

Rozprawa doktorska

Mirosława Anna Skupińska

**Poszukiwanie nowych terapeutyków
na platformie syntetaz aminoacylo - tRNA**

Promotor: Prof. nadzw. dr hab. Małgorzata Giel - Pietraszuk

Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk
Poznań, 2013

*Serdecznie dziękuję
Pani Prof. nadzw. dr hab. Małgorzacie Giel - Pietraszuk
za opiekę naukową, okazaną pomoc oraz cenne uwagi podczas przygotowywania niniejszej
pracy*

*Składam podziękowania
Panu Prof. dr hab. Janowi Barciszewskiemu
dziękuję za wprowadzenie w świat nauki, współpracę i nieustanny doping naukowy*

*Bardzo dziękuję Prof. dr hab. Mirosławie Z. Naskręt-Barciszewskiej
za współpracę i oraz okazaną życzliwość*

*Serdecznie dziękuję
mgr Agnieszce Belter
dr Beacie Plitta*

prof. nadzw. dr hab. Elizie Wyszko

*Iwonie Gawrońskiej
dr Katarzynie Rolle
dr Agnieszce Fedoruk-Wyszomirskiej
dr Monice Piweckiej
dr Marcie Gabryjelskiej
mgr inż. Patrycji Sosińskiej
mgr Dariuszowi Wawrzyniakowi
oraz wszystkim Pracownikom Zespołu Biosyntezy Białka
za miłą atmosferę oraz okazaną pomoc*

Szczególne podziękowania składam

*Mojemu Mężowi
za wyrozumiałość, cierpliwość, wsparcie i wiarę we mnie*

*Mojej Rodzinie, Mamie, Babci i Córce Marysi
"Dzieci są skrzydłami człowieka"*

Spis treści

Spis treści	1
1. Wprowadzenie i cel pracy	4
2. Wykaz ważniejszych skrótów	7
3. Opracowanie literaturowe	9
3.1. Charakterystyka syntetaz aminoacylo - tRNA	9
3.1.1. Budowa i podział na klasy	9
3.1.2. Mechanizm aminoacylacji tRNA	11
3.1.3. Rozszerzenie kodu genetycznego	13
3.1.4. Inne funkcje aaRS	15
3.2. Inhibitory syntetaz aminoacylo - tRNA	17
3.2.1. Sposoby hamowania reakcji aminoacylacji tRNA	17
3.2.2. Konsekwencje zahamowania aminoacylacji tRNA	19
3.2.3. Naturalne inhibitory aaRS	20
3.2.4. Syntetyczne i półsyntetyczne inhibitory aaRS	27
3.3. TyrRS prokariota i eukariota	37
4. Materiały i metody	43
4.1. Wykaz materiałów stosowanych w pracy	43
4.1.1. Ważniejsze odczynniki i enzymy	43
4.1.2. Pożywki, bufor i roztwory	44
4.1.3. Związki niskocząsteczkowe	48
4.1.4. Oligodeoksyrybonukleotydy	49
4.1.5. Plazmidy	49
4.1.6. Materiał biologiczny	50
4.2. Metody rozdziału i analizy kwasów nukleinowych	52
4.2.1. Elektroforetyczny rozdział kwasów nukleinowych w denaturujących żelach poliakrylamidowych	52
4.2.2. Elektroforetyczny rozdział kwasów nukleinowych w żelach agarozowych	52
4.2.3. Wykrywanie kwasów nukleinowych w żelach i roztworze	53
4.2.4. Izolacja tRNA z <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> i <i>P. aeruginosa</i>	53
4.2.5 Izolacja tRNA z wątroby <i>S.scrofa domestica</i>	54
4.3. Hodowle bakteryjne	55
4.3.1. Hodowla bakterii <i>E. coli</i> do izolacji tRNA	55
4.3.2. Przygotowanie komórek kompetentnych <i>E. coli</i>	55

4.3.3. Transformacja bakterii plazmidowym DNA metodą szoku cieplnego.....	56
4.3.4. Określanie minimalnego stężenia hamującego (MIC ₅₀).....	56
4.4. Izolacja plazmidowego DNA z hodowli bakteryjnych.....	56
4.5. Przygotowanie plazmidu i insertu do klonowania i transformacji bakterii	57
4.5.1. Amplifikacja DNA metodą PCR	57
4.5.2. Hydroliza plazmidu i insertu TyrRS enzymami restrykcyjnymi	58
4.5.3. Ligacja	59
4.5.4. Transformacja bakterii.....	60
4.5.5. Analiza transformantów	60
4.5.6. Klonowanie fragmentu <i>tyrS</i> z plazmidu propagacyjnego do wektora ekspresyjnego	60
4.6. Hodowle komórkowe	60
4.6.1. Hodowla komórek HEK 293T.....	60
4.6.2. Hodowla komórek VERO	61
4.6.3. Przechowywanie linii komórkowych	61
4.6.4. Analiza cytotoksyczności i hamowania proliferacji komórek przez związki niskocząsteczkowe (test MTT).....	61
4.7. Izolacja i nadprodukcja białek.....	62
4.7.1. Przygotowanie mieszaniny enzymów z <i>S. aureus</i> i <i>P. aeruginosa</i>	62
4.7.2. Przygotowanie mieszaniny enzymów z wątroby <i>S.scrofa domestica</i>	62
4.7.3. Oznaczanie stężenia białka metodą Bradford.....	63
4.7.4. Nadprodukcja syntetazy tyrozylo - tRNA <i>E. coli</i>	63
4.7.5. Oczyszczanie białka na złożu chitynowym	64
4.7.6. Elektroforetyczny rozdział białek.....	64
4.8. Reakcja aminoacylacji tRNA	65
4.8.1. Określanie warunków reakcji i stężeń poszczególnych substratów	65
4.8.2. Wyznaczanie kinetyki reakcji aminoacylacji tRNA.....	65
4.8.3. Analiza związków niskocząsteczkowych.....	66
4.8.4. Wyznaczanie kinetyki reakcji w obecności inhibitora	66
5. Wyniki i ich dyskusja	68
5.1. Reakcja aminoacylacji <i>in vitro</i>	71
5.1.1. Nadekspresja i oczyszczanie TyrRS z <i>E. coli</i>	72
5.1.2. Izolacja mieszaniny aaRS z bakterii <i>S. aureus</i> i <i>P. aeruginosa</i>	76
5.1.3. Izolacja mieszaniny tRNA z bakterii <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> oraz wątroby <i>S. scrofa domestica</i>	76
5.1.4. Określenie warunków aminoacylacji <i>in vitro</i>	77
5.2. Badanie wpływu związków niskocząsteczkowych na aktywność rekombinowanej TyrRS <i>E. coli in vitro</i>	80

5.2.1. Związki naturalne	80
5.2.2. Związki syntetyczne	93
5.3. Badanie wpływu związków niskocząsteczkowych na aktywność TyrRS <i>S. aureus</i> i <i>P. aeruginosa</i> oraz <i>S. scrofa domestica in vitro</i>	102
5.4. Wyznaczenie minimalnego stężenia hamującego (MIC ₅₀) dla inhibitorów.	107
5.5. Oznaczenie cytotoksyczności i hamowania proliferacji linii komórkowych przez badane związki niskocząsteczkowe	108
5.6. Badanie wpływu wybranych inhibitorów na inwazyjność <i>E. coli</i> wobec komórek VERO	110
6. Podsumowanie.....	111
7. Literatura	112

Załącznik

Wykaz testowanych związków niskocząsteczkowych

1. Wprowadzenie i cel pracy

Syntetazy aminoacylo - tRNA (EC 6.1.1.) spełniają kluczową rolę w metabolizmie komórki, katalizując przyłączenie właściwego aminokwasu do specyficznego tRNA. Produkt reakcji, aa - RNA pośredniczy w procesie tłumaczenia informacji zapisanej w postaci sekwencji nukleotydowej na sekwencję aminokwasową. Syntetazy aminoacylo - tRNA (aaRS) są zatem unikalnymi enzymami działającymi na granicy dwóch światów - świata kwasów nukleinowych i białek. Zahamowanie aminoacylacji tRNA prowadzi do akumulacji wolnych cząsteczek tRNA, które wiążąc się do rybosomów powodują zatrzymanie przebiegającej na nich elongacji łańcucha peptydowego. Zatem inhibicja aktywności jednej lub kilku aaRS hamuje syntezę białka i wywołuje zmiany w metabolizmie komórki prowadzące do jej śmierci [1].

Poznanie sekwencji i struktury aaRS różnych organizmów umożliwiło zrozumienie mechanizmu reakcji aminoacylacji. Uwidocznilo również różnice pomiędzy prokariotycznymi i eukariotycznymi aaRS, które można wykorzystać projektując inhibitory selektywnie hamujące enzymy bakteryjne. Z kolei podobieństwo aaRS różnych bakterii chorobotwórczych umożliwia projektowanie leków o szerokim spektrum działania.

Celem moich badań było znalezienie nowych inhibitorów reakcji aminoacylacji tRNA katalizowanej przez syntetazę tyrozylo - tRNA (TyrRS) prokariotów, które w przyszłości mogą być podstawą do opracowania nowego terapeutyku.

Wybór syntetazy tyrozylo - tRNA z *Escherichia coli* podyktowany był spostrzeżeniem, że syntetazy tyrozyłowe prokariotów i eukariotów wykazują największe spośród wszystkich syntetaz różnice struktury i sposobu działania oraz tym, że ich udział w całkowitej puli syntetaz aminoacylo - tRNA jest stosunkowo niewielki.

Centrum katalityczne TyrRS tworzone jest przez strukturę Rossmanna, natomiast występujące w jego obrębie wariacje sekwencji aminokwasowej w znaczący sposób wpływają na różnice w jego geometrii u różnych organizmów [2]. Rozbieżności występują również poza domeną katalityczną, w miejscu wiązania antykodonu. Koniec karboksylowy białka prokariotycznego stanowi domena α - ACB oraz domena wykazująca homologię do końca C białka rybosomalnego S4. W białku eukariotycznym natomiast jest to domena C-W/Y i Ct [3].

O wyborze bakterii, przeciwko którym mają być skierowane wyselekcjonowane inhibitory zdecydowało ich znaczenie w epidemiologii zakażeń wywoływanych u ludzi. Szczepy gronkowca złocistego odporne na metycylinę (MRSA: *methicilin resistant Staphylococcus aureus*) oraz wielooporne pałeczki niefermentujące z rodzaju *Pseudomonas* są, zarówno w Polsce jak i na świecie, powodem ciężkich zakażeń (również szpitalnych).

Obecnie znanych jest wiele naturalnych inhibitorów kompetycyjnie hamujących syntetazy aminoacylo - tRNA. Wśród nich są m.in. mupirocyna, borelidyna, indolmycyna, chuangsinsinmycyna, agrocyna, ochratoksyna A, furanomycyna, granatycyna i reveromycyna A. Jednak za sprawą zbyt niskiej selektywności wobec bakterii chorobotwórczych, wysokiej toksyczności w stosunku do komórek gospodarza oraz niestabilności większość z nich, z wyjątkiem mupirocyny (IleRS), nie została wprowadzona na rynek. AN-2690 oraz icofungipen skierowane przeciwko IleRS patogenów grzybowych, znajdują się obecnie odpowiednio w III i II fazie badań klinicznych [4,5]. Wobec obserwowanej szybkiej ewolucji bakterii i nabywania przez nie oporności na obecnie stosowane terapeutyki istnieje ryzyko, że

w najbliższej przyszłości pojawi się poważny problem braku skutecznych terapeutyków do leczenia groźnych dla zdrowia i życia zakażeń (np. sepsa). W tej sytuacji poszukiwanie nowych bezpiecznych dla ludzi terapeutyków, hamujących rozwój patogennych bakterii jest niezwykle ważnym zadaniem dla medycyny molekularnej.

Niniejsza rozprawa jest wynikiem prac związanych z poszukiwaniem nowych inhibitorów reakcji aminoacylacji prokariota. Realizowałam następujące cele badawcze:

1. Izolacja i rozdział tRNA z bakterii (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) i wątroby świńskiej (*Sus scrofa domestica*),
2. Klonowanie, nadprodukcja i oczyszczanie TyrRS *E. coli*,
3. Opracowanie warunków reakcji aminoacylacji *in vitro* dla oceny aktywności potencjalnych inhibitorów,
4. Wyznaczenie wartości IC_{50} wobec TyrRS prokariota dla wszystkich aktywnych związków niskocząsteczkowych,
5. Wyznaczenie wartości stałej inhibicji (K_i) oraz określenie typu inhibicji badanych związków niskocząsteczkowych wobec TyrRS prokariota dla inhibitorów naturalnych o $IC_{50} < 200 \mu M$,
6. Ocena zależności pomiędzy właściwościami fizykochemicznymi i aktywnością inhibitorową wybranych związków,
7. Ocena wpływu wyselekcjonowanych inhibitorów na aktywność eukariotycznej TyrRS,
8. Analiza cytotoksyczności badanych związków na liniach komórkowych,
9. Oznaczenie wartości MIC_{50} wybranych związków dla *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*,
10. Określenie wpływu wybranych inhibitorów na żywotność komórek VERO zakażonych inwazyjnym, wnikającym do komórek szczepem *E. coli*.

Część zagadnień omawianych w niniejszej pracy zostało opublikowanych:

1. Eitner K, Gawęda T, Hoffmann M, **Jura M**, Rychlewski L, Barciszewski J. eHiTS-to-VMD Interface Application. The Search for Tyrosine - tRNA Ligase Inhibitors, *J.Chem.Inf.Model.* 47, 695-702 (2007),
2. **Jura M**, Rychlewski L, Barciszewski J. Comprehensive Insight into Human Aminoacyl - tRNA Synthetases as Autoantigens in Idiopathic Inflammatory Myopathies. *Crit.Rev.Immunol.* 27, 559-72 (2007),
3. Belter A, **Skupińska M**, Giel - Pietraszuk M, Rychlewski L, Barciszewski J. Syntetazy aminoacylo - tRNA – znaczenie fizjologiczne i patologiczne. *Na Pograniczu Chemii i Biologii* tom XX, 313-320 (2008),
4. **Skupińska M**, Belter A, Giel - Pietraszuk M, Rychlewski L, Barciszewski J. Znaczenie syntetaz aminoacylo - tRNA w patologiach i perspektywa ich wykorzystania w diagnostyce i terapii. *Postępy Biochemii.* 55(4): 373-384 (2009).
5. **Skupińska M**, Łętowska I, Giel-Pietraszuk M, Barciszewski J. Plant compounds - inhibitors of aminoacyl-tRNA synthetase in potential antibacterial therapy. Przygotowana do druku.

Ponadto, opublikowano prace związane z innym realizowanym tematem badawczym:

5. **Skupińska M**, Belter A, Giel - Pietraszuk M, Grabarkiewicz T, Hoffmann M, Rychlewski L, Barciszewski J. Monooksygenaza skwalenu – cel terapii hipercholesterolemii. *Na Pograniczu Chemii i Biologii* tom XX, 321-346 (2008),
6. Belter A, **Skupińska M**, Giel - Pietraszuk M, Grabarkiewicz T, Rychlewski L., Barciszewski J. Squalene monooxygenase – a target for hypercholesterolemic therapy. *Biol. Chem.* 392(12), 1053-1075 (2011).

2. Wykaz ważniejszych skrótów

- A – adenina
- aa – aminokwas
- Å – angstrom ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
- aa - AMP – aminoacylo - AMP
- aa – tRNA – aminoacylo - tRNA
- aaRS – syntetaza aminoacylo - tRNA
- AMP – monofosforan adenozyne
- ATP – trifosforan adenozyne
- Ap₃A – trifosfataza diadenozyne
- Ap₄A – tetrafosfataza diadenozyne
- APS – nadsiaraczan amonu
- ATP – trifosforan adenozyne
- BrEt – bromek etydyne
- BSA – albumina z surowicy wołowej
- C – cytozyna
- C - TyrRS – karboksylowy koniec syntetazy tyrozylowej
- cDNA – DNA komplementarny do mRNA
- CFU – jednostki tworzące kolonie (*ang. colony-forming units*)
- CP1 – białko łączące polipeptyd (*ang. connective polypeptide 1*)
- cpm – ilość rozpadów promieniotwórczych na minutę (*ang. counts per minute*)
- Da – dalton, jednostka masy atomowej
- DMSO – dimetylosulfotlenek
- DNA – kwas deoksyrybonukleinowy
- dsDNA – dwuniciowy DNA
- DTT – ditiotretiol
- EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy
- G – guanina
- GDP – difosforan guanozyne
- GSH – glutation
- GST – S-transferaza glutationu
- GTP – trifosforan guanozyne
- IPTG – izopropyl β - D - tiogalaktopiranozyd
- IC₅₀ – stężenie inhibitora powodujące 50% inhibicję (*ang. half maximal inhibitory concentration*)
- Ha – atom będący akceptorem wiązania wodorowego
- Hd – atom będący donorem wiązania wodorowego
- His - Tag – metka histydynowa
- kDa – kilodalton ($1 \text{ kDa} = 1000 \text{ Da}$)
- K_i – stała inhibicji (*ang. inhibition constant*)
- K_d – stała dysocjacji (*ang. dissociation constant*)
- K_m – stała Michaelisa

- LogP – logarytm współczynnika rozdziału P, będącego stosunkiem stężeń danego związku w dwóch niemieszających się rozpuszczalnikach (oktanol/woda) w stanie równowagi
- MCS – miejsce wielokrotnego klonowania (*ang. multiple cloning sites*)
- MIC – minimalne stężenie hamujące (*ang. minimal inhibitory concentration*)
- MIC₅₀ – minimalne stężenie antybiotyku hamujące wzrost 50% kolonii bakterii
- mRNA – informacyjny RNA (*ang. messenger RNA*)
- MRSA – gronkowiec złocisty oporny na metycylinę (*ang. methicilin resistant Staphylococcus aureus*)
- MSC – kompleks multienzymatyczny syntetaz (*ang. multisynthetase complex*)
- mt - aaRS – mitochondrialne syntetazy aminoacylo - tRNA
- MTT – bromek 3 - [4,5 - dimetylotiazol - 2 - ylo] - 2,5 - difenylotetrazolowy
- M_w – ciężar cząsteczkowy (*ang. molecular weight*)
- nt – nukleotyd
- OD – gęstość optyczna
- PAA – poliakrylamid
- PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy
- RNA – kwas rybonukleinowy
- rRNA – rybosomalny RNA (*ang. ribosomal RNA*)
- PMSF – fluorek fenylometrylosulfonylu
- pz – para zasad
- rpm – obrót na minutę (*ang. rotation per minute*)
- SAR – zależność pomiędzy strukturą a działaniem biologicznym (*ang. structure activity relationship*)
- ssDNA – jednoniciowy DNA
- T – tymina
- TEMED – tetrametylenodwuamina
- TF – czynnik transkrypcyjny (*ang. transcription faktor*)
- TNFα – czynnik martwicy nowotworów
- Tris – hydroksymetyloaminometan
- TyrRS – syntetaza tyrozylo-tRNA
- tRNA – transferowy RNA (*ang. transfer RNA*)
- U – jednostka aktywności enzymatycznej
- WO – wiązanie obrotowe

3. Opracowanie literaturowe

3.1. Charakterystyka syntetaz aminoacylo - tRNA

W roku 1957 ukazała się praca autorstwa Hoaglanda, Zamecnika i wsp., w której pokazano proces aktywacji aminokwasów oraz ich przeniesienie na cząsteczki obecne we frakcji RNA. Dowiedziono także, że proces ten zachodzi w obecności enzymów i jest kluczowym etapem w biosyntezie białek [6]. Dziś, ponad pół wieku po tym odkryciu wiadomo, że aminokwas przenoszony jest na cząsteczkę transportującego RNA (tRNA) w dwuetapowej reakcji katalizowanej przez swoiste enzymy – syntetazy aminoacylo - tRNA.

Sugeruje się, że aaRS są jednymi z pierwszych enzymów. Zgodnie z teorią „świata RNA” zanim pojawiły się syntetazy, aminoacylacja katalizowana była przez rybozomy, które w procesie ewolucji stopniowo zostały zastąpione najpierw poprzez kompleksy RNA - białko a następnie przez zróżnicowaną rodzinę białek [7]. Pierwsze aaRS charakteryzowały się niezwykle prostotą. Jedna domena odpowiadała zarówno za aktywację aminokwasu jak i rozpoznanie małej, helikalnej cząsteczki RNA przypominającej ramię akceptorowe współczesnych tRNA. W toku ewolucji zyskały one dodatkowe domeny (m. in. wiążącą ramię antykodonu), dzięki czemu stały się bardziej specyficzne zarówno w stosunku do powstałych, różnorodnych cząsteczek tRNA jak i poszczególnych aminokwasów [8].

3.1.1. Budowa i podział na klasy

aaRS znacznie różnią się między sobą sekwencją oraz długością łańcucha aminokwasowego, a co za tym idzie również strukturą przestrzenną [9].

Poznanie struktury krystalicznej SerRS i kompleksu AspRS z tRNA^{Asp} pozwoliło na ustalenie elementów wspólnych w ogólnej budowie i strukturze miejsca aktywnego, odróżniających je od dwóch innych poznanych wcześniej syntetaz – GlnRS i TyrRS [10,11].

W miarę poznawania nowych członków rodziny syntetaz aminoacylo - tRNA odkrywano ich różnorodność. Dotyczy ona zarówno wielkości poszczególnych aaRS, ich sekwencji a także struktury trzecio- i czwartorzędowej. Po szczegółowej analizie enzymów pochodzących z różnych gatunków okazało się jednak, że możliwe jest wyodrębnienie charakterystycznych dla ich struktury motywów. To z kolei było punktem wyjścia do podziału aaRS na dwie klasy [Tab. 3.1] [12].

Miejsce aktywne enzymów klasy I tworzy tzw. struktura Rossmanna zbudowana z co najmniej trzech równoległych struktur β połączonych helisami α - motyw: β - α - β - α - β . W jej obrębie znajdują się dwa charakterystyczne motywy: HIGH i KMSKS stanowiące miejsce wiązania ATP (Rys. 3.1). Syntetazy klasy II wyróżnia natomiast miejsce aktywne składające się z antyrównoległych struktur β otoczonych helisami α oraz trzy konserwowane motywy [13]. Motyw 1 to długa helisa α połączona ze strukturą β , motyw 2 – dwie antyrównoległe

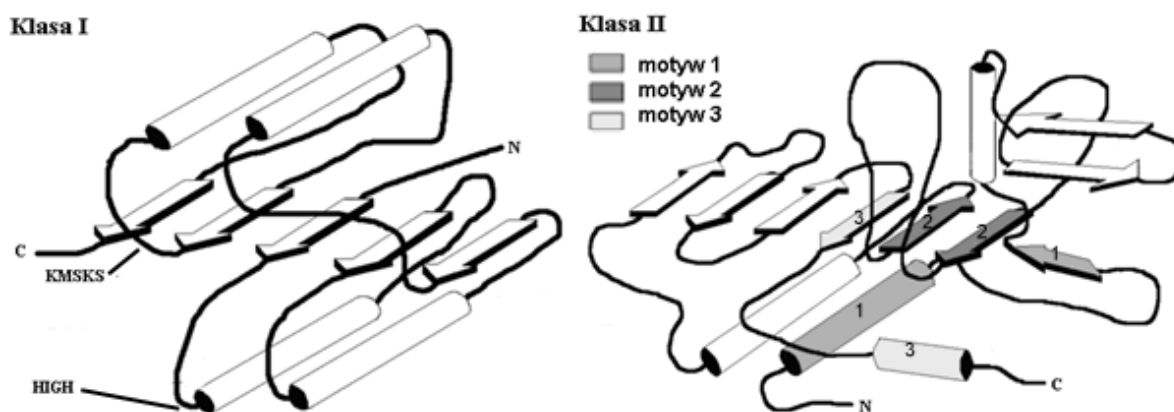
struktury β połączone pętlą, motyw 3 – struktura β z helisą α (Rys. 3.1). Motyw 1 uczestniczy w oddziaływaniach między domenami, motywy 2 i 3 są częścią miejsca aktywnego.

Tab. 3.1. Cechy budowy syntetaz aminoacylo - tRNA

Cecha	Klasa aaRS	
	I	II
Struktura miejsca aktywnego Charakterystyczne motywy	Domena Rossmanna HIGH KMSKS	Antyrównoległe struktury β motyw 1 – $\phi G\Theta_{xx}\Theta_{xx}P\Theta\Theta$ motyw 2 – $\phi\Theta\Theta_{xvxxx}(F/Y/H)RxE$ motyw 3 – $x\Theta G\Theta G\Theta G\Theta ER\Theta\Theta\Theta\Theta\Theta$
Miejsce wiązania tRNA do syntetazy	Mniejsza bruzda ramienia akceptorowego tRNA	Większa bruzda ramienia akceptorowego tRNA
Pozycja ramienia dodatkowego tRNA	Skierowane na zewnątrz kompleksu tRNA - aaRS	Zwrócone do wnętrza kompleksu tRNA - aaRS
Miejsce aminoacylacji 3' końcowej rybozy tRNA	2'-OH	3'-OH (wyjątek PheRS)
Konformacja przyłączonego ATP	Rozluźniona	Napięta
Podklasy	Ia: IleRS (α), LeuRS (α), ValRS (α), CysRS (α), MetRS (α lub α_2), ArgRS (α) Ib: GlnRS (α), GluRS (α), LysRS-I (α) Ic: TyrRS (α_2), TrpRS (α_2)	IIa: AlaRS (α lub α_4), ProRS (α_2), HisRS (α_2), SerRS (α_2), ThrRS (α_2), GlyRS (α_2 lub $\alpha_2\beta_2$) IIb: AsnRS (α_2), AspRS (α_2), LysRS-II (α_2) IIc: PheRS ($\alpha\beta$) ₂

Charakterystyczne motywy przedstawiono w kodzie literowym (ϕ – aminokwas obdarzony ładunkiem dodatnim, Θ – aminokwas hydrofobowy, x – dowolny aminokwas). W nawiasach przedstawiono rodzaj struktury czwartorzędowej poszczególnych aaRS: α – monomer, α_2 – homodimer, α_4 – homotetramer, $(\alpha\beta)_2$ – dimer zbudowany z dwóch podjednostek.

Podział aaRS na klasy znajduje odzwierciedlenie w mechanizmie ich działania. aaRS klasy I przyłączają aminokwas do grupy 2'-OH adenozyiny znajdującej się przy końcu 3' cząsteczki tRNA, klasy II natomiast do grupy 3'-OH. Wyjątkiem jest PheRS – enzym klasy II, przyłączający aminokwas do grupy 2'-OH [12]. Natomiast wśród LysRS można wyróżnić te, które działają zgodnie z mechanizmem charakterystycznym dla syntetaz klasy I (LysRS-I) oraz klasy II (LysRS-II); pierwsze z nich występują głównie u archeonów, drugie u wszystkich eukariotów i większości bakterii. Postęp w poznaniu genomów dostarcza coraz liczniejszych przykładów współistnienia obu rodzajów LysRS w jednym organizmie [14,15].



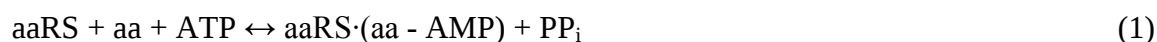
Rys. 3.1. Topologia miejsca aktywnego syntetaz klas I i II.

Dalszy podział syntetaz aminoacylo - tRNA na podklasy wynika z chemicznej natury przyłączanego aminokwasu [Tab. 3.1] [16].

Porównując strukturę czwartorzędową syntetaz aminoacylo - tRNA można zauważyć, że większość aaRS klasy I występuje w postaci monomerów. Wyjątek stanowią syntetazy: TyrRS i TrpRS - dimery stanowiące odrębną podklasę Ic. Enzymy klasy II wykazują z kolei tendencję do tworzenia symetrycznych dimerów wiążących dwie cząsteczki tRNA, jak np. AspRS [17]. Zdarzają się również przypadki, że obie podjednostki dimeru współtworzą miejsce aktywne i uczestniczą w wiązaniu jednej cząsteczki tRNA, np. SerRS *T. thermophilus* [18]. Część syntetaz klasy II występuje w postaci tetramerów zbudowanych bądź z dwóch podjednostek $(\alpha\beta)_2$ – PheRS [19], bądź homotetrameru α_4 – AlaRS [20].

3.1.2. Mechanizm aminoacylacji tRNA

Mimo iż rodzinę aaRS cechuje niezwykła różnorodność sekwencji i struktur, enzymy te katalizują reakcję aminoacylacji wg zbliżonego mechanizmu. W pierwszym etapie następuje aktywacja aminokwasu, efektem czego jest utworzenie aminoacyloadenylationu (1). Jest to mieszany bezwodnik, w którym grupa karboksylowa aminokwasu jest związana z grupą fosforanową AMP. Do syntezy aa - AMP zasadniczo nie jest wymagana cząsteczka tRNA, wyjątkiem są ArgRS, GluRS, GlnRS. W drugim etapie następuje przyłączenie aminokwasu do grupy 2'-OH (klasa I aaRS) lub 3'-OH (klasa II aaRS) adenozyiny przy końcu 3' tRNA, efektem czego jest powstanie aminoacylo - tRNA (2) [21].



Poznanie struktur krystalicznych kompleksów poszczególnych syntetaz z substratami, produktami pośrednimi reakcji i ich analogami, umożliwiło zrozumienie mechanizmu pierwszego etapu reakcji aminoacylacji. Utworzenie kompleksu aktywnego następuje w wyniku związania przez enzym aminokwasu, ATP oraz jonów Mg^{2+} , a w przypadku ArgRS, GluRS, GlnRS również specyficznego tRNA. Miejsca wiązania wymienionych składników kompleksu są swoiste dla danej klasy. Topologia kieszeni wiążącej ATP jest podobna u wszystkich aaRS klasy I. Wyróżniono w niej charakterystyczne sekwencje KMSKS i HIGH wchodzące w skład struktury Rossmanna, z niewielkimi różnicami jak np. $^{243}KISKR^{247}$ i $^{15}HVGT^{18}$ w GluRS *E. coli*. Większe różnice występują w obrębie miejsc wiązania aminokwasu, co zapewnia selektywność aaRS [22,23].

GluRS jest jednym z trzech enzymów, obok GlnRS i ArgRS, które aktywują aminokwas jedynie w obecności odpowiedniego tRNA. W tym przypadku fosforan w pozycji α - ATP i grupę α - karboksylową aminokwasu dzieli zbyt duża odległość (6.2Å), aby możliwe było utworzenie wiązania. Dopiero przyłączenie tRNA zmienia konformację aaRS skutkiem czego jest zbliżenie grupy α - karboksylowej do fosforanu α ATP na odpowiednią odległość. Po związaniu w kieszeni aktywnej syntetaz klasy II, ATP przyjmuje charakterystyczną konformację, w której atomy fosforu β i γ znajdują się w sąsiedztwie adeniny, dzięki czemu fosforan α zostaje wyeksponowany w kierunku grupy karboksylowej aminokwasu. Taka zmiana konformacji ATP pozwala na atak nukleofilowy grupy α - karboksylowej na fosfor α cząsteczki ATP i utworzenie aa - AMP [23].

W tworzeniu kompleksu aa - tRNA - aaRS biorą udział również jony Mg^{2+} . Dodatnio naładowane jony oddziałujące z atomami fosforu w pozycjach β i γ w GlnRS ekranują ich ładunki ujemne stabilizując cząsteczkę ATP. W przypadku innych syntetaz jony Mg^{2+} ulokowane są między fosforanami α i β uczestnicząc w stabilizacji pięciokoordynacyjnego stanu przejściowego. W kompleksach syntetaz klasy II stwierdzono obecność trzech jonów magnezu (w tym jednego związanego z ATP). Enzymy klasy I wykazują aktywność po związaniu jednego jonu Mg^{2+} . Zaobserwowano również, że jony te determinują szybkość dysocjacji kompleksu enzym - aa - tRNA wpływają zatem na szybkość obrotu syntetaz [24].

Pomimo wysokiej specyficzności aaRS zdarzają się jednak przypadki błędnej acylacji tRNA. Zjawisko to obserwuje się najczęściej dla aa o podobnej strukturze np. Ile, Val i Thr. W celu zapobieżenia błędnej aminoacylacji, syntetazy wykształciły mechanizm naprawczy. IleRS i ValRS posiadają tzw. domenę redagującą, która znajduje się poza miejscem aktywnym enzymu. Domena ta hydrolizuje aminoacyloadenylany błędnie rozpoznanych aminokwasów. Inne aaRS wykazują dodatkowo aktywność deacylazy niepoprawnych aa - tRNA [20].

W drugim etapie reakcji następuje związanie cząsteczki tRNA do enzymu oraz jej aminoacylacja. Różnice w strukturze i sekwencji między poszczególnymi tRNA umożliwiają ich prawidłowe rozpoznanie przez odpowiednią syntetazę. Najistotniejszymi determinantami specyficzności tRNA są: pętla antykodonu, ramię akceptorowe oraz nukleotydy występujące w ramieniu D i T. Są one głównymi miejscami kontaktu tRNA z aaRS, które zajmują około 20% powierzchni enzymu [13]. Miejsca wiązania ramienia akceptorowego oraz 3' końca cząsteczki tRNA enzymów klasy I i II wydają się być swoimi odbiciami lustrzanymi. aaRS klasy I oddziałują z nukleotydami w mniejszej bruździe ramienia akceptorowego tRNA, klasy II – większej bruździe. GlnRS (klasa I) wiąże się z nukleotydami znajdującymi się w

mniejszej bruździe ramienia akceptorowego za pośrednictwem helisy α i pętli, AspRS (klasa II) – z adenozyną przy końcu 3' tRNA oraz pierwszym nukleotydem znajdującym się w większej bruździe z udziałem długiej pętli, w obrębie której znajduje się motyw 2. Częsteczka tRNA związana z syntetazą przyjmuje charakterystyczną konformację. W kompleksach aaRS klasy I ramię dodatkowe tRNA znajduje się na powierzchni kompleksu, natomiast klasy II wewnątrz. Różnice obserwowane są również w konformacji końca 3', który w kompleksie AspRS - tRNA^{Asp} jest prosty, w GlnRS - tRNA^{Gln} zagięty. Konsekwencją tych różnic jest odmienny mechanizm syntezy aa - tRNA [13]. W wyniku wiązania tRNA przez aaRS następuje zmiana konformacji pętli z motywem KMSKS (klasa I), a w klasie II pętli między motywem 1 i 2. Dodatkowo, rozpoznanie właściwego antykodonu w tRNA indukuje zmiany konformacji enzymu zmierzające do maksymalnego zwiększenia kontaktu tRNA z aaRS [17]. Rozpoznanie specyficznego tRNA przez aaRS wymaga identyfikacji unikalnego zestawu elementów: nukleotydów lub zmodyfikowanych nukleotydów w poszczególnych pozycjach tRNA. Elementy identyczności tRNA zlokalizowane są zazwyczaj w ramionach akceptorowym, antykodonu i zmiennym oraz pętli antykodonu tRNA. Są one bardzo różnorodne co powoduje, że aaRS mogą je specyficznym rozpoznawać [25].

3.1.3. Rozszerzenie kodu genetycznego

Tuż po odkryciu syntetaz aminoacylo - tRNA, Francis Crick postulował, że każdemu spośród grupy 20 uniwersalnych dla każdej komórki aminokwasów, odpowiada inna aaRS. Jednak już w 1968 roku zaobserwowano odstępstwa od tej reguły. Jedynie eukarionty i nieliczne bakterie posiadają zestaw 20 aaRS [Tab. 3.2]. W genomach żadnego z poznanych archeonów oraz znacznej większości prokariotów nie stwierdzono genów kodujących GlnRS. Bakterie bardzo często nie posiadają AsnRS, a metanogenne archeony również CysRS [26]. Genom *Methanococcus janashii* zawiera geny kodujące jedynie 16 aaRS. Nie zidentyfikowano w nim genów dla GlnRS, AsnRS, LysRS oraz CysRS, mimo obserwowanej aktywności charakterystycznej dla tych enzymów. Gdy w komórce brak jest swoistych dla aminokwasów i tRNA syntetaz, tworzenie odpowiednich aminoacylo - tRNA może odbywać się w dwustopniowym procesie: najpierw z udziałem nieswoistych syntetaz, następnie amidotransferaz [27]. Podobny mechanizm tworzenia aminoacylo - tRNA obserwowany jest w przypadku selenocysteiny (Sec) – jednego z dwóch aminokwasów wykraczających poza kanoniczny zestaw 20 reszt aminokwasowych [28]. Z kolei dla drugiego z nich – pirolizyny (Pyl) odkryto swoistą syntetazę pirolizylo - tRNA [29].

Tab. 3.2. Strategie syntezy niektórych aa - tRNA

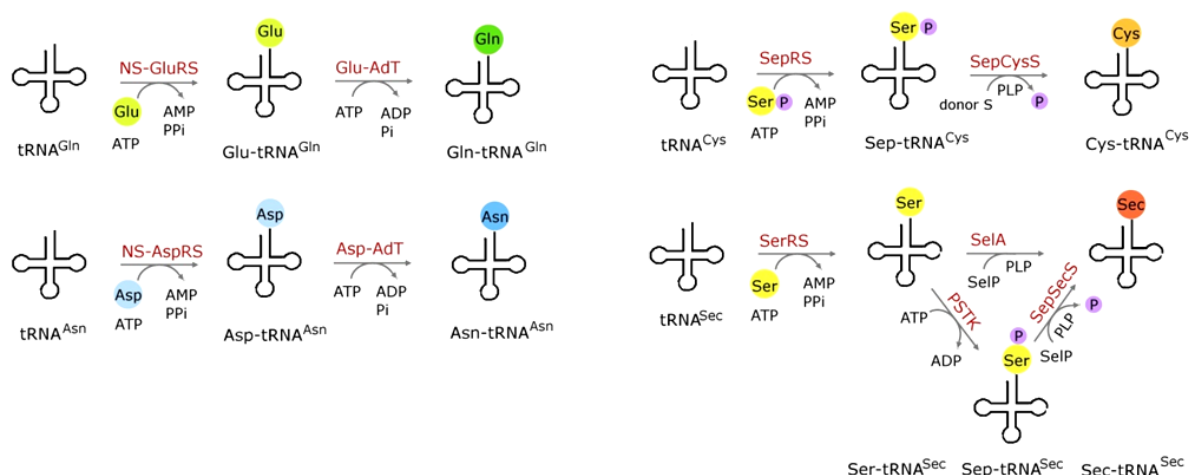
aa - tRNA	Synteza aminoacylo - tRNA	
	Pośredni szlak	Z udziałem swoistej aaRS
Gln - tRNA	Archeony, większość bakterii, chloroplasty	Eukariota, niektóre bakterie
Asn - tRNA	Większość bakterii i archeonów	Eukariota, liczne bakterie i archeony
Cys - tRNA	Metanogenne archeony (z wyjątkiem <i>M. smithii</i> i <i>M. stadtmanae</i>) i <i>A. fulgidus</i>	Eukariota, bakterie, archeony
Sec - tRNA	Eukariota, archeony, bakterie wstawiające Sec w pozycję kodonu UAG	Żaden ze znanych organizmów
Pyl - tRNA	Brak znanych przykładów	Metanogenne archeony i niektóre bakterie Gram (+)

We wszystkich znanych archeonach, komórkach bakteryjnych i chloroplastach, w których brak GlnRS, synteza Gln - tRNA^{Gln} katalizowana jest przez GluRS o obniżonej specyficzności w stosunku do tRNA^{Glu}, zdolnej również do wiązania tRNA^{Gln}. W pierwszym etapie powstaje Glu - tRNA^{Gln}, który poprzez amidację Glu do Gln katalizowaną przez amidotransferazę Glu - tRNA^{Gln} (Glu - AdT), w obecności ATP i donora grupy amidowej zostaje przekształcony w Gln - tRNA^{Gln} (Rys. 3.2) [30]. Synteza Asn - tRNA^{Asn} u organizmów nie posiadających AsnRS przebiega z udziałem AspRS. Asp - tRNA^{Asn} przekształcany jest następnie przez odpowiednią amidotransferazę (Asp - AdT) w Asn - tRNA^{Asn} (Rys. 3.2) [31,32]. W mitochondriach wielu eukariotów stwierdzono obecność Glu - tRNA^{Gln} i Glu-AdT. Wydaje się więc, że eukariotyczne amidotransferazy mogą również uczestniczyć, w syntezie Gln - tRNA^{Gln}. Zdziwiający jest zatem fakt, że mtGluRS tych organizmów nie katalizują aminoacylacji tRNA^{Gln} [32]. Jak dotąd funkcja Glu - AdT i mechanizm powstawania Glu - tRNA^{Gln} u eukariotów nie zostały wyjaśnione.

U archeonów metanogennych i redukujących siarczany, u których nie stwierdzono CysRS w syntezie Cys - tRNA^{Cys} udział biorą dwa dodatkowe enzymy: syntetaza O - fosfoserylo - tRNA (SepRS) i syntaza Sep - tRNA:Cys - tRNA (SepCysS) [33]. SepRS jest syntetazą klasy II występującą w postaci homotetrameru (α_4) katalizującą tworzenie Sep - tRNA^{Cys}, który w reakcji zależnej od fosforanu pirydoksalu (PLP), a katalizowanej przez SepCysS jest przekształcany do Cys - tRNA^{Cys}. Zdarza się, że szlak SepRS/SepCysS współistnieje z CysRS (Rys. 3.2.). U pewnych organizmów jest jednak jedynym, w którym powstaje Cys, gdyż oprócz tego, że nie stwierdzono u nich CysRS nie kodują również enzymów uczestniczących w biosyntezie cysteiny [33,34].

Rozszerzenie kodu genetycznego o selenocysteinę (Sec) było możliwe tylko dzięki wykształceniu wydajnego mechanizmu syntezy Sec - tRNA^{Sec}. Jak dotąd nie poznano syntetazy katalizującej bezpośrednio tworzenie tego kompleksu. U niektórych roślin i bakterii Sec włączana jest w biosyntezę białka za pośrednictwem CysRS i tRNA^{Cys}. Wydajność tej strategii jest niska z powodu ograniczonego stężeniu Sec w komórce [35]. Alternatywą jest synteza selenocysteiny zależna od swoistego dla niej tRNA. W pierwszym etapie SerRS katalizuje wiązanie Ser do tRNA^{Sec} [36]. Następnie syntaza selenocysteiny (SelA)

przekształca Ser w Sec i powstaje Sec - tRNA^{Sec}. Sec włączana jest w sekwencję białka tylko w przypadku, gdy w jego sąsiedztwie znajduje się charakterystyczny element struktury RNA – SECIS (*selenocysteine insertion sequence*) i specyficzny dla selenocysteiny czynnik elongacyjny (SecB) (Rys. 3.2) [37]. U pewnych archeonów i eukariotów Ser - tRNA^{Sec} nie jest przekształcany bezpośrednio w Sec - tRNA^{Sec}. Etapem pośrednim jest utworzenie, z udziałem kinazy O - fosfoserylo - RNA (PSTK), Sep - tRNA^{Sec}, który przekształcany jest ostatecznie w Sec - tRNA^{Sec} w reakcji katalizowanej w obecności selenofosforanu przez syntezę Sep - tRNA:Sec - tRNA (SepSecS). Zarówno SecA, jak i SepSecS są białkami zależnymi od PLP (Rys. 3.2) [38]. Warto w tym miejscu wspomnieć również o pirolizynie (Pyl) i swoistej dla niej syntetazie - PylRS. Aminokwas ten włączany jest do łańcucha polipeptydowego podczas translacji jedynie u pewnej grupy archeonów i bakterii. Wymagana jest do tego zgodność kodonu UAG z sekwencją antykodonu związanej z Pyl cząsteczki tRNA^{Pyl} oraz obecność struktury określonej jako PYLIS (*pyrrolysine insertion sequence*) [39].



Rys. 3.2. Pośrednie szlaki syntezy aa - tRNA (bez udziału specyficznych aaRS).

Glu – kwas glutaminowy, Gln – glutamina, Asp – kwas asparaginowy, Asn – asparagina, Ser – seryna, Cys – cysteina, Sec – selenocysteina, NS - GluRS – GluRS wykazująca specyficzność zarówno do tRNA^{Glu} jak i tRNA^{Gln}, NS - AspRS – AspRS wykazująca specyficzność zarówno do tRNA^{Asp} jak i tRNA^{Asn}, Glu - AdT – amidotransferaza Glu - tRNA^{Gln}, Asp - AdT – amidotransferaza Asp - tRNA^{Asn}, SepRS – syntetaza fosfoserylo - tRNA, SepCysS – syntetaza Sep - tRNA:Cys - tRNA, Sela – syntetaza selenocysteiny, SepSecS – syntetaza Sep - tRNA:Sec - tRNA, PSTK – kinaza O – fosfoserylo - tRNA, PLP – fosforan pirydoksalu.

3.1.4. Inne funkcje aaRS

Od prawidłowego funkcjonowania syntetaz zależy nie tylko biosynteza białka ale również szereg innych procesów komórkowych, często warunkujących przeżycie komórki. Niektóre spośród aaRS regulują ekspresję własnych genów, np. ThrRS z *E. coli*. Enzym ten wiążąc się do odcinka liderowego własnego mRNA, który tworzy strukturę przypominającą kształtem ramię antykodonu tRNA^{Thr}, co uniemożliwia jego związanie z rybosomem, a tym samym syntezę kolejnych cząsteczek enzymu. Z kolei AlaRS reguluje ekspresję własnego genu przez wiązanie się z sekwencją palindromową otaczającą miejsce startu transkrypcji genu *alaS* [40].

Mitochondrialne aaRS mogą uczestniczyć w dojrzewaniu mitochondrialnego RNA. MtTyrRS *N. crassa*, P. anserine, mtLeuRS *S. cerevisiae*, *S. douglasii* rozpoznają i biorą udział w wycinaniu intronów grupy I dzięki znacznemu ich podobieństwu do tRNA [41]. Niektóre z aaRS występujących w mitochondriach, mimo iż nie uczestniczą w składaniu własnych genów, z powodu braku w ich obrębie intronów, posiadają zdolność wycinania intronów z genów innych organizmów. Przykładowo ludzka mtLeuRS nie uczestniczy w dojrzewaniu mRNA własnego genu, ale genu kodującego mtLeuRS *S. cerevisiae* [42].

Niektóre bakteryjne i eukariotyczne LysRS, PheRS, TyrRS zaangażowane są w syntezę alarmonów (Ap₄A, Ap₃A, Ap₄G, Ap₃G, Ap₃Gpp) będących cząstkami sygnałnymi komórki w odpowiedzi na zmieniające się warunki otoczenia [43]. Z kolei GluRS roślin wyższych, glonów, *Eubacteria* i *Archeobacteria* uczestniczą w biosyntezie porfiryny. Produkt reakcji GluRS – glutamyl - tRNA^{Glu} stanowi początek szlaku syntezy związków tetrapirolowych, do których zaliczamy m.in. hem i chlorofil [44]. W genomach *B. subtilis*, *L. lactis* i *Synechocystis spp.* stwierdzono obecność białka uczestniczącego w biosyntezie histydyny i wykazującego podobieństwo do HisRS tych bakterii [45].

aaRS mogą katalizować także przyłączenie aminokwasu do RNA wirusów np. wirusa mozaiki tytoniu TMV i żółtej mozaiki rzepy TYMV. Aminoacylacji ulega koniec RNA wirusa przypominający cząsteczkę tRNA oraz posiadający sekwencję CCA na końcu 3' (dołączaną przez nukleotransferazę tRNA gospodarza). Obecność tej sekwencji na końcu RNA wirusa i związanego z nią aminokwasu chroni kwasy nukleinowe wirusa przed działaniem nukleaz gospodarza [46].

Niektóre syntetazy, jak np. ludzka TyrRS mogą wykazywać aktywność cytokin. Na końcu karboksylowym tej syntetazy znajduje się domena podobna strukturalnie do białka EMAPII (*ang. endothelial - monocyte - activating polypeptide II*) uczestniczącego w odpowiedzi zapalnej i procesie apoptozy. Z kolei domena katalityczna TyrRS ma zdolność wiązania się do receptora interleukiny 8A [47].

Mutacja w genie kodującym GlyRS *A. thaliana* prowadzi do ograniczonego wzrostu rośliny, będącego skutkiem nieprawidłowo wykształconych plastydów. Do prawidłowego ich rozwoju niezbędny jest odpowiedni poziom GlyRS uczestniczącej w przekazywaniu sygnałów między jądrem komórkowym, a plastydami [48].

Istnieje również związek między niektórymi syntetazami a rozwojem embrionalnym zwierząt. Podczas rozwoju gruczołów ślinowych zaobserwowano podwyższony poziom ekspresji TrpRS, TyrRS, SerRS i AlaRS. W kulturach komórek ludzkich zauważono, że poziom ekspresji TrpRS może być regulowany przez czynniki transkrypcyjne aktywowane przez przeciwwirusowy czynnik IFN - γ . Zatem możliwe jest, że podwyższony poziom TrpRS stanowi barierę przed rozwojem wirusów i wewnątrzkomórkowych pasożytów [49].

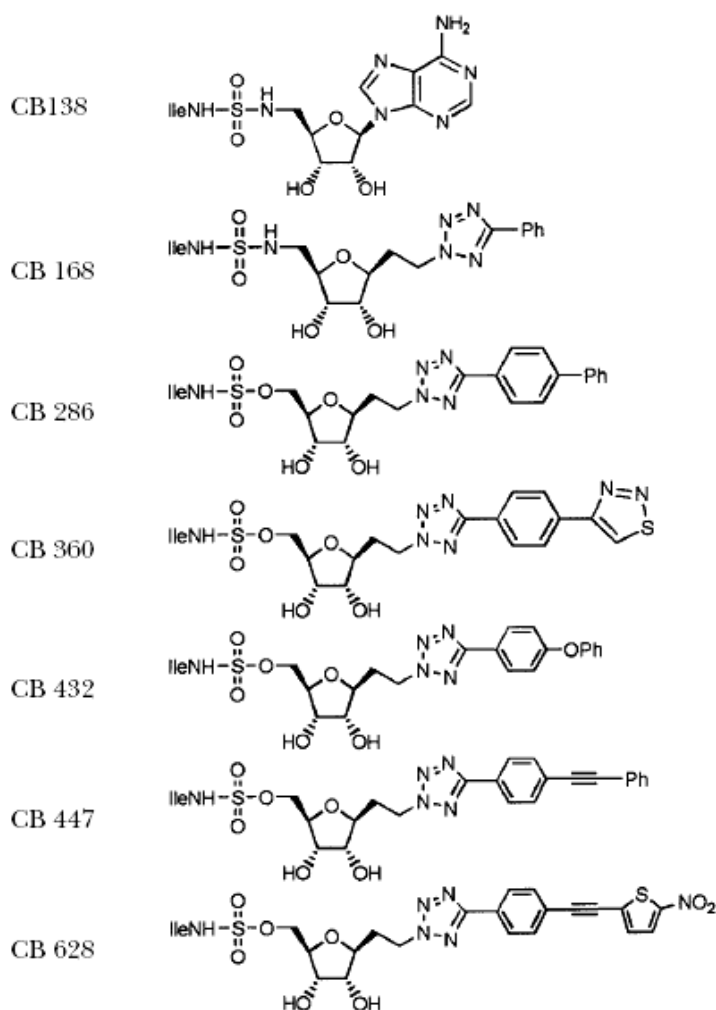
3.2. Inhibitory syntetaz aminocylo - tRNA

3.2.1. Sposoby hamowania reakcji aminoacylacji tRNA

Związki hamujące aktywność syntetaz aminocylo - tRNA można podzielić na inhibitory naturalne i ich pochodne oraz inhibitory półsyntetyczne i syntetyczne. Większość z nich to inhibitory kompetycyjne, konkurujące z substratem o wiązanie w miejscu aktywnym enzymu, najczęściej będące analogiem aminoacyloadenylnu. Mniejszą grupę stanowią inhibitory allosteryczne oraz analogi tRNA.

Aminoacyloadyln, będący produktem pośrednim aminoacylacji jest silniej związany z syntetazą niż aminokwas czy ATP. Stała dysocjacji kompleksu aminoacyloadenyln - aaRS osiąga wartości nano lub pikomolarne, jest zatem o 3 do 4 rzędów wielkości niższa niż K_d dla aa i ATP. Analogi tego związku mają więc wyższy potencjał inhibitorowy niż analogi pojedynczych substratów, co jest pożądaną cechą dla potencjalnego leku. Z drugiej strony przeszkodą do ich użycia może być ich niewystarczająca selektywność i ewentualne oddziaływanie z enzymami gospodarza (wymagana jest minimum 100 - krotna selektywność inhibitora).

Porównanie sekwencji miejsc aktywnych syntetazy izoleucylowej wyizolowanej z 3 patogenów - *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* z ludzkim odpowiednikiem tego enzymu, pozwoliło określić kilka miejsc w obrębie regionu peptydu CP1 (*ang. connective polypeptide 1*) różniących się znacznie między obiema grupami. Inhibitory skierowane przeciwko syntetazom bakteryjnym mogą być projektowane z uwzględnieniem tych właśnie różnic. Przykłady związków, będących inhibitorami kompetycyjnymi syntetazy izoleucylowej przedstawione są na Rys. 3.3. Tworząc je zachowano strukturę adenylnu izoleucyny natomiast labilne wiązanie acylofosforanowe zastąpiono trwałym wiązaniem sulfaminianowym lub sulfonamidowym [16,25].



Rys. 3.3. Wzory strukturalne inhibitorów pochodnych aminoacyloadenylationu.

Celem dla potencjalnych terapeutyków, inhibitorów allosterycznych, może być także domena redagująca enzymu posiadająca aktywność korygującą błędy w aminoacylacji dzięki swojej hydrolitycznej aktywności. Zablockowanie aktywności domeny redagującej może spowodować inhibicję enzymu i w konsekwencji być letalne dla komórki patogenu [50]. Do tej grupy związków które mimikują nieprawidłowo aminoacylowany tRNA należą mało zbadane do tej pory inhibitory np. Nva2AA (2' - (L-norwalilo) amino - 2' - deoksyadenozyna), której celem jest domena redagująca LeuRS [51].

Dla większości enzymów katalizujących procesy metabolizmu komórkowego, miejsce wiążące substraty i produkty znajduje się w domenie katalitycznej. W przypadku aaRS, miejsca wiążące ATP i aa znajdują się w całości kieszeni katalitycznej enzymu stanowiącej głęboką szczelinę w strukturze białka. Ze względu jednak na to, że cząsteczka tRNA ma wielkość porównywalną do enzymu, tylko jej koniec 3' wiąże się w obrębie miejsca aktywnego. Wiązanie innych nukleotydów oddalonych od końca 3' tRNA warunkujące selektywne rozpoznawanie właściwej cząsteczki tRNA następuje poza domeną katalityczną. Również miejsce oddziaływania tRNA - aaRS stanowią dobry cel dla blokowania aktywności katalitycznej enzymu [50].

Jednym ze sposobów hamowania aktywności syntetaz w przypadku bakterii, które wykształciły oporność na istniejące terapeutyki jest jednocześnie zahamowanie kilku syntetaz. Jest to możliwe dzięki elementom struktury zakonserwowanym w całej rodzinie syntetaz lub przynajmniej w obrębie ich klas. W przypadku zastosowania tego typu inhibitorów wykształcenie oporności jest bardzo mało prawdopodobne. Możliwe byłoby jedynie w przypadku, gdyby równocześnie we wszystkich syntetazach będących celem działania terapeutyki zaszły, na skutek mutacji punktowych w genach je kodujących, zmiany warunkujące ich niewrażliwość na lek. Okazało się, że związki hamujące równocześnie wiele syntetaz, mogą równie skutecznie zmniejszać prawdopodobieństwo wykształcenia oporności powstającej na skutek horyzontalnego transferu genów.

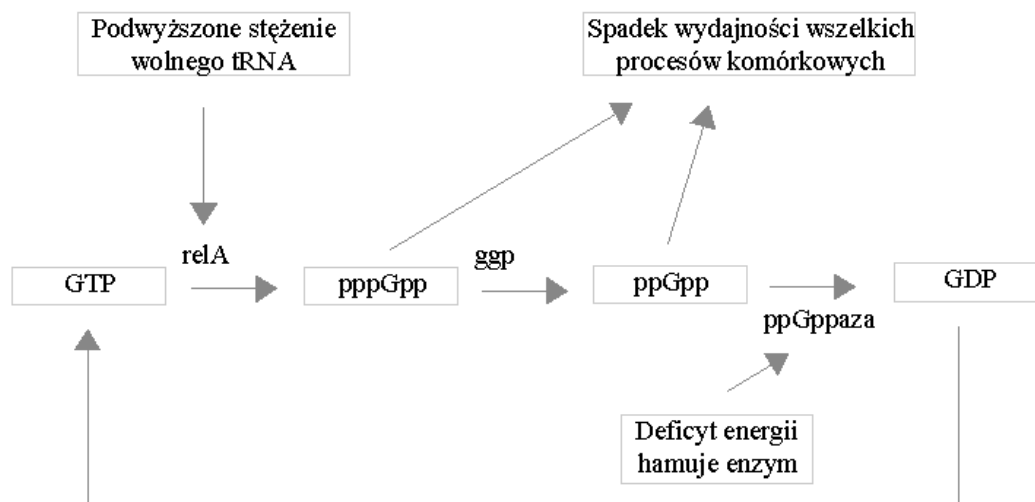
Inną strategią zmierzającą do zwiększenia efektywności terapii i zmniejszenia prawdopodobieństwa powstawania szczepów opornych jest równoczesne użycie dwóch lub więcej inhibitorów aaRS. Zastosowano ją w przypadku mupirocyny i REP8839. Działają one synergistycznie i mimo, iż znane są szczepy odporne zarówno na mupirocynę, jak i REP8839, nie odnotowano bakterii opornych równocześnie na oba terapeutyki. Opracowanie struktury farmakoforu może ułatwić tworzenie tego typu par inhibitorów. Przykładowo usunięcie pierścienia fenylogo ze struktury ochratoksyny A, inhibitora PheRS, i zastąpienie go podstawnikiem charakterystycznym dla waliny sprawia, że cząsteczka zmienia specyficzność w kierunku inhibicji ValRS. Niestety związki te nie wykazują specyficzności w stosunku do syntetaz bakteryjnych, hamują również ich eukariotyczne odpowiedniki.

Oporność bakterii może wynikać z odstępstw od standardowego modelu budowy ich błony komórkowej. Obecność na jej powierzchni aa - PG, np. Lys - PG, Arg - PG, znosi jej ładunek ujemny czyniąc ją niedostępną dla wielu enzymów i peptydów odpowiedzialnych za lizę bakterii. Enzymami zaangażowanymi w syntezę aa - PG (*ang. aminoacyl - phosphatidylglycerol*) są np. MprF1 i MprF2, katalizujące powstawanie odpowiednio Ala - PG i Lys - PG. Aktywność ich warunkowana jest dostępnością aa - tRNA, zatem zależy również od prawidłowego funkcjonowania aaRS bakteryjnych. Podobnie aktywność enzymów uczestniczących w tworzeniu w ścianie komórkowej poprzecznych mostków peptydowych łączących łańcuchy wielocukrowe zależy od aa - tRNA. Wspomniane wyżej grupy enzymów mogą, obok aaRS, stanowić obiecujący obiekt badań mających na celu poszukiwanie nowych antybiotyków [52].

3.2.2. Konsekwencje zahamowania aminoacylacji tRNA

Inhibicja aminoacylacji prowadzi do akumulacji w komórce niezwiązanych z aminokwasem cząsteczek tRNA, które wiążąc się do rybosomów blokują elongację łańcucha peptydowego. Wzrost stężenia wolnego tRNA prowadzi do aktywacji rybosomalnego enzymu relA, wywołującego pleiotropowe działanie na komórki bakterii. W wyniku przeniesienia grupy pirofosforanowej z ATP na 3'GTP powstaje guanozyna -5' - trifosforan - 3' - difosforan (pppGpp). Ten z kolei po odłączeniu jednej grupy fosforanowej przez produkt genu *gpp* jest przekształcany w ppGpp - główny efektor kontroli ścisłej metabolizmu. Wysokie stężenie

alarmu ppGpp hamuje polimerazę RNA oraz drastycznie obniża wydajność wysokoenergetycznych procesów komórkowych, np. syntezy RNA, DNA, białek i peptydoglikanu (Rys. 3.4). Zahamowanie jednej lub kilku aaRS może w bardzo krótkim czasie wywołać zmiany w metabolizmie komórki, prowadzące do zahamowania wzrostu bakterii i w konsekwencji do ich śmierci [53,54].



Rys. 3.4. Efekt pleiotropowy związany z zahamowaniem aktywności aaRS.

GTP – trifosforan guanozyny, pppGpp – guanozyna 5' – trifosforan - 3' - difosforan, ppGpp – guanozyna 5' - difosforan - 3' - difosforan, GDP – difosforan guanozyny, relA – białko katalizujące reakcję przeniesienia grupy pirofosforanowej z ATP na GDP w pozycję 3', ggp – białko odłączające jedną grupę fosforanową z pppGpp w wyniku czego powstaje ppGpp.

3.2.3. Naturalne inhibitory aaRS

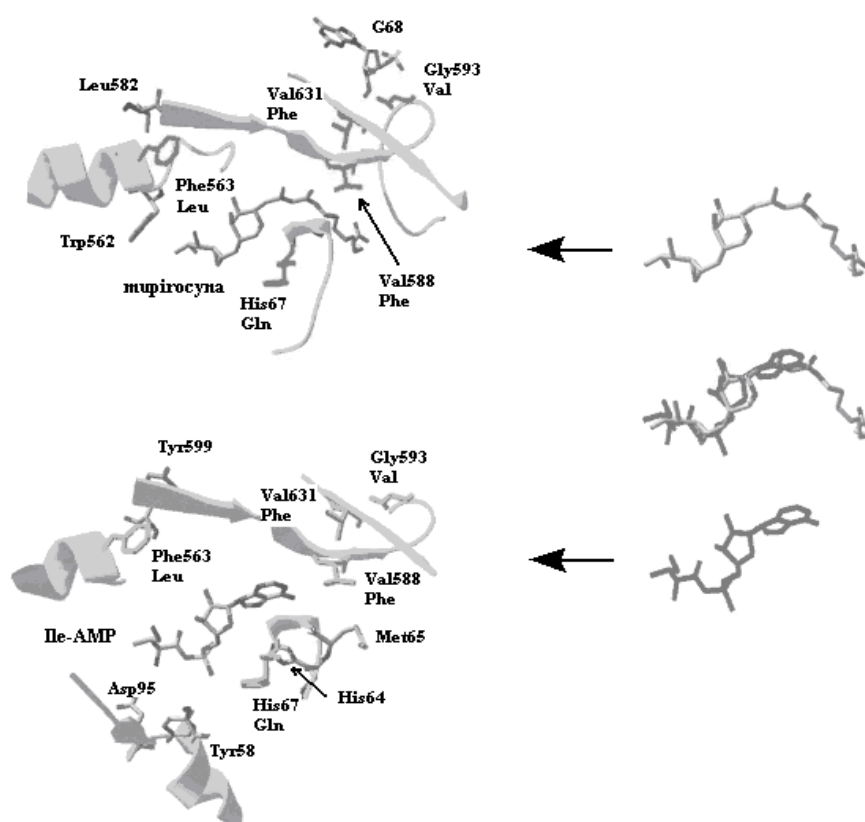
Obecnie znanych jest wiele naturalnych inhibitorów specyficznie hamujących bakteryjne syntetazy aminoacylo - tRNA, które cechują niskie wartości K_i lub/i IC_{50} . Jednak z powodu zbyt niskiej selektywności wobec bakterii chorobotwórczych, wysokiej toksyczności w stosunku do komórek gospodarza oraz niestabilności żaden z nich, z wyjątkiem mupirocyny, nie został do tej pory wprowadzony na rynek. Mogą jednak stanowić doskonały punkt wyjścia w projektowaniu nowych leków.

Na etapie badań klinicznych znajdują się natomiast inhibitory skierowane przeciwko IleRS z grzybów: tavaborol (AN-2690) - grzybica paznokci, faza III [55,56] oraz icofungipen (PLD-118) – kandydoza, faza II [57] (Rys. 3.10 S i T).

Mupirocyna (ang. *mupirocin*) jest jedynym zarejestrowanym lekiem przeciwbakteryjnym (Bactroban®) hamującym aktywność bakteryjnej syntetazy IleRS [58,59]. Związek ten jest metabolitem wtórnym syntezowanym przez bakterie *Pseudomonas fluorescens* [60]. Składa się z krótkiego kwasu tłuszczowego połączonego z kwasem monowym i mimikuje adenylan izoleucynowy (Ile - AMP). Mupirocyna jest inhibitorem bifunkcyjnym, współzawodniczącym o miejsce aktywne zarówno z izoleucyną jak i ATP [59]. Grupa

epoksydowa inhibitora oddziałuje w centrum aktywnym enzymu w miejscu grupy fosforanowej aa - AMP, fragment przypominający hydrofobowy łańcuch boczny Ile w kieszeni hydrofobowej podobnie jak izoleucyna, a pierścień dihydrotetrahydropirany – w miejscu wiązania rybozy (Rys. 3.5). Główną różnicę stanowi miejsce wiązania kwasu monowego, które w kompleksie Ile - AMP - IleRS pozostaje puste. Okazuje się jednak, że odgrywa ono kluczową rolę w stabilizacji kompleksu mupirocyna - enzym. Pochodne mupirocyny pozbawione kwasu monowego nie wykazują tak efektywnego działania jak postać pierwotna inhibitora [4,61].

Mupirocyna hamuje IleRS bakterii, archeonów i grzybów. Bakterie *P. fluorescens* wytwarzające ten związek są niewrażliwe na jego działanie dzięki obecności dwóch izoenzymów IleRS. Jeden z nich (IleRS - R2), podobnie jak IleRS eukariotów nie wiąże mupirocyny. Do tej pory nie odnotowano przypadków inhibicji ortologów ssaczych, co zadecydowało o wpisaniu tego związku na listę leków przeciwbakteryjnych. Mupirocyna jest antybiotykiem o szerokim spektrum działania, hamuje kompetycyjnie IleRS bakterii ($K_i = 2,5$ nM dla *E. coli*). Działa na bakterie Gram (+) (*S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *E. faecium*) oraz Gram (–) (*H. influenzae*, *M. catarrhalis*) i grzyby (*C. albicans*) [60]. Niestety, mała stabilność tego związku powoduje, że jego użycie jest ograniczone. We krwi ulega on hydrolizie do kwasu monowego – nieaktywnego metabolitu, który bardzo szybko wydalanany jest z organizmu [60,62]. Mupirocyna stosowana jest głównie w postaci 2% maści w leczeniu infekcji skórnych lub 2% emulsji przy infekcjach górnych dróg oddechowych. Używana jest również w zwalczaniu szczepów *S. aureus* opornych na metycylinę [63].



Rys. 3.5. Porównanie struktur IleRS *S. aureus* związanego z mupirocyną i Ile - AMP oraz konformacji tych związków po związaniu z enzymem.

Powszechne użycie mupirocyny spowodowało jednak pojawienie się szczepów opornych na ten związek [64,65]. Umownie podzielono je na dwa fenotypy. Pierwszy z nich cechuje tzw. niski poziom oporności (MIC: 8 – 256 mg/ml) wykształcanej na skutek mutacji punktowej w genie *ileS* znajdującym się na chromosomie bakteryjnym. Drugi cechuje wyższa oporność (MIC > 256 mg/ml), która jest efektem pojawienia się genu *mupA* kodującego niewrażliwą na mupirocynę formę enzymu IleRS - R2 [63,66]. Pochodzi on prawdopodobnie z organizmu eukariotycznego lub *B. anthracis* [67] (Rys. 3.6.A).

Borelidyna (ang. *borrelidin*), syntezowana jest przez dwa szczepy *Streptomyces albobovineus* (bakteria glebowa). Jej właściwości antybakteryjne po raz pierwszy zaobserwowano w stosunku do *Treponema hyodysenteriae*. Znane są również inne bakterie wrażliwe na ten związek. Analiza struktury kompleksu ThrRS *E. coli* z borelidyną pokazała, że inhibitor ten wiąże się z enzymem w kieszeni hydrofobowej, poza domeną katalityczną. W przeciwieństwie do znacznej większości inhibitorów aaRS borelidyna jest inhibitorem allosterycznym, którego związanie utrudnia zmiany konformacyjne niezbędne do związania Thr i ATP. Borelidyna aktywuje ponadto kaspazy 3 i 8 a więc indukuje apoptozę. Związek cechuje dobra absorpcja i przenikanie przez błonę komórkową [68,69]. Borelidynę badano również pod kątem stworzenia nowego leku przeciw malarii [70]. Okazało się, że związek ten hamuje selektywnie proliferację komórek ludzkich linii rakowych [71] (Rys. 3.6.B).

Chuangksinmycyna (ang. *chuangxinmycin*). Budową przypomina tryptofan, z którym konkuruje o wiązanie do enzymu, przez co hamuje tworzenie Trp - tRNA. Jej naturalnym źródłem jest *Actinoplanes tsinanensis*. Wykazuje specyficzność w stosunku do TrpRS bakterii Gram (+) i Gram (-) *E. coli* i *Shigella dysenteriae* (IC₅₀ dla TrpRS *E. coli* = 30 nM). Obecnie badana jest jej skuteczność w leczeniu posocznicy i infekcji dróg moczowych wywołanych przez *E. coli* [72] (Rys. 3.6.C).

Indolmycyna (ang. *indolmycin*) po raz pierwszy została wyizolowana z *Streptomyces griseus*. Związek ten przypomina L - tryptofan i selektywnie hamuje wybrane TrpRS bakteryjne (IC₅₀ dla *E. coli* wynosi 9,25 nM; IC₅₀ dla enzymu z wątroby wołowej 4,04 mM). Ze względu na lipofilowy charakter cząsteczki oraz jej inkorporację do błon bakteryjnych nie znalazła ona zastosowania w leczeniu infekcji wywołanych przez gronkowce, paciorkowce i bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* [73,74]. Indolmycyna okazała się jednak skuteczna w zwalczaniu wszystkich 54 znanych szczepów *H. pylori* (MIC₉₀: 0,03 µg/ml). Swoją aktywność zachowuje nawet w silnie kwaśnym środowisku żołądka będącego naturalnym rezerwuarem tej bakterii [75]. Wysoka skuteczność oraz niska częstość powstawania szczepów opornych nasuwa przypuszczenie, że wywiera ona również inny wpływ na komórki patogenów. Niestety, odnotowano również negatywny wpływ indolmycyny na komórki gospodarza. Przede wszystkim zaburza ona metabolizm tryptofanu oraz ma toksyczny wpływ na komórki wątroby [76]. Zaobserwowano również, że indolmycyna efektywnie hamuje oporne na metycylinę i pochodne wankomycyny szczepy *S. aureus* (MIC₉₀ odpowiednio 0,5 i 1 µg/ml). Uzyskanie wysokiego stężenia leku w komórkach patogenów jest możliwe dzięki bakteryjnemu systemowi pobierania tryptofanu. Błędnie rozpoznaje on indolmycynę jako Trp i transportuje do komórki. Wysokie stężenie terapeutycznego w komórce bakteryjnej oznacza potencjalnie większe szanse pokonania infekcji [74,77] (Rys. 3.6.D).

Ochratoksyna A (ang. *ochratoxin A*) jest mykotoksyną produkowaną m.in. przez *Aspergillus ochraceus* i *Penicillium verrucosum*. Wykazano, że związek ten inhibuje PheRS z *Bacillus subtilis* a wartość K_i wynosi 3 μM [78]. Ochratoksyna A hamuje również aktywność PheRS innych bakterii, drożdży oraz eukariota. Związek ten wykazuje niestety działanie immunosupresyjne, teratogenne i rakotwórcze, prawdopodobnie z powodu wtórnego hamowania hydroksylazy fenyloalaninowej, peroksydacji lipidów i tworzenia adduktów DNA [79,80] (Rys. 3.6.E).

Furanomycyna (ang. *furanomycin*), chociaż swoją strukturą nie przypomina żadnego z występujących naturalnie aminokwasów, jest błędnie rozpoznawana przez IleRS *E. coli* i przyłączana do tRNA^{Ile}, co prowadzi do jej wbudowywania do łańcucha peptydowego. Furanomycyna, w postaci furanomycylo - tRNA^{Ile}, wiąże się z kompleksem EF - Tu - GTP równie silnie jak izoleucyno - tRNA^{Ile} i w tej postaci transportowana jest do miejsca A rybosomu. Inkorporację furanomycyny w miejsce izoleucyny do białka potwierdzono w prekursorze β - laktamazy otrzymanej w warunkach *in vitro* [81,82].

Wśród wielu przebadanych analogów furanomycyny, oprócz jej demetylowanych pochodnych, nie znaleziono innych, które miałyby porównywalną do niej aktywność przeciwbakteryjną. Świadczy to o niskiej korelacji struktury cząsteczki z jej aktywnością [83] (Rys. 3.6.F).

Purpuromycyna (ang. *purpuromycin*) to antybiotyk produkowany przez *Actinoplanes lanthinogenes*. Związek ten wiąże się z dużym powinowactwem do wszystkich tRNA. Chociaż do tRNA wiąże się zawsze więcej niż jedna cząsteczka purpuromycyny to ich działanie hamujące jest selektywne i ogranicza się jedynie do hamowania aktywności akceptorowej tRNA. Purpuromycyna nie wpływa natomiast na inne funkcje tRNA takie jak oddziaływanie z miejscami P i A w rybosomie czy oddziaływanie z czynnikami translacyjnymi. Antybiotyk ten jest bardzo aktywny wobec grzybów i bakterii np. szczepów *S. aureus* opornych na inne antybiotyki [84,85] (Rys. 3.6.G).

Reweromycyna A (ang. *reveromycin A*) to poliketyd produkowany przez grzyby z rodzaju *Streptomyces*. Jest specyficznym inhibitorem syntetazy izoleucylo - tRNA *Saccharomyces cerevisiae* i wyższych eukariota. IC_{50} dla enzymu drożdżowego wynosi 1,3 ng/ml. Reweromycyna A blokuje cykl komórkowy komórek ssaków w fazie G1 [86].

Istnieją doniesienia, że reweromycyna A może uchronić przed złamaniami kości osoby cierpiące na osteoporozę aktywując proces apoptozy osteoklastów i w ten sposób hamuje resorpcję tkanki kostnej [87] (Rys. 3.6.H).

Granatacyna (ang. *granatacin*), aromatyczny poliketyd produkowany przez *Streptomyces* okazał się specyficznym inhibitorem syntetazy leucylo - tRNA *B. subtilis*. Dowiedziono, że granatacyna wpływa na wzrost poziomu ppGpp oraz pppGpp w traktowanych komórkach, co w konsekwencji powoduje zatrzymanie syntezy białka. IC_{50} wynosi 0,1 – 0,2 $\mu\text{g/ml}$ (450 nM) [88] (Rys. 3.6.I).

Cispentacyna, PLD-118 (ang. *cispentacin*), cykliczny β - aminokwas w izolowany z *Bacillus cereus* i *Streptomyces setonii* jest z kolei inhibitorem ProRS *C. albicans* działającym w

stężeniach milimolarnych. Na bazie struktury cispentacyny (Rys. 3.6.J) stworzony został icofungipen [54,89].

Agrocyna 84 (*ang. agrocin 84*). należy do inhibitorów będących analogami aminoacyloadenylanu, który nie ulega hydrolizie. Związek ten wytwarzany jest przez *Agrobacterium radiobacter* przeciw *Agrobacterium tumefaciens* odpowiedzialnym za wywoływanie zakażeń roślin prowadzących do powstawania tumorowatych narośli na szyjce korzeniowej. Agrocyna 84 w znacznym stopniu przypomina adenylan leucyny i jest kompetycyjnym inhibitorem IleRS ($IC_{50} < 10$ nM). Posiada resztę D - glukofuranozylo oksyfosforylową, która jest kluczowa przy pobieraniu agrocyny 84 przez patogen. Reszta ta ulega hydrolizie w komórce a powstały związek posiadający stabilne wiązanie fosfoamidowe staje się inhibitorem kompetycyjnym LeuRS [90,91] (Rys. 3.6.K).

Askamycyna (*ang. ascamycin*) to inny naturalny analog aa - AMP będący inhibitorem PheRS, podstawiony chlorem w pozycji 2 adeniny. Wytwarzany jest przez *Streptomyces*. Askamycyna hamuje aktywność PheRS *Xanthomonas citri* i *Xanthomonas oryzae*. Nie zaobserwowano aktywności wobec *E. coli*, co jest prawdopodobnie spowodowane tym, że obdarzona ładunkiem cząsteczka nie przenika przez błonę komórek bakterii [92]. *X. citri* i *X. oryzae* posiadają natomiast enzym – Xc - aminopeptydazę, która katalizuje hydrolizę askamycyny. Powstały związek ma szerokie spektrum działania wobec bakterii Gram (+) i Gram (-) [93] (Rys. 3.6.L).

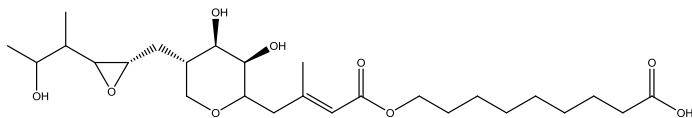
Fozmidozyna (*ang. phosmidosine*) jest analogiem prolio - AMP, co przypuszczalnie powoduje, że celem jej działania jest ProRS. Związek ten po raz pierwszy opisano w roku 1991 jako antybiotyk przeciwbakteryjny hamujący tworzenie zarodników *Botrytis cinerea* w stężeniu 0,25 mg/ml [94]. Fozmidozyna jest mało stabilnym związkiem z powodu metylacji grupy fosfo - amidowej. Otrzymano jej bardziej stabilne analogi i badano zależność między aktywnością biologiczną a ich cechami fizykochemicznymi w kontekście działania przeciwnowotworowego. Związek ten wykazuje unikalne właściwości hamowania wzrostu komórek w fazie G1 cyklu komórkowego [95] (Rys. 3.6.M).

Albomycyna (*ang. albomycin*) to inhibitor serylo - tRNA, który działa na zasadzie „konia trojańskiego”. Aktywna część inhibitora połączona jest ze specyficznym sideroforem, za pośrednictwem grupy hydroksamowej, odpowiedzialnej za pobieranie związku i hydrolizowanej w czasie aktywnego transportu przez błonę. Reszta związku, która zostaje uwolniona do wnętrza komórki jest analogiem Ser - AMP z resztą tiofuranozową zastępującą resztę rybofuranozową i glicyną w pozycji 5'C. Zsyntezowano różne pochodne albomycyny (Rys. 3.6.N), z których najbardziej aktywny (SB-217452) miał IC_{50} : 8 nM [96,97].

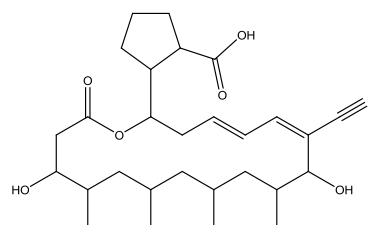
Mikrocyna C (*ang. microcin C*) wykazuje działanie bakteriostatyczne wobec bakterii Gram (-): *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* [57] oraz niektórych bakterii Gram (+). Mikrocyna C jest silnym związkiem antybakteryjnym wytwarzanym przez niektóre szczepy *E. coli* i działającym podobnie jak albomycyna na zasadzie konia trojańskiego. Jest aktywnie pobierana do wnętrza komórki przez transportery YejABEF gdzie staje się

substratem dla aminopeptydaz. Produkt reakcji to nie podlegający hydrolizie analog aspartylo - adenylanu, który hamuje aktywność AspRS [98,99] (Rys. 3.6.O).

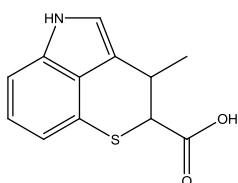
Prowadzone są badania mające na celu modyfikacje niektórych z powyższych związków i wprowadzenie zmian w obrębie poszczególnych elementów ich struktury. Ich celem jest z jednej strony zwiększenie selektywności i stabilności a z drugiej zmniejszenie ich negatywnego wpływu na organizm gospodarza [100].



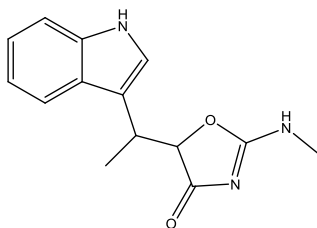
A. Mupirocyna (IleRS)



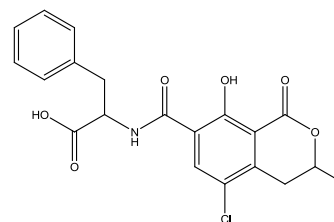
B. Borelidyna (ThrRS)



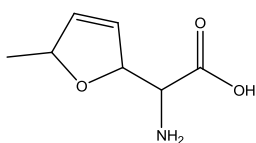
C. Chuangksinmycyna (TrpRS)



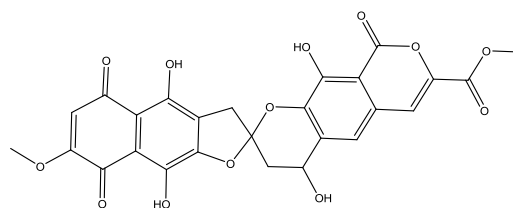
D. Indolmycyna (TrpRS)



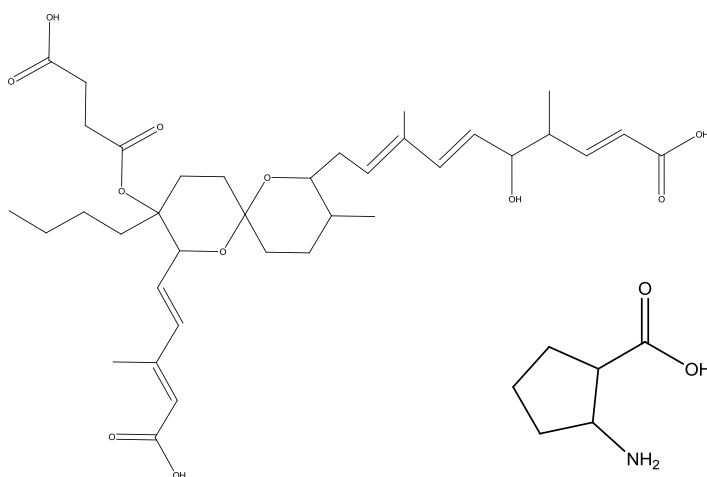
E. Ochratoksyna A (PheRS)



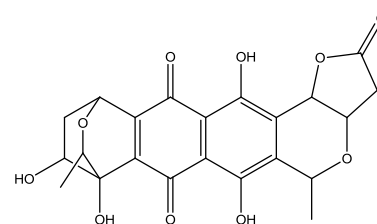
F. Furanomycyna (IleRS)



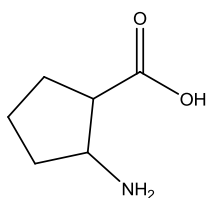
G. Purpuromycyna (tRNA)



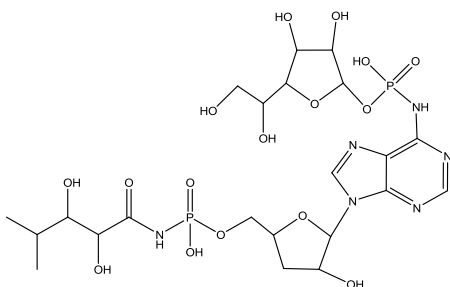
H. Reweromycyna A (IleRS)



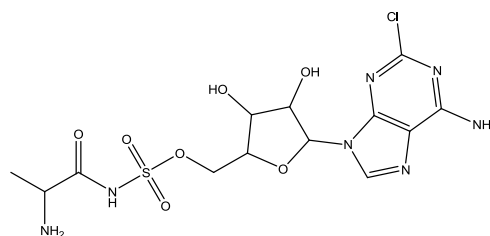
I. Granatacycna (LeuRS)



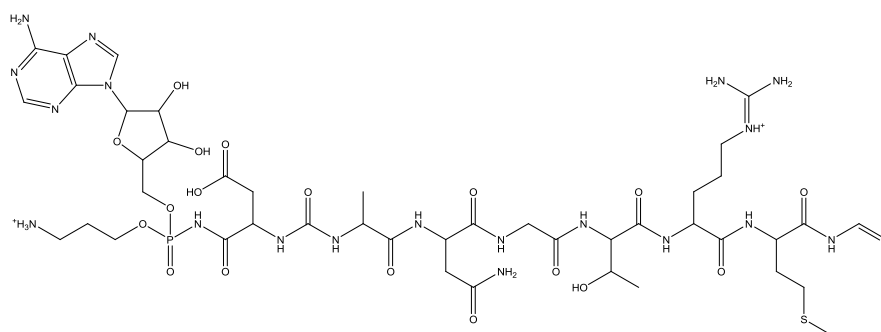
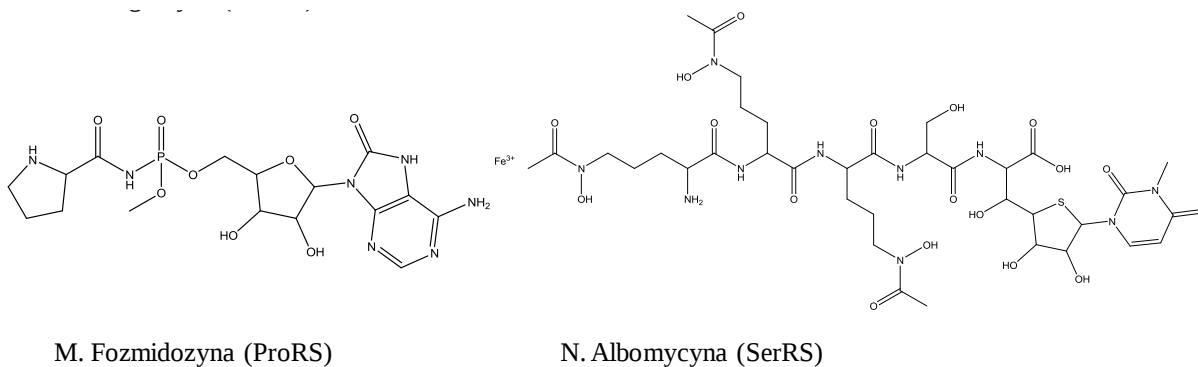
J. Cispentacycna (ProRS)



K. Agrocyna (LeuRS)



L. Askamycyna (PheRS)



Rys. 3.6. Naturalne inhibitory aaRS: A) mupirocyna, B) borelidyna, C) chuangksinmycyna, D) indolmycyna, E) ochratoksyna A, F) furanomycyna, G) purpuromycyna, H) reweromycyna, I) granatacyna, J) cispentacyna, K) agrocyna, L) askamycyna, M) fozmidozyna, N) albomycyna, O) mikrocyna C.

3.2.4. Syntetyczne i półsyntetyczne inhibitory aaRS

Poznanie mechanizmu aminoacylacji tRNA oraz struktur syntetaz aminoacylo - tRNA stwarza wiele nowych możliwości w projektowaniu i syntezie inhibitorów aaRS. W pierwszym etapie aminoacylacji powstaje aminoacyloadenylan – produkt pośredni, który tworzy z enzymem kompleks o stałej dysocjacji rzędu kilku - kilkudziesięciu nanomoli, podczas gdy wartość stałej dysocjacji dla aminokwasu i ATP jest kilka rzędów wielkości wyższa. Można więc oczekiwać, że analogi aminoacyloadenylanu, podobnie jak sam aa - AMP, będą silniej wiązane przez enzym. Modyfikacje aa - AMP mogą dotyczyć czterech rejonów cząsteczki (Rys. 3.7):

1. wiązania fosfodwuestrowego,
2. rybozy,
3. adeniny,
4. reszty aminokwasowej.

Poniżej przedstawiono wybrane przykłady powyższych modyfikacji:

1. Modyfikacje wiązania fosfodwuestrowego

Przykładowa strategia to zastąpienie atomu fosforu w wiązaniu fosfodwuestrowym siarką (Rys. 3.7.A). Główną wadą powstałych w ten sposób pochodnych jest ich niska specyficzność w stosunku do enzymów prokariotycznych. Natomiast porównując działanie odpowiednich aminoalkilowych adenylianów i pochodnych aminoacylosulfaminowych na ArgRS, HisRS i ThrRS, zauważono korelację między rodzajem pochodnych aa - AMP a klasą syntetaz. Inhibicję aktywności ArgRS (klasa I) obserwowano po zastosowaniu obu rodzajów pochodnych Arg - AMP już w stężeniach nanomolarnych. W przypadku HisRS i ThrRS (klasa II) skuteczne okazały się jedynie acylosulfaminiany. Obserwacja ta potwierdza odmienny mechanizm wiązania produktu pośredniego reakcji przez syntetazy klasy I i II [101]. Innym podejściem w syntezie inhibitorów syntetaz w oparciu o modyfikacje aa - AMP jest użycie aminoalkoholi zamiast aminokwasów. Związki te posiadają w cząsteczce równocześnie grupy hydroksylowe – OH i aminowe – NH₂. Powstający produkt – ester aminoalkilo - AMP (Rys. 3.7.B) wykazuje znacznie większą stabilność niż acylofosforan i równie wysokie powinowactwo do aaRS [102,103].

2. Modyfikacje rybozy

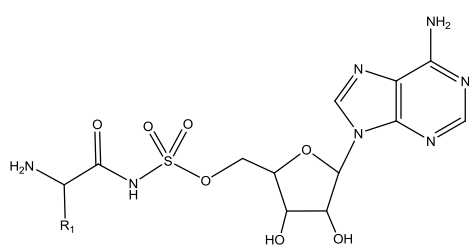
Istotną rolę w wiązaniu aa - AMP do odpowiadających im syntetaz pełnią grupy hydroksylowe rybozy. Ich zastąpienie przy C2' i C3' (Rys. 3.7.C,D) znacząco zmniejsza powinowactwo pochodnych do aaRS.

3. Modyfikacje adeniny

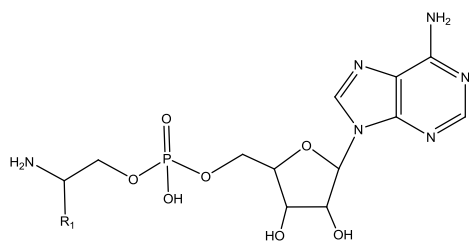
Pochodne zmodyfikowane w obrębie reszty adeniny mogą być wiązane przez enzym znacznie silniej niż związek wyjściowy, co czyni je potencjalnymi inhibitorami aaRS. Tak jest w przypadku 2 - jodo (Rys. 3.7.E) i 2 - etynylo pochodnych adenylianu izoleucynowego z wiązaniem sulfonowym. Tiazole (Rys. 3.7.F), estry, karbaminiany aa - AMP hamują aktywność wybranych enzymów już w stężeniach nanomolarnych. Przykładowo, IC₅₀ dla sulfamidowej pochodnej izoleucynowej z grupą tiazolową połączoną z fenolem (Rys. 3.7.G), skierowanej przeciwko IleRS *E. coli* wynosi 1,3 nM [104].

4. Modyfikacje reszty aminokwasowej

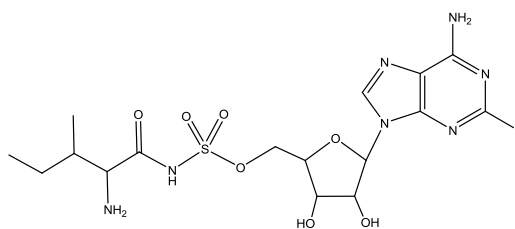
Modyfikacje mogą być wprowadzane w obrębie aminokwasowego łańcucha bocznego aa - AMP lub dotyczyć użycia pochodnych aa. Chociaż aaRS wszystkich organizmów przyłączają te same aa, to jednak różnice w mechanizmie ich rozpoznawania dają możliwość użycia tego typu analogów. Przykłady to: kwas glutaminowy połączony wiązaniem estrowym z pochodną piperydyny (inhibitor GluRS *E. coli*) [105] (Rys. 3.7.H), hydroksylowana L - metionina (MetRS *E. coli*) [106] (Rys. 3.7.I), wanilloid i izowanilloid (IleRS *E. coli*) [107], tyrozyno - fenyloglicyna (TyrRS *S. aureus*) [108] (Rys. 3.7.J).



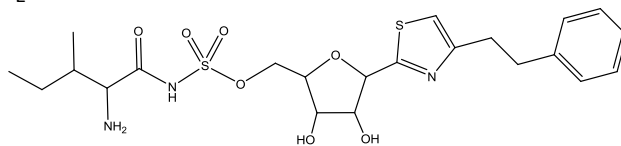
A



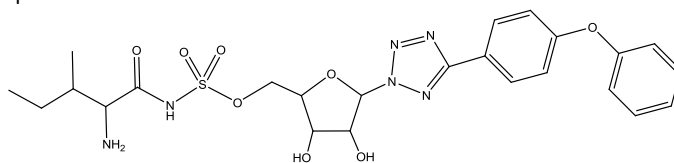
B



E



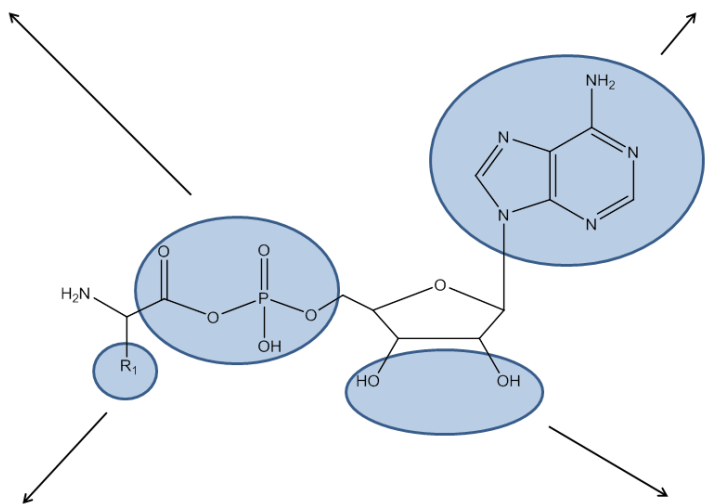
F



G

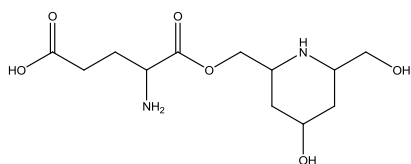
Modyfikacje wiązania fosfordwuestrowego

Modyfikacje adeniny

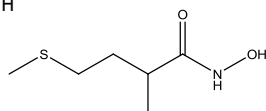


Modyfikacje reszty aminokwasowej

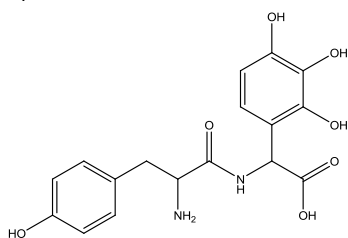
Modyfikacje rybozy



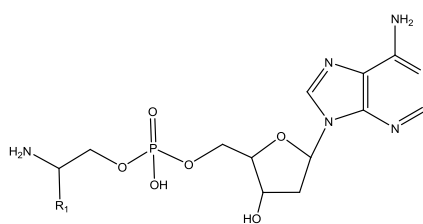
H



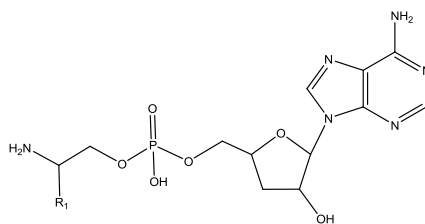
I



J



C



D

Rys. 3.7. Wybrane przykłady analogów aminoacyloadenylnu.

3.2.4.1. Komputerowo wspomagane badania przesiewowe i ukierunkowane projektowanie inhibitorów aaRS

W Protein Data Bank zdeponowanych jest kilkaset struktur krystalicznych aaRS pochodzących z archeonów, eubakterii i eukariota oraz chloroplastów i mitochondriów, również w kompleksach z substratami, inhibitorami i produktami pośrednimi reakcji. Bank danych dotyczący sekwencji aaRS zawiera ponad 1000 pozycji [109]. Informacje te zostały wykorzystane do poszukiwania nowych lub optymalizowania już istniejących związków hamujących aktywność aaRS. Przykładowo, w wyniku wirtualnego (*in silico*) badania przesiewowego ponad 500 000 związków otrzymano 91 nowych, potencjalnych inhibitorów MetRS. Związkiem o najsilniejszym działaniu (IC_{50} : 237 nM) okazał się analog kwasu benzoowego hamujący aktywność MetRS *E. coli* (Rys. 3.8.A) [110]. W ten sam sposób zidentyfikowano inhibitory AsnRS *Brugia malayi* działające w stężeniach mikromolarnych [111].

Modelowanie molekularne miejsca aktywnego aaRS i dokowanie związków niskocząsteczkowych są szeroko stosowane w poszukiwaniu specyficznych inhibitorów. Struktura krystaliczna LysRS z *Pyrococcus horikoshii* została wykorzystana do poszukiwania inhibitorów LysRS *Treponema pallidum*, krętka wywołującego kiłę [112] oraz LysRS *Borrelia burgdorferi* wywołującego boreliozę [113]. Różnice strukturalne pomiędzy aaRS prokariotycznymi i eukariotycznymi zostały również wykorzystane do zaprojektowania inhibitorów działających specyficznie wobec bakteryjnej TyrRS [114] i do selektywnej inhibicji SerRS metanogennych bakterii przez amid seryny [115]. Korzystając z tej metody opracowano, a następnie zsyntezowano wiele, nieulegających hydrolizie analogów substratu, które działały w stężeniach nanomolarnych. Pomimo, iż wiele z nich wykazuje selektywność wobec aaRS bakteryjnych to prawdopodobnie z powodu wysokiej polarności, hamującej transport przez błonę bakteryjną, nie mają one zadawalającej aktywności *in vivo* [101,116-121]. Przykładem jest inhibitor IleRS, w którym adenozyne podstawiono grupą izowanilinianową lub hydroksamową [119] (Rys. 3.8.B).

3.2.4.2. Badania przesiewowe w poszukiwaniu nowych inhibitorów aaRS

Znacząca liczba związków wiodących została zidentyfikowana w wysokoprzepustowych badaniach przesiewowych. Firma Cubist Pharmaceuticals koncentrując swoją działalność na poszukiwaniach inhibitorów aaRS na cel działania inhibitorów wybrała LeuRS, MetRS, PheRS i ProRS. Wynikiem badań było odkrycie pochodnych tiazolu, będących analogami aminoacyloadenyłanu wykazujących silne, selektywne działanie wobec LysRS *E. coli* i *S. aureus* (Rys. 3.8.C) [122]. W wyniku optymalizacji innego związku wiodącego otrzymano 2 - pirydylo - pirazol hamujący aktywność bakteryjnej MetRS w stężeniach mikromolarnych i wykazujący ponad 100 - krotnie wyższą selektywność wobec enzymu bakteryjnego w porównaniu z odpowiednikiem

ludzkim (Rys. 3.8.D). Związek ten wykazuje jednak aktywność w innych szlakach metabolicznych, co powoduje brak specyficzności wobec komórek bakteryjnych [123]. Poszukiwanie inhibitorów PheRS zakończyło się odkryciem spirocyklicznych furanów, które hamują specyficznie PheRS z *S. aureus* i *E. coli* w stężeniach nanomolarnych (Rys. 3.8.E). Niestety związki te wykazują niską stabilność w roztworze wodnym [124]. Analogi heterocykliczne tych związków hamowały PheRS *S. aureus* w jeszcze niższych stężeniach (IC_{50} : 0,26 μ M) i wykazywały aktywność przeciwbakteryjną wobec *S. aureus* (MIC: 3,1 μ g/ml) (Rys. 3.8.F). Niestety, oprócz specyficznego hamowania bakteryjnej PheRS hamowały one również niespecyficzną syntezę DNA [125]. We współpracy z ArQuele Inc, w Cubist Pharmaceuticals odkryto nową klasę inhibitorów MetRS zawierających szkielet oksazolo - dipeptydowy (Rys. 3.8.G). Pomimo, iż związki te wykazywały olbrzymią aktywność i selektywność nie przekładało się to na działanie przeciwbakteryjne [126]. Zidentyfikowano również chinoliny i ich pochodne jako inhibitory ProRS *C. albicans* (Rys. 3.8.H). Najlepiej działający związek, kompetycyjny wobec ATP, osiągał wartość IC_{50} : 5 nM [127].

W okresie 1995 - 2001, w SmithKline Beecham prowadzono systematyczne poszukiwania inhibitorów wszystkich 19 aaRS *S. aureus*. Z *Micromonospora* spp. NCIMB 40684 wyizolowany został niezwykle silny i selektywny inhibitor bakteryjnej TyrRS, konkurujący o miejsce wiązania z Tyr (Rys. 3.8.I). Strukturalnie SB-219383 to dipeptyd złożony z L - Tyr i bicyklicznego α - aminokwasu [128]. Niektóre estrowe i amidowe pochodne, jak również monocykliczne analogi tego związku wykazywały działanie hamujące TyrRS w stężeniach subnanomolarnych. Niestety, ich aktywność przeciwko gronkowcom i paciorkowcom była stosunkowo niska [129]. SB-219383 wywołuje głód aminokwasowy u *S. aureus* i *S. pneumoniae*, co jest cechą specyficznych inhibitorów [83]. Poszukiwanie inhibitorów PheRS *S. aureus* pozwoliło na wytypowanie inhibitora, etanoloaminy, który w ilościach mikromolarnych hamuje działanie enzymu. Modyfikacja tego związku do 4 - bromo - 2 - tienylo - etanoloaminy poprawiała aktywność (IC_{50} : 8 nM) (Rys. 3.8.J). Inhibitory z tej serii wykazywały szerokie spektrum działania wobec bakteryjnych PheRS i wysoką selektywność wobec enzymu bakteryjnego. Jednak żaden z tych związków nie posiadał aktywności przeciwbakteryjnej wobec *S. aureus* prawdopodobnie z powodu niekontrolowanego wnikania (*ang. influx*) oraz wypływu na zewnątrz komórki (*ang. efflux*) [130].

W testach przesiewowych GlaxoSmithKline mających na celu zidentyfikowanie inhibitorów MetRS *S. aureus* wyłoniono związek, którego IC_{50} to 350 nM. Jego syntetyczne analogi, pochodne 1,3 - diaminopropanu podstawione grupami fenyłową, chromanową i tetrahydrochinolinową wykazywały znacząco wyższą aktywność np. SB-425076 (Rys. 3.8.K). Posiadały również silne działanie przeciwbakteryjne wobec gronkowców i paciorkowców. W badaniach *in vivo* na szczurzym modelu zakażenia *S. aureus*, potwierdzono ich potencjał jako nowej klasy terapeutyków [131,132]. Jednak bardziej szczegółowa analiza spektrum przeciwbakteryjnego wykazała, że znaczna część (46%) szczepów będących izolatami klinicznymi *S. pneumoniae* (n = 315) nie była wrażliwa na te inhibitory. W trakcie badań zidentyfikowano gen, *metS2*, kodujący odrębny typ syntetazy. *MetRS2* wykazujący znaczną homologię z genem syntetazy MetRS *B. anthracis*, prawdopodobnie został on przeniesiony w wyniku poziomego transferu genów [67,133]. Naturalna oporność tego groźnego patogenu

dróg oddechowych zawęży spektrum działania tej nowej klasy leków przeciwbakteryjnych. Dodatkowo związki z tej serii inhibitorów MetRS wykazywały bardzo niską biodostępność. GlaxoSmithKline postanowiło więc nie kontynuować tego programu, sprzedało natomiast licencję firmie Replidyne Inc., w której w wyniku dalszych badań zidentyfikowano związek o nazwie REP8839.

Inny związek otrzymany przez GlaxoSmithKline w wyniku badań przesiewowych to SB-203207, wyizolowany ze *Streptomyces* NCIMB 40513 (Rys. 3.8.L). SB-203207 hamował aktywność IleRS *S. aureus* (IC_{50} : 1,7 nM). Niestety, wykazywał się on również niską selektywnością; wartość IC_{50} dla IleRS z wątroby szczura wynosiła < 2 nM [134]. Dodatkowo, SB-203207 hamował również aktywność LeuRS i ValRS, aczkolwiek w wyższych stężeniach. Analogi SB-203207, w których grupę Ile zastąpiono Leu lub Val, zastosowano jako inhibitory LeuRS i ValRS, działały w stężeniach nanomolarnych. Analogi te pozostawały również aktywne wobec IleRS *S. aureus* i wątroby szczura, co oznacza, że ani specyfika ani selektywność nie zostały osiągnięte. Żaden z tych związków nie wykazał działania przeciwbakteryjnego wobec *S. aureus* w stężeniu ≤ 64 $\mu\text{g/ml}$ [135]. Natomiast analogi SB-203207, gdzie reszta Ile została podstawiona Met były 50 – 100 okazały się bardziej specyficznymi inhibitorami [136].

W Bayer Pharmaceuticals prowadzono program mający na celu znalezienie inhibitorów bakteryjnej PheRS [98]. Optymalizacja struktury związku wiodącego wyłonionego w badaniach przesiewowych syntetycznej biblioteki związków doprowadziła do wytypowania grupy fenylo - tiazolilo - sulfonoamidów ($IC_{50} < 5$ i 10 nM kolejno dla PheRS *E. coli* i *H. influenzae*) (Rys. 3.8.M). Związki te były nieco mniej aktywne w stosunku bakterii Gram (+): IC_{50} : 40 – 300 nM dla *S. pneumoniae* i 50 – 80 nM dla *S. aureus*. Wykazywały natomiast wysoką selektywność wobec bakteryjnej PheRS ($IC_{50} > 200$ μM dla PheRS zarówno cytoplazmatycznej jak i mitochondrialnej). Fenyl - tiazolilo - sulfonamidy są silnymi inhibitorami najczęstszych patogenów układu oddechowego takich jak, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* i *M. catarrhalis*, ($MIC < 1$ $\mu\text{g/ml}$) [137].

Syntetyczny związek REP8839 to fluorwinylofien połączony z chinolonem poprzez 1,3 - diaminopropan [138] (Rys. 3.8.R). Jest inhibitorem MetRS, obecnie w fazie I badań klinicznych w leczeniu zakażeń skóry i ran wywołanych przez *S. aureus*. Oprócz działania na szczepy *S. aureus* odporne na mupirocynę i oksacylinę (MIC_{90} : 0,5 $\mu\text{g/ml}$), związek ten wykazał aktywność przeciwko *Streptococcus pyogenes* (MIC : 0,03 – 0,5 $\mu\text{g/ml}$), jak również przeciwko kilku innym gronkowcom i paciorkowcom, K_i dla MetRS *S. aureus* wynosi ok. 10 pM a dla MetRS *E. coli* 300 nM. Nie obserwowano hamowania MetRS z wątroby szczura, natomiast K_i dla ludzkich mitochondrialnych i cytoplazmatycznych MetRS było trzy do sześciu razy większe niż dla MetRS *S. aureus*. REP8839 jest więc selektywnym związkiem o wysokim potencjale terapeutycznym [139]. Z powodu niskiej biodostępności związku po podaniu doustnym oraz znacznemu wiązaniu przez białka surowicy ($> 95\%$) proponuje się jego użycie w przypadku infekcji skórnych np. w formie maści donosowych [140].

AN-2690 – 5-fluoro - 1,3 - dihydro - 1 - hydroksy- 2,1- benzoksaborol otrzymany został przez Anacor Pharmaceuticals (Rys. 3.8.S). Badania z udziałem mutantów opornych na ten związek pozwoliły ustalić, że jego celem jest domena edytująca LeuRS szerokiej gamy patogenów

(dermatofity, drożdże i pleśnie) odpowiedzialnych m.in. za rozwój grzybic paznokci [56]. Dzięki łatwej penetracji przez płytkę paznokcia, aż do jego łożyska, trafia w miejsce rozwoju infekcji i skutecznie ją hamuje (MIC: 0,125 – 8 µg/ml). Na korzyść tego związku przemawia również fakt, że nie stwierdzono jego obecności we krwi pacjentów. AN-2690 hamuje cytoplazmatyczną LeuRS przez tworzenie stabilnego adduktu tRNA^{Leu} z AN-2690 związanym z domeną redagującą enzymu. Addukt powstaje na skutek utworzenia wiązania pomiędzy atomem boru AN-2690 i tlenu w pozycji 2' i 3' pierścienia rybozy na końcu 3' tRNA. Trwałe związanie tRNA blokuje LeuRS wyłączając ją z puli aktywnych enzymów w kolejnym cyklu katalitycznym, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania syntezy białka. AN-2690 jest inhibitorem niekompetycyjnym wobec ATP i leucyny; IC₅₀: 2,1 µM [141]. I i II faza badań klinicznych potwierdziły skuteczność i bezpieczeństwo tego związku [54]. Obecnie trwa III faza badań klinicznych. Niedawno stwierdzono, że analogi AN-2690 silnie hamują LeuRS z *Trypanosoma brucei*, co implikuje również antypasożytnicze zastosowanie tego inhibitora LeuRS [142].

Icofungipen jest związkiem przeciwgrzybicznym hamującym działanie IleRS (Rys. 3.8.T). W 1990 roku w firmie Bayer zsyntetyzowano pochodną cispentacyny – BAY - 10-8888, która oprócz selektywnego hamowania IleRS, jest również wydajnie kumulowana w komórkach patogenów, z udziałem permeaz drożdżowych [143]. Niezwykle ważna dla aktywności związku jest jego konfiguracja – 1R, 2S. Każda modyfikacja, za wyjątkiem metylenu w pozycji 4, powoduje obniżenie jego aktywności [144]. Transport terapeutyku do komórek ulega ograniczeniu w podwyższonym stężeniu Ile współzawodniczącej z inhibitorem o miejsce wiązania z permeazą. Istotne jest, że do tej pory nie odnotowano szczepów z dodatkową kopią genu kodującego enzym niewrażliwy na BAY - 10-8888, a wszystkie przypadki oporności są efektem zaburzenia transportu leku do komórki, bądź nadprodukcji IleRS. Nie stanowi to poważnego problemu, gdyż substancja nie wykazuje znaczącej toksyczności w stosunku do organizmu gospodarza, co pozwala na znaczne podwyższenie dawki terapeutycznej [143]. Licencję na ten związek wykupiła GlaxoSmithKline i pod nową nazwą PLD-118 testuje jego przydatność w leczeniu infekcji części ustnej gardła i górnych dróg oddechowych wywoływanych przez bakterie odporne na flukonazol oraz infekcji centralnego układu nerwowego [145,146]. W I i II fazie badań klinicznych wykazano dobrą skuteczność kliniczną i bezpieczeństwo tego leku.

W ciągu ostatnich 5 lat obserwuje się wzmożone zainteresowanie poszukiwaniem nowych oraz doskonaleniem już istniejących inhibitorów aaRS. Związane jest to m.in. z faktem pojawienia się mutacji w genach kodujących poszczególne aaRS, które warunkują oporność na dotychczas skuteczne inhibitory (np. *S. aureus* odporny na REP8839) [54].

Do opracowania inhibitorów LeuRS pierwotniaka *T. brucei* wykorzystano jako strukturę wiodącą benzoksyborol. Pochodne tego związku wykazywały wyjątkowo silne działanie hamujące wzrost tego pasożyta, szczególnie w przypadku bardziej liofilowych kongenerów; EC₅₀: 0,37 µM [147]. Kontynuacja badań *in silico* tej samej grupy polegająca na wirtualnym przesiewaniu z wykorzystaniem kombinacji struktury farmakoforu oraz dokowania do modelu miejsca aktywnego LeuRS doprowadziła do wytypowania pochodnych 2 - pyrrolidonu jako potencjalnych inhibitorów *T. brucei*. Analiza zależności pomiędzy strukturą i funkcją pokazała, że grupa fenyłowa podstawiona w pozycji R2 znajduje się w kieszeni hydrofobowej

a grupa indolilowa w pozycji R3 oddziałuje z aminokwasami w kieszeni wiążącej Leu. Wartość IC_{50} dla najbardziej aktywnego związku wynosi: 31,9 μ M [148].

W podobny sposób zidentyfikowano grupę 31 nowych inhibitorów MetRS *S. aureus*. Komputerowo wspomagane badania przesiewowe komercyjnie dostępnych baz związków doprowadziły do wytypowania potencjalnych inhibitorów, z których najbardziej aktywny charakteryzował się wartością IC_{50} : 4,8 μ M w badaniach *in vitro*. Również w tym przypadku wyniki eksperymentalne potwierdziły aktywność związków wyselekcjonowanych metodą *in silico* [149].

Metodą wirtualnego przesiewania zidentyfikowano również trzy związki hamujące TrpRS *S. epidermis* o IC_{50} : 18,3 – 22,8 μ M. Chociaż związki te charakteryzują się pewnym podobieństwem, jak obecność reszty kwasu benzoowego to ich ogólna struktura różni się znacząco. Inhibitory te wykazują umiarkowaną aktywność przeciwbakteryjną MIC od 6,25 do 100 μ M [150].

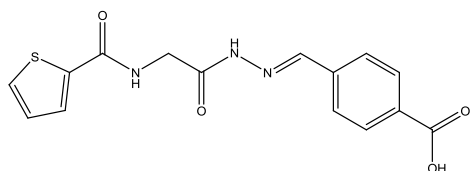
REP3123 zsyntezowany w laboratorium badawczym firmy Replidyne, jest nowym związkiem przeciwbakteryjnym, wyjątkowo silnie hamującym wzrost *C. difficile*, K_i dla MetRS wynosi 0,02 nM. Związek ten wykazuje ponad 1000 – krotnie niższą selektywność względem enzymu ludzkiego zarówno cytoplazmatycznego jak i mitochondrialnego. REP3123 wykazuje bardzo wąski zakres MIC 0,5 – 1 μ g/ml wobec *C. difficile*, co świadczy o braku naturalnie występującej oporności na REP3123 (w przeciwieństwie do *S. pneumoniae* gdzie zidentyfikowano ortolog MetRS2). REP3123 wykazuje szerokie spektrum działania przeciw bakteriom Gram (+) (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*) wliczając w to szczepy odporne na istniejące antybiotyki. Tak jak i inne diaryldiaminy (diaryldiamines) jak np. REP8839 posiada bardzo silne działanie przeciwbakteryjne wobec *E. faecalis* i *E. faecium* włączając w to szczepy odporne na wankomycynę [139].

W firmie Pfizer otrzymano zupełnie nową grupę inhibitorów PheRS, etery benzylofenylowe (BPEs) działające zarówno na bakterie Gram (-) (*Haemophilus influenzae*) jak i Gram (+) (*Streptococcus pneumoniae*). Znaczna część z tej grupy związków wykazuje wyjątkowo silne działanie: $IC_{50} < 1$ μ M. MIC 32 μ g/ml dla *H. influenzae* i *S. pneumoniae* [151].

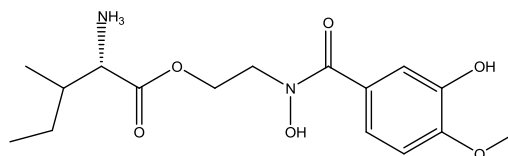
Pochodne 3 – arylo - 4 - alkiloaminofuran - 2(5H) - onu okazały się być skutecznymi inhibitorami TyrRS z bakterii Gram (+) (Rys. 3.8.O). Wartość MIC dla najsilniejszego z nich wynosi 0,42 μ g/ml dla *S. aureus* [152]. Badania tej samej grupy doprowadziły do wytypowania kolejnej serii związków, z których najbardziej aktywny był 3 - (4-hydroksyfenylo) - 4 - (2 - morfolinoetoksy)furan - 2(5H) - on (MIC: 0,23 μ g/ml dla *S. aureus* ATCC 25923). (Rys. 3.8.N) [153]. Ostatnie doniesienia dotyczą pochodnych 3 – arylo - 4 - arylaminofuran - (5H) - onu (Rys. 3.8.P). Jeden z tych związków 3 - (3 - bromofenylo) - 4 - (3,5 - dichlorofenylamino)furan - 2(5H) - on charakteryzuje się wartością IC_{50} : 0,09 μ M, MIC: 0,06 μ g/ml dla *S. aureus* ATCC 25923. Dokowanie molekularne potwierdziło kompetycyjne działanie tych inhibitorów wobec TyrRS [154].

Ponieważ najsilniejsze inhibitory spośród zbadanych *in vitro* analogów 5' - O - (N-L - aminoacylo) - sulfamoidoadenozyny nie wykazywały działania przeciwbakteryjnego z powodu słabego przenikania do komórek bakteryjnych otrzymano 18 ich dipeptydowych pochodnych i zbadano ich wpływ na wzrost *S. aureus*, *E. faecalis* and *E. coli*. Kilka z nich wykazało znaczące działanie przeciwbakteryjne i szersze spektrum działania [155].

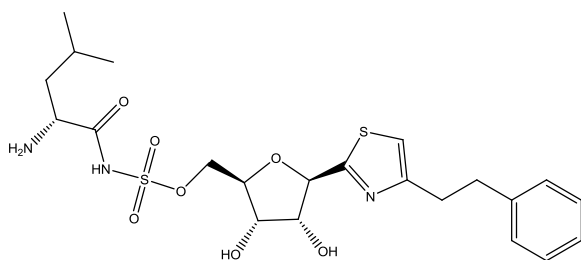
W ramach programu poszukiwania leków przeciw *B. malayi* zidentyfikowano nowe inhibitory AsnRS. Badania przesiewowe 73 000 mikroekstraktów doprowadziły do wyłonienia trzech nowych i dwóch znanych tyrandamycyn o wysokim i selektywnym potencjale hamowania AsnRS *B. malayi* (IC_{50} : 30 – 200 μ M) i potwierdzonym działaniu przeciwmalarycznym [156].



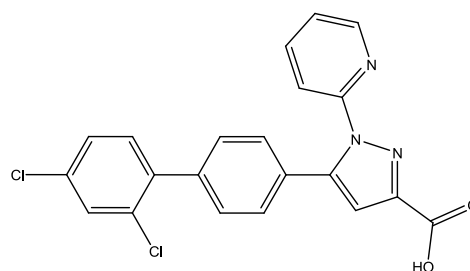
A. Analog kwasu benzoesowego (MetRS)



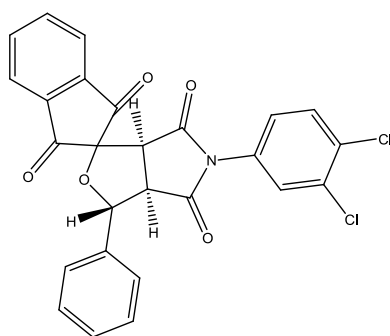
B. Izowanilinin – hydroksamian (IleRS)



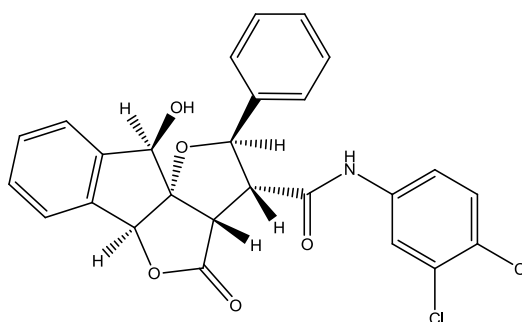
C. Pochodna aminoacylo- sulfamilo tiazolu (LeuRS)



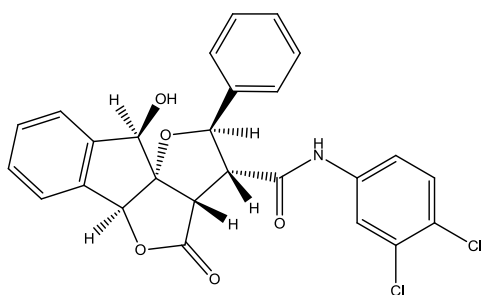
D. 2-pirydylo-pirazol (MetRS)



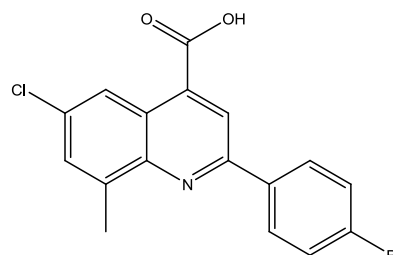
E. Spirocycliczny furan (PheRS)



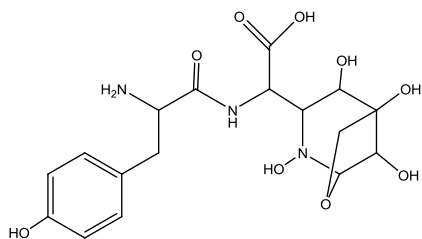
F. Analog heterocykliczny spirocyklicznego furanu (PheRS)



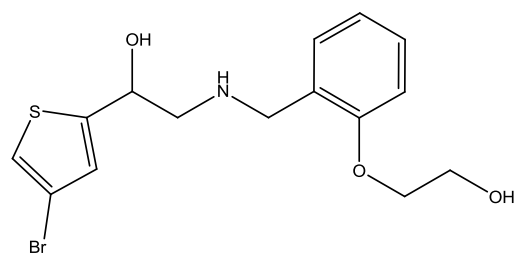
G. Oksazolo - dipeptyd (MetRS)



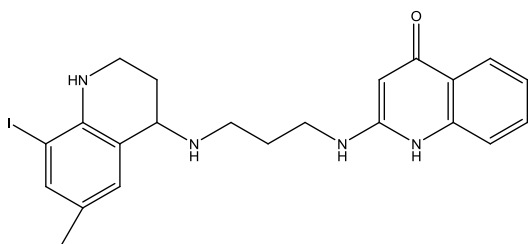
H. Pochodna chinoliny (ProRS)



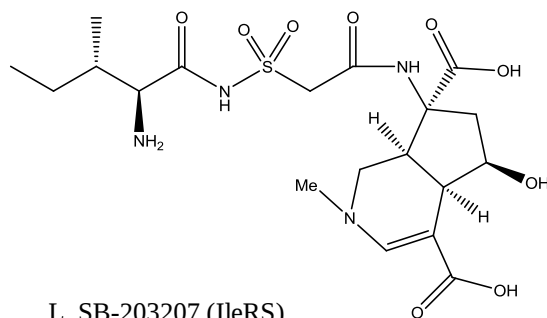
I. SB-219383 (TyrRS)



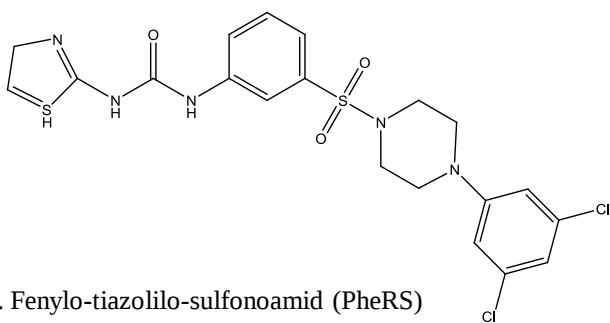
J. Pochodna etanoloaminy (PheRS)



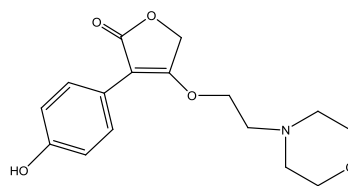
K. SB-425076 (MetRS)



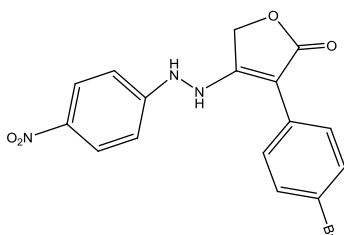
L. SB-203207 (IleRS)



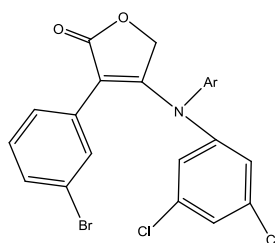
M. Fenylo-tiazolilo-sulfonoamid (PheRS)



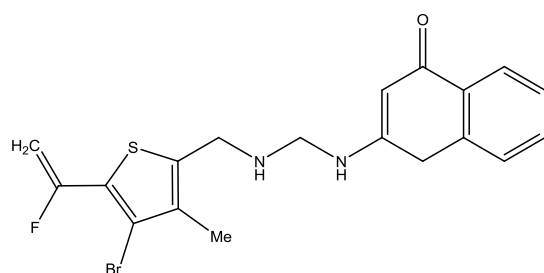
N. 4-alkoxy-3-arylfuran-2(5H)-one



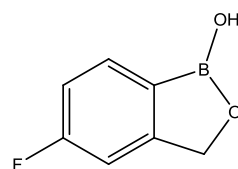
O. 3-aryl-4-aminofuran-2(5H)-one



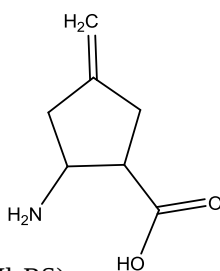
P. 3-aryl-4-arylaminofuran-2(5H)-one



R. REP 8839 (MetRS)



S. AN -2690 (LeuRS)

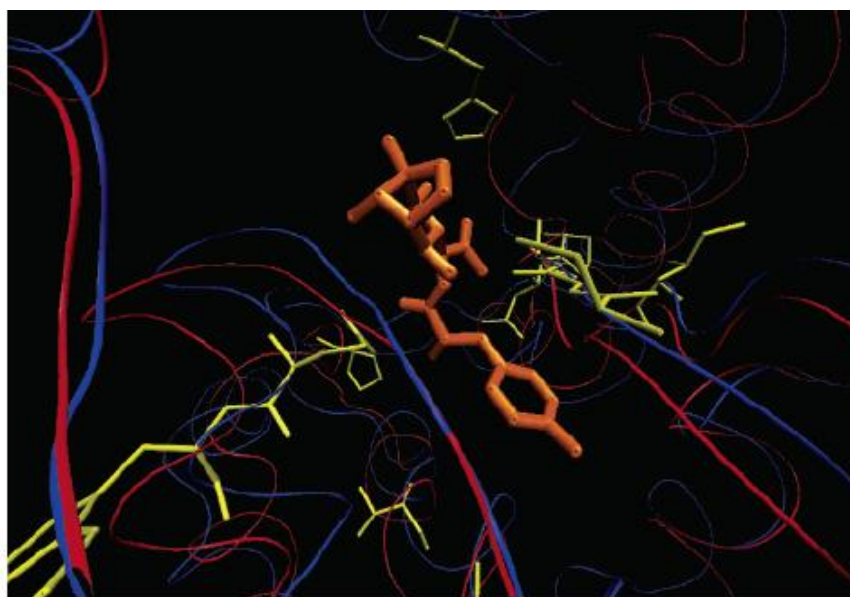


T. Icofungipen (IleRS)

Rys. 3.8. Struktury wybranych, syntetycznych inhibitorów aaRS.

3.3. TyrRS prokariota i eukariota

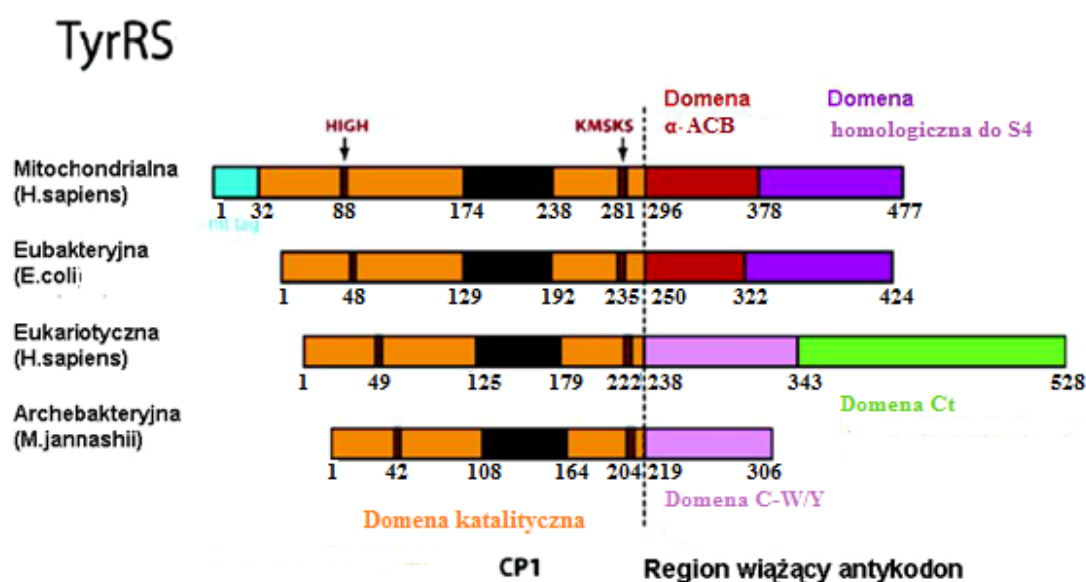
Kluczowe znaczenie dla specyficznej inhibicji aaRS bakteryjnych mają różnice w strukturze pomiędzy nimi a enzymami ludzkimi. Nałożenie struktur przestrzennych kieszeni wiążącej tyrozynę w TyrRS z bakterii i człowieka pokazuje występowanie różnic w geometrii miejsca katalitycznego, pomimo że obydwa enzymy wiążą ten sam aminokwas (Rys. 3.9).



Rys. 3.9. Miejsce wiążące w kieszeni aktywnej syntetazy tyrozylo-tRNA z *S. aureus* (czerwone) z SB-219383 (pomarańczowy) nałożone na syntetazę tyrozylo-tRNA *H. sapiens* (niebieski) [2].

Porównanie sekwencji aminokwasowych TyrRS poszczególnych organizmów wskazuje na ich znaczne zróżnicowanie. Wprawdzie centrum katalityczne każdego z nich tworzy struktura Rossmanna, jednak motywy HIGH i KMSKS w TyrRS mogą być zmienione, co ma odzwierciedlenie we wspomnianych różnicach w strukturze przestrzennej. Stwarza to szansę na uzyskanie specyficznych inhibitorów aminoacylacji.

Znacznie większe różnice występują jednak poza domeną katalityczną, w miejscu wiązania antykodonu. Koniec karboksylowy białka prokariotycznego stanowi domena α -ACB oraz domena wykazująca homologię do końca C białka rybosomalnego S4. W białku eukariotycznym natomiast jest to domena C-W/Y i Ct (Rys. 3.10) [9]. Przykład TyrRS obrazuje różnice strukturalne i funkcjonalne między enzymami prokariotycznymi i eukariotycznymi.



Rys. 3.10. Schemat budowy TyrRS *E. coli* i *H. sapiens* i *M. jannashii*.

Domena katalityczna TyrRS zawierająca strukturę Rossmanna wiążącą Tyr - AMS, zbudowana z ~ 230 aminokwasów, podzielona jest na 2 części połączone krótkim peptydem CP1 (*ang. connective peptide 1*) o długości ~50 aminokwasów, który tworzy powierzchnię oddziaływania pomiędzy jednostkami dimeru. Struktura Rossmanna połączona jest z częścią przy końcu aminowym za pomocą pętli KMSKS [157]. W przeciwieństwie do fragmentu białka przy końcu aminowym, fragment w pobliżu końca karboksylowego, który wiąże charakterystyczny region ramię - pętla tRNA w przypadku eukariota różni się znacząco sekwencją, długością i organizacją. U eubakterii składa się ona z α -helikalnej domeny (α -ABC) o długości ~ 100 aa, po której następuje domena S4, która wykazuje wysoką homologię z domeną białka rybosomalnego S4 ulokowaną przy końcu karboksylowym białka. U eukariota część przy końcu C białka również złożona jest z dwóch domen. Pierwsza z nich nazwana C-W/Y jest wysoce homologiczna z domeną TrpRS znajdującą się na końcu

karboksylowym i różni się od α - helikalnej domeny eubakterii. U wyższych eukariota po domenie tej następuje tzw. domena extra - Ct złożona z ~160 aminokwasów. W przypadku ludzkiej TyrRS fragment ten wykazuje 51% identyczności sekwencji do białka EMAPII uczestniczącego w prostej odpowiedzi zapalnej i procesie apoptozy [158-160].

Do tej pory rozwiązano następujące struktury krystaliczne TyrRS:

- prokariota: eubakterii: *Staphylococcus aureus* [161], *Thermus thermophilus* [162], *Bacillus stearothermophilus* [163], *Mycobacterium tuberculosis* [164], *Escherichia coli* [165] i archeonów: *Methanococcus jannaschii* [166], *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus horikoshii* [167],
- eukariota: *Homo sapiens* [168], *Saccharomyces cerevisiae* [169], *Plasmodium falciparum* [170], *Leishmania major* [171].

Analizy strukturalne i biochemiczne wykazały, że domena katalityczna, głównie motyw KMSKS, a także miejsce rozpoznawania tRNA różnią się, u bakterii i eukariota/archeonów [114,166,172]. Istnieje wiele doniesień odnośnie struktur bakteryjnych TyrRS związanych z L - tyroziną, ATP, Tyr - ATP oraz ich analogami. W przypadku enzymów eukariotycznych/archeonów informacje, które można uzyskać z baz danych są bardzo nieliczne [163,166,173-177].

Mechanizm aktywacji L - tyrozyny został opisany szczegółowo dla *E. coli* i na tym przykładzie omówiony poniżej [165]:

1. Rozpoznawanie L - tyrozyny:

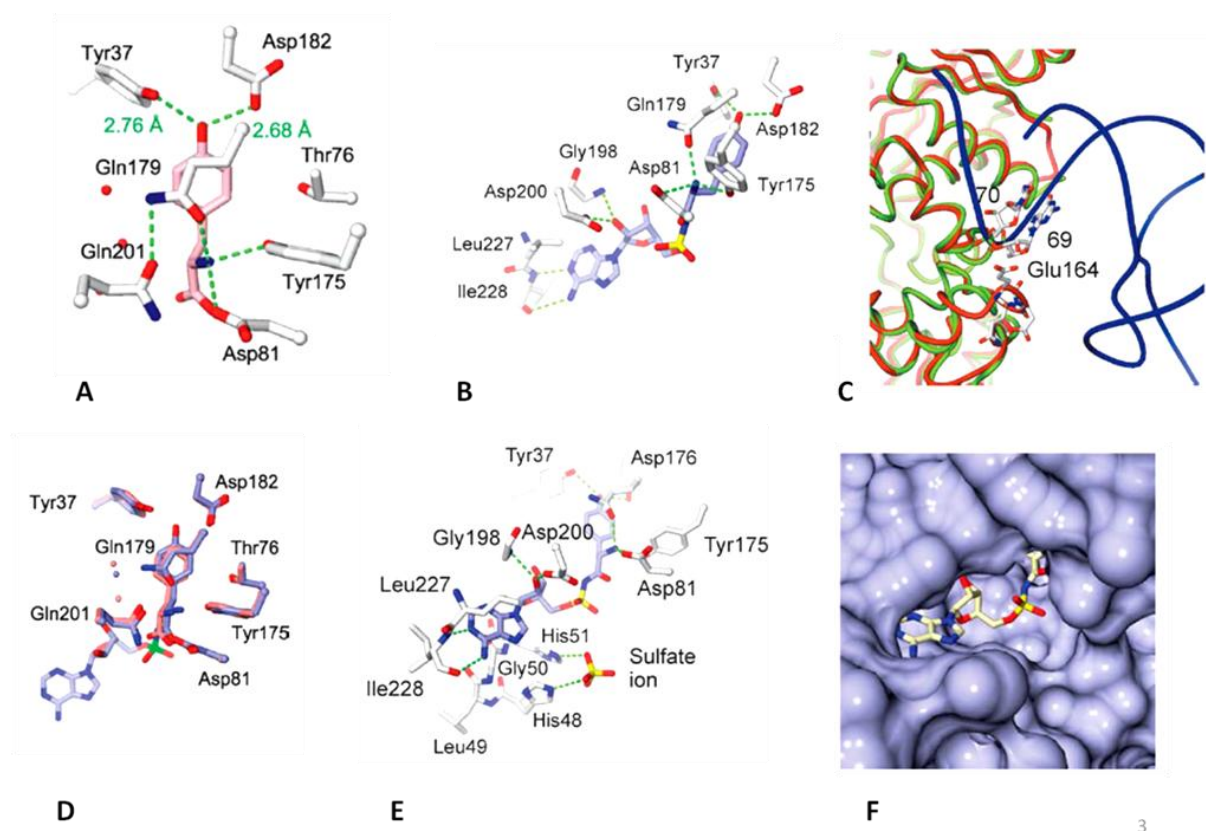
Miejsce wiązania tyrozyny znajduje się w głębokiej szczelinie będącej częścią miejsca aktywnego TyrRS. Reszty wiążące tyrozinę: Tyr37, Asp182, Gln179, Gln201, Asp81, Tyr175 i Thr76 *E. coli* (Rys. 3.11.A) są mocno zakonserwowane i odpowiadają przykładowo resztom Tyr34, Asp176, Gln173, Gln195, Asp78, Tyr169 i Thr73 u *B. stearothermophilus* TyrRS [163,173].

2. Rozpoznawanie reszty adenozyiny Tyr - AMP:

Reszta adenozyiny wiązana jest za pośrednictwem wiązań wodorowych pomiędzy grupą 2' - OH rybozy i grupą NH Gly198 łańcucha głównego oraz z Asp200 łańcucha bocznego. Te aminokwasy są silnie zakonserwowane wśród aaRS klasy I i umożliwiają rozróżnienie ATP i dATP. Pierścień adeniny jest „przykryty” przez łańcuch boczny Leu227, a N1 i N6 pierścienia adeniny specyficznie oddziałują kolejno z grupami aminową i karboksylową łańcucha głównego Ile228. Utworzenie tych wiązań powoduje znaczące zmiany kątów dwuściennych pomiędzy wiązaniami peptydowymi motywu KMSKS, co indukuje zmianę konformacji. Porównując struktury TyrRS - L-tyrozyna i TyrRS - Tyr - AMS stwierdzono różne położenie łańcucha bocznego Ser199 oraz łańcucha głównego His51 wraz z grupą karboksylową łańcucha głównego Gly50 motywu HIGH, co zapobiega zawadzie sterycznej i pozwala na utworzenie wiązania van der Waalsa z pierścieniem adeniny (Rys. 3.11.E).

3. Wiązanie jonów siarczanu przez motyw HIGH:

Analizując struktury krystaliczne kompleksów TyrRS/L - tyrozyna i TyrRS/Tyr - AMS stwierdzono obecność jonu siarczanowego związanego z His48 i His51 motywu HIGH. Anion ten zastępuje prawdopodobnie w kryształach γ - fosforan. Sugeruje to, że γ - fosforan może oddziaływać z TyrRS bez oddziaływania z pętlą KMSKS i brać udział we wstępnym wiązaniu cząsteczki ATP. Tłumaczy to, dlaczego ADP czy AMP nie oddziałują efektywnie z TyrRS. Na skutek tego wiązania anionu siarczanowego w strukturze Tyr - AMS, His51 przemieszcza się w kierunku α - fosforanu a His48 pierścienia adeniny. Sposób wiązania reszty adeniny *E. coli* i *B. stearothermophilus* różni się znacząco, podczas gdy reszta tyrozynowa rozpoznawana jest podobnie. Do tej pory nie rozwiązano struktury TyrRS eukariotycznej/archeonów w kompleksie z resztą adenozyiny, chociaż reszty aa zaangażowane w jej rozpoznawanie zostały zidentyfikowane.



Rys. 3.11. Miejsce wiązania: A) tyrozyna w kompleksie: TyrRS/L - tyrozyna *E. coli*; B) Tyr - AMP w kompleksie TyrRS/Tyr - AMS *E. coli*; C) Model przedstawiający dokowanie tRNA^{Tyr} do TyrRS *E. coli* (czerwony) i TyrRS *B. stearothermophilus* (zielony); D) Porównanie struktur TyrRS/L - tyrozyna (różowy) and TyrRS/Tyr - AMS (niebieski); E) Miejsce wiązania Tyr - AMS przez TyrRS *E. coli*; F) Model miejsca aktywnego TyrRS *E. coli* w formie półotwartej ze związanym Tyr - AMS.

Kluczowe znaczenie w aktywacji aminokwasu przez TyrRS odgrywa pętla KMSKS, która rozpoznaje i oddziałuje z cząsteczką ATP w dwóch podstawowych konformacjach:

- konformacja elastyczna, „otwarta”, nieoddziałująca z ATP
- konformacja sztywna, „zamknięta”, oddziałująca z ATP [172].

Pętla KMSKS ulega przegrupowaniu w odpowiedzi na związanie reszty adeniny i utworzenie wiązań wodorowych i przyjmuje bardziej kompaktową – półotwartą formę zamiast formy bardziej elastycznej – otwartej. Motyw HIGH rozpoznaje początkowo γ - fosforan a następnie γ i α - fosforany ATP, co powoduje nieznaczne przegrupowanie reszt aminokwasowych. Inne reszty aa znajdujące się w pobliżu substratu także przemieszczają się dostosowując się do struktury Tyr - AMS. Indukowane dopasowanie stanowi najnowszy model dla wyjaśnienia mechanizmu aminoacylacji TyrRS (Rys. 3.11.D).

Obecnie znane struktury aaRS m.in. TyrRS *T. thermophilus* bez i ze związanym ATP wykazały, że rozległe zmiany konformacyjne spowodowane indukowanym dopasowaniem dotyczące zarówno motywu KMSKS jak i innych lokalnych zmian w miejscu wiązania substratu stanowią podstawę do aktywacji aminokwasu: pętla KMSKS początkowo w formie otwartej, przejściowo przemieszcza się tworząc formę półotwartą (wiązanie reszty adenozyne) i finalnie osiąga sztywną, zamkniętą formę wiążącą ATP. Po aktywacji aminokwasu, pętla KMSKS przyjmuje ponownie formę półotwartą, żeby związać koniec CCA tRNA i umożliwić wiązanie zaktywowanego aa.

Sekwencja zdarzeń podczas wiązania ATP i aktywacji tyrozyny przez pętlę KMSKS jest następująca:

- (1) tyrozyna wiąże się w głębokiej szczelinie miejsca aktywnego TyrRS. Miejsce wiązania γ - fosforanu w motywie HIGH ulega reorganizacji tworzy się forma otwarta pętli KMSKS,
- (2) do otwartej formy pętli KMSKS wiąże się γ - fosforan z ATP,
- (3) w kieszeni katalitycznej wiąże się reszta adeniny z ATP, pętla KMSKS zostaje delikatnie przyciągnięta do ATP przyjmując formę półotwartą,
- (4) dwie lizyny z pętli KMSKS tworzą wiązania z ATP a pętla KMSKS ulega zamknięciu,
 - (a) łańcuch boczny pierwszej lizyny, azot z łańcucha głównego lizyny drugiej i tlen karbonylowy reszty znajdującej się po pierwszej lizynie stabilizują strukturę ATP w kształcie litery U w kieszeni aktywnej enzymu w ten sposób, że γ - fosforan znajduje się w pobliżu tlenu karbonylowego tyrozyny,
 - (b) łańcuch boczny drugiej lizyny tworzy silne wiązanie wodorowe lub mostek solny z tlenem α - fosforanu ATP [162],
- (5) pomiędzy grupą karbonylową tyrozyny i α - fosforanem ATP utworzone zostaje wiązanie zerwaniu ulega natomiast wiązanie pomiędzy fosforanem α i β ,
- (6) grupa α - fosforanowa Tyr - AMP oddala się od łańcucha bocznego lizyny, zrywając wiązanie wodorowe. Na skutek zerwania wiązania pomiędzy fosforanem α i β , zerwaniu ulega wiązanie pomiędzy motywem KMSKS i γ - fosforanem, co uniemożliwia utrzymanie formy zamkniętej. Z tego powodu motyw KMSKS wraca do formy półotwartej. Pozwala to

na związanie cząsteczki tRNA^{Tyr} i skierowanie końca CCA do centrum aktywnego a następnie przeniesienia na niego zaktywowanej tyrozyny.

Forma otwarta pętli KMSKS w TyrRS *E. coli* oddziałuje z tRNA^{Tyr}, co może wpływać na wydajność reakcji katalizowanej przez drugą podjednostkę enzymu. Tłumaczy to wyniki otrzymane w badaniach biochemicznych, które wskazują, że w danym momencie aminoacylacja odbywa się tylko na jednej podjednostce enzymu [165].

W przypadku ludzkiej TyrRS znany jest jedynie ogólny mechanizm wiązania L - tyrozyny. Reszty kluczowe do jej rozpoznania znajdują blisko w strukturze przestrzennej ale daleko w strukturze I - rzędowej, w nici $\beta 2$ i helisie $\alpha 8$. Grupa hydroksylowa tyrozynolu jest donorem wiązania wodorowego dla tlenu karboksylowego Asp173 w $\alpha 8$ i akceptorem wiązania wodorowego Tyr39 w $\beta 2$. W przeciwieństwie do innych aaRS np. oddziałujących z aa o hydrofilowych łańcuchach bocznych, w przypadku TyrRS zaobserwować można duże zmiany w składzie aa w miejscu aktywnym, co sugeruje późny rozwój mechanizmów dyskryminujących [168,178].

Eukariotyczne TyrRS nie katalizują reakcji aminoacylacji bakteryjnych tRNA^{Tyr} i odwrotnie. O gatunkowej specyficzności decyduje w dużej mierze różnica w pojedynczej parze nukleotydów zlokalizowanej blisko ramienia akceptorowego tRNA^{Tyr}: para C1 - G72 charakterystyczna jest dla eukariotycznego tRNA, a G1 - C72 dla bakteryjnego [179]. Zamiana tych nukleotydów zmienia specyficzność syntetazy na skutek czego enzym eukariotyczny rozpoznaje bakteryjne tRNA i odwrotnie. Różnice między cząsteczką tRNA^{Tyr} z prokariota i eukariota dotyczą przede wszystkim rejonów odpowiedzialnych za jej oddziaływanie z enzymem, a więc nukleotydów w pozycji 1 i 72 oraz pętli zmiennej. W bakteryjnym tRNA^{Tyr} są to odpowiednio G1 i C72 oraz kilkunastonukleotydomowa pętla zmienna, w eukariotycznej C1 i G72 i rejon zmienny zbudowany z ok. 5 nt. TyrRS są dimerami, których domena C1 centrum katalitycznego odpowiada za swoiste wiązanie ramienia akceptorowego (rozróżnienie pomiędzy C1 - G72 w eukariota od G1 i C72 obecnych u prokariota). Koniec karboksylowy białka odpowiedzialny jest za wiązanie antykodonu, oraz oddziaływania z długą pętlą zmienną w przypadku tRNA bakteryjnego. Przykład TyrRS doskonale obrazuje różnice strukturalne i funkcjonalne między enzymami prokariotycznymi i eukariotycznymi. Obecność tych różnic stwarza szanse na znalezienie leku działającego specyficznie na konkretną syntetazę określonego mikroorganizmu.

4. Materiały i metody

4.1. Wykaz materiałów stosowanych w pracy

4.1.1. Ważniejsze odczynniki i enzymy

Tab. 4.1. Zestawienie odczynników chemicznych i biochemicznych wykorzystywanych w pracy.

Odczynnik	Producent
Zestaw do izolacji plazmidowego i genomowego DNA, zestaw do oczyszczania DNA po reakcjach enzymatycznych	A&A Biot
Zestaw do oczyszczania produktów PCR (DNA Clean - Up Purification Kit), zestaw do oczyszczania DNA rozdzielanych na żelu agarozowym (GeneMATRIX Agarose - Out DNA Purification Kit)	EURx
Zestaw do oczyszczania produktów PCR oraz do oczyszczania DNA z żelu agarozowego (NucleoSpin Extract II Kit), zestaw do izolacji plazmidowego DNA w małej skali (NucleoSpin® Plasmid)	Macherey - Nagel
Zestaw do izolacji plazmidowego DNA w dużej skali (Qiagen Plasmid Maxi Kit), agaroz wzbogacona niklem (Ni - NTA)	Qiagen
Marker wielkości DNA (1kpz), marker wielkości białek	Fermentas
Pożywka EMEM	ATCC
Pożywka OPTIMEM	Gibco
L - tyrozyna [¹⁴ C]	Moravek
Złoże do kolumny chitynowe	NEB
Roztwór scyntylacyjny	PerkinElmer
Sephadex G75, G100	Amersham Biosciences
Amicon, filtry 45mm, Bibuła 3MM	Milipore
Chlorek magnezu, chlorek potasu, chlorek sodu, cytrynian sodu, wersenian żelaza, wodorotlenek sodu, wodorotlenek potasu, DMSO, lizozym	Merck
Kwas borowy, kwas octowy, metanol, etanol, mocznik, fenol, chloroform, izopropanol, toluen, chlorek sodu, kwas ortofosforowy, kwas solny	Polskie Odczynniki Chemiczne
Agar	Serva
Mleko w proszku, PBS	LabEmpire
Bacto - Agar, Bacto - Trypton, ekstrakt drożdżowy, akryloamid (amid kwasu akrylowego), N’N’ - metylenobisakrylamid, błękit	Sigma

bromofenolowy (3,3',5,5' - tetrabromofenolosulfoftaleina), chlorek wapnia, DTT, EDTA, glicyna, glicerol, imidazol, nadsiarczan amonu (APS), TEMED, SDS (siarczan dodecyłu sodu), Tris (tri(hydroksymetylo) - aminometan), membrana PVDF, pożywka RPMI - 1640, roztwór witamin do pożywki RPMI - 1640, mieszanina antybiotyków do pożywki RPMI - 1640 (Antibiotic - Antimycotic), FBS, PBS, Tween 20, BCIP/NBT, PMSF, β - merkaptoetanol, ATP, IPTG, octan sodu, kwas trójchlorooctowy, arabinoza, odczynnik Bradforda, Triton X100, przeciwciała anty - His, BSA, MTT, glukoza, przeciwciało II - rz., streptawidyna, ampicilina, kanamycyna, spektynomycyna, gentamycyna	
---	--

Tab. 4.2. Enzymy stosowane w pracy.

Enzym	Producent
T4 DNA ligaza + 10 x bufor ligacyjny	Fermentas
Taq polimeraza + bufor Taq	Fermentas
Enzym restrykcyjny SapI	NEB
Enzymy restrykcyjne NcoI, SmaI, XhoI, EcoRI, HindIII, BamHI, PstI, NdeI	Fermentas
Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity + High Fidelity PCR Buffer	Invitrogen

4.1.2. Pożywki, bufor i roztwory

- Pożywki:

Pożywka LB płynna

1% Bakto - Trypton
0,5% ekstrakt drożdżowy
1% NaCl

Pożywka LB stała

1% Bakto - Trypton
0,5% ekstrakt drożdżowy
1% NaCl
1,5% agar

Pożywka SOC

2% Bakto - Trypton

0,5% ekstrakt drożdżowy
8,6 mM NaCl
2,5 mM KCl
20 mM MgSO₄
20 mM glukoza

Pożywka 2xYT płynna

1,6% Bakto -Trypton
1% ekstrakt drożdżowy
0,5% NaCl

Pożywka Superbroth płynna

3,2% Bakto - Trypton
2% ekstrakt drożdżowy
0,5% NaCl

Pożywka TB

1,2% Bakto - Trypton
2,4% ekstrakt drożdżowy
0,04% glicerol
0,017 M KH₂PO₄
0,072 M K₂HPO₄

M9 minimal

0,24 M Na₂HPO₄
0,11 M KH₂PO₄
0,093 M NH₄Cl
0,043 g NaCl

Pożywka RM

2% Bakto - Trypton
0,2% glukoza
1 mM MgCl₂
1 x M9 minimal

Pożywki do hodowli linii komórkowych

RPMI - 1640 Medium (Sigma)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma)
EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium) (ATCC)
OPTIMEM (Gibco)

Pożywki suplementowane były płodową surowicą bydlęcą (FBS) do stężenia 10%, roztworem antybiotyków oraz mieszaniną witamin do stężeń końcowych 1%.

- Bufory:

Bufor do izolacji RNA:

50 mM Tris - HCl, pH 7.5
 5 mM (CH₃COO)₂Mg
 30 mM KCl
 1 mM EDTA

Bufor do izolacji enzymu z *E. coli*, *S. aureus* i *P. aeruginosa*:

50 mM Tris - HCl, pH 7.5
 10 mM MgCl₂
 10 mM KCl
 20 mM β - merkaptioetanol
 10% glicerol
 1 mM EDTA

Bufor do izolacji enzymu z wątroby *Sus scrofa domestica*:

50 mM Tris - HCl, pH 7.5
 10 mM MgCl₂
 0,1 M KCl
 1 mM EDTA
 10 mM β - merkaptioetanol
 15% glicerol
 1 mM PMSF

Bufor do sączenia na Sephadex:

10 mM Tris - HCl, pH 7.5
 1 M NaCl

Bufor 10x TBE pH 8,3

0,5 mM Tris - HCl pH 8,3
 0,5 mM H₃BO₃
 10 mM EDTA pH 8,0

Bufor obciążający 2x stężony do elektroforezy kwasów nukleinowych

2 mM Tris - HCl pH 7,5
 4% glicerol
 0,2% bromofenol
 0,2% ksylencjanol

Bufor obciążający do elektroforezy białek

25 mM Tris - HCl pH 6,8
 0,8% SDS
 2 mM DTT
 0,1% błękit bromofenolowy

20% glicerol

Bufor do elektroforezy białek w żelu PAA 1x stężony

25 mM Tris - HCl pH 8,3

0,1% SDS

0,2 M glicyna

Bufor do sonikacji bakterii

100 mM bufor fosforanowy pH 7,4

0,6 M NaCl

0,2% β - merkaptotoetanol

1% glicerol

40 mg/ml PMSF

Bufor CLB

20 mM Tris - HCl, pH 8,5

500 mM NaCl

1 mM EDTA

Bufor CB

20 mM Tris - HCl, pH 8,5

1 M NaCl

1 mM EDTA

Bufor CleavB

20 mM Tris - HCl, pH 8,5

500 mM NaCl

1 mM EDTA

50 mM DTT

Bufor do transferu Western Blot:

25 mM Tris - HCl, pH 7,5

190 mM glicyna

20% metanol

• Roztwory:

Roztwór do barwienia żeli białkowych

50% metanol

10% kwas octowy

1,25% błękit Coomassie Brilliant Blue

Roztwór do odbarwiania żeli białkowych

10% kwas octowy

40% metanol

Roztwór do barwienia żeli poliakrylamidowych uwidaczniający obecność kwasów nukleinowych

1 g toluidyny blue O

590 ml H₂O

MIX do reakcji aminoacylacji

4 mM ATP/Na

100 mM Tris - HCl, pH 7.5

6 mM MgCl₂ 70 mM KCl

2 mM β - merkaptoetanol

4.1.3. Związki niskocząsteczkowe

Badane związki niskocząsteczkowe pochodziły z:

- Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN:

Pracownia Chemii Bioorganicznej ICHB PAN

Pracownia Analogów Nukleotydów i Oligonukleotydów

Pracownia Chemii Nukleotydów

Pracownia Proteomiki i Metabolomiki

- Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, Wydział Chemii:

Pracownia Chemii Nukleotydów i Nukleotydów

- Department of Regulation of Cell Proliferation and Apoptosis, Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine
- Sigma, Merck, Enamine, GreenPharma (związki dostępne komercyjnie)

W przeszukiwaniu komercyjnie dostępnych bibliotek związków użyto trzech narzędzi bioinformatycznych służących do wirtualnej analizy dużej ilości cząsteczek mogących być potencjalnymi lekami:

- <http://ligand.info/applet.html>
- <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/search.cgi#>
- <https://www.enaminestore.com>

Bazy danych powyższych programów zawierają wiele publicznie dostępnych oraz akademickich bibliotek związków pochodzących z takich baz danych jak: Hetero Atoms z Protein Data Bank, KEGG Ligand Database, czy The Open NCI Database. Całkowity rozmiar tych baz danych to ponad milion rekordów. Ich działanie opiera się na idei, że małe związki chemiczne o podobnej strukturze mają podobne właściwości biologiczne. System pozwala na szybkie i czułe przeszukiwanie związków z użyciem indeksów strukturalnych.

Procedurę dokowania przeprowadzono z użyciem programu AutoDock Vina wersja 1.1.2 [180].

4.1.4. Oligodeoksyrybonukleotydy

Jednoniciowe oligodeoksynukleotydy [Tab. 4.3] syntetyzowane były w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.

Tab. 4.3. Zestawienie oligodeoksyrybonukleotydów stosowanych w pracy.

Nazwa	Sekwencja zapisana od końca 5' do 3'
T7 start	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 stop	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
aga	CCCCCATGGCAAGCAGTAACTTG
aga2	CCCCTCGAGTTATTTCCAGCAAAT
RS	GTACCCGGCTTATTTCCAGCAAAT
pBAD Forward	ATGCCATAGCATTTTTATCC
pBAD Reverse	GATTTAATCTGTATCAGG
pBAD TyrF	ACCATGGCAAGCAGTAACTTG
pBAD TyrR	GGTTTCCAGCAAATCAGACAGTA
pTXB1Forv	GGTGGTCATATGGCAAGCAGTAACTTGATTAAAC
pTXB1Rev	GGTGGTTGCTCTTCCGCATTTCAGCAAATCAG
pTYB21Forv	GGTGGTTGCTCTTCCAACGCAAGCAGTAACTTG
pTYB21Rev	GGTGGTCTGCAGTCATTTCAGCAAATCAG
InteinForv	CCCGCCGCTGCTTTTGCACGTGAG
MxeInteinRevII	GATTGCCATGCCGGTCAAGG
TyrRSsprForv	GGAGAAAACCTCTGCTATCGCGGCG
TyrRSsprRev	CGCCTGTAAACCTTCTTCACCGTGAAC
Spr Rev	GTACATACTGGGCGCGCG
SprForv	ACTCTGCTATCGCGGCGAAC
T7_Ter_Rev	TATGCTAGTTATTGCTCAG

4.1.5. Plazmidy

W badaniach wykorzystano następujące plazmidy:

- pUC18 – plazmid wysokokopijny, przystosowany do powielania w szczepach propagacyjnych *E. coli* np. NovaBlue, DH5 α w obecności ampicyliny (50 μ g/ml),
- pET28a – plazmid ekspresyjny, zawierający promotor dla T7 polimerazy RNA przystosowany do ekspresji w obecności kanamycyny (60 μ g/ml) w szczepie *E. coli* BL21 - CodonPlus(DE3) - RIL,
- pDRIVE – plazmid klonujący produkty PCR zawierający: geny oporności na ampicylinę (50 μ g/ml) i kanamycynę (60 μ g/ml),
- pQE30 – niskokopijny plazmid ekspresyjny umożliwiający syntezę białek z dodatkową sekwencją 6 histydyn, pozwalającą oczyścić białko na kolumnkach niklowych. W skład plazmidu pQE30 wchodzi: promotor T5, sekwencja His - Tag, sekwencja MCS, terminator lambda t0, ColE1 ori, sekwencja kodująca β - laktamazę,

- pBAD - TOPO – plazmid umożliwiający jednoetapowe klonowanie i ekspresję produktów PCR, po aktywowaniu do formy zlinearyzowanej przez topizomerazę I. W skład plazmidu wchodzi: ścisły promotor araBad, sekwencja His Tag, MCS,
 - pTXB1 – plazmid ekspresyjny umożliwiający ekspresję docelowego białka w ramce odczytu z białkiem fuzyjnym ulegającym samoodcięciu z kolumny powinowactwa ze złożem chitynowym. Koniec karboksylowy docelowego białka jest połączony z inteiną. Plazmid zawiera promotor dla T7 polimerazy RNA przystosowany do ekspresji w obecności ampicyliny (50 µg/ml),
 - pTYB21 – plazmid ekspresyjny umożliwiający ekspresję docelowego białka w ramce odczytu z białkiem fuzyjnym ulegającym samoodcięciu z kolumny powinowactwa ze złożem chitynowym. Koniec aminowy docelowego białka jest połączony z inteiną. Plazmid zawiera promotor dla T7 polimerazy RNA przystosowany do ekspresji w obecności ampicyliny (50 µg/ml),
 - pAT505 – plazmid umożliwiający ekspresję białka zielonej fluorescencji w komórkach bakterii *E. coli*. Zawiera promotor dla T7 polimerazy RNA, jest przystosowany do ekspresji w obecności ampicyliny (100 µg/ml).
- Otrzymany od prof. Catherine Grillot - Courvalin z Unité des Agents Antibactériens, Institut Pasteur w Paryżu, Francja,
- pGB2Ω inv/hly – plazmid odpowiedzialny za inwazyjność *E. coli*. Gen *hly* zawiera gen kodujący inwazyję – białko z *Yersinia pseudotuberculosis* umożliwiające wnikanie bakterii do komórek eukariotycznych zawierających w błonie komórkowej β - integryny. Plazmid zawiera promotor dla T7 polimerazy RNA i jest przystosowany do ekspresji w obecności spektynomycyny (50 µg/ml). Otrzymany od prof. Catherine Grillot - Courvalin z Unité des Agents Antibactériens, Institut Pasteur w Paryżu, Francja.

4.1.6. Materiał biologiczny

- Szczepy *E. coli*:

Escherichia coli NovaBlue (Novagen). Genotyp: endA1 hsdR17 (r_{K12}-m_{K12}⁺) supE44 thi - 1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA+B + lacIqZ Δ M15::Tn10] (Tet^R). Szczep bakteryjny zapewniający wysoką wydajność transformacji i propagacji wektora.

Escherichia coli DH5α (Novagen). Genotyp: F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ⁻. Szczep *E. coli* używany rutynowo do klonowania. Zapewnia dużą stabilność insertu.

Escherichia coli BL21 (Stratagene). Genotyp: F- dcm ompT hsdS(r_B- m_B-) gal [malB⁺]_{K-12}(λ^S). Układ oparty jest na ekspresji z promotora faga T7. Jest to bardzo silny promotor, działający wyłącznie z polimerazą RNA faga T7. Polimeraza znajduje się pod kontrolą promotora laktozowego w genomie gospodarza (BL21(DE3)).

Escherichia coli TOP10 (Invitrogen). Genotyp: F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻. Szczep bakteryjny zapewniający wysoką wydajność transformacji i propagacji wektora.

Escherichia coli LMG194 (Invitrogen) Genotyp: F- Δ lacX74 galE thi rpsL Δ phoA (Pvu II) Δ ara714 leu::Tn10. Szczep z delecją araBAD. LMG194 hodowany w pożywce zawierającej 1% glukozę pozwala na uzyskanie bardzo niskiego poziomu ekspresji w komórkach nieindukowanych. Przeznaczony do nadprodukcji białek potencjalnie toksycznych dla komórki.

Escherichia coli ER2566 (NEB). Genotyp: F- λ - fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene 1 gal sulA11 Δ (mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10-TetS)2 R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm]. Szczep ekspresyjny dla genów wklonowanych do wektorów pTYB. Polimeraza T7 znajduje się pod kontrolą promotora laktozowego w genomie gospodarza. Przy braku indukcji IPTG, ekspresja polimerazy T7 jest wyciszona przez przyłączenie represora lacI do promotora lac.

Escherichia coli JM109 (NEB). Genotyp: endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB⁺ Δ (lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ Δ M15] hsdR17(r_K⁻m_K⁺). Szczep *E. coli* używany rutynowo do klonowania. Zapewnia dużą stabilność insertu.

Escherichia coli C41 pLys (Lucigen). Genotyp: F⁻ ompT gal dcm hsdS_B(r_B⁻m_B) (DE3)pLysS (Cm^r). Szczep zawiera mutacje wybrane na podstawie obserwacji fenotypu przy ekspresji rekombinowanych białek toksycznych. Szczep C41 (DE3) pochodzi od BL21 (DE3).

Escherichia coli C43 pLys (Lucigen). Genotyp: F⁻ ompT gal dcm hsdS_B(r_B⁻m_B) (DE3)pLysS (Cm^r). Szczep C43 pochodzi od C41 (DE3) poprzez selekcję oporności na inne białka toksyczne.

Escherichia coli M15 [pREP4] (Qiagen). Genotyp: nalS, strS, rifS, thi-, lac-, ara+, gal+, mtl-, F-, recA+, uvr+, lon+ [pREP4 KanR]. Szczep wywodzi się od szczepu K12, endogenne plazmid pREP4 koduje białko represorowe lac oraz oporność na kanamycynę.

Escherichia coli SG13009 [pREP4] (Qiagen). Genotyp: nalS strS rifS thi- lac- ara- gal+ mtl- F- recA+ uvr+ lon+ [pREP4 KanR]. Szczep wywodzi się od szczepu K12, endogenne plazmid pREP4 koduje białko represorowe lac oraz oporność na kanamycynę.

- Patogenne bakterie wykorzystywane w pracy: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* [Tab. 4.4].

Tab. 4.4. Szczepy bakterii patogennych wykorzystane w pracy

Gatunek	Pochodzenie	Fenotyp
<i>Staphylococcus aureus</i>	izolat kliniczny	MRSA Oporny na: erytromycynę, klindamycynę, doksycylinę, gentamycynę, ciprofloksacynę, trimetoprim/sulfametoksazol Wrażliwy na: wankomycynę, linezolid, teikoplaninę, rifampicynę
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	izolat kliniczny	Oporny na: ciprofloksacynę, karbapenemy (imipenem, meropenem) Wrażliwy na: amikacynę, ceftazydym, gentamicynę, piperacylinę, netylmycinę
<i>Escherichia coli</i>	kolekcja ATCC	Szczep kontrolny do badania m.in. wrażliwości na antybiotyki, ESBL i in.

- Linie komórkowe:

W badaniach wykorzystano: linię komórkową wyprowadzoną z ludzkich komórek śródbłonkowych nerki (HEK 293T) oraz linię komórkową VERO pochodzącą z tkanki nabłonkowej pobranej z nerki afrykańskiego koczodana zielonego. Jest to ciągła, aneuploidalna linia komórkowa o komórkach podobnych do fibroblastów.

- Tkanki: wątroba *Sus scrofa domestica*

- cDNA *tyrS* (*E. coli*)

Otrzymany od prof. Osamu Yamamoto z Protein Research Group, RIKEN, Genomic Sciences Center (GSC) w Yokohama, Japonia.

4.2. Metody rozdzielania i analizy kwasów nukleinowych

4.2.1. Elektroforetyczny rozdział kwasów nukleinowych w denaturujących żelach poliakrylamidowych

Rozdział elektroforetyczny oligonukleotydów DNA i RNA prowadzono w 15% i 20% żelu poliakrylamidowym z 7 M mocznikiem [Tab. 4.5.] o wymiarach 20 cm x 40 cm i grubości 0,5 mm, przy napięciu 1000 V – 2000 V i natężeniu 5 – 30 mA w temperaturze pokojowej [181]. Elektroforezę prowadzono w buforze 1x TBE. Próby nakładano na żel w buforze obciążającym do PAA w stosunku 1:1. Każdą elektroforezę poprzedzano 30 min. elektroforezą wstępną (*ang. pre - run electrophoresis*)

Tab. 4.5. Skład denaturujących żeli poliakryloamidowych.

Składnik	15%	20%
40% akryloamid/bisakryloamid (38:2)	37,5 ml	50 ml
mocznik	42 g	42 g
10 x TBE	10 ml	10 ml
Woda	do 100 ml	do 100 ml
10% APS	700 µl	700 µl
100% TEMED	35 µl	35 µl

4.2.2. Elektroforetyczny rozdział kwasów nukleinowych w żelach agarozowych

Produkty otrzymane metodą PCR oraz plazmidowy DNA (500 – 1000 ng) izolowany z hodowli bakteryjnych analizowano w 1% i 2% żelach agarozowych [Tab. 4.6.] o wymiarach

10 x 10 cm i 15 x 13 cm grubości 0,5 cm w obecności BrEt. Przed rozdziałem elektroforetycznym preparaty obciążano 1/6 objętości buforu do elektroforezy agarozowej. Rozdział prowadzono w buforze 1x TBE przy natężeniu prądu 40 – 50 mA w temperaturze pokojowej w obecności markerów wielkości DNA 1 kpz (Fermentas) [182].

Tab. 4.6. Skład żeli agarozowych.

Składnik	1% żel agarozowy	2% żel agarozowy
Agaroza	0,5 g	1 g
1x bufor TBE	50 ml	50 ml
Bromek etydyny	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml

4.2.3. Wykrywanie kwasów nukleinowych w żelach i roztworze

RNA oraz DNA identyfikowano w żelach poliakrylamidowych w świetle UV [182] lub wykorzystując roztwór błękitu toluidyny.

Plazmidowe DNA oraz produkty otrzymane metodą PCR w żelach agarozowych wybarwionych BrEt wizualizowano wzbudzając fluorescencję światłem UV przy pomocy systemu do dokumentacji żeli GelDoc - Imaging System (UVP).

Stężenie kwasów nukleinowych w próbach wyznaczano na podstawie pomiarów absorpcji przy długości fali λ_{260} nm a ich czystość określano na podstawie stosunku A260/A280 nm oraz A260/A230 nm. Preparat DNA uznawano za czysty jeżeli A260/A280 wynosiło 1,8 – 2,0 i A260/A230 wynosiło ok. 2,2.

Przeliczniki wartości stosowane do obliczenia stężenia kwasów nukleinowych w roztworach:

ssRNA: 1 OD/ml = 40 µg/ml

ssDNA: 1 OD/ml = 33 µg/ml

dsDNA: 1 OD/ml = 50 µg/ml

4.2.4. Izolacja tRNA z *E. coli*, *S. aureus* i *P. aeruginosa*

Komórki bakterii przemyto wodą MiliQ, następnie buforem do izolacji RNA (50 ml), zwirowano (4000 rpm, 4°C, 10 min.) i usunięto supernatant. Czynność powtórzono trzykrotnie w celu usunięcia pozostałości pożywki. Komórki bakteryjne [Tab. 4.7.] ponownie zawieszono w buforze do izolacji RNA (150 ml buforu/10 g pasty bakteryjnej) tym razem z dodatkiem lizozymu (odpowiednio 40 mg lizozymu/100 ml buforu dla bakterii Gram (-) – *E. coli* i *P. aeruginosa*, 300 mg lizozymu/100 ml buforu dla Gram (+) – *S. aureus* i 2% SDS. Lizę bakterii prowadzono w 0°C, mieszając przez 1h. Po tym czasie zawiesinę zwirowano (5900 rpm, 4°C, 5 min.).

Zebrany supernatant ekstrahowano rozpuszczalnikami organicznymi: fenolem, a następnie mieszaniną fenol:chloroform w stosunku 1:1 w celu usunięcia białek i

polisacharydów. Aby z roztworu usunąć pozostałości fenolu ostatnią ekstrakcję przeprowadzono z użyciem chloroformu.

Kolejnym etapem było wytrącenie z roztworu RNA i usunięcie z niego zanieczyszczeń drobnocząsteczkowych. Do warstwy wodnej dodano 2,5 objętości 96% etanolu i 1/10 objętości 2% octanu potasu, pH 5.2, celem strącenia RNA. Roztwór umieszczono na 1 h w temperaturze -80°C. Następnie mieszaninę zwirowano (12000 rpm, 4°C, 10 min.), supernatant zlano, a osad przepłukano 70% etanolem w celu usunięcia z roztworu soli). Mieszaninę ponownie zwirowano, supernatant usunięto, a osad pozostawiono do całkowitego odparowania etanolu. Wysuszony osad rozpuszczono w wodzie MiliQ. Jakość preparatu RNA sprawdzono elektroforetycznie na 15% żelu poliakrylamidowym. Stężenie RNA określono spektrofotometrycznie.

W dalszym etapie mieszaninę RNA oczyszczono na kolumnie ze złożem Sephadex G75 (120 cm x 1 cm) uprzednio przemytej 2 litrami buforu do sączenia na Sephadex. Tego samego buforu użyto do elucji RNA (prędkość przepływu 1 ml/10 min) i regeneracji kolumny. Zbierano frakcje o objętości 1 ml, w których, przy pomocy spektrofotometru Nanodrop Spectrophotometer 2000C, określono stężenie RNA. Analizę składu frakcji wykonano za pomocą elektroforezy w 15% żelu PAA z moczniakiem, który po rozdziale (I = 20 mA) wybarwiono błękitem toluidynowym. Frakcje zawierające tRNA połączono i wytrącono a następnie odwirowano, wysuszono i rozpuszczono jak wyżej. Stężenie tRNA, oraz czystość preparatu określono na podstawie A260 oraz stosunków A260/A280 i A260/A230.

Tab. 4.7. Średnia masa pasty bakteryjnej wykorzystywana do oczyszczania tRNA.

	Średnia masa pasty bakteryjnej (g) z 1l hodowli
<i>E. coli</i>	10
<i>S. aureus</i>	7,5
<i>P. aeruginosa</i>	10

4.2.5 Izolacja tRNA z wątroby *S.scrofa domestica*

125 g świeżej wątroby *Sus scrofa domestica* homogenizowano w 250 ml buforu do izolacji tRNA. Począwszy od etapu ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi izolację tRNA przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną dla RNA z *E. coli*, *S. aureus* i *P. aeruginosa*.

4.3. Hodowle bakteryjne

4.3.1. Hodowla bakterii *E. coli* do izolacji tRNA

Przygotowano hodowlę bakterii BL21 (pożywka płynna LB, 37.1°C, wytrząsanie z szybkością 210 rpm, 16 h). Posłużyła ona do inokulacji kolejnych hodowli, które prowadzono w tych samych warunkach do czasu, aż ich gęstość optyczna OD mierzona przy długości fali $\lambda = 600$ nm osiągnęła wartość 0.8 – 1. Następnie hodowlę zwirowano w wirówce Eppendorf Centrifuge 5810R (4000 rpm, w 4°C, przez 10 min). Pożywkę znad osadu komórek zdekantowano, a komórki bakteryjne zważono.

4.3.2. Przygotowanie komórek kompetentnych *E. coli*

Szczep bakterii *E. coli* przygotowano do transformacji plazmidami [Tab. 4.8.] stosując metodę chemiczną z wykorzystaniem chlorku wapnia. 100 ml płynnej pożywki LB inokulowano 1 ml nocnej hodowli. Hodowlę prowadzono w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 200 rpm do wczesnej fazy logarytmicznego wzrostu bakterii $OD_{600} = 0,5 - 0,6$. Kulturę wirowano 5 min. w 4°C z prędkością 4000 rpm, osad zawieszano w 4 ml schłodzonego na lodzie sterylnego 100 mM chlorku wapnia, a następnie inkubowano w lodzie przez 25 min., po czym wirowano 5 min. w 4°C, 4000 rpm. Komórki kompetentne zawieszano w 2 ml sterylnego 75 mM roztworu chlorku wapnia zawierającego 25% glicerolu, rozdzielono na 100 μ l frakcje i zamrożono w ciekłym azocie. Tak przygotowane bakterie przechowywano w temperaturze -80°C.

Tab. 4.8. Zestawienie plazmidów i szczepów bakteryjnych wykorzystanych w pracy.

Plazmid	Docelowy szczep <i>E. coli</i>
Propagacja plazmidu	
pDrive	DH5 α , Nova Blue
pUC18	TOP 10, Nova Blue
pET28b	DH5 α
pBAD - TOPO	TOP 10
pTXB1, pTYB21	TOP 10, DH5 α
pAT505	DH5 α
PGB2 Ω inv/hly	DH5 α
Ekspresja TyrRS	
pET28b	BL21, C41 pLYS, C43 pLYS
pQE30	JM109, M15, SG13009
pBAD - TOPO	LMG 194, C41 pLYS, C43 pLYS
pTXB1, pTYB21	ER2566, C41 pLYS, C43 pLYS
Ekspresja białka zielonej fluorescencji i białka odpowiedzialnego za inwazyjność <i>E. coli</i>	
pAT505	DH5 α , LMG 194, ER2566, C41 pLYS, C43 pLYS
PGB2 Ω inv/hly	DH5 α , LMG 194, ER2566, C41 pLYS, C43 pLYS

4.3.3. Transformacja bakterii plazmidowym DNA metodą szoku cieplnego

Do 100 μ l zawiesiny zawierającej komórki kompetentne dodawano plazmid w stężeniu 10 – 20 ng/ μ l. Komórki inkubowano 30 minut w lodzie, a następnie 90 sekund w 42°C i ponownie w lodzie przez 2 minuty. Do transformowanych komórek dodano 800 μ l pożywki SOC i inkubowano przez 1 h w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 350 rpm. Bakterie wirowano 2 minuty z prędkością 4000 rpm, osad zawieszano w 200 μ l pożywki LB. 50 μ l zawiesiny bakteryjnej nanoszono na szalki Petriego z pożywką stałą LB zawierającą antybiotyki selekcyjne (kanamycyna (60 μ g/ml), ampicilina (100 μ g/ml), spektynomycyna (100 μ g/ml)) i inkubowano 16 h w temperaturze 37°C. Następnego dnia otrzymywano pojedyncze kolonie transformowanych bakterii.

4.3.4. Określanie minimalnego stężenia hamującego (MIC₅₀)

Bakterie *E. coli*, *S. aureus* i *P. aeruginosa* wysiano na 96 - dołkową płytkę w ilości 10⁵ cfu/ml w 100 μ l pożywki płynnej LB zawierającej antybiotyki selekcyjne: ampicilinę (50 μ g/ml) i spektynomycynę (50 μ g/ml). Wcześniej na płytce umieszczono inhibitor w roztworze PBS/DMSO (50% v/v), którego ostateczne stężenie w dołkach wynosiło 500 μ M, 250 μ M, 100 μ M i 50 μ M. Dla każdego stężenia wykonano sześć powtórzeń. Kontrolę pozytywną stanowił roztwór PBS/DMSO (50% v/v) a negatywną kanamycyna w stężeniu 50 μ g/ml. Po 24h hodowli do każdego dołka dodano 50 μ l roztworu MTT o stężeniu 2 mg/ml w PBS i inkubowano w ciemności przez 4 h. Następnie płytkę wirowano 10 min. z prędkością 4000 rpm. Zebrano supernatant a osad rozpuszczono w 100 μ l 10% SDS w 5% izopropanolu i 1mol/L HCl. Po 12 h inkubacji wykonano pomiaru przy długości fali 550 nm z użyciem czytnika mikropłytek (Synergy2, Biotek).

4.4. Izolacja plazmidowego DNA z hodowli bakteryjnych

Otrzymywanie lizatów bakteryjnych z plazmidowym DNA

Kolonie bakterii zawierających wektor ekspresyjny zawieszono w 20 μ l jałowej dejonizowanej wody i denaturowano 5 min. w temperaturze 95°C. Uzyskane lizaty komórkowe wirowano 5 min. z prędkością 14000 rpm. Supernatant zawierający plazmidowy DNA przeniesiono do nowej probówki i wykorzystano jako matrycę do reakcji PCR.

Otrzymywanie plazmidu w małej skali

Pojedyncze kolonie bakterii transformowanych plazmidem, przenoszono do 10 ml płynnej pożywki LB z antybiotykiem selekcyjnym i wytrząsano 14 – 16 h w temperaturze 37°C z prędkością 250 rpm. 3 ml zawiesiny bakterii wirowano 1 min., 10 000 rpm. Z uzyskanego osadu izolowano plazmidowy DNA z wykorzystaniem zestawu odczynników Plasmid Mini AX (A&A Biot) lub zestawu do izolacji plazmidowego DNA w małej skali

(NucleoSpin® Plasmid) zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Wydajność izolacji wynosiła około 5 – 10 µg. Stężenie otrzymanego DNA mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 260 nm.

Izolacja plazmidu w dużej skali

10 ml płynnej pożywki LB z antybiotykiem selekcyjnym inokulowano transformowanymi bakteriami z pojedynczych kolonii i wytrząsano 14 – 16 h w temperaturze 37°C, 250 rpm. Następnie 1 ml tej hodowli zastosowano do inokulacji 100 ml pożywki LB z antybiotykiem i inkubowano w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 250 rpm przez noc. Następnie kulturę wirowano 15 minut w 4°C przy 4000 rpm. Izolację plazmidowego DNA przeprowadzono wykorzystując zestaw odczynników Plasmid Maxi Kit (Qiagen) zgodnie z opisem dołączonym przez producenta. Wydajność izolacji wynosiła około 500 – 600 µg. Stężenie otrzymanego DNA mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 260 nm. Czystość otrzymanego plazmidu analizowano na podstawie stosunku wartości absorbancji $A_{260/280}$ nm oraz A_{260}/A_{220} nm.

4.5. Przygotowanie plazmidu i insertu do klonowania i transformacji bakterii

4.5.1. Amplifikacja DNA metodą PCR

Łańcuchową reakcję polimerazy DNA (PCR) przeprowadzano według ogólnego modelu podanego w tabeli 4.9.

Tab. 4.9. Skład typowej reakcji PCR.

Składniki	Stężenie/ilość
Matryca DNA	1 – 10 ng
dNTP mix 10 mM (Fermentas)	0,2 mM
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM
Bufor reakcyjny 10x (Fermentas)*	1x
Starter komplementarny do końca 5' powielanego fragmentu	8 – 10 pmol
Starter komplementarny do końca 3' powielanego fragmentu	8 – 10 pmol
Polimeraza Taq 5U/µl (Fermentas)	1U

* Skład buforu reakcyjnego 10x: 100 mM Tris - HCl pH 8,8; 500 mM KCl; 0,8% Nonidet P40 lub 750 mM Tris - HCl pH 8,8; 200 mM (NH₄)₂SO₄; 0,1% Tween 20

Reakcje prowadzono w objętości 10, 25 lub 50 µl. Przygotowane próby umieszczano w aparacie nagrzanym do 94°C (hot start). Ogólne warunki reakcji PCR zestawiono w tabeli 4.10.

W zależności od dalszego przeznaczenia produkty reakcji PCR poddawane były:

- analizie metodą elektroforezy w żelu agarozowym (Rozdz.4.2.2.)

- oczyszczaniu przy pomocy zestawu Nucleo Spin Extract II Kit (zgodnie z procedurą podaną przez producenta)
- hydrolizie enzymami restrykcyjnymi (Rozdz.4.5.2).

Ocenę ilości uzyskanego DNA dokonywano przez pomiar UV przy długości fali 260 nm

Tab. 4.10. Ogólne warunki reakcji PCR.

		Polimeraz Taq Fermentas			PCR taq High Fidelity Invitrogen		
Etap		Temperatura	Czas	Ilość powtórzeń	Temperatura	Czas	Ilość powtórzeń
I	Denaturacja	94°C	5'	1	95°C	2'	1
	Wiązanie starterów	53°C	1'		55°C	30''	
	Wydłużanie łańcucha DNA	72 °C	1'		68 °C	1'15''	
II	Denaturacja	94°C	1'	29	95°C	30''	29
	Wiązanie starterów	53°C	1'		55°C	30''	
	Wydłużanie łańcucha DNA	72 °C	1'		68 °C	1'15''	
III	Synteza końcowa	72 °C	10'	1	68 °C	20'	1

4.5.2. Hydroliza plazmidu i insertu TyrRS enzymami restrykcyjnymi

Reakcję hydrolizy enzymami restrykcyjnymi prowadzono w objętości 20 µl przez 0,5 – 3 h [Tab. 4.11.; Tab. 4.12.]. Produkty analizowano w 1% żelu agarozowym.

Tab. 4.11. Hydroliza DNA enzymami restrykcyjnymi.

Skład mieszaniny reakcyjnej	Ilości
Plazmidowy DNA	1µg
Bufor do trawienia restrykcyjnego 10x	2µl
Enzym restrykcyjny	2µl (10U/µl)
H ₂ O	do 20µl

W przypadku produktów reakcji PCR hydroliza enzymatyczna poprzedzona była ich oczyszczeniem z żelu za pomocą gotowego zestawu do oczyszczania produktów PCR z żelu agarozowego (NucleoSpin Extract II Kit). Produkt reakcji oczyszczano zgodnie z procedurą fenol - chloroform, a następnie analizowano w 1 – 2% żelu agarozowym.

Tab. 4.12. Zestawienie restryktaz i buforów wykorzystywanych do hydrolizy DNA.

Substrat poddany trawieniu	Enzym restrykcyjny	Bufor
pDrive	NcoI, SmaI EcoRI, Hind III	Tango*
pET28b	NcoI, XhoI	Tango*
pTXB1	SapI, NdeI	NEB4**
pTYB21	PstI, SapI	Tango*

* Oznaczenia buforów firmy Fermentas [Protocols and Applications Guide]

** Oznaczenia buforów firmy NEB

4.5.3. Ligacja

Gen kodujący TyrRS *E. coli* powielony w wyniku reakcji PCR (Rozdz.4.5.1) został wklonowany do plazmidów w wyniku ligacji. Stosunek molowy wektor:insert wynosił 1:1, 1:3. Skład mieszaniny ligacyjnej przedstawiono w tabeli 4.13.

Tab. 4.13. Przykładowy skład mieszaniny ligacyjnej.

Składniki	Stosunek wektor : insert 1:1	Stosunek wektor : insert 1:3
Plazmid pTYB21	7,2 ng/μl	7,2 ng/μl
Insert TyrRS	11,2 ng/μl	11,2 ng/μl
Bufor ligacyjny 10x	2 μl	2 μl
T4 DNA ligaza (1U/μl)	2 μl	2 μl
Woda	do 20 μl	do 20 μl

Mieszaninę reakcyjną inkubowano 16 h w temperaturze 16°C, a następnie wykorzystano do transformacji kompetentnych bakterii *E. coli* metodą szoku cieplnego (Rozdz.4.3.3). Każdorazowo przygotowywano kontrolną reakcję ligacji (kontrolę negatywną) zawierającą wektor w formie liniowej bez insertu. Bakterie wysiewano na szalki Petriego ze stałą pożywką LB zawierającą ampicylinę, spektynomycynę lub kanamycynę (100 μg/ml pożywki) i inkubowano w temperaturze 37°C. Po 16 h inkubacji otrzymywano pojedyncze kolonie transformowanych bakterii.

Efektywność ligacji sprawdzono:

- w reakcji PCR ze specyficznymi starterami (Rozdz.4.5.1),

Jako matrycę do namnożenia wklonowanego fragmentu wykorzystano plazmidowy DNA obecny w lizatach transformowanych bakterii.

- poprzez hydrolizę enzymami restrykcyjnymi izolowanego plazmidu (Rozdz.4.5.2),
- wykonując sekwencjonowanie plazmidowego DNA (UAM) uzyskanego w wyniku miniizolacji wektora z pojedynczych koloni transformowanych komórek bakteryjnych (Rozdz.4.4.2).

4.5.4. Transformacja bakterii

Transformację bakterii przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 4.3.3. wykorzystując 1µl mieszaniny ligacyjnej, którą poddano wcześniej działaniu wysokiej temperatury (65°C, 10min) w celu inaktywacji enzymu.

4.5.5. Analiza transformantów

Identyfikację transformantów przeprowadzono z użyciem techniki PCR kolonii (*ang. colony PCR*) (Rozdz.4.5.1). Matrycę do reakcji przygotowano przez zawieszenie w wodzie bakterii pobranych z pojedynczej kolonii, ich inkubację w 95°C przez 10 min. i odwirowanie. Do reakcji stosowano 1µl w ten sposób przygotowanego supernatantu.

4.5.6. Klonowanie fragmentu *tyrS* z plazmidu propagacyjnego do wektora ekspresyjnego

Wektor ulegający ekspresji w komórkach bakteryjnych, poddano hydrolizie odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi (Rozdz. 4.1.1). W celu sprawdzenia efektywności hydrolizy 1,5 µg przeciętego plazmidu poddano analizie w 1% żelu agarozowym w obecności tej samej ilości niehydrolizowanego wektora jako kontroli oraz standardu wielkości. Fragment przeznaczony do ligacji z plazmidem zawierający kohezyjne końce uzyskano w wyniku reakcji PCR z wykorzystaniem starterów wprowadzających sekwencje dla odpowiednich enzymów restrykcyjnych [Tab. 4.3.]. Skład mieszaniny reakcyjnej i warunki reakcji podano odpowiednio w tabelach 4.9 i 4.10.

Reakcję prowadzono w warunkach opisanych w rozdz.4.5.1. Uzyskany w wyniku PCR insert *tyrS* oczyszczono elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym i wyizolowano z żelu za pomocą zestawu do oczyszczania produktów PCR oraz do oczyszczania DNA z żelu agarozowego (NucleoSpin Extract II Kit). W celu utworzenia lepkich końców otrzymany insert trawiono odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi (Rozdz.4.5.2). Ilość uzyskanego produktu oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali 260 nm. Przygotowany gen *tyrS* ligowano z wektorem (Rozdz 4.5.3).

4.6. Hodowle komórkowe

4.6.1. Hodowla komórek HEK 293T

Do analizy cytotoksyczności badanych związków (test MTT) wykorzystywano komórki HEK 293T, które hodowano w 96 - dołkowych płytkach komórkowych (Nunc) 5 x 10³ komórek/dołek) w objętości pożywki 100 µl oraz w butelkach do hodowli komórkowych (25 cm², 75 cm²).

4.6.2. Hodowla komórek VERO

Komórki VERO w stężeniu 10^5 /ml hodowano na płytkach 6 - dołkowych przez noc w pożywce EMEM suplementowanej 2 mM L - glutaminą oraz 5% płodową surowicę bydlęcą. Bakterie *E. coli* K12 hodowano przez noc w wytrząsarce w temperaturze 30°C w pożywce LB zawierającej 25 µg/ml spektynomycyny i kanamycyny a następnie zebrano w późnej fazie wzrostu logarytmicznego (OD₆₀₀ ok. 4) i zawieszono w pożywce EMEM tak, aby uzyskać 10^8 – 10^9 bakterii/ml. Bakterie w środkowej fazie wzrostu logarytmicznego uzyskano przenosząc 0,5 ml inokulatu do 20 ml pożywki LB i inkubując w temperaturze 30°C do momentu, gdy OD₆₀₀ wyniosło około 0,7.

Inwazyjne bakterie *E. coli* w stężeniach $2,5 \times 10^7$ /ml dodane zostały do komórek VERO w pożywce EMEM zawierającej badany inhibitor w stężeniach 0 – 0,5 mM i inkubowane przez 2 – 4 h w 37°C. Po inkubacji komórki przepłukane zostały 3 - krotnie EMEM a ilość bakterii, które wniknęły do komórek VERO oceniona została przy użyciu mikroskopu optycznego umożliwiającego obserwację fluorescencji.

4.6.3. Przechowywanie linii komórkowych

Do namnożenia komórek HEK293T i VERO w celu przygotowania odpowiedniej ilości materiału do przechowywania wykorzystywane były butelki do hodowli linii komórkowych (75 cm³, Nunc). Komórki wysiewano w ilości $1,5 \times 10^7$. Hodowlę prowadzono w 10 ml pożywki EMEM (komórki VERO) lub DMEM (HEK 293T) w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂ do osiągnięcia 80% konfluencji. W celu odklejenia komórek od dna butelki hodowlę przemywano dwukrotnie buforem PBS, a następnie dodawano 3 ml roztworu trypsyny - EDTA i inkubowano 2 min. w temperaturze pokojowej lub w 37°C. Do uzyskanej zawiesiny dodawano 6 ml odpowiedniej pożywki i całość wirowano 2 min. z prędkością 1500 rpm. w temperaturze 22°C. Supernatant usuwano, a osad zawieszano w 500 µl pożywki uzupełnionej 40% FBS i 500 µl pożywki z dodatkiem 20% DMSO. Całość przenoszono do probówki przystosowanej do przechowywania w ciekłym azocie i poddawano wstępnemu zamrażaniu w temperaturze - 70°C. Po upływie 24 h probówki przenoszono do ciekłego azotu w celu dalszego przechowywania.

4.6.4. Analiza cytotoksyczności i hamowania proliferacji komórek przez związki niskocząsteczkowe (test MTT)

Analizę cytotoksyczności badanych związków wykonano za pomocą testu MTT. Do przeprowadzenia testu przygotowano 10x stężony roztwór wodny MTT (5 mg/ml) oraz 1x stężony rozcieńczony w pożywce OPTIMEM. Komórki HEK293T hodowane w 96 - dołkowych płytkach poddawane 72 h inkubacji z wybranymi stężeniami badanych związków. Po tym czasie komórki były przemywane 1x stężonym buforem PBS, a następnie

umieszczane z pożywką z 1x stężonym MTT (100µl/1dołek). Komórki inkubowano 2 h w inkubatorze CO₂, po czym usuwano roztwór MTT. Powstałe kryształy formazanu rozpuszczano w 100 µl DMSO a płytkę umieszczono na wstrząsarce orbitalnej na 10 min. w temperaturze pokojowej w zaciemnieniu. Następnie odczytywano absorbancję przy długości fali 590 nm oraz referencyjnej 620 nm za pomocą czytnika mikropłytek (Synergy2, Biotek). Każdorazowo mierzono absorbancję dla kontroli DMSO.

Wartość poziomu redukcji MTT na początku czasu inkubacji ($t = 0$) była odejmowana od kontroli i wyników uzyskanych po inkubacji komórek eukariotycznych z badanym związkiem przez 72 h. Pozwoliło to na rozróżnienie śmierci komórek wywołanej przez badany związek od zahamowania proliferacji. Wartości negatywne wskazują na śmierć nekrotyczną komórek wywołaną cytotoksycznością związków. Wartości pomiędzy 0 – 100% odnoszą się do zahamowania ich proliferacji [183].

4.7. Izolacja i nadprodukcja białek

4.7.1. Przygotowanie mieszaniny enzymów z *S. aureus* i *P. aeruginosa*

Tab. 4.14. Masa pasty bakteryjnej przeznaczona do izolacji aaRS z bakterii.

	Waga komórek bakteryjnych (g)	Ilość buforu izolacyjnego (ml)
<i>E. coli</i>	10	30
<i>S. aureus</i>	2,5	20
<i>P. aeruginosa</i>	2,5	20

Komórki bakteryjne przemyto buforem do izolacji enzymu, zwirowano (4000 rpm, 4°C, 10 min.). Supernatant usunięto. Czynność powtórzono trzykrotnie w celu pozbycia się resztek pożywki z pasty bakteryjnej. Następnie bakterie zawieszono w tym samym buforze, dodano 1 mM PMSF i mieszano przez 1 h (w przypadku izolacji enzymu z *S. aureus* do buforu izolacyjnego dodano 60 mg lizozymu w celu rozbicia ściany komórkowej). Po tym czasie zawiesinę sonikowano 4x10 s z odstępami 30 s (amplituda 80%). Homogenizat odwirowano (5500rpm, 4°C, 1 h), osad odrzucono, a supernatant nasycono (NH₄)₂SO₄ do stężenia 40%. Po zwirowaniu (5500 rpm, 4°C, 40 min.) usunięto osad, a stężenie (NH₄)₂SO₄ w supernatancie stopniowo zwiększono do 65%. Mieszaninę ponownie zwirowano (5500 rpm, 4°C, 40 min.). Tym razem odrzucono supernatant, a osad rozpuszczono w 2,5 ml buforu zawierającego 50 mM Tris - HCl z dodatkiem 1mM EDTA. Dodano glicerolu do 50% stężenia końcowego i przechowywano w -20°C.

4.7.2. Przygotowanie mieszaniny enzymów z wątroby *S.scrofa domestica*

150 g świeżej wątroby *Sus scrofa domestica* homogenizowano w 250 ml buforu do izolacji enzymu. Mieszaninę zwirowano (12000 rpm, 4°C, 15 min.), usunięto osad, a

supernatant nasycono glicerolem do 50%. Tak otrzymaną mieszaninę białek zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

4.7.3. Oznaczanie stężenia białka metodą Bradford

Z roztworu wzorcowego albuminy sporządzono szereg rozcieńczeń (10, 20, 30, 40, 50 µg/ml) oraz 1000 - krotne rozcieńczenie badanego białka. Do 800 µl każdego z roztworów dodano 200 µl barwnika do oznaczania stężenia białka metodą Bradford. Po 15 minutowej inkubacji dokonano pomiaru absorbancji przy długości fali 595 nm. Z wyników otrzymanych dla prób zawierających różne stężenia albuminy wyznaczono krzywą wzorcową, z której odczytano stężenie białka w próbce badanej.

4.7.4. Nadprodukcja syntetazy tyrozylo - tRNA *E. coli*

Kompetentne bakterie *E. coli* DH5α transformowano plazmidem pTYB21 zawierającym insert kodujący TyrRS i hodowano na pożywce stałej LB (ampicilina 100 µg/ml) w temp. 37°C przez 14 – 16 h. 10 ml pożywki LB (ampicilina 100 µg/ml) inokulowano pojedynczą kolonią i hodowano 14 – 16 h w temp. 37°C w inkubatorze z wytrząsaniem 250 rpm. 3 ml zawiesiny bakterii wirowano 1 min. z prędkością 10 000 rpm. Z uzyskanego osadu izolowano plazmidowy DNA z wykorzystaniem zestawu odczynników Plasmid Mini AX (A&A Biotechnology) zgodnie z opisem producenta. Tak przygotowany plazmid został poddany analizie restrykcyjnej w 1% żelu agarozowym. Prawidłowa sekwencja plazmidu została potwierdzona przez sekwencjonowanie z użyciem starterów InteinForv i pTYB21Rev (wykonane na Wydziale Biologii UAM w Poznaniu).

Plazmidem pTYB21 - TyrRS transformowano bakterie *E. coli* ER2566, które następnie hodowano przez 14 – 16 h na pożywce stałej zawierającej 100 µg/ml ampiciliny w temp. 37°C. Pojedynczą kolonią inokulowano 10 ml pożywki LB (100 µg/ml ampiciliny) i hodowano 14 – 16 h w temp. 37°C wytrząsając z prędkością 200 rpm. 2 ml hodowli przenoszono do 1 l pożywki LB, którą wytrząsano (200 rpm) do momentu osiągnięcia gęstości optycznej OD = 0,5. Po tym czasie ekspresję TyrRS indukowano 0,4 mM IPTG i prowadzono hodowlę w temp. 22°C przez 12 h. Hodowlę wirowano 4000 rpm, 10 min. w temp. 4°C. Otrzymany osad (ok. 2,5 g pasty bakteryjnej) zawieszono w 1x stężonym buforze do sonikacji z dodatkiem inhibitorów działających na różne klasy proteaz komórkowych – PMSF, serynowych – aprotyna, cysteinowych – leupeptyna i kwasowych – pepstatyna. Zawiesinę lizowano przez sonikację 8x10” przy amplitudzie 80% w 20 ml buforu do lizy komórek (CLB). Lizat wirowano 12 000 g, 30 min. w 4°C. Po wirowaniu bufor uzupełniono do 100 ml oraz dodano Triton X100 do końcowego stężenia 0,01% w celu ograniczenia niespecyficznego wiązania się białek ze złożem kolumny.

4.7.5. Oczyszczanie białka na złożu chitynowym

W celu oczyszczenia TyrRS posiadającego przy końcu N białko fuzyjne – inteinę, wykorzystano metodę chromatografii powinowactwa. Złoże chitynowe (NEB) umieszczono w szklanej kolumnie o wysokości 10 cm i średnicy 1 cm. Całkowita objętość złoża wynosiła 7,85 cm³. W wektorze ekspresyjnym razem z TyrRS w ramce odczytu znajduje się zmodyfikowana inteina *Sce* VMA. Graniczy ona od strony aminowej z oczyszczanym białkiem i od strony karboksylowej z białkiem wiążącym chitynę CBD z *Bacillus circulans*. Kompleks CBD - inteina - oczyszczane białko zatrzymywany jest na kolumnie chitynowej. Hydroliza wiązania peptydowego w celu uwolnienia białka docelowego indukowana jest za pomocą związku z grupy tioli – DTT.

Kolumnę przemyto 50 ml buforu CB i nałożono 100 ml supernatantu pochodzącego z ultrawirowania lizatu, tempo przepływu 0,8 ml/min. Białka niezwiązane ze złożem wymyto 200 ml buforu CB. Następnie kolumnę przemyto 30 ml buforu tnącego CleavB zawierającego DTT. Po 96 h uwolnione białko wmywano z kolumny bufurem CB, tempo przepływu 0,5 ml/min.

Następnie uzyskany eluat wirowano z prędkością 4000 g w rotorze wyhyłowym w temp. 4°C w probówce typu Amicon (zawierającej błonę celulozową) z punktem odcięcia 30kDa. Celem wirowania było zagęszczenie białka oraz usunięcie buforu CB i zastąpienie go buforem 50 mM Tris - HCl pH 7.5 z dodatkiem 1 mM EDTA. Końcowe stężenie białka wynosiło ok. 0,6 – 0,7 mg/ml. Wszystkie etapy oczyszczania białka prowadzono w 4°C.

4.7.6. Elektroforetyczny rozdział białek

Analizę białek, w tym rozdziału po sączeniu molekularnym na kolumnie Sephadex G100 oraz etapów oczyszczania i nadprodukcji TyrRS, prowadzono na żelu PAA zawierającym SDS (SDS - PAGE) [Tab. 4.15]. Próby zawieszono w buforze obciążającym zawierającym SDS w stosunku 1:1 i denaturowano w temp. 95°C przez 5 minut, a następnie nakładano na żel o wymiarach 15 cm x 15 cm lub 8 cm x 10 cm i grubości 0,4 mm w objętości 10µl. Rozdział prowadzono w temp. pokojowej w buforze do elektroforezy białek, stosując natężenie 25 mA.

Białka identyfikowano na żelu poprzez wybarwienie za pomocą roztworu Coomassie Brilliant Blue R-250 [182].

Tab. 4.15. Skład żeli poliakrylamidowych do elektroforezy białek.

Składniki żelu zagęszczającego	4%
30% akrylamid/bisakrylamid (19:1)	6,7 ml
1M Tris - HCl pH 6,7	6,25 ml
10% SDS	0,5 ml
H ₂ O	do 50 ml
10% APS	100 µl
100% TEMED	10 µl

Składniki żelu rozdzielającego	12%
30% akrylamid/bisakrylamid (19:1)	80 ml
1M Tris - HCl pH 8,7	75 ml
10% SDS	2 ml
H ₂ O	do 200 ml
10% APS	250 µl
100% TEMED	25 µl

4.8. Reakcja aminoacylacji tRNA

Aminoacylację przeprowadzano w 50 µl, 37°C przez 30 minut. Po upływie tego czasu do reakcji dodawano 100 µl 10% roztworu zimnego TCA i inkubowano 10 min. na lodzie w celu zatrzymania reakcji aminoacylacji. Następnie mieszaninę reakcyjną nakrapiano na krążek bibuły Whatmann 3MM i przemywano 3 ml 10% roztworu zimnego TCA, 2 x 3 ml 5% TCA i 10 ml etanolu. Wysuszony krążek umieszczono w naczynku pomiarowym ze scyntylatorem. Ilość radioaktywności oznaczono za pomocą licznika scyntylacyjnego MicroBeta Perkin Elmer.

Tab. 4.16. Składniki reakcji aminoacylacji

Składnik	Stężenie końcowe w 50 µl reakcji
MIX (Rozdz.4.1.6)	20 µl
TyrRS	50 nM
mieszanina tRNA	2 mg/ml
[¹⁴ C]Tyr	2 - 2,5 µM
H ₂ O	do 50 µl

4.8.1. Określanie warunków reakcji i stężeń poszczególnych substratów

Ilości poszczególnych substratów dodawanych do reakcji aminoacylacji ustalano doświadczalnie. Przeprowadzono szereg prób z różnymi stężeniami TyrRS *E. coli* lub aaRS *S. aureus* i *P. aeruginosa* oraz *S. scrofa domestica*, tRNA i [¹⁴C]Tyr. Sporządzono wykresy zależności produktu do ilości poszczególnych substratów i na ich podstawie określono optymalne stężenie każdego z nich.

Za pomocą programu FindGraph wykreślono krzywą zależności wydajności reakcji od ilości enzymu oraz substratów i na jej podstawie wyznaczono odpowiednie stężenia do dalszych reakcji.

4.8.2. Wyznaczanie kinetyki reakcji aminoacylacji tRNA

Kinetykę aminoacylacji dla TyrRS opisano korzystając z metody Lineweavera – Burka. Punktem wyjścia było wyznaczenie prędkości początkowych reakcji w różnych

stężeniach [^{14}C]Tyr (10,3; 5,15; 2,6; 1,3 i 0,65 μM). Reakcje prowadzono zgodnie ze standardową procedurą (Rozdz.4.8), w czasie: 1, 3, 5, 10 min. Otrzymane wyniki opracowano z użyciem programu FindGraph i wyznaczono prędkość początkową reakcji (V_0) przy określonym stężeniu Tyr. Następnie wyznaczono funkcję zależności odwrotności prędkości początkowych ($1/V_0$) od odwrotności stężeń aminokwasów ($1/[^{14}\text{C}]\text{Tyr}$) użytych w poszczególnych reakcjach. Wartość funkcji w punkcie przecięcia z osią x opowiada wielkości $-1/K_m$ oraz z osią y $= 1/V_{\max}$.

4.8.3. Analiza związków niskocząsteczkowych

Do poszukiwań potencjalnych inhibitorów wykorzystano związki wymienione w załączniku nr 1. W celu sprawdzenia ich potencjału hamowania TyrRS do reakcji aminoacylacji (Rozdz.4.8) dodawano różne stężenia związków: 50 μM – 2,5 mM. Wydajność aminoacylacji oceniano na podstawie stężenie [^{14}C]Tyr - tRNA^{Tyr}. Ilość radioaktywności w próbie mierzono w liczniku scyntylacyjnym MicroBeta.

4.8.4. Wyznaczanie kinetyki reakcji w obecności inhibitora

Metoda graficznego wyznaczenia K_i opracowana przez Lineweavera i Burka umożliwia obliczenie wartości K_m oraz K_i , dzięki graficznemu przedstawieniu zależności pomiędzy $1/V_0$ i $1/S$, a następnie obliczeniu wartości K_i inhibitora kompetycyjnego według równania Michaelisa [184]:

$$v = \frac{V_{\max} S}{K_m (1 + I/K_i) + S}$$

$$v = \frac{V_{\max} S}{K_{mi} + S}$$

W celu określenia parametrów reakcji inhibicji wykorzystano metodę Dixona. Wyznaczono szybkości początkowe reakcji (v_{0i}) z 4 różnymi stężeniami inhibitora $[I]$ dla trzech stężeń substratu ($[^{14}\text{C}]\text{Tyr}$). Następnie wykreślono krzywe zależności $1/v_i$ od $[I]$ dla obu stężeń substratu, a z ich wzajemnego ułożenia na wykresie określono typ inhibicji i wartość jej stałej (K_i). gdzie $K_{mi} = K_m(1 + [I]/K_i)$ i jest pozorną stałą Michaelisa wyznaczoną w obecności inhibitora, odczytaną w przecięcia linii z osią x. Z równania wynika, że szybkość reakcji enzymatycznej zależy od stężenia substratu (S) i inhibitora (I). Metoda Dixona upraszcza znacząco wyznaczenia wartości stałej inhibicji. Na osi x oznaczono stężenia inhibitora, natomiast na osi y odwrotność szybkości reakcji ($1/V$ [pmol/min.]) przy stałym stężeniu (S) dla każdej z prostych. Wartość parametru $-K_i$ wyznacza punkt przecięcia prostych rzutowany na os X. Graficzne przedstawienie wyników pozwala nie tylko na odczytanie wartości parametru $-K_i$ bezpośrednio z wykresu, ale także na określenie typu inhibicji

badanego inhibitora. Przecięcie prostych w polu między osiami współrzędnych wskazuje na kompetycyjny typ inhibicji enzymu. Natomiast punkt przecięcia na osi y oznacza, że badany związek jest inhibitorem niekompetycyjnym. Metoda Dixona pozwala także na zaobserwowanie inhibicji akompetycyjnej. W takiej sytuacji wyznaczone na wykresie proste przebiegają w sposób równoległy. Aby wyznaczyć parametr K_i' , będący stałą inhibicji kompleksu enzym - substrat - inhibitor, należy przedstawić graficznie zależność pomiędzy ilorazem stężenia substratu i prędkości reakcji (S/V) a badanym stężeniem inhibitora. Rzut punktu przecięcia wyznaczonych prostych na oś x wyznacza wartość K_i' [185].

5. Wyniki i ich dyskusja

Masowe zastosowanie antybiotyków doprowadziło do pojawienia się szczepów bakterii opornych na działanie większości znanych leków. Dlatego też choroby drobnoustrojowe, oprócz alergii, chorób układu krążenia i chorób reumatycznych, należą do plag XXI wieku. Zwalczanie drobnoustrojów opornych na konwencjonalne antybiotyki oraz opanowanie rosnącej liczby zakażeń jest jednym z najpoważniejszych problemów współczesnej medycyny [186]. Powstawanie lekooporności jest uwarunkowane genetycznie i zależy w znacznej mierze od rodzaju drobnoustroju, zastosowanego antybiotyku jak i środowiska. Obecnie, do szczególnie groźnych bakterii opornych należą m.in. niewrażliwy na metycylinę gronkowiec złocisty (MRSA) [187] oraz wielooporne pałeczki niefermentujące z rodzaju *Pseudomonas* [188]. Infekcje wywołane przez te bakterie są trudne do opanowania, a ich liczba narasta lawinowo. Szacuje się, że liczba osób hospitalizowanych z powodu zakażeń szczepem MRSA w Stanach Zjednoczonych sięga 100 000 osób rocznie [189]. Najskuteczniejszym sposobem walki z opornymi na dotychczasowe terapie bakteriami jest opracowanie nowych, skutecznych preparatów. Tymczasem w ciągu ostatnich 25 lat wprowadzono tylko kilka nowych klas związków przeciwbakteryjnych, do których należą m.in. oksazoliny, streptograminy oraz lipopeptydy. Obecnie, znaczna część tzw. „celów molekularnych” w komórkach bakteryjnych została już osiągnięta [190-192].

aaRS jako enzymy kluczowe w syntezie białek a tym samym niezbędne do funkcjonowania komórki stanowią bardzo obiecujący cel do rozwoju nowych kuracji przeciwbakteryjnych [50]. Dodatkowy czynnik decydujący o wyborze syntetaz aminoacylo - tRNA na cel badawczy to różnice w strukturze i mechanizmie działania syntetaz pochodzących z organizmów odległych ewolucyjnie – prokariota i eukariota, co stwarza szansę na specyficzną inhibicję enzymów bakteryjnych. Jednocześnie poszczególne syntetazy w obrębie gatunku i pomiędzy blisko spokrewnionymi bakteriami chorobotwórczym wykazują wysokie podobieństwo, co umożliwia projektowanie inhibitorów o szerokim spektrum działania.

Celem mojej pracy było znalezienie inhibitorów reakcji katalizowanej przez syntetazy tyrozylo - tRNA z bakterii, które mogą stanowić podstawę do opracowania terapeutyków o właściwościach bakteriostatycznych i/lub bakteriobójczych.

Związków o właściwościach hamujących aktywność TyrRS poszukiwano zarówno wśród substancji naturalnych jak i związków syntetycznych. Kluczem do wyboru związków była znajomość struktury krystalicznej TyrRS w kompleksie z tyrozylo-AMP (Tyr-AMP). Wybrane związki stanowiły zróżnicowaną grupę zarówno pod względem właściwości fizycznych, biochemicznych jak i aktywności biologicznej i potencjalnego mechanizmu działania. Wybrane związki badano pod kątem ich właściwości hamujących reakcję aminoacylacji w układzie prokariotycznym i eukariotycznym zarówno *in vitro* jak i *in vivo*.

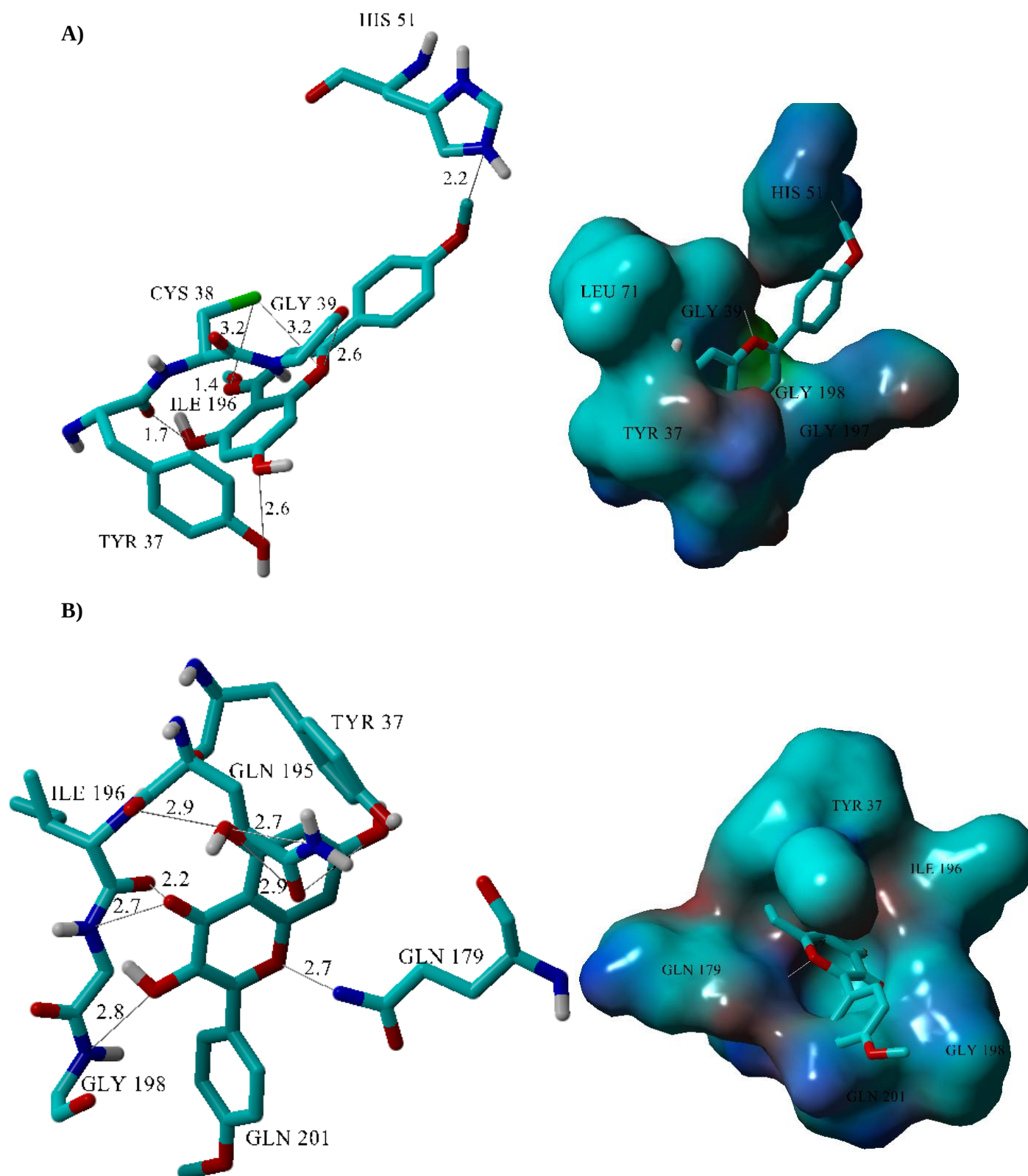
Związki badane pod kątem potencjalnych właściwości hamujących prokariotyczną TyrRS podzielono na (numery odpowiadają numerom związków wg załącznika):

L.p.	Związki naturalne	Nr związku
1.	Flawonoidy	1 - 32
2.	Stilbeny	33 – 34
3.	Chalkony	35 – 36
4.	Alkaloidy	37 – 44
5.	Terpeny	45 – 48
6.	Kwasy	49 – 56
7.	Hormony roślinne	57 – 64
8.	Witaminy z grupy B	65 – 67
L.p.	Związki syntetyczne	Nr związku
1.	Analogi tyrozyloadenylanu	68 – 102
2.	Pochodne tyrozyny	103 – 108
3.	Pochodne puryny	109 – 136
4.	Pochodne pirymidyny	137 – 192
5.	Syntetyczne hormony roślinne	193 – 210
6.	Hormony	211 – 212
7.	Inne	213 – 216

Związki naturalne:

Bogatym źródłem substancji terapeutycznych są rośliny, które w trakcie ewolucji wykształciły mechanizmy obronne pozwalające im na przetrwanie w niekorzystnym środowisku (przeciwutleniacze, substancje bakterio i grzybobójcze, bądź odstraszaające). Wyciągi roślinne zawierają szereg aktywnych metabolitów wtórnych, m.in. z grupy flawonoidów, alkaloidów czy związków terpenowych o udokumentowanej badaniami farmakologicznymi aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Część z nich, tak jak jest to w przypadku polifenoli, stilbenów, chalkonów czy kwasów roślinnych może być rozważana w kontekście potencjalnych inhibitorów kompetycyjnych bakteryjnej TyrRS ze względu na obecność w swojej strukturze grup mimikujących substrat reakcji – tyrozinę. Z kolei hormony roślinne to związki, które jako pochodne nukleozydów mogą konkurować o miejsce wiązania z ATP. W przypadku alkaloidów i terpenów istnieją racjonalne przesłanki mówiące o możliwości wiązania się ich w miejscu aktywnym syntetaz tak jak ma to miejsce w przypadku kapsaicyny [193] oraz związków SB-203207 i SB-203208 opartych na strukturze altemycydyny [134] bądź też w miejscu allosterycznym w przypadku sparteiny [194].

W przypadku polifenoli pierścień B mógłby zastępować tyrozinę w miejscu aktywnym TyrRS. Przypuszczenia te potwierdzono wykorzystując procedurę dokowania wybranych związków, które wiązały się w centrum katalitycznym TyrRS *E. coli* [PDB (1VBN)]. Co ciekawe, lepsze parametry wiązania uzyskiwano w przypadku, gdy to pierścień B znajdował się w miejscu wiązania tyrozyny (Rys. 5.1).



Rys. 5.1. Schemat przedstawiający optymalne miejsce wiązanie dla A) akacetyny (CID 5280442) i B) kemferydu (CID 5281666) w miejscu aktywnym TyrRS *E. coli*.

Związki syntetyczne:

Związki syntetyczne będące analogami tyrozyny oraz nukleotydy i nukleozydy a także analogi tyrozyloadenylanu zostały wybrane na zasadzie podobieństwa strukturalnego do substratów i produktu pośredniego reakcji aminoacylacji.

5.1. Reakcja aminoacylacji *in vitro*

Wstępnej selekcji związków dokonano w oparciu o reakcję aminoacylacji *in vitro* z wykorzystaniem enzymu prokariotycznego – rekombinowanej syntetazy tyrozylowej *E. coli*.

		10	20	30	40	50	60	
<u>H.sapiens</u>	1	MGDAP	SPEEKLHLITRN	LQEV	LGEELKEILKERELK	YWG	TATTGKPHVAYFV	PMSKIADFLKA
<u>S. scrofa domestica</u>	1	MGDAL	SPEEKLHLITRN	LQEV	LGEELKEILKERELK	YWG	TATTGKPHVAYFV	PMSKIADFLKA
		80	90	100	110	120	130	
<u>H.sapiens</u>	71	ILFADLHAYLDNM	KAPWELLELRV	SY	ENVIKAMLESIG	VPLEKLKFIK	GTDYQLSKEY	TLDVYR
<u>S. scrofa domestica</u>	71	ILFADLHAYLDNM	KAPWELLELRV	SY	ENVIKAMLESIG	VPLEKLKFIK	GTDYQLSKEY	TLDVYR
		150	160	170	180	190	200	
<u>H.sapiens</u>	141	TQHDS	KKAGAEVVKQVEH	PLLSGLLYPGL	QALDEEYLK	VDAQFGG	TDQRKI	FTFAEKYLPALGYS
<u>S. scrofa domestica</u>	141	TQHDA	KKAGAEVVKQVEH	PLLSGLLYPGL	QALDEEYLK	VDAQFGG	TDQRKI	FTFAEKYLPALGYS
		220	230	240	250	260	270	
<u>H.sapiens</u>	211	MNPMV	PGLTGSKMSSSE	EESKIDLLDR	KEDVKKLKKAF	CEPGNV	DNGVLSFIKH	VLFPLKSEF
<u>S. scrofa domestica</u>	211	MNPMV	PGLTGSKMSSSE	EESKIDLLDR	KEDVKKLKKAF	CEPGNV	DNGVLSFIKH	VLFPLKSEF
		290	300	310	320	330	340	
<u>H.sapiens</u>	281	EKWGG	NKTYTAYVDLE	KDFAAEV	VHPGDLKNS	VEVALNKLLD	PIREKFNT	PALKKLSAAAYDPDS
<u>S. scrofa domestica</u>	281	EKWGG	NKTYTAYSDLE	KDFAAEV	VHPGDLKNS	VEVALNKLLD	PIREKFNT	PALKKLSAAAYDPDS
		360	370	380	390	400	410	
<u>H.sapiens</u>	351	AKGPA	KNSEPEEVIP	SRLDIRVGK	ITVEKHPD	ADSLYVEK	IDVGEAEP	RTVVSGLVQFVPKEEL
<u>S. scrofa domestica</u>	351	AKGPA	KNSEPEEVIP	SRLDIRVG	RVLSDVKHP	DADSLYVEK	IDVGEAEP	RTVVSGLVQFVPKEEL
		430	440	450	460	470	480	
<u>H.sapiens</u>	421	VVLCN	LKPQKMRGV	ESQGMLLCAS	TEGINRO	VEPLDPP	PAGSAPGE	RVFVKGYEKGQPD
<u>S. scrofa domestica</u>	421	VVLCN	LKPQKMRGV	ESQGMLLCAS	TEGVSRK	VEPLDPP	PAGSAPGE	RVFVKGYEKGQPD
		500	510	520				
<u>H.sapiens</u>	491	LQADF	KISEECIAQ	WKQTNE	MTKLGSIS	CKSLKGGNIS		
<u>S. scrofa domestica</u>	491	LQADF	KISEECIAQ	WKQTNE	MTKLGSIS	CKSLKGGNIS		

Rys. 5.2. Porównanie sekwencji TyrRS z *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* i *H. sapiens* (kolorem czarnym zaznaczono aminokwasy identyczne, kolorem szarym aminokwasy o podobnych właściwościach).

Następnie zbadano wpływ wybranych związków niskocząsteczkowych na aktywność prokariotycznych TyrRS *S. aureus*, *P. aeruginosa* oraz eukariotycznej TyrRS *S. scrofa domestica*. Wybór TyrRS *S. scrofa domestica* podyktowany był dostępnością materiału do izolacji enzymu i tRNA. Ponadto porównanie sekwencji syntetaz TyrRS *H. sapiens* i *S. scrofa*

domestica wykazało prawie 100% homologię, co daje możliwość wstępnej analizy aktywności inhibitorów względem syntetaz ludzkich (Rys. 5.2). Homologia pomiędzy enzymami z *H. sapiens* a *S. aureus* i *E. coli* wynosi ok. 20%, co daje szansę na uzyskanie związków aktywnych, które nie będą hamować aktywności enzymów ludzkich.

5.1.1. Nadekspresja i oczyszczanie TyrRS z *E. coli*

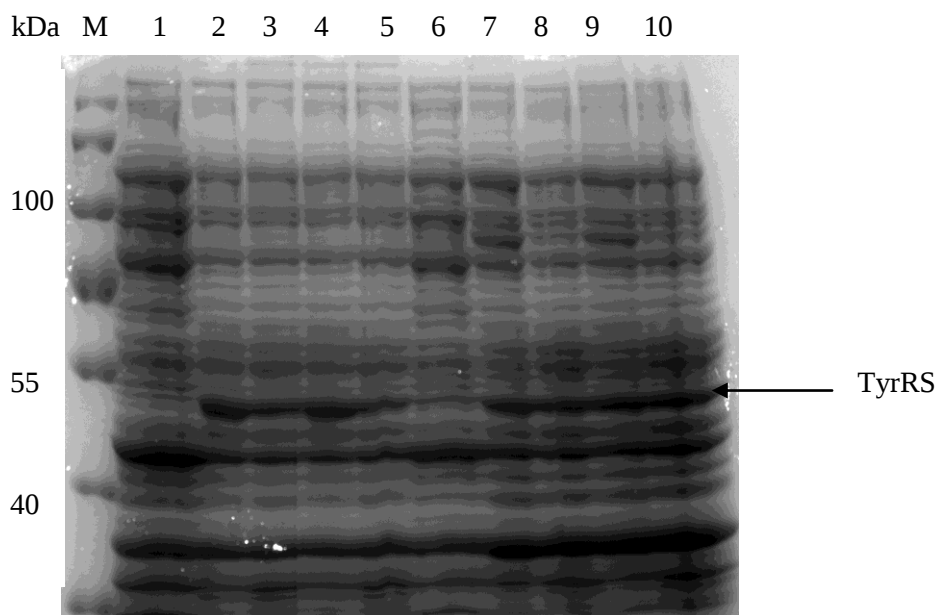
Pierwsze próby nadprodukcji TyrRS *E. coli* przy użyciu wysokokopijnego plazmidu pET28b (zawierającego gen oporności na kanamycynę oraz metkę histydynową – His - Tag), w którym klonowana sekwencja genu znajdowała się pod kontrolą silnego promotora T7 były nieudane. Po transformacji plazmidem szczepu propagacyjnego *E. coli* DH5 α obserwowałam wzrost pojedynczych kolonii. Próba transformacji szczepu ekspresyjnego BL21 zakończyła się niepowodzeniem. Wyniki te wskazywały, że wysoka ekspresja genu *tyrS* ma toksyczny wpływ na komórki bakterii. Obserwacje te potwierdzają eksperymenty, w których mutacje punktowe genu *tyrS* *E. coli* uniemożliwiają oddziaływanie TyrRS z tRNA^{Tyr} (jednocześnie nie wpływając na formowanie tyrozyloadenylationu) znoszą toksyczny wpływ podwyższonej ekspresji tego białka [195]. Autorzy tej pracy zaobserwowali niekorzystny wpływ podwyższonego poziomu TyrRS na metabolizm komórki. Nadekspresja TyrRS *in vivo* powoduje wzrost puli tRNA^{Tyr} aminoacylowanej niewłaściwym aminokwasem. Wysoki poziom TyrRS może więc obniżyć pulę dostępnych tRNA^{Tyr} i w rezultacie wpłynąć na ograniczenie syntezy białka w komórce [195].

Do nadprodukcji białka zastosowano więc szczepy *E. coli* C41 pLys i C43 pLys, przeznaczone do nadprodukcji białek toksycznych. Jedynie w przypadku C43 pLys po 48h inkubacji w 37°C obserwowano wzrost pojedynczych kolonii, które po drugim pasażu zamierały.

Toksyczność białka starano się obniżyć poprzez wykorzystanie niskokopijnego plazmidu pQE30 (zawierającego gen oporności na ampicylinę oraz metkę histydynową – His - Tag), w którym klonowana sekwencja genu *tyrS* znajduje się pod kontrolą promotora T5. Do nadprodukcji wykorzystano bakterie JM109, M15 oraz SG13009. Szczepy M15 oraz SG13009 posiadają endogenne plazmid pREP4, kodujący białko represorowe lac oraz oporność na kanamycynę. Aktywność represora lac blokowana jest przez IPTG. Tylko w przypadku bakterii M15 obserwowano wzrost kolonii po transformacji plazmidem pQE30 - TyrRS. Jednak również w tym przypadku próby nadekspresji, również z użyciem tzw. metody płytkowej (*ang. plating method*) nie powiodły się, gdyż bakterie po kilku godzinach zamierały. Obniżenie temperatury ekspresji do 30 i 22°C również nie dało pozytywnych rezultatów.

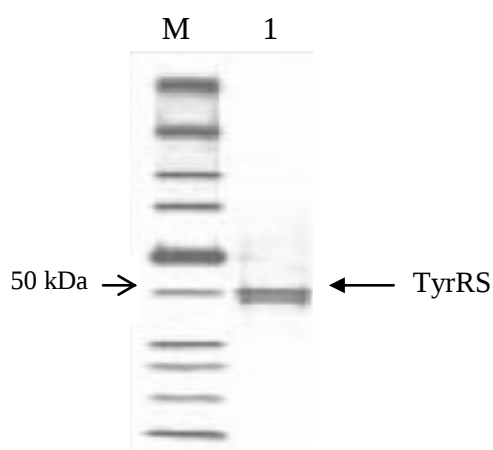
W kolejnym etapie TyrRS eksprymowano przy użyciu systemu pBAD - TOPO (zawierający gen oporności na ampicylinę oraz His - Tag) dedykowanego nadprodukcji białek toksycznych dla komórek *E. coli*. Plazmid pBAD - TOPO został skonstruowany w oparciu o elementy regulacji transkrypcji operonu arabinozowego *E. coli*, które pozwalają na bardzo precyzyjną kontrolę ekspresji białka za pomocą induktora – arabinozy. Dodatkowo, aby

zmniejszyć toksyczność nadprodukcję prowadzono w pożywkach LB, RM (Rys. 5.3) i minimalnej M9.



Rys. 5.3. Analiza elektroforetyczna ekspresji białka TyrRS w systemie pBAD - TOPO. 1 – hodowla w pożywce LB, 6 -10 hodowla w pożywce RM; **M** – standard masy cząsteczkowej białek (kDa); 1,6 – kontrola bez induktora, 2,7 – 4 h hodowli (0,13 μ M arabinoza); 3,8 – 16 h hodowli (0,13 μ M arabinoza); 4,9 – 4 h hodowli (0,013 μ M arabinoza); 5,10 – 16 h hodowli (0,13 μ M arabinoza).

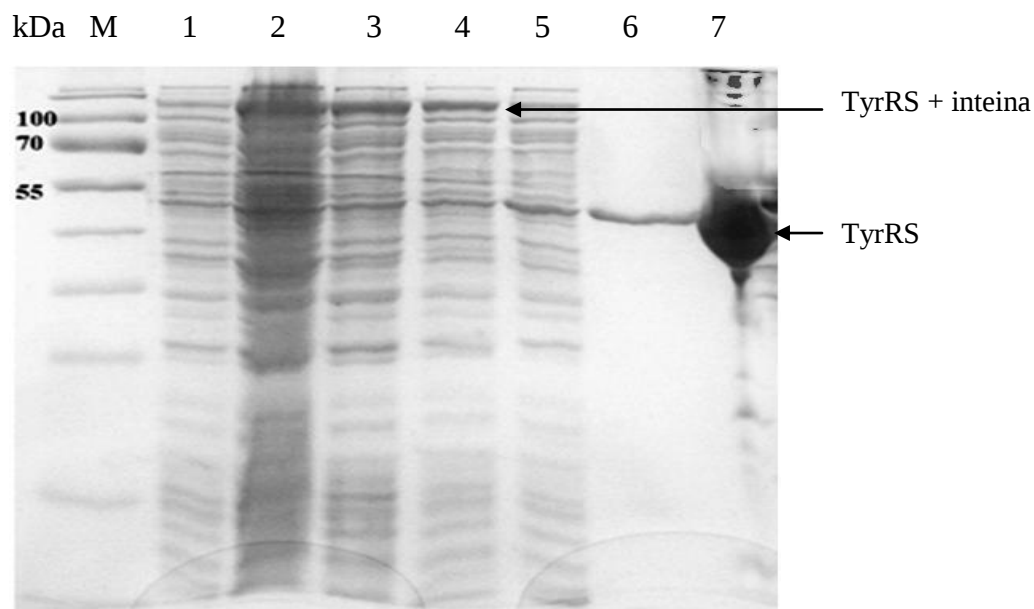
Obecność TyrRS w lizacie komórkowym potwierdzono metodą Western Blot z użyciem przeciwciał anty - His (Rys. 5.4). W tym przypadku nieskuteczne okazało się oczyszczenie białka na kolumnie ze złożem agarozowym zawierającym kationy niklu (Ni - NTA). Spowodowane było to prawdopodobnie przez przyjmowaną przez białko strukturę przestrzenną, która uniemożliwiła efektywną ekspozycję metki histydynowej pozwalającą na związanie oczyszczanego białka ze złożem kolumny oraz jego immobilizację.



Rys. 5.4. Analiza Western Blot potwierdzający obecność białka TyrRS wraz z metką histydynową w lizacie komórkowym.

Finalnie rekombinowany enzym bakteryjny TyrRS otrzymano w wyniku ekspresji genu *tyrS* w szczepie ER2566 *E. coli* (Rozdz. 4.7.4). Do nadprodukcji białka wykorzystano

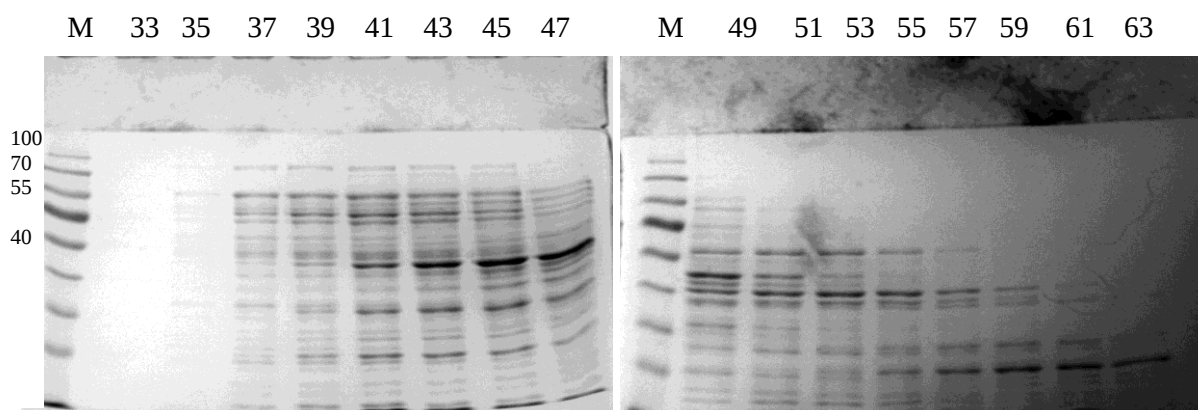
zrekombinowany plazmid pTYB21 zawierający sekwencję kodującą TyrRS *E. coli* oraz białko fuzyjne – inteinę. Obecność białka fuzyjnego ogranicza aktywność TyrRS *in vivo*, przez co znacząco obniża się jego toksyczność. Najwyższą wydajność ekspresji uzyskano, indukując ekspresję genu w bakteriach przy $OD_{600} = 0,5$, przy pomocy 0,4 mM IPTG, prowadząc hodowlę prowadzono przez 12h w temp. 22°C (Rys. 5.5).



Rys. 5.5. Elektroforetyczna analiza ekspresji białka TyrRS *E. coli* na żelu poliakrylamidowym z SDS.

M - standard masy cząsteczkowej białek (kDa), 1 – całkowity ekstrakt białkowy z komórek nieindukowanych, 2,3 - całkowity ekstrakt białkowy z komórek indukowanych 0,4 mM IPTG, przed wirowaniem, 4 - całkowity ekstrakt białkowy z komórek indukowanych 0,4 mM IPTG, po wirowaniu, 5 – przesącz po kolumnie, 6 – kalibracja kolumny buforem CB, 7 – elucja białka po 96h inkubacji buforem CleavB z 50 mM DTT.

Przed oczyszczeniem białka na kolumnie ze złożem chitynowym wykonano sączenie molekularne na złożu Sephadex G100 (Rys. 5.6).

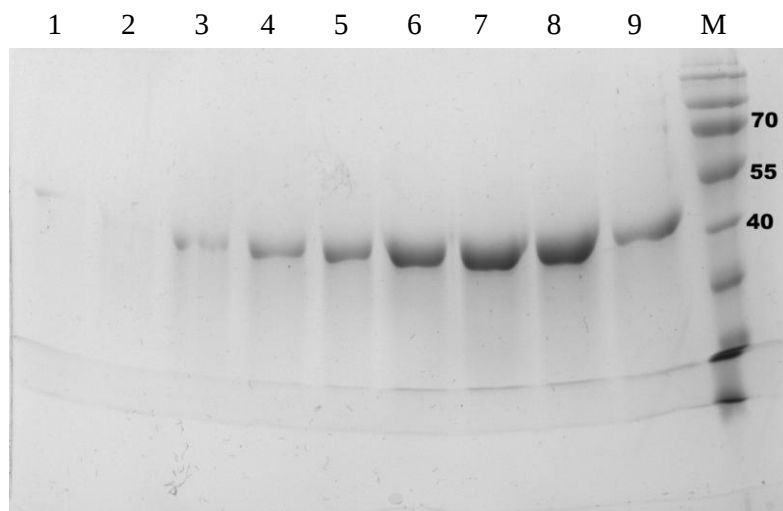


Rys. 5.6. Analiza elektroforetyczna w żelu SDS – PAGE procesu frakcjonowania na kolumnie ze złożem Sephadex G100.

M – standard masy cząsteczkowej białek, 33 – 63 frakcje wypływające z kolumny.

Roztwór zawierający mieszaninę białek poddano frakcjonowaniu techniką chromatografii powinowactwa (Rozdz.4.7.5). Obecność białka fuzyjnego – inteiny oraz

domeny CBD (*ang. chitin binding domain*) umożliwia jednoetapowe oczyszczenie białka na kolumnie ze złożem chitynowym. Po inkubacji uwolnione białko wymywano z kolumny (Rys. 5.7). Stężenie białka TyrRS oznaczano metodą Bradford [196].



Rys. 5.7. Elektroforegram wskazujący na obecność oczyszczanego białka TyrRS w poszczególnych frakcjach eluowanych z kolumny (1 – 9), M – standard masy cząsteczkowej białek (kDa).

Następnie frakcje zawierające TyrRS połączono i zatężono metodą wirowania w probówkach typu Amicon o punkcie odcięcia 30kDa. Wydajność izolacji wynosiła 2 – 3,7 mg z 1 litra hodowli bakteryjnej [Tab. 5.1].

Tab. 5.1. Parametry oczyszczonego białka TyrRS w porównaniu z całkowitym ekstraktem białkowym z komórek nieindukowanych.

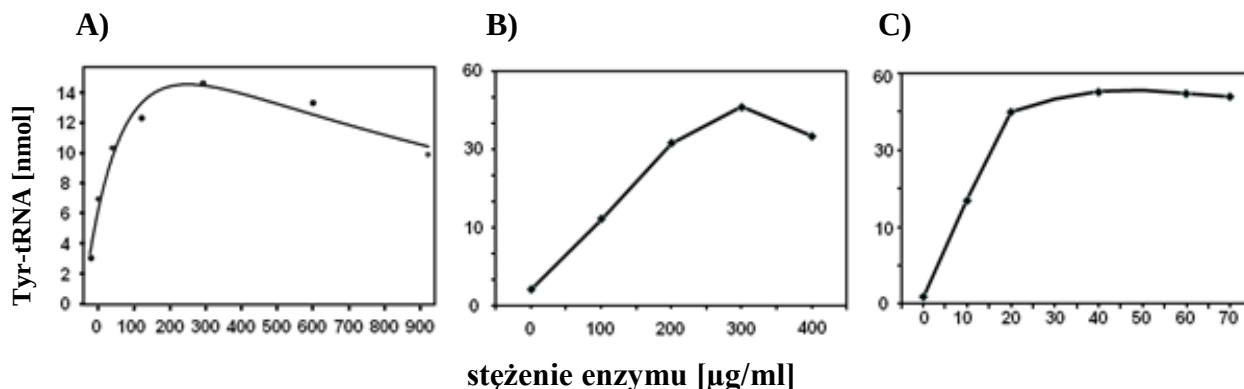
	Białko (mg)	Aktywność całkowita (U*)	Aktywność właściwa (U/mg)	Procent odzysku (%)	Współczynnik oczyszczenia
Całkowity ekstrakt białkowy	5290	10332	1,95	100	1
Oczyszczona TyrRS	3,7	1086	293	10,5	150

*1U – ilość enzymu katalizująca syntezę 1nmol aa - tRNA/min.

Otrzymane białko pełnej długości TyrRS *E. coli* składa się z 424 aa. Wykazuje bardzo wysoką aktywność enzymatyczną w testach aminoacylacji [Tab. 5.1]. Ponieważ w chwili obecnej w bazie PDB zdeponowane są jedynie dwie struktury TyrRS *E. coli* typu dzikiego w kompleksie z Tyr - AMS (PDB: 1VBM, skrócona do 318 aa) oraz Tyr (PDB: 1X8X, skrócona do 322 aa) w dalszych badaniach zostaną podjęte próby otrzymania kryształu TyrRS pełnej długości z wybranymi inhibitorami.

5.1.2. Izolacja mieszaniny aaRS z bakterii *S. aureus* i *P. aeruginosa*

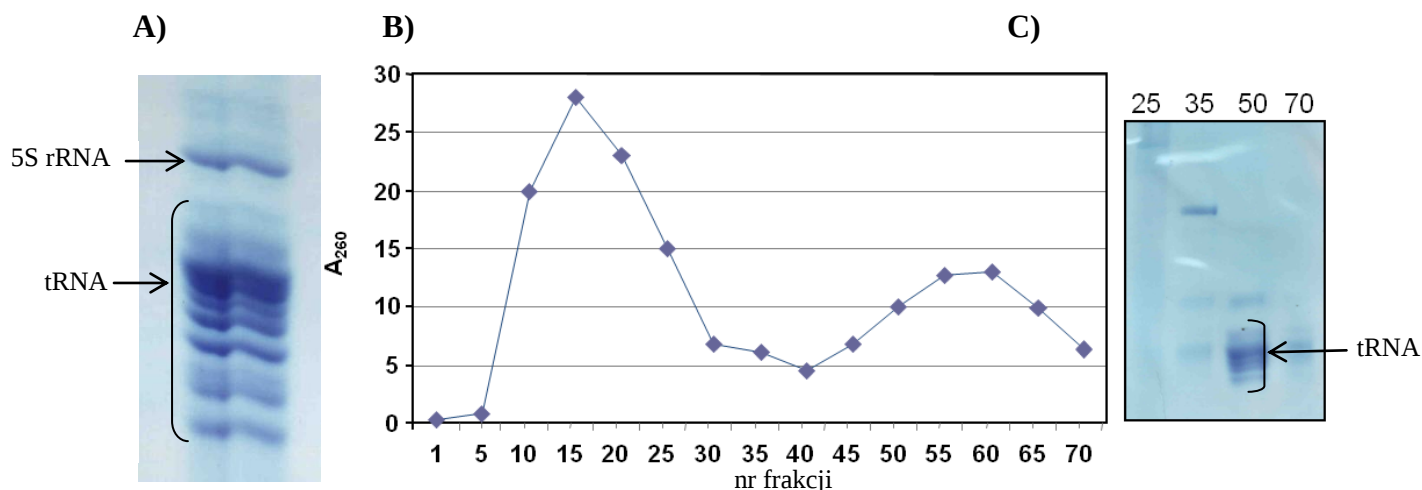
Izolację syntetaz aminoacylo - tRNA z bakterii *S. aureus*, *P. aeruginosa* oraz wątroby świńskiej prowadzono wg procedury opisanej w Rozdz.4.7.1. i 4.7.2. Z 10g pasty bakteryjnej oraz 125 g świeżej tkanki (homogenatu wątroby *S.scrofa domestica*) otrzymano preparat o aktywności właściwej kolejno 1.9, 2.0, 2.5 nmola/min/mg (Rys. 5.8).



Rys. 5.8. Wykresy reakcji aminoacylacji tRNA w zależności od stężenia enzymu z *S. s. domestica* (A), *S. aureus* (B) i *P. aeruginosa* (C).

5.1.3. Izolacja mieszaniny tRNA z bakterii *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* oraz wątroby *S. scrofa domestica*.

Mieszaninę tRNA ze szczepów bakterii oraz wątroby *Sus scrofa domestica* uzyskano zgodnie z procedurą opisaną w Rozdz.4.2.4 (Rys. 5.9). Wydajność izolacji mieszaniny tRNA z bakterii oraz *Sus scrofa domestica* przedstawiono w Tab. 5.2.



Rys. 5.9. Oczyszczanie tRNA (*Sus scrofa domestica*)

A) Elektroforegram preparatu po ekstrakcji fenolem; B) Wykres absorbancji A_{260} poszczególnych frakcji po sączeniu żelowym na kolumnie ze złożem Sephadex G75. Frakcje: 5 – 30 DNA, 30 – 40 5S rRNA, 40 – 70 – tRNA; C) Elektroforegram preparatu poddanego chromatografii (15% poliakrylamid, 7M mocznik). Frakcje: 25, 35, 50 i 70.

Tab. 5.2. Ilość tRNA uzyskanego z *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *S. scrofa domestica*

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Sus scrofa domestica</i>
Masa komórkowa (g)	10	10	10	100
Ilość materiału (U*)	74,6	96	83	250

1 U - 1 A₂₆₀ = 40µg

5.1.4. Określenie warunków aminoacylacji *in vitro*

W celu przeprowadzenia analizy aktywności inhibitorowej związków niskocząsteczkowych, opracowano warunki reakcji aminoacylacji *in vitro* z wykorzystaniem TyrRS *E. coli* oraz mieszaniny aaRS z *S. aureus*, *P. aeruginosa* oraz *S. scrofa domestica*.

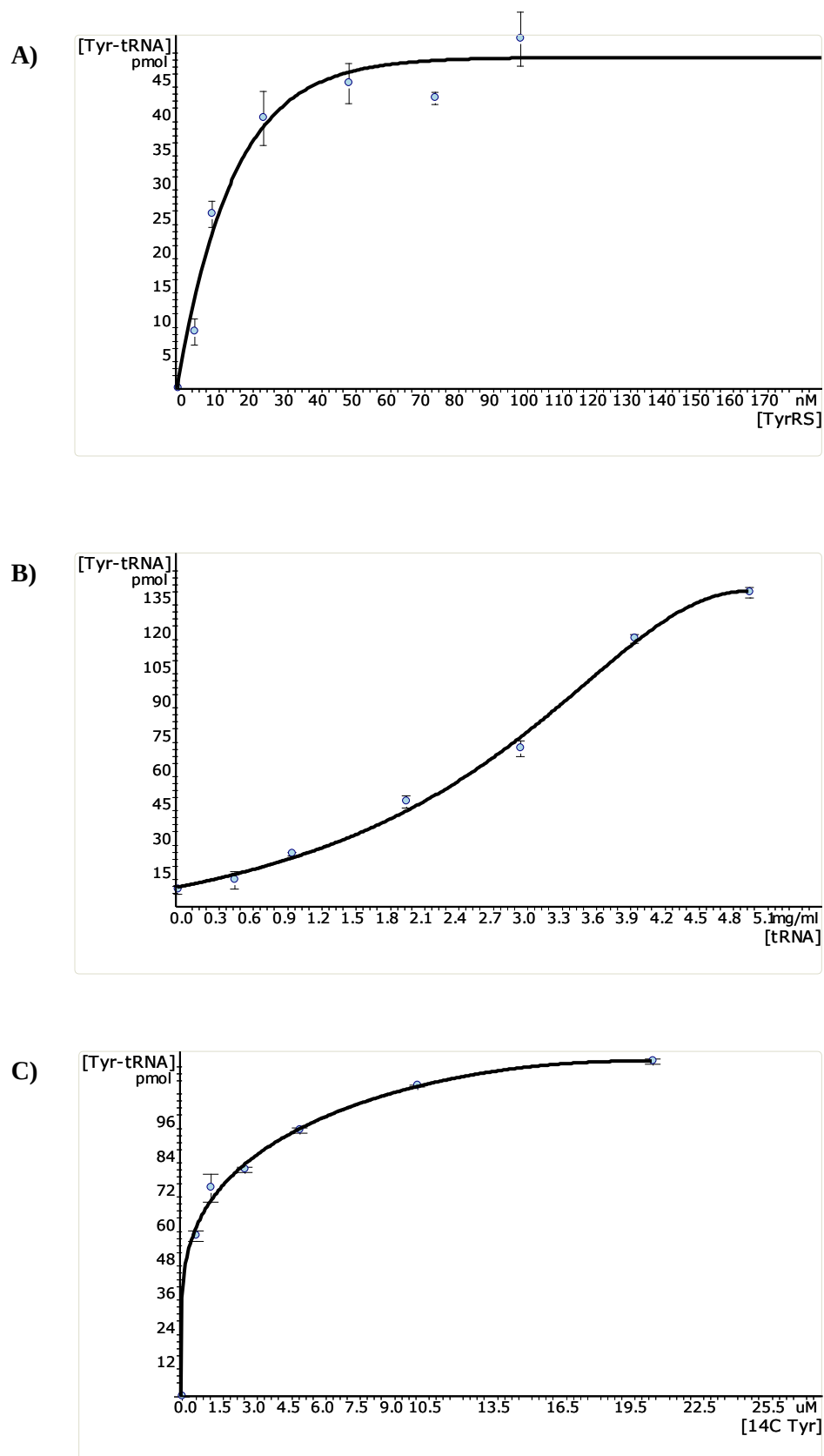
W celu optymalizacji warunków reakcji aminoacylacji wyznaczone zostały wartości następujących parametrów: ilość jednostek (U) enzymu TyrRS lub mieszaniny enzymów, stężenie substratów tzn. ilość mieszaniny tRNA i [¹⁴C]Tyr oraz optymalny czas reakcji (t).

W przypadku oczyszczonego enzymu TyrRS *E. coli* w pierwszym etapie zbadano zależność pomiędzy ilością enzymu a stężeniem produktu reakcji Tyr - tRNA^{Tyr}. Reakcję prowadzono w roztworze zawierającym 2 mg/ml tRNA, 2,06 µM [¹⁴C]Tyr oraz 5 – 200 nM TyrRS w czasie 30 minut. W tych warunkach obserwowano wzrost stężenia produktu wraz ze wzrostem stężenia enzymu do 100 nM a następnie reakcja osiąga fazę plateau. Liniowy przyrost ilości produktu obserwowano do stężenia 10 nM TyrRS (Rys. 5.10.A).

W kolejnym etapie przeanalizowano wpływ stężenia tRNA na wydajność reakcji aminoacylacji. W składzie mieszaniny reakcyjnej znajdowało się 2,06 µM [¹⁴C]Tyr, 50 nM TyrRS oraz 0,5 – 5 mg/ml tRNA. Reakcję prowadzono przez 30 minut. Obserwowano proporcjonalny wzrost stężenia tRNA^{Tyr} (Rys. 5.10.B).

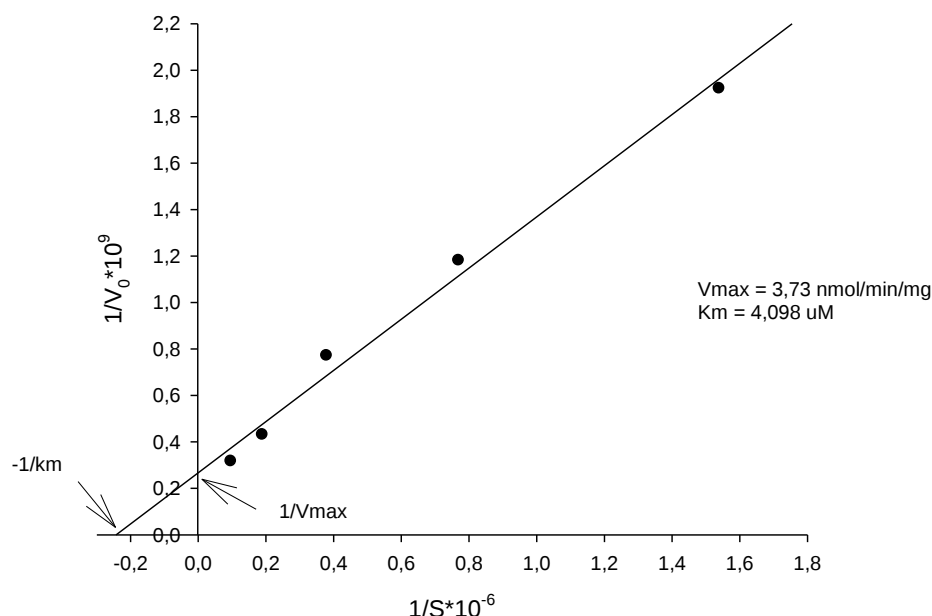
Wyznaczono także optymalne stężenie [¹⁴C] Tyr. Mieszanina reakcyjna zawierała 2 mg/ml tRNA, 50 nM TyrRS i 0,64 – 20,6 µM [¹⁴C] Tyr. Czas reakcji wynosił 30 minut. Liniowy wzrost stężenia produktu Tyr - tRNA^{Tyr} obserwowano do stężenia [¹⁴C]Tyr 2,8 µM. Reakcja osiągała fazę plateau przy stężeniu 20,6 µM [¹⁴C]Tyr (Rys. 5.10.C).

W ostatnim etapie wyznaczono optymalny czas reakcji. Reakcja katalizowana była przez 50 nM TyrRS w czasie 5 – 180 minut w obecności [¹⁴C]Tyr 2,8 µM i 2 mg/ml tRNA. Liniowy przyrost produktu (szybkość początkowa reakcji V₀) obserwowano do 30 minuty.



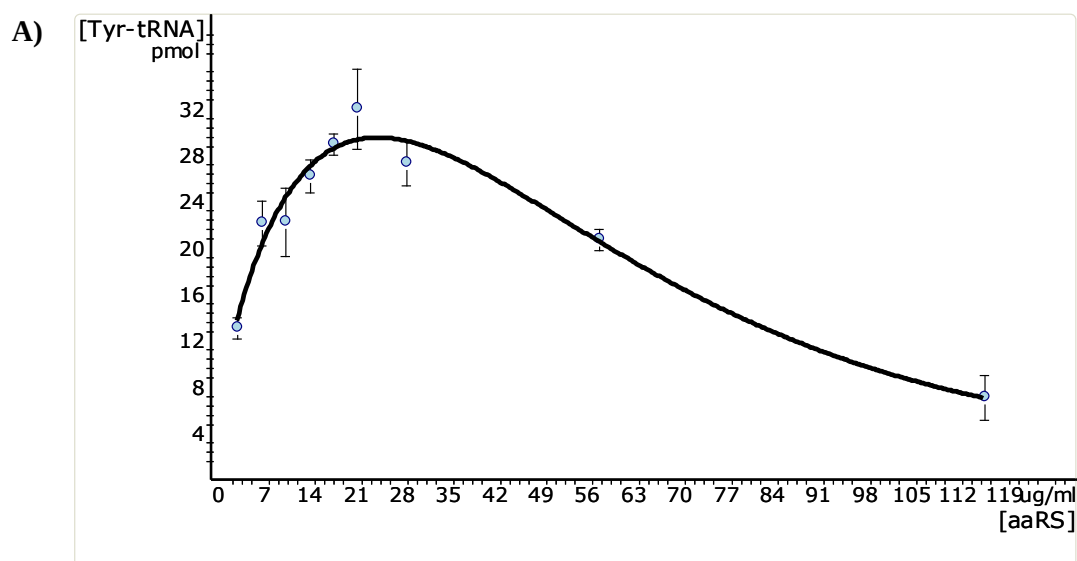
Rys. 5.10. Zależność ilości powstającego produktu Tyr - tRNA^{Tyr} od stężenia: A) TyrRS, B) tRNA, C) [C¹⁴]Tyr.

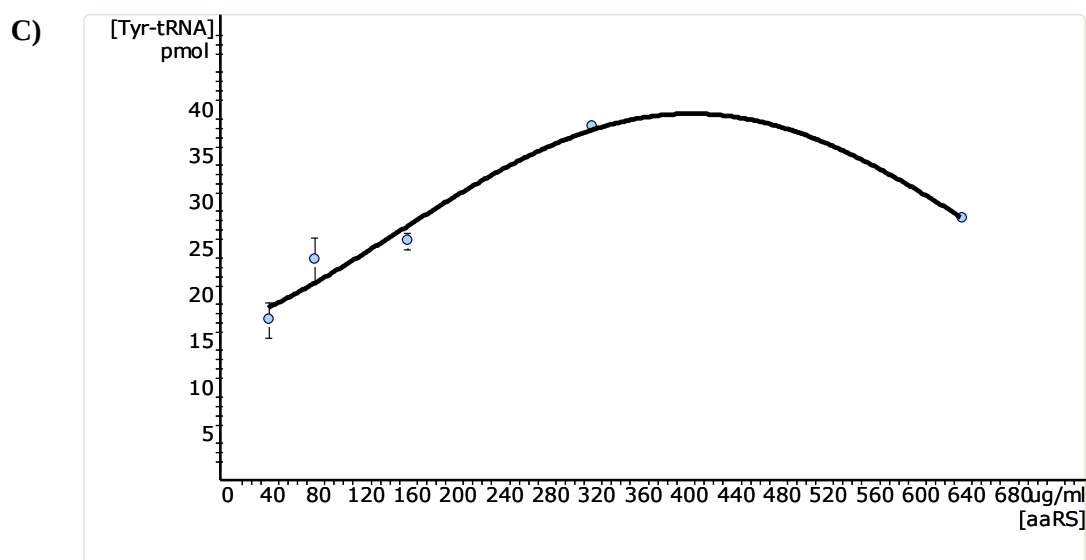
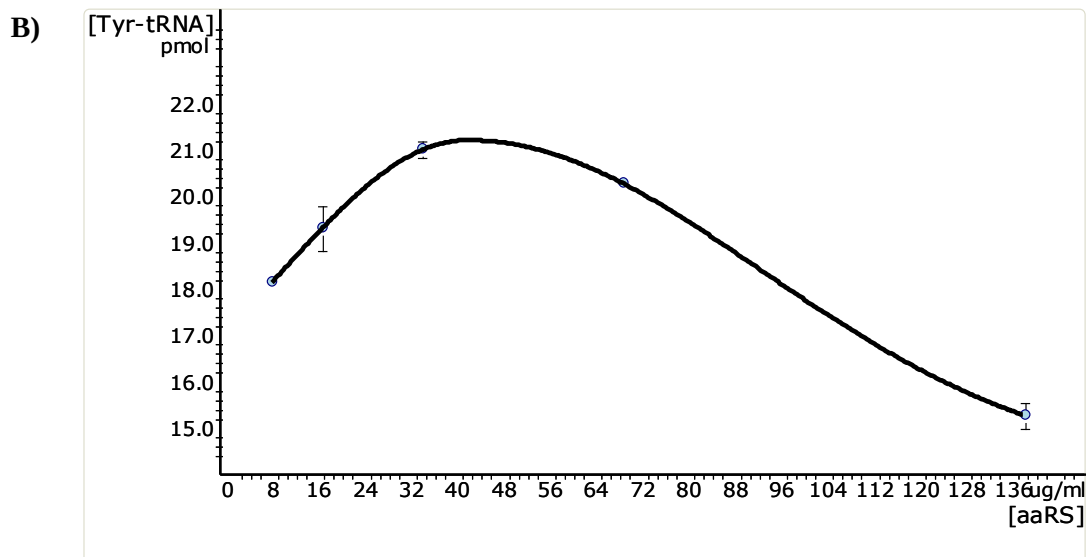
W celu wyznaczenia wartości K_m i V_{max} (Rys. 5.11) w układzie enzym - substrat zmierzono szybkość początkową reakcji V_0 . Reakcję prowadzono w obecności 0,65 – 10,3 μM [^{14}C]Tyr w czasie 0 – 10 min. Następnie wykorzystując wartości V_0 wyznaczono wartości parametrów K_m i V_{max} dla substratu reakcji metodą Lineweavera – Burka [184]. Wartość K_m i V_{max} dla substratu wynoszą 4,1 μM i 3,73 nmol/min/mg (Rys. 5.11). Wartości te pokrywają się z danymi literaturowymi [197].



Rys. 5.11. Wykres Lineweavera – Burka dla reakcji aminoacylacji w zależności od stężenia tyrozyny.

W przypadku optymalizacji reakcji aminoacylacji, w której wykorzystano mieszaninę aaRS, analogicznie do rekombinowanego enzymu TyrRS *E. coli*, w pierwszej kolejności wyznaczano optymalne stężenia mieszaniny aaRS przy stałym stężeniu [^{14}C]Tyr i tRNA a następnie optymalne stężenie [^{14}C]Tyr przy stałym stężeniu tRNA i mieszaniny aaRS (Rys. 5.12).



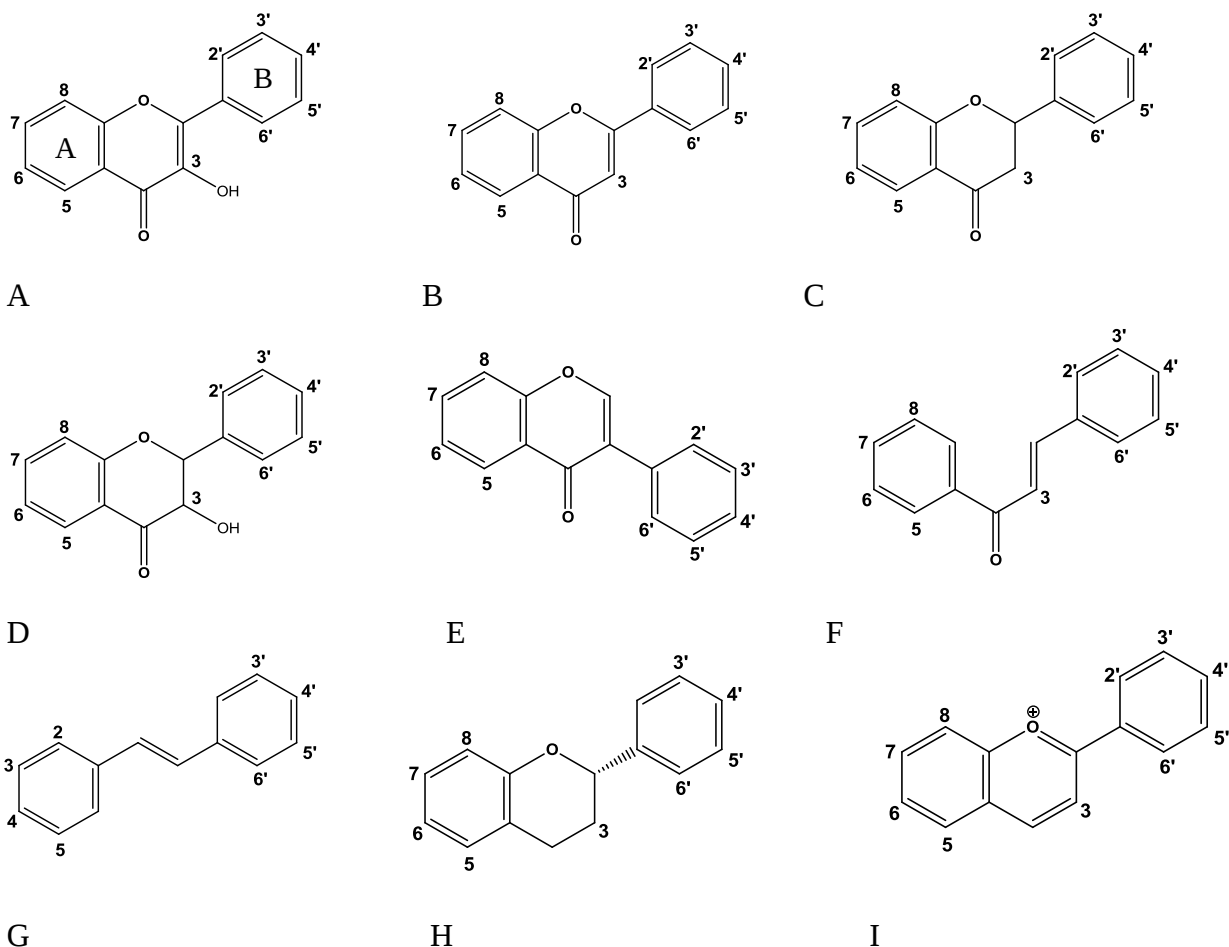


Rys. 5.12. Zależność wydajności aminoacylacji tRNA od stężenia mieszaniny aaRS: A) *S. aureus*, B) *P. aeruginosa*, C) *S. scrofa domestica*

5.2. Badanie wpływu związków niskocząsteczkowych na aktywność rekombinowanej TyrRS *E. coli* *in vitro*

5.2.1. Związki naturalne

Spośród poddanych analizie związków naturalnych najbardziej aktywną grupą okazały się być flawonoidy (Rys. 5.13). Otrzymana w wyniku oznaczenia wartość IC_{50} określa stężenie badanego związku, przy którym zachodzi 50% inhibicja aktywności katalitycznej enzymu. Wyniki analizy zebrano w Tab. 5.3.

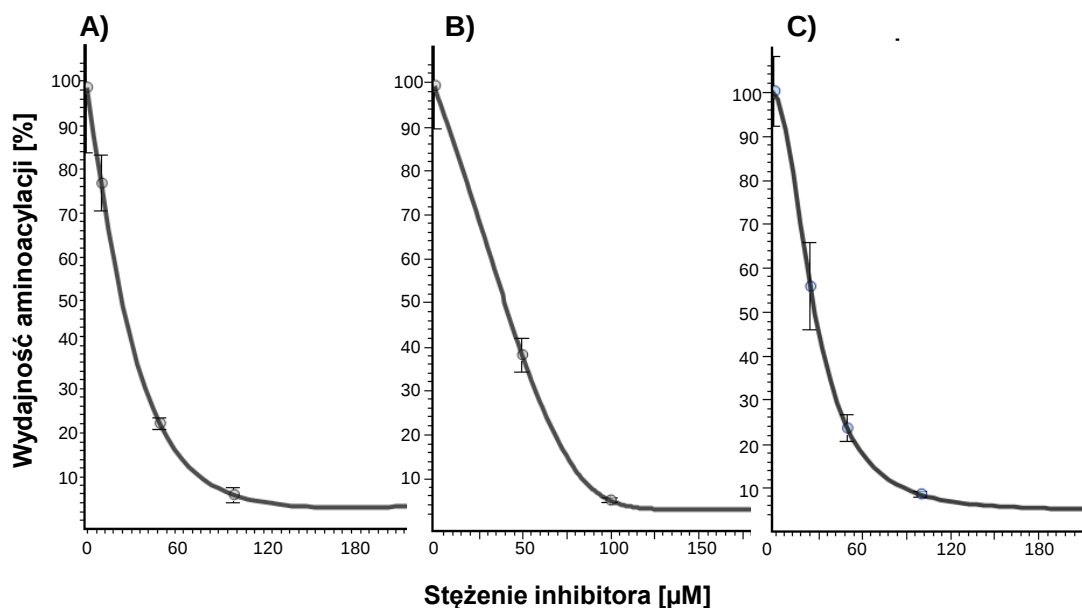


Rys. 5.13. Wzory strukturalne polifenoli wraz z numeracją atomów węgla. A: Flawanol, B: Flawon, C: Flawanon, D: Flawanonol, E: Izoflawon, F: Chalkon, G: Stilben, H: Katechina, I: Antocyjanidyna

Zbadano 36 polifenoli, w tym 32 flawonoidy, 2 chalkony oraz 2 stilbeny. Związki te podzielono na 3 grupy:

1. Silne inhibitory, poniżej 10% aktywności enzymatycznej w stężeniu 200 μM : kemferyd, galangina, akacetyna, chryzyna, apigenina, hesperytyna, naringenina, biochanina A i EGCG (Rys. 5.14);
2. Inhibitory o średniej aktywności, 10% - 50 % aktywności enzymatycznej w stężeniu 200 μM : kemferol, kwercetyna, moryna, bajkaleina, skutelaryna, luteolina, flawon, genisteina, floretyna i pelargonidyna;
3. Słabe inhibitory, powyżej 50% aktywności enzymatycznej w stężeniu 200 μM : fisetyna, myricetyna, kwercytryna, 5' - metoksyhydroksyflawon, 7 - hydroksyflawon, taksyfolina, silibinina, daidzeina, florydzya, rezweratrol oraz polidatyna.

W przypadku 7,4' - dimetoksy - 3 - hydroksyflawonu, ikaryny, rutyny, orientyny oraz katechiny i epigalokatechiny nie odnotowano inhibicji TyrRS (IC_{50} powyżej 2 mM).



Rys. 5.14. Inhibicja reakcji aminoacylacji tRNA w zależności od stężenia: A) kemferyd, B) naringenina i C) chryzyna.

Tab. 5.3. Wartości IC_{50} dla badanych polifenoli. Związki, dla których $IC_{50} < 200\mu M$ zostały wyróżnione kolorem szarym.

	Podstawnik w pozycji węgla										IC ₅₀ (μM)	
	A	B					C					
	R3	R5	R6	R7	R8	R2’	R3’	R4’	R5’	R6’		
Flawonol												
Kemferyd	OH	OH	-	OH	-	-	-	OCH ₃	-	-	25,14	
Galangina	OH	OH		OH	-	-	-	-	-	-	38,6	
Kampferol	OH	OH	-	OH	-	-	-	OH	-	-	55,5	
Kwercetyna	OH	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-	116	
Moryna	OH	OH	-	OH	-	OH	-	OH	-	-	203	
Fisetyna	OH	-	-	OH	-	-	-	OH	OH	-	472	
Myricetyna	OH	OH	-	OH	-	-	OH	OH	OH	-	407	
Kwercytryna	O-Rmn	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-	503	
5'-metoksy hydroksyflawon	OH	-	-	-	-	-	-	-	OCH ₃		838	
7,4'-dimetoksy-3- hydroksyflawon	OH			OCH ₃				OCH ₃			>2000	
Ikaryna	O-Glc	OH	-	-O-Glc	O-ip	-	-	OCH ₃	-	-	>2000	
Rutyna	Gl-Rm	OH		OH			OH	OH			>2000	
Flawony												
Akacetyna	-	OH	-	OH	-	-	-	OCH ₃	-		5,12	
Chryzyna	-	OH	-	OH	-	-	-	-	-	-	27,8	
Apigenina	-	OH	-	OH	-	-	-	OH	-	-	36,7	
Bajkaleina	-	OH	OH	OH	-	-	-	-	-	-	91,5	
Skutelaryna	-	-	OH	O-Gln	-	-	-	OH	-	-	118	
Luteolina	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-	98	
Flawon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	248	
7 - hydroksyflawon				OH							1800	

Orientyna	-	OH	-	OH	O-Glc	-	OH	OH	-	-	>2000
Flawanony											
Hesperetyna	-	OH	-	OH	-	-	OH	OCH ₃	-	-	32,5
Naringenina	-	OH	-	OH	-	-	OH	-	-	-	40,6
Flawanonole											
Taksyfolina	OH	OH	-	OH	-		OH	OH		-	1360
Silibinina	OH	OH	-	OH	-		O-lig			-	338
Izoflawony											
Biochanina A	-	OH	-	OH				OCH ₃		-	25,8
Genisteina	-	OH	-	OH				OH		-	152
Daidzeina	-	-	-	OH				OH		-	902
Chalkony											
Floretyna	H	OH	-	-	-	OH	-	OH	-	OH	111
Florydzyina	H	OH	-	-	-	OH	-	OH	-	O-Glc	1800
Stilbeny											
Rezweratrol	OH	OH	-	-	-	-	-	OH	-	-	463
Polidatyna	OH	O-Glc	-	-	-	-	-	OH	-	-	611
Katechiny											
EGCG	Gal	OH	-	OH	-	-	OH	OH	OH	-	5
Katechina	OH	OH		OH				OH	OH		>2000
Epigalokatechina	OH	OH		OH			OH	OH	OH		>2000
Antocyjanidyny											
Pelargonidyna	OH	OH	-	OH	-	-	-	OH	-	-	119

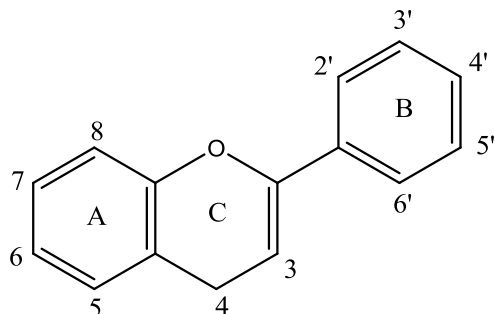
Glc - glukoza, Gln - glukuronid, -ip - izoprenyl, - lig lignan; Gal - galusan, Rmn - ramnoza, Gl-Rm - glukoramnozyd

Flawony posiadające więcej niż dwie grupy hydroksylowe w pierścieniu A (bajkaleina), jak również więcej niż jedną grupę OH w pierścieniu B (luteolina) charakteryzują się wyższymi wartościami IC₅₀ w porównaniu do flawonów, gdzie w pierścieniu A znajdują się 2 grupy OH (apigenina, chryzyna, akacetyna) a w pierścieniu B jedna (lub brak), grupa OH (apigenina chryzyna). Brak OH w pierścieniu B obniża IC₅₀ (chryzyna) jednak najwyższą aktywność obserwowano w przypadku wzrostu hydrofobowości cząsteczki przez podstawienie grupy metoksyłowej w pozycji 4' (akacetyna) (Rys. 5.15). Zależność tę obserwowano również w przypadku flawonoli. Wzrost hydrofilowości poprzez podstawienie więcej niż jednej grupy OH w pierścieniu B obniża działanie hamujące inhibitora (kwercetyna, moryna, fisetyna, myrycetyna). Obecność jednej (kemferol) lub całkowity brak grupy OH w pierścieniu B (galangina) powoduje wzrost właściwości hamujących inhibitora. Najlepsze rezultaty (kemferyd) daje podstawienie grupy metoksyłowej w pozycji 4'. Identyczną zależność obserwowano również w przypadku flawanonów (hesperetyna) jak i izoflawonów (biochanina A). Co ciekawe nie ma zasadniczych różnic w wartościach IC₅₀ dla par chryzyna - galangina oraz apigenina - kemferol. Cząsteczka trans - rezweratrolu może być uważana za częściowo symetryczną i wchodzić w interakcje zarówno za pośrednictwem grupy 3-OH, jak również grupy 4'-OH (Rys. 5.15).

Podstawienie pierścienia benzopiranowego resztą cukrową powoduje natomiast osłabienie potencjału inhibitorowego związków (kwercytryna, ikaryna, rutyna, skutelaryna, polidatyna). Zmiany w geometrii cząsteczki na skutek wysycenie wiązania podwójnego pomiędzy C2-C3 również powodują podwyższenie wartości IC₅₀ (apigenina - naringenina). Podobnie

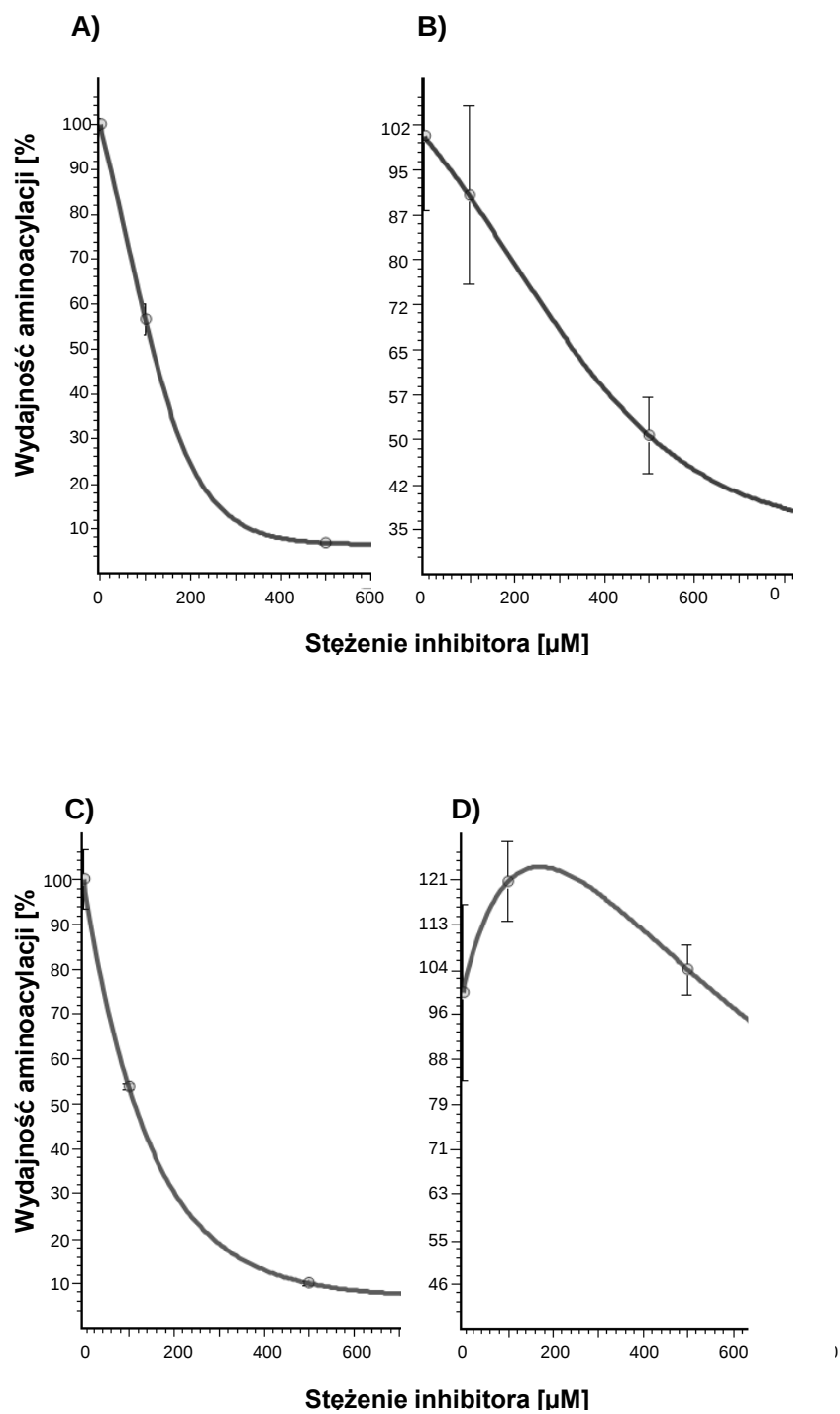
zwiększenie stopnia swobody cząsteczki poprzez rozerwanie wiązania C1-C2 skutkuje dalszym wzrostem IC_{50} (naringenina – floretyna) (Rys. 5.15).

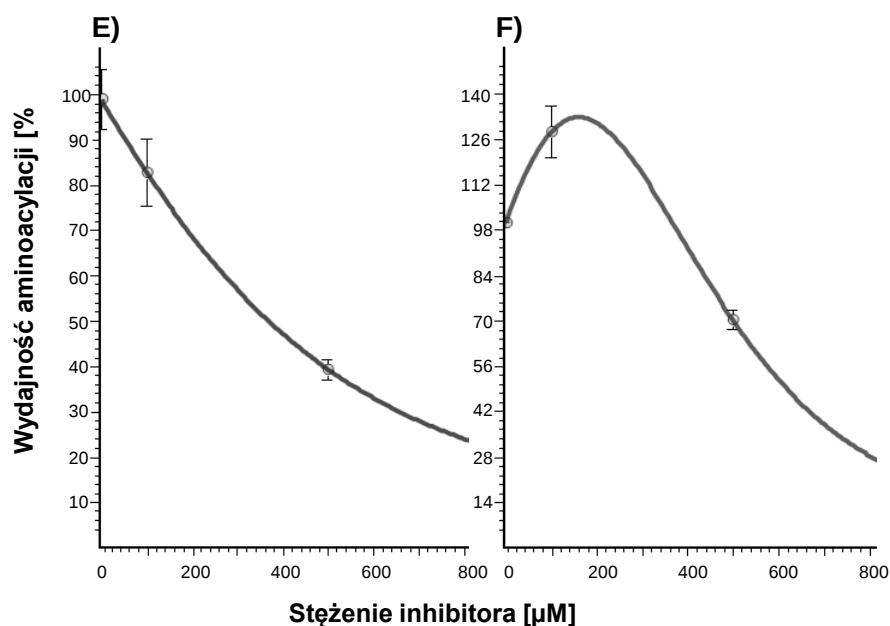
Porównanie struktury najsilniejszych inhibitorów aminoacylacji katalizowanej przez TyrRS *E. coli* pokazuje, że najsukuteczniejsze są te posiadające grupę hydrofobową w pozycji 4' i grupy hydroksylowe w pozycji 5 i 7.



Rys. 5.15. Szkielet flawonu wraz z numeracją atomów węgla

Obecność reszty cukrowej obniża potencjał hamujący inhibitora np. reszta glukuronidu w pozycji 7 pierścienia A w przypadku skutelaryny. Z kolei podstawienie reszty cukrowej w pozycji 5 pierścienia A w przypadku florydzyiny, powoduje wstępną aktywację aminoacylacji, po której następuje hamowanie reakcji w obecności wyższego stężenia inhibitora. Podobną sytuację zaobserwowano w przypadku polidatyny. Charakterystyczne jest, że w obu przypadkach podstawnikiem jest glukoza. Porównując wpływ kwercetyny, floretyny i rezweratrolu na reakcję aminoacylacji można zauważyć, że stężenie 200 μM inhibitora powoduje odpowiednio 80, 70 i 30% spadek wydajności reakcji. Zastąpienie reszty cukrowej w pozycji 3 w przypadku kwercytryny nie wpływa znacząco na jego aktywność hamującą, podczas gdy podstawienie w pozycji 5 - florydzyina oraz w pozycji 7 - polidatyna powoduje aktywację TyrRS w niższym stężeniu (poniżej 100 μM) a inhibicję w wyższym stężeniu (Rys. 5.16). Sugeruje to wpływ tych związków na strukturę TyrRS prowadzący do podwyższenia liczby obrotów enzymu. Podobne zjawisko wiązania niskocząsteczkowych związków w miejscu innym niż katalityczne obserwowano w przypadku białek osocza ludzi.





Rys. 5.16. Wykresy wydajności aminoacylacji tRNA katalizowanej przez TyrRS *E. coli* w zależności od stężeń inhibitorów: A) kwercetyny, B) kwercytryny, C) floretyny, D) florydzyiny, E) rezweratrolu i F) polidatyny

Dla związków, których wartość IC_{50} wynosiła $< 200 \mu\text{M}$ przeprowadzono analizę inhibicji metodą Dixona [198]. W celu wyznaczenia wartości szybkości reakcji początkowej (V_0) w obecności inhibitora, reakcje prowadzono przez 1, 2 i 5 minut dla 3 różnych stężeń Tyr (1,25, 2,5, $5 \mu\text{M}$) w obecności 4 różnych stężeń inhibitora (5, 25, 50, $100 \mu\text{M}$) [Tab. 5.4]. Stężenie substratu zostało dobrane tak, aby nie przekraczało wartości $1/3 K_m < [S] < 3 K_m$. Umożliwia to określenie typu inhibicji, zapobiegając wykluczeniu inhibitorów typu kompetycyjnego. Jednocześnie pozwala na osiągnięcie odpowiedniej szybkości reakcji oraz wydajności.

Tab. 5.4. Wartości stałej inhibicji flawonoidów oraz ich właściwości fizykochemiczne. Parametry cLogP i tPSA oraz liczbę akceptorów i donorów wiązań wodorowych (Ha/Hd) i wiązań obrotowych (WO) obliczono z wykorzystaniem programu Molinspiration Cheminformatics

	$K_i (x 10^{-6} \text{ M})$	M_w	Ha/Hd	cLogP	tPSA ($\text{\AA}$)	WO
Kemferyd	9,1	284,267	5/3	3,1	90,895	1
Galangina	12,3	270,24	5/3	2,651	90,895	1
Kampferol	41,3	286,239	6/4	2,172	111,123	1
Kwercetyna	145,7	302,238	7/5	1,683	131,351	1
Akacetyna	5,12	284,267	5/2	2,999	79,901	2
Chryzyna	12,5	254,241	4/2	2,943	70,667	1
Apigenina	42,7	270,24	5/3	2,463	90,895	1
Bajkaleina	86,9	270,24	5/3	2,682	90,895	1
Luteolina	79,3	286,239	6/4	1,974	111,123	1
Skutelaryna	198,2	462,363	12/7	0,065	207,346	4

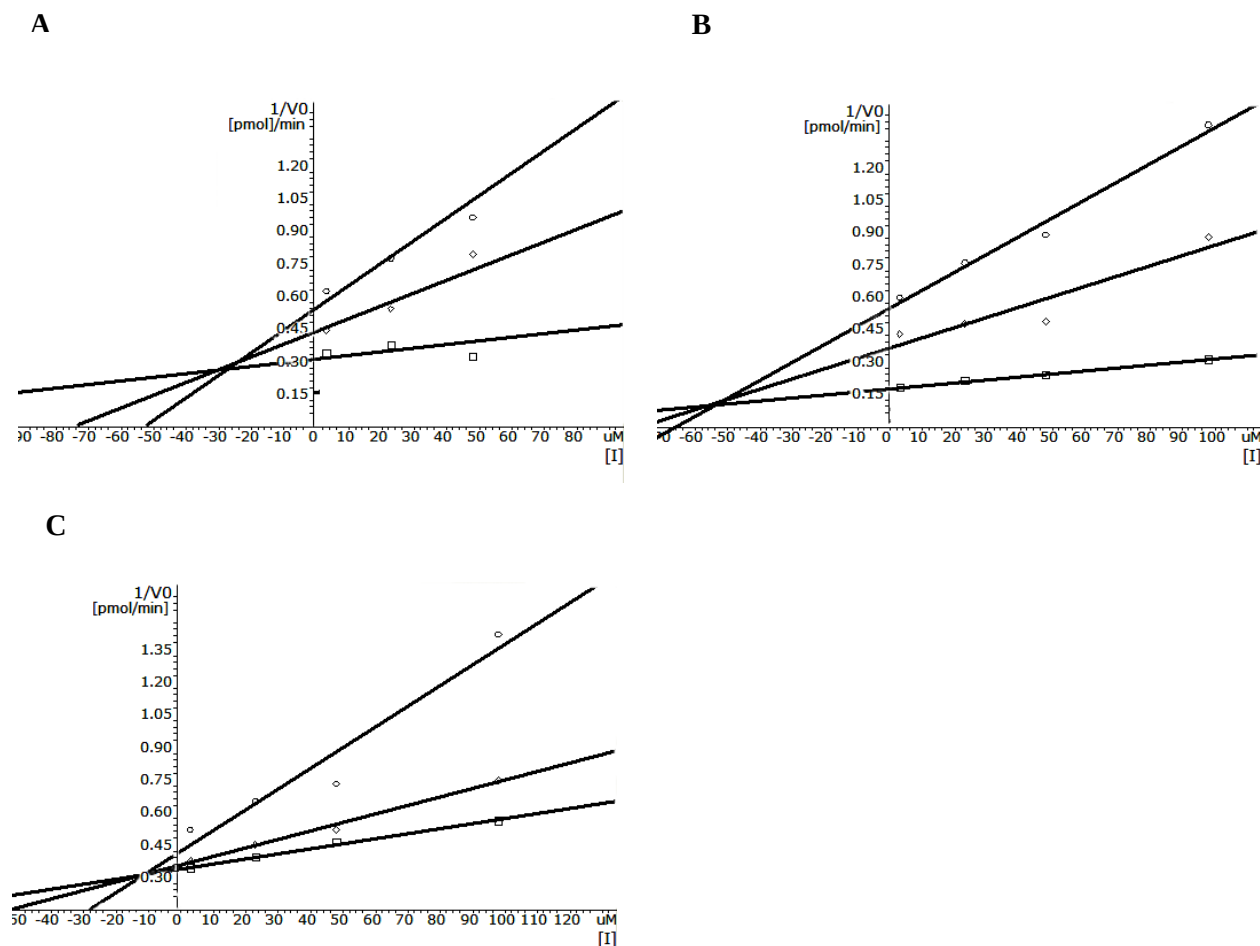
Hesperetyna	52	302,282	6/3	1,935	96,223	2
Naringenina	67,8	272,256	5/3	2,117	86,989	1
Biochanina A	26,6	284,267	5/2	2,804	79,901	2
Genisteina	111,6	270,24	5/3	2,268	90,895	1
Floretyna	134,2	274,272	5/4	2,656	97,983	4
EGCG	7,5	442,376	10/7	2,537	177,135	4
Pelargonidyna	168,9	271,248	5/4	-0,257	92,082	1

Analizując zależność pomiędzy wartościami K_i i LogP poszczególnych grup związków, można zauważyć, że wraz z obniżeniem K_i rośnie lipofilowość cząsteczki, na co wskazuje wartość LogP. Wartość LogP aktywnych związków mieści się w przedziale $1 < \log P < 3$, co oznacza średnią lipofilowość. Wartości tPSA (topologiczne pole polarne cząsteczki) dla tych związków wynoszą $< 140 \text{ \AA}$, co oznacza dobrą biodostępność związku, wyjątki stanowią EGCG i skutelaryna. Dla związków o najniższych wartościach K_i akacetyny, hesperetyny i biochaniny A, obserwuje się także większą liczbę wiązań rotujących.

Masa cząsteczkowa wszystkich związków z tej grupy jest niższa niż 500Da. Spełniają one także kryterium ilości akceptorów i donorów wiązań wodorowych (Ha i Hd), wg. reguł Lipińskiego, wyjątki stanowią EGCG i skutelaryna. Inhibitorem o najwyższej aktywności w teście inhibicji był EGCG ($K_i = 5 \mu\text{M}$). Jednakże pokazano, że rozpad tego związku generuje powstawanie H_2O_2 , co może być przyczyną spadku aktywności enzymu związanej z jego utlenieniem a nie wiązaniem EGCG [199].

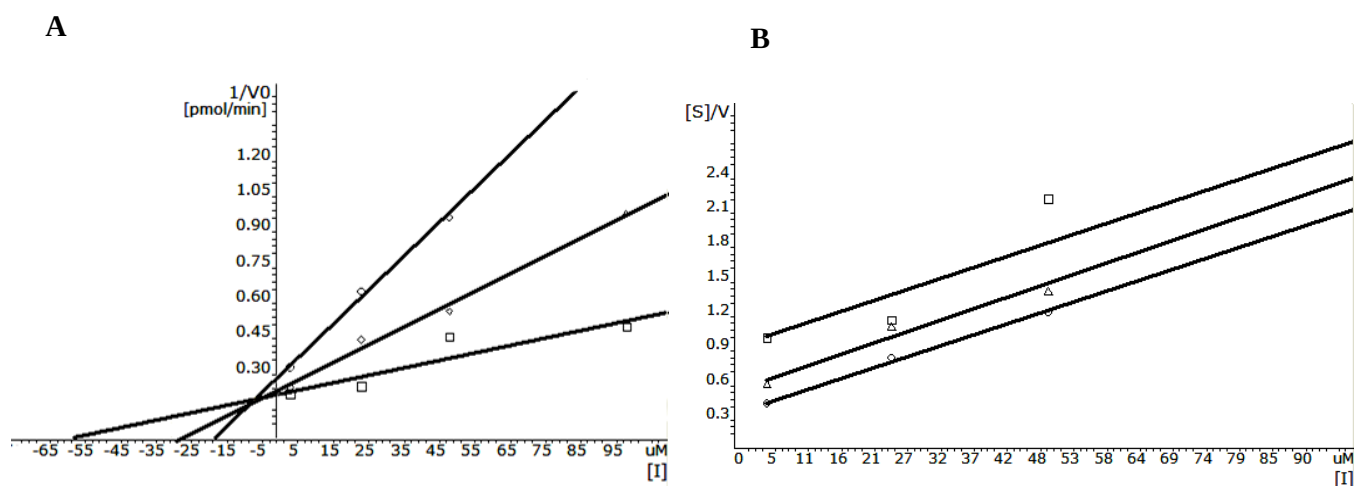
W wyniku analizy inhibicji TyrRS *E. coli* metodą Dixona otrzymano linie proste przecinające się w obszarze ujemnych wartości y i dodatnich wartości x, co wskazuje na inhibicję kompetycyjną TyrRS (*ang. competitive inhibition*) przez kemferyd, galanginę, kemferol, kwercetynę, akacetynę, chryzynę, apigeninę, bajkaleinę, luteolinę, hesperetynę, naringeninę, biochaninę A, genisteinę oraz floretynę (Rys. 5.17 i 5.18) lub mieszaną (*ang. mixed inhibition*) przez skutelarynę.

Inhibitory kompetycyjne wiążą się tylko do wolnego enzymu TyrRS (niezwiązanego z substratem) tworząc kompleks EI, rywalizując o miejsce wiązania w centrum aktywnym enzymu. Istnieje także możliwość ograniczania dostępu substratu do miejsca aktywnego na skutek wiązania inhibitora w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca aktywnego, co blokuje dostęp substratu lub zmienia konformację miejsca aktywnego. Inhibitory kompetycyjne zmniejszają w tym przypadku szybkość katalizy przez zmniejszenie liczby cząsteczek TyrRS wiążących substrat [200]. Z kolei skutelaryna będąca inhibitorem mieszanym, wpływa jednocześnie na wiązanie substratu i liczbę obrotów enzymu.



Rys. 5.17. Wykres Dixona inhibicji TyrRS *E. coli* A) Biochanina A, B) Hesperetyna, C) Kemferyd.

Tyr: $\square$ -5 μM , $\diamond$ -2,5 μM , $\circ$ -1,25 μM ;

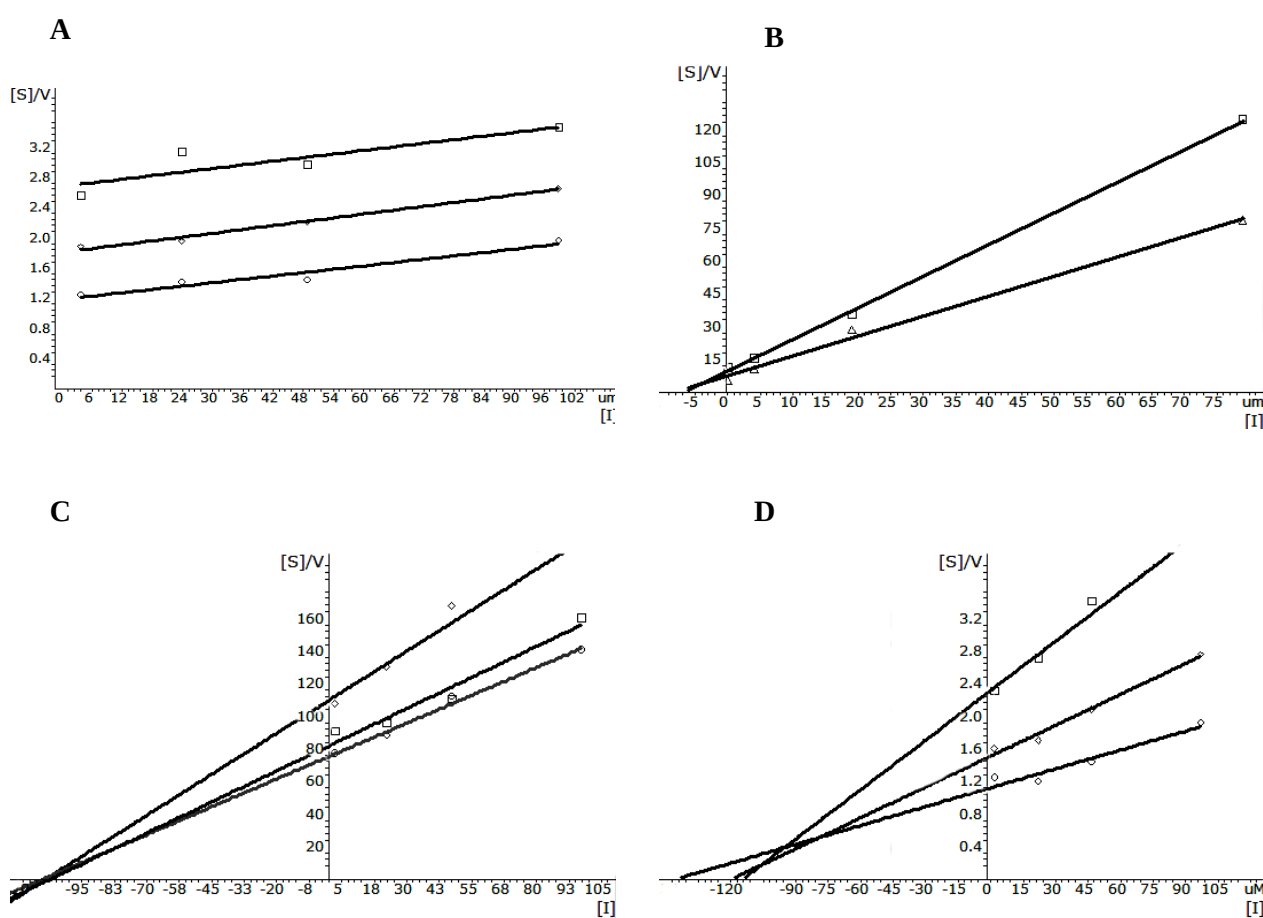


Rys. 5.18. Wykres inhibicji TyrRS *E. coli* przez akacetynę.

A) metoda Dixona ($1/V$ vs. $[I]$); B) metoda Cornisha – Bowdena ($[S/V]$ vs. $[I]$)

Tyr: $\square$ -5 μM , $\diamond$ -2,5 μM , $\circ$ -1,25 μM .

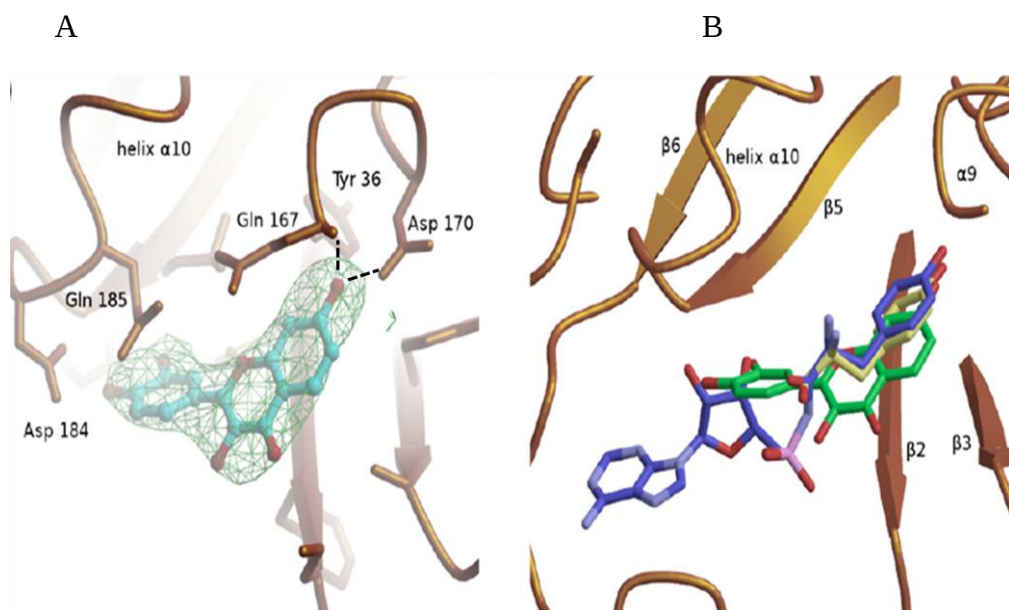
W celu wyznaczenia mechanizmu inhibicji dla floretyny, EGCG, skutelaryny i pelargonidyny wykonano dodatkową analizę metodą Cornisha – Bowdena. Otrzymane wyniki potwierdzają kompetycyjny oraz mieszany mechanizm inhibicji TyrRS w przypadku floretyny i skutelaryny. Dla EGCG linie proste przecinające się na osi x w obszarze ujemnych wartości y, co wskazuje na inhibicję niekompetycyjną (ang. *noncompetitive inhibition*) (Rys. 5.19). Oznacza to, że EGCG i substrat mogą się jednocześnie wiązać się do cząsteczki TyrRS w różnych miejscach, nie konkurując ze sobą o miejsce wiązania. Zmniejszenie liczby obrotów enzymu przez inhibitor niekompetycyjny jest niezależne od stężenia substratu [200]. Wykres Cornisha – Bowdena dla pelargonidyny tworzą linie proste przecinające się w obszarze ujemnych wartości y oraz dodatnich x, co wskazuje na inhibicję akompetycyjną (ang. *uncompetitive inhibition*) (Rys. 5.19). W tym przypadku inhibitor wiąże się tylko do kompleksu enzym – substrat. Tak jak w przypadku inhibicji niekompetycyjnej liczba obrotów enzymu jest niezależna od stężeń substratu.



Rys. 5.19. Wykres Cornisha – Bowdena inhibicji TyrRS *E. coli* dla: A) floretyny, B) EGCG, C) skutelaryny and D) pelargonidyny.

W roku 2011 rozwiązano strukturę krystaliczną kompleksu TyrRS *Leishmania major* w kompleksie z fisetyną (Rys. 5.20) [171]. Na podstawie tej struktury opracowano model wiązania flawonoidów w kieszeni aktywnej enzymu. Chociaż jak wynika z moich badań, fisetyna nie jest w grupie najsilniejszych inhibitorów [Tab. 5.3], to otrzymany model pokazuje sposób, w jaki ten flawonoid kompetycyjnie oddziałuje w miejscu aktywnym enzymu. Pozwala na wysunięcie wniosków o sposobie oddziaływania innych polifenoli z tym

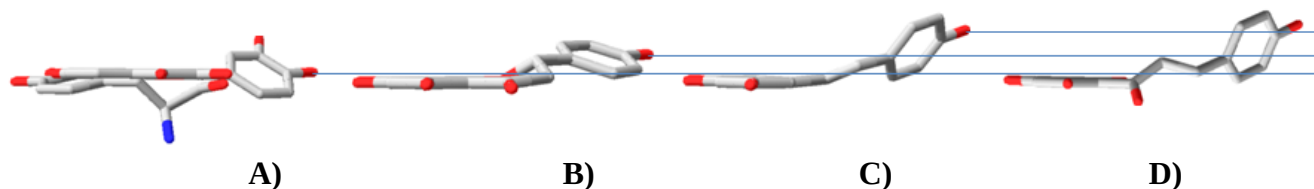
enzymem (Rys. 5.20). Praca ta potwierdza wyniki badań własnych, jakie otrzymano w trakcie modelowania molekularnego (Rys. 5.1) – flawonoidy oddziałują z miejscem aktywnym TyrRS głównie poprzez wiązania tworzone przez grupy pierścienia B.



Rys. 5.20. Miejsce wiązania fisetyny w A) w miejscu aktywnym; B) nałożenie kompleksów TyrRS *L. major* z tyrozynolem (żółty; PDBID 3POI), fisetyną (niebieski; PDBID 3POH), i drożdżową TyrRS z tyrozyloadenylanem (zielony; PDBID 2DLC) [171].

Grupa hydroksylowa w pozycji 7 pierścienia benzopiranowego fisetyny tworzy wiązanie wodorowe z tlenem znajdującym się w pierścieniu bocznym Tyr36 i tlenem łańcucha bocznego Asp170 analogicznie do grupy OH tyrozynolu. Reszta cząsteczki fisetyny znajduje się w pozycji zajmowanej przez rybozę w tyrozyloadenylanie jak pokazano w kompleksie TyrRS drożdży. Para grup hydroksylowych z ugrupowania katecholowego fisetyny zajmuje pozycję zbliżoną do O2' and O3' reszty rybozy. Pozostałe podstawniki hydroksylowe fisetyny nie oddziałują z enzymem [171].

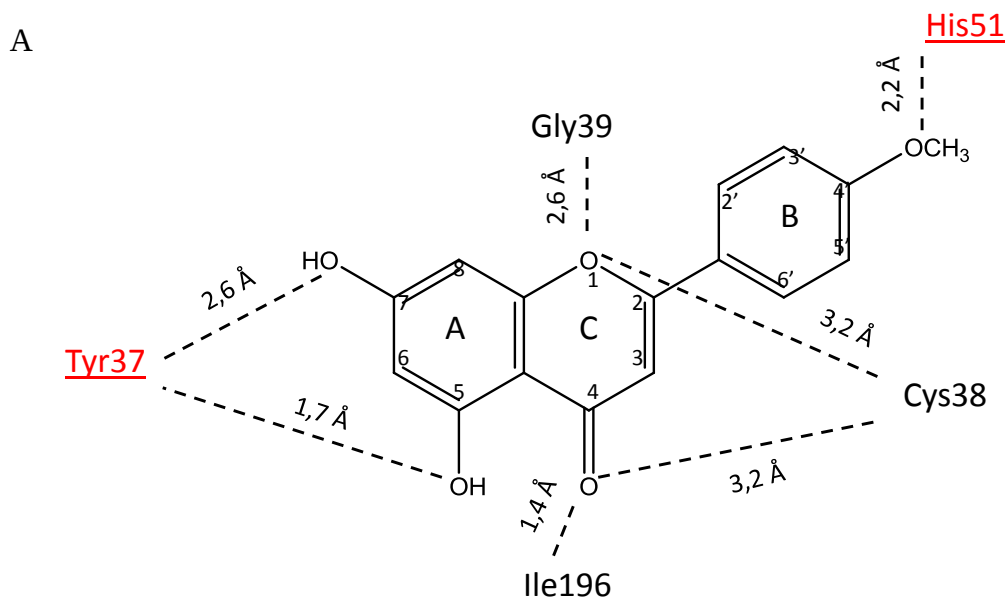
Porównanie struktury krystalicznej fisetyny w kompleksie z TyrRS oraz flawonoidów z innymi grup (naringeniną, fioletyną i rezweratolem) w kompleksach krystalicznych z innymi enzymami, wskazuje, że mogą one oddziaływać z centrum katalicznym TyrRS w taki sam sposób. Grupa 4'-OH w każdym przypadku znajduje się w innym położeniu, co może wyjaśnić wzrost wartości K_i tych związków (Rys. 5.21).



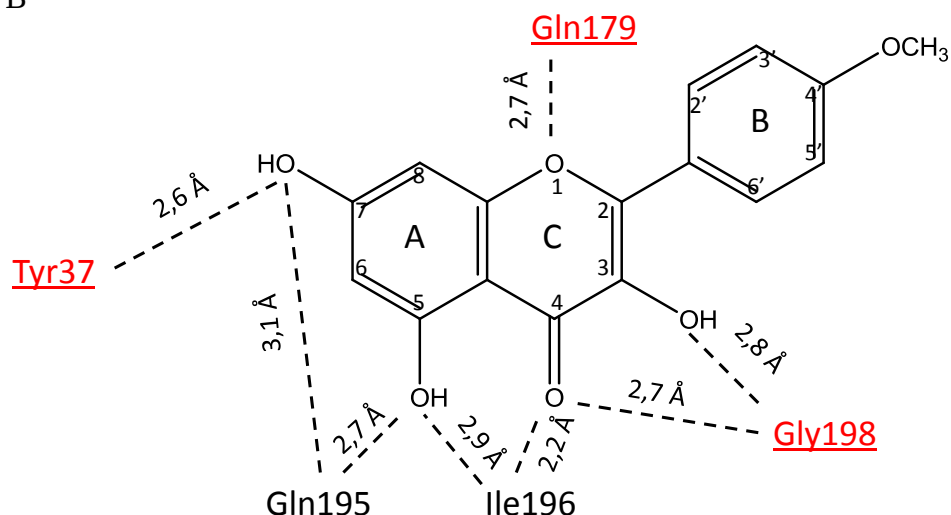
Rys. 5.21. Porównanie struktur krystalicznych: A) fisetyna nałożona na tyrozynol (PDB:3P0H, 3P0I), B) naringenina (PDB: 2UXU), C) rezweratrol (PDB: 3FTS) i D) fioletyna (PDB: 2UXI). Poziome linie wskazujące na różnicę położenia grupy 4'-OH.

Inhibicja TyrRS przez flawonoidy ma w większości przypadków charakter kompetycyjny, co oznacza wiązanie w kieszeni aktywnej enzymu. W celu określenia mechanizmu oddziaływania tych związków wykorzystano modelowanie molekularne. Wyniki tej analizy wskazują, że w wiązaniu flawonoidów w kieszeni aktywnej TyrRS *E. coli* uczestniczą aminokwasy zaangażowane w wiązanie tyrozyny w kieszeni aktywnej: Tyr37 oraz Gln179 (podobnie jak w strukturze krystalicznej TyrRS - Tyr (Rys. 3.14 [165])). Z rezultatów modelowania wynika, że Tyr37 może wchodzić w interakcje z częścią flawnoidu za pośrednictwem wiązań wodorowych z grupą 5-OH (1,7 Å dla akacetyny) i 7-OH (2,6 Å dla akacetyny oraz kemferydu), natomiast Gln179 oddziałuje prawdopodobnie z tlenem znajdującym się w pozycji 1 pierścienia C (2,7 Å dla kemferydu) (Rys. 5.22) na co wskazują odległości pomiędzy potencjalnym donorem i akceptorem protonu.

Grupa metoksylova w pozycji 4' pierścienia B zajmuje miejsce analogiczne do 3'-OH rybozy i może oddziaływać z His51 (2,2 Å dla akacetyny) (His51 bierze udział w wiązaniu γ -fosforanu cząsteczki ATP). W zależności od rodzaju flawnoidu (nasycone bądź nienasycone wiązanie C2-C3 w pierścieniu C, grupa 4'OCH₃ może znajdować się w nieco innym położeniu. Wpływa to na siłę jej oddziaływania z His51. Gly198 (która w kompleksie TyrRS - TyrAMP tworzy wiązanie wodorowe z 2'OH rybozy) oddziałuje z grupą 3-OH (2,8 Å dla kemferydu) oraz tlenem będącym podstawnikiem węgla 4 w pierścieniu C flawnoidu (2,7 Å dla kemferydu) (Rys. 5.22).

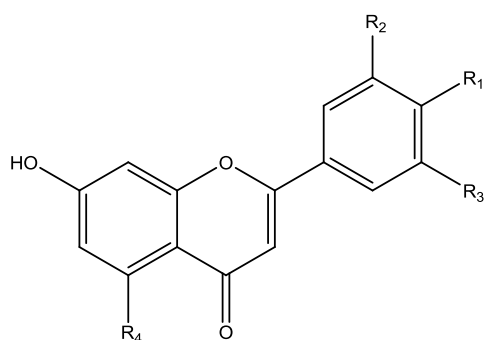


B



Rys. 5.22. Model potencjalnego oddziaływania flawonoidów w kieszeni aktywnej TyrRS *E. coli*; A: akacetyna, B: kemferyd.

Analiza zależności pomiędzy strukturą chemiczną i aktywnością flawonoidów doprowadziła do wyznaczenia związku wiodącego, który w dalszych badaniach poddany zostanie modyfikacjom w wybranych miejscach (Rys. 5.23). Potencjalne miejsca modyfikacji zostały określone w celu obniżenia stałej inhibicji K_i oraz minimalnego stężenia hamującego MIC_{50} wobec bakterii.



R1 – grupy: $-CH_3$, $-OCH_3$, $-C_2H_5$, $-OC_2H_5$, $-NH_2$, $-NHR$ czy $-NR_2$

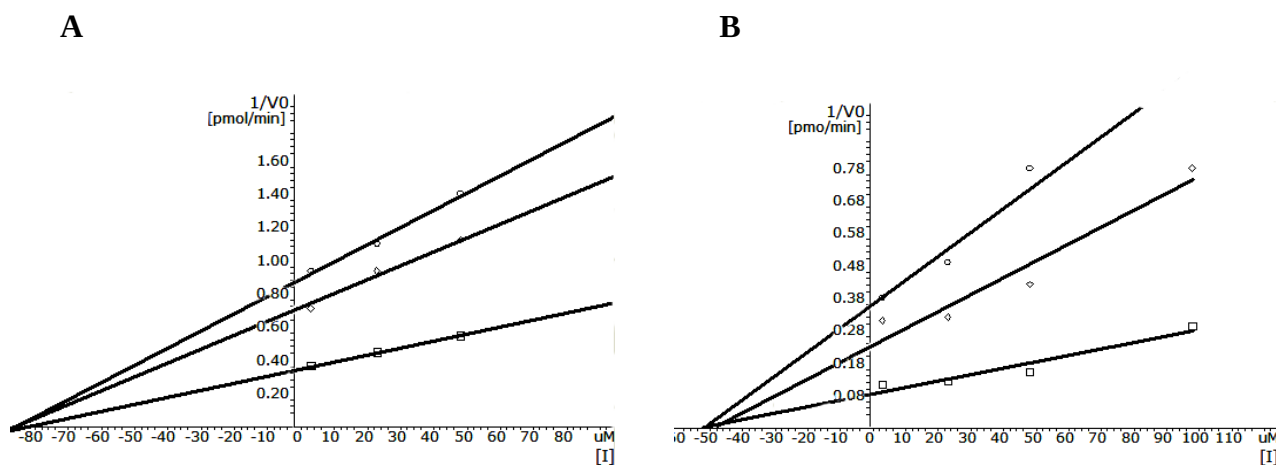
R2, R3, R4 – np. $-NO_2$, $-CN$, $-COR$, $-CHO$, $-COOR$, $-C=C$, $-Ph$, halogeny, grupy elektrodonorowe

Rys. 5.23. Struktura związku wiodącego wraz z proponowanymi modyfikacjami.

Poszukując potencjalnych inhibitorów allosterycznych zbadano również inne związki pochodzenia naturalnego. Wśród nich wyodrębniono również kilka hamujących aktywność TyrRS *E. coli*, są to: sangwinaryna (24 μM), kolchicina (1,2 mM), sparteina (2,59 mM) oraz kinetyna (2,23 mM) i kwas ursolowy (76,6 μM) [Tab. 5.5]. Metodą Dixona wyznaczono typ inhibicji kwasu ursolowego oraz sangwinaryny (Rys. 5.24). Wyniki wskazują, że oba związki są inhibitorami niekompetycyjnymi wiążącymi się z TyrRS niezależnie od substratu wpływając na zmniejszenie szybkości reakcji czyli ilości cząsteczek enzymu dostępnych dla substratu. Chociaż sugerowano już hamujący wpływ alkaloidów na aktywność syntetaz w przypadku sparteiny [194] to sangwinaryna i kolchicina są nowymi związkami w tej grupie.

Tab. 5.5. Wartości inhibicji związków naturalnych oraz ich właściwości fizykochemiczne. Parametry cLogP i tPSA oraz liczbę akceptorów i donorów wiązań wodorowych (Ha/Hd) i wiązań rotujących (WR) obliczono z wykorzystaniem programu Molinspiration Cheminformatics

	K_i/IC_{50}	M_w	Ha/Hd	cLogP	tPSA (Å)	WR
Sangwinaryna	$K_i: 49,93 \times 10^{-6} \text{ M}$	332,335	5/0	0,797	40,821	0
Kolchicyna	$IC_{50}: 1,2 \text{ mM}$	413,47	7/1	1,686	83,105	6
Sparteina	$IC_{50}: 2,59 \text{ mM}$	234,387	2/0	2,897	6,476	0
Kwas ursolowy	$K_i: 85,39 \times 10^{-6} \text{ M}$	456,711	3/2	6,789	57,527	1
Kinetyna	$IC_{50}: 2,23 \text{ mM}$	215,216	6/2	1,265	79,634	3



Rys. 5.24. Wykres hamowania aktywności TyrRS *E. coli* (metoda Dixona)

A) Kwas ursolowy, B) Sangwinaryna

Tyr: $\square$ -5 μM , $\diamond$ -2,5 μM , $\circ$ -1,25 μM .

5.2.2. Związki syntetyczne

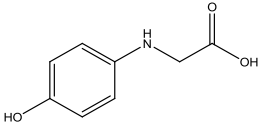
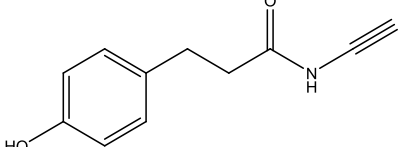
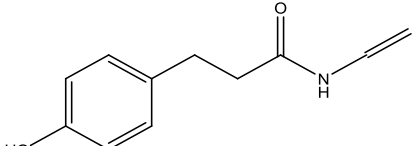
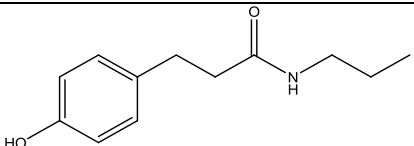
Związki syntetyczne, wśród których zidentyfikowano inhibitory bakteryjnej TyrRS podzielono na 3 grupy:

- Analogi tyrozyny [Tab. 5.6]
- Analogi nukleozydów [Tab. 5.7]

- Analogi tyrozyloadenylationu [Tab. 5.8]

Poszukiwanie inhibitorów wśród związków syntetycznych rozpoczęto od tych, które potencjalnie mogłyby konkurować o miejsce wiązania w centrum aktywnym TyrRS z tyrozyną (załącznik: związki 103 – 108). Potencjał inhibicyjny tych związków był mały, najniższą wartość IC_{50} uzyskano dla N - hydroksyfenyloglicyny (IC_{50} : 314 μ M), pozostałe mieszczą się w przedziale 654 – 1250 μ M [Tab. 5.6]. W tym przypadku wydłużenie łańcucha alifatycznego oraz zastąpienie grupy karboksylowej grupą aminową skutkuje wzrostem wartości IC_{50} .

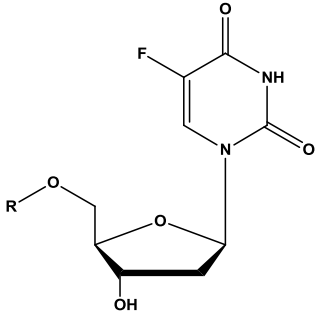
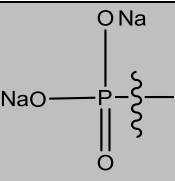
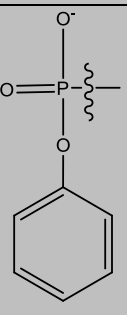
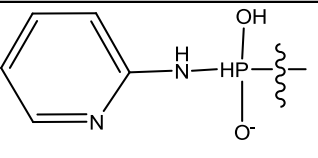
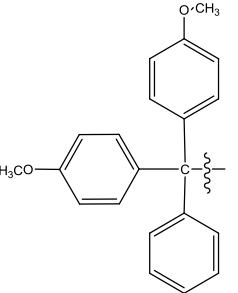
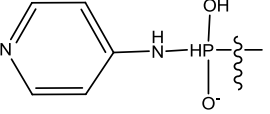
Tab. 5.6. Wartości inhibicji związków syntetycznych, analogów tyrozyny, oraz ich właściwości fizykochemiczne. Parametry cLogP i tPSA oraz liczbę akceptorów i donorów wiązań wodorowych (Ha/Hd) i wiązań obrotowych (WO) obliczono z wykorzystaniem programu Molinspiration Cheminformatics

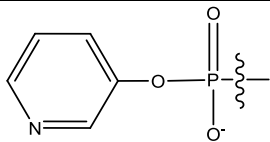
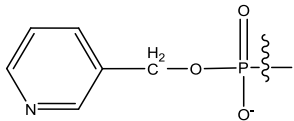
Nr*	R ₁	IC ₅₀ [μ M]	M.W. [Da]	Ha/ Hd	LogP	tPSA [Å]	WO
103		314	167,164	3/4	-0,351	69,554	3
106		654	189,214	2/3	1,042	49,326	3
107		622	191,23	2/3	1,564	49,326	4
108		1250	207,273	2/3	2,14	49,326	5

* numery wg załącznika

Analogi nukleozydów wykazywały najslabszy potencjał hamujący (załącznik: związki 184 - 191). Jedynie dla związków nr 184 i nr 185 $IC_{50} < 1$ mM [Tab. 5.7]. ATP nie tworzy rozbudowanej sieci wiązań z TyrRS, co ma odzwierciedlenie w wartości $K_d = 0,5$ mM. Zatem można oczekiwać, że jego pochodne oddziałują w podobny sposób, co manifestuje się wysokimi wartościami IC_{50} .

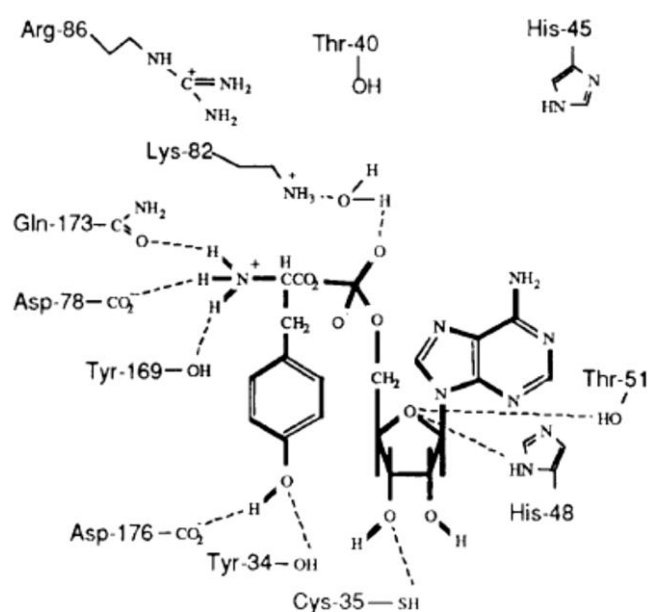
Tab. 5.7. Wartości inhibicji związków syntetycznych, analogów nukleozydów, oraz ich właściwości fizykochemiczne. Parametry cLogP i tPSA oraz liczbę akceptorów i donorów wiązań wodorowych (Ha/Hd) i wiązań obrotowych (WO) obliczono z wykorzystaniem programu Molinspiration Cheminformatics.

							
Nr*	R	IC ₅₀ [μM]	Mw [Da]	Ha/ Hd	LogP	tPSA [Å]	WO
184		60	324,157	10/2	-4,967	156,75	4
185		159	401,263	10/2	-3,466	142,92	6
186		1195	403,283	11/4	-5,123	161,77	6
188		2397	548,567	9/2	3,854	112,03	9
189		>2000	403,283	11/4	-5,242	161,77	6

190		>2000	306,385	11/2	-4,43	155,82	6
191		>2000	416,278	11/2	-4,591	155,82	7

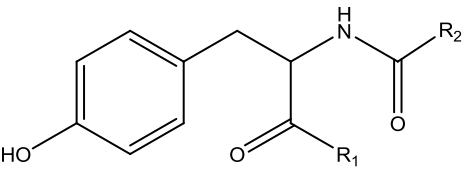
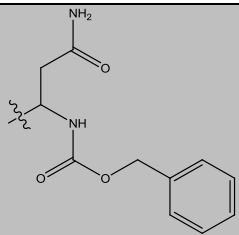
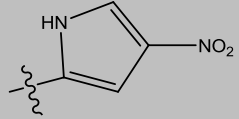
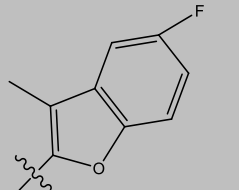
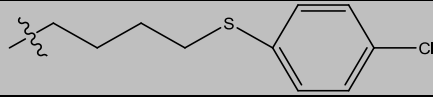
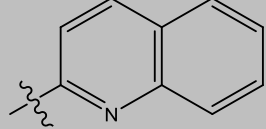
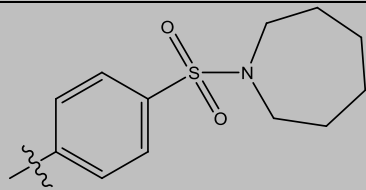
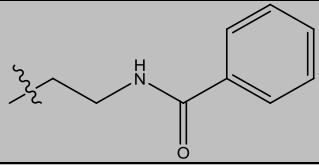
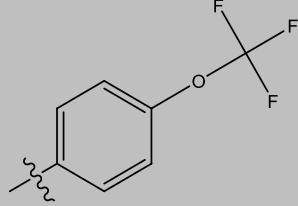
* numery wg załącznika

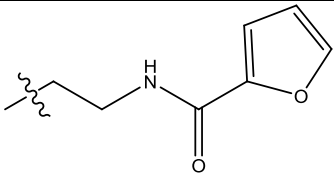
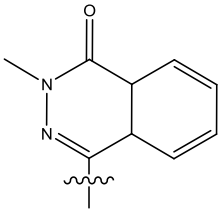
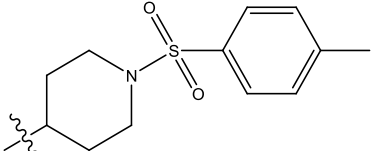
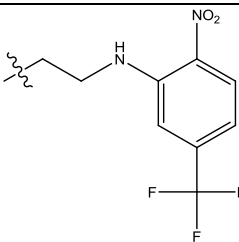
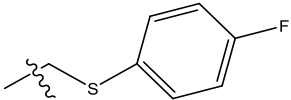
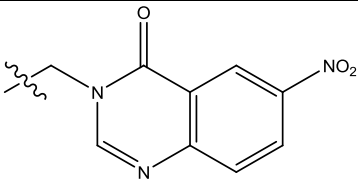
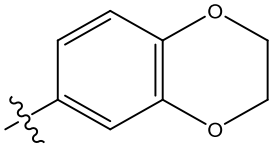
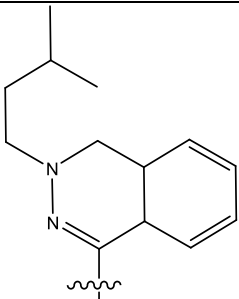
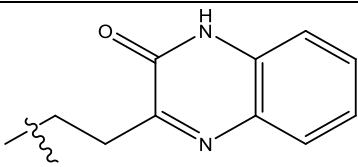
Spośród przebadanych grup związków najniższymi wartościami IC_{50} charakteryzowały się analogi tyrozyloadenylationu [Tab. 5.8]. Stała dysocjacji K_d dla tyrozyloadenylationu wynosi ok. 10 pM, podczas gdy K_d dla tyrozyny i ATP to odpowiednio 15 μ M i 0,5 mM [201]. Stała dysocjacji informuje o sile wiązania substratu do enzymu, zależnej od komplementarności, czyli wzajemnego dopasowania przestrzennego struktur. Im niższa wartość K_d tym wyższe powinowactwo. Zatem tak wysokie powinowactwo tyrozyloadenylationu do enzymu, na co wpływ ma zarówno komplementarność jak i liczba wiązań chemicznych stabilizujących ten kompleks uzasadnia niższe, w porównaniu do analogów Tyr i nukleozydów wartości IC_{50} jego analogów (Rys. 5.25).

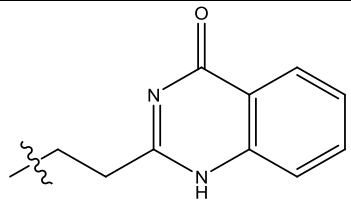
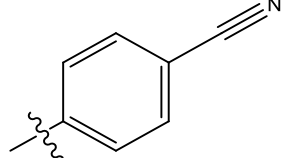
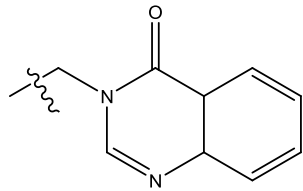
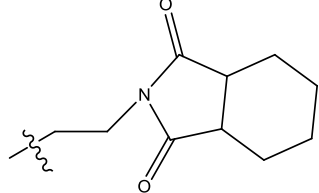
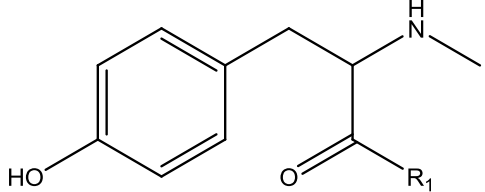
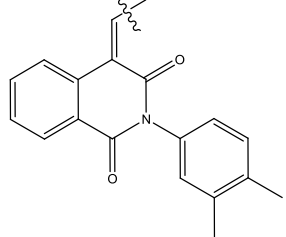
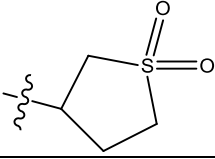
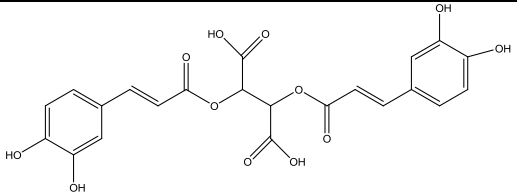
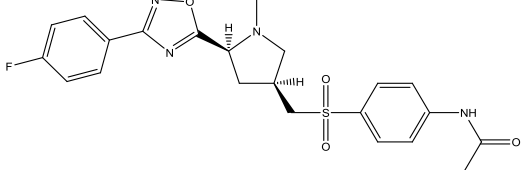


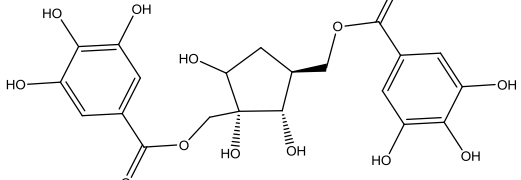
Rys. 5.25. Miejsce wiązania /TyrAMP do TyrRS *E. coli*.

Tab. 5.8. Wartości inhibicji związków syntetycznych, analogów tyrozyloadenylationu, oraz ich właściwości fizykochemiczne. Parametry cLogP i tPSA oraz liczbę akceptorów i donorów wiązań wodorowych (Ha/Hd) i wiązań obrotowych (WO) obliczono z wykorzystaniem programu Molinspiration Cheminformatics.

								
Nr*	R ₁	R ₂	IC ₅₀ [μM]	M _w [Da]	Ha/ Hd	LogP	tPSA [Å]	WR
90	OH		14,98	429,429	10/6	1,761	168,051	11
89	OH		118,4	319,273	9/4	0,727	148,24	6
86	OCH ₃		120	371,12	6/2	2,413	88,771	6
82	OH		122	407,919	5/3	2,303	86,625	10
71	OCH ₃		123	350,374	6/2	2,381	88,523	6
81	OH		146	446,525	8/3	0,959	124,005	7
76	OCH ₃		152	370,405	7/3	1,682	104,729	9
84	OH		164	369,295	6/3	1,202	95,859	7

78	OCH ₃		202	360,366	8/3	0,939	117,869	9
83	OH		278	369,377	8/3	-1,685	119,298	5
80	OCH ₃		302	460,552	8/2	2,753	113,011	8
87	OCH ₃		396	455,389	9/3	3,128	133,482	11
85	OCH ₃		533	363,41	5/2	2,815	75,631	8
88	OCH ₃		536	426,385	11/2	1,268	156,352	8
68	OH		649	343,335	7/3	-0,26	105,093	5
79	OCH ₃		1880	425,529	7/2	2,72	91,233	9
75	OCH ₃		>2000	395,415	8/3	1,703	121,385	8

77	OCH ₃		>2000	395,415	8/3	1,82	121,385	8
72	OCH ₃		>2000	324,336	6/2	2,06	99,423	6
74	OCH ₃		>2000	383,404	8/2	0,933	108,304	7
73	OCH ₃		>2000	402,447	8/2	1,551	113,011	8
								
70	OCH ₃		1540	472,541	7/2	4,086	97,636	7
69	OH		>2000	301,364	6/3	-1,613	103,696	5
Inne								
95			80	474,374	12/6	1,269	208,12	11
100			411	458,515	8/1	2,412	105,402	6

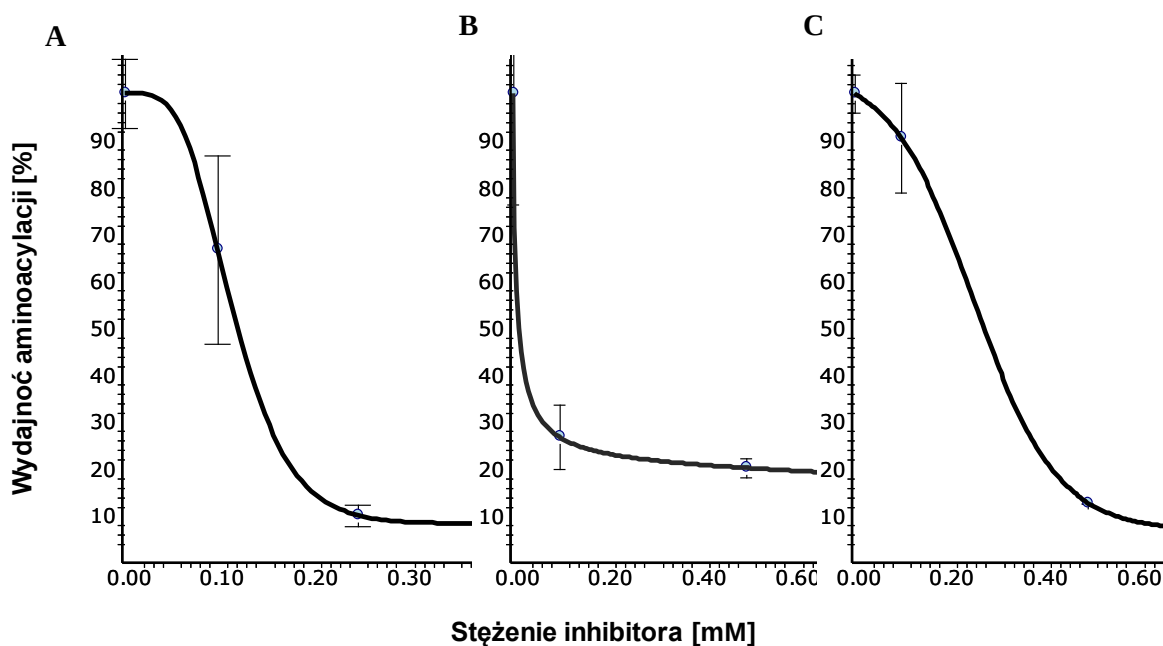
97		482	482,394	13/9	0,023	234,662	8
----	---	-----	---------	------	-------	---------	---

* numery wg załącznika

Inhibitory będące analogami tyrozyloadenyłanu podzielono na 2 grupy:

1. Inhibitory wykazujące 10% - 50% aktywności enzymatycznej w stężeniu 200 μM :
związek nr 89; 90, 86, 84, 82, 81, 78, 76, 71;
2. Słabe inhibitory wykazujące więcej niż 50% aktywności enzymatycznej w stężeniu 200 μM : związek nr 88, 87, 85, 83, 80, 79, 70, 68 (Rys. 5.26).

W przypadku związków: 75, 77, 72, 74, 73 i 69 nie stwierdzono inhibicji TyrRS (IC_{50} powyżej 2 mM) [Tab. 5.8].



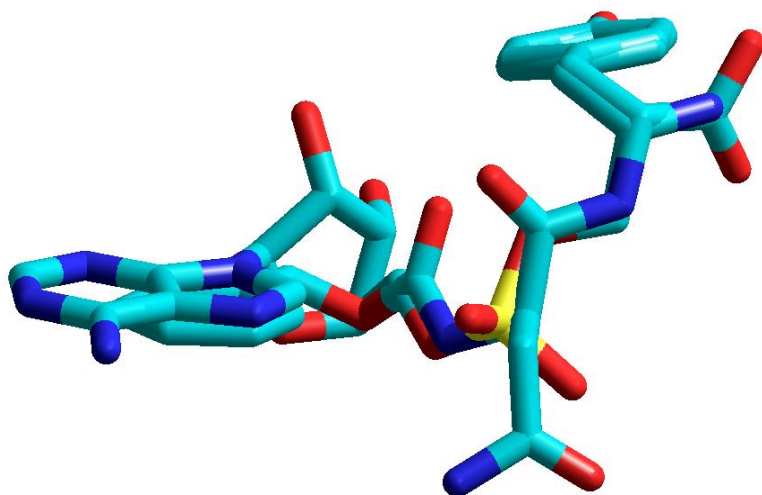
Rys. 5.26. Wykresy wydajności aminoacylacji tRNA katalizowanej przez TyrRS *E. coli* w zależności od stężeń inhibitorów: A) związek nr 82, B) związek nr 90 i C) związek nr 83.

Najsilniejszym inhibitorem z tej grupy okazał się związek nr 90. IC_{50} dla tego analogu tyrozyloadenyłanu wynosi 14,98 μM . Wartość tę można tłumaczyć dużą ilością wiązań rotujących, co umożliwia dopasowanie przestrzenne do kieszeni aktywnej enzymu, co potwierdzono przez nałożenie struktur tyrozyloadenyłanu oraz kwasu 2 - (4 - amino - 2 - (benzyloksykarbonyl - amino) - 4 - oksobutanamido - 3 - (4 - hydroksyfenylo) propionowego (związek nr 90) (Rys. 5.27, 5.28).

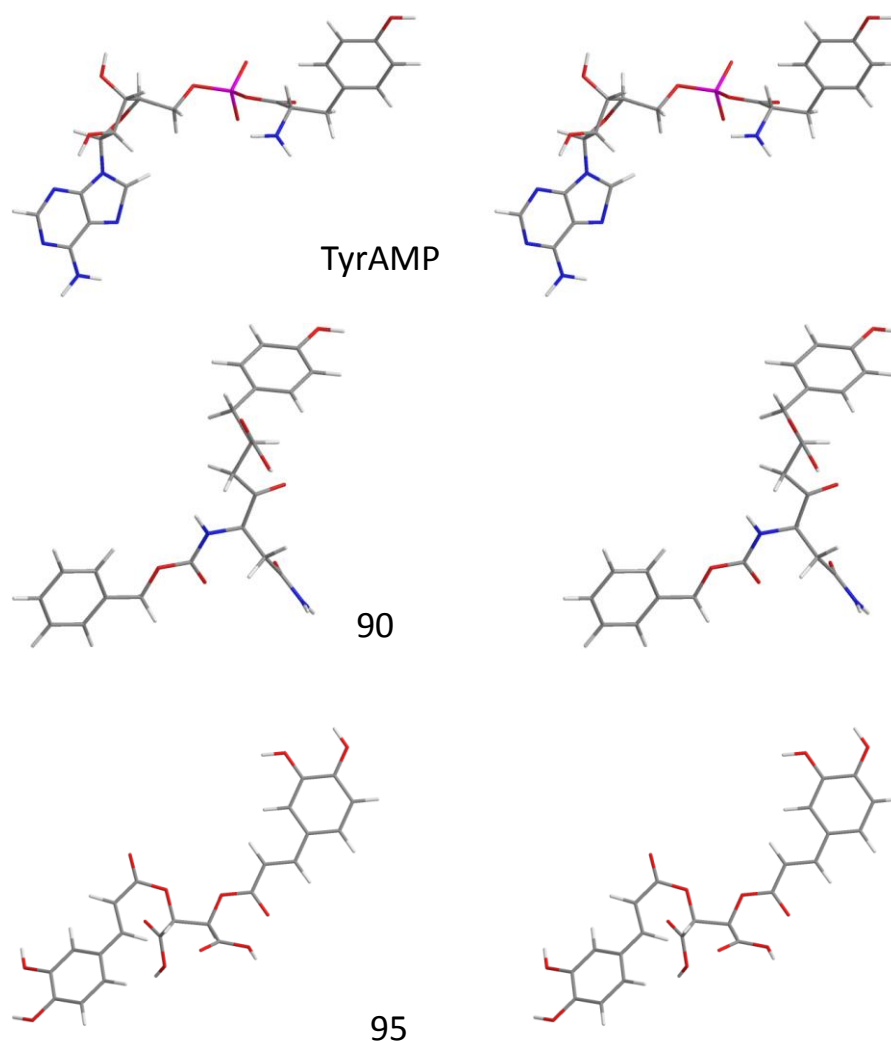
Większość związków z grupy analogów aa - AMP spełnia kryteria Lipińskiego dla potencjalnych terapeutyków. Pozbawienie cząsteczki grupy karboksylowej wyraźnie wpływa

na podwyższenie wartości IC_{50} a tym samym na obniżenie potencjału hamującego inhibitora [Tab. 5.8].

Oprócz wyżej wymienionych inhibitorów aktywność hamującą zaobserwowano również w przypadku związków 95, 100, 97. Podobnie jak w przypadku związku nr 90, związek nr 95 ($IC_{50} = 80 \mu M$) wyróżnia się dużą ilością wiązań rotujących, co może wpływać na ułożenie w centrum katalitycznym enzymu.



Rys. 5.27. Nałożenie struktur Tyr - AMP oraz związku nr 90. Wskazuje na możliwe ułożenie inhibitora w kieszeni aktywnej.



Rys. 5.28. Widok stereo A) struktury krystalicznej AMP, B) związku nr 90, C) związku nr 95 wskazujący na ich możliwe ułożenie miejscu aktywnym TyrRS *E. coli*.

5.3. Badanie wpływu związków niskocząsteczkowych na aktywność TyrRS *S. aureus* i *P. aeruginosa* oraz *S. scrofa domestica* *in vitro*

W przypadku rekombinowanego enzymu TyrRS *E. coli* najsilniejsze inhibitory ($IC_{50} < 50 \mu M$) to: EGCG, akacetyna, kemferyd, biochanina A, chryzyna, hesperetyna, galangina, apigenina i naringenina. Natomiast w badaniach przy użyciu mieszaniny enzymów wyizolowanej z *S. aureus* i *P. aeruginosa* wyznaczone wartości są średnio 10 - 100 razy wyższe. Floretyna, chryzyna i akacetyna hamują TyrRS *S. aureus* w stężeniach odpowiednio 100, 142 i 146 μM natomiast chryzyna i akacetyna hamują TyrRS *P. aeruginosa* TyrRS w stężeniach odpowiednio 567 i 789 μM . Żaden z testowanych związków polifenolowych w badaniach przy użyciu mieszaniny białek wyizolowanej z *S. scrofa domestica* nie hamował aktywności eukariotycznej TyrRS w stężeniu mniejszym niż 1 mM [Tab. 5.9]. Daje to

podstawy do stwierdzenia, że TyrRS cytoplazmatyczna ssaków, nie jest hamowana lub hamowana w znacznie mniejszym stopniu niż TyrRS bakteryjna. Obserwacja ta stanowi podstawę do wykorzystania flawonoidów w zapobieganiu i leczeniu infekcji bakteryjnych.

Natomiast w przypadku alkaloidów nie odnotowano gatunkowo specyficznej selektywności.

Tab. 5.9. Wartości inhibicji (μM) związków naturalnych wobec TyrRS *S. aureus*, *P. aeruginosa* oraz *S. scrofa domestica* w mieszaninie białek.

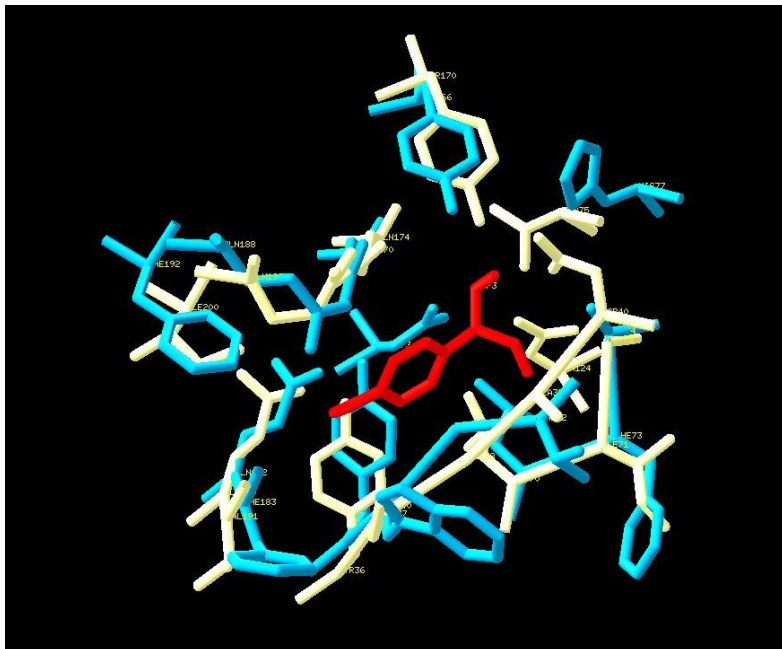
	<i>S. aureus</i> (IC_{50})	<i>P. aeruginosa</i> (IC_{50})	<i>S. scrofa domestica</i> (IC_{50})
Kemferyd	766	1250	1550
Galangina	887	1131	1890
Kemferol	1590	2335	1680
Kwercetyna	1430	>2500	2350
Akacetyna	146	789	1800
Chryzyna	142	567	1430
Apigenina	218	2390	>2500
Bajkaleina	570	>2500	>2500
Luteolina	725	>2500	1000
Skutelaryna	>2500	>2500	>2500
Hesperetyna	1690	>2500	2250
Narigenina	1235	>2500	>2500
Biochanina A	455	1790	>2500
Genisteina	712	1240	1790
Floretyna	99,8	2793	>2500
EGCG	>2500	>2500	>2500
Pelargonidyna	970	1530	1820
Sangwinaryna	>2500	549	200
Kwas ursolowy	1800	1560	678

Tab. 5.10. Wartości inhibicji związków syntetycznych wobec TyrRS *S. aureus*, *P. aeruginosa* oraz *S. scrofa domestica* w mieszaninie białek.

Nr związku	<i>S. aureus</i> (IC_{50})	<i>P. aeruginosa</i> (IC_{50})	<i>S. scrofa domestica</i> (IC_{50})
90	97	675	2100
89	75	987	>2500
86	342	1200	1800
82	321	1780	2340
71	615	2111	>2500
81	2100	>2500	>2500
76	1750	>2500	>2500
84	576	>2500	1720
184	709	1980	638
185	1450	>2500	431

Znaczące różnice w aktywności flawonoidów jako inhibitorów TyrRS pomiędzy bakteriami a *S. scrofa domestica*, wynikają z zasadniczych różnic w architekturze miejsca aktywnego w przypadku prokariota i eukariota. Porównanie struktury przestrzennej (Rys. 5.29) oraz

sekwencji (*ang. alignment*) TyrRS *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* wskazuje na dużą zachowawczość reszt aminokwasowych zaangażowanych w oddziaływanie z tyrozyną i ATP. Natomiast w sekwencji ludzkiej TyrRS występuje kilka znaczących rozbieżności, co przekłada się na różnice w geometrii miejsca wiązania widoczne na Rys. 5.25 i nie pozostając bez wpływu na oddziaływanie w miejscu aktywnym (Rys. 5.30).



Rys. 5.29. Porównanie struktur przestrzennych domeny katalitycznej TyrRS z bakterii (biała) i człowieka (niebieska). Kolorem czerwonym zaznaczono tyrozinę.

Na podstawie kompleksu TyrRS – fisetyna [171] oraz modelowania stwierdzono, że pomiędzy grupą 5-OH cząsteczki flawonoidu a Tyr37, Gln195 oraz Ile196 *E. coli* (Leu i Val w przypadku *P. aeruginosa* i *S. aureus*) tworzy się wiązanie wodorowe. W sekwencji białkowej enzymu ludzkiego alifatyczna Ile196 zastąpiona jest przez polarną Thr219 a liniowa Gln195 przez cykliczną Pro216. Obecność tej ostatniej wprowadza duże ograniczenia konformacyjne (podobna zależność występuje w przypadku grupy 7-OH) [Tab. 5.11].

Polarna, hydrofilowa His51 *E. coli* wiążąca grupę 4'-OCH₃, której odpowiednikami są His55 i His50 u *P. aeruginosa* i *S. aureus* u człowieka zastąpiona jest przez aromatyczną i hydrofobową – Tyr52.

W wiązaniu tlenu z grupy OH w pozycji 1 pierścienia C flawonoidów bierze udział Gln179 (Gln178 *P. aeruginosa* i Gln175 *S. aureus*). W przypadku enzymu *H. sapiens* w pozycji tej znajduje się cykliczna Pro200. Natomiast odpowiednikiem polarnej i hydrofobowej Cys38 jest aromatyczny Trp40. Aromatyczne aminokwasy (Trp40 oraz Tyr219) w eukariotycznym enzymie odpowiadają zaangażowanym w wiązanie tlenu w pozycji 4 pierścienia C resztom Cys38 i Gly198 u bakterii (Gly197 *P. aeruginosa* i Gly 193 *S. aureus*) [Tab. 5.11]. Obserwowane różnice w sekwencji pomiędzy enzymem eukariotycznym i prokariotycznymi, są (prawdopodobnie na skutek niemożności dopasowania się inhibitora do kieszeni katalitycznej) odpowiedzialne za słabe lub brak wiązania inhibitora do TyrRS z *H. sapiens*, czego konsekwencją jest brak hamowania jej aktywności przez te związki i możliwość wykorzystania ich w zapobieganiu zakażeniom jak również potencjalnej terapii.

Tab. 5.11 Aminokwasy zaangażowane w wiązanie flawonoidów w TyrRS *E. coli*, *P. aeruginosa*. Kolory wg diagramu Venn'a (Rys. 5.31).

	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>H. sapiens</i>
Pierścień A				
5-OH	Tyr37	Tyr41	Tyr36	Tyr39
5-OH	Gln195	Gln194	Gln190	Pro216
5-OH	Ile196	Leu196	Val191	Thr219
7-OH	Tyr37	Tyr41	Tyr36	Tyr39
7-OH	Gln195	Gln194	Gln190	Pro216
Pierścień B				
4'-OCH ₃	His51	His55	His50	Tyr52
Pierścień C				
1O	Gln179	Gln178	Gln175	Pro200
1O	Gly39	Gly41	Gly36	Gly39
1O	Cys38	Leu42	Cys37	Trp40
3-OH	Gly198	Gly197	Gly193	Ser221
4=O	Cys38	Leu42	Cys37	Trp40
4=O	Ile196	Leu196	Val191	Tyr219
4=O	Gly198	Gly197	Gly193	Ser221

Bajkaleina	230	240	280
Luteolina	180	50	350
Skutelaryna	NA	NA	NA
Hesperetyna	210	250	420
Narigenina	260	130	480
Biochanina A	90	60	130
Genisteina	155	150	210
Floretyna	NA	NA	NA
EGCG	425	90	420
Pelargonidyna	80	90	190
Sangwinaryna	158	6	480
Kwas ursolowy	250	60	8

5.5. Oznaczenie cytotoksyczności i hamowania proliferacji linii komórkowych przez badane związki niskocząsteczkowe

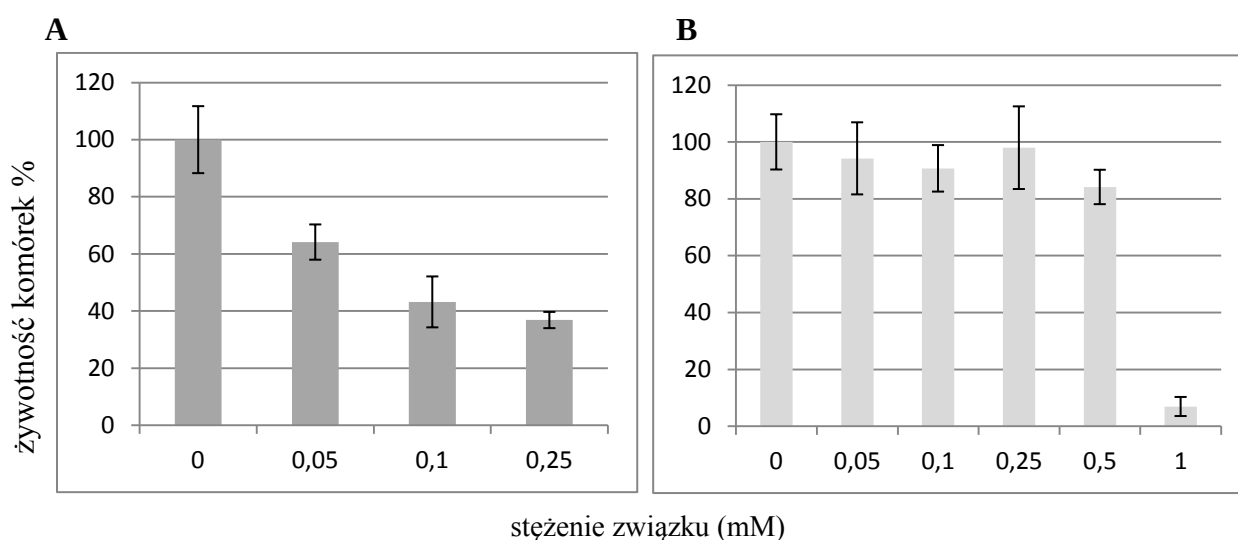
Cytotoksyczność badanych związków i ich wpływ na proliferację komórek eukariotycznych oceniono stosując metodę polegającą na kolorymetrycznym oznaczeniu stężenia formazanu powstającego w wyniku rozkładu tetrazolu (MTT) redukowanego w żywych komórkach przez mitochondrialną dehydrogenazę bursztynianową. Wyniki wyrażone są w procentach w odniesieniu do kontroli pozytywnej (komórki nietraktowane badanym związkiem) i odzwierciedlają aktywność metaboliczną i żywotność komórek (Rys. 5.32). Analiza cytotoksyczności względem komórek linii HEK293T wykazała, że testowane związki cechują się umiarkowaną cytotoksycznością, a wpływ flawonoidów na żywotność i proliferację komórek widoczny jest dopiero w stężeniu 10 – 100 μM . Najwyższą cytotoksyczność w stosunku do komórek HEK293T wykazywały alkaloidy: sangwinaryna i kwas ursolowy (ok. 2,5 $\mu\text{g/ml}$) [Tab. 5.13].

Tab. 5.13. Wartości IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$] wyznaczone w teście MTT oraz indeks terapeutyczny (IVTI) *in vitro* dla *E. coli*, *S. aureus* i *P. aeruginosa*.

TI – stosunek stężenia związku wywołujący 50% zahamowanie proliferacji komórek do stężenia wywołującego 50% zahamowanie wzrostu bakterii.

	HEK293T	Indeks terapeutyczny		
	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	IVTI (<i>E. coli</i>)	IVTI (<i>S. aureus</i>)	IVTI (<i>P. aeruginosa</i>)
Kemferyd	50	0,625	1,67	0,98
Galangina	35,7	0,127	0,476	-
Kemferol	35	-	-	0,194
Kwercetyna	80	1,6	0,46	0,8
Akacetyna	72,4	0,48	1,39	0,57
Chryzyna	33,9	0,12	0,14	0,12
Apigenina	46	-	0,368	-
Bajkaleina	30	0,132	0,125	0,107

Luteolina	2,4	0,013	0,048	0,007
Skutelaryna	543	-	-	-
Hesperetyna	65	0,31	0,26	0,155
Narigenina	56	0,215	0,43	0,117
Biochanina A	98	1,09	1,63	0,75
Genisteina	39,7	0,256	0,26	0,19
Floretyna	153,4	-	-	-
EGCG	62	0,15	0,7	0,15
Pelargonidyna	778	9,725	8,64	4,09
Sangwinaryna	9	0,057	1,5	0,019
Kwas ursolowy	9	0,036	0,15	1,125



Rys. 5.32. Cytotoksyczność kwercetyny (A) i pelargonidyny (B) względem komórek HEK293T.

Chociaż cytotoksyczność badanych związków wobec eukariotycznych komórek HEK293T jest zbliżona do ich potencjału antybakteryjnego, to indeks terapeutyczny kemferydu, akacetyny, biochaniny A, pelargonidyny i sangwinaryny w przypadku *S. aureus* oraz kemferydu, kwercetyny i pelargonidyny dla *E. coli* oraz *P. aeruginosa* jest większy niż 1. Na podstawie powyższych wyników można wnioskować, że najlepszym kandydatem na antybakteryjny inhibitor TyrRS jest pelargonidyna: K_i dla rekombinowanego enzymu TyrRS *E. coli* wynosi 169 $\mu\text{g/ml}$ a MIC_{50} 80 $\mu\text{g/ml}$, podczas gdy IC_{50} dla HEK293T to 210,8 $\mu\text{g/ml}$. Indeks terapeutyczny osiąga 9,7, co oznacza, że pelargonidyna może być bezpiecznym i skutecznym związkiem przeciwbakteryjnym. Analizując otrzymane wyniki można zauważyć, że różnorodne położenie podstawników w cząsteczce flawonoidu nadaje jej odmienne właściwości chemiczne i fizyczne, co przekłada się na indywidualny metabolizm danego związku i jego aktywność biologiczną. Różnice w budowie mogą mieć również wpływ na niejednorodny mechanizm pobierania i transportu polifenoli przez błonę komórkową. Obecnie postuluje się, że w transporcie biorą udział zarówno pompy ATP - zależne jak niezależne od ATP transportery np. bilitranslokaza, działająca na zasadzie uniportu, która katalizuje transport elektrogeniczny BSP, będącego strukturalnym mimetykiem flawonoidów. W

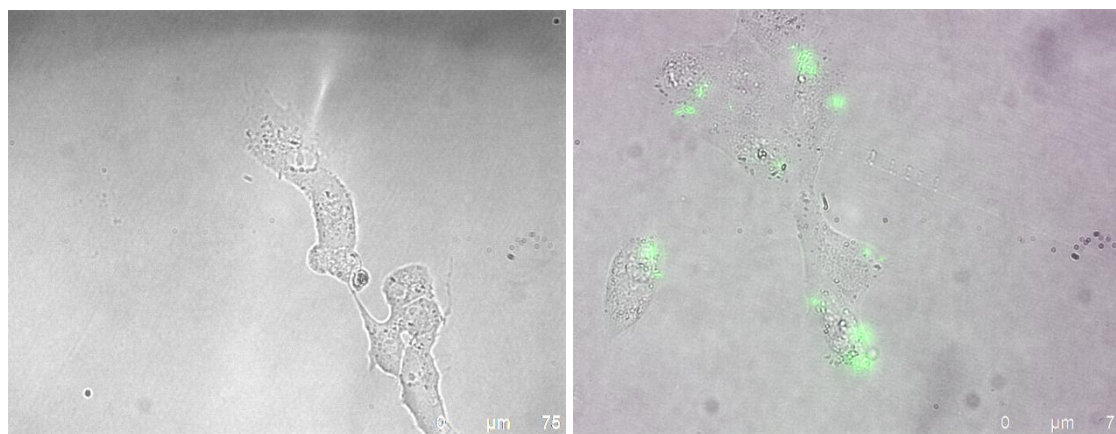
przypadku bakterii zakłada się transport aktywny przez błonę komórkową przez systemy zależne od tlenu [202].

5.6. Badanie wpływu wybranych inhibitorów na inwazyjność *E. coli* wobec komórek VERO

W celu zbadania wpływu badanych inhibitorów na leczenie bądź zapobieganie zakażeniu komórek ludzkich bakteriami patogennymi badano wzrost komórek VERO infekowanych inwazyjnym szczepem *E. coli*, w obecności badanych inhibitorów. Aby otrzymać inwazyjny szczep *E. coli* wprowadzono do niego plazmid pGB2 Ω inv/hly. Plazmid ten zawiera gen kodujący inwazyję – białko z *Yersinia pseudotuberculosis* umożliwiające wnikanie bakterii do komórek eukariotycznych zawierających w błonie komórkowej β - integryny. Obserwację wnikania komórek bakteryjnych do komórek eukariotycznych umożliwiło eksprymowane przez nie białko zielonej fluorescencji kodowane przez gen znajdujący się na plazmidzie pAT505.

Tak otrzymane inwazyjne bakterie *E. coli* w stężeniach $2,5 \times 10^7$ /ml dodane zostały do komórek VERO w pożywce EMEM zawierającej badany inhibitor w stężeniach 0 – 0,5mM i inkubowane przez 2 - 4h w 37°C. Ilość bakterii, które wniknęły do komórek VERO oceniono na podstawie obserwacji fluorescencji białka GFP przy użyciu mikroskopu optycznego umożliwiającego obserwację fluorescencji.

Spośród przebadanych związków [Tab. 5.4] akacetyna i biochanina A wykazywały właściwości bakteriobójcze w stężeniu 100 μ M natomiast kemferol oraz pelargonidyna w stężeniu 500 μ M (Rys. 5.33). W przypadku biochaniny A oraz pelargonidyny widoczne jednak były zdecydowane zmiany w morfologii i liczbie komórek VERO. Wyniki wskazują, iż ww. związki skutecznie chroniły eukariotyczne komórki VERO przed inwazją patogenu.



Rys. 5.33. Komórki VERO zainfekowane inwazyjnym szczepem *E. coli* (plazmid pGB2 Ω inv/hly) produkujące białko zielonej fluorescencji (plazmid pAT505): A: W obecności 100 μ M akacetyny; B: Kontrola bez akacetyny

6. Podsumowanie

Celem pracy było znalezienie nowych inhibitorów bakteryjnej syntetazy tyrozylo - tRNA. Znacząca większość związków wykazujących właściwości hamujące to związki naturalne, głównie flawonoidy.

W ramach realizowanej pracy badawczej:

1. Wyznaczono wartości IC_{50} wobec TyrRS prokariota dla wszystkich badanych związków niskocząsteczkowych oraz wyznaczono wartości stałej inhibicji (K_i) oraz określono typ inhibicji badanych związków niskocząsteczkowych wobec TyrRS prokariota dla inhibitorów naturalnych o $IC_{50} < 200 \mu M$. Wśród związków naturalnych najsilniejszymi inhibitorami są: akacetyna K_i : $5,12 \times 10^{-6} M$, EGCG K_i : $7,5 \times 10^{-6} M$ oraz kemferyd K_i : $9,1 \times 10^{-6} M$. Wśród związków syntetycznych najbardziej aktywnymi związkami okazały się analogi aminoacyloadenyłanu. Kwas 2 - (4 - amino - 2 - (benzyloksykarbonylamino) - 4-oksobutanamido) - 3 - (4 - hydroksyfenylo) propionowy charakteryzował się wartością IC_{50} : $14,98 \mu M$.
2. Sprawdzone wpływ wyselekcjonowanych inhibitorów na aktywność eukariotycznej TyrRS. Żaden ze związków polifenolowych nie hamował aktywności TyrRS w stężeniu mniejszym niż 1 mM. Jedynie sangwinaryna, kwas ursolowy oraz związki nr 184 i 185 hamowały TyrRS eukariotyczną na podobnym poziomie jak prokariotyczną.
3. Oceniono cytotoksyczność wybranych związków na linii komórkowej HEK293T. Testowane związki naturalne wykazywały umiarkowaną cytotoksyczność w stężeniach 10 – 100 μM
4. Wyznaczono wartość MIC_{50} wybranych związków dla *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*. Najbardziej aktywnymi związkami okazały się: kemferyd, akacetyna, biochanina A oraz pelargonidyna.
5. Zbadano wpływ wybranych inhibitorów na żywotność komórek VERO zakażonych inwazyjnym, wnikającym do komórek szczepem *E. coli*. Ponownie, akacetyna oraz pelargonidyna wykazywały właściwości bakteriobójcze w stężeniu 100 μM .

7. Literatura

- [1] Tao J., Wendler P., Connely G., Lim A., Zhang J., King M., Li T., Silverman J.A., Schimmel P.R., and Tally F.P., Drug target validation: lethal infection blocked by inducible peptide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97 (2000) 783-786.
- [2] Eitner K., Gaweda T., Hoffmann M., Jura M., Rychlewski L., and Barciszewski J., eHiTS-to-VMD interface application. The search for tyrosine-tRNA ligase inhibitors, *J Chem Inf Model.*, 47 (20107) 695-702.
- [3] Bonnefond L., Giege R., and Rudinger-Thirion J., Evolution of the tRNA^{Tyr}/TyrRS aminoacylation systems, *Biochimie*, 87 (2005) 873-883.
- [4] Nureki O., Nakama T., Yokoyama S., and Nureki O., Structural basis for the recognition of isoleucyl-adenylate and an antibiotic, mupirocin, by isoleucyl-tRNA synthetase, *J. Biol. Chem.*, 276 (2001) 47387-47393.
- [5] Lv P.C. and Zhu H.L., Aminoacyl-tRNA Synthetase Inhibitors As Potent Antibacterials, *Curr Med Chem.*, 19 (2012) 3550-3563.
- [6] Hoagland M.B., Stephenson M.L., Scott J.F., Hecht L.I., and Zamecnik P.C., A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis, *J. Biol. Chem.*, 231 (1958) 241-257.
- [7] Henderson B.C. and Schimmel P., RNA-RNA interactions between oligonucleotide substrates for aminoacylation, *Bioorg. Med. Chem.*, 5 (1997) 1071-1079.
- [8] Schimmel P. and Ribas de Pouplana L., Transfer RNA: from minihelix to genetic code, *Cell*, 81 (2012) 983-986.
- [9] Safo M.G. and Moor N.A., Codases: 50 years after, *Molecular Biology*, (2009) 211-222.
- [10] Guo M., Yang X.L., and Schimmel P., New functions of aminoacyl-tRNA synthetases beyond translation. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 11 (2010) 668-674.
- [11] Schimmel P.R., Development of tRNA synthetases and connection to genetic code and disease, *Protein Sci.*, 17 (2008) 1643-1652.
- [12] Eriani G., Delaure M., Poch O., Gangloff J., and Moras D., Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs, *Nature*, 69 (1990) 203-206.
- [13] Ruff M., Krishnaswamy S., Boeglin M., Poterszman A., Mitschler A., Podjarny A., Rees B., Thierry J.C., and Moras D., Class II aminoacyl transfer RNA synthetases: crystal structure of yeast aspartyl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Asp), *Science*, 252 (1991) 1682-1689.
- [14] Doolittle R.F. and Handy J., Evolutionary anomalies among the aminoacyl-tRNA synthetases, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 8 (1998) 630-636.

- [15] Yannay-Cohen N and Razin E., Translation and transcription: the dual function of LysRS in mast cells, *Mol. Cells*, 22 (2006) 127-132.
- [16] Kim S., Lee S.W., Choi E.C., and Choi S.Y., Aminoacyl-tRNA synthetases and their inhibitors as a novel family of antibiotics, *Appl Microbiol Biotechnol*, 61 (2003) 278-288.
- [17] Cavarelli J., Rees B, Ruff M., Thierry J.C., and Moras D., Yeast tRNA(Asp) recognition by its cognate class II aminoacyl-tRNA synthetase, *Nature*, 11 (1993) 181-184.
- [18] Biou V., Yaremchuk A., Tukalo M., and Cusack S., The 2.9 Å crystal structure of *T. thermophilus* seryl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Ser), *Science*, 263 (1994) 1404-1420.
- [19] Mosyak L., Reshetnikova L., Goldgur Y., Delarue M., and Safro M.G., Structure of phenylalanyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus*, *Nat. Struct. Biol.*, 2 (1995) 537-547.
- [20] Carter C.W.Jr., Cognition, mechanism, and evolutionary relationships in aminoacyl-tRNA synthetases, *Annu. Rev. Biochem.*, 62, 715-748. (1993) 715-748.
- [21] Schimmel P.R. and Soll D., Aminoacyl-tRNA synthetases: general features and recognition of transfer RNAs, *Annu. Rev. Biochem.*, 48 (1979) 601-648.
- [22] Fersht A.R., Dissection of the structure and activity of the tyrosyl-tRNA synthetase by site-directed mutagenesis, *Biochemistry*, 26 (1987) 8031-8037.
- [23] Sekine S., Nureki O., Dubois D.Y., Bernier S., Chenevert R., Lapointe J., Vassilyev G., and Yokoyama S., ATP binding by glutamyl-tRNA synthetase is switched to the productive mode by tRNA binding, *EMBO J.*, 22 (2003) 688.
- [24] Belrhali H., Yaremchuk A., and Tukalo M., The structural basis for seryl-adenylate and Ap4A synthesis by seryl-tRNA synthetase, *Structure*, 15 (1995) 341-352.
- [25] Hurdle J.G., O'Neill A.J., and Chopra I., Prospects for Aminoacyl-tRNA Synthetase Inhibitors as New Antimicrobial Agents, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49 (2005) 4821-4833.
- [26] Sheppard K., Akochy P.M., Salazar J.C., and Söll D., The *Helicobacter pylori* amidotransferase GatCAB is equally efficient in glutamine-dependent transamidation of Asp-tRNA^{Asn} and Glu-tRNA^{Gln}, *J. Biol. Chem.*, 282 (2007) 11866-11873.
- [27] Ibba M., Curnow A.W., and Söll D., Aminoacyl-tRNA synthesis: divergent routes to a common goal, *Trends Biochem. Sci.*, 22 (1998) 39-42.
- [28] Ambrogelly A., Palioura S., and Söll D., Natural expansion of the genetic code, *Nat. Chem. Biol.*, 3 (2007) 29-35.
- [29] Srinivasan G., James C.M., and Krzycki J.A., Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of UAG-decoding specialized tRNA, *Science*, 296 (2002) 1459-1462.

- [30] Lapointe J., Duplain L., and Proulx M., A single glutamyl-tRNA synthetase aminoacylates tRNA^{Glu} and tRNA^{Gln} in *Bacillus subtilis* and efficiently misacylates *Escherichia coli* tRNA^{Gln1} *in vitro.*, J. Bacteriol., 165 (1986) 88-93.
- [31] Cathopoulis T., Chuawong P., and Hendrickson T.L., Novel tRNA aminoacylation mechanisms, Mol. Biosyst., 3 (2007) 408-418.
- [32] Sheppard K., Yuan J., Hohn M.J., Jester B., Devine K.M., and Söll D., From one amino acid to another: tRNA-dependent amino acid biosynthesis, Nucleic Acids Res., 36 (2008) 1813-1825.
- [33] Fukunaga R. and Yokoyama S., Structural insights into the second step of RNA-dependent cysteine biosynthesis in *Archaea*: crystal structure of Sep-tRNA: Cys-tRNA synthase from *Archaeoglobus fulgidus*, J. Mol. Biol., 370. (2007) 128-141.
- [34] Sauerwald A., Zhu W., Major T.A., Roy H, Palioura S., Jahn D., Whitman W.B., Yates J.R.3rd, Ibba M., and Söll D., RNA-dependent cysteine biosynthesis in archaea, Science, 307 (2005) 1969-1972.
- [35] Johansson L., Gafvelin G., and Arner E.S., Selenocysteine in proteins-properties and biotechnological use, Biochim. Biophys. Acta, 1726 (2005) 1-13.
- [36] Bilokapic S., Korencic D., Söll D., and Weygand-Durasevic I., The unusual methanogenic seryl-tRNA synthetase recognizes tRNA^{Ser} species from all three kingdoms of life, Eur. J. Biochem., 271 (2004) 694-702.
- [37] Böck A., Thanbichler M., Rother M., and Resch A., Selenocysteine. In: The Aminoacyl-tRNA Synthetases, in: Ibba M., Francklyn C., and Cusack S. (Eds.), Aminoacyl-tRNA synthetases, Landes Bioscience, 2005, pp. 320-327.
- [38] Yuan, ., Palioura S., Salazar J.C., Su D., O'Donoghue P., Hohn M.J., Cardoso A.M., Whitman W.B., and Söll D., RNA-dependent conversion of phosphoserine forms selenocysteine in eukaryotes and archaea, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103, (2006) 18923-18927.
- [39] Longstaff D.G., Larue R.C., Faust J.E., Mahapatra A., Zhang L., Green-Church K.B., and Krzycki J.A., A natural genetic code expansion cassette enables transmissible biosynthesis and genetic encoding of pyrrolysine , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104 (2007) 1021-1026.
- [40] Sacerdot C., Caillet J., Graffe M., Eyermann F., Ehresmann B., Ehresmann C., Springer M., and Romby P., The *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase gene contains a split ribosomal binding site interrupted by a hairpin structure that is essential for autoregulation, Mol. Microbiol., 29, (1998) 1077-1090.
- [41] Caprara M.G., Lehnert V., Lambowitz A.M., and Westhof E., A tyrosyl-tRNA synthetase recognizes a conserved tRNA-like structural motif in the group I intron catalytic core, Cell, 87 (1996) 1135-1145.
- [42] Houman F., Rho S.B., Zhang J., Shen X., Wang C.C., Schimmel P., and Martinis S.A., A prokaryote and human tRNA synthetase provide an essential RNA splicing function in yeast mitochondria, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97 (2000) 13743-13748.

- [43] Kisselev L.L., Justesen J., Wolfson A.D., and Frolova L.Y., Diadenosine oligophosphates (Ap(n)A), a novel class of signalling molecules?, FEBS Lett., 427 (1998) 157-163.
- [44] Jahn D., Verkamp E., and Söll D., Glutamyl-transfer RNA: a precursor of heme and chlorophyl biosynthesis, Trends Biochem Sci., 17 (1992) 215-218.
- [45] Sissler M., Delorme C., Bond J., Ehrlich S.D., Renault P., and Francklyn C., An aminoacyl-tRNA synthetase paralog with a catalytic role in histidine biosynthesis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96 (1999) 8985-8990.
- [46] Haenni A.L. and Chapeville F., An enigma: the role of viral RNA aminoacylation, Acta Biochim. Pol., 44 (1997) 827-837.
- [47] Tas M.P. and Murray J.C., Endothelial-monocyte-activating polypeptide II, Int. J. Biochem. Cell Biol., 28 (1996) 837-841.
- [48] Wakasugi K., Slike B.M., Hood J., Otani A., Ewalt K.L., Friedlander M., Cheresch D.A., and Schimmel P., A human aminoacyl-tRNA synthetase as a regulator of angiogenesis., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 8 (2002) 173-177.
- [49] Uwer U., Willmitzer L, and Altmann T., A human aminoacyl-tRNA synthetase as a regulator of angiogenesis , Plant Cell, 10 (1998) 1277-1294.
- [50] Schimmel P., Tao J., and Hill J., Aminoacyl tRNA synthetases as targets for new anti-infectives , FASEB J., 12 (1998) 1599-1609.
- [51] Lincecum T.L, Tukalo M., Yaremchuk A., Mursinna R.S., Williams A.M., Sproat B.S., Van Den E.W., Link A., Van Calenbergh S., Grotli M., Maritinis S.A., and Cusack S., Structural and mechanistic basis of pre- and posttransfer editing by leucyl-tRNA synthetase, Mol. Cell, 11 (2003) 951-963.
- [52] RajBhandary U.L. and Söll D., Aminoacyl-tRNAs, bacterial cell envelope and antibiotics, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105 (2008) 5285-5286.
- [53] Greenwood R.C. and Gentry D.R., The effect of antibiotic treatment on the intracellular nucleotide pools of *Staphylococcus aureus*, FEMS Microbiol. Lett., 208 (2002) 203-206.
- [54] Ochsner U.A., Sun X, Jarvis T., Critchley I., and Janjic N., Aminoacyl-tRNA synthetases: essential and still promising target for new anti-infective agent, Expert Opin. Investig. Drugs, 16 (2007) 573-593.
- [55] Anacor Pharmaceuticals Inc., Anacor Pharmaceuticals Reports Second Quarter 2012 Financial Results. http://files.shareholder.com/downloads/ANCR/0x0x590653/63325336-400d-48ed-8a39-026eed94665c/ANAC_News_2012_8_9_Press_Releases.pdf . 2012. Ref Type: Internet Communication
- [56] Baker S.J., Zhang Y.K., Akama T., Lau A., Zhou H., Hernandez V., Mao W., Alley M.R., Sanders V., and Plattner J.J., Discovery of a new boron-containing antifungal agent, 5-fluoro-1,3-dihydro-1-hydroxy-2,1- benzoxaborole (AN2690), for the potential treatment of onychomycosis, J Med Chem., 49 (2006) 4447-4450.

- [57] Hasenoehrl A., Galic T., Ergovic G., Marsic N., Skerlev M., Mittendorf J., Geschke U., Schmidt A., and Schoenfeld W., In vitro activity and in vivo efficacy of icofungipen (PLD-118), a novel oral antifungal agent, against the pathogenic yeast *Candida albicans*., *Antimicrob Agents Chemother.*, 50 (2006) 3011-3018.
- [58] El Sayed A.K., Hothersall J., and Thomas C.M., Quorum-sensing-dependent regulation of biosynthesis of the polyketide antibiotic mupirocin in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586, *Microbiology*, 147 (2001) 2127-2139.
- [59] Yanagisawa T., Lee J.T., Wu H.C., and Kawakami M., Relationship of protein structure of isoleucyl-tRNA synthetase with pseudomonic acid resistance of *Escherichia coli*. A proposed mode of action of pseudomonic acid as an inhibitor of isoleucyl-tRNA synthetase. 269, *J Biol Chem.*, 269 (1994) 24304-24309.
- [60] Sutherland R., Boon R.J., Griffin K.E., Masters P.J., Slocombe B., and White A.R., Antibacterial activity of mupirocin (pseudomonic acid), a new antibiotic for topical use, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 27 (1985) 495-498.
- [61] Hurdle J.G., O'Neill A.J., Ingham E., Fishwick C., and Chopra I., Analysis of mupirocin resistance and fitness in *Staphylococcus aureus* by molecular genetic and structural modeling techniques, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48 (2004) 4366-4376.
- [62] Hudson I.R.B., The efficacy of intranasal mupirocin in the prevention of staphylococcal infections-a review of recent experience, *J. Hosp. Infect.*, 27 (1994) 81-98.
- [63] Cookson B.D., The emergence of mupirocin resistance: a challenge to infection control and antibiotic prescribing practice, *J. Antimicrob. Chemother.*, 41 (1998) 18.
- [64] Deshpande L.M., Fix A.M., Pfaller M.A., and Jones R.N., Emerging elevated mupirocin resistance rates among staphylococcal isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000): correlations of results from disk diffusion, Etest and reference dilution methods, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 42 (2002) 290.
- [65] Fujimura S. and Watanabe A., Survey of high- and low-level mupirocin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 15 Japanese hospitals, *Chemotherapy*, 49 (2003) 36-38.
- [66] Gilbert J., Perry C.R., and Slocombe B., High-level mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*-evidence for 2 distinct isoleucyl-transfer RNA-synthetases, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37 (1993) 32-38.
- [67] Brown J.R., Gentry D., Becker J.A., Ingraham K., Holmes D.J., and Stanhope M.J., Horizontal transfer of drug-resistant aminoacyl-transfer-RNA synthetases of anthrax and gram-positive pathogens, *EMBO Rep.*, 4 (2003) 692-698.
- [68] Paetz W. and Nass G., Biochemical and immunological characterization of threonyl-tRNA synthetase of two borrelidin-resistant mutants of *Escherichia coli* K12, *Eur. J. Biochem.*, 35 (1973) 331.-337.
- [69] Ruan B., Bovee M.L., Sacher M., Stathopoulos C., Poralla K., Francklyn C.S., and Söll D., A unique hydrophobic cluster near the active site contributes to differences in

- borrelidin inhibition among threonyl-tRNA synthetases, *J. Biol. Chem.*, 280 (2005) 571-577.
- [70] Otoguro K., Ui H., Ishiyama M., Kobayashi M., Togashi H., Takahashi Y., Masuma R., Tanaka H., Tomoda H., Yamada H., and Omura S., In vitro and in vivo antimalarial activities of a non-glycosidic 18-membered macrolide antibiotic, borrelidin, against drug-resistant strains of *Plasmodia*., *J. Antibiot.*, 56. (2003) 727-729.
 - [71] Kawamura T., Liu D., Towle M.J., Kageyama R., Tsukahara N., and Wakabayashi T., Anti-angiogenesis effects of borrelidin are mediated through distinct pathways: threonyl-tRNA synthetase and caspases are independently involved in suppression of proliferation and induction of apoptosis in endothelial cells, *J. Antibiot.*, 56 (2003) 709-715.
 - [72] Brown M.J., Carter P.S., Fenwick A.S., Fosberry A.P., Hamprecht D.W., Hibbs M.J., Jarvest R.L., Mensah L., Milner P.H., O'Hanlon P.J., Pope A.J., Richardson C.M., West A., and Witty D.R., The antimicrobial natural product chuangxinmycin and some synthetic analogues are potent and selective inhibitors of bacterial tryptophanyl tRNA synthetase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12 (2002) 3171-3174.
 - [73] Werner R.G., Thorpe L.F., Reuter W., and Nierhaus K.H., Indolmycin inhibits prokaryotic tryptophanyl-tRNA ligase, *Eur. J. Biochem.*, 68 (1976) 1-3.
 - [74] Werner R.G., Uptake of indolmycin in Gram-positive bacteria, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 18 (1980) 858-862.
 - [75] Kanamaru T., Nakano Y., Toyoda Y., Miyagawa K.I., Tada M., Kaisho T., and Nakao M., In vitro and in vivo antibacterial activities of TAK-083, an agent for treatment of *Helicobacter pylori* infection, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45 (2001) 2455-2459.
 - [76] Werner R.G. and Reuter W., Interaction of indolmycin in the metabolism of tryptophan in rat liver., *Arzneimittelforschung*, 29 (1979) 59-63.
 - [77] Hurdle J.G., O'Neill A.J., and Chopra I., Anti-staphylococcal activity of indolmycin, a potential topical agent for control of staphylococcal infections, *J. Antimicrob. Chemother.*, 54 (2004) 549-552.
 - [78] Konrad I. and Rösenthaller R., Inhibition of phenylalanine tRNA synthetase from *Bacillus subtilis* by ochratoxin A, *FEBS Lett.*, 83 (1977) 341-347.
 - [79] Creppy E.E., Schlegel M., Rosenthaller R., and Dirheimer G., Phenylalanine prevents acute poisoning by ochratoxina in mice, *Toxicol. Lett.* (1980), 6 (1980) 77-80.
 - [80] Dirheimer G. and Creppy E.E., Mechanism of action of ochratoxin A, *IARC Sci. Publ.*, (1991) 171-186.
 - [81] Kohno T., Kohda D., Haruki M., Yokoyama S., and Miyazawa T., Nonprotein amino acid furanomycin, unlike isoleucine in chemical structure, is charged to isoleucine tRNA by isoleucyl-tRNA synthetase and incorporated into protein., *J Biol Chem.*, 265. (1990) 6931-6935.

- [82] Tanaka K., Tamaki M., and Watanabe S., Effect of furanomycin on the synthesis of isoleucyl-tRNA, *Biochim. Biophys. Acta*, 195 (1969) 244-245.
- [83] Lee J.P., Schiffer G., and Jäger V., Synthesis of L-carbafuranomycin, an unnatural analogue of the antibiotic amino acid furanomycin., *Org Lett.*, 12 (2005) 2317-2320.
- [84] Kirillov S., Vitali L.A., Goldstein B.P., Monti F., Semenov Y., Makhno V., Ripa S., Pon C.L., and Gualerzi C.O., Purpuromycin: an antibiotic inhibiting tRNA aminoacylation., *RNA*, 3 (1997) 905-913.
- [85] Rambelli F., Brigotti M., Zamboni M., Denaro M., Montanaro L., and Sperti S., Effect of the antibiotic purpuromycin on cell-free protein-synthesizing systems, *Biochem J.*, 259 (1989) 307-310.
- [86] Miyamoto Y., Machida K., Mizunuma M., Emoto Y., Sato N., Miyahara K., Hirata D., Usui T., Takahashi H., Osada H., and Miyakawa T., Identification of *Saccharomyces cerevisiae* isoleucyl-tRNA synthetase as a target of the G1-specific inhibitor Reveromycin A., *J Biol Chem.*, 277 (2002) 28810-28814.
- [87] Woo J.T., Kawatani M., Kato M., Shinki T., Yonezawa T., Kanoh N., Nakagawa H., Takami M., Lee K.H., Stern P.H., Nagai K., and Osada H., Reveromycin A, an agent for osteoporosis, inhibits bone resorption by inducing apoptosis specifically in osteoclasts, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (2006) 4729-4734.
- [88] Ogilvie A., Wiebauer K., and Kersten W., Stringent control of ribonucleic acid synthesis in *Bacillus subtilis* treated with granaticin., *Biochem J.*, 152 (1975) 517-522.
- [89] Capobianco J.O., Zakula D., Coen M.L., and Goldman R.C., Anti-Candida activity of cispentacin: the active transport by amino acid permeases and possible mechanisms of action, *Biochem Biophys Res Commun.*, 190 (1993) 1037-1044.
- [90] Ataide S.F. and Ibba M., Small molecules: big players in the evolution of protein synthesis., *ACS Chem. Biol.*, 1 (2006) 285-297.
- [91] Reader J.S., Ordoukhanian P.T., Kim J.G., de Crécy Lagard V., Hwang I., Farrand S., and Schimmel P., Major biocontrol of plant tumors targets tRNA synthetases, *Science*, 309 (2005) 1533.
- [92] Ubukata M., Osada H., and Isono K., Synthesis and biological activity of nucleoside antibiotics, ascamycin and its amino acid analogs, *Nucleic Acids Symp.*, (1985) 81-83.
- [93] Osada H. and Isono K., Mechanism of action and selective toxicity of ascamycin, a nucleoside antibiotic, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 27 (1985) 230-233.
- [94] Uramoto M., Kim C.J., Shin-Ya K., Kusakabe H., Isono K., Phillips D.R., and McCloskey J.A., Isolation and characterization of phosmidosine. A new antifungal nucleotide antibiotic, *J. Antibiotics*, 44 (1991) 375-381.
- [95] Sekine S., Okada K., Seio K., Kakeya H., Osada H., Obata T., and Sasaki T., Synthesis of chemically stabilized phosmidosine analogues and the structure-activity relationship of phosmidosine, *J. Org. Chem.*, 69 (2004) 314-326.

- [96] Benz G., Schroder T., Kurz J., Wunsche C., Karl W., Steffens G., Pfitzner J., and Schmidt D., Constitution of the deferrirform of the albomycins Delta-1, Delta-2, and epsilon, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 21 (1982) 527-528.
- [97] Stefanska A.L., Fulston M., Houge-Frydrych C.S., Jones J.J., and Warr S.R., A potent seryl tRNA synthetase inhibitor SB-217452 isolated from a *Streptomyces* species, *J. Antibiotics*, 53 (2000) 1346-1353.
- [98] Garcia-Bustos J.F., Pezzi N., and Mendez E., Structure and mode of action of microcin 7, an antibacterial peptide produced by *Escherichia coli*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 27 (1985) 791-797.
- [99] Metlitskaya A.Z., Katrukha G.S., Shashkov A.S., Zaitsev D.A., Egorov T.A., and Khmel I.A., Structure of microcin C51, a new antibiotic with a broad spectrum of activity, *FEBS Lett.*, 357 (1995) 235-238.
- [100] Brown M.J., Mensah L.M., and Doyle M.L., Rational design of femtomolar inhibitors of isoleucyl tRNA synthetase from a binding model for pseudomonic acid-A, *Biochemistry*, 39 (2000) 6011.
- [101] Forrest A.K., Jarvest R.L., Mensah L.M., O'Hanlon P.J., Pope A.J., and Sheppard R.J., Aminoalkyl adenylate and aminoacyl sulfamate intermediate analogues differing greatly in affinity for their cognate *Staphylococcus aureus* aminoacyl tRNA synthetases, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10 (2000) 1871-1874.
- [102] Bernier S., Dubois D.Y., Therrien M., Lapointe J., and Chenevert R., Synthesis of glutaminyl adenylate analogues that are inhibitors of glutaminyl-tRNA synthetase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10 (2000) 2441-2444.
- [103] Cassio D., Lemoine F., Waller J.P., Sandri E., and Boissonas R.A., Selective inhibition of aminoacyl ribonucleic acid synthetases by aminoalkyl adenylates, *Biochemistry*, 6 (1967) 827-836.
- [104] Lee J., Kim S.E., Lee J.Y., Kim S.Y., Kang S.U., Seo S.H., Chun M.W., Kang T., Choi S.Y., and Kim H.O., N-Alkoxysulfamide, N-hydroxysulfamide, and sulfamate analogues of methionyl and isoleucyl adenylates as inhibitors of methionyl-tRNA and isoleucyl-tRNA synthetases, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13 (2003) 1087-1092.
- [105] Desjardins M., Desgagnes J., Lacoste L., Yang F., Morin M.P., Lapointe J., and Chenevert R., Synthesis of inhibitors of glutamyl-tRNA synthetase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 7 (1997) 2363-2366.
- [106] Lee J., Kang M.K., Chun M.W., Jo Y.J., Kwak J.H., and Kim S., Methionine analogues as inhibitors of methionyl-tRNA synthetase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8, 8 (1998) 3511-3514.
- [107] Lee J., Kang S.U., Kim S.Y., Kim S.E., Jo Y.J., and Kim S., Vanilloid and isovanilloid analogues as inhibitors of methionyl-tRNA and isoleucyl-tRNA synthetases, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11 (2012) 965-968.
- [108] Jarvest R.L., Berge J.M., Houge-Frydrych C.S., Janson C., Mensah L.M., O'Hanlon P.J., Pope A., Saldanha A., and Qiu X., Interaction of tyrosyl aryl dipeptides with S.

- aureus* tyrosyl tRNA synthetase: inhibition and crystal structure of a complex., Bioorg. Med. Chem. Lett., 9 (1999) 2859-2862.
- [109] Szymański M., Deniziak M.A., and Barciszewski J., Aminoacyl-tRNA synthetases database, Nucleic Acids Res., 29 (2001) 288-290.
 - [110] Kim S.Y., Lee Y.S., Kang T., Kim S., and Lee J., Pharmacophore-based virtual screening: the discovery of novel methionyl-tRNA synthetase inhibitors, Bioorg. Med. Chem. Lett., 16 (2006) 4898-4907.
 - [111] Sukuru S.C., Crepin T., Milev Y., Marsh L.C., Hill J.B., Anderson R.J., Morris J.C., Rohatgi A., O'Mahony G., Grotli M., Danel F., Page M.G., Härtlein M., Cusack S., Kron M.A., and Kuhn L.A., Discovering new classes of *Brugia malayi* asparaginyl-tRNA synthetase inhibitors and relating specificity to conformational change, J. Comput. Aided Mol. Des., 20 (2006) 159-178.
 - [112] Rao V.R., Ramanjeneyulu R., Rao D.M., and Kumar C.S., Comparative modeling of class I lysyl tRNA synthetase from *Treponema pallidum*, Bioinformation, 1 (2006) 81-82.
 - [113] Ambrogelly A., Frugier M., Ibba M., Söll D., and Giege R., Transfer RNA recognition by class I lysyl-tRNA synthetase from the Lyme disease pathogen *Borrelia burgdorferi*, FEBS Lett., 579 (2005) 2629-2634.
 - [114] Austin J. and First E.A., Potassium functionally replaces the second lysine of the KMSKS signature sequence in human tyrosyl-tRNA synthetase, J. Biol. Chem. 277, 277 (2002) 20243-20248.
 - [115] Ahel D., Slade D., Mocibob M., Söll D., and Weygand-Durasevic I., Selective inhibition of divergent seryl-tRNA synthetases by serine analogues, FEBS Lett., 579 (2005) 4344-4348.
 - [116] Bernier S., Dubois D.Y., Habegger-Polomat C., Gagnon L.P., Lapointe J., and Chenevert R., Glutamylsulfamoyladenine and pyroglutamylsulfamoyladenine are competitive inhibitors of *E. coli* glutamyl-tRNA synthetase, J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 20 (2005) 61-67.
 - [117] Bernier S., Akochy P.M., Lapointe J., and Chenevert R., Synthesis and aminoacyl-tRNA synthetase inhibitory activity of aspartyl adenylate analogs, Bioorg. Med. Chem., 13 (2005) 69-75.
 - [118] Brown P., Richardson C.M., Mensah L.M., O'Hanlon P.J., Osborne N.F., Pope A.J., and Walker G., Molecular recognition of tyrosinyl adenylate analogues by prokaryotic tyrosyl tRNA synthetases, Bioorg. Med. Chem., (1999) 2473-2485.
 - [119] Lee J., Kang S.U., Kim S.Y., Kim S.E., Kang M.K., Jo Y.J., and Kim S., Ester and hydroxamate analogues of methionyl and isoleucyl adenylates as inhibitors of methionyl-tRNA and isoleucyl-tRNA synthetases, Bioorg Med Chem Lett., 11 (2001) 961-964.
 - [120] Santi D.V., Cunnion S.O., Anderson R.T., and Webster R.W., *In vivo* inhibitors of *Escherichia coli* phenylalanyl-tRNA synthetase, J. Med. Chem., 22 (1979) 1260-1263.

- [121] Vaughan M.D., Sampson P.B., Daub E., and Honek J.F., Investigation of bioisosteric effects on the interaction of substrates/inhibitors with the methionyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*, *Med. Chem.*, 1 (2005) 227-237.
- [122] Yu X.Y., Hill J.M., Yu G., Wang W., Kluge A.F., Wendler P., and Gallant P., Synthesis and structure-activity relationships of a series of novel thiazoles as inhibitors of aminoacyl-tRNA synthetases, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9 (1999) 375-380.
- [123] Finn J., Mattia K., Morytko M., Ram S., Yang Y., Wu X., Mak E., Gallant P., and Keith D., Discovery of a potent and selective series of pyrazole bacterial methionyl-tRNA synthetase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13 (2003) 2231-2234.
- [124] Yu X.Y., Finn J., Hill J.M., Wang Z.G., Keith D., Silverman J., and Oliver N., A series of spirocyclic analogues as potent inhibitors of bacterial phenylalanyl-tRNA synthetases, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14 (2004) 1339-1342.
- [125] Yu X.Y., Finn J., Hill J.M., Wang Z.G., Keith D., Silverman J., and Oliver N., A series of heterocyclic inhibitors of phenylalanyl-tRNA synthetases with antibacterial activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14 (2004) 1343-1346.
- [126] Tandon M., Coffen D.L., Gallant P., Keith D., and Ashwell M.A., Potent and selective inhibitors of bacterial methionyl tRNA synthetase derived from an oxazolone-dipeptide scaffold, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14 (2004) 1909-1911.
- [127] Yu X.Y., Hill J.M., Yu G., Yang Y., Kluge A.F., Keith D., Finn J., Gallant P., Silverman J., and Lim A., A series of quinoline analogues as potent inhibitors of *C. albicans* prolyl tRNA synthetase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11 (2001) 541-544.
- [128] Stefańska A.L., Coates N.J., Mansah L.M., Pope A.J., Ready S.J., and Warr S.R., SB-219383, a novel tyrosyl tRNA synthetase inhibitor from a *Micromonospora* sp. I. Fermentation, isolation and properties, *J. Antibiot.*, 53 (2000) 345-350.
- [129] Berge J.M., Broom N.J., Houge-Frydrych C.S., Jarvest R.L., Mensah L., McNair D.J., O'Hanlon P.J., Pope A.J., and Rittenhouse S., Synthesis and activity of analogues of SB-219383: novel potent inhibitors of bacterial tyrosyl tRNA synthetase, *J. Antibiot.*, 53 (2000) 1282-1292.
- [130] Jarvest R.L., Erskine S.G., Forrest A.K., Fosberry A.P., Hibbs M.J., Jones J.J., O'Hanlon P.J., Sheppard R.J., and Worby A., Discovery and optimisation of potent, selective, ethanolamine inhibitors of bacterial phenylalanyl tRNA synthetase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15 (2005) 2305-2309.
- [131] Jarvest R.L., Berge J.M., Brown M.J., Brown P., Elder J.S., Forrest A.K., Houge-Frydrych C.S., O'Hanlon P.J., McNair D.J., Rittenhouse S., and Sheppard R.J., Optimisation of aryl substitution leading to potent methionyl tRNA synthetase inhibitors with excellent Gram-positive antibacterial activity., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13 (2003) 665-668.
- [132] Jarvest R.L., Armstrong S.A., Berge J.M., Brown P., Elder J.S., Broom N.J., Copley R.C., Forrest A.K., Hamprecht D.W., O'Hanlon P.J., Mitchell D.J., Rittenhouse S., and Witty D.R., Definition of the heterocyclic pharmacophore of bacterial methionyl tRNA synthetase inhibitors: potent antibacterially active non-quinolone analogues, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14 (2004) 3937-3941.

- [133] Gentry D.R., Ingraham K.A., Stanhope M.J., Rittenhouse S., Jarvest R.L., O'Hanlon P.J., Brown J.R., and Holmes D.J., Variable sensitivity to bacterial methionyl-tRNA synthetase inhibitors reveals subpopulations of *Streptococcus pneumoniae* with two distinct methionyl-tRNA synthetase genes, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47 (2003) 1784-1789.
- [134] Houge-Frydrych C.S., Gilpin M.L., Skett P.W., and Tyler J.W., SB-203207 and SB-203208, two novel isoleucyl tRNA synthetase inhibitors from a *Streptomyces* sp. II. Structure determination., *J. Antibiot.*, 53 (2000) 364-372.
- [135] Banwell M.G., Crasto C.F., Easton C.J., Forrest A.K., Karoli T., March D.R., Mensah L., Nairn M.R., O'Hanlon P.J., Oldham M.D., and Yue W., Analogues of SB-203207 as inhibitors of tRNA synthetases, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10 (2000) 2263-2266.
- [136] Crasto C.F., Forrest A.K., Karoli T., March D.R., Mensah L., O'Hanlon P.J., Nairn M.R., Oldham M.D., Yue W., Banwell M.G., and Easton C.J., Synthesis and activity of analogues of the isoleucyl tRNA synthetase inhibitor SB-203207, *Bioorg. Med. Chem.*, 11 (2003) 2687-2694.
- [137] Beyer D., Kroll H.P., Endermann R., Schiffer G., Siegel S., Bauser M., Pohlmann J., Brands M., Ziegelbauer K., Haebich D., Eymann C., and Brötz-Oesterhelt H., New class of bacterial phenylalanyl-tRNA synthetase inhibitors with high potency and broad-spectrum activity, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48 (2004) 525-532.
- [138] Jarvest R.L., Berge J.M., Berry V., Boyd H.F., Brown M.J., Elder J.S., Forrest A.K., Fosberry A.P., Gentry D.R., Hibbs M.J., Jaworski D.D., O'Hanlon P.J., Pope A.J., Rittenhouse S., Sheppard R.J., Slater-Radosti C., and Worby A., Nanomolar inhibitors of *Staphylococcus aureus* methionyl tRNA synthetase with potent antibacterial activity against gram-positive pathogens, *J. Med. Chem.*, 45 (2002) 1959-1962.
- [139] Critchley I.A., Green L.S., Young C.L., Bullard J.M., Evans R.J., Price M., Jarvis T.C., Guiles J.W., Janjic N., and Ochsner U.A., Spectrum of activity and mode of action of REP3123, a new antibiotic to treat *Clostridium difficile* infections., *J. Antimicrob. Chemother.*, 63 (2009) 954-963.
- [140] Faqi A.S., Bell S.J., Gill S., and Colagiovanni D.B., An intranasal irritation assessment of antibacterial ointment alone or in combination with mupirocin versus Bactroban Nasal in rabbits, *Regulatory Toxicol. Pharmacol.*, RTP 55 (2009) 28-32.
- [141] Rock F.L., Mao W., Yaremchuk A., Tukalo M., Crepin T., Zhou H., Zhang Y.K., Hernandez V., Akama T., Baker S.J., Plattner J.J., Shapiro L., Martinis S.A., Benkovic S.J., Cusack S., and Alley M.R., An antifungal agent inhibits an aminoacyl-tRNA synthetase by trapping tRNA in the editing site, *Science*, 316 (2007) 1759-1761.
- [142] Nare B., Wring S., Bacchi C., and et al., Discovery of novel orally bioavailable oxaborole 6-carboxamides that demonstrate cure in a murine model of late-stage central nervous system african trypanosomiasis, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54 (2010) 4379-4388.
- [143] Ziegelbauer K., Babczinski P., and Schonfeld W., Molecular mode of action of the antifungal beta-amino acid BAY 10-8888, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42 (1998) 2197-2205.

- [144] Mittendorf J., Kunisch F., Matzke M., Militzer H.C., Schmidt A., and Schonfeld W., Novel antifungal beta-amino acids: synthesis and activity against *Candida albicans*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13 (2003) 433-436.
- [145] Petraitiene R., Petraitis V., and Kelaher A.M., Efficacy, plasma pharmacokinetics, and safety of icofungipen, an inhibitor of *Candida* isoleucyl-tRNA synthetase, in treatment of experimental disseminated candidiasis in persistently neutropenic rabbits, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49 (2005) 2084-2092.
- [146] Petraitis V., Petraitiene R., and Kelaher A.M., Efficacy of PLD-118, a novel inhibitor of *Candida* Isoleucyl-tRNA synthetase, against experimental oropharyngeal and esophageal candidiasis caused by fluconazole-resistant *C. albicans*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48 (2004) 3959-3967.
- [147] Ding D., Meng Q., Gao G., Zhao Y., Wang Q., Nare B., Jacobs R., Rock F., Alley M.R., Plattner J.J., Chen G., Li D., and Zhu H., Design, synthesis, and structure-activity relationship of *Trypanosoma brucei* leucyl-tRNA synthetase inhibitors as antitrypanosomal agents, *J. Med. Chem.*, 54 (2011) 1276-1287.
- [148] Zhao Y., Wang Q., Meng Q., Ding D., Yang H., Gao G., Li D., Zhu W., and Zhu H., Identification of *Trypanosoma brucei* leucyl-tRNA synthetase inhibitors by pharmacophore- and docking-based virtual screening and synthesis, *Bioorg Med Chem.*, 20 (2012) 1240-1250.
- [149] Finn J., Stidham M., Hilgers M., and G C K., Identification of novel inhibitors of methionyl-tRNA synthetase (MetRS) by virtual screening., *Bioorg Med Chem Lett.*, 18 (2008) 3932-3937.
- [150] Wu Y., Yu K., Xu L., Chen L., Chen X., Mao J., Danchin A., Shen X., Qu D., and Jiang H., Potent and selective inhibitors of *Staphylococcus epidermidis* tryptophanyl-tRNA synthetase, *J. Antimicrob. Chemother.*, 60 (2007) 502-509.
- [151] Montgomery J.I., Toogood P.L., Hutchings K.M., Liu J., Narasimhan L., Braden T., Dermeyer M.R., Kulynych A.D., Smith Y.D., Warmus J.S., and Taylor C., Discovery and SAR of benzyl phenyl ethers as inhibitors of bacterial phenylalanyl-tRNA synthetase, *Bioorg Med Chem Lett.*, 19 (2009) 665-669.
- [152] Xiao Z.P., He X.B., Peng Z.Y., Xiong T.J., Peng J., Chen L.H., and Zhu H.L., Synthesis, structure, molecular docking, and structure-activity relationship analysis of enamines: 3-aryl-4-alkylaminofuran-2(5H)-ones as potential antibacterials, *Bioorg. Med. Chem.*, 19 (2011) 1571-1579.
- [153] Xiao Z.P., Ouyang H., Wang X.D., Lv P.C., Huang Z.J., Yu S.R., Yi T.F., Yang Y.L., and Zhu H.L., 4-alkoxy-3-arylfuran-2(5H)-ones as inhibitors of tyrosyl-tRNA synthetase: synthesis, molecular docking and antibacterial evaluation, *Bioorg Med Chem.*, 19 (2011) 3884-3891.
- [154] Xiao Z.P., Ma T.W., Liao M.L., Feng Y.T., Peng X.C., Li J.L., Li Z.P., Wu Y., Luo Q., Deng Y., Liang X., and Zhu H.L., Tyrosyl-tRNA synthetase inhibitors as antibacterial agents: synthesis, molecular docking and structure-activity relationship analysis of 3-aryl-4-arylamino-furan-2(5H)-ones., *Eur J Med Chem.*, 46 (2011) 4904-4914.

- [155] Van de Vijver P., Vondenhoff G.H., Denivelle S., Rozenski J., Verhaegen J., Van Aerschot A., and Herdewijn P., Antibacterial 5'-O-(N-dipeptidyl)-sulfamoyladenines, *Bioorg. Med. Chem.*, 17 (2009) 260-269.
- [156] Yu Z., Vodanovic-Jankovic S., Ledebor N., Huang S.X., Rajske S.R., Kron M., and Shen B., Tirandamycins from *Streptomyces* sp. 17944 inhibiting the parasite *Brugia malayi* asparagine tRNA synthetase, *Org Lett.*, 13 (2011) 2034-2037.
- [157] Starzyk R.M., Webster T.A., and Schimmel P., Evidence for dispensable sequences inserted into a nucleotide fold, *Science*, 237 (1987) 1614-1618.
- [158] Kleeman T.A., Wei K.L., and Simpson E.A., First, Human tyrosyltRNA synthetase shares amino acid sequence homology with a putative cytokine, *J. Biol. Chem.*, 272 (1997) 14420-14425.
- [159] Bonnefond L., Giegé R., and Rudinger-Thirion J., Evolution of the tRNA^{Tyr}/TyrRS aminoacylation systems, *Biochimie*, 87 (2005) 873-883.
- [160] Wolf Y.I., Aravind L., Grishin N.V., and Koonin E.V., Evolution of aminoacyl-tRNA synthetases-analysis of unique domain architectures and phylogenetic trees reveals a complex history of horizontal gene transfer events, *Genome Res.*, 9 (1999) 689-710.
- [161] Qiu X., Janson C.A., Smith W.W., Green S.M., McDevitt, P., Johanson K., and et al., Crystal structure of *Staphylococcus aureus* tyrosyl-tRNA synthetase in complex with a class of potent and specific inhibitors, *Protein Sci.*, 10 (2001) 2008-2016.
- [162] Yaremchuk A., Kriklivyi I., Tukalo M., and Cusack S., Class I tyrosyl-tRNA synthetase has a class II mode of cognate tRNA recognition, *EMBO J.*, 21 (2002) 3829-3840.
- [163] Brick P., Bhat T.N., and Blow D.M., Structure of tyrosyl-tRNA synthetase refined at 2.3Å resolution. Interaction of the enzyme with the tyrosyl adenylate intermediate, *J. Mol. Biol.*, 208 (1989) 83-98.
- [164] Odyne's K.O. and Korneliuk O., A model of three-dimensional structure of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosyl-tRNA synthetase, *Ukr Biokhim Zh.*, 80 (2008) 62-75.
- [165] Kobayashi T., Takimura T., Sekine R., Kelly V.P., Vincent K., Kamata K., Sakamoto K., Nishimura S., and Yokoyama S., Structural snapshots of the KMSKS loop rearrangement for amino acid activation by bacterial tyrosyl-tRNA synthetase, *J. Mol. Biol.*, 346 (2005) 105-117 .
- [166] Kobayashi T., Nureki O., Ishitani R., Yaremchuk A., Tukalo M., Cusack S., Sakamoto K., and Yokoyama S., Structural basis for orthogonal tRNA specificities of tyrosyl-tRNA synthetases for genetic code expansion, *Nat Struct Biol*, 10 (2003) 425-432.
- [167] Kuratani M., Sakai H., Takahashi M., Yanagisawa T., Kobayashi T., Murayama K., Chen L, Liu Z.J, Wang B.C, Kuroishi C., Kuramitsu S., Terada T., Bessho Y., Shirouzu M., Sekine S., and Yokoyama S., Crystal structures of tyrosyl-tRNA synthetases from *Archaea*, *J Mol Biol.*, 355 (2006) 395-408.

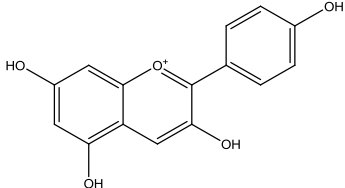
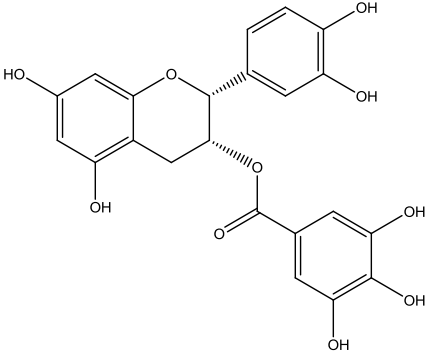
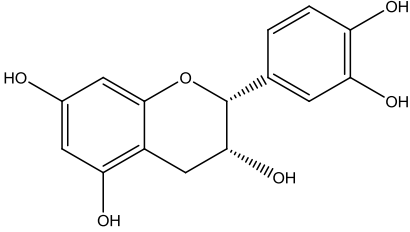
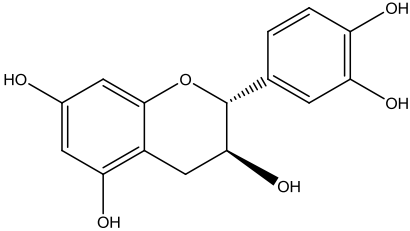
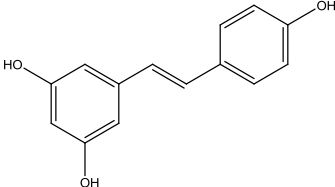
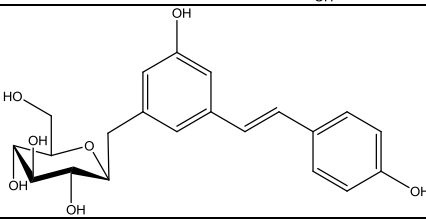
- [168] Yang X.L., Skene R.J., McRee D.E., and Schimmel P., Crystal structure of a human aminoacyl-tRNA synthetase cytosine, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 99 (2002) 15369-15374.
- [169] Tsunoda M., Kusakabe Y., Tanaka N., Ohno S., Nakamura M., Senda T., Sekine M., Yokogawa T., Nishikawa K., and Nakamura K.T., Three-dimensional structure of the ternary complex of yeast tyrosyl-tRNA synthetase, *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, (2004) 155-156.
- [170] Bhatt T.K., Khan S., Dwivedi V.P., Banday M.M., Sharma A., Chandele A., Camacho N., de Pouplana L.R., Wu Y., Craig A.G., Mikkonen A.T., Maier A.G., Yogavel M., and Sharma A., Malaria parasite tyrosyl-tRNA synthetase secretion triggers pro-inflammatory responses, *Nat Commun*, 2 (2011) 530.
- [171] Larson E.T., Kim J.E., Castaneda L.J., Napuli A.J., Zhang Z., Fan E., Zucker F.H., Verlinde C.L., Buckner F.S., Van Voorhis W.C., Hol W.G., and Merritt E.A., The double-length tyrosyl-tRNA synthetase from the eukaryote *Leishmania major* forms an intrinsically asymmetric pseudo-dimer., *J. Mol. Biol.*, 409 (2011) 159-176 .
- [172] Austin J. and First E.A, Comparison of the catalytic roles played by the KMSKS motif in the human and *Bacillus stearothermophilus* tyrosyl-tRNA synthetases, . *J. Biol. Chem.*, 277 (2002) 28394-28399.
- [173] Fersht A.R., Knill-Jones J.W., Bedouelle H., and Winter G., Reconstruction by site-directed mutagenesis of the transition state for the activation of tyrosine by the tyrosyl-tRNA synthetase: a mobile loop envelopes the transition state in an induced-fit mechanism, *Biochemistry*, 27 (1988) 1581-1587.
- [174] First E.A and Fersht A.R., Mutational and kinetic analysis of a mobile loop in tyrosyl-tRNA synthetase, *Biochemistry*, 32 (1993) 13658-13663.
- [175] First E.A and Fersht A.R., Involvement of threonine 234 in catalysis of tyrosyl adenylate formation by tyrosyl-tRNA synthetase, *Biochemistry*, 32 (1993) 13644-13650.
- [176] First E.A and Fersht A.R., Mutation of lysine 233 to alanine introduces positive cooperativity into tyrosyl-tRNA synthetase, *Biochemistry*, 32 (1993) 13651-13657.
- [177] First E.A and Fersht A.R., Analysis of the role of the KMSKS loop in the catalytic mechanism of the tyrosyl-tRNA synthetase using multimutant cycles, *Biochemistry*, 34 (1995) 5030-5043.
- [178] Yang X.L., Otero F.J., Skene R.J., McRee D.E., Schimmel P., and Ribas de Pouplana L., Crystal structures that suggest late development of genetic code components for differentiating aromatic side chains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 (2003) 15376-15380.
- [179] Quinn C.L., Tao N., and Schimmel P.R., Species-specific microhelix aminoacylation by a eukaryote pathogen tRNA synthetase dependent on a single base pair, *Biochemistry*, 34 (1995) 12489-12495.

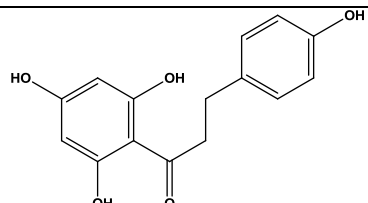
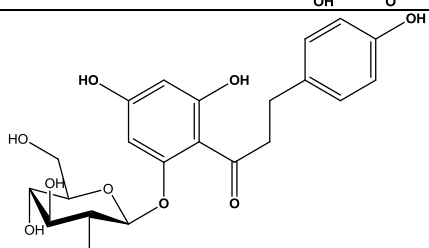
- [180] Trott O. and Olson A.J., AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *J. Comput Chem*, 31 (2010) 455-461.
- [181] Digweed M., Pieler T., and Erdmann V.A., RNA sequencing, *Advanced Methods in Protein Microsequence Analysis*, Springer-Verlag Heidelberg, (1986).
- [182] Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., and E. Struhl K., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York., Vol. 1 (1994) pp. 4.7.1-4.7.6.
- [183] Xavier C.P.R., Lima C.F., Rohde M., and Pereira-Wilson C., Quercetin enhances 5-fluororacil-induced apoptosis in MSI colorectal cancer cells through p53 modulation, *Cancer Chemother Pharmacol*, 68 (2011) 1449-1457.
- [184] Lineweaver H. and Burk D., The determination of enzyme dissociation constants, *J. Amer. Chem. Soc.*, 56 (1934) 658-666.
- [185] Eisenthal R and Cornish-Bowden A., The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters, *Biochem J.*, 139 (1974) 715-720.
- [186] Levy S.B., Oporność na antybiotyki - wyzwanie końca XX wieku, *Świat Nauki*, 5 (1998) 32-34.
- [187] Panlilio A.L., Culver D.H., Gaynes R.P., Banerjee S., Hendreson T.S., Tolson J.S., and Martone W.J., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975-1991, *Infect Control Hosp Epidemiol.*, 13 (1992) 582-586.
- [188] Lockhart S.R., Abramson M.A., Beekmann S.E., Gallagher G., Riedel S., Diekema D.J., Quinn J.P., and Doern G.V., Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004, *J Clin Microbiol.*, 45 (2007) 3359.
- [189] Xu K.D., McFeters G.A., and Stewart P.S., Biofilm resistance to antimicrobial agents., *Microbiology*, 146 (2000) 547-549.
- [190] Hancock R.E., Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens., *Lancet Infect Dis.*, 5 (2005) 209-218.
- [191] Wilcox M.H., Update on linezolid: the first oxazolidinone antibiotic., *Expert Opin Pharmacother.*, 6 (2005) 2315-2326.
- [192] Mądry K., Nowe antybiotyki, *Współcz Onkol*, 8 (2004) 52-57.
- [193] Cochereau C., Sanchez D., Bourhaoui A., and Creppy E.E., Capsaicin, a structural analog of tyrosine, inhibits the aminoacylation of tRNA(Tyr), *Toxicol Appl Pharmacol.*, 141 (1996) 133-137.
- [194] Zwierzyński T., Joachimiak A., Barciszewska M., Kulińska K., and Barciszewski J., Interaction of alkaloids with plant transfer ribonucleic acids. Effect of sparteine on lupin arginyl-tRNA formation, *Chem Biol Interact.*, 42 (1982) 107-116.

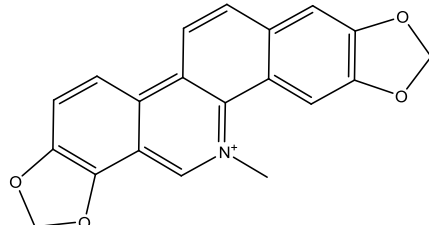
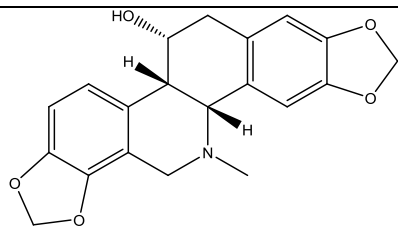
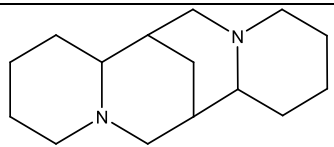
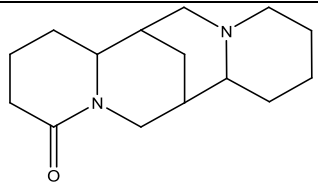
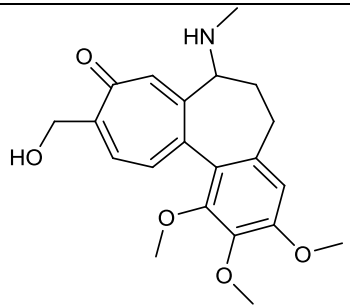
- [195] Bedouelle H., Guez V., Vidal-Cros A., and Hermann M., Overproduction of tyrosyl-tRNA synthetase is toxic to *E.coli*: a genetic analysis, *J Bacteriol.*, 172 (1990) 3940-3945.
- [196] Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72 (1976) 248-254.
- [197] http://brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=6.1.1.1.2012. Ref Type: Internet Communication
- [198] Dixon M., The determination of enzyme inhibitor constants, *Biochem J.*, 55 (1972) 170-171.
- [199] Fang M.Z., Wang Y., Ai N., Hou Z., Sun Y., Lu H.Welsh W., and Yang C.S., Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines, *Cancer Res.*, 63 (2003) 7563-7570.
- [200] Copeland R.A., *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis* [Hardcover], 2000.
- [201] Wells T.N., Ho C.K., and Fersht A.R., Free energy of hydrolysis of tyrosyl adenylate and its binding to wild-type and engineered mutant tyrosyl-tRNA synthetases, *Biochemistry*, 25 (1986) 6603-6608.
- [202] Passamont S., Terdoslavich M., Franca R., Vanzo A., Tramer F., Braidot E., Petrusa E., and Vianello A., Bioavailability of Flavonoids: A Review of Their Membrane Transport and the Function of Bilirubin Translocase in Animal and Plant Organisms, *Curr Drug Metab*, 10 (2009) 369-394.

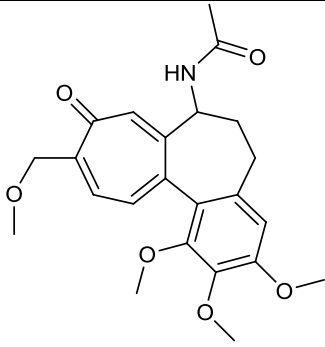
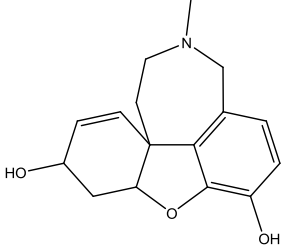
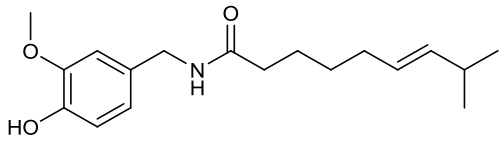
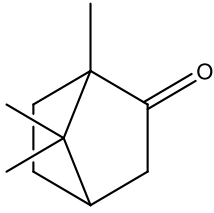
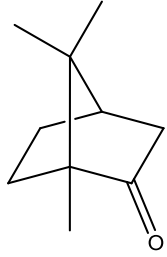
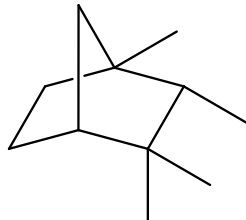
Załącznik

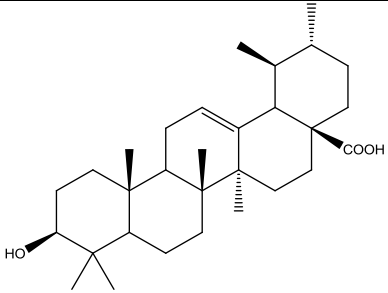
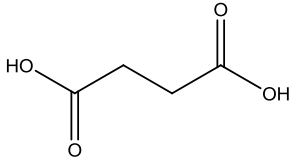
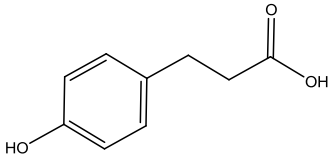
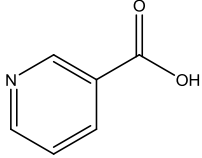
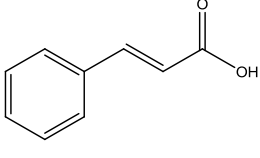
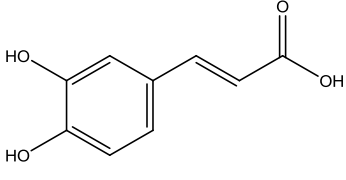
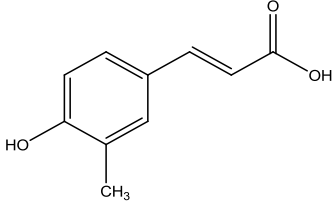
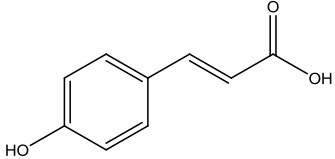
Izoflawony		
1.	Daidzeina	
2.	Genisteina	
3.	Biochinina A	
Flawanonole		
4.	Taksyfolina	
5.	Sylibinina	
6.	Naringina	
Flawanony		
7.	Naringenina	
8.	Hesperetyna	

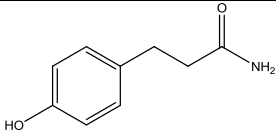
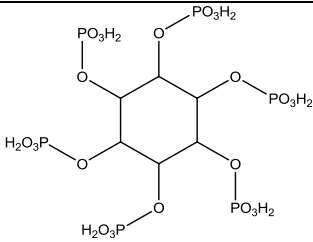
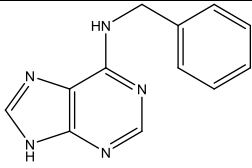
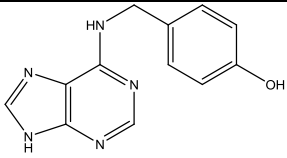
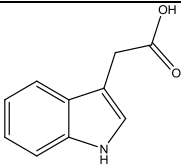
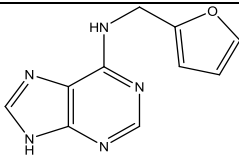
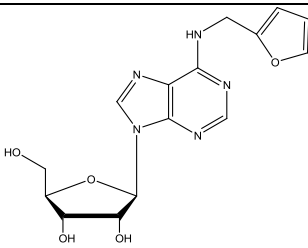
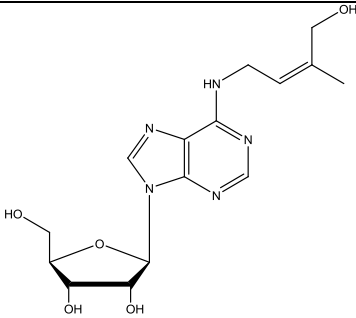
Antocyjanidyny		
9.	Pelargonidyna	
Katechiny		
10.	EGCG	
11.	Epigalokatechina	
12.	Katechina	
Stilbeny		
13.	Rezweratrol	
14.	Polidatyna	
Chalkony		

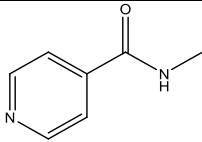
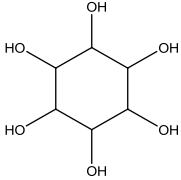
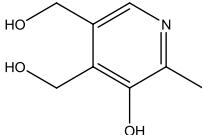
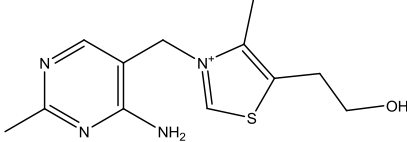
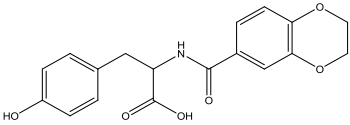
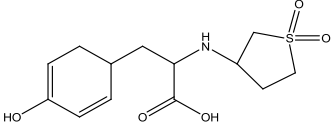
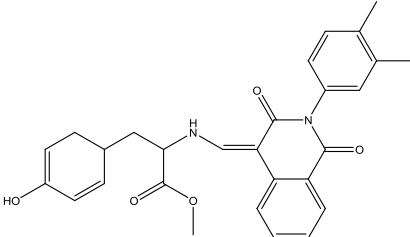
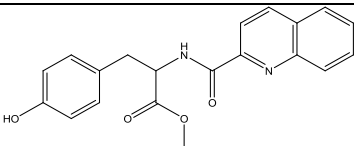
15.	Floretyna	
16.	Florydzyna	

Alkaloidy		
17.	Sangwinaryna	
18.	Chelidonina	
19.	Sparteina	
20.	Lupanina	
21.	Kolchamina	

22.	Kolchicyna	
23.	Sanguinina	
24.	Kapsaicyna	
Terpeny		
25.	Kamfora	
26.	Izoborneol	
27.	Fenchol	

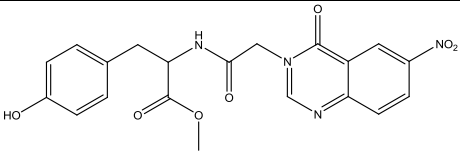
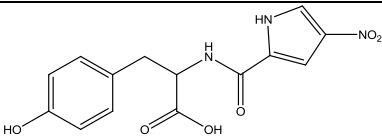
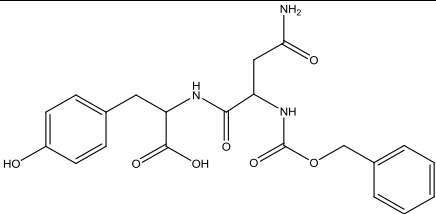
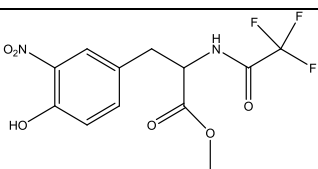
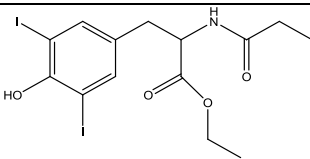
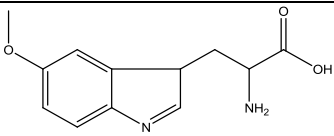
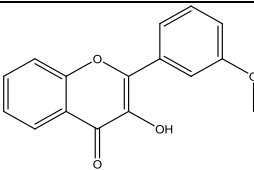
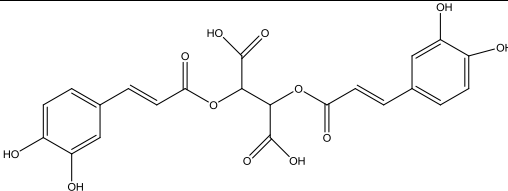
28.	Kwas ursolowy	
Kwasy		
29.	Kwas bursztynowy	
30.	Kwas pirogronowy	
31.	Kwas nikotynowy	
32.	Kwas cynamonowy	
33.	Kwas kawowy	
34.	Kwas ferulowy	
35.	Kwas p - kumarowy	

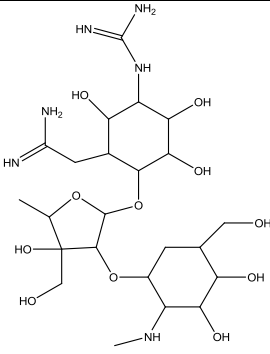
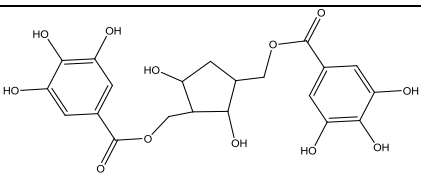
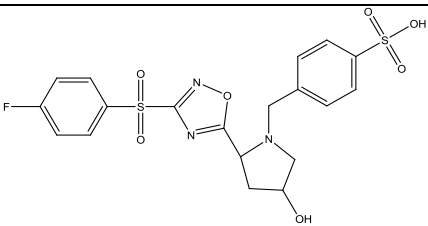
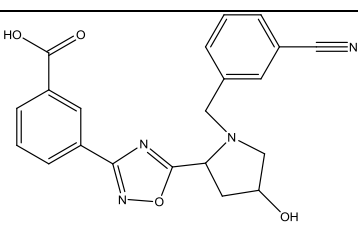
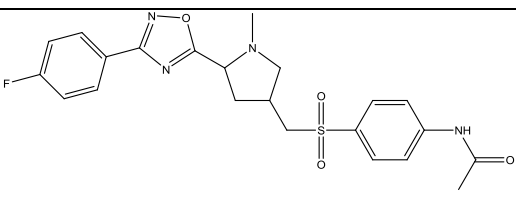
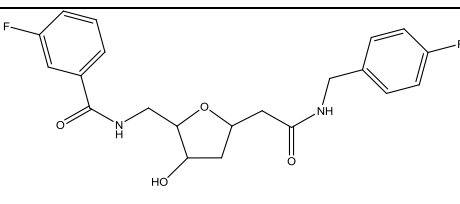
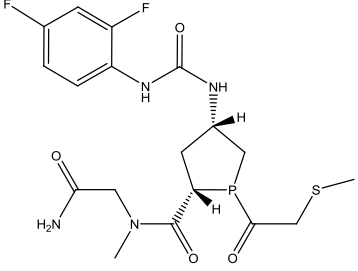
36.	Floretamid	
37.	Kwas fitowy	
Hormony roślinne		
38.	6 - benzylaminopuryna	
39.	p - topolina	
40.	Kwas 3 - indoliloctowy	
41.	Kinetyna	
42.	Rybozyd kinetyny	
43.	Rybozyd zeatyny	

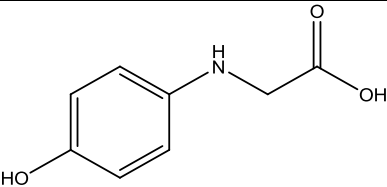
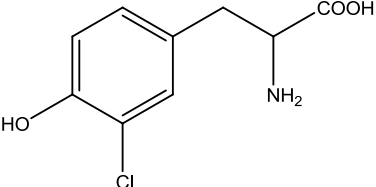
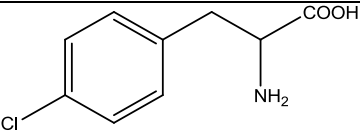
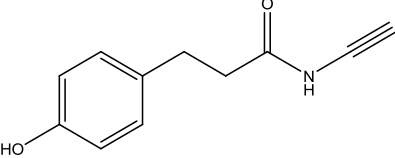
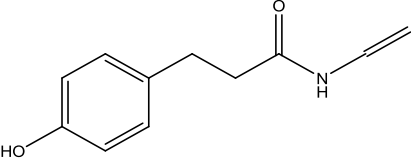
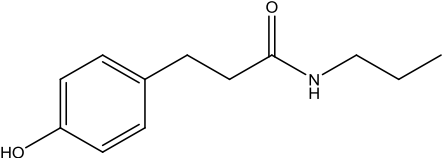
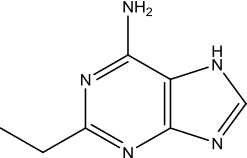
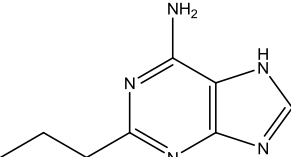
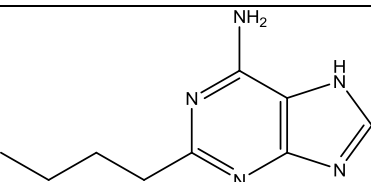
44.	Amid kwasu N - metylnicotynowego (NMA)	
Witaminy z grupy B		
45.	Inozytol	
46.	Pirydoksyna	
47.	Tiamina	
Związki syntetyczne		
Analogi tyrozyloadenylationu		
48.	Kwas 2 - (2,3 - dihydrobenzo[b][1,4]dioksyne - 6 - carboksamido) - 3 - (4 - hydroksyphenylo) propanowy	
49.	Kwas 2 - (1,1 - dioksotiolanylo)amino) - 3 - (4 - hydroksyfenylo) propionowy	
50.	Kwas (Z) - 2 - ((2 - (3,4 - dimetylfenylo) - 1,3 - diokso-2,3 - dihydroisochinylideno) metylamino) - 3 - (4 - hydroksycykloheksa - 2,4 - dienyl) propionowy	
51.	Kwas 3 - (4 - hydroksyfenylo) - 2 - (chinolino - 2 - karboksamido) propionowy	

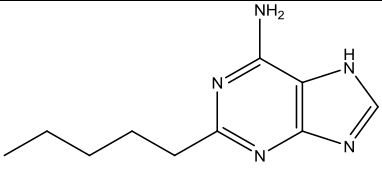
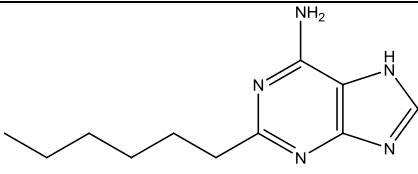
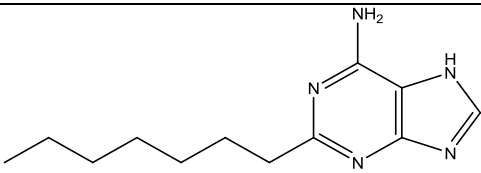
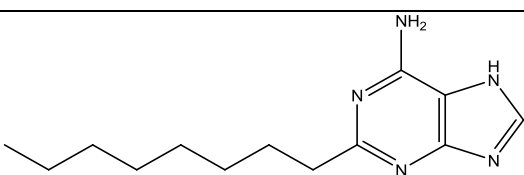
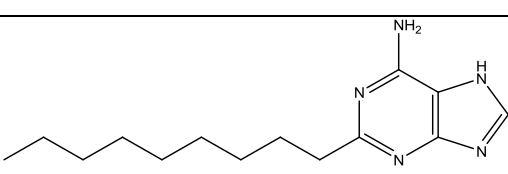
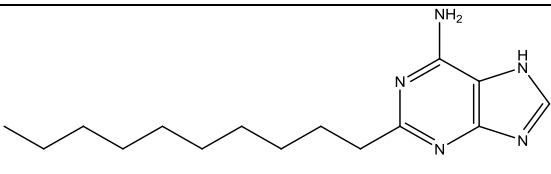
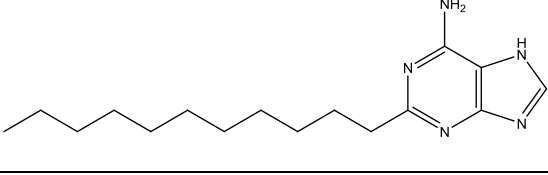
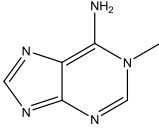
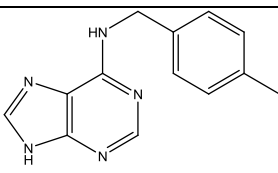
52.	Kwas 2 - (4 - cjanobenzamido) - 3 - (4 - hydroksyfenyl) propionowy	
53.	Kwas 2 - (3 - (1,3 - diokso - 1H - izoindol - 2(3H,3aH,4H,5H,6H,7H,7aH) - yl)propanamido) - 3 - (4 - hydroksyfenylo) propionowy	
54.	Kwas 3 - (4 - hydroksyfenylo) - 2 - (2 - (4 - oxo - 4,4a - dihydrochinazolino - 3(8aH) - yl)acetamido)propionowy	
55.	Kwas 3 - (4 - hydroxyphenyl)- 2 -(3 - (3 - oxo - 3,4 - dihydroquinoxalin - 2 - yl)propanamido) propionowy	
56.	Kwas 2 - (3 - benzamidopropanamido) - 3 - (4 - hydroksyfenylo)propionowy	
57.	Kwas 3 - (4 - hydroksyfenylo) - 2 - (3 - (4 - oxo - 1,4 - dihydrochinazolinyl) propanamido) propionowy	
58.	Kwas 2 - (3 - (furan - 2 - carboxamido)propanamido) - 3 - (4 - hydroksyfenylo) propionowy	
59.	Kwas 3 - (4 - hydroksyfenylo) - 2 - (3 - izopentylo - 3,4,4a,8a - tetrahydroftalazyno - 1 - karboksamido) propionowy	

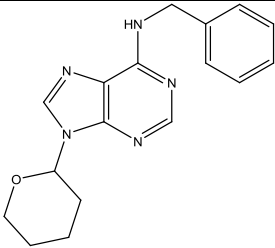
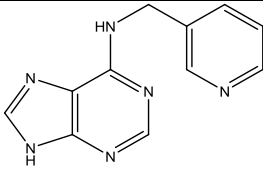
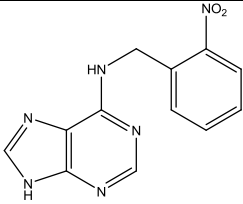
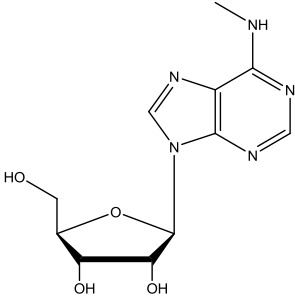
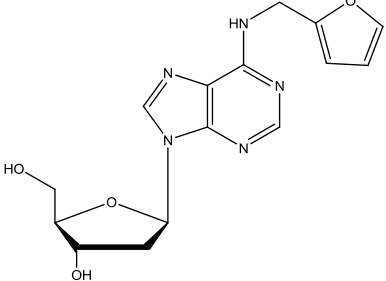
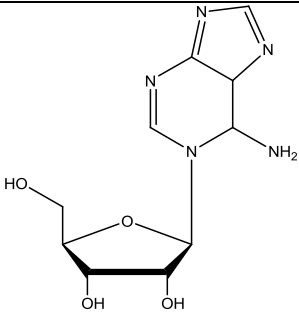
60.	Kwas 3 - (4 - hydroksyfenylo) - 2 - (1 - tosylpiperidyno - 4 - karboksamido) propionowy	
61.	Kwas 2 - (4 - (azepanylosulfonylo)benzamido) - 3 - (4 - hydroksyfenylo) propionowy	
62.	Kwas 2 - (5 - (4 - chlorofenyltio)pentanamido) - 3 - (4-hydroksyfenylo) propionowy	
63.	Kwas 3 - (4 - hydroxyphenyl) - 2 - (3 - methyl - 4 - oxo - 3,4,4a,8a - tetrahydrophthalazine - 1 - karboksamido) propionowy	
64.	Kwas 3 - (4 - hydroksyfenylo) - 2 - (4 - (trifluorometoksy)benzamido) propionowy	
65.	Kwas 2 - (2 - (4 - fluorofenyltio)acetamido) - 3 - (4 - hydroksyfenylo)propionowy	
66.	Kwas 2 - (5 - fluoro - 3 - metylbenzofurano - 2 - karboksamido) - 3 - (4 - hydroksyfenyl)propionowy	
67.	Kwas 3 - (4 - hydroksyfenylo) - 2 - (3 - (2 - nitro - 5 - (trifluorometylo) fenylamino)propanamido) propionowy	

68.	Kwas metylo - 3 - (4 - hydroksyfenylo) - 2 - (2 - (6-nitro - 4 - oksochinazolino -3 (4H) - ylo) - acetamido) propionowy	
69.	Kwas 3 - (4 - hydroksyfenylo) - 2 - (4 - nitro - 1H - pyrrolo - 2 - karboksamido)propionowy	
70.	Kwas 2 - (4 - amino - 2 - (benzyloksykarbonylamino) - 4 - oksobutanamido) - 3 - (4 - hydroksyfenylo)propionowy	
71.	Kwas metylo 3 - (4 - hydroksy - 3 - nitrofenylo) - 2 -(2,2,2 - trifluoroacetamido)propionowy	
72.	Etylo 3 - (4 - hydroksy - 3,5 - diiodofenylo) - 2 - propionamidopropionian	
73.	Kwas 2 - amino - 3 - (5 - metoksy - 3H - indol - 3 - ilo) propionowy	
74.	3 - hydroksy - 2 - (3 - metoksyfenylo) - 4H - chromen - 4 - on	
75.	Kwas 2,3 - bis((E) - 3 - (3,4 - dihydroksyfenylo)akryloyloksy) bursztynowy	

76.	2 - (2 - (3 - (3,4 - dihydroksy - 5 - (hydroksymetylo) - 2 - (metyloamino) cykloheksyloksy) - 4 - hydroksy - 4 - (hydroksymetylo) - 5 - metylotetrahydrofuran - 2 - yloksy) - 5 - guanidyno - 3, 4,6 - trihydroksycykloheksylo) acetimidoamid	
77.	2,4 - dihydrocyklopentanylo bismetyleno bis 3,4,5 - trihydrobenzoesan	
78.	Kwas 4 - fluorofenylsulfonylo)- 1,2,4 - oksadiazyl) - 4 - hydroksypyrolidynometylsulfonowy	
79.	Kwas 3 - (5 - (3 - cjanobenzyl) - 4 - hydroksypyrolidyno - 2 - yl) - 1,2,4 - oksadiazol - 3 - yl)benzoesowy	
80.	N - (4 - ((5 - (3 - (4 - fluorofenyl) - 1,2,4 - oksadiazol - 5 - yl) - 1 - metylpyrolidyno - 3 - yl)metylsulfonylo)fenyloacetamid	
81.	3 - fluoro - N - (- 5 - (2 - (4 - fluorobenzylamino) - 2 - oksoetylo) - 3,4 - dihydroksytetrahydrofuran - 2 - yl)metylo)benzamid	
82.	N - (2 - amino - 2 - oksoetylo) - 4 - (3 - (2,4 - difluorofenyl)ureido) - N - metylo - 1 - (2 - (metyltio)acetylo)fosfolano - 2 - karboksamid	
Pochodne Tyr		

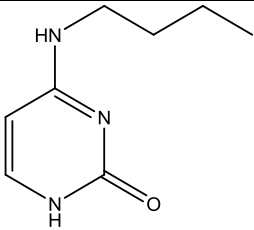
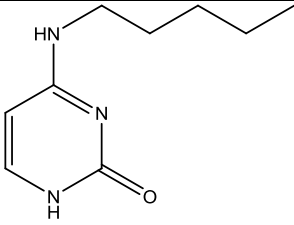
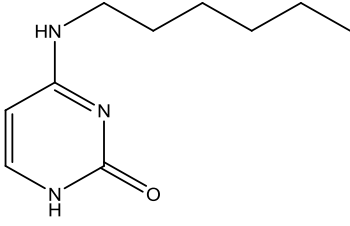
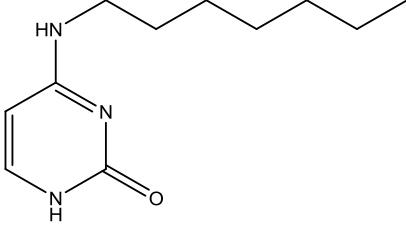
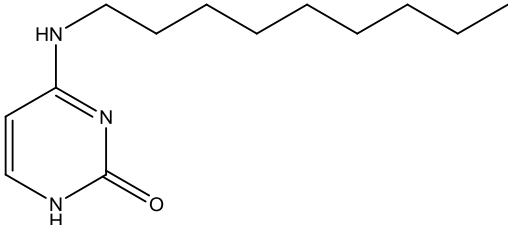
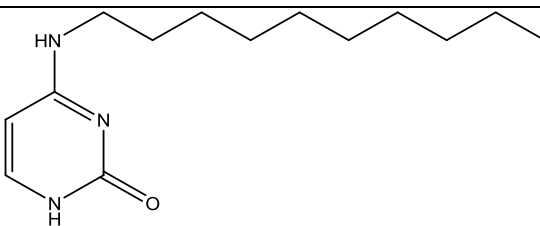
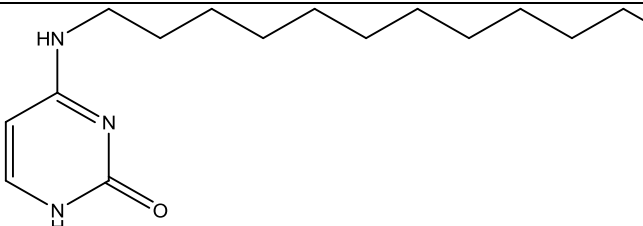
83.	N - (4 - hydroksyfenyl)glicyna	
84.	3 - chloro - L - tyrozyna	
85.	4 - chloro - DL - fenyloalanina	
86.	N - etinofloretamid	
87.	N - etenofloretamid	
88.	N - propylofloretamid	
Pochodne puryny		
89.	2 - etyloadenina	
90.	2 - propyloadenia	
91.	2 - butyloadenina	

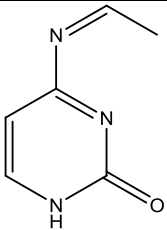
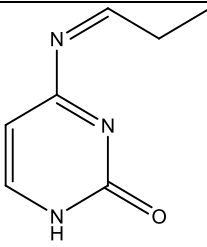
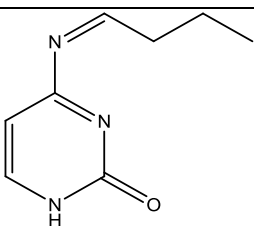
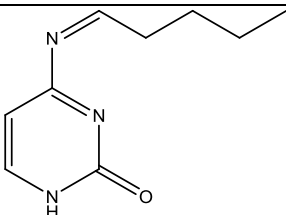
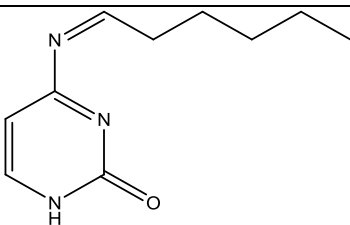
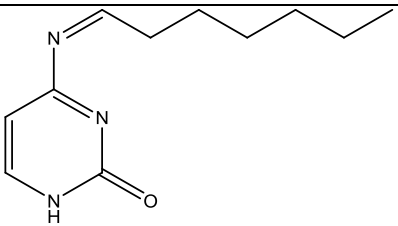
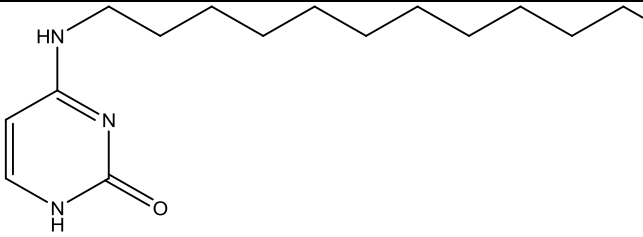
92.	2 - pentyloadenina	
93.	2 - heksyloadenina	
94.	2 - heptyloadenina	
95.	2 - oktyloadenina	
96.	2 - nonyloadenina	
97.	2 - dekanyloadnina	
98.	2 - dodekanyloadenina	
99.	1 - metyloadenina	
100.	4N - (4 - metylobenzylo)adenina	

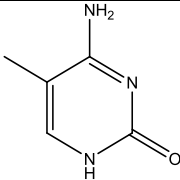
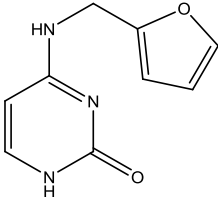
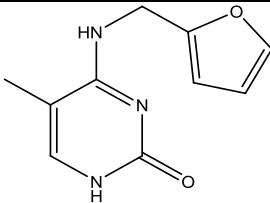
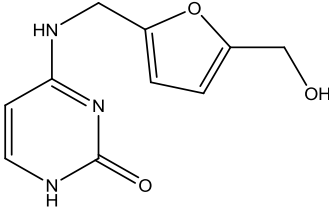
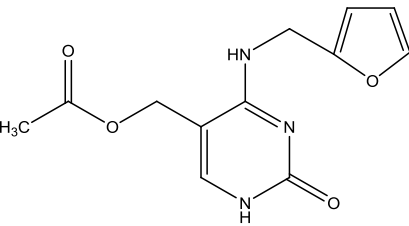
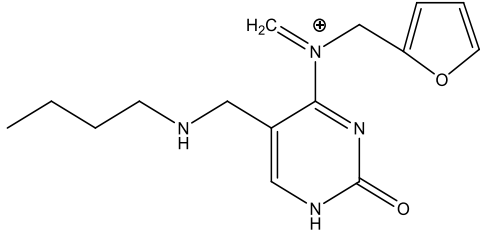
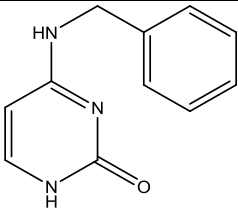
101.	N - 6 - benzyl - 9 - (2 - tetrahydropyranylo)adenina	
102.	4N - metylopirydylo - adenina	
103.	4N - (2 - nitrobenzylo)adenina	
104.	N - 6 - metyloadenozyna	
105.	2'deoksy - 4H - furfuryloadenozyna	
106.	1 - (β - D - rybofuranozylo) adenina	

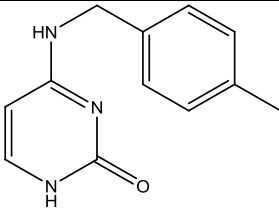
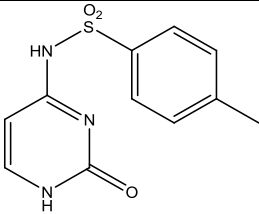
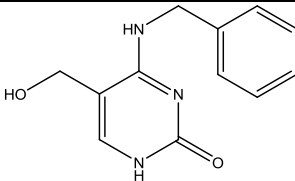
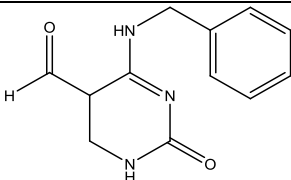
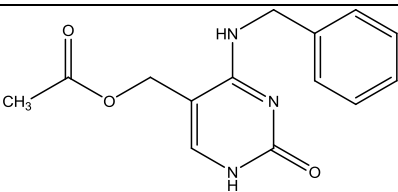
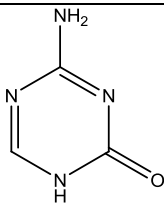
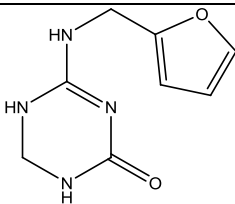
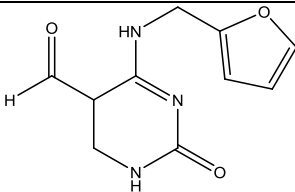
107.	3 - (β - D - rybofuranozylo) adenina	
108.	7 - (β - D - rybofuranozylo) adenina	
109.	α,β - metylenadenozyna 5' - trifosforan	
110.	7 - metyloguanozyna	
111.	7 - (β - D - rybofuranozylo) - guanozyna	
112.	Ksantozyna	

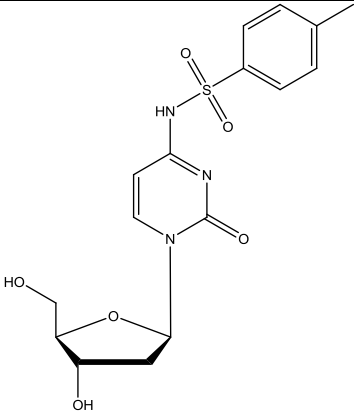
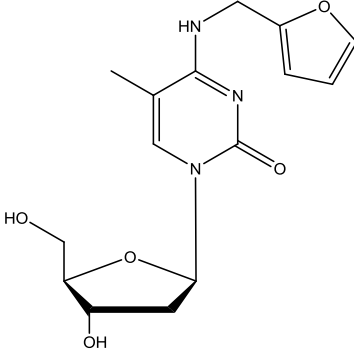
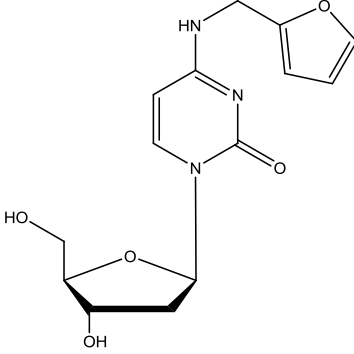
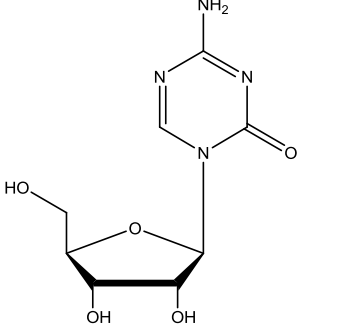
113.	6 - tioguanozyna	
114.	2' - C - metyloguanozyna	
115.	8 - merkaptoguanozyna	
116.	1 - metylinozyna	
Pochodne pirymidyny		
117.	4N - etylocytozyna	
118.	4N - propylocytozyna	

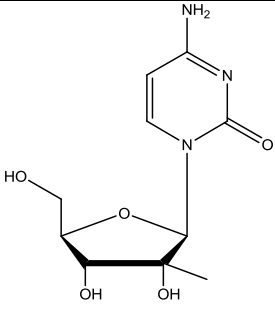
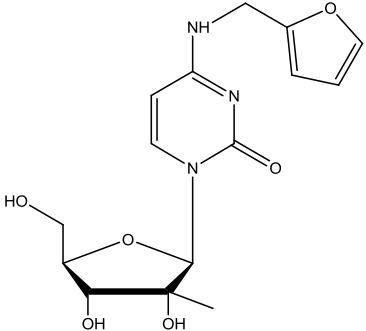
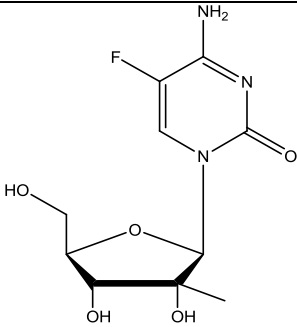
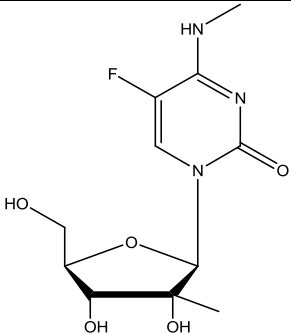
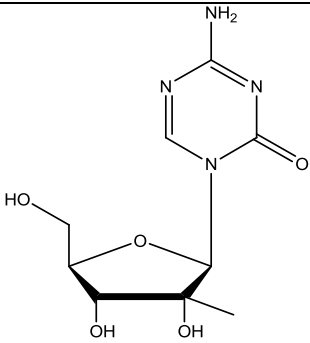
119.	4N - butylocytozyna	
120.	4N - pentylocytozyna	
121.	4N - heksylocytozyna	
122.	4N - heptylocytozyna	
123.	4N - nonylocytozyna	
124.	4N - decylocytozyna	
125.	4 - N - dodekanylocytozyna	

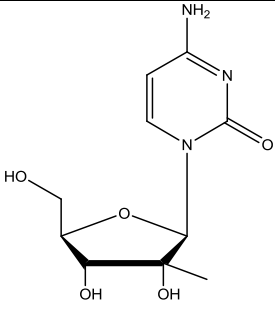
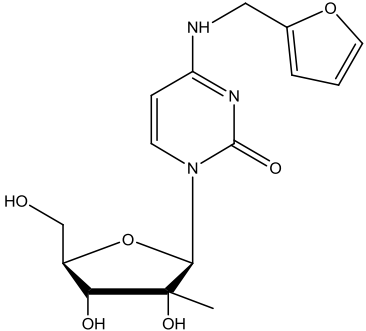
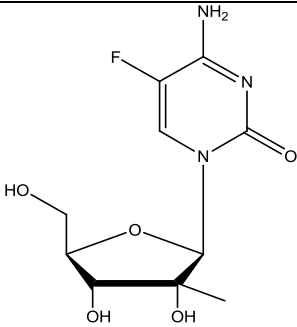
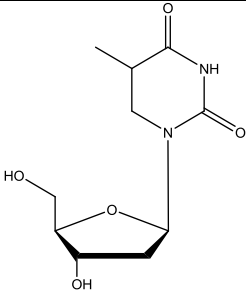
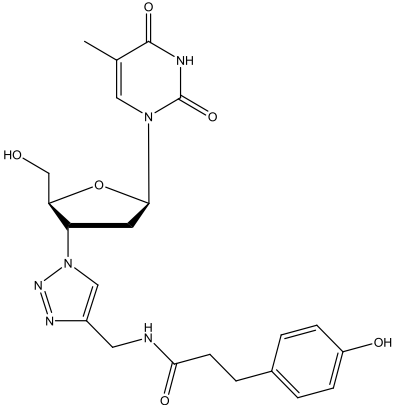
126.	4N - etylidenocytozyna	
127.	4N - propylidenocytozyna	
128.	4N - butylidenocytozyna	
129.	4N - pentylidenocytozyna	
130.	4N - heksylidenocytozyna	
131.	4N - heptylidenocytozyna	
132.	4 - N - dodekanylocytozyna	

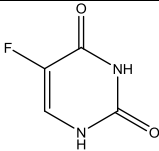
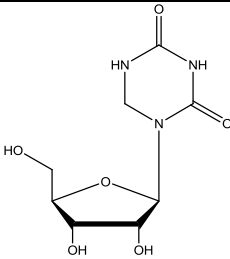
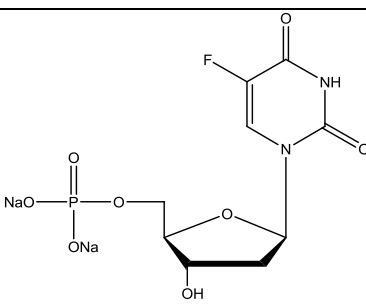
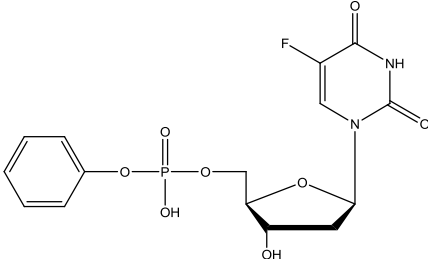
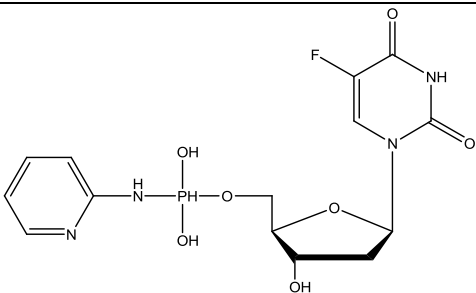
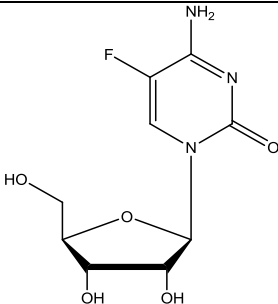
133.	5 - metylocytozyna	
134.	Furfurylocytozyna	
135.	4N - furfurylo - 5 - metylocytozyna	
136.	4N - (5 - hydroksymetylofurfurylo) cytozyna	
137.	4 - N - furfurylo - 5 - acetyloksymetylocytozyna	
138.	5 - ((butyloamino)metyl) - N - (furan - 2 - ylo - metylo) - N - metylen - 2 - okso - 1,2 - dihydropirymidyno - 4 - aminium	
139.	4N - benzylocytozyna	

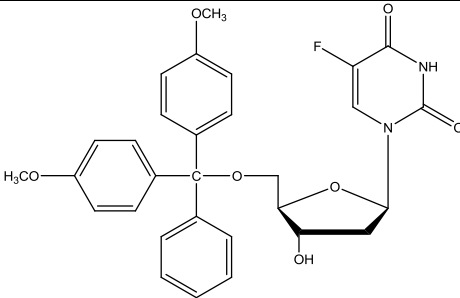
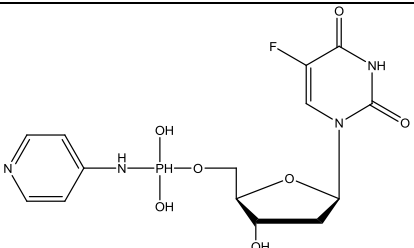
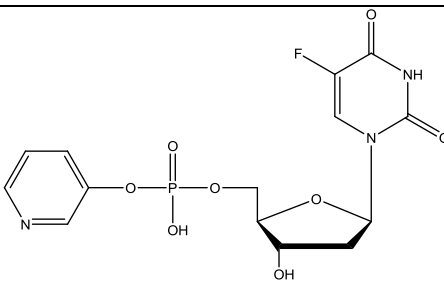
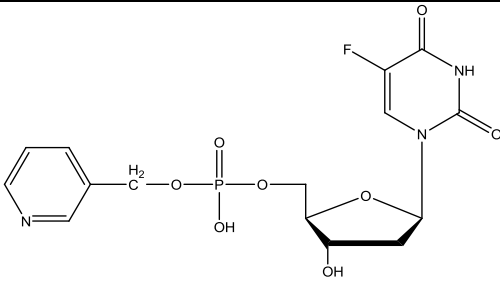
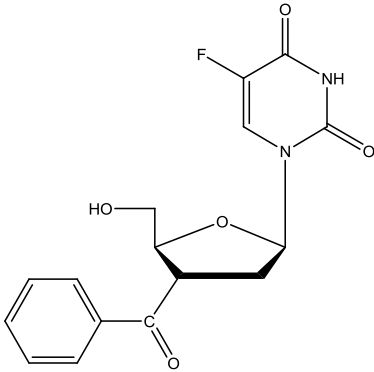
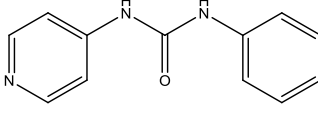
140.	4N - (4 - metylobenzylo)cytozyna	
141.	Tosylcytozyna	
142.	4N - benzylo - 5 - hydroskymetylocytozyna	
143.	4N - benzylo - 5 - formylocytozyna	
144.	4 - N - benzylo - 5 - metyloacetyloksycytozyna	
145.	Azacytozyna	
146.	Dihydroaza - 4N - furfurylocytozyna	
147.	4 - furfurylo - 5 - formylocytozyna	

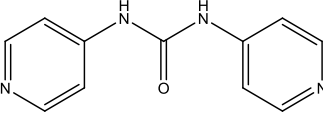
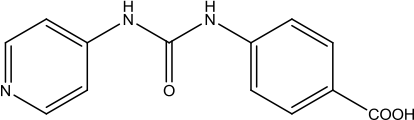
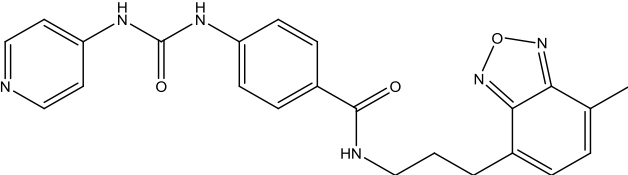
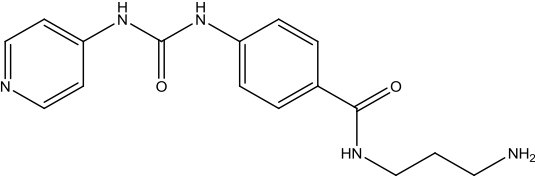
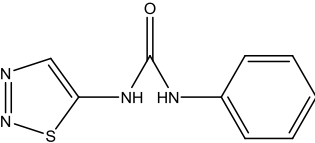
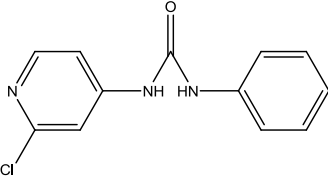
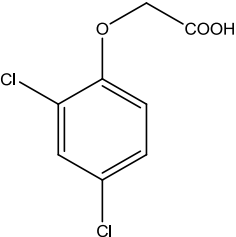
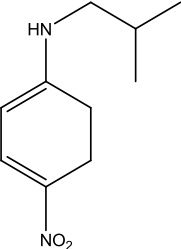
148.	Tosylocytydina	
149.	4 - furfurylo - 5 - metylo - 2'deoksycytydina	
150.	4N - furfurylo - 2'deoksycytydina	
151.	Azacytydina	

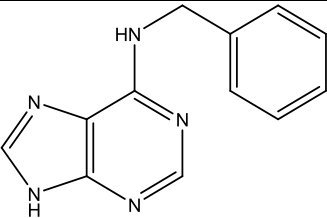
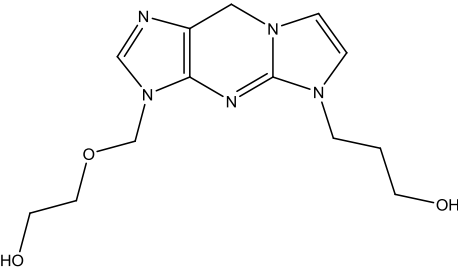
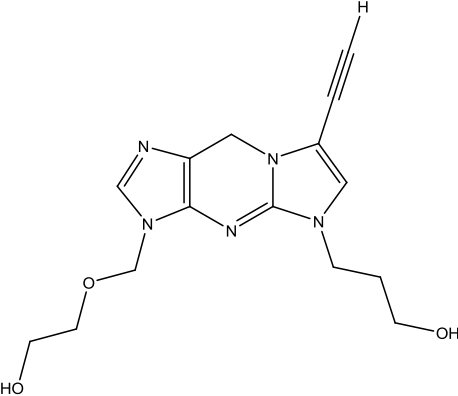
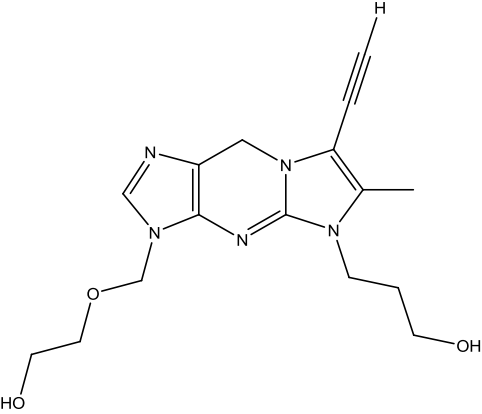
152.	2'C - metylocytydyna	
153.	4N - benzylo - 2'C - metylocytydyna	
154.	5 - fluoro - 2' - C - metylocytydyna	
155.	5 - fluoro - N ⁴ ,2' - C - dimetylocytydyna	
156.	5-aza - 2' - C - metylocytydyna	

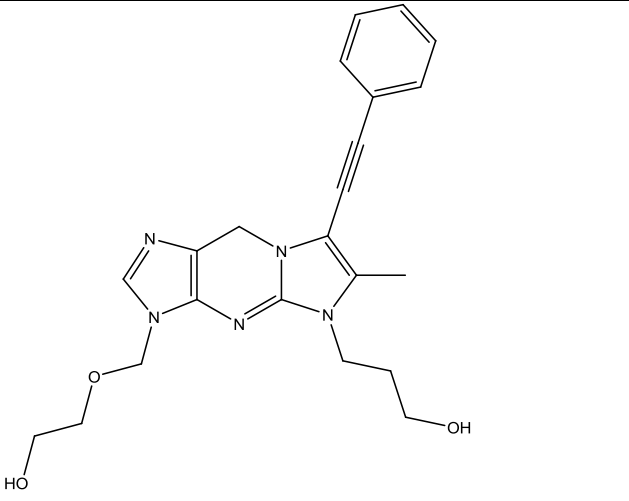
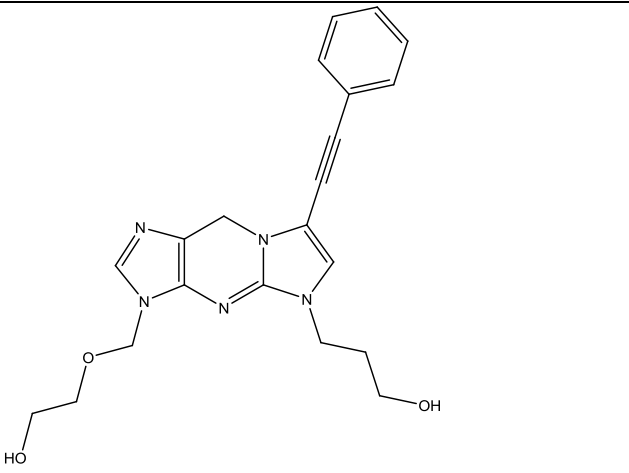
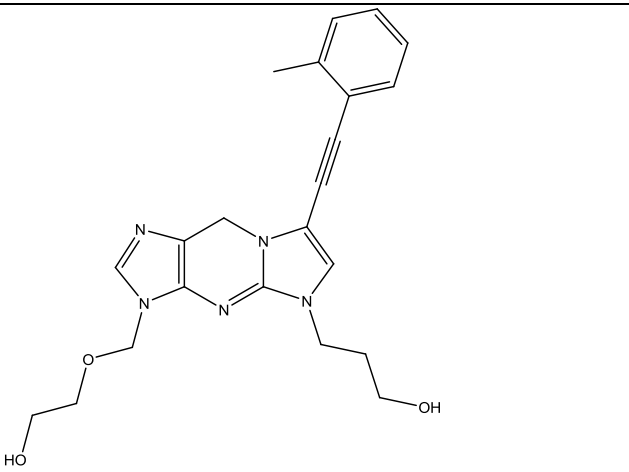
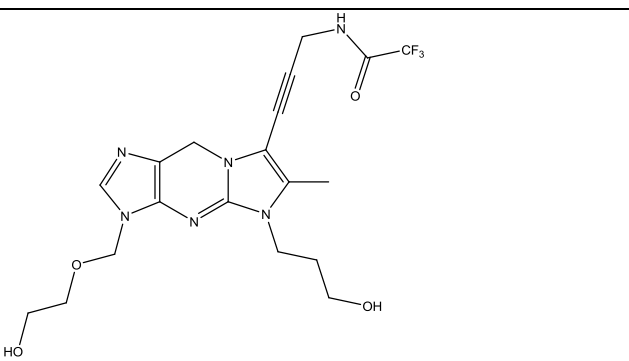
157.	2'C - metylocytydyna	
158.	4N - benzylo - 2'C - metylocytydyna	
159.	5 - fluoro - 2' - C - metylocytydyna	
160.	Dihydrotymidyna	
161.	2' - trioksazopropionamid tymidyna (2'PAT)	

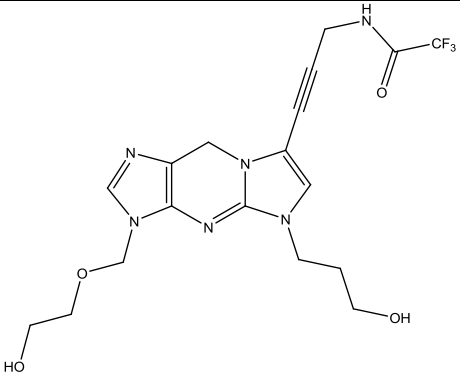
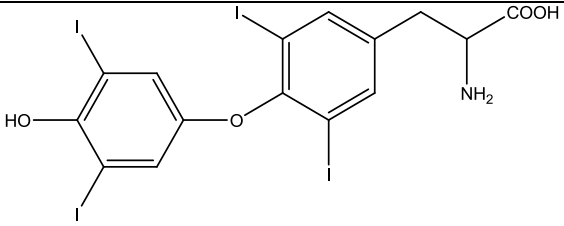
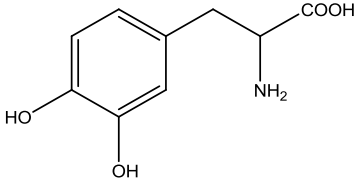
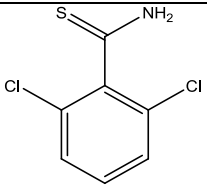
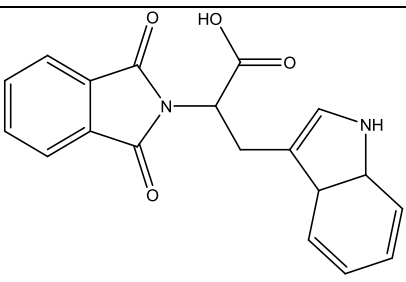
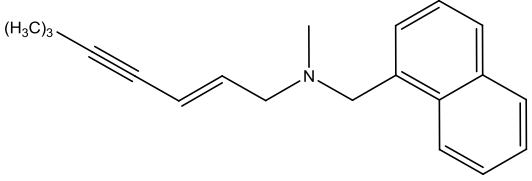
162.	Fluorouracyl	
163.	Pseudouryna	
164.	Fosfonian sodowy 5 - fluorodeoksyurydyny	
165.	Fenilo wodorofosfonian 5 - fluorodeoksyurydyny	
166.	Kwas N - fenilo - fosforoamidowy 5 - fluorodeoksyurydyny	
167.	5 - fluorourydyna	

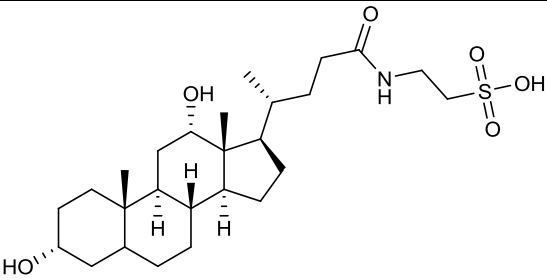
168.	4,4' - (fenylometyleno) bis(metoksybenzen) 5 - fluorodeoksyurydyny	
169.	Kwas N - (pirydyn - 4 - ylo) fosforoamidowy 5 - fluorodeoksyurydyny	
170.	Pirydyn - 3 - ylo wodorofosfonian 5 - fluorodeoksyurydyny	
171.	Pirydyn - 3 - ylometylo fosfonian wodoru 5 - fluorodeoksyurydyny	
172.	3' - benzaldehyd 5 - fluorodeoksyurydyny	
Syntetyczne hormony roślinne		
173.	1 - fenylo - 3 - pirydyn - 4 - mocznik	

174.	1,3 - bis - (pirydyn - 4 - ylo) - mocznik	
175.	Kwas 3 - [(pirydyn - 4 - ylo) amino karbamoilo] benzoesowy	
176.	N - (3 - (7 - metylobenzo [c] [1,2,5] oksadiazol - 4 - ylo) propylo) -4 - (3 - pirydyn - 4 - ylureido) benzamid	
177.	N - (3 - aminopropyl) - 3 - [(pirydyno - 4 - ylkarbamoilo)amino]benzamid	
178.	(1 - fenylo - 3 - (1,2,3 - tiodiazylo) mocznik (Thidiazuron)	
179.	N - (2 - chloro - 4 - pyridylo) - N' - fenylo mocznik	
180.	2,4 D; kwas 2,4 - dichlorofenoksyoctowy	
181.	N - izobutylo - 4 - nitrocycloheksa - 1,3 - dienamina	

182.	N - benzylo - 9H - puryn - 6 - amina	
183.	3 - [(2 - hydroksyetoksy) metylo] -5 - (3 - hydroksypropylo) - imidazo [1,2-a] - puryn - 9 - on	
184.	7 - etynylo - 3 - [(2 - hydroksyetoksy) metylo] -5 - (3 - hydroksypropylo) - imidazo [1,2-a] - puryn - 9 - on	
185.	7 - etynylo - 3 - [(2 - hydroksyetoksy) metylo] -5 - (3 - hydroksypropylo) - 6 - metyloimidazo [1,2-a] - puryn - 9 - on	

186.	3 - [(2 - hydroksyetoksy) metylo] -5 - (3-hydroksypropylo) - 6 - metylo - 7 - (2 - fenyloetynylo) imidazo [1,2-a]-puryn - 9 - on	
187.	3 - [(2 - hydroksyetoksy) metylo] -5 - (3 - hydroksypropylo) -7 - (2 - fenyloetynylo) imidazo [1,2-a]-puryn - 9 - on	
188.	3 - [(2 - hydroksyetoksy) metylo] -5 - (3 - hydroksypropylo) -7 - [2 - (2 - metylofenylo) etynylo] imidazo [1,2-a]-puryn - 9 - on	
189.	2,2,2 - trifluoro - N - (3 - (3 - ((2 - hydroksyetoksy) metylo) - 5 - (3-hydroksypropylo) - 6 - metylo - 5,9 - dihydro - 3H - imidazo [1,2 -] puryn - 7 - ylo) - prop - 2 - ynylo) acetamid	

190.	2,2,2 - trifluoro - N - (3 - (3 - [(2 - hydroksyetoksy) metylo] -5 - (3 - hydroksypropylo) -9 - oksoimidazo [1,2-a] - puryn - 7 - ylo) prop - 2 - yn - 1- ilo) acetamid	
Hormony		
191.	Lewotyroksyna	
192.	3,4 - dihydroksyfenyloalanina (L-dopa)	
Inne		
193.	2,6 - dichloro - benzo tioamid	
194.	RG108	
195.	Terbinafina	

196.	Kwas taurodeoksycholowy	
------	-------------------------	--



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Oświadczam, że jestem stypendysta w ramach projektu pt.: „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, współfinansowanego przez Unie Europejska w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego (edycja 2011/2012).

Oświadczam, że jestem stypendysta w ramach projektu pt.: „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, współfinansowanego przez Unie Europejska w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego (edycja 2009/2010).



**Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego**

.
Praca współfinansowana z grantu MNiSW nr N N405 126640
Tytuł: Poszukiwanie nowych inhibitorów bakteryjnej syntetazy tyrozylo-tRNA.
Kierownik: prof. dr hab. Jan Barciszewski

oraz

grantu MNiSW nr N N401 037236
Tytuł: Nowe terapie przeciwko zakażeniom bakteryjnym.
Kierownik: dr Małgorzata Giel-Pietraszuk