

S2-04

- **Datum izdelave:** 2026-05-08
- **Koda seminarja:** S2-04

Analiza selektivnosti in bakterijske rezistence na ciprofloksacin

1. del naloge

Raziskovalno vprašanje:

Kako mutacije zmanjšajo učinkovitost ciprofloksacina (razvijejo antibiotično rezistenco), ne da bi popolnoma uničile funkcijo DNA giraze?

Rešitev:

1. Na spletu poišči, v katero skupino antibiotikov spada ciprofloksacin.

Fluorokinoloni

2. Podanih je 5 aminokislinskih zaporedij, ki vsebujejo mutacije. S pomočjo poravnav z WT GyrA iz E.coli določi, za katere mutacije gre (zaporedna št. in sprememba AK ostanka.

Uporabiti moramo NW globalno poravnavo in odčitati številko AK ostanka.

67A→S, 81G→C, 83S→L, 87D→N, 106Q→H

3. V Uniprot preveri, ali gre za mutacije, ki povzročijo odpornost na skupino antibiotikov, v katero spada ciprofloksacin. Ali so tam še druge mutacije? V katerem delu so zgoščene (od...do)? Pobrskaj po spletu, kako se reče dani regiji.

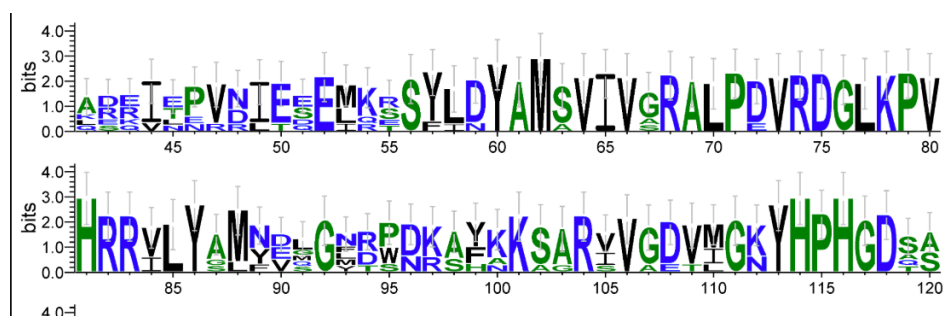
Da. So še druge mutacije. Večina mutacij, povezanih z rezistenco na fluorokinolone, je skoncentrirana v regiji približno med aminokislinskimi ostanki 67–106. Ta regija je v literaturi opisana kot QRDR (quinolone resistance-determining region).

4. Pripravi datoteko v FASTA formatu z WT zaporedji homologov vključno z E.coli.
5. Naredi poravnavo in za lažjo vizualizacijo pripravi tudi Sequence logo.

- Kje se pojavljajo mutacije? V ohranjenih ali neohranjenih delih encima?

Mutacije se pojavljajo v relativno ohranjenih delih encima. To kaže, da gre za funkcionalno pomembno regijo, povezano z vezavo fluorokinolonov.

Del, v katerem so mutacije (program Weblogo):



Slika 1: Del Sequence logo, kjer analiziramo mutacije.

- Ali se mutacije pojavljajo pomembni domeni ali v aktivnem mestu encima? Zakaj da oz. ne?
Mutacije se večinoma ne pojavljajo neposredno v katalitičnem aktivnem mestu (Tyr122), ampak v njegovi bližini, v QRDR regiji katalitične domene. Tako lahko zmanjšajo vezavo antibiotika, ne da bi bistveno zmanjšale osnovno funkcijo encima.
6. V strukturi WT proteina poišči mutirane ostanke. Ali se nahajajo blizu vezavnega ali aktivnega mesta? Ali so na površini ali v notranjosti encima?

So blizu aktivnega mesta in so na površini encima (katalitična domena).



Slika 2: 5 aminokislinskih ostankov, ki povzročijo rezistenco (roza). Z zeleno je označen Y122 (aktivno mesto). Vidi se, da je protein na površini.

7. Glede na ugotovitve predlagaj mehanizem delovanja antibiotika. Kako mutacije učinkujejo proti njemu?

Fluorokinoloni stabilizirajo kompleks encim–DNA po cepitvi DNA, pri čemer je pomembna koordinacija Mg^{2+} iona ter interakcije z aminokislinskimi ostanki v QRDR regiji, predvsem Ser83 in Asp87. Mutacije torej se ne zgodijo v aktivnem mestu, ampak na površini encima zraven njega. Konformacija se rahlo spremeni in vezava v antibiotika v kompleks ni možna.

2. del naloge

Raziskovalno vprašanje

Zakaj ciprofloksacin učinkovito deluje na bakterijsko DNA girazo in ne na človeško topoizomerazo II?

Rešitev

1. V Uniprot poišči zaporedje za podenoto A DNA giraze iz *E.coli*, podenoto A topoizomeraze IV (nanjo prav tako deluje ciprofloksacin) iz *E.coli* ter človeško topoizomerazo II.
2. Za tri proteine zapiši naslednje informacije:

Protein	Accession code	Funkcija	Dolžina	Aktivno mesto
GyrA_ECOLI	P0AES4	topoizomeraza tipa II, omogoča negativno superzvitje krožne DNA, od ATP odvisna	875 ak	Y122
PARC_ECOLI	P0AFI2	sproščanje superzvite DNA, od ATP odvisna	752 ak	Y120
TOP2A_HUMAN	P11388	povzroči dvoverižni prelom ene izmed verig DNA	1531 ak	Y805

3. Naredi MSA (lahko kar v Uniprot) in analiziraj podobnost. Odgovori:

- Ali sta si bakterijski tarči antibiotika bolj podobni druga drugi kot človeški protein? Razloži podobnosti/razlike.

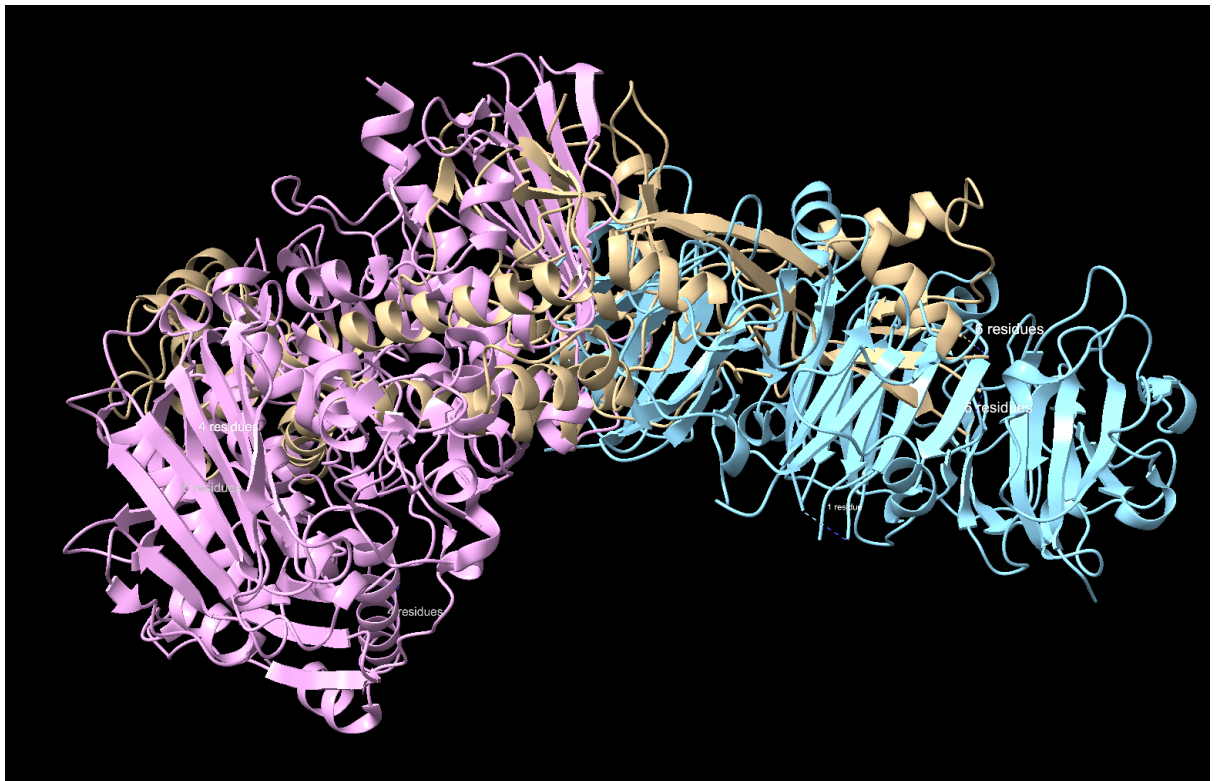
Bakterijska proteina sta si bolj podobna tako po dolžini kot po zaporedju katalitične domene. Drugače pa je veliko ohranjenih aminokislinskih ostankov v vseh treh proteinih, saj so vse topoizomeraze tipa II s podobno funkcijo.

- Ali se razlikujejo aminokislinski ostanki v aktivnem mestu?

Pri vseh proteinih je ohranjen tirozin v aktivnem mestu.

4. Primerjaj tudi strukture treh proteinov. Ali so si kaj podobne?







Strukture so si različne, kljub enaki katalitični funkciji. Človeški protein je tudi bolj kompleksen, vsebuje več regulatornih regij (slika 2)



Slika 3: Primerjava struktur treh proteinov (roza – topoizomeraza IV, modra – človeška topoizomeraza II, rumena – DNA giraza). Nekaj podobnosti je v katalitični domeni.

5. Glede na ugotovitve v prejšnjem delu preveri, ali so pomembni aminokislinski ostanki (tisti, ki ob mutaciji povzročijo rezistenco) enaki tudi pri človeku?

Pomembne mutacije so v okolici 67-106. Temu se tudi reče QRDR regija. V človeškem TOP2A so drugačni AK ostanki. (67D, 81L, 83K, 87E, 106R)

<input type="checkbox"/>  splP11388 TOP2A_HUMAN	REVKVAQLAGSVAE - MSSY - HHEMSLMMTIINLAQN	774
<input type="checkbox"/>  splP0AES4 GYRA_ECOLI	WNKAYKKSARVVGDIVGKYHPHGDSAVYDTIVRMAQP	95
<input type="checkbox"/>  splP0AFI2 PARC_ECOLI	ASAKFKKSARTVGDVVGKYPHGDSACYEAMVLMMAQP	92
P11388:Chain		
<input type="checkbox"/>  splP11388 TOP2A_HUMAN	FVGSNNLNL LQPIGQFGTRLHGGKDSASPRYIFTMLS	811
<input type="checkbox"/>  splP0AES4 GYRA_ECOLI	FSL - - RYMLVDGQGNFGSI - DG - DSAAAMRYTEIRLA	128
<input type="checkbox"/>  splP0AFI2 PARC_ECOLI	FSY - - RYPLVDGQGNWGAP - DDPKSFAMRYTESRLS	126

Slika 4: Podobnost v regiji 67-106. Ključni aminokislinski ostanki (83, 87) niso enaki.

6. Na poldagi vseh ugotovitev sklepaj, kako pride do selektivnosti antibiotika?

Selektivnost ciprofloksacina temelji na bistveno večji afiniteti do bakterijskega kompleksa DNA–topoizomeraza kot do človeške topoizomeraze II. Pri človeški topoizomerazi II ustrežna regija QRDR ni popolnoma ohranjena, zato je vezava antibiotika bistveno šibkejša. Posledično ciprofloksacin selektivno inhibira predvsem bakterijske topoizomeraze.