

**BADANIE ODDZIAŁYWANIA WANKOMYCYNY
Z FRAGMENTEM PEPTYDOGLIKANU
ŚCIANY KOMÓRKOWEJ BAKTERII**

STUDY ON INTERACTION OF VANCOMYCIN WITH
BACTERIAL CELL WALL PEPTIDOGLYCAN

Justyna Samaszko-Fiertek*, Rafał Ślusarz, Janusz Madaj

*Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, Pracownia Chemii Cukrów
ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk
e-mail: j.samaszko-fiertek@ug.edu.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Badanie sił oddziaływania fragmentów peptydowych ściany komórkowej bakterii z wankomycyną
 - 1.1. Metody badania oddziaływania peptydoglikanu z wankomycyną

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

Dr hab. Janusz Madaj, prof. nadzw. UG, ukończył studia chemiczne na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w roku 1989. W tym samym roku podjął pracę w Zakładzie Chemii Cukrów UG. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w roku 1995. W latach 1997–8 odbył staż naukowy w Case Western Reserved University w Cleveland, Ohio USA w grupie profesora Vincenta M. Monnier. W roku 2004 uzyskał stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych po przedstawieniu rozprawy na temat: „Badania dróg tworzenia i przemian wybranych związków cukrowych”. Jego aktualne zainteresowania naukowe skupiają się na chemii organicznej ze szczególnym uwzględnieniem chemii węglowodanów. Ostatnio swoje prace koncentruje na badaniach mechanizmu oddziaływania wankomycyny ze ścianą komórkową bakterii Gram-dodatnich oraz wpływem na to oddziaływanie fragmentów cukrowych.

Dr Rafał Ślusarz ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Gdańskim. Także na Wydziale Chemii UG, w 2004 roku uzyskał stopień doktora nauk chemicznych, po obronie rozprawy pt. „Symulowanie dynamiką molekularną blokowania i aktywacji receptorów sprzężonych z białkiem G”. Obecnie zajmuje się badaniem zmian konformacyjnych układów cukrowych i glikoproteinowych podczas swoistego oddziaływania z fragmentami konstrukcyjnymi komórek bakteryjnych oraz enzymami organizmów wyższych metodami modelowania molekularnego. Jego warsztat pracy obejmuje dynamikę molekularną, analizę statystyczną, optymalizację, dokowania oraz badanie oddziaływań międzycząsteczkowych.

Dr Justyna Samaszko-Fiertek w roku 2004 ukończyła Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w Gdańsku. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskała w roku 2010. Jest adiunktem w Pracowni Chemii Cukrów na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Tematyka badawcza: badaniach mechanizmu oddziaływania wankomycyny ze ścianą komórkową bakterii Gram-dodatnich, opracowanie metod syntezy nowych pochodnych antybiotyków glikopeptydowych.

ABSTRACT

Unfortunately, despite of work involved in understanding of the mechanism of bacterial virulence, especially *Staphylococcus aureus*, it has not been developed effective therapy against this bacteria. The first antibiotic used against this bacteria was penicillin, which was discovered by Alexander Fleming in 1928.

A new generation of drugs introduced into therapy against *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria are glycopeptide antibiotics. The most widespread and most commonly used are vancomycin and teicoplanin, discovered respectively in 1956 and 1978.

As a result of frequent use of vancomycin VISA (ang. *Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*) and VRSA (ang. *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*) strains were discovered. The mechanism of action of this antibiotic based on the inhibition of the biosynthesis of bacterial cell wall peptidoglycan fragment. Forming stabilized by hydrogen bonds complex with terminal fragment of peptidoglycan (dipeptide D-Ala-D-Ala) vancomycin prevents its further crosslinking [2] (Fig. 1).

However, in recent years other theories of the mechanism of action of glycopeptide antibiotics against Gram-positive bacteria were presented it seems to be crucial to find methods of selection of new antibiotics and for this purpose standard techniques of the analysis, including isothermal titration calorimetry (ITC) [3], nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) [8–15], high performance liquid chromatography (HPLC) [16], capillary electrophoresis [17] or self-assembled monolayers (SAMs) [22] are used.

Discovering new methods for studying of interaction between vancomycin and Gram-positive bacterial cell wall allows use it as a new technique for rapid selection of potential new antibiotics, including glycopeptide derivatives.

Keywords: vancomycin, HPLC, capillary electrophoresis, NMR, SAMs

Słowa kluczowe: wankomycyna, HPLC, elektroforeza kapilarna, NMR, SAMs

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

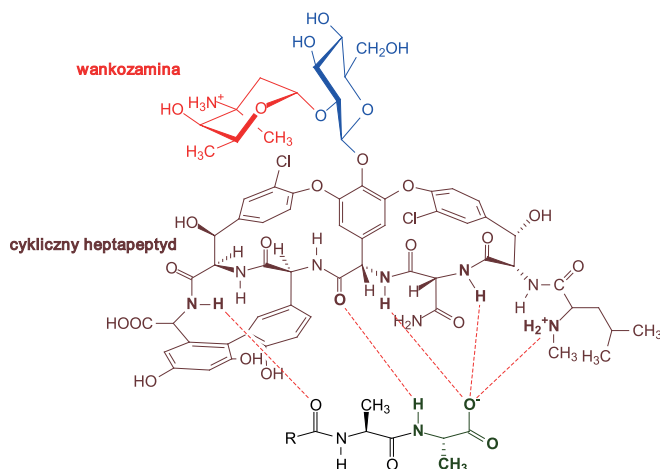
Używane w tekście symbole aminokwasów oraz ich pochodnych są zgodne z postanowieniami IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature zawartymi w *Eur. J. Biochem.*, **1985**, 138, 9-37 oraz *A Short Guide to Abbreviations and Their Use In Peptide Science*, *J. Peptide Sci.*, **1999**, 5, 465-471. W wypadkach nie objętych postanowieniami stosowano oznaczenia powszechnie przyjęte w chemii peptydów.

AFM	– ang. <i>Atomic Force Microscopy</i>
Białko Map	– ang. <i>MHC class II analogous protein</i>
DCC	– ang. <i>dicyclohexylcarbodiimide</i>
Gal	– D-galaktoza
GalNAc	– N-acetylo-D-galaktozamina
GlcNAc	– N-acetylo-D-glukozamina
HATU	– ang. <i>2-(7-Aza-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium hexafluorophosphate</i>
HBTU	– ang. <i>O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate</i>
HOAt	– ang. <i>1-hydroxy-7-azabenzotriazole</i>
HOBt	– ang. <i>N-hydroxybenzotriazole</i>
HPLC	– wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
LLO	– ang. <i>lipid-linked oligosacchrides</i>
LSP	– ang. <i>lipopolysacchride</i>
LTA	– ang. <i>lipoteichoicacid</i>
NCCLS	– ang. <i>National Committee on Clinical Laboratory Standards</i>
MIC	– ang. <i>minimum inhibitor concentration</i>
MurNAc	– kwas N-acetylo-D-muraminowy
NMR	– spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
OT	– transferaza oligosacharydowa
PRSA	– ang. <i>penicilineresistant strain S. aureus</i>
PBP	– ang. <i>peniciline binding protein</i>
PIERS	– ang. <i>Polarized Infrared External Reflectance Spectroscopy</i>
PTE	– ang. <i>peniciline tetracycline erythromycine resistant strain S. aureus</i>
SAM	– ang. <i>Self-Assembled Monolayers</i>
SPPS	– ang. <i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>
SPR	– ang. <i>Surface Plasmon Resonance Spectroscopy</i>
TEM	– transmisyjny mikroskop elektronowy

VISA	- ang. <i>vancomycin-intermediate</i> S. aureus
VRE	- ang. <i>vancomycin-resistant</i> Enterococcus
VRSA	- ang. <i>vancomycin-resistant strain</i> S. aureus

WPROWADZENIE

Niestety pomimo ogromu włożonej pracy w poznanie mechanizmu zjadliwości bakteryjnej, przede wszystkim gronkowca złocistego, nie opracowano jak dotąd skutecznej terapii przeciwko tej bakterii. Początkowo stosowano przeciwko niemu pierwszy odkryty przez Aleksandra Fleminga w 1928 antybiotyk – penicylinę. Bakteria ta wykształciła przeciwko niemu swoisty system odporności. Stosunkowo szybko pojawiły się pierwsze szczepy PRSA (ang. *penicilineresistant S. aureus*), odporne na stosowanie tego antybiotyku, o czym przestrzegali sam twórca: „Jeśli kuracja nie zniszczy wystarczającej liczby bakterii, ocalałe wydadzą uodpornione potomstwo, które szybko się namnoży. W efekcie choroba przypuści ponowny atak i nie będzie jej już można wyleczyć penicyliną” [1]. Niestety rzeczywistość okazała się okrutniejsza i podobne błędy popełniono względem najbardziej popularnego oraz najczęściej stosowanego antybiotyku przeciwko *S. aureus* wankomycynie. W konsekwencji czego bakteria wykształciła szczepy wankomycyno wrażliwe VISA (ang. *Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*) i odporne VRSA (ang. *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*) na skuteczność terapii przy zastosowaniu tych antybiotyków. Mechanizm działania tych antybiotyków w głównej mierze opiera się zahamowaniu biosyntezy fragmentów peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii. Zatrzymanie tego procesu związane jest z bezpośrednim oddziaływaniem antybiotyku z końcowym fragmentem peptydoglikanu ściany komórkowej gronkowca złocistego (dipeptydem D-Ala-D-Ala) (Rys. 1) [1, 2].



Rysunek 1. Wankomycyna i oddziaływanie z fragmentem peptydowym peptydoglikanu *S. aureus* [2]

Figure 1. Vancomycin and their interaction with peptidoglycan fragment of *S. aureus* [2]

Jednakże w ostatnich latach pojawiają się inne teorie opisujące mechanizm działania nowych potencjalnych antybiotyków przeciwko bakterii Gram-dodatniej.

Dlatego tak ważne jest położenie nacisku na dalszy rozwój i opracowanie technik syntetycznych określonych fragmentów ściany komórkowej wchodzących w interakcje z potencjalnymi antybiotykami przeciwko *S. aureus*.

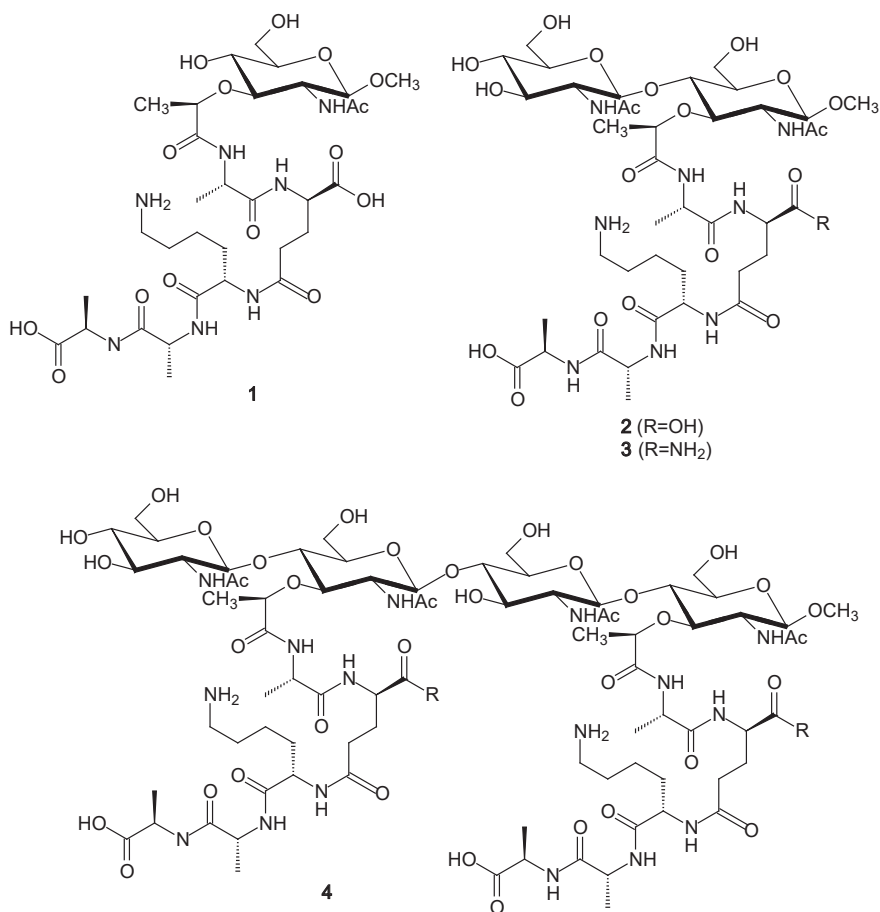
Kolejnym ważnym aspektem jest znalezienie metod selekcji nowych antybiotyków. W tym celu próbuje się wykorzystać standardowe techniki wykorzystywane w analizie, m.in. spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR), wysokosprawną chromatografię cieczoową (ang. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) czy elektroforezę kapilarną, mające na celu skrócenie czasu przeprowadzania wstępnych badań przed klinicznych.

1. BADANIE SIŁ ODDZIAŁYWANIA FRAGMENTÓW PEPTYDOWYCH ŚCIANY KOMÓRKOWEJ BAKTERII Z WANKOMYCYNĄ

Do badań nad siłą wzajemnego oddziaływania wankomycyny z fragmentem peptydoglikanu w kompleksie i wyznaczenia stałej asocjacji (K_a) stosowano różnego typu techniki analityczne, m.in. izotermiczną kalorymetrię miareczkową (ang. *Isothermal Titration Calorimetry*, ITC). Metoda ta pozwoliła wyznaczyć nie tylko stałą K_a , lecz również parametry termodynamiczne (m.in. entalpię i entropię).

Otrzymane wyniki potwierdziły stawianą od lat hipotezę, że im dłuższy fragment peptydoglikanu tym oddziaływania są silniejsze. Jednakże z porównania stałej K_a dla fragmentu tripeptydowego z wartościami dla fragmentu mono-, di- i tetrasacharydowego (podstawionymi fragmentami pentapeptydowymi) wynika, że obecność fragmentu cukrowego nie wpływa na tworzenie się kompleksu. Niewielka zmiana wartości dla związku **2** i **3** związana jest z ładunkiem ujemnym na grupie karboksylowej z łańcucha bocznego γ -iGlu. W przypadku pochodnej **3** grupa ta podstawiona jest grupą aminową, zmieniając tym samym zdolność solwatacji tego związku (Rys. 2) [3].

Ciekawe rezultaty otrzymano dla związku **4**, dla którego wyznaczono dwie stałe asocjacji. Pierwsza odnosi się do powstającego kompleksu w stosunku 1:1, druga zaś związana jest z przyłączeniem kolejnej wankomycyny do istniejącego już kompleksu. Sugeruje to, że w obrębie struktury przy tworzeniu się kompleksu pomiędzy jedną cząsteczką wankomycyny a cząsteczką związku **4** powstają dodatkowe słabe oddziaływania elektrostatyczne, które ją stabilizują (Tab. 1) [3].



Rysunek 2. Fragmenty pochodnej peptydoglikanu wykorzystane do badań oddziaływań z wankomycyną [3]
 Figure 2. Peptidoglycan derivatives used for studies of interactions with vancomycin [3]

Tabela 1. Parametry termodynamiczne tworzenia kompleksu pomiędzy wankomycyną a fragmentem ściany komórkowej w buforze octanu sodu, pH = 4,7 (T = 298 K) [3]

Table 1. Thermodynamic parameters of complex between vancomycin and a fragment of the cell wall in sodium acetate buffer, pH = 4.7 (T = 298 K) [3]

Ligand	K _a [M ⁻¹]	ΔG° [kJmol ⁻¹]	ΔH° [kJmol ⁻¹]	TΔS [kJmol ⁻¹]
(Ac) ₂ KAA	(4,8 ± 0,7) · 10 ⁵	-32,4 ± 0,4	-40,1 ± 1,0	-7,7 ± 1,0
1	(6,6 ± 1,0) · 10 ⁵	-33,2 ± 0,4	-40,2 ± 1,0	-7,0 ± 1,0
2	(5,4 ± 0,8) · 10 ⁵	-32,7 ± 0,4	-39,2 ± 1,0	-6,5 ± 1,0
3	(2,5 ± 0,3) · 10 ⁵	-30,8 ± 0,3	-40,2 ± 1,0	-9,4 ± 1,0
4 (I-stała)	(1,1 ± 0,2) · 10 ⁶	-34,5 ± 0,5	-41,2 ± 1,0	-6,7 ± 1,0
4 (II-stała)	(4,0 ± 0,7) · 10 ⁵	-32,0 ± 0,5	-45,4 ± 1,0	-13,4 ± 1,0

1.1. METODY BADANIA ODDZIAŁYWANIA PEPTYDOGLIKANU Z WANKOMYCYNĄ

Wraz z pojawieniem się szczepów gronkowca złocistego opornych na działanie stosowanych dotąd leków bardzo ważne stało się opracowanie/zaprojektowanie nie tylko nowych antybiotyków lecz również metod ich selekcji. Stanowi to duże wyzwanie dla naukowców ponieważ powierzchnia bakterii wykazuje się słabymi właściwościami antygenowymi [4–7]. Badania nad nowymi lekami trwają od kilku do kilkunastu lat, niestety najwięcej czasu pochłaniają testy kliniczne. Dlatego też projektowanie nowych leków i metod ich badania opiera się na wykorzystaniu wiedzy o mechanizmie działania istniejących już antybiotyków, co pozwala na skrócenie czasu przeprowadzanych analiz.

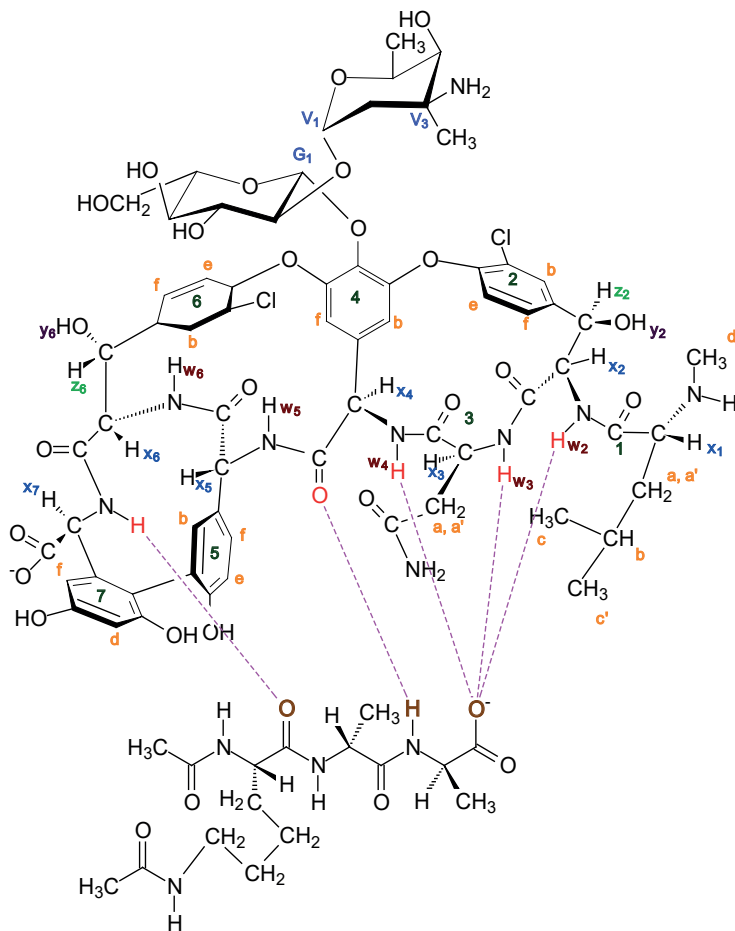
W przypadku gronkowca złocistego wykorzystuje się podstawową wiedzę o jego zdolności tworzenia się kompleksu C-terminalnego fragmentu dipeptydowego (D-Ala-D-Ala), wchodzącego w skład peptydoglikanu z wankomycyną. Na tej podstawie opracowano kilka metod badania oddziaływania pomiędzy antybiotykiem, a powierzchnią ściany komórkowej bakterii. Opierały się one na wykorzystaniu już istniejących technik analitycznych, m.in. spektroskopii magnetycznego rezonansu jądowego (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR), wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) czy spektrometria mas z jonizacją typu electrospray (ang. *Electrospray Ionisation-Mass Spectrometry*, ESI-MS).

Wraz z rozwojem techniki NMR i odkryciem efektu NOE nastąpił gwałtowny postęp w określaniu struktur różnego typu związków, w tym wankomycyny. Po poznaniu dokładnej budowy antybiotyku ostatniej szansy w terapii przeciwko zakażeniom wywołanym szczepami MRSA, dużo czasu poświęcono na badania tworzenia się kompleksu z fragmentem peptydoglikanu. Pionierami tego typu badań był Williams wraz ze współpracownikami [8]. W pierwszej fazie badań zastosowali oni model wykorzystujący głównie fragmenty di- i tripeptydowe (Ac-D-Ala-D-Ala, Ac₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala) oraz wankomycynę. Badanie struktury kompleksu okazało się skomplikowane ze względu na niejednoznaczne przypisanie m.in. protonów amidowych (–CONH–) wankomycyny biorących udział w tworzeniu wiązań wodorowych w kompleksie, w odniesieniu do protonów pochodzących z cząsteczki wankomycyny niebiorącej udziału w tworzeniu kompleksu [8].

Początkowo analizy przeprowadzano w temperaturze 25°C i DMSO-d₆ nie otrzymując jednoznacznych wyników. W celu zahamowania wymiany protonów zastosowano ponownie jako rozpuszczalnik DMSO-d₆, ale z domieszką CCl₄ (3:1), obniżono temperaturę z 25 do 0°C, CCl₄ zastosowany został jako antyzamrażacz (ang. *antifreeze*). Warunki te obniżały stałą dysocjacji kompleksu i chroniły przed zbyt szybką wymianą protonów, powodujących zrywanie wiązań wodorowych. Do analizy zastosowano mieszaninę ~20 mM każdego komponentu, uzyskując kompleks w stosunku 1 : 1 [9].

Z analizy widm ¹H NMR wynikało, że nastąpiła zmiana wartości przesunięć protonów grup metylowych dipeptydu Ac-D-Ala-D-Ala z 1,28 oraz 1,18 (w przy-

padku samego dipeptydu) na 0,5 i 0,92 dla fragmentu peptydowego „związanego” w kompleks z wankomycyną. Wpływa na to ulokowanie tych grup naprzeciwko pierścieni aromatycznych wankomycyny (głównie pierścienia 5 i 7 – Rys. 3, Tab. 2). Kolejnym dowodem tworzącego się kompleksu były zmiany wartości przesunięć chemicznych w kierunku wyższych wartości dla grup amidowych NH z antybiotyku (Tab. 3). Stwierdzono, że pierścienie aromatyczne bifenylu oddziałują z grupą metylową *N*-terminalnej reszty *D*-alaniny z fragmentu peptydowego [9, 10]. Interakcje te potwierdzone zostały z analizy X-ray CDPI [11].



Rysunek 3. Kompleks wankomycyna – fragment peptydowy peptydoglikanu wykorzystany do badań oddziaływań przy wykorzystaniu spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego [10]

Figure 3. Complex between vancomycin and a peptide fragment of peptidoglycan used for studies of interactions using NMR spectroscopy [10]

Table 2. Zmiana przesunięć chemicznych we fragmencie peptydowym peptydoglikanu związanego w kompleks z wankomycyną (A1) [10]

Table 2. Changing of the chemical shifts in a peptide fragment of peptidoglycan bound in a complex with vancomycin (A1) [10]

Proton peptydowy	A1 + dipeptyd		Proton peptydowy	A1 + tripeptyd	
	Wolny	Związany		Wolny	Związany
A _C Me	1,28	0,50	A _C Me	1,28	0,50
A _C CH	4,14	3,90	A _C CH	4,16	3,90
A _C NH	8,16	7,84	A _C NH	8,10	7,84
A _N Me	1,18	0,92	A _N Me	1,20	0,92
A _N CH	4,30	4,70	A _N CH	4,30	4,52
A _N NH	8,06	8,06	A _N NH	8,24	8,02
CH ₃ CO	1,82	1,82	KαCH	4,18	4,18
			KεCH ₂	3,00	3,06
			KαNH	8,10	7,48
			KεNH	7,84	7,94

Table 3. Zmiana przesunięć chemicznych wybranych protonów wankomycyny (A1) w kompleksie z fragmentem peptydowym mureiny [10]

Table 3. Change of chemical shifts selected protons of vancomycin (A1) in complex with a peptide fragment of murein [10]

Wankomycyna (A1)	A1	A1 + dipeptyd	A1 + tripeptyd
w5	8,64	8,76	8,90
w7	8,46	8,74	9,15
w4	8,22	9,00	9,00
w2	7,80	11,70	11,80
6b	7,89	7,26	7,16
2f	7,50	7,62	7,60
2b	7,46	7,17	7,16
2e	7,20	6,90	6,88
5b	7,20	7,77	7,82
w3	6,78	8,30	8,34
x4	5,74	5,88	5,90
x2	4,86	5,18	5,17
4b	5,52	5,40	5,40
x5	4,38	4,64	4,64
x3	4,38	4,70	4,70
x7	4,38	4,40	4,50
x1	3,20	4,14	4,16
x6	4,20	4,50	4,40

Wankomycyna (A1)	A1	A1 + dipeptyd	A1 + tripeptyd
N-Me	2,40	2,64	2,60
3a, 3a'	2,38; 2,12	2,16	2,10
1b	1,70	1,65	1,38
1a, a'	1,50; 1,30	~1,38	1,40
V6	1,06	1,02	1,00
1c	0,90	0,70	0,68
1c'	0,86	0,70	0,68

W tworzenie wiązań wodorowych w kompleksie zaangażowane są w sumie 3 grupy amidowe NH, jedna grupa karbonylowa C=O oraz jedna grupa aminowa (NH₂+CH₃) pochodzące z wankomycyny. Analiza widm NMR potwierdziła powstawanie tych oddziaływań. Wskazywała na to m.in. zasadnicza zmiana przesunięcia protonu w2 (Rys. 3). W kompleksie wartość jego wynosi 11,7 ppm, podczas gdy w wolnej wankomycynie jest przesunięta o około 3,9 ppm w kierunku niższych wartości. Taka różnica tłumaczona jest tworzącym się wiązaniem pomiędzy protonem a atomem tlenu z anionu karboksylanowego C-teminalnej reszty D-alaniny (Tab. 3) [10].

Wraz ze zmianą wartości przesunięcia chemicznego grup NH zmienia się siła powstającego wiązania. Porównując siłę tworzącego się wiązania wodorowego pomiędzy ligandem a grupą NH drugiej reszty aminokwasowej wankomycyny zauważalna jest pewna prawidłowość. Im dłuższy jest fragment peptydowy tym większa jest siła wiązania w tworzącym się kompleksie. (brak ligandu < Ac-D-Ala < Ac-D-Ala-D-Ala < Ac₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala) [2]. Wpływ na tę zależność mają tworzące się dodatkowo oddziaływania hydrofobowe i wiązania wodorowe. Wykorzystanie fragmentu tripeptydowego pozwoliło ustalić, że w roztworze wodnym ma miejsce rotacja łańcucha bocznego L-lizyny dzięki czemu skierowany on jest stroną pierścienia aromatycznego w pozycji 7 antybiotyku (Rys. 3) [12, 13].

Przy wykorzystaniu technik NOE zaobserwowano, że protony ligandu i antybiotyku są ułożone względem siebie stosunkowo blisko. Wpływa na to zmiana konfiguracji w obrębie wankomycyny i tworzenia przez nią tzw. karboksylowej kieszeni wiążącej (ang. carboxylate binding pocket). Utworzona jest ona głównie przez reszty aminokwasowe antybiotyku znajdujące się w pozycji 2, 3 oraz 4. Rotacja wiązań w obrębie reszty L-izoasparaginy, N-metylo-L-leucyny i p-hydroksyfenyloglicyna, ułatwia jej powstanie. Obrót o 180° wiązania αCHCO w N-metylo-L-leucynie pozwala na zmianę ułożenia terminalnego kationu grupy N-metylowej (NH₂+CH₃) i wytworzenie oddziaływań elektrostatycznych z anionem karboksylanowym (COO⁻) D-alaniny.[13]

Tworzenie się wiązania wodorowego pomiędzy anionem karboksylanowym z ligandu a grupami NH antybiotyku potwierdzone zostały przy użyciu techniki krystalografii. Jak dotąd do analiz wykorzystywano głównie krótkie fragmenty peptydowe, takie jak di- i tripeptydowe, a badania nad tworzeniem się kompleksu wan-

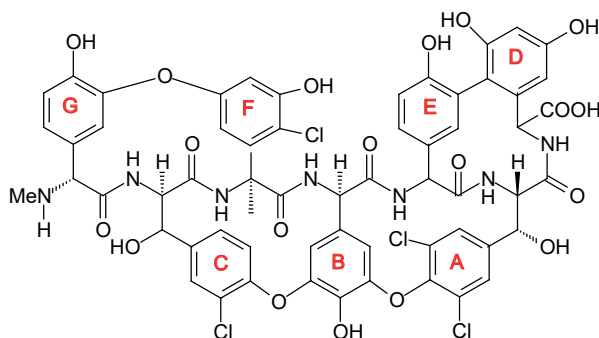
komocyny z dłuższymi fragmentami peptydoglikanu przez długi okres czasu były słabiej udokumentowane.

Pierwsze analizy z zastosowaniem fragmentu pentapeptydowego L-Ala-D-iGln-L-Lys-D-Ala-D-Ala przeprowadził Mueller [14]. Do badań wykorzystany został aglikon aridicyny A (Rys. 4), identyczny z fragmentem heptapeptydowym wankomocyny. Tworzenie się kompleksu potwierdziła m.in. zmiana przesunięć chemicznych dla atomów azotu z grup amidowych heptapeptydu (Tab. 4) [14].

Table 4. Zmiana przesunięć chemicznych atomów azotu (^{15}N) z grup amidowych pochodzących z łańcuch peptydowego aglikonu aridicyny A [14]

Table 4. Changing of chemical shifts nitrogen atom (^{15}N) amide groups coming from the peptide chain of the aglycone aridicyny A [14]

Label (etykieta)	Tripeptyd			Pentapeptyd		
	Wolny	Związany	Różnica	Wolny	Związany	Różnica
CNH	108,0	111,7	+3,7	108,0	111,7	+3,7
FNH	118,1	122,5	+ 4,4	118,4	122,6	+4,2
BNH	118,3	116,0	-2,3	118,1	115,9	-2,2
ENH	122,1	123,9	+1,6	122,1	123,8	+1,7
ANH	105,6	105,6	0,0	105,6	105,0	-0,6
DNH	128,3	128,3	0,0	126,5	126,8	+0,3



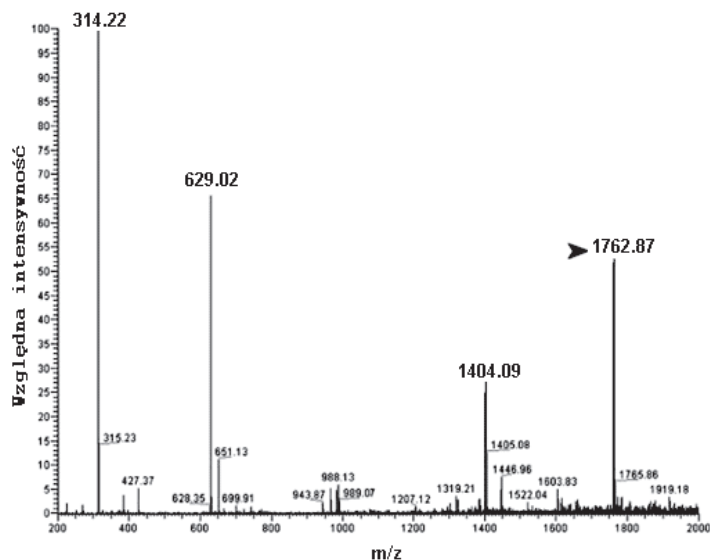
Rysunek 4. Aglikon aridicyny A [14]

Figure 4. Acridicine A aglycone [14]

Zmiany wartości przesunięcia chemicznego grup ANH oraz DNH wskazują, że również reszta D-iGln uczestniczy w tworzeniu kompleksu. Dalsze analizy wskazały również, że łańcuch boczny reszty D-iGln skierowany jest w kierunku 6 pierścienia aromatycznego aglikonu [15].

Oprócz spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego wykorzystano również inne techniki do badań wzajemnego oddziaływania w tworzącym się kompleksie pomiędzy fragmentem peptydoglikanu a wankomocyną. W tym celu wykorzystano powszechnie znaną technikę analityczną, taką jak wysoko-

sprawną chromatografię cieczową (ang. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Cieszy się ona również dużym zainteresowaniem wśród syntetyków, wykorzystujących ją do określania czystości otrzymywanych związków oraz ich oczyszczania, a także coraz częściej znajduje zastosowanie do badania tworzenia się kompleksów pomiędzy różnego typu związkami. Hermount wraz ze współpracownikami [16] wykorzystał tę metodę do badania zdolności tworzenia się kompleksów pomiędzy wankomycyną a fragmentem tripeptydowym (*N*- α -Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala) i jego analogami (*N*-*t*BuO-6-aminokaproilo-D-Ala-D-Ala i *N*-Me-6-aminokaproilo-D-Ala-D-Ala). Do rejestracji wyników wykorzystany został diodearray detektor 996 UV przy długości fali 280 nm i kolumna Symmetry-Shield™ RP C18. Fazę mobilną stanowił bufor octanu amonu (pH 5,0; 70 mM) (A) i acetonitril (B), przy zastosowanym gradiencie 95% A \rightarrow 5% A, w czasie 20 min. Wykorzystując różne stężenie „ligandów” stwierdzili, że przy stosunku molowym 1:25 (wankomycyna : fragment peptydowy) ma miejsce „zanik” wolnej wankomycyny o 52,2% i 73,9% w wyniku tworzenia się kompleksu odpowiednio z *N*- α -Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala i *N*-*t*BuO-6-aminokaproilo-D-Ala-D-Ala. W celu potwierdzenia tworzącego się kompleksu pomiędzy antybiotykiem a fragmentem peptydowym wykorzystano metodę ESI-MS. Jon molekularny 314 odpowiada masie molekularnej *N*-Me-6-aminokaproilo-D-Ala-D-Ala, 629,02 i 943,87 odpowiednio dimerowi i trimerowi pochodnej peptydowej, zaś 1404,09 fragmentacji wankomycyny (masa wankomycyny pomniejszona o grupę COOH) zaś 1762,87 wskazuje na tworzący się kompleks pomiędzy obydwoma typami związków (Rys. 5) [16].

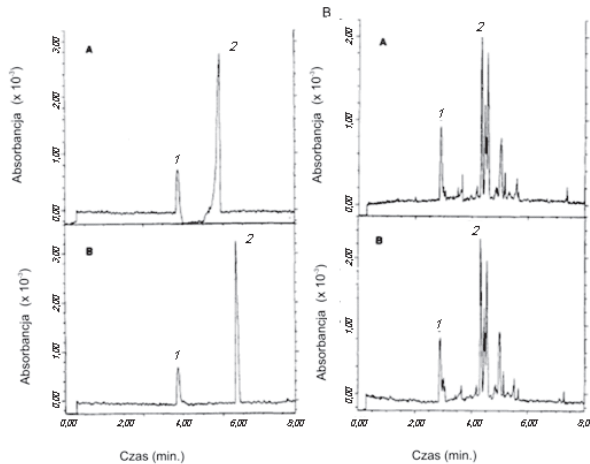


Rysunek 5. Analiza ESI oddziaływania wankomycyny z fragmentem peptydowym (*N*-Me-6-aminokaproilo-D-Ala-D-Ala) [16]

Figure 5. ESI analysis of interaction of vancomycin with a peptide fragment (*N*-Me-6-aminocaproilo-D-Ala-D-Ala) [16]

Wśród wielu technik analitycznych stosowanych do badań oddziaływania w tworzących się kompleksach typu ligand-receptor swoje zastosowanie znalazła również elektroforeza kapilarna. Okazała się metodą szybką i skuteczną w określaniu powinowactwa pomiędzy wankomycyną i fragmentami peptydowymi. Od kilku lat prezentowane są prace ukazujące zalety tej metody. Badania w głównej mierze przeprowadzone zostały przy wykorzystaniu prekursora peptydoglikanu UDP-*N*-acetylo-*D*-muramylo-*L*-Ala-*D*-Glu-*L*-Lys-*D*-Ala-*D*-Ala wyizolowanego ze szczepu gronkowca złocistego 209P oraz prekursora UDP-*N*-acetylo-*D*-muramylo-*L*-Ala-*D*-Glu-*L*-Lys-*D*-Ala-*D*-Lac (z *L. casei* 7469) i UDP-*N*-acetylo-*D*-muramylo-*L*-Ala-*D*-Glu-*L*-Lys-(*L*-Ala)-*D*-Ala-*D*-Lac (*L. mesenteroides* VR1) [17].

Pomiar wykonano w czasie 20 s przy natężeniu 7 μ A, z zastosowaniem buforu startowego (0,2 M glicyna, 0,03 M Tris) o pH 8,30 i stężeniu ligandu (wankomycyny) w buforze 25 mM. Stężenie nanoszonej próbki wynosiło 10 μ L prekursora peptydoglikanu i 10 μ L tlenu mesitylu. Zmiana czasu „retencji” z 4,3 min na 3,9 min potwierdziła tworzenie się kompleksu (Rys. 6). Podobna analiza przeprowadzona została dla próbek, w których C-terminalna reszta *D*-alaniny zastąpiona była *D*-mleczanem, ale w ich przypadku nie odnotowano żadnej zmiany na chromatogramie. Dodatkowo wykonana analiza Scatchard pozwoliła wykreślić stałą dysocjacji kompleksu prekursor peptydoglikanu – antybiotyk wynoszącą $K_d \sim 62,5 \mu\text{M}$ (stała wiązania – binding konstant – $K_b \sim 1,6 \cdot 10^{-5} \text{M}^{-1}$) [16].

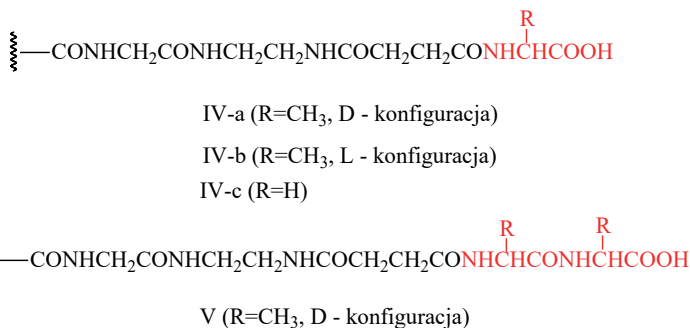


Rysunek 6. Ocena zdolności oddziaływania pentapeptydowego prekursora peptydoglikanu (A) *S. aureus* 209P, (B) *L. casei* 7469 z wankomycyną przy wykorzystaniu elektroforezy kapilarniej [17]

Figure 6. Evaluation of ability interaction of pentapeptide fragment of peptidoglycan precursor (A) *S. aureus* 209P, (B), *L. casei* 7469 with vancomycin using capillary electrophoresis [17]

Elektroforeza kapilarna coraz częściej wykorzystywana jest do badania oddziaływań pomiędzy enzymem a kofaktorem, proteiną-cukrem czy peptydem i antybiotykiem. Zaletą tej metody jest przypisanie różnych funkcji badanej próbce, zarówno roli receptora jak i ligandu.

Inne metody badania wzajemnego oddziaływania w tworzącym się kompleksie opierają się na wykorzystaniu poliakrylamidu. Yan wraz z współpracownikami zmodyfikował go resztami aminokwasowymi D-Ala, L-Ala, Gly oraz fragmentem peptydowym D-Ala-D-Ala wbudowane w linker [18]. Pełniły one rolę adsorbentów. Poprzez pomiar absorpcji określił on wzajemne powinowactwo „ligandu/adsorbentu” do antybiotyku. Zastosował dwa związki wankomycynę i demetylowankomycynę. Z przeprowadzonych analiz wynikało, że pochodna wankomycyny wykazywała się niższą zdolnością adsorpcyjną względem każdej zastosowanej pochodnej poliakrylamidowej, aniżeli jej pochodna i do tworzenia kompleksu konieczna jest obecność fragmentu dipeptydowego. Demetylowankomycyna dodatkowo tworzyła kompleks z resztami aminokwasowymi (Rys. 7, Tab. 5) [17].



Rysunek 7. Modyfikacja linkerów fragmentami peptydowymi [18]

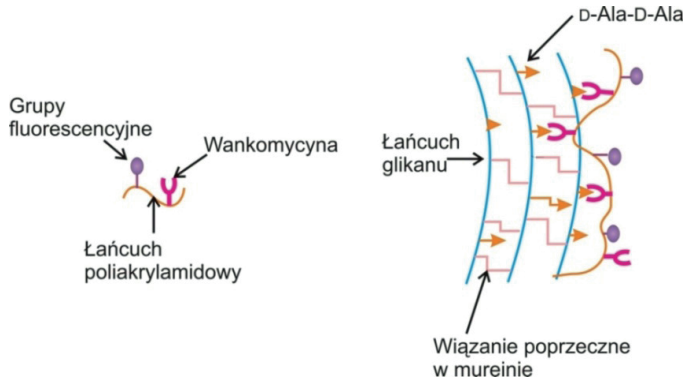
Figure 7. Modification linker by peptide fragments [18]

Table 5. Porównanie zmian absorpcji zmodyfikowanych dla fragmentów poliakrylamidu związanych w kompleksie z demetylowankomycyną lub wankomycyną [18]

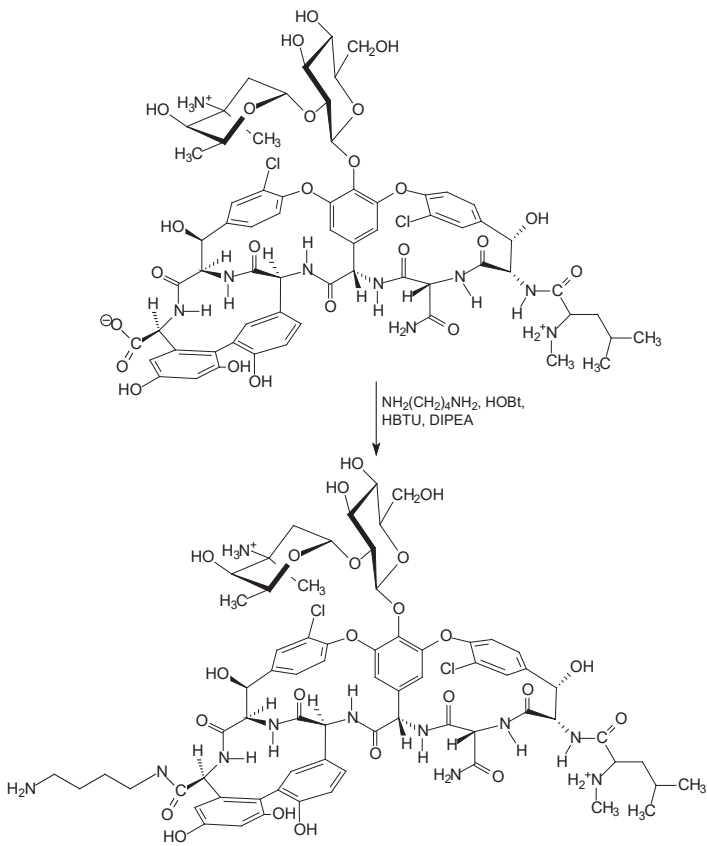
Table 5. Comparison of changes absorption for a modified polyacrylamide fragments bound in a complex with demetylovancomycin or vancomycin [18]

Adsorbent	Adsorpcja demetylowankomycyny		Adsorpcja wankomycyny	
	Stężenie (mmol/g)	Stężenie/unieruchomiony ligand	Stężenie (mmol/g)	Stężenie/unieruchomiony ligand
IV-a	0,35	0,83	–	–
IV-b	0,09	–	–	–
IV-c	0,29	0,56	–	–
V	0,59	1,44	0,53	1,29

Modyfikacja poliakrylamidu opierała się nie tylko na wbudowaniu w jego strukturę fragmentów peptydowych peptydoglikanu lecz również antybiotyku glikopeptydowego. Tego typu pracę przedstawił Whitesides i jego współpracownicy (Rys. 8) [19].

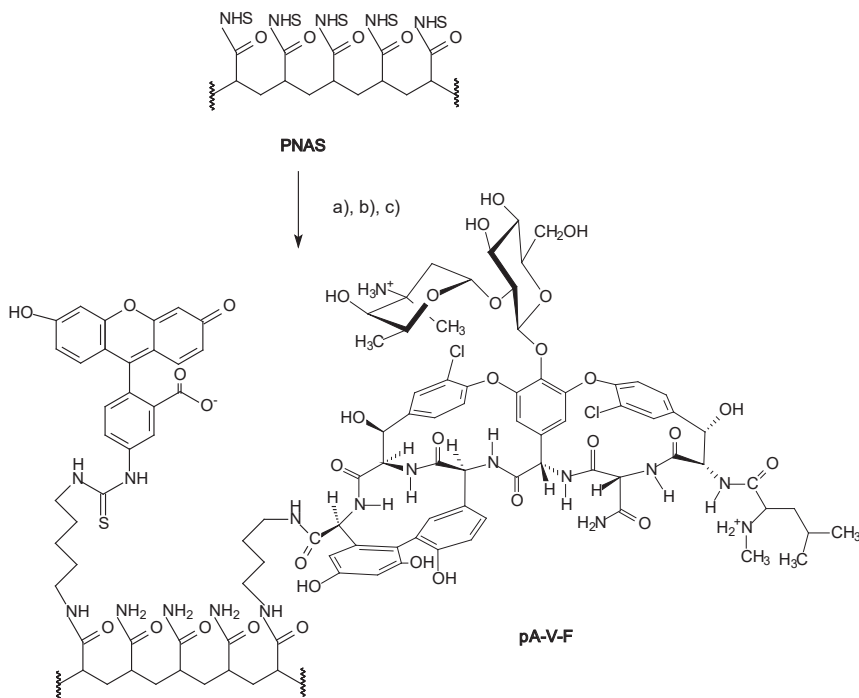


Rysunek 8. Modyfikacja poliakrylamidu grupami fluorescencyjnymi i wankomycyną [19]
 Figure 8. Modification of polyacrylamide by fluorescent groups and vancomycin [19]



Rysunek 9. Synteza zmodyfikowanej pochodnej wankomycyny [20]
 Figure 9. Synthesis of vancomycin derivative [20]

Model ten wykorzystuje zdolność tworzenia się kompleksu pomiędzy wankomycyną a C-terminalnym fragmentem dipeptydowym (D-Ala-D-Ala) pochodzącym z fragmentu mureiny. Zastosowany poliakrylamid pA zmodyfikowany został antybiotykiem glikopeptydowym – wankomycyną V (stanowiącym 5% polimeru) oraz grupą fluorescencyjną F (1%) (Rys. 8–10) [19].



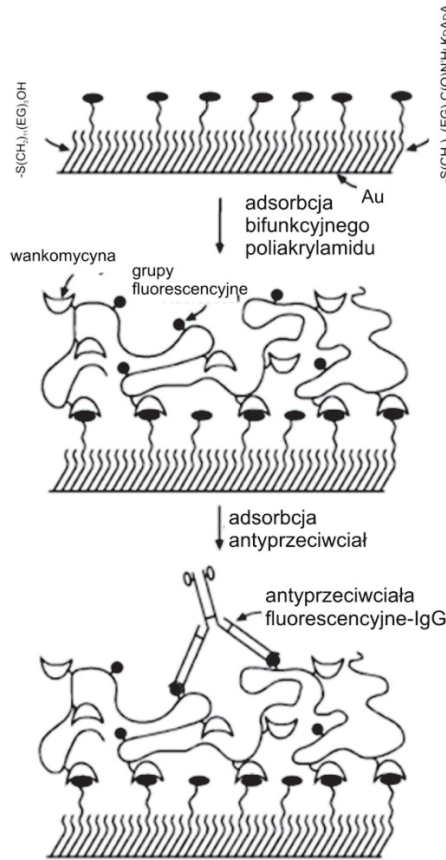
Rysunek 10. Synteza zmodyfikowanej pochodnej wankomycyny. Warunki syntezy: a) 0,02 ekwiwalentupochodnej fluorescencyjnej, Et_3N ; b) 0,01 ekwiwalentu pochodnej 5; c) $\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$ (aq) [20]

Figure 10. Synthesis of modified derivative of vancomycin. Conditions of synthesis: a) 0.02 equiv. fluorescence derivative, Et_3N ; b) 0.01 equiv. derivative 5; c) $\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$ (aq.) [20]

Wbudowanie grup fluorescencyjnych w strukturę pA opierało się na reakcji poly(*N*-akryloloksysukcynimidu) (PNAS) z 5-[(5-aminopentyl)tioureidylo] fluoresceiną (fluorescein cadaverine) w bezwodnym *N,N*-dimetyloformamidzie (DMF) w obecności trietyloaminy. Natomiast modyfikacja pA-F wankomycyną związana była z przyłączeniem do niej linkera (pochodnej diaminobutylowej), a następnie przy wykorzystaniu środków sprzęgających HOBt i HBTU wbudowanie jej w strukturę poliakrylamidu (Rys. 9 i 10). Ilość przyłączonych grup fluorescencyjnych i antybiotyku określona została na podstawie analizy ^1H NMR oraz spektroskopii UV-VIS [20, 21].

Badania przeprowadzone zostały kilkutorowo. Wstępne analizy opierały się na wykorzystaniu SAMs (ang. *self-assembled monolayers*) na której zakotwiczone zostały fragmenty peptydowe (*N*- α -Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala) [20, 21]. Powierzchnia

SAM została zaktywowana poprzez reakcję z $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{OH}$ (1,8 mM) i $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OCH}_2\text{COOH}$ (0,2 mM) w etanolu [21]. Wolna grupa karboksylowa zaktywowana została *N*-hydroksysukcynimidem i przyłączony został do niej fragment tripeptydowy. Obecność fragmentu *D*-Ala-*D*-Ala potwierdzona została przy wykorzystaniu techniki spektroskopii w podczerwieni (ang. *Polarized Infrared External Reflectance Spectroscopy*, PIERS) [20].



Rysunek 11. Model powierzchni samonośnej z wbudowanymi fragmentami peptydowymi *D*-Ala-*D*-Ala wykorzystywanej do badania oddziaływania z bifunkcyjnym poliakrylamidem [20]

Figure 11. Surface model of peptide fragments *D*-Ala-*D*-Ala used for studying the effect with bifunctional polyacrylamide [20]

Tworzące się oddziaływania pomiędzy wankomycyną a fragmentem dipetydowym potwierdzone zostały przy wykorzystaniu techniki spektroskopii rezonansu powierzchniowego (ang. *Surface Plasmon Resonance Spectroscopy*, (SPR)) oraz mikroskopu fluorescencyjnego (ang. *Fluorescence Microscopy*), potwierdzając tworzenie się stabilnego kinetycznie kompleksu, dla którego k_{off} (stała szybkości rozpadu) wynosi około $2 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ (Rys. 11) [20, 22].

Dodatkowo wykorzystanie metody fluorescencyjnej pozwoliło na określenie wzajemnego powinowactwa pomiędzy stosowanym antybiotykiem a produktami odpowiedzi immunologicznej organizmu (przeciwciałami czy makrofagami) lub z powierzchnią bakterii czy wirusów, gdzie grupa fluorescencyjna pełni rolę antygeny przeciwko którym organizm wytwarza specyficzne przeciwciała. Wykazano ponadto zdolność tworzenia kompleksu bifunkcyjnegopoliakrylamidu nie tylko z powierzchnią SAM lecz również z powierzchnią komórek bakteryjnych. W tym celu wykorzystano hodowlę szczepów *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* i *E. faecalis*. W przypadku bakterii Gram-ujemnych nie odnotowano tworzenia się kompleksu, co potwierdza, że wankomycyna nie jest skuteczna przeciwko tym bakteriom. Wykorzystanie przeciwciał [IgG(anty-fluor)] i metody cytometrycznej pozwoliło na kontrolę wzrostu komórek bakteryjnych szczepów podatnych na działanie wankomycyny, a także stworzyło dodatkowo możliwość wykorzystania tej techniki w przypadku szczepów VRSA [20].

UWAGI KOŃCOWE

Opracowane metody badań sił oddziaływania pomiędzy wankomycyną a fragmentem peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii Gram-dodatniej mogą posłużyć jako nowe techniki szybkiej selekcji nowych potencjalnych antybiotyków, w tym pochodnych glikopeptydowych. Skróci to niewątpliwie czas wprowadzenia nowych leków skierowanych do walki z zakażeniami wywołanymi przez bakterie Gram-dodatnie, a przede wszystkim *S. aureus*.

PODZIĘKOWANIA

Praca współfinansowana przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (POIG.01.01.02-14-102/09) oraz DS 530-8455 -D 501-15.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] a) New York Times, 1945, 26 lipiec, 21; b) S.B. Levy, *The Antibiotic Paradox: How the Misuse of Antibiotics Destroys Their Curative Powers*, 1992.
- [2] D.H. Williams, B. Bardsley, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1999, **38**, 1172.
- [3] M. Rekharsky, D. Heseck, M. Lee, S.O. Meroueh, Y. Inoue, Sh. Mobashery, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 7736.
- [4] C. Picard, A. Puel, J. Bustamante, C.L. Ku, J.L. Casanova, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2003, **3**, 451.
- [5] H.A. Verbrugh, P.K. Peterson, B.Y. Nguyen, S.P. Sisson, Y.J. Kim, *Immunol.*, 1982, **129**, 1681.
- [6] J. Casal, D. Tarrago, *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2003, **16**, 219.
- [7] D. Bogaert, P.W.H. Hermans, P.V. Adrian, H.C. Rumke, R. de Groot, *Vaccine*, 2004, **22**, 2209.

- [8] D.H. Williams, D.W. Butcher, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 5700.
- [9] D.H. Williams, D.W. Butcher, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 5697.
- [10] R. Kannan, C.M. Harris, T.M. Harris, J.P. Waltho, N.J. Skelton, D.H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 2946.
- [11] G.M. Sheldrick, P.G. Jones, O. Kennard, D.H. Williams, G.A. Smith, *Nature (London)*, 1978, **271**, 223.
- [12] Williamson, M.P.; Williams, D.H. *J. Chem. Perkin. Trans.*, 1985, **1**, 949.
- [13] S.W. Fesik, T.J. O'Donnell, R.T. Gampe Jr, E.T. Olejniczak, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 3165.
- [14] L. Mueller, S.L. Heal, J.C. Hempel, P. Jeffs, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 496.
- [15] L. Cegielski, S.J. Kim, A.W. Hing, D.R. Studelska, R.D. O'Connor, A.K. Mehta, J. Schaefer, *Biochemistry*, 2002, **41**, 13053.
- [16] O. Hernout, K. Berthoin, I. Delattre, P.M. Tulkens, S. Carryn, J. Marchand-Brynaer, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2007, **17**, 5758.
- [17] J. Liu, K.J. Volk, M.S. Lee, M. Pucci, S. Handwerger, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 2412.
- [18] H. Yan, Q. Zhao, J. Yuan, X. Cheng, B. He, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2000, **31**, 15.
- [19] V.M. Krishnamurthy, L.J. Quinton, L.A. Estroff, S.J. Metallo, J.M. Isaacs, J.P. Mizgerd, G.M. Whitesides, *Biomaterials*, 2006, **27**, 3663.
- [20] S.J. Metallo, R.S. Kane, R.E. Holmlin, G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 4534.
- [21] J. Lahiri, L. Isaacs, B. Grzybowski, J.D. Carbeck, G.M. Whitesides, *Langmuir*, 1999, **15**, 7186.
- [22] C.D. Bain, J. Evall, G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 7155.

Praca wpłynęła do Redakcji 17 czerwca

