradi nabitih sladkorjev in fosfatnih skupin v svoji strukturi prispevajo k negativnemu naboju zunanje membrane (1, 12).

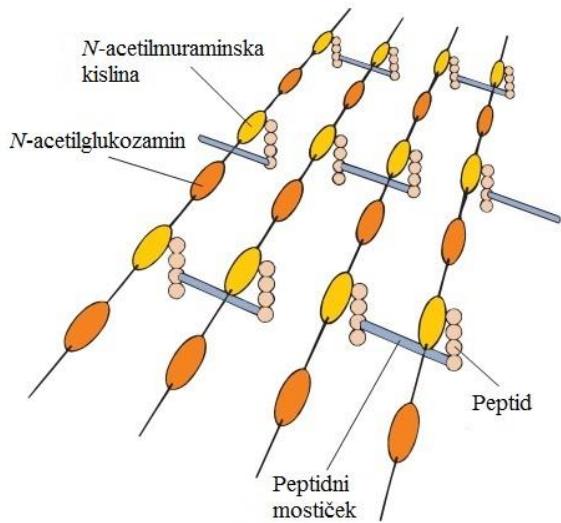


Slika 5: Celična ovojnica Gram-negativnih bakterij (povzeto po 1)

1.3. PEPTIDOGLIKAN

Peptidoglikan, ki obdaja bakterijsko celico, ohranja njeno obliko in celovitost, hkrati pa preprečuje razpad celic zaradi osmotskega tlaka (13, 14). Eden največjih izzivov sodobnih raziskav v zdravstvu je neprekinjen razvoj novih antibiotikov, ki ovirajo bistvene procese za bakterijsko preživetje. In prav biosinteza peptidoglikana ponuja bogat vir tarč, ki so ključnega pomena za uspešno protibakterijsko terapijo (15, 16). Peptidoglikana in genov za njegovo sintezo nimajo bakterije iz rodu *Mycoplasma*, debla *Planctomycetes* in *Orientia tsutsugamushi*, ki povzroča podvrsto tifusa. Peptidoglikana prav tako še niso opazili pri bakterijah iz rodu *Chlamydia*, kljub temu da imajo gene za njegovo biosintezo (17).

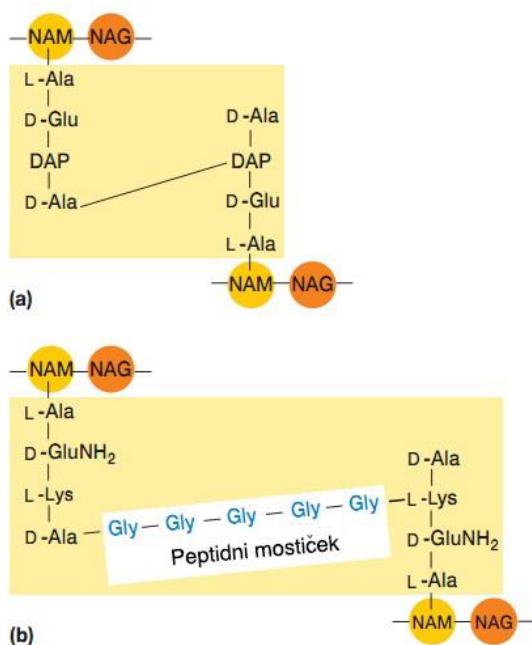
1.3.1. Zgradba peptidoglikana



Slika 6: Struktura peptidoglikana (povzeto po 1)

Glavna strukturalna značilnost peptidoglikana so linearne glikanske verige, ki so prečno povezane s kratkimi peptidi (Slika 6). Glikanske verige so zgrajene iz izmenjujočih se ostankov N-acetilglukozamina (GlcNAc) in N-acetilmuraminske kisline (MurNAc), ki so povezani z β -1,4 glikozidno vezjo. Na D-laktilno skupino vsake N-acetilmuraminske kisline je v večini primerov pripet pentapeptid L-Ala-D-Glu-meo-DAP-D-Ala-D-Ala ali L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala, čeprav so možne določene razlike glede na vrsto bakterije (17). Prisotnost D-aminokislin v peptidoglikanu ščiti pred razgradnjo s peptidazami, ki prepoznajo samo L-izomere aminokislin (1). Največja razlika je na mestu 3, kjer pri večini Gram-negativnih bakterij najdemo mezo-diaminopimelinsko kislino (mezo-DAP), pri večini Gram-pozitivnih bakterij pa L-Lys (17). Za učvrstitev strukture pa so nujne še prečne povezave glikanskih verig, ki nastanejo med peptidi (1). Tudi tukaj so možne različne variacije, na podlagi katerih ločimo dve glavni skupini prečnih povezav. Prva skupina so 3-4 povezave, ki so pogostejše, druga pa 2-4 povezave. Pri prvi skupini prečnih povezav se vzpostavi vez med karboksilno skupino D-Ala na mestu 4 in amino skupino diaminokisline na mestu 3. Pri večini Gram-negativnih bakterij je ta povezava direktna, pri večini Gram-pozitivnih bakterij pa sta diaminokislina in D-Ala povezana preko

Peptidnega mostička.



Slika 7: Primerjava strukture peptidoglikana Gram-negativne (a) in Gram-pozitivne (b) bakterije (povzeto po 1)
(a) *E. coli* (b) *S. aureus*

peptidnega mostička sestavljenega iz petih glicinov (Slika 7). Redkejše 2-4 povezave najdemo pri bakterijah iz rodu *Corynebacterium*. V tem primeru se povežeta α -karboksilna skupina D-Glu na mestu 2 in karboksilna skupina D-Ala na mestu 4. Za to povezavo je nujen peptidni mostiček, ki mora vsebovati diaminokislino (17, 18).

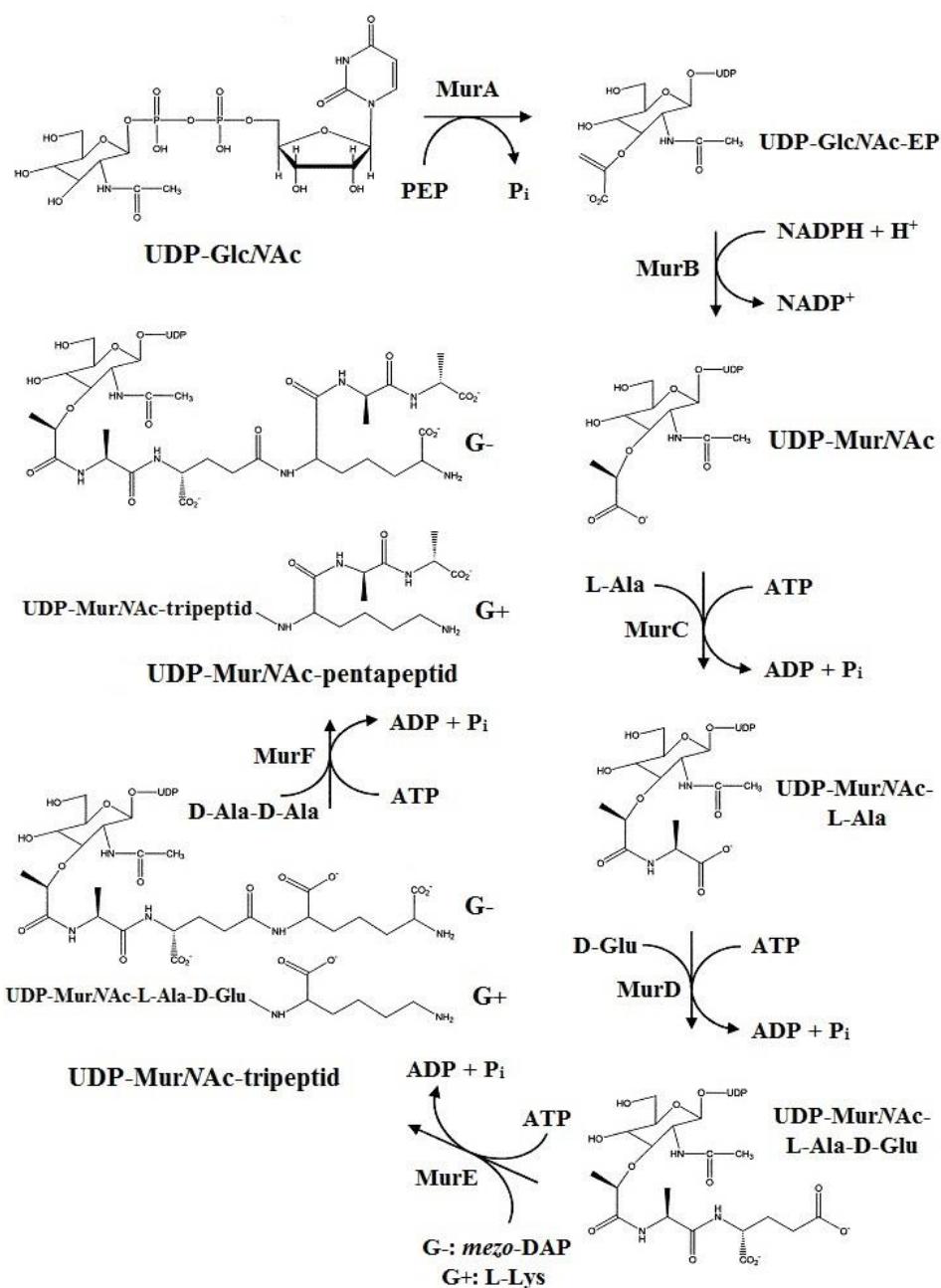
1.3.2. Biosinteza peptidoglikana

Biosinteza peptidoglikana je kompleksen proces, ki poteka v citoplazmi ter na notranji in zunanji strani celične membrane. V citoplazmi se sintetizirajo nukleotidni prekurzorji in UDP-MurNAc-pentapeptid, na notranji strani celične membrane poteka sinteza monomernih enot GlcNAc-MurNAc-pentapeptid povezanih z undekaprenil-fosfatom, ki se na zunanji strani membrane polimerizirajo in prečno povežejo. Reakcije v citoplazmi lahko razdelimo v 4 skupine: sinteza UDP-GlcNAc iz fruktoza-6-fosfata, sinteza UDP-MurNAc iz UDP-GlcNAc, sinteza pentapeptida in tvorba UDP-MurNAc-pentapeptida ter stranske reakcije v katerih nastaneta D-Glu in dipeptid D-Ala-D-Ala (19).

Biosinteza UDP-GlcNAc iz fruktoza-6-fosfata poteka s pomočjo treh encimov. Najprej nastane glukozamin-6-fosfat, nato glukozamin-1-fosfat, ki se acetilira na dušiku, na koncu pa UDP zamenja fosfatno skupino. Biosinteza UDP-GlcNAc poteka tudi v evkariontskih celicah, vendar na drugačen način, zato tudi ta stopnja biosinteze peptidoglikana ponuja možne tarče za dobro selektivno toksične protibakterijske učinkovine (19).

Iz UDP-GlcNAc s pomočjo dveh encimov nastane UDP-MurNAc. Prvo stopnjo katalizira MurA, ki prenese enolpiruvatno skupino iz fosfoenolpiruvata (PEP) na 3'-hidroksi skupino UDP-GlcNAc, pri čemer se sprosti anorganski fosfat. Nastali produkt UDP-GlcNAc-EP se nato reducira s pomočjo MurB in NADPH. Iz enolpiruvatne skupine nastane laktilni eter, produkt pa je UDP-MurNAc (18-22).

Stopenjsko sintezo pentapeptida katalizirajo štirje encimi, ki jih skupno imenujemo Mur ligaze (Slika 8). Na karboksilno skupino laktilnega etra MurC pripne L-Ala, MurD pa D-Glu. Diaminokislino, ki je lahko *mezo*-DAP ali L-Lys pripne MurE, dipeptid D-Ala-D-Ala pa pripne MurF (19).



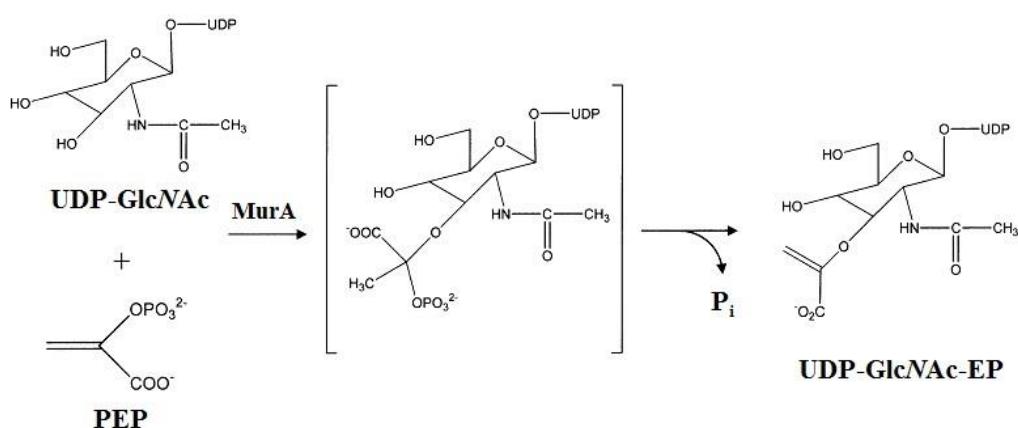
Slika 8: Biosinteza UDP-MurNAc-pentapeptida iz UDP-GlcNAc (povzeto po 15)

Naslednji korak je vezava sintetiziranega UDP-MurNAc-pentapeptida na lipid, ki jo katalizira membranski encim MraY. MraY translokaza prenese fosfo-MurNAc-pentapeptid na lipid undekaprenil-fosfat, nastali produkt pa imenujemo lipid I. MurG katalizira adicijo GlcNAc na lipid I in tako nastane lipid II (23). Premestitev intermedijata lipid-disaharid-pentapeptid preko membrane v zunajcelični prostor pri Gram-pozitivnih bakterijah ali v periplazemski prostor pri Gram-negativnih bakterijah katalizira encim flipaza. Mehanizem premestitve in flipaza sta še slabo raziskana (5).

Na zunanji strani celične membrane poteče polimerizacija intermedijatov lipid-disaharid-pentapeptid v glikanske verige, ki jo katalizirajo glikoziltransferaze. Prečno povezovanje glikanskih verig, ki je zadnja stopnja v biosintezi peptidoglikana, pa katalizirajo transpeptidaze (5, 24).

1.4. MurA

Encim MurA (*N*-acetilglukozamin enolpiruvil transferaza) katalizira prvo stopnjo biosinteze gradnikov peptidoglikana, torej prenos enolpiruvatne skupine iz fosfoenolpiruvata na 3'-hidroksi skupino UDP-GlcNAc (18-22, 25-28) (Slika 9).



Slika 9: Reakcija UDP-GlcNAc in PEP z MurA (povzeto po 15)

Reakcija z MurA je redek biokemijski proces, saj je edini preostali znan prenos enolpiruvatne skupine iz fosfoenolpiruvata v poti šikimske kisline, ki ga katalizira encim 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat sintaza (19, 29). Kristalne strukture encimov MurA iz *E. coli*, *E. cloacae* in *H. influenzae* so si zelo podobne. MurA je sestavljen iz dveh domen, na stiku katerih se nahaja aktivno mesto. Aktivno mesto je delno pokrito z regijo Pro112-Pro121, ki sestavlja upogljivo zanko. Pri reakciji encima MurA s svojima substratoma UDP-GlcNAc in PEP pride do velikih konformacijskih sprememb. Na odprto konformacijo encima se lahko veže le UDP-GlcNAc. Po vezavi UDP-GlcNAc encim preide v zaprto konformacijo, na katero se lahko veže še PEP. Pri spremembi iz odprte v zaprto konformacijo se upogljuva zanka iz 12 aminokislinskih ostankov upogne tako, da pride stranska veriga Cys115 v bližino vezavnega mesta za PEP (18, 19, 29-32).

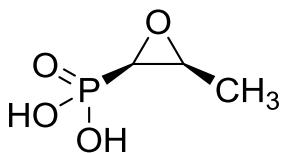
MurA je bistven encim za celično rast, saj je delecija gena za MurA iz genoma *E. coli* ali *S. pneumoniae* letalna za bakterijo (18, 22, 30, 33). Nasprotno so Mur encimi zelo pomembni in

nespremenjeni med različnimi vrstami bakterij. Zaradi tega pričakujemo, da bi potencialni Mur zaviralec deloval baktericidno in širokospektralno. Prav to pa upravičuje izbiro in pomembnost teh encimov kot tarč za iskanje novih protibakterijskih učinkovin (15).

1.4.1. Fosfomicin

Veliko antibiotikov v uporabi, predvsem β -laktami in glikopeptidi, zavira zadnje stopnje biosinteze peptidoglikana. Začetne stopnje biosinteze citoplazemskih prekurzorjev pa so kot tarče protibakterijskih učinkovin slabo izkoriščene, saj nobena do sedaj znana učinkovina, razen fosfomicina, ne zavira encimov na tej stopnji (14, 15, 22). Fosfomicin je antibiotik, ki kovalentno in irreverzibilno zavre MurA (Slika 10). Fosfomicin se veže na cisteinski ostanek Cys115 in ga irreverzibilno alkilira. Cys115 je bistvenega pomena za katalitsko aktivnost encima (26, 34). MurA iz *E. coli*, ki vsebuje C115D mutacijo, je encimsko aktiven, vendar odporen na inhibicijo s fosfomicinom (19, 32). Nasprotno pa MurA iz *H. influenzae*, ki ima Cys117 zamenjan z alaninom ali serinom, popolnoma izgubi svojo katalitsko aktivnost (30). Bakterije, kot so *Chlamydia trachomatis*, *Borrelia burgdorferi*, *Vibrio fischeri* in *Mycobacterium tuberculosis*, so naravno odporne na fosfomicin, saj imajo Cys115 v MurA zamenjan z asparaginsko kislino (18, 19, 35). Zanimivo je, da imajo Gram-negativne bakterije eno, Gram-pozitivne pa dve kopiji gena za MurA, kar je najverjetnejše posledica podvojevanja. Encima MurA1 in MurA2 iz *S. pneumoniae* imata podobno katalitsko aktivnost in sta oba občutljiva na fosfomicin (19).

Žal se z visoko frekvenco pojavlja odpornost tudi na fosfomicin. Fosfomicin vstopa v bakterijsko celico z aktivnim transportom preko transportnih proteinov za L- α -glicerofosfat in glukoza-6-fosfat (15, 27). Odpornost na fosfomicin se lahko izrazi kot zmanjšan privzem fosfomicina v bakterijsko celico, sprememba vezavnega mesta na MurA ali pa se fosfomicin razgradi z encimsko razgradnjo (36).



Slika 10: Struktura fosfomicina

2. NAMEN DELA

Namen te diplomske naloge je vzpostavitev eksperimentalnega *in vitro* testnega sistema, ki bo omogočal testiranje čim večjega števila spojin na encimu MurA v čim krajšem času. Zavedamo se, da učinkovitosti rešetanja visoke zmogljivosti ne bomo dosegli, vendar želimo, da bo naš sistem hiter, enostaven, ponovljiv, cenovno ugoden in primeren za predviden obseg testiranj. Sistem nam mora omogočati opredelitev osnovnih lastnosti encima, kot so njegova aktivnost, odvisnost aktivnosti encima od koncentracije UDP-GlcNAc in PEP ter Michaelis-Mentenove konstante (K_M).

Po vzpostavitvi sistema bomo testirali večje število spojin na encimu MurA in ugotovili, ali katera zavira njegovo katalitsko aktivnost. Spojine bomo vzeli iz urejene knjižnice spojin Fakultete za farmacijo, ki vsebuje preko 1600 strukturno različnih spojin.

Spojinam, ki bodo uspešno zavrle katalitsko aktivnost MurA in pri katerih bo rezidualna aktivnost (RA) pod 75 %, bomo, v kolikor jih bomo imeli na razpolago nerazredčene, s pomočjo Hillove enačbe določili še koncentracije, pri katerih zavrejo 50 % aktivnosti encima (IC_{50}).

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali dimetilsulfoksid (DMSO) proizvajalca Fluka. Substrata UDP-GlcNAc in PEP smo uporabili od proizvajalca Sigma-Aldrich. Za določanje katalitske aktivnosti encima smo uporabili reagent BIOMOL® Green proizvajalca Enzo Life Sciences. 1 M in 50 mM HEPES pufer (pH = 7,8) smo pripravili sami iz trdnih zrnčic proizvajalca Sigma-Aldrich. Pufru smo dodali še antioksidant ditiotreitol (DTT) proizvajalca Fluka. Pri delu smo uporabljali laboratorijski pribor, kot so steklene čaše, erlenmajerice, epruvete in kapalke, ter plastične mikrocentrifugirke, centrifugirke in mikropipete. Za reakcijo z encimom smo uporabili standardne brezbarvne mikrotitrski plošče s 96 luknjicami in ravnim dnem. Za določanje količine sproščenega fosfata smo uporabili spektrofotometer BioTek Synergy H4 hybrid reader.

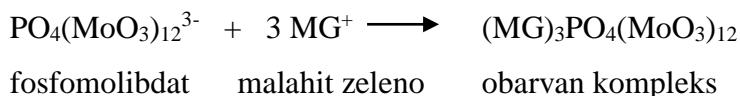
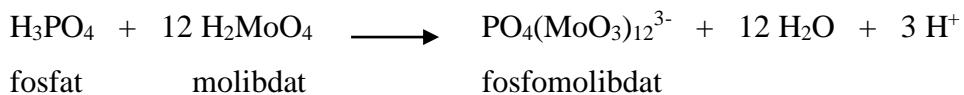
3.2. KNJIŽNICA SPOJIN FAKULTETE ZA FARMACIJO

Spojine, ki smo jih testirali, smo vzeli iz knjižnice spojin Fakultete za farmacijo. Knjižnica vsebuje spojine od različnih projektov, v katerih je sodelovala Fakulteta za farmacijo v preteklih letih. Nekatere so bile kupljene za potrebe določenega projekta, večino pa so sintetizirali raziskovalci in diplomanti na fakulteti. Zaradi tega vsebuje knjižnica struktorno zelo različne spojine, ki so bile kupljene ali sintetizirane za različne tarče. Trenutno je v knjižnici preko 1600 spojin, vendar končno število iz dneva v dan narašča.

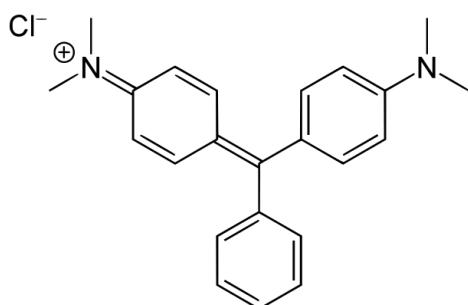
Spojine so raztopljene v DMSO in velika večina jih je v 1 mM koncentraciji. Izjeme so samo spojine, ki so bile že predhodno razredčene na nižje koncentracije, vendar je teh zelo malo. Spojine so zamrznjene v kriovialah in zložene na ploščah, ki sprejmejo 96 kriovial. Vsaka krioviala ima svojo QR kodo in oznako, ki je sestavljena iz številke plošče in pozicije na plošči. Oznaka krioviale nam tako pove številko plošče in točen položaj, kje na plošči se ta krioviala nahaja. S pomočjo QR kode ali oznake pa lahko določeno kriovialo poiščemo v Excelovi tabeli, kjer so shranjeni še podatki o projektu, za katerega je bila spojina namenjena, koncentraciji, raziskovalcu, ki je to spojino uporabljal ali sintetiziral, in strukturi spojine.

3.3. METODE

Pri reakciji UDP-GlcNAc in PEP z MurA se sprosti fosfat, preko katerega lahko posredno določimo katalitsko aktivnost encima. Sproščeni fosfat smo določili z dodatkom reagenta BIOMOL® Green. BIOMOL® Green vsebuje barvilo malahit zeleno, ki v prisotnosti molibdata s sproščenim fosfatom tvori obarvan kompleks, katerega določimo spektrofotometrično pri 650 nm (37) (Slika 11). Množina sproščenega fosfata je sorazmerna katalitski aktivnosti encima, pri čemer je pomembno, da ostane množina sproščenega fosfata znotraj linearEGA območja umeritvene krivulje za fosfat. Če določena spojina zavre katalitsko aktivnost encima se posledično sprosti manj fosfata. Stopnjo inhibicije encima izrazimo z rezidualno aktivnostjo, ki je razmerje med aktivnostjo encima v prisotnosti testirane spojine in aktivnostjo encima brez prisotnosti testirane spojine.



BIOMOL® Green zagotavlja enostavno in priročno metodo za kolorimetrično določitev množine fosfata. Za razliko od drugih reagentov, ki delujejo na principu molibdata in malahit zelenega, ni potrebno vsak dan sproti pripravljati različnih raztopin in reagentov. BIOMOL® Green je stabilen več kot 6 mesecev pri 4 °C in se enostavno, kar pri sobni temperaturi, doda encimski reakciji, pri kateri se je sprostil fosfat, ki ga želimo določiti (38).



Slika 11: Struktura malahit zelenega

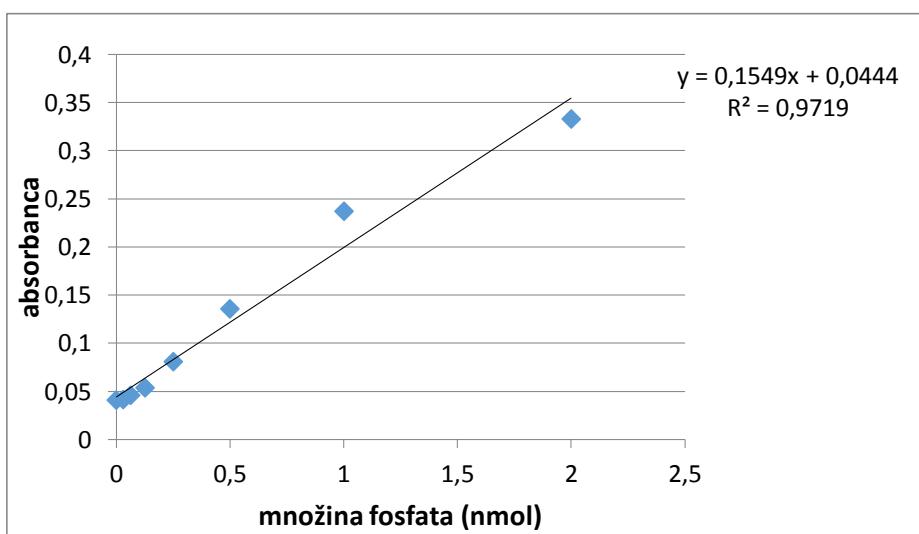
4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1. UMERITVENA KRIVULJA ZA FOSFAT

Umeritveno krivuljo za fosfat smo naredili po navodilih priloženih reagentu BIOMOL® Green. Pripravili smo 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 in 0,625 μM raztopine fosfata v 50 mM HEPES pufru. Delali smo v dveh paralelah, kar pomeni, da smo v prvi in drugi stolpec vsake vrstice na mikrotitrski plošči odmerili po 50 μL raztopine fosfata padajočih koncentracij, kar ustreza množinam podanim v preglednici I. Dodali smo reagent BIOMOL® Green ($V = 100 \mu\text{L}$), inkubirali 20 minut na sobni temperaturi in izmerili absorbanco pri 650 nm (Preglednica I). Iz povprečja absorbanc in množine fosfata smo narisali umeritveno krivuljo (Slika 12).

Preglednica I: Koncentracije fosfata in njihove absorbance.

Koncentracija fosfata (μM)	Množina fosfata (nmol)	A1	A2	Povprečje absorbanc
40	2	0,338	0,328	0,333
20	1	0,24	0,235	0,2375
10	0,5	0,135	0,137	0,136
5	0,25	0,081	0,081	0,081
2,5	0,125	0,053	0,055	0,054
1,25	0,063	0,048	0,044	0,046
0,625	0,031	0,042	0,042	0,042
0 (slepa)	0	0,041	0,041	0,041



Slika 12: Umeritvena krivulja za fosfat. Ker je volumen konstanten ($V = 50 \mu\text{L}$), je množina primerljiva s koncentracijo.

4.2. DOLOČANJE K_M

4.2.1. Določanje K_M za UDP-GlcNAc

Michaelis-Mentenova konstanta oz. K_M je tista koncentracija substrata, pri kateri je hitrost encimske reakcije enaka polovici maksimalne hitrosti. K_M smo določali v treh paralelah. Od povprečja treh absorbanc reakcij z encimom (vzorec) smo odšteli povprečje treh absorbanc substratov in reagentov brez encima (ozadje), da smo dobili razliko, ki je posledica nastanka fosfata med reakcijo. Raztopino encima ($\gamma = 0,6 \text{ mg/mL}$) smo razredčili s 50 mM HEPES pufrom 1/30, da smo dobili prizerno absorbanco, ki je bila v linearinem območju umeritvene krivulje za fosfat. V vsako luknjico na mikrotitrski plošči smo odmerili 33 μL raztopine substratov ustreznih koncentracij in 17 μL čistega pufra ali pufra z encimom. Koncentracija PEP je bila konstantna, v vseh primerih 100 μM . Reakcijo smo inkubirali 15 minut pri 37 °C, dodali BIOMOL® Green (V = 100 μL) in po petih minutah izmerili absorbanco pri 650 nm (Preglednica II).

Preglednica II: Določanje K_M za UDP-GlcNAc. Koncentracija PEP je bila konstantna (100 μM). Absorbance A1-A3 niso vsebovale encima in predstavljajo ozadje. Absorbance A4-A6 so vsebovale encim in predstavljajo vzorec. Razlika predstavlja od povprečja absorbanc vzorca odšteto povprečje absorbanc ozadja.

PEP = 100 μM	A1	A2	A3	Povprečje absorbanc	A4	A5	A6	Povprečje absorbanc	Razlika
UDP- GlcNAc (μM)									
5	0,044	0,043	0,043	0,043	0,059	0,063	0,064	0,062	0,019
10	0,046	0,045	0,045	0,045	0,091	0,088	0,085	0,088	0,043
20	0,043	0,042	0,046	0,044	0,121	0,146	0,135	0,134	0,090
30	0,046	0,043	0,043	0,044	0,160	0,150	0,142	0,151	0,107
40	0,043	0,045	0,043	0,044	0,184	0,173	0,166	0,174	0,131
60	0,041	0,045	0,044	0,043	0,215	0,207	0,189	0,204	0,160
80	0,045	0,044	0,045	0,045	0,245	0,234	0,220	0,233	0,188
100	0,043	0,043	0,043	0,043	0,256	0,229	0,230	0,238	0,195

Iz začetne koncentracije encima ($\gamma = 0,6 \text{ mg/mL}$), upoštevanja redčitev in molske mase encima ($M = 45000 \text{ Da}$) smo izračunali množino encima v eni luknjici. Iz absorbance, ki je bila posledica sprostitve fosfata, in umeritvene krivulje za fosfat smo po enačbi 1 izračunali množino sproščenega fosfata pri encimski reakciji. Iz množine sproščenega fosfata in množine encima v luknjici smo po enačbi 2 izračunali hitrost reakcije v $\mu\text{molih sproščenega fosfata na minuto na mol encima}$ (Preglednica III).

Koncentracija encima v luknjici: $\gamma = 0,6 \frac{mg}{mL} \times \frac{1}{30} \times \frac{17}{50} = 0,0068 \frac{mg}{mL}$

Masa encima v luknjici: $m = \gamma \times V = 0,0068 \frac{mg}{mL} \times 0,05 mL = 0,00034 mg$

Množina encima v luknjici: $n = \frac{m}{M} = \frac{0,00034 mg}{45\,000 Da} = 7,556 \times 10^{-12} mol$

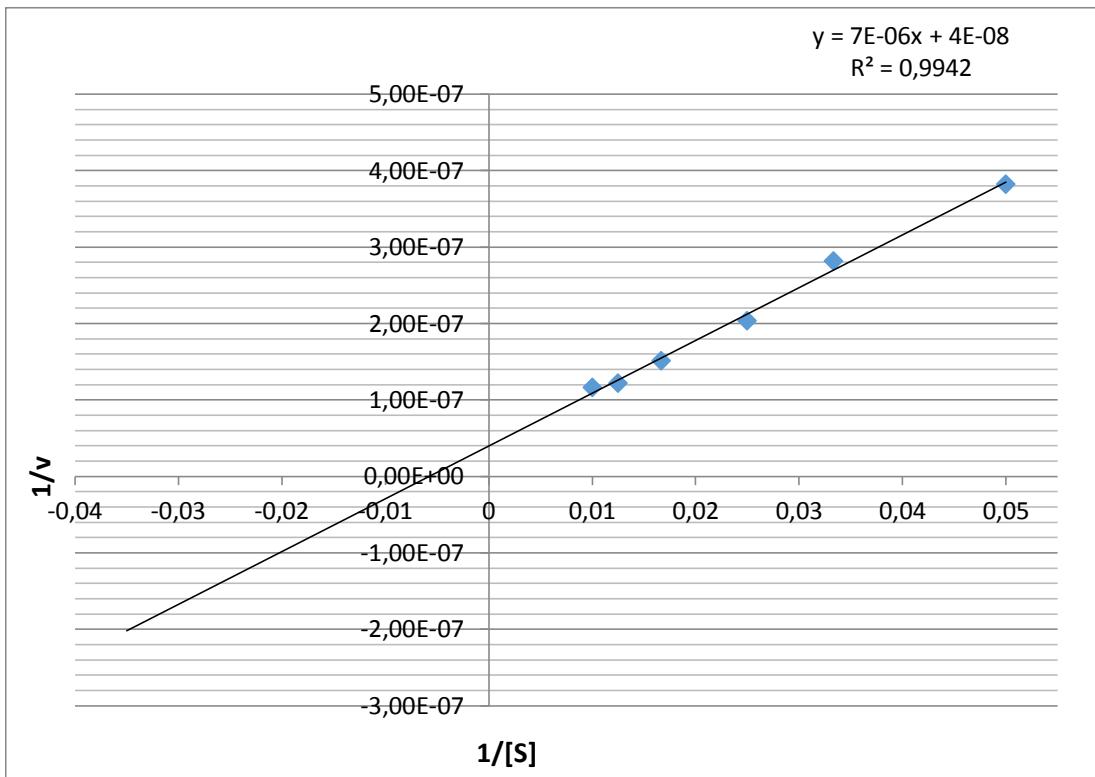
Enačba 1: $n_{(Pi)} = \frac{(A - 0,0444)}{0,1549 \times 1000} (\mu mol)$

Enačba 2: $v = \frac{n_{(Pi)}}{t \times n} (\frac{\mu mol}{min \times mol})$

Preglednica III: Množina sproščenega fosfata in hitrost reakcije pri različnih koncentracijah UDP-GlcNAc ter obratni vrednosti koncentracije substrata in hitrosti reakcije.

UDP-GlcNAc (μM)	$n_{(Pi)}$ (μmol)	v ($\mu mol / min \times mol$)	$1/[S]$ ($1/\mu M$)	$1/v$ ($min \times mol / \mu mol$)
5	-0,0001661	-1465755	0,200	-6,822E-07
10	-0,0000112	-98730	0,100	-1,013E-05
20	0,0002965	2616335	0,050	3,822E-07
30	0,0004020	3546672	0,033	2,820E-07
40	0,0005569	4913697	0,025	2,035E-07
60	0,0007484	6603493	0,017	1,514E-07
80	0,0009292	8198356	0,013	1,220E-07
100	0,0009744	8597071	0,010	1,163E-07

K_M in v_{max} smo izračunali po Lineweaver-Burkovi enačbi (Enačba 3). Izračunali smo obratne vrednosti koncentracij UDP-GlcNAc in hitrosti reakcije ter narisali premico (Slika 13).



Slika 13: Lineweaver-Burkova diagrama za UDP-GlcNAc. Naklon premice je $k = 6,903 \times 10^{-6} \frac{\text{min} \times \text{mol}}{\text{L}}$, konstantni člen pa $n = 3,987 \times 10^{-8} \frac{\text{min} \times \text{mol}}{\mu\text{mol}}$.

Iz Enačbe 3 sledi, da je naklon premice enak količniku K_M/v_{max} , konstantni člen pa predstavlja vrednost $1/v_{max}$. To smo uporabili za izračun K_M in v_{max} .

$$\text{Enačba 3: } \frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}}$$

$$\text{Izračun } v_{max}: n = \frac{1}{v_{max}} \rightarrow v_{max} = \frac{1}{n} = \frac{1}{3,987 \times 10^{-8} \frac{\text{min} \times \text{mol}}{\mu\text{mol}}} = 25\ 081\ 515 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \times \text{mol}}$$

$$\text{Izračun } K_M: k = \frac{K_M}{v_{max}} \rightarrow K_M = k \times v_{max}$$

$$K_M = k \times v_{max} = 6,903 \times 10^{-6} \frac{\text{min} \times \text{mol}}{\text{L}} \times 25\ 081\ 515 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \times \text{mol}} = 173 \mu\text{M}$$

4.2.2. Določanje K_M za PEP

K_M za PEP smo določili na podoben način. Delali smo v treh paralelah, redčitev encima je bila 1/30. Čas inkubacije je ostal enak ($t = 15$ min). Tokrat smo spremajali koncentracijo PEP, koncentracija UDP-GlcNAc pa je bila konstantna, in sicer 250 μM (Preglednica IV).

Preglednica IV: Določanje K_M za PEP. Koncentracija UDP-GlcNAc je bila konstantna (250 μM). Absorbance A1-A3 niso vsebovale encima in predstavljajo ozadje. Absorbance A4-A6 so vsebovale encim in predstavljajo vzorec. Razlika predstavlja od povprečja absorbanc vzorca odšteto povprečje absorbanc ozadja.

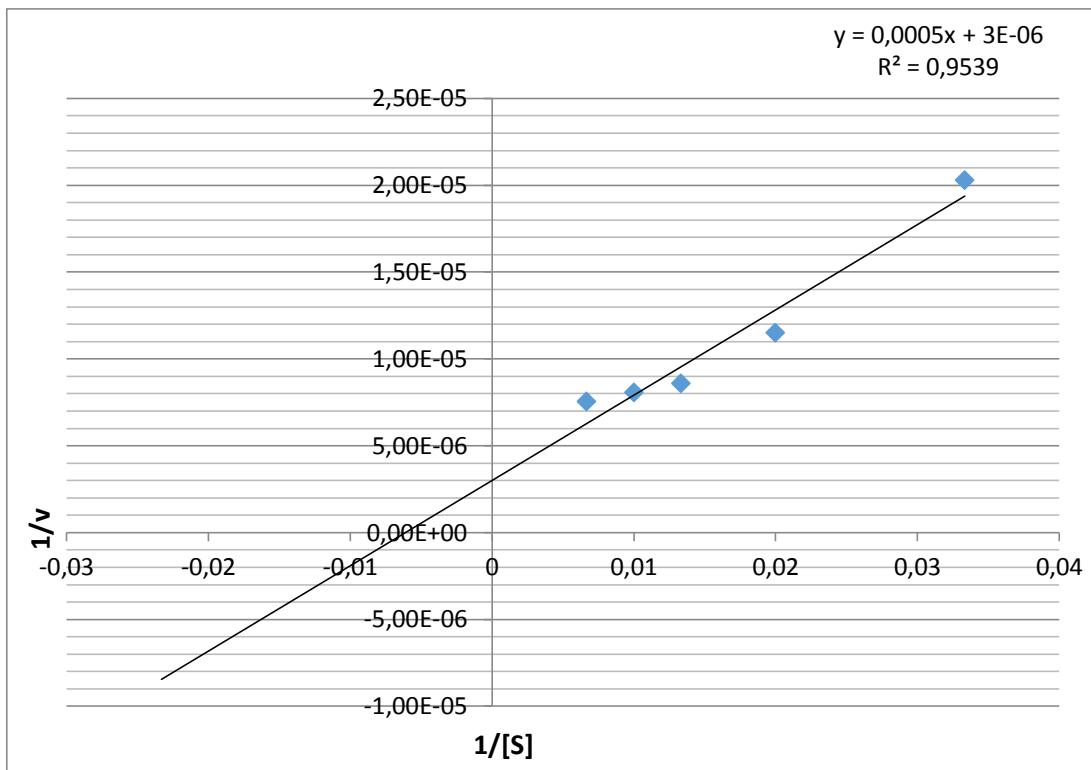
UDP-GlcNAc = 250 μM	A1	A2	A3	Povprečje absorbanc	A4	A5	A6	Povprečje absorbanc	Razlika
10	0,038	0,037	0,037	0,037	0,063	0,060	0,064	0,062	0,025
20	0,039	0,038	0,038	0,038	0,103	0,097	0,095	0,098	0,060
30	0,036	0,036	0,039	0,037	0,141	0,123	0,136	0,133	0,096
50	0,041	0,037	0,036	0,038	0,190	0,168	0,164	0,174	0,136
75	0,037	0,039	0,037	0,038	0,213	0,195	0,206	0,205	0,167
100	0,036	0,039	0,039	0,038	0,228	0,194	0,217	0,213	0,175
150	0,040	0,039	0,038	0,039	0,235	0,214	0,219	0,223	0,184
200	0,039	0,038	0,039	0,039	0,226	0,206	0,223	0,218	0,180

Enako kot pri določanju K_M za UDP-GlcNAc smo po enačbi 1 izračunali množino sproščenega fosfata in po enačbi 2 hitrost reakcije (Preglednica V).

Preglednica V: Množina sproščenega fosfata in hitrost reakcije pri različnih koncentracijah PEP ter obratni vrednosti koncentracije substrata in hitrosti reakcije.

PEP (μM)	$n(\text{Pi})$ (μmol)	v ($\mu\text{mol} / \text{min} \times \text{mol}$)	$1/[S]$ (1/ μM)	$1/v$ (min \times mol / μmol)
10	-0,0001252	-18417	0,100	-5,430E-05
20	0,0001007	14809	0,050	6,752E-05
30	0,0003353	49302	0,033	2,028E-05
50	0,0005913	86958	0,020	1,150E-05
75	0,0007915	116387	0,013	8,592E-06
100	0,0008431	123982	0,010	8,066E-06
150	0,0008991	132209	0,007	7,564E-06
200	0,0008733	128412	0,005	7,787E-06

Iz obratnih vrednosti koncentracij PEP in hitrosti reakcije smo narisali premico ter iz naklona k in konstantnega člena n po Enačbi 3 izračunali K_M in v_{max} (Slika 14).



Slika 14: Lineweaver-Burkova diagram za PEP. Naklon premice je $k = 4,913 \times$

$$10^{-4} \frac{\text{min} \times \text{mol}}{\text{L}}, \text{konstantni člen pa } n = 3,013 \times 10^{-6} \frac{\text{min} \times \text{mol}}{\mu\text{mol}}.$$

Izračun v_{max} : $n = \frac{1}{v_{max}} \rightarrow v_{max} = \frac{1}{n} = \frac{1}{3,013 \times 10^{-6} \frac{\text{min} \times \text{mol}}{\mu\text{mol}}} = 331\,895 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \times \text{mol}}$

Izračun K_M : $k = \frac{K_M}{v_{max}} \rightarrow K_M = k \times v_{max}$

$$K_M = k \times v_{max} = 4,913 \times 10^{-4} \frac{\text{min} \times \text{mol}}{\text{L}} \times 331\,895 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \times \text{mol}} = 163 \mu\text{M}$$

4.3. VPLIV DMSO IN TRITONA X114 NA AKTIVNOST ENCIMA

Zanimalo nas je, ali prisotnost DMSO v reakcijski zmesi vpliva na katalitsko aktivnost encima. To smo preizkusili tako, da smo prvič na mikrotitrsko ploščo odmerili štiri paralele po 2,5 µL DMSO, drugič pa štiri paralele po 2,5 µL bidestilirane vode. V obeh primerih smo dodali 32,5 µL substrata in 15 µL pufra ali pufra z encimom. Encim smo s 50 mM HEPES pufrom razredčili 1/30. Delali smo v dveh paralelah, vendar se je večino časa pojavljala napaka pri absorbancah v zadnjem stolpcu na mikrotitrskih ploščah. Za teste, ki smo jih izvajali v zadnjem stolpcu imamo zato samo en rezultat za absorbanco z encimom (Preglednica VI).

Preglednica VI: Vpliv DMSO na katalitsko aktivnost encima.

	A1	A2	Povprečje absorbanc	A3	Razlika
DMSO	0,054	0,057	0,056	0,276	0,221
Voda	0,048	0,047	0,048	0,263	0,216

Preizkusili smo tudi vpliv Tritona X114 na katalitsko aktivnost encima. Na mikrotitrsko ploščo smo odmerili dvakrat štiri paralele po 2,5 µL DMSO in dodali enkrat 32,5 µL raztopine substratov, drugič pa enako količino raztopine substratov z dodanim Tritonom X114. Končna koncentracija Tritona X114 v testu je bila 0,005 %. V obeh primerih smo dodali 15 µL pufra ali pufra z encimom. Encim smo s 50 mM HEPES pufrom razredčili 1/30. Inkubirali smo 15 minut, dodali BIOMOL® Green (V = 100 µL) in po petih minutah izmerili absorbanco pri 650 nm (Preglednica VII).

Preglednica VII: Vpliv Tritona X114 na katalitsko aktivnost encima.

	A1	A2	Povprečje absorbanc	A3	Razlika
Substrat	0,049	0,049	0,049	0,160	0,111
Substrat + Triton X114	0,049	0,048	0,049	0,181	0,133

4.4. TESTIRANJE SPOJIN

Najprej smo v vsako luknjico v prvi vrstici mikrotitrsko plošče (slepa) odmerili 2,5 µL DMSO. Spojine iz knjižnice smo odmrznili, nato pa odmerili štiri paralele po 2,5 µL vsake spojine na mikrotitrsko ploščo, dokler ta ni bila polna. V prvi dve paraleli (ozadje) smo dodali 32,5 µL raztopine substratov in 15 µL pufra brez encima. V drugi dve paraleli (vzorec) pa smo dodali enako količino raztopine substratov in 15 µL pufra z encimom. Uporabljali smo 50 mM HEPES pufer (pH = 7,8) z dodatkom DTT. Koncentracija DTT v pufru je bila 1 mM. Za pripravo pufra smo uporabili bidestilirano vodo. Raztopino encima ($\gamma = 0,6 \text{ mg/mL}$) smo s pufrom razredčili 1/25. Končna koncentracija encima v reakcijski zmesi je bila približno 7 µg/mL. Končni koncentraciji substratov v reakcijski zmesi sta bili 200 µM, končna koncentracija spojine pa 50 µM. V raztopino substratov smo dodali še Triton X114. Njegova končna koncentracija v reakcijski zmesi je bila 0,005 % (Preglednica VIII). Reakcijsko zmes smo inkubirali 20 minut na 37 °C ter dodali 100 µL reagenta BIOMOL® Green v vse luknjice na mikrotitrski plošči. Po dodatku reagenta smo inkubirali še 5 minut na 37 °C in izmerili absorbanco pri 650 nm.

Preglednica VIII: Končne koncentracije vseh snovi v testu.

Spojina (µM)	UDP- GlcNAc (µM)	PEP (µM)	Encim (µg/mL)	Triton X114 (%)	DMSO (%)	DTT (mM)	HEPES pufer (mM)
50	200	200	7	0,005	5	0,3	50

Na koncu smo izračunali povprečje absorbanc prvih dveh paralel in povprečje absorbanc drugih dveh paralel. Od povprečja absorbanc drugih dveh paralel (vzorec) smo odšteli povprečje absorbanc prvih dveh paralel (ozadje) in dobili razliko, ki je bila posledica sprostitev fosfata med reakcijo. RA smo izračunali tako, da smo razliko absorbanc za določeno spojino delili z razliko absorbanc slepe raztopine, ki je namesto spojine v DMSO vsebovala samo DMSO. Rezultat smo pomnožili s 100 in dobili RA podano v %.

Na vsako drugo mikrotitrsko ploščo smo enkrat namesto spojine odmerili štiri paralele po 2,5 µL 5 mM raztopine fosfomicina (Preglednica IX). Končna koncentracija fosfomicina v reakcijski zmesi je bila 250 µM.

Preglednica IX: Primer rezultatov testiranja spojin. Fosfomicin in spojina 13G4 sta uspešno zavrla encim. Prva vrstica je slepa raztopina, s pomočjo katere smo računalni rezidualno aktivnost.

55								
Spojina	A1	A2	Povprečje absorbanc	A3	A4	Povprečje absorbanc	Razlika	RA (%)
DMSO	0,041	0,041	0,041	0,201	0,201	0,201	0,160	
13F4	0,040	0,040	0,040	0,213	0,196	0,205	0,165	102,813
13G4	0,037	0,037	0,037	0,129	0,109	0,119	0,082	51,250
13H4	0,039	0,037	0,038	0,226	0,202	0,214	0,176	110,000
13A5	0,040	0,039	0,040	0,235	0,209	0,222	0,183	114,063
13B5	0,039	0,039	0,039	0,258	0,235	0,247	0,208	129,688
13C5	0,040	0,038	0,039	0,226	0,198	0,212	0,173	108,125
FOSFOMICIN	0,037	0,038	0,038	0,135	0,121	0,128	0,091	56,563

4.5. DOLOČANJE IC₅₀ VREDNOSTI

Spojinam, pri katerih je bila RA nižja od 75 % in smo jih imeli na razpolago nerazredčene, smo določili še IC₅₀ vrednost. IC₅₀ je tista koncentracija spojine, pri kateri je RA 50 % oz. je zavrte 50 % katalitske aktivnosti encima. IC₅₀ vrednost smo določili s pomočjo Hillove enačbe (Enačba 4), ki smo jo prilagodili za naš sistem. Za primer določanja IC₅₀ vrednosti vzemimo spojino z oznako 4H2, ki je imela pri prvem testiranju RA 36 % (Preglednica X).

$$\text{Enačba 4: } \log \left(\frac{RA}{100-RA} \right) = H \times \log I - H \times \log K_d$$

V enačbi H predstavlja Hillov koeficient, I koncentracijo inhibitorja in K_d konstanto disociacije.

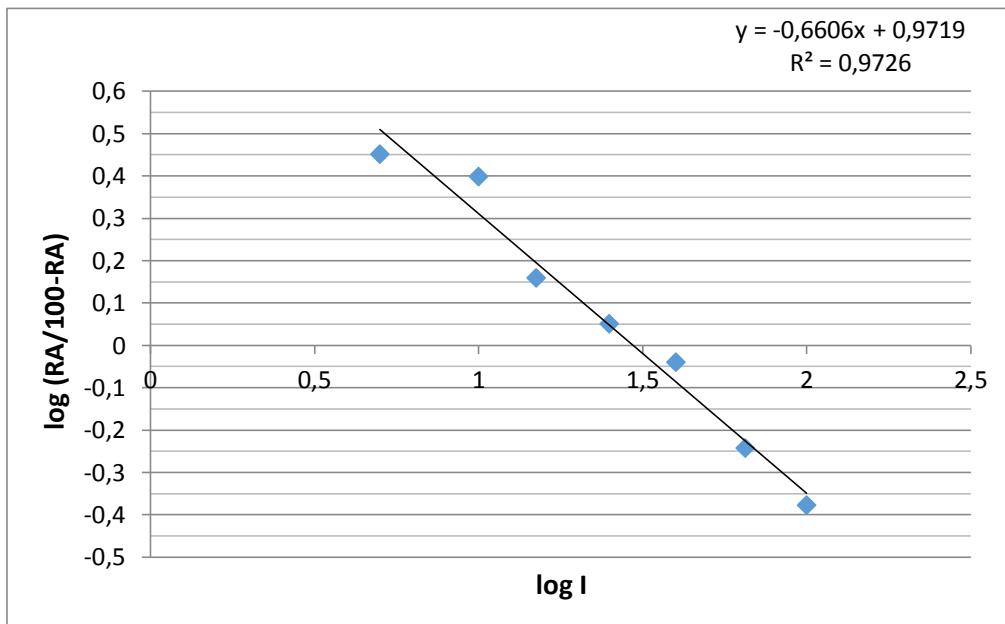
Preglednica X: Določanje IC₅₀ vrednosti spojine 4H2. Absorbanci A1 in A2 nista vsebovali encima in predstavljata ozadje. Absorbanci A3 in A4 sta vsebovali encim in predstavljata vzorec. Razlika predstavlja od povprečja absorbanc vzorca odšteto povprečje absorbanc ozadja.

4H2 (µM)	A1	A2	Povprečje absorbanc	A3	A4	Povprečje absorbanc	Razlika	RA (%)
DMSO	0,040	0,043	0,042	0,195	0,179	0,187	0,146	
100	0,057	0,060	0,059	0,103	0,100	0,102	0,043	29,553
65	0,049	0,048	0,049	0,103	0,100	0,102	0,053	36,426
40	0,042	0,044	0,043	0,116	0,109	0,113	0,070	47,766
25	0,043	0,044	0,044	0,116	0,125	0,121	0,077	52,921
15	0,045	0,044	0,045	0,130	0,131	0,131	0,086	59,107
10	0,044	0,045	0,045	0,147	0,150	0,149	0,104	71,478
5	0,044	0,042	0,043	0,161	0,140	0,151	0,108	73,883

Iz koncentracij spojine in izračunanih RA smo izračunali člena Hillove enačbe (Enačba 4) log I in log (RA/100-RA) ter narisali premico (Slika 15) (Preglednica XI).

Preglednica XI: RA pri različnih koncentracijah spojine 4H2 ter izračunani vrednosti log I in log (RA/100-RA).

4H2 (μM)	RA (%)	log I	log (RA/100-RA)
100	29,553	2,000	-0,37726
65	36,426	1,813	-0,24187
40	47,766	1,602	-0,03883
25	52,921	1,398	0,05080
15	59,107	1,176	0,15998
10	71,478	1,000	0,39899
5	73,883	0,699	0,45162



Slika 15: Hillov diagram za spojino 4H2. Naklon premice je $k = -0,661$, konstantni člen pa $n = 0,972$.

Iz Enačbe 4 smo ob upoštevanju koeficientov premice izpeljali enačbo 5, po kateri lahko izračunamo IC₅₀.

$$\text{Eračba 5: } IC_{50} = 10^{-\frac{n}{k}}$$

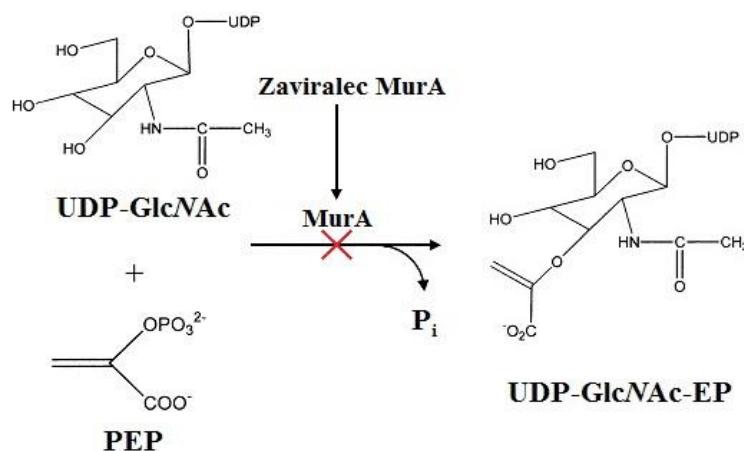
$$\text{Izračun IC}_{50}: IC_{50} = 10^{-\frac{0,972}{-0,661}} = 30 \mu\text{M}$$

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. ZAVIRANJE KATALITSKE AKTIVNOSTI MurA

Peptidoglikan je glavni gradnik bakterijske celične stene. Zaviranje biosinteze gradnikov peptidoglikana dobi smisel takoj, ko pomislimo na pomembnost bakterijske celične stene. Celična stena je za bakterije nujno potrebna, saj brez zaščite in opore, ki jo nudi celična stena, ne morejo preživeti. Potencialni zaviralcii biosinteze gradnikov peptidoglikana bi preprečili bakterijam izgradnjo ali obnovitev poškodovane celične stene, bakterije brez funkcionalne celične stene pa bi odmrle.

Eden izmed encimov, ki so odgovorni za biosintezo gradnikov peptidoglikana je tudi MurA. MurA katalizira prvo stopnjo biosinteze gradnikov peptidoglikana, torej prenos enolpiruvatne skupine iz fosfoenolpiruvata na 3'-hidroksi skupino UDP-GlcNAc (18-22, 25-28) (Slika 9). Z rešetanjem knjižnice spojin Fakultete za farmacijo smo želeli odkriti spojine, ki zavirajo katalitsko aktivnost MurA in ki bi bile lahko v prihodnosti, po nadalnjem razvoju in optimizaciji, uspešne protibakterijske učinkovine. Z zaviranjem encima MurA bi v bakterijah začelo primanjkovati UDP-GlcNAc-EP, ki je substrat naslednjega encima v biosintezi gradnikov peptidoglikana - MurB (Slika 16). Posledično bi se ustavila celotna kaskada reakcij biosinteze gradnikov peptidoglikana in bakterije bi odmrle. Potencialni zaviralcii MurA bi bili učinkoviti tudi proti bakterijam, ki so razvile odpornost na antibiotike in protibakterijske učinkovine, ki so trenutno v uporabi.



Slika 16: Zaviranje katalitske aktivnosti MurA

5.2. UMERITVENA KRIVULJA ZA FOSFAT

Enačbo umeritvene krivulje za fosfat smo uporabili za izračun množine sproščenega fosfata pri reakciji z encimom. V enačbi umeritvene krivulje y predstavlja absorbanco, x pa množino fosfata. Po enačbi 1, ki smo jo izpeljali iz enačbe umeritvene krivulje za fosfat, lahko za izmerjeno absorbanco hitro izračunamo množino sproščenega fosfata pri reakciji.

5.3. DOLOČANJE K_M

Michaelis-Mentenovo konstanto smo določali v treh paralelah. Pri določanju K_M vidimo, da so absorbance večinoma lepo ponovljive, sploh v paralelah brez encima, ki so nam služile kot ozadje. Pri paralelah z encimom pride včasih do manjših odstopanj, kar je najverjetneje posledica posedanja encima v mikropipeti ali napake mikropipete.

K_M za UDP-GlcNAc smo določili $173 \mu\text{M}$, K_M za PEP pa $163 \mu\text{M}$. Določene K_M se precej razlikujejo od tistih v literaturi, kjer so določili K_M za UDP-GlcNAc $15 \mu\text{M}$, K_M za PEP pa $0,4 \mu\text{M}$ (18). Možnih vzrokov za razlike v K_M je več. Na vrednost K_M vpliva pufer, v katerem je bil encim shranjen in pufer, v katerem se je test izvajal. Pomemben je tudi test oz. sama metoda določitve K_M . Možno je, da smo mi uporabili drugačen test in drugačne pogoje pri določitvi K_M , kot so jih uporabili pri določitvi podatkov iz literature. Nedavna odkritja pa so pokazala, da se med ekspresijo in izolacijo na MurA vežeta UDP-MurNAc in PEP. UDP-MurNAc, ki je sicer produkt MurB, in PEP, ki se kovalentno veže na cisteinski ostanek na mestu 115, povzročita konformacijsko spremembo in encim preide v zaprto konformacijo. Encim, če ga ne izoliramo ustrezno in ga ne speremo s fosfatnim pufrom, ostane v kompleksu z UDP-MurNAc in PEP tudi po izolaciji (32). Ta kompleks je zelo obstojen in je lahko razlog za manjšo aktivnost encima in posledično nižjo določeno vrednost K_M .

5.4. VPLIV DMSO IN TRITONA X114

Vpliv DMSO na katalitsko aktivnost encima smo proučevali zaradi tega, ker so spojine v knjižnici raztopljene v DMSO. Opazili smo zanemarljivo razliko v primerjavi z vodo. Morebitna razlika prav tako ne bi imela vpliva na rezultate, saj smo v našem sistemu v prvi vrstici vsake mikrotitrsko plošče uporabili slepo raztopino, ki je vsebovala DMSO. RA smo nato računali glede na katalitsko aktivnost encima v slepi raztopini.

Triton X114 je površinsko aktivna snov. V reakcijsko zmes smo ga dodali z namenom preprečiti lažno pozitivne rezultate. Hidrofobne spojine se lahko v polarnem okolju zaradi

hidrofobnega efekta začnejo združevati v skupke. Takšni skupki hidrofobnih molekul se lahko nespecifično vežejo na encim in spremenijo njegovo konformacijo, kar onemogoči katalitsko aktivnost encima (39, 40). Posledica je manj sproščenega fosfata in lažno pozitiven rezultat. Triton X114 v nizkih koncentracijah prepreči skupkom molekul nespecifično inhibicijo encima, v višjih koncentracijah pa jih razbije (40).

5.5. TESTIRANJE SPOJIN

V slepi raztopini, kjer je bil samo DMSO, je encim deloval neovirano. S primerjavo absorbanc slepe raztopine in raztopine s spojino smo dobili prvo informacijo o katalitski aktivnosti encima. Če je dodana spojina zavrla katalitsko aktivnost encima, se je pri reakciji sprostilo manj fosfata in posledično je bila absorbanca raztopine s spojino nižja od absorbance slepe raztopine.

Prvi dve paraleli, ki nista vsebovali encima, sta nam služili kot ozadje. Absorbanca teh dveh paralel je bila posledica mikrotitrsko plošče in raztopine v njej. Ko smo od povprečja absorbanc drugih dveh paralel odšteli ozadje, smo dobili razliko absorbanc, ki je bila v celoti prispevek sproščenega fosfata med reakcijo.

Encim smo s pufom razredčili toliko, da smo dobili primerno visoke absorbance, ki so bile znotraj linearnega območja umeritvene krivulje za fosfat. Po začetnih poskusih smo se odločili, da bomo za testiranje spojin uporabili redčitev encima 1/25.

Pufer z encimom smo dodali hitro, da je bilo čim manj časovne razlike med prvim in zadnjim vzorcem. Daljša časovna razlika bi pomenila daljši čas poteka reakcije in s tem višjo absorbanco v prvem vzorcu, hkrati pa krajši čas reakcije in nižjo absorbanco v zadnjem vzorcu.

DTT je antioksidant, ki se pogosto uporablja za antioksidativno zaščito proteinov. V pufer smo ga dodali z namenom povečanja stabilnosti encima med pripravo in reakcijo. DTT preprečuje nastajanje intramolekularnih in intermolekularnih disulfidnih vezi med cisteinskimi ostanki v proteinih.

Fosfomicin, ki smo ga dodali na vsako drugo ploščo, nam je služil kot pozitivna kontrola. S tem smo preverili ali encim res deluje in ali ga je fosfomicin sposoben zavreti.

5.6. DOLOČANJE IC₅₀ VREDNOSTI

V biokemiji se afiniteta za vezavo liganda na makromolekulo pogosto poveča po vezavi prvega liganda, kar imenujemo kooperativna vezava. Hillova enačba opisuje delež makromolekul z vezanim ligandom kot funkcijo koncentracije liganda. Kooperativno vezavo ligandov pa lahko kvantificiramo s Hillovim koeficientom:

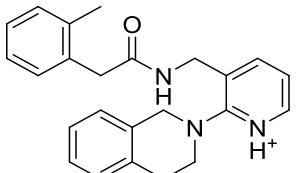
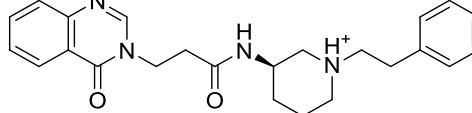
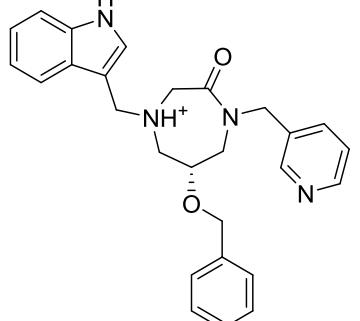
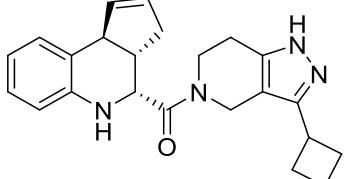
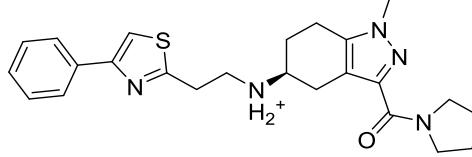
- kadar je $H > 1$ gre za pozitivno kooperativno vezavo, kar pomeni, da se po vezavi prvega liganda afiniteta za vezavo drugega (enakega) liganda poveča;
- kadar je $H < 1$ gre za negativno kooperativno vezavo, kar pomeni, da se po vezavi prvega liganda afiniteta za vezavo drugega (enakega) liganda zmanjša;
- kadar je $H = 1$ pa vezava ni kooperativna, kar pomeni, da se po vezavi prvega liganda afiniteta za vezavo drugega (enakega) liganda ne spremeni (41).

V našem primeru je makromolekula encim MurA, ligand pa testirana spojina. MurA ima eno aktivno mesto, v katerega se veže ena molekula spojine. V teoriji bi zato H moral biti 1, vendar je zaradi eksperimentalnih napak okrog 1 (0,8 – 1,3). Želimo si, da bi spojine, ki bodo uspešno zavrle katalitsko aktivnost MurA imele H čim bližje 1. Če je H večji od 2 pomeni, da so molekule spojine nespecifično zavrle encim. H je hkrati naklon premice, ki smo jo narisali po Hillovi enačbi.

IC₅₀ smo določali pri sedmih različnih koncentracijah spojine, ki smo jih določili na podlagi predhodno določene RA. Če je imela spojina pri prvem testiranju RA pri 50 μM koncentraciji okrog 50 %, smo začeli z 200 μM koncentracijo in jo šestkrat pomnožili z 0,65. 0,65 je eksperimentalno določeno število tako, da so točke na logaritemskem grafu primerno oddaljene in da so koncentracije spojine takšne, da je RA znotraj linearnega območja (20 – 80 %). Za določanje IC₅₀ vrednosti takšnih spojin smo torej uporabili 200, 130, 85, 55, 35, 20 in 15 μM koncentracije. Ker je bila koncentracija spojin v prvem testu 50 μM , se tudi IC₅₀ vrednost takšnih spojin pričakuje nekje okrog 50 μM . Za spojine, ki so imele RA pri 50 μM koncentraciji okrog 30 %, smo uporabili 100, 65, 40, 25, 15, 10 in 5 μM koncentracije. Za spojine, ki so imele RA pri 50 μM koncentraciji okrog 10 %, pa smo uporabili 50, 30, 20, 10, 6, 4 in 2 μM koncentracije.

5.7. REZULTATI TESTIRANJA

Preglednica XII: Spojine 1-5.

Spojina	Oznaka spojine	Struktura spojine	RA (50 µM) (%)	IC ₅₀ (µM)	H
1	1C1		55	20	0,9
2	1E1		65	27	1,0
3	1D1		50 (33 µM)	~	~
4	1H1		50	~	~
5	1A2		48	~	~

Spojini **1** in **2** s piperidinskim obročem sta imeli pri prvem testiranju RA 55 in 65 %. Pri določanju IC₅₀ sta se izkazali za še boljša inhibitorja, saj smo jima določili IC₅₀ vrednost 20 in 27 µM. Obe spojini imata dober Hillov koeficient, in sicer 0,9 in 1,0.

Spojina **3** je ena izmed redkih, ki je bila v knjižnici shranjena v koncentraciji nižji od 1mM. Končna koncentracija te spojine v testu je bila 33 µM. Spojin **3**, **4** in **5** žal nismo imeli na voljo za določitev IC₅₀ vrednosti.

Preglednica XIII: Spojine 6-9.

Spojina	Oznaka spojine	Struktura spojine	RA (50 µM) (%)	IC ₅₀ (µM)	H
6	1C10		36	~	~
7	2G4		49	~	~
8	1C2		44	Ni aktivna	/
9	1G5		28	Ni aktivna	/

Spojini **6** in **7** vsebujeta enak struktturni fragment 3-fenilprop-2-enojsko kislino. Razlika je v stranski verigi, kjer ima spojina **6** enega, spojina **7** pa dva fenilna obroča. Spojina **6** s krajšo stransko verigo ima nižjo RA, iz česar bi lahko sklepali, da je favorizirana manjša molekula in da je velika stranska veriga spojine **7** prevelika za vezavo na encim. Žal nobene od teh spojin nismo imeli na voljo za določitev IC₅₀ vrednosti.

Spojini **8** in **9** imata skupen indenski obroč, piperidinski obroč in metoksietilno verigo. Razlikujeta se v fragmentu na karboksilni strani amida. Spojina **8** je imela RA 44 %, spojina **9** pa 29 %. Obe sta se pri določanju IC₅₀ vrednosti izkazali za neaktivni.

Možnih vzrokov za neaktivnost je več in zajemajo vse spojine, ki so se pri določanju IC₅₀ vrednosti izkazale za neaktivne. Možni vzroki so:

- nestabilnost spojine v DMSO. Med pripravo ustreznih koncentracij za določanje IC₅₀ ter ponovnim zamrzovanjem in odtajanjem lahko spojina razpade.
- Koncentracija spojine. Pri tehtanju in redčenju spojine za knjižnico lahko prihaja do napak. Spojina je zato v knjižnici shranjena v koncentraciji nižji od navedene, ta pa se z dodatnim redčenjem za določitev IC₅₀ vrednosti še zniža.
- Slaba aktivnost spojine. Mejo za določanje IC₅₀ vrednosti smo postavili relativno visoko (RA manjša od 75 %). Zaradi eksperimentalne napake pri testu, ki znaša +/- 10 %, so lahko spojine na meji neaktivne.

Preglednica XIV: Spojine 10-12.

Spojina	Oznaka spojine	Struktura spojine	RA (50 µM) (%)	IC ₅₀ (µM)	H
10	1F4		49	Ni aktivna	/
11	3G4		35	Ni aktivna	/
12	3G5		57	~	~

Spojina **10** je imela RA 49 %, vendar se je pri določanju IC₅₀ vrednosti izkazala za neaktivno.

Spojini **11** in **12** sta derivata nitroksolina. Spojina **11** je imela RA 35 %, vendar se je, tako kot spojina **10**, pri določanju IC₅₀ vrednosti izkazala za neaktivno. Spojina **12** je imela pri testiranju RA 57 %, žal pa je nismo imeli na voljo za določitev IC₅₀.

Preglednica XV: Spojine 13-18.

Spojina	Oznaka spojine	Struktura spojine	RA (50 µM) (%)	IC ₅₀ (µM)	H
<u>13</u>	4H1		72	152	1,6
<u>14</u>	4H2		36	30	0,7
<u>15</u>	4F3		61	Ni aktivna	/
<u>16</u>	4H4		45	15	1,3
<u>17</u>	4G6		55	47	0,7
<u>18</u>	10C8		49	Ni aktivna	/

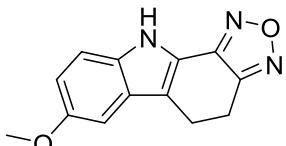
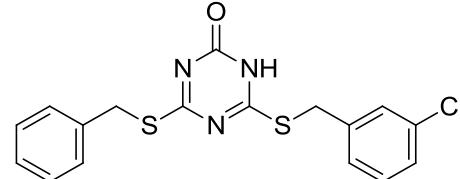
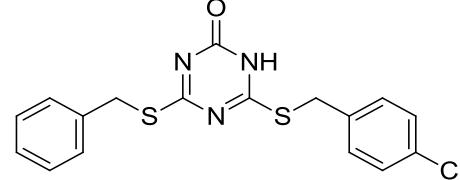
Vse spojine v preglednici XV so derivati 3-cianotiofena. Razlikujejo se v obroču in stranskih verigah na obroču, ki je kondenziran na tiofen, ter po fragmentu na amidnem delu. Spojini **15** in **18**, sta se pri določanju IC₅₀ vrednosti izkazali za neaktivni. Neaktivnost je verjetno posledica prevelikega fragmenta na amidnem delu.

Tudi spojina **13**, ki ima na amidni del pripet večji aromatski sistem, se je izkazala za slab inhibitor. Pri testiranju je imela RA 72 %, kasneje pa smo ji določili IC₅₀ 152 μM. Malo višji H bi lahko pomenil, da je bila prisotna nespecifična inhibicija.

Spojini **14** in **17** sta imeli RA 36 in 55 %. Zanimiva je spojina **17**, saj ima edina na cianotiofen prikondenziran 7 členski obroč. Pri določanju IC₅₀ vrednosti sta se spojini **14** in **17** izkazali za močna inhibitorja MurA, saj smo jima določili IC₅₀ 30 in 47 μM.

Najmočnejša spojina izmed derivatov 3-cianotiofena je bila spojina **16**. Kljub večjemu aromatskemu sistemu je imela pri testiranju RA 45 %. Pri določanju IC₅₀ vrednosti se je izkazala za še bolj aktivno, saj smo ji določili IC₅₀ 15 μM. Hilov koeficient je bil 1,3.

Preglednica XVI: Spojine 19-21.

Spojina	Oznaka spojine	Struktura spojine	RA (50 µM) (%)	IC ₅₀ (µM)	H
19	4H12		50	Ni aktivna	/
20	7G2		66	35	1,5
21	7H2		67	29	1,1

Spojina **19** vsebuje štiri kondenzirane obroče. Pri testiranju je imela RA 50 %, vendar se je pri določanju IC₅₀ vrednosti izkazala za neaktivno.

Spojini **20** in **21** sta derivata triazina. Razlikujeta se le po položaju kloridnega atoma na substituiranem fenilnem obroču. Spojina **20** ima klor na položaju *meta*, spojina **21** pa na položaju *para*. Spojini sta imeli skoraj identični RA, pri določanju IC₅₀ pa je spojina **21** malenkost bolj zavrla MurA. Spojini **20** smo določili IC₅₀ vrednost 35 µM, spojini **21** pa 29 µM.

Preglednica XVII: Spojine 22-25.

Spojina	Oznaka spojine	Struktura spojine	RA (50 µM) (%)	IC ₅₀ (µM)	H
<u>22</u>	7H9		71	~	~
<u>23</u>	7A10		71	~	~
<u>24</u>	7G10		30	Ni aktivna	/
<u>25</u>	7D11		10	Ni aktivna	/

Spojine 22, 23 in 24 imajo skupen tiofenopirimidinski skelet. Spojini 22 in 24 imata prikondenziran še cikloheksilni obroč, medtem ko ima spojina 23 na mestu 5 tiofenopirimidinskega skeleta vezan fenilni obroč. Spojina 23 ima v stranski verigi še atom žvepla. Spojini 22 in 23 sta imeli pri testiranju enak RA, in sicer 71 %. Žal nobene od teh spojin nismo imeli na voljo za določitev IC₅₀. Spojina 24 je imela pri testiranju RA 30 %, vendar se je pri določanju IC₅₀ vrednosti izkazala za neaktivno.

Spojina 25 je imela zelo nizko RA, in sicer 10 %. Pri določanju IC₅₀ vrednosti pa se je žal izkazala za neaktivno.

Preglednica XVIII: Spojine 26-33.

Spojina	Oznaka spojine	Struktura spojine	RA (50 µM) (%)	IC ₅₀ (µM)	H
26	8C6		36	64	0,9
27	8D6		53	85	0,6
28	8E6		28	113	1,4
29	8F6		38	112	1,7
30	8G6		62	121	1,7
31	8C9		41	114	2,0
32	8D8		64	197	2,0
33	8E8		28	136	3,9

Spojine v preglednici XVIII so derivati naftalena ali kinolina. Izmed derivatov naftalena je najmočnejši MurA zaviralec spojina **26**. Pri testiranju je imela RA 36 %, IC₅₀ vrednost pa smo ji določili 64 µM. Spojina **27** se od spojine **26** razlikuje po tem, da ima na mestu 6 na naftalenu metoksi skupino namesto broma. Imela je malo višjo IC₅₀ vrednost, in sicer 85 µM. Iz tega lahko sklepamo, da se pri vezavi spojine na encim tvorijo interakcije, kjer je potreben donor elektronskega para. Za te interakcije je odgovorna elektronegativna skupina na mestu 6 s prostimi elektronskimi pari. Spojini **28** in **29**, ki sta brez elektronegativne skupine na mestu 6, potrjujeta to teorijo, saj sta se izkazali za mnogo slabša inhibitorja MurA. Spojini **28**, ki ima namesto amidne sulfonamidno skupino, smo določili IC₅₀ vrednost 113 µM, spojini **29** pa 112 µM. Kot kaže zamenjava amidne s sulfonamidno skupino nima pomembnejše vloge pri inhibiciji encima MurA. Spojini **30** in **31** imata, podobno kot spojini **26** in **27**, na mestu 6 brom in metoksi skupino. Razlika je le v benzoksazolnem delu, kjer imata spojini **30** in **31** namesto benzoksazola benzotiazol. IC₅₀ vrednosti smo jima določili 121 in 114 µM. Če ju primerjamo s spojinama **26** in **27**, lahko sklepamo, da je zamenjava kisikovega atoma v benzoksazolu z žveplovim odgovorna za slabšo inhibicijo encima. Slabša inhibicija encima v primeru spojin **28** in **29** je zato lahko tudi posledica zamenjave benzoksazola z benzotiazolom. Če pa upoštevamo, da so imele spojine z benzotiazolom višji H, pa lahko sklepamo, da je bila pri teh spojinah prisotna tudi nespecifična inhibicija.

Spojini **32** in **33** sta derivata kinolina. Na kinolinu imata na mestu 5 nitro in na mestu 8 hidroksi skupino, preostali del molekule pa je podoben derivatom naftalena. Spojina **32** ima na piperidinski obroč vezan benzoksazol, spojina **33** pa benzotiazol. Obratno kot pri derivatih naftalena je pri derivatih kinolina močnejši inhibitor spojina z benzotiazolom. Spojini **32** smo določili IC₅₀ vrednost 197 µM, spojini **33**, ki vsebuje benzotiazol, pa 136 µM. Glede na IC₅₀ vrednosti ti dve spojini nista najmočnejša zaviralca MurA. Če upoštevamo še visok H, lahko zaključimo, da je šlo v primeru spojin **32** in **33** za nespecifično inhibicijo pri visokih koncentracijah.

Preglednica XIX: Spojine 34-37.

Spojina	Oznaka spojine	Struktura spojine	RA (50 µM) (%)	IC ₅₀ (µM)	H
34	13F1		55	~	~
35	13E4		47	~	~
36	15F10		29	142	1,7
37	15D12		28	Ni aktivna	/

Spojini **34** in **35** sta imeli pri testiranju RA 55 in 47 %. Žal nobene od teh spojin nismo imeli na voljo za določitev IC₅₀ vrednosti.

Spojina **36** je derivat benzotiadiazola. Pri testiranju je imela RA 29 %, IC₅₀ pa smo ji določili 142 µM. Glede na H, ki je bil 1,7, je možno, da je bilo zavrtje encima posledica nespecifične inhibicije.

Spojina **37** je imela pri testiranju RA 28 %, vendar se je pri določanju IC₅₀ vrednosti izkazala za neaktivno.

Preglednica XX: Spojine 38-41.

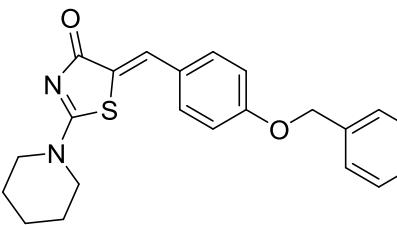
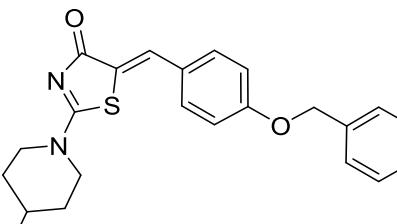
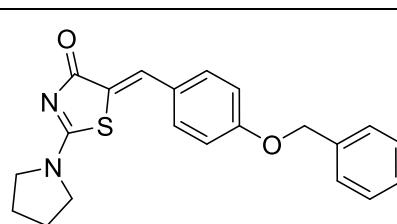
Spojina	Oznaka spojine	Struktura spojine	RA (50 µM) (%)	IC ₅₀ (µM)	H
38	14D1		18	10	1,7
39	14E6		50	~	~
40	14C12		59	15	1,5
41	14E9		45	Ni aktivna	/

Spojine v preglednici XX so derivati 2-tioksotiazolidin-4-ons. Spojini **38** in **39** se med seboj razlikujeta po položaju amino skupine. Spojina **38** je močnejši zaviralec MurA, saj je imela RA 18 %, IC₅₀ vrednost pa smo ji določili 10 µM. Spojina **39** je imela pri testiranju RA 50 %, žal pa je nismo imeli na voljo za določitev IC₅₀ vrednosti. Na podlagi rezidualnih aktivnosti spojin **38** in **39** bi lahko sklepali, da je položaj amino skupine v primeru spojine **38** ugodnejši, žal pa tega nismo mogli potrditi z določitvijo IC₅₀.

Spojina **40** se od spojine **38** razlikuje po položaju karboksilne skupine na drugem fenilnem obroču. Spojina **38** ima karboksilno skupino na položaju *meta*, spojina **40** pa na položaju *para*. Spojina **40** je imela RA 59 %, IC₅₀ vrednost pa smo ji določili 15 µM. Če primerjamo IC₅₀ vrednosti spojin **38** in **40**, lahko sklepamo, da je položaj karboksilne skupine na drugem fenilnem obroču pomemben za aktivnost spojin na encimu MurA.

Spojina **41** se od ostalih razlikuje po fenilnem obroču pripetem na mesto 3 v 2-tioksotiazolidin-4-onskem obroču in po metoksi skupini na prvem fenilnem obroču. Pri testiranju je imela RA 45 %, pri določanju IC₅₀ vrednosti pa se je izkazala za neaktivno.

Preglednica XXI: Spojine 42-45.

Spojina	Oznaka spojine	Struktura spojine	RA (50 µM) (%)	IC ₅₀ (µM)	H
42	16B1		23	7	1,2
43	16H2		23	134	1,8
44	16B3		65	Ni aktivna	/
45	16D3		47	135	1,0

Spojine v preglednici XXI so derivati 5-benzilidentiazol-4-ona. Med njimi je najenostavnnejša spojina **42**, ki ima na mestu 2 tiazolona pripet morfolin. Spojina **42** je hkrati najmočnejši zaviralec MurA, ki smo ga dobili z rešetanjem knjižnice. Pri testiranju je imela spojina **42** RA 23 %, IC₅₀ vrednost pa smo ji določili 7 µM. Hillov koeficient je bil 1,2.

Spojina **43** je imela pri testiranju RA prav tako 23 %, IC₅₀ vrednost pa smo ji določili 134 µM. Spojina **43** ima, tako kot spojini **44** in **45**, na fenilnem obroču na *para* mestu pripeto še benziloksi skupino, namesto morfolina pa ima pripet piperidin. Visok H bi lahko pomenil, da je šlo za nespecifično inhibicijo pri visokih koncentracijah.

Spojina **44** se od spojine **43** razlikuje po metilni skupini pripeti na *para* mesto na piperidinu. Pri testiranju je imela RA 65 %, pri določanju IC₅₀ vrednosti pa se je izkazala za neaktivno. To bi lahko pomenilo, da je v primeru spojine **43** res šlo za nespecifično inhibicijo pri visokih koncentracijah.

Spojina **45** ima namesto piperidina na mestu 2 tiazolona pripet pirolidin. Pri testiranju je imela RA 47 %, IC₅₀ vrednost pa smo ji določili 135 µM. Hillov koeficient je bil 1,0.

6. ZAKLJUČEK

V okviru diplomske naloge smo encimu MurA najprej določili Michaelis-Mentenovi konstanti za oba substrata in preverili odvisnost njegove katalitske aktivnosti od prisotnosti DMSO in Tritona X114. Po začetni karakterizaciji encima smo testirali več kot 1600 spojin, da bi ugotovili, ali katera izmed njih zavre njegovo katalitsko aktivnost. Dobili smo 45 takšnih, pri katerih je imel MurA rezidualno aktivnost pri $50 \mu\text{M}$ koncentraciji spojine nižjo od 75 %. 45 aktivnih od približno 1600 strukturno zelo različnih spojin, ki so bile kupljene ali sintetizirane za druge tarče, predstavlja lep uspeh.

Najmočnejši dobljeni zaviralec MurA je spojina **42**, ki je derivat 5-benzilidentiazol-4-ona in ima $\text{IC}_{50} 7 \mu\text{M}$. Drugi najmočnejši zaviralec MurA, ki smo ga dobili, je spojina **38**, ki je derivat 2-tioksotiazolidin-4-ona in ima $\text{IC}_{50} 10 \mu\text{M}$. Tretja najmočnejša spojina, ki je zavrla MurA, je spojina **16**, ki je derivat 3-cianotiofena in ima $\text{IC}_{50} 15 \mu\text{M}$. Pomembno je, da imajo vse tri spojine več aktivnih analogov. Koncentracije, pri katerih spojine **16**, **38** in **42** zavrejo katalitsko aktivnost MurA, so v nizkem mikromolarnem območju in bi se z optimizacijo spojin lahko še znižale. Prav to pa sta najbolj vzpodbudna razloga za nadaljnje raziskave omenjenih spojin.

Pomembne so tudi spojine, ki so že bile testirane in niso aktivne na MurA. Podatke o teh spojinah je mogoče dobiti v Excelovi tabeli na katedri za farmacevtsko kemijo, kjer so zbrani podatki o vseh spojinah v knjižnici spojin Fakultete za farmacijo. V okviru te diplomske naloge so bile testirane vse spojine do oznake 17E10.

7. VIRI

1. Willey J M, Sherwood L M, Woolverton C J: **Prescott, Harley, and Klein's Microbiology**, 7th Edition, McGraw-Hill, New York, 2008
2. Madigan M T, Martinko J M, Stahl D A, Clark D P: **Brock biology of microorganisms**, 13th Edition, Benjamin Cummings, San Francisco, 2011
3. Lemke T L, Williams D A, Roche V F, Zito S W: **Foye's Principles of Medicinal chemistry**, 6th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008
4. Heynick F: **Jews and Medicine: An Epic Saga**, Ktav Publishing House, Hoboken, 2002
5. Di Guilmi A M, Dessen A, Dideberg O, Vernet T: **Bifunctional Penicillin-Binding Proteins: Focus on the Glycosyltransferase Domain and its Specific Inhibitor Moenomycin**, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, Vol. 3, 2002, 63-75
6. Yunnis A A: **Chloramphenicol toxicity: 25 years of research**, *The American Journal of Medicine*, Vol. 87, 1989, 44-48
7. Doyle M P, Busta F, Cords B R, Davidson P M, Hawke J, Hurd H S, Isaacson R E, Matthews K, Maurer J, Meng J, Montville T J, Shryock T R, Sofos J N, Vidaver A K, Vogel L: **Antimicrobial Resistance: Implications for the Food System**, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol. 5, 2006, 71-137
8. Martinez J L, Fajardo A, Garmendia L, Hernandez A, Linares J F, Martínez-Solano L, Sánchez M B: **A Global view of Antibiotic Resistance**, *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 33, 2009, 44-65
9. Doyle M P, Loneragan G H, Scott H M, Singer R S: **Antimicrobial Resistance: Challenges and Perspectives**, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol. 12, 2013, 234-248
10. Gareth T: **Foundamentals of Medicinal Chemistry**, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2003
11. Black J G: **Microbiology Principles and Explorations**, 8th Edition, John Wiley & Sons Inc, Hoboken, 2012
12. Gareth T: **Medicinal Chemistry An Introduction**, 2nd Edition, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2007

13. Banzhaf M, van den Berg van Saparoea B, Terrak M, Fraipont C, Egan A, Philippe J, Zapun A, Breukink E, Nguyen-Distèche M, den Blaauwen T, Vollmer W: **Cooperativity of peptidoglycan synthases active in bacterial cell elongation**, *Molecular Microbiology*, Vol. 85, 2012, 179–194
14. Hrast M, Turk S, Sosič I, Knez D, Randall C P, Barreteau H, Contreras-Martel C, Dessen A, O'Neill A J, Mengin-Lecreux D, Blanot D, Gobec S: **Structure-activity relationships of new cyanothiophene inhibitors of the essential peptidoglycan biosynthesis enzyme MurF**, *European Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 66, 2013, 32-45
15. El Zoeiby A, Sanschagrin F, Levesque R C: **Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors**, *Molecular Microbiology*, Vol. 47, 2003, 1-12
16. Francisco G D, Li Z, Albright J D, Eudy N H, Katz A H, Petersen P J, Labthavikul P, Singh G, Yang Y, Rasmussen B A, Lin Y, Mansour T S: **Phenyl thiazolyl urea and carbamate derivatives as new inhibitors of bacterial cell-wall biosynthesis**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 14, 2004, 235-238
17. Vollmer W, Blanot D, de Pedro M A: **Peptidoglycan structure and architecture**, *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 32, 2008, 149-167
18. Gautam A, Rishi P, Tewari R: **UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase as a potential target for antibacterial chemotherapy: recent developments**, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 92, 2011, 211-225
19. Barreteau H, Kovač A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D: **Cytoplasmic steps of peptidoglycan synthesis**, *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 32, 2008, 168-207
20. Mizyed S, Oddone A, Byczynski B, Hughes D W, Berti P J: **UDP-N-acetylmuramic Acid (UDP-MurNAc) Is a Potent Inhibitor of MurA (Enolpyruvyl-UDP-GlcNAc Synthase)**, *Biochemistry*, Vol. 44, 2005, 4011-4017
21. Dunsmore C J, Miller K, Blake K L, Patching S G, Henderson P J F, Garnett J A, Stubbings W J, Phillips S E V, Palestrant D J, De Los Angeles J, Leeds J A, Chopra I, Fishwick C W G: **2-Aminotetralones: Novel inhibitors of MurA and MurZ**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 18, 2008, 1730-1734

22. Dube S, Nanda K, Rani R, Jit Kaur N, Kumar Nagpal J, Upadhyay D J, Cliffe I A, Singh Saini K, Purnapatre K P: **UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase from *Pseudomonas aeruginosa***, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 26, 2010, 1623-1629
23. Terrak M: **Peptidoglycan Glycosyltransferase Inhibition: New Perspectives for An Old Target**, *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, Vol. 7, 2008, 180-192
24. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala J A, Charlier P: **The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis**, *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 32, 2008, 234-258
25. Miller K, Dunsmore C J, Leeds J A, Patching S G, Sachdeva M, Blake K L, Stubbings W J, Simmons K J, Henderson P J F, De Los Angeles J, Fishwick C W G, Chopra I: **Benzothioxalone derivatives as novel inhibitors of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferases (MurA and MurZ)**, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 65, 2010, 2566–2573
26. Barbosa M D F S, Yang G, Fang J, Kurilla M G, Pompliano D L: **Development of a Whole-Cell Assay for Peptidoglycan Biosynthesis Inhibitors**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 46, 2002, 943-946
27. Eschenburg S, Priestman M A, Abdul-Latif F A, Delachaume C, Fassy F, Schönbrunn E: **A Novel Inhibitor That Suspends the Induced Fit Mechanism of UDP-N-Acetylglucosamine Enolpyruvyl Transferase (MurA)**, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 280, 2005, 14070-14075
28. Bachelier A, Mayer R, Klein C D: **Sesquiterpene lactones are potent and irreversible inhibitors of the antibacterial target enzyme MurA**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 16, 2006, 5605-5609
29. Schönbrunn E, Svergun D I, Amrhein N, Koch M H J: **Studies on the conformational changes in the bacterial cell wall biosynthetic enzyme UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyltransferase (MurA)**, *European Journal of Biochemistry*, Vol. 253, 1998, 406-412
30. Han S G, Lee W K, Jin B S, Lee K I, Lee H H, Yu Y G: **Identification of Novel Irreversible Inhibitors of UDP-N-Acetylglucosamine Enolpyruvyl Transferase (MurA) from *Haemophilus influenzae***, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 23, 2013, 329-334

31. Han H, Yang Y, Olesen S H, Becker A, Betzi S, Schönbrunn E: **The Fungal Product Terreic Acid Is a Covalent Inhibitor of the Bacterial Cell Wall Biosynthetic Enzyme UDP-N-Acetylglucosamine 1-Carboxyvinyltransferase (MurA)**, *Biochemistry*, Vol. 49, 2010, 4276–4282
 32. Zhu J-Y, Yang Y, Han H, Betzi S, Olesen S H, Marsilio F, Schönbrunn E: **Functional Consequence of Covalent Reaction of Phosphoenolpyruvate with UDP-N-acetylglucosamine 1-Carboxyvinyltransferase (MurA)**, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 287, 2012, 12657–12667
 33. Baum E Z, Montenegro D A, Licata L, Turchi I, Webb G C, Foleno B D, Bush K: **Identification and Characterization of New Inhibitors of the *Escherichia coli* MurA Enzyme**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 45, 2001, 3182–3188
 34. Scholz T, Heyl C L, Bernardi D, Zimmermann S, Kattner L, Klein C D: **Chemical, biochemical and microbiological properties of a brominated nitrovinylfuran with broad-spectrum antibacterial activity**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Vol. 21, 2013, 795-804
 35. Hrast M, Sosič I, Šink R, Gobec S: **Inhibitors of the peptidoglycan biosynthesis enzymes MurA-F**, *Bioorganic Chemistry*, Vol. 55, 2014, 2-15
 36. Castañeda-García A, Blázquez J, Rodríguez-Rojas A: **Molecular Mechanisms and Clinical Impact of Acquired and Intrinsic Fosfomycin Resistance**, *Antibiotics*, Vol. 2, 2013, 217-236
 37. Lanzetta P A, Alvarez L J, Reinach P S, Candia O A: **An Improved Assay for Nanomole Amounts of Inorganic Phosphate**, *Analytical Biochemistry*, Vol. 100, 1979, 95-97
 38. Product data sheet: **BIOMOL® Green Reagent**, dostopno na <http://www.enzolifesciences.com/BML-AK111/biomol-green-reagent/>
 39. McGovern S L, Caselli E, Grigorieff N, Shoichet B K: **A Common Mechanism Underlying Promiscuous Inhibitors from Virtual and High-Throughput Screening**, *Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 45, 2002, 1712-1722
 40. McGovern S L, Helfand B T, Feng B, Shoichet B K: **A Specific Mechanism of Nonspecific Inhibition**, *Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 46, 2003, 4265-4272
 41. Nelson D L, Cox M M: **Lehninger Principles of Biochemistry**, 5th Edition, W. H. Freeman and Company, New York, 2008
-