



**TURUN  
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen  
tiedekunta

# Indoli- ja karbatsoliaalkaloidien MRSA-aktiivisuus

Vaikutusmekanismit ja rakenneaktiivisuusvuorovaikutukset

Hanna Lammassaari

Luonnonyhdisteiden kemia

LuK-tutkielma

Laajuus: 9 op

19.4.2024

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

**Pääaine:** Kemia

**Tekijä(t):** Hanna Lammassaari

**Otsikko:** Indoli- ja karbatsoli alkaloidien MRSA-aktiivisuus: vaikutusmekanismit ja rakenneaktiivisuusvuorovaikutukset

**Ohjaaja(t):** Hanna Lammassaari

**Sivumäärä:** 18 sivua

**Päivämäärä:** 19.4.2024

---

Antibioottien liiallinen käyttö ja väärinkäyttö ovat edesauttaneet resistenttien bakteerikantojen syntyä. MRSA eli metisilliinille resistentti *Staphylococcus aureus* on bakteerikanta, joka on vastustuskykyinen useille yleisesti käytössä oleville keskeisille antibiootille. Luonnonyhdisteistä voidaan tulevaisuudessa saada yksi osaratkaisu antibioottiongelmaan ja alkaloidit ovat siihen potentiaalinen vaihtoehto. Alkaloidit ovat tyyppiä sisältävä, erikoistuneiden metaboliittien ryhmä, joita löytyy kasvi- ja eläinkunnasta jopa tuhansia erilaisia rakenteita. Tässä tutkielmassa keskitytään tarkemmin indoli- ja karbatsoli alkaloideihin ja niiden MRSA-aktiivisuuteen. Indoli- ja karbatsoli alkaloidit jakautuvat useaan eri alaluokkaan niiden kemiallisen rakenteen perusteella. Indoli- ja karbatsolirakenteen kemiallisen muokattavuuden ansiosta niistä saatavien yhdisteiden määrä on suuri.

Indoli- ja karbatsoli alkaloideilla on useita mekanismeja, joilla ne vaikuttavat MRSA:han. Ne pyrkivät häiritsemään bakteerin ja sen solukalvon normaalia toimintaa inhiboimalla esimerkiksi sen proteiineja, entsyymejä ja reseptoreja sekä DNA-synteesiä ja pyruvaattikinaasin toimintaa. Yhdisteiden rakenneaktiivisuutta voidaan parantaa huomattavasti modifioimalla rakennetta esimerkiksi hapetuksen, halogenoinnin tai dimerisoinnin kautta. Substituenttien lisäksi niiden asema yhdisteessä vaikuttaa antibakteriaaliseen aktiivisuuteen.

---

**Avainsanat:** alkaloidit, antibioottiresistenssi, erikoistuneet metaboliitit, indoli alkaloidi, karbatsoli alkaloidi, MRSA



## **Sisällysluettelo**

<b>1</b>	<b>Johdanto</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Indoliaalkaloidien rakenne</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Karbatsoliaalkaloidien rakenne</b>	<b>4</b>
<b>4</b>	<b>Vaikutusmekanismit</b>	<b>6</b>
4.1	DNA-synteesin inhibointi	6
4.2	Pyruvaattikinaasin inhibointi	8
4.3	Soluseinän toiminnan esto	10
<b>5</b>	<b>Rakeneaktiivisuusvuorovaikutukset</b>	<b>11</b>
5.1	Karbatsoliaalkaloidit	11
5.2	Indoliaalkaloidit	16
<b>6</b>	<b>Johtopäätökset</b>	<b>18</b>
	<b>Viitteet</b>	<b>19</b>

## Lyhenneluettelo

ADP	adenosiinidifosfaatti
AMR	mikrobilääkeresistenssi (engl. antimicrobial resistance)
AT	adeniini-tyrosiini -emäspari
ATP	adenosiinitrifosfaatti
DAPI	4,6-diamidino-2-fenyyli-indoli
IC	inhibointi potentiaali (engl. inhibitory potencies)
JE2	MRSA-bakteerikanta
LAC	MRSA-bakteerikanta
MIC	pienin bakteerin kasvun estävä pitoisuus (engl. minimal inhibitory concentration)
MBC	pienin bakteereja tappava pitoisuus (engl. minimal bacteriocidal concentration)
MRSA	metisilliiniresistentti <i>Staphylococcus aureus</i>
NADH	nikotiiniamidiadeniininukleotidi
T <sub>m</sub>	sulamislämpötila

# 1 Johdanto

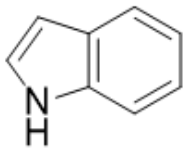
Antibioottien yleistymisen ja lisääntynyt käyttö on edesauttanut antibioottiresistenttien bakteerikantojen syntyä ja mikrobilääkeresistenssin voidaan sanoa olevan yksi suurimmista maailmanlaajuisista terveysuhista, sillä lähes kaikille käytössä oleville antibiooteille on olemassa resistentti bakteerikanta (Khan et al., 2022; Rehberg et al., 2020). Bakteerit jaetaan gram-negatiivisiin sekä gram-positiivisiin bakteereihin ja jälkimmäisestä ryhmästä suurin osa patogeenisistä bakteereista kuuluu *Staphylococcus*-sukuun. Tutkielmassani käsitelen juuri *Staphylococcus aureus*-suvun metisilliinille resistenttiä bakteerikantaa eli MRSA:ta ja siihen tehoavia alkaloideja. On tutkittu, että kyseinen resistentti kanta on syntynyt beetalaktaami- ja glykopeptidi-antibioottien liiallisesta ja pitkäkestoisesta käytöstä. Yleistynyt termi MRSA:lle on sairaalabakteeri ja se on kehittänyt resistenssin useille yleisesti tunnetuille antibiooteille, kuten vankomysiinille (Burchak et al., 2011).

Viime vuosien aikana luonnollisista lähteistä, kuten kasveista ja mikro-organismeista, saatavat antibakteriaaliset komponentit ovat osoittautuneet potentiaalisiksi tutkimuskohteiksi ja tulevaisuudessa mahdollisiksi antibioottien korvaajiksi (Burchak et al., 2011). Komponentteja on eristetty myös joistakin sienistä (M. fei Li et al., 2022). Tutkielmassa käsitellään alkaloidien antibakteriaalista aktiivisuutta MRSA:ta vastaan, ja esitellään niiden erilaisia mekanismeja sekä niiden rakenneaktiivisuutta eli sitä, kuinka rakenteiden muokkaaminen vaikuttaa yhdisteen antibakteriaaliseen aktiivisuuteen MRSA:ta vastaan. Alkaloidit ovat laaja tyyppiä sisältävä orgaaninen yhdisteryhmä, joka jakautuu kemiallisen rakenteen perusteella useaan alaluokkaan, ja joilla on antibakteriaalisen aktiivisuuden lisäksi monia muita biologisia aktiivisuuksia. Alkaloideja saadaan luonnollisesti kasveista tai valmistamalla synteettisesti johdannaisia, mikä lisää niiden rakenteellista monimuotoisuutta ja kemiallista muokattavuutta (Casciaro et al., 2020; Khan et al., 2022). Alkaloidien monimuotoisuuden vuoksi tutkielmassa keskitytään indoli- ja karbatsolialkaloideihin ja niiden rakenteen monimuotoisuuteen, rakenneaktiivisuuteen ja yleisiin mekanismeihin MRSA:ta vastaan.

Mahdollista yhdisteiden antibakteriaalista aktiivisuutta voidaan mitata erilaisilla menetelmillä, kuten fluoresenssimikroskopiolla käyttämällä leimattuja koettimia. Antibakteriaaliseen aktiivisuuteen linkittyvät myös vahvasti termit MIC ja MBC eli pienin bakteerin kasvun estävä pitoisuus ja pienin bakteereja tappava pitoisuus. Yksinkertaistettuna antibakteriaalisen aktiivisuuden määrittämiseksi MRSA:ta inkuboidaan kandidaattien eri konsentraatioissa ja määritetään, kuinka suuri osa bakteerista saatiin tapettua milläkin konsentraatiolla (Khan et al., 2022; Z. H. Liu et al., 2022).

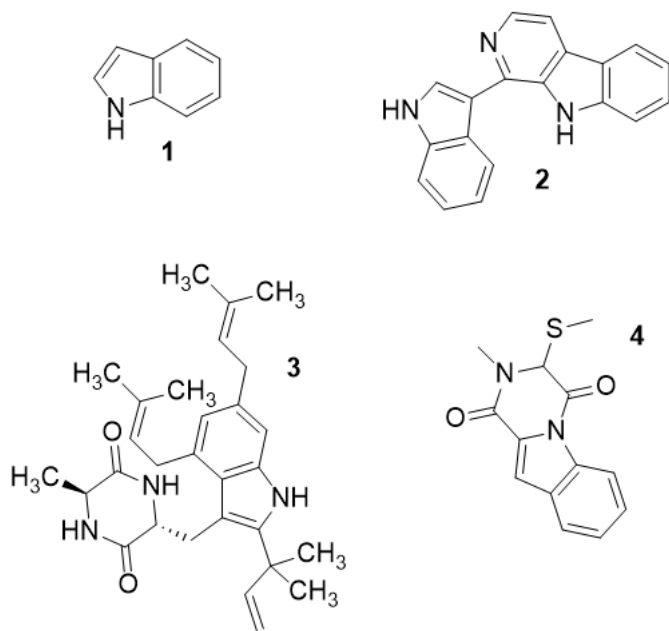
## 2 Indoli alkaloidien rakenne

Indoliytimen rakennetta (kuva 1) pidetään suurilta osin indoli alkaloidien aktiivisena osana ja syynä antibakteriaalisiin aktiivisuuksiin eri bakteereja vastaan (Omar et al., 2021; Yan et al., 2021). Indoli alkaloidit voidaan yleisesti jakaa kemiallisen perusrakenteen mukaan neljään ryhmään; monoindoli alkaloideihin, bis/tri-indoli alkaloideihin, prenyloituihin indoli alkaloideihin ja anneloituihin indoli alkaloideihin (kuva 2) (Wibowo et al., 2022). Monoindoli alkaloidit koostuvat indolin perusrakenteesta, joka on yleisesti tryptofaanin johdannainen ja, johon voi liittyä substituentteina muita ryhmiä, kuten etoksi- tai hydroksyyli ryhmiä. Myös elektrofiilisiä substituutioreaktioita tapahtuu usein, ja substituenttina toimii yleisimmin bromi tai jodi. Bis- ja tri-indoli alkaloidissa kaksi tai kolme indolin perusrakennetta on liittynyt yhteen. Kahden samanlaisen monoindolirakenteen liittyessä yhteen muodostuu homodimeeri, muussa tapauksessa heterodimeeri. Niiden indoliytimiin voi monoindolien tapaan liittyä erilaisia funktionaalisia ryhmiä, mikä luo monipuolisia rakenteita ja bis- ja tri-indoli alkaloidia tunnetaankin runsaasti erilaisia (Radwanski & Last, 1995).



**Kuva 1.** Indoliytimen perusrakenne

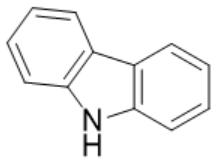
Prenyloidut indoli alkaloidit puolestaan sisältävät indolirakenteen lisäksi isopreeni yksikön. Prenyloidut indoli alkaloidit ovat indoli alkaloidien alaryhmä, joka on johdettu prenyylidifosfaateista ja tryptofaanista, ja joilla on monimuotoisia kemiallisia rakenteita ja sen vuoksi paljon erilaisia biologisia aktiivisuuksia. Tryptofaani toimii siis myös prenyloiduissa indoli alkaloidissa usein indolin lähteenä. Prenyloidut alkaloidit sisältävät vielä alaryhmiä, kuten asterrikinonit, jotka sisältävät kaksi tryptofaaniosaa. Prenyloidut alkaloidit muodostuvat liitettävän prenyyliosan rakenteesta riippuen liittymällä indolirakenteen N1-asemaan tai C2-, C3-, C5-, C6- tai C7-hiileen (S. M. Li, 2010). Anneloitu indoli alkaloidi tarkoittaa, että indoli yksikkö on yhdistynyt johonkin toiseen heterosykliseen renkaaseen. Yleisimmin indoli yksikkö liittyy rengasrakenteeseen, jossa osana rengasta on typpiä tai happea. Rengasrakenteeseen sen sijaan voi olla liittyneenä erilaisia funktionaalisia ryhmiä, kuten hydroksyyli ryhmiä, karboksyyli happo- tai eetterirakenteita (Wibowo et al., 2022).



**Kuva 2.** Esimerkit indoli alkaloidien ryhmien rakenteista: monoindoli alkaloidi (1), bis-indoli alkaloidi (2), prenyloitu indoli alkaloidi (3) ja anneloitu indoli alkaloidi (4)

### 3 Karbatsolialkaloidien rakenne

Karbatsolialkaloideja on tunnettu jo yli vuosisadan ajan, ja niitä yleisesti eristetään tietyistä kasvilajeista, kuten Clausena- tai Murraya-suvun kasveista (Knölker & Reddy, 2002). Karbatsolirunkoa voidaan pitää avainrakenteena niiden biologisille aktiivisuuksille. Karbatsolialkaloidit ovat potentiaalinen tutkimuksen kohde niiden rakenteellisen muokattavuuden vuoksi, sillä niistä pystytään muokkaamaan runsaasti uusia johdannaisia. Karbatsolin perusrakenne on trisyklinen, ja se syntyy pyrrolirenkaan ja kahden bentseenirenkaan fuusiossa (kuva 3) (Gluszynska, 2015). Kemiallisen rakenteen perusteella karbatsolialkaloidit voidaan erottaa seitsemään eri ryhmään; halogenoidut karbatsolialkaloidit, hapetetut karbatsolialkaloidit, pyridokarbatsolialkaloidit, indolikarbatsolialkaloidit, dimeeriset karbatsolialkaloidit, tetrahydrokarbatsolialkaloidit sekä muut substituoidut karbatsolialkaloidit (Ding et al., 2023).



**Kuva 3.** Karbatsolin perusrakenne

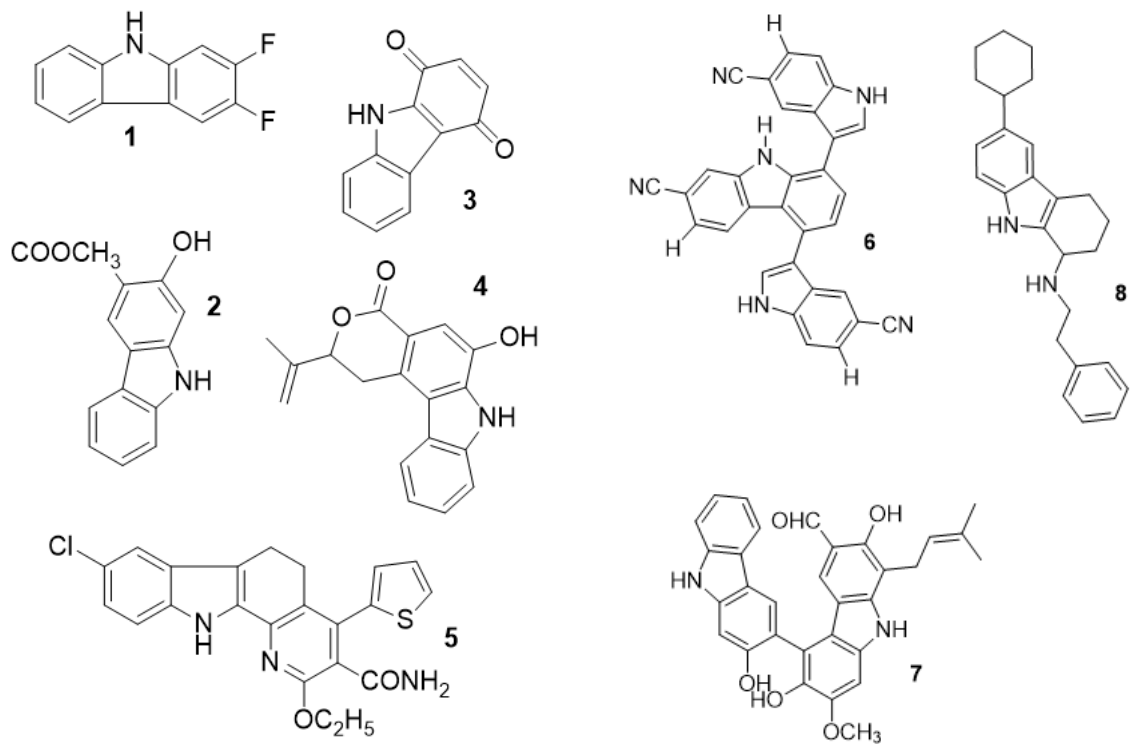
Halogenoiduissa karbatsolialkaloideissa yleisin substituentti on fluori, jota kutsutaan aryloiduksi fluoridiksi, kun se on liitetty karbatsolin aromaattiseen rakenteeseen. Fluoratuille karbatsolialkaloideille yleisin synteesimenetelmä on molekyylinsisäinen C-H-sidoksen arylaatio, jossa käytetään katalyyttinä palladiumia (Kong et al., 2016). Halogenoiduissa karbatsolialkaloideissa substituenttina voi esiintyä myös bromi, jodi tai kloori (M. C. Li et al., 2016) (Cheng et al., 2021). Halogenoitujen karbatsolialkaloidien yleisessä rakenteessa halogeenisubstituenttien määrä vaihtelee useimmiten yhdestä kuuteen (Ding et al., 2023).

Hapetetut karbatsolialkaloidit jakautuvat vielä alaluokkiin kuten, yksinkertaiset happisubstituoidut karbatsolialkaloidit, karbatsolikinonialkaloidit, pyranokarbatsolialkaloidit sekä furokarbatsolialkaloidit (Ding et al., 2023). Happisubstituoiduissa karbatsolialkaloideissa substituenttina on hydroksyyli ryhmä, karbonyyli ryhmä tai happi ja substituentti on renkaassa kiinni eetterisidoksella (Maneerat, Ritthiwigrom, et al., 2012). Karbatsolikinonialkaloideissa keskeisenä on alkaloidin kinonirakenne, jossa keskuksena on bentseenirengas, jonka vastakkaisilla puolilla on karbonyyli ryhmät. Pyrano- ja furokarbatsolialkaloideissa karbatsolin perusrakenteen toisen bentseenirenkaan rengasrakenteeseen on liittynyt joko typpi tai happi (Ding et al., 2023).

Indolikarbatsolialkaloideissa yhdistyvät edellä mainitut indolin ja karbatsolin rakenteet. Indolikarbatsolialkaloideissa on siis yhteensä kolme bentseenirengasta sekä kaksi tyyppiä sisältävää heterogeenistä rengasta. Yleinen rakenne voi muokkautua erilaisten kemiallisten reaktioiden



seurauksena (Morshed et al., 2021). Dimeerisissä karbatsoliaalkaloideissa kaksi karbatsolirakennetta on liittynyt yhteen yleensä kahden hiilen välisellä sidoksella. Tetrahydrokarbatsoliaalkaloidien perusrakenne koostuu trisyklisestä aromaattisesta rakenteesta, joka on muodostunut, kun pyrrolirengas on fuusioitunut bentseeni- ja sykloheksaanirenkaaseen. Perusrakenteeseen on voinut liittyä myös enemmän bentseenirenkaita, sykliä rakenteita, rikkisiltoja tai substituentteja, minkä vuoksi ryhmän rakenteet ovat monipuolisia. Viimeisenä alaluokkana ovat muut substituoidut karbatsoliaalkaloidit, jotka eivät sisällä keskenään muita rakenteellisia yhtäläisyyksiä kuin karbatsolin perusrakenteen (Ding et al., 2023).



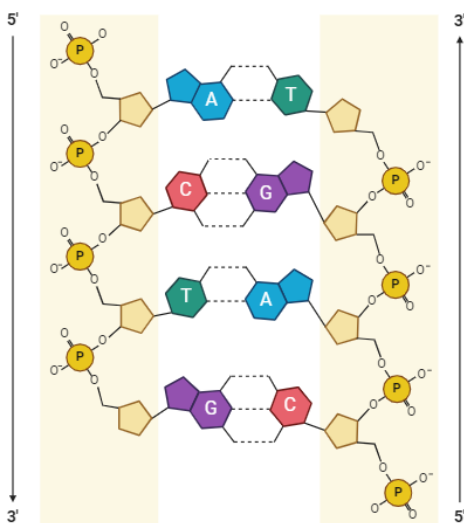
**Kuva 4.** Esimerkkirakenteita karbatsoliaalkaloidien alaluokista: halogenoitu karbatsoliaalkaloidi (1), hapetettu karbatsoliaalkaloidi (2), karbatsolikinoniaalkaloidi (3), pyranokarbatsoliaalkaloidi (4), pyridokarbatsoliaalkaloidi (5), indolikarbatsoliaalkaloidi (6), dimeerisoitu karbatsoliaalkaloidi (7) ja tetrahydrokarbatsoliaalkaloidi (8)

## 4 Vaikutusmekanismit

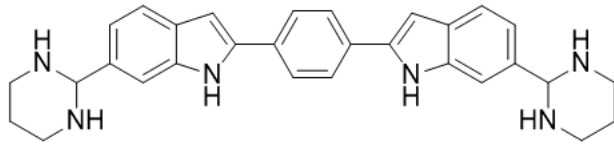
Indolialkaloideille on esitetty useita mahdollisia mekanismeja, joilla ne pyrkivät vaikuttamaan MRSA:han, mutta yhtäkään vaikutusmekanismia ei vielä tunneta kovin tarkasti. Indolialkaloidit kykenevät vaikuttamaan inhibiivasti bakteerien eri proteiineihin, entsyymeihin sekä reseptoreihin ja sitä kautta häiritsemään bakteerin normaalia toimintaa (Y. Liu et al., 2020). Indolialkaloidien on myös esimerkiksi esitetty inhiboivan MRSA:n DNA-synteesiä tai pyruvaattikinaasia sekä häiritsevän solukalvon normaalia toimintaa. Solukalvon mekanismi on vielä tuntematon, mutta on havaittu, että indoli- ja karbatsolialkaloidit eivät vaikuta solukalvon synteesiin vaan muihin sen toimintoihin, kuten solukalvon läpäisevyyteen tai protonigradiettiin. Mekanismin tunteminen on tärkeä osa lääkekehitystä, jotta indolialkaloidien antibakteriaalista aktiivisuutta voidaan tehokkaasti hyödyntää MRSA:ta vastaan (Opperman et al., 2016).

### 4.1 DNA-synteesin inhibointi

On osoitettu, että etenkin bis-indolialkaloidien kohde MRSA:ssa on DNA. Tälle syynä pidetään sitä, että osalla tutkituista bis-indolialkaloideista on rakenteellisia samankaltaisuuksia sellaisten yhdisteiden kanssa, jotka yleisesti sitoutuvat DNA:n kaksoiskierteen pienempään uraan (kuva 5), kuten DAPI eli 4,6-diamidino-2-fenyyli-indoli. Näitä rakenteellisia ominaisuuksia ovat esimerkiksi tasomaiset rakenteet, joissa on kationisia funktionaalisia ryhmiä ja heteroatomeja, jotka pystyvät muodostamaan vetysidoksia DNA:n B-muodon eli yleisimmän muodon kanssa. Vetysidokset muodostuvat juuri pienen uran kohtiin (Opperman et al., 2016). DNA:han vaikuttavista yhdisteistä potentiaalisimpana tutkimuksessa pidettiin MBX-1162 eli trifluoroasetatti (Kuva 6) (Butler et al., 2010). Tutkimuksessa tarkasteltiin soluissa yhdisteiden sitoutumista DNA:han sekä määritettiin niiden DNA-sekvenssien koostumusta, joihin bis-indolialkaloidit selektiivisesti sitoutuvat. Myös niiden sitoutumisaffiniteetit määritettiin.



**Kuva 5.** DNA:n kaksoisheliksirakenne, jossa osoitettu nuolella indolialkaloidien sitoutumiskohta.



1,4-bis(6-(heksahydropyrimidin-2-yyli)-1 H-indol-2-yyli)bentseeni

**Kuva 6.** Yhdiste MBX-1162:n rakenne, jolla on todettu potentiaalia MRSA:n DNA-synteesin inhiboinnissa.

Sitoutumisen havaitsemiseksi käytetään leima-aineita, jotka fluoresoivat, kun bis-indoli alkaloidi sitoutuu DNA-juosteeseen. Sitoutuminen tapahtuu juosteen AT -emäspareihin, jolloin sitoutuminen ja sitä kautta DNA- ja RNA-synteesin inhiboiminen on voimakkainta DNA:n kohdissa, jotka sisältävät runsaasti AT-emäspareja. Tutkittu yhdiste laskee fluoresenssia, mikä tarkoittaa suurempaa sitoutumisaffiniteettiä DNA:ta kohtaan. Tutkimuksessa määritettiin, että bis-indolien sitoutumisen kannalta parhaat sekvenssit olivat 5'-AATT-3' sekä 5'-AAAT-3' (Opperman et al., 2016).

Eri bakteerisolujen DNA:n sitomiskykyä ja sen riippuvuutta annetusta annoksesta testattiin kolmen eri kandidaatin välillä (MBX-1066, MBX-1162 sekä MBX-1095). Vertailuyhdisteenä käytettiin netropsiinia, jonka tiedetään yleisesti omaavan kyvyn sitoutua DNA:han, kun kaksoiskierteen sokerifosfaattirungot lähellä toisiaan (minor groove). Määrittäminen suoritettiin altistamalla bakteerisolut yhdisteille 20 minuutin ajan, ja tuloksena saaduista annosvaste -käyristä määritettiin inhibointikonsentraatiot. Niistä saatiin selville, että MBX-1162 sekä MBX-1066 sitoutuvat DNA:han suurimmalla affiniteetillä. DNA-synteesin lisäksi yhdisteet osoittivat aktiivisuutta myös RNA:n ja soluseinän synteesiä kohtaan (Opperman et al., 2016).

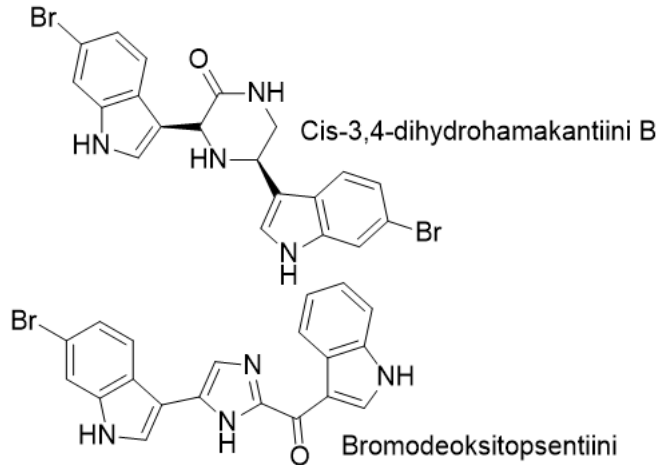
DNA-synteesin inhiboiminen perustuu siihen, että yhdisteen sitoutuessa DNA:n kohtaan, jossa kaksoiskierteen sokerifosfaattirungot ovat lähellä toisiaan, se stabiloi DNA:n kaksoisheliksirakennetta. DNA-synteesissä kaksoisheliksin tulisi purkautua, jolloin sen stabiloituminen heikentää DNA- ja RNA-polymeraasien aktiivisuutta. Yhdisteen sitoutumisaffiniteetti DNA:ta kohtaan on suoraan verrannollinen DNA:n T<sub>m</sub>-arvoon eli sulamislämpötilaan. Sulamislämpötila määritellään lämpötilan arvona, jossa DNA:sta puolet on yksinauhaisessa ja puolet kaksinauhaisessa muodossa. Suuremman sulamislämmön omaaviin sekvensseihin tutkittavat yhdisteet sitoutuvat tiukemmin, ja tästä seuraa voimakkaampi DNA- ja RNA-synteesin inhibointi. DNA:n pieneen uraan sitoutuvat yhdisteet muuttavat sen rakennetta huomattavasti, jolloin DNA:n replikaatiossa ja transkriptiossa vaadittavat proteiinit eivät pysty sitoutumaan uraan ja synteesi estyy. Tutkimuksissa on havaittu, että DNA:ta sitovien bis-indoliyhdisteiden vaikutukset bakteerien fysiologiaan ovat monimutkaisemmat kuin aiemmin on ajateltu ja pidetäänkin epätodennäköisenä, että yhdisteiden DNA-sitoutumisaktiivisuus ja sitä kautta DNA-synteesin inhibointi yksinään saisivat aikaan niin nopean bakterisidisen eli bakteereja tappavan vaikutuksen (Opperman et al., 2016).

## 4.2 Pyruvaattikinaasin inhibointi

Pyruvaattikinaasia on tutkittu mahdollisena uutena lääkkeen vaikutuskohteena, sillä se on keskeinen entsyymi MRSA:n aineenvaihdunnassa. Pyruvaattikinaasin tärkein tehtävä on osallistua hiilihydraattiaineenvaihduntaan sen katalysoidessa glykolyysin viimeistä vaihetta, jossa fosfaattiryhmä siirretään fosfoenolipyruvaatilta ADP-molekyylille, jolloin syntyy pyruvaattia sekä ATP-molekyyli. ATP:n tuotto riippuu siis suoraan pyruvaattikinaasin toiminnasta ja sen inhibointi estää ATP:n tuoton (Zoraghi et al., 2011). Pyruvaattikinaasi koostuu alayksiköistä, joista jokainen koostuu kolmesta tai neljästä domeenista (Tulloch et al., 2008). MRSA:n rakenne on melko samankaltainen ihmisen pyruvaattikinaasiin verrattuna, mutta suurin rakenteellinen eroavaisuus ja kriittinen rakenne MRSA:n pyruvaattikinaasin inhiboinnissa on alayksiköiden välinen rajapinta, johon indoli alkaloidit pystyvät sitoutumaan (Gatadi et al., 2019). Kun MRSA:n pyruvaattikinaasiin vaikuttavien yhdisteiden sitoutumispaikka tiedetään, mahdollistaa se entistä tarkempien ja tehokkaampien inhibiittoreiden suunnittelun (Zoraghi et al., 2011).

Bis-indoli alkaloidien aktiivisuutta MRSA:n pyruvaattikinaasia vastaan määritettiin NADH:n hapettumisreaktiolla, joka johti absorbanssin muutokseen 340 nm:n aallonpituudella. Pyruvaattikinaasi katalysoi kyseistä reaktiota, ja pyruvaattikinaasiaktiivisuus ilmaistaan ominaisaktiivisuutena, joka määritellään pyruvaattikinaasin määränä, joka katalysoi 1  $\mu\text{mol}$  tuotteen muodostumista NADH:n hapettumisreaktiossa. Reaktiot suoritettiin 30 asteessa 5 minuutin ajan, ja tuloksia voidaan pitää luotettavina, sillä jokaista saatua arvoa kohden tehtiin kolme rinnakkaista mittausta (Zoraghi et al., 2011).

Tutkimuksissa on pystytty tunnistamaan joukko rakenteita, jotka ovat osoittaneet inhiboivaa aktiivisuutta MRSA:n pyruvaattikinaasia vastaan, ja sen lisäksi estäneet MRSA:n kasvua in vitro. Potentiaalisimmat yhdisteet olivat cis-3,4-dihydrohamakantiini B sekä bromodeoksitopsentiini (kuva 7). Kasvun inhiboimista testattiin 96-kuoppaisella mikrotiitterilevyllä, johon tehtiin tutkittavista yhdisteistä laimennossarja, jossa konsentraatiot vaihtelivat välillä 100–0,5 g/ml. Tästä pystyttiin määrittämään tutkittaville yhdisteille MIC-arvo, jossa MRSA:n solujen kasvu estyi kokonaan. Vertailuyhdisteenä käytettiin erytromysiiniä, joka on yleinen bakteerien lisääntymistä estävä antibiootti (Zoraghi et al., 2011).



**Kuva 7.** Potentiaalisimmat yhdisteet MRSA:n pyruvaattikinaasin inhibointiin.

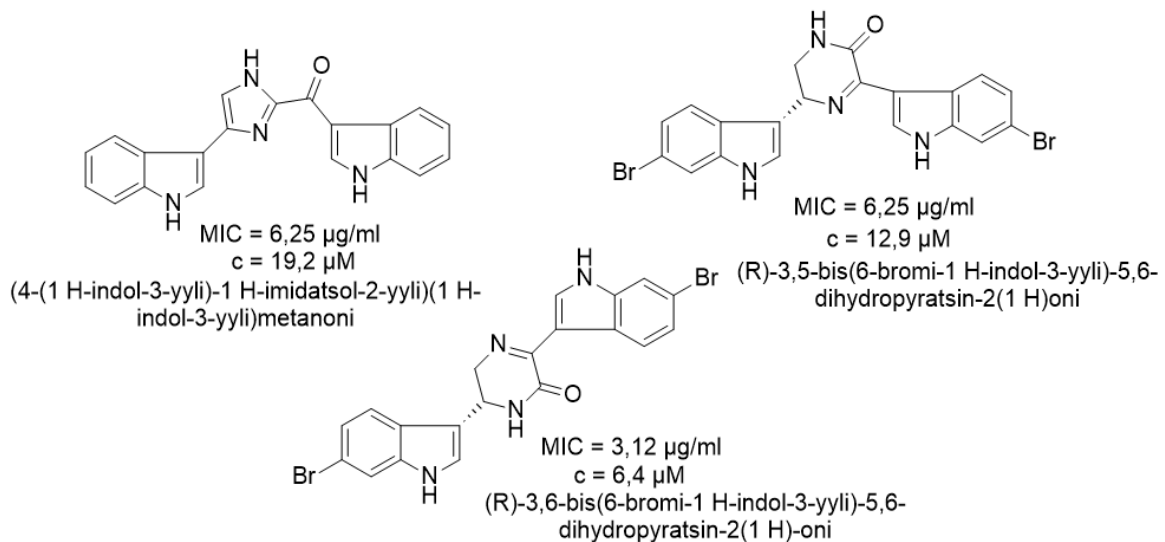
Kuvan 7 yhdisteillä havaittiin tutkimuksessa merkittävästi selektiivistä inhibointiaktiivisuutta MRSA:n pyruvaattikinaasia vastaan verrattuna ihmisen pyruvaattikinaasiin. Kyseiset yhdisteet vaikuttivat selkeämmin MRSA:n pyruvaattikinaasiin kuin ihmisen pyruvaattikinaasiin. Yhdisteille määritettiin myös niin sanotut IC-arvot (engl. inhibitory potencies), jotka olivat pienemmät kuin vertailuyhdisteellä (NSK5-15), joka on jo aiemmin havaittu MRSA:n pyruvaattikinaasin inhibiittori. Näiden tulosten pohjalta kyseisiä rakenteita pidetään potentiaalisena lähtökohtana spesifisempien pyruvaattikinaasin inhibiittorien kehityksessä (Zoraghi et al., 2011).

Tutkimuksessa määritettiin myös yhteiskiteytyksellä MRSA:n pyruvaattikinaasin rakennetta ja sen mahdollisia muutoksia, kun tutkittavat pyruvaattikinaasi-inhibiittorit sitoutuivat siihen. Pyruvaattikinaasin rakenne normaalioloissa on tetrameerinen, ja kaikilla monomeereillä on sama konformaatio molekyylin sisäiseen runkoon nähden. Inhibiittorin sitoutuminen aiheutti pienen, mutta merkittävän konformationalisen uudelleenjärjestäytymisen tetrameerirakenteen monomeerisissä yksiköissä. Sitoutumisen yhteydessä havaittiin pyruvaattikinaasin tetrameerirakenteen rajapinnassa niin sanottu ”sidostasku” (engl. binding pocket), joka muodostuu vierekkäisten alayksiköiden helix-rakenteiden vuorovaikutuksesta. MRSA:n pyruvaattikinaasin rakenteellinen vertaaminen eukaryoottisten eliöiden pyruvaattikinaasiin selittää bis-indolien selektiivisyyden MRSA:n pyruvaattikinaasia kohtaan. Eukaryoottinen pyruvaattikinaasi sisälsi samanlaisen sidostaskun kuin MRSA:n pyruvaattikinaasin rakenteessa on, mutta merkittävin ero oli, että sidostaskua ympäröivä rakenne oli merkittävästi tiukemmin pakkautunut, jolloin pääsy sidostaskuun estyy. MRSA:n pyruvaattikinaasin inhiboinnissa potentiaalisimpina rakenteina pidettiin kuvassa 7 esiintyviä yhdisteitä (Zoraghi et al., 2011).

### 4.3 Soluseinän toiminnan esto

Gram-positiivisilla bakteereilla, kuten MRSA:lla, on soluseinässään pintaproteiineja, joilla on keskeinen rooli niiden elintoimintojen kannalta. Pintaproteiinit auttavat bakteeria kiinnittymään tiettyihin elinkudoksiin, tunkeutumaan isäntäsoluun ja välittämään isäntä-immuunivasteita. Nämä virulenssiin vaikuttavat proteiinit sitoutuvat kovalenttisesti bakteerin soluseinän peptidoglykaaniin eli mureiiniin, jonka muodostumista katalysoi transpeptidaasit, joita kutsutaan sortaaseiksi. Soluseinän toiminnan inhiboiminen tapahtuu siis välillisesti inhiboimalla sortaaseja, jotka vaikuttavat peptidoglykaanin muodostumiseen, joka on soluseinän keskeinen rakennusaine (Oh et al., 2005).

MRSA:n tapauksessa sortaasi A on se proteiini, jolla on kriittinen rooli patogeneesissä. Se muokkaa bakteerin kykyä kiinnittyä isäntäkudokseen ankkuroimalla proteiineja kovalenttisesti peptidoglykaaniin. Mutantit, joissa ei ole sortaasi A:ta, eivät ilmennä bakteerin normaaleja pintaproteiineja ja siksi infektiot muodostuvat puutteellisesti. Tutkimuksissa on havaittu useita bis-indolialkaloideja, jotka kykenevät inhiboimaan sortaasi A:ta, ja niiden rakenteet ovat monimuotoisia (kuva 8) (Oh et al., 2005). Yhdisteille mitattuja IC-arvoja verrattiin tunnettuun sortaasi A:n inhibaattoriin,  $\beta$ -sitosteroli-3-*O*-glykopyranosidiin (Kim et al., 2003). Vaikka kuvan 8 yhdisteistä kahdella on sama inhibointipitoisuus massakonsentraationa ilmoitettuna, muutettaessa arvot molaarisiksi konsentraatioiksi, rakenteiden välille saadaan selvä ero niiden tehokkuudessa MRSA:n sortaasi A-entsyymiä vastaan.



**Kuva 8.** Potentiaaliset yhdisteet sortaasi A:n inhibointiin.

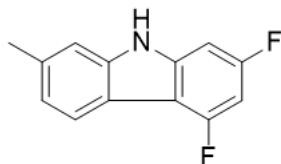
Aktiivinen sortaasi entsyymi vaaditaan siihen, että MRSA pystyy sitoutumaan eukaryoottisolujen matriiseihin tai solun pinnan proteiineihin, kuten fibrinonektiiniin (Wiley & Schneewind, 1999). Sortaasi-inhibiittorin tulisi inhiboida sortaasin aktiivisuutta in vivo sekä vähentää fibrinonektiini-proteiinin ilmenemistä bakteerin pinnalla. Mahdollisten inhibiittoreiden vaikutuksia testattiin määrityksellä, jossa bakteerisolujen tarttuminen fibrinonektiinillä päällystettyihin levyihin kvantifioitiin mittaamalla absorbanssi väriaineella leimaamisen jälkeen (Oh et al., 2005).

## 5 Rakenneaktiivisuusvuorovaikutukset

Indoli- ja karbatsolialkaloidit ovat kemiallisen rakenteensa puolesta helposti muokattavia, jolloin niiden perusrungosta saatavien yhdisteiden määrä on suuri. Kaikki indoli- tai karbatsolialkaloidit eivät omaa samanlaisia aktiivisuuksia MRSA:ta kohtaan, vaikka yhdisteiden perusrunko on samanlainen. Jopa yhden funktionaalisen ryhmän muutos voi vaikuttaa merkittävästi aktiivisuuteen negatiivisesti tai positiivisesti. Indoli- ja karbatsolialkaloideihin kuuluvat rakenteet eroavat toisistaan useimmiten perusrunkoon liittyneiden substituenttien tai yhteenliittyneiden perusrunkorakenteiden lukumäärän perusteella (Ding et al., 2023, Wibowo et al., 2022).

### 5.1 Karbatsolialkaloidit

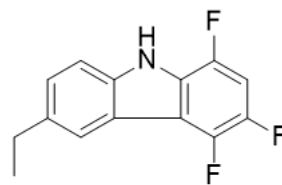
Karbatsolialkaloidien rakenneaktiivisuusvuorovaikutukset kytkeytyvät vahvasti aiemmin esiteltyihin karbatsolialkaloidien alaluokkiin. Halogenointi on tyypillinen aktiivisuutta lisäävä tekijä, mutta halogeeniatomit vaikuttavat aktiivisuuteen eri tavoin (Ding et al., 2023). Fluoriatomit ovat tyypillisimpiä substituentteja juuri lääkaineina käytetyissä karbatsolialkaloideissa. Fluorisubstituoitujen karbatsolialkaloidien synteesi tapahtuu esimerkiksi käyttämällä metallista palladium-kupari eli Pd-Cu-katalyyttiä molekyyllinsisäisessä arylaatioreaktiossa. Arylaatioreaktiossa aromaattisen renkaan vety korvataan toisella atomilla, tässä tapauksessa fluorilla. Useat fluorisubstituoitut karbatsolialkaloidit osoittivat merkittävää aktiivisuutta MRSA:ta vastaan (kuva 9). MIC-arvot olivat parhaimmillaan 3,125 µg/mL riippumatta, oliko fluorisubstituentteja liittyneenä aromaattiseen renkaaseen yksi, kaksi vai kolme (Kong et al., 2016). Kun artikkeleissa olleet arvot muutetaan molaariseen konsentraatioon, saadaan kuitenkin selville, että fluorisubstituenttien määrä vaikuttaa konsentraation arvoon. Kuvan 9 yhdisteiden runkorakenteissa on myös hieman eroa, mutta jos runkorakenteiden oletetaan olevan samat, fluorisubstituenttien määrän kasvu vaikuttaa molaariseen konsentraatioon pienentävästi.



2,4-difluori-7-metyyli-9H-karbatsoli

MIC = 3,125 µg/mL

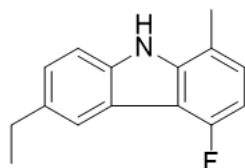
c = 14,4 µM



6-etyyli-1,3,4-trifluori-9H-karbatsoli

MIC = 3,125 µg/mL

c = 12,5 µM



6-etyyli-4-fluori-1-metyyli-9H-karbatsoli

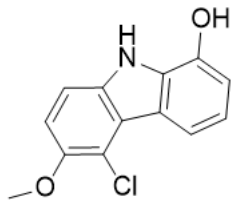
MIC = 3,125 µg/mL

c = 13,7 µM

**Kuva 9.** Fluoria sisältävät karbatsolirakenteet, jolla on havaittu merkittävää aktiivisuutta MRSA:ta vastaan.

Klooriatomeilla on fluoriatomien tavoin aktiivisuutta lisäävä vaikutus (Ding et al., 2023). Tutkimuksissa kasveista on eristetty ja analysoitu neljä rakennetta, klokarbatsomysiinit A-D, joiden perusrakenne ja klooriatomien lukumäärä sekä asema yhdisteessä ovat samat. Kloorisubstituoiduissa karbatsolialkaloideissa on usein substituenttina myös happea ja tässä se on yhdisteitä erottava tekijä. Yhdisteiden rakenteissa oli hydroksyyli-ryhmä tai eetterihappi hieman eri kohdissa yhdisteitä, mikä aiheutti erot yhdisteiden aktiivisuuksissa. Potentiaalisin kandidaatti MRSA:ta vastaan havaittiin olevan klokarbatsomysiini C (kuva 10), jolla on karbatsolin perusrakenne, johon on liittyneenä C3-asemaan eetterihappi, C4-asemaan kloori ja C8-asemaan hydroksyyli-ryhmä. Hydroksyyli-ryhmä oli MRSA-aktiivisuuden kannalta olennainen. Yhdisteen MIC-arvo oli 32 µg/mL MRSA:ta ja muita tutkittuja bakteerikantoja vastaan eli melko hyvä, mutta runsaasti suurempi kuin fluorisubstituoiduilla karbatsolialkaloideilla. Molaarisesti konsentraatioksi muutettuna klokarbatsomysiini C:n konsentraatio on 129,2 µM. Klokarbatsomysiini A:n, B:n ja D:n MIC-arvot olivat 128 µg/mL eli melko heikkoa aktiivisuutta osoittava (Cheng et al., 2021).





5-kloori-6-metoksi-9H-karbotsol-1-oli

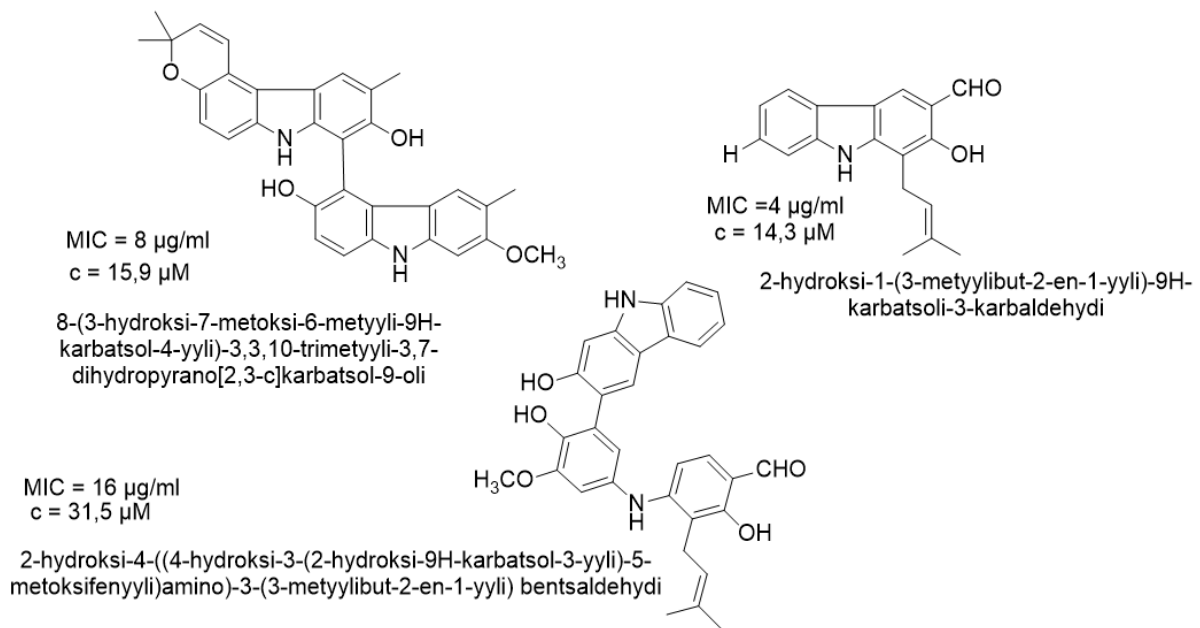
MIC = 32 µg/ml

c = 129,2 µM

**Kuva 10.** Klokarbatsomysiini C:n rakenne, jolla on todettu merkittävää aktiivisuutta MRSA:ta vastaan.

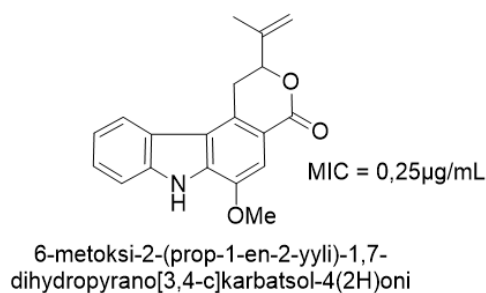
Lisäksi on tutkittu bromattujen karbatsolialkaloidien rakenteita, joiden bromiatomien lukumäärä vaihtelee kahdesta neljään, ja niiden antibakteriaalisia vaikutuksia. Vaikka halogenointi yleisesti on MRSA-aktiivisuutta lisäävä tekijä, bromatut karbatsolialkaloidit eivät osoittaneet aktiivisuutta juuri MRSA:ta vastaan vaan yleisesti *Staphylococcus aureus* -suvun bakteereja vastaan. Niiden pienimpien inhibointikonsentraatioiden arvot olivat myös paljon suurempia kuin fluori- tai kloorisubstituoiduilla karbatsolialkaloideilla. Tutkituista neljästä rakenteesta yhden MIC-arvo oli hyvin alhainen, 2µg/mL, yhden arvo kohtuullinen, 12,5µg/mL, mutta kahden muun rakenteen erittäin suuri, >250µg/mL, muihin halogenoituihin yhdisteisiin verrattuna. Vertailukohtana voidaan myös pitää penisilliiniä, jonka MIC *S.aureus* -suvun bakteereille oli 0,25 µg/mL. Bromatuilla karbatsolialkaloideilla halogeenisubstituenttien lukumäärän havaittiin vaikuttavan aktiivisuuteen niin, että enemmän halogeeniatomeja omaavalla rakenteella oli pienempi MIC-arvo (M. C. Li et al., 2016).

Happisubstituoidut karbatsolialkaloidit jakautuvat neljään alaluokkaan, mutta tarkastellaan tässä yksinkertaisten happisubstituoitujen karbatsolialkaloidien ja karbatsolikinonialkaloidien MRSA-aktiivisuutta. Clausena-suvun kasveista on pystytty eristämään runsaasti MRSA-aktiivisia happisubstituoituja karbatsolialkaloideja. Tutkimuksessa eristettiin aktiivisia yhdisteitä *Clausena wallichii* -kasvin juurista (Ding et al., 2023). Määritettäessä yhdisteiden aktiivisuuksia eri bakteerikantoja vastaan, havaittiin, että hapen tulee olla liittyneenä substituenttina myös aromaattisen rakenteen sivuketjuihin, jotta yhdisteellä olisi aktiivisuutta MRSA:ta vastaan. Yhdisteet, joissa oli happi liittyneenä aromaattiseen rengasrakenteeseen, olivat inaktiivisia testattuja gram-positiivisia, mutta aktiivisia gram-negatiivisia bakteereja vastaan. Yhdisteiden MIC-arvot määritettiin sarjalaimennoksella, kuten yleensä, ja testiaineet liuotettiin DMSO:hon eli dimetyylisulfoksidiin (engl. dimethyl sulfoxide). Merkittävämpää aktiivisuutta osoittaneiden yhdisteiden (kuva 11) MIC-arvot olivat 4, 8 ja 16 µg/mL, kun määrittäessä gram-positiivisille bakteereille standardina käytetyn vankomysiinin arvo oli 1 µg/mL (Maneerat, Ritthiwigrom, et al., 2012). Molaarisiksi konsentraatioiksi muutettuina yhdisteiden inhibointikonsentraatiot olivat 14,3 µM, 15,9 µM ja 31,5 µM.



**Kuva 11.** *Clausena wallichii* -juurista eristetyt yhdisteet ja niiden MIC-arvot.

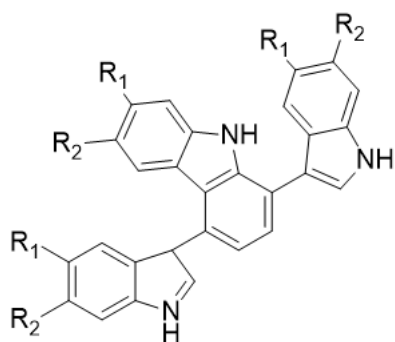
Myös *Clausena harmandiana* -kasvin oksista on löydetty useita MRSA-aktiivisia yhdisteitä. Määrittäessä käytettiin täsmälleen samaa menetelmää ja standardia kuin edellisessä. Parhaimpien yhdisteiden MIC-arvot olivat samaa luokkaa kuin toisesta *Clausena*-suvun kasvista eristetyillä, mutta yksi yhdiste (kuva 12) osoitti merkittävästi parempaa aktiivisuutta kuin vankomysiini sen pienimmän inhibointikonsentraation ollessa vain 0,25 µg/mL. Verrattaessa yhdisteen rakennetta muihin MRSA-aktiivisiin rakenteisiin, havaittiin eroavaisuuksia, jotka voivat selittää yhdisteen merkittävän aktiivisuuden. Muilla yhdisteillä perusrunko oli karbatsolin perusrakenne, johon oli liittyneenä eri substituentteja, joista osa sisälsi happea. Kuvan 12 yhdisteeseen kuitenkin oli happisubstituenttien lisäksi karbatsolin perusrakenteeseen liittynyt pyranoni-rengas, jossa sykloheksaanirenkaan rengasrakenteeseen on liittynyt happi ja substituenttina karbonyyliryhmä. Tulosten perusteella tämän pyranoni -rakenteen voidaan ajatella aiheuttavan suuren MRSA-aktiivisuuden. Kuvan 11 yhdisteestä voidaan myös päätellä, että dimerisointi on aktiivisuutta lisäävä tekijä, sillä inhibointikonsentraatiota 15,9 µM voidaan pitää melko hyvänä. (Maneerat, Phakhodee, et al., 2012).



**Kuva 12.** *Clausena harmandianan* oksista eristetty yhdiste.

Pyridokarbatsoliakaloideilla ei ole havaittu niin merkittävää aktiivisuutta juuri MRSA:ta vastaan, mutta yleisesti *S.aureus* -suvun bakteereja vastaan (Ding et al., 2023). Aiemmin esiteltyt indolin ja karbatsolin perusrakenteet voidaan yhdistää ja näin saada tehokkaita antibakteriaalisia yhdisteitä. Parhaita tuloksia saatiin aikaan ensin dimerisoimalla indolirakenne ja sen jälkeen hybridisoimalla se karbatsolin rakenteen kanssa. Käytännössä tämä tapahtuu niin, että indoliyksiköt yhdistetään alkyyliketjun kautta aromaattiseen keskusrakenteeseen tai indoli hybridisoidaan muiden rakennelementtien kanssa, kuten esimerkiksi imidatsolien. Näitä tekniikoita yhdistämällä on saatu tuotettua tetrahydrokarbatsoleja, joissa on substituentteina kaksi indoliyksikköä ja niitä edelleen hapettamalla saatiin bis-indolikarbatsoliakaloideja (Gehrmann et al., 2022).

Tutkimuksessa muodostettuja yhdisteitä testattiin ensin toista MRSA:n kantaa vastaan (USA300 LAC lux). Jos tuloksena oli pienempi inhibointikonsentraatio kuin 16 µg/mL, oli yhdiste aktiivisempi kuin standardina käytetty oksasilliini. Tässä tapauksessa yhdistettä testattiin vielä toista MRSA-bakteerikantaa vastaan (JE2). Määrittäessä käytettiin yhdistettä, jolla oli kuvan 13 mukainen perusrunko ja substituentit vaihtelivat. Parhaimmat tulokset kumpaakin kantaa vastaan saatiin yhdisteellä, jossa R<sub>1</sub> ja R<sub>2</sub> olivat kummatkin vetyjä. Tällöin MIC-arvo oli toista kantaa kohtaan 4 µg/mL ja toista 8 µg/mL. Substituenttien muutosten vaikutukset inhibointikonsentraatioon on esitetty taulukossa 1. Taulukosta 1 nähdään, että suhteessa suurin aktiivisuuden menetys tapahtui, kun toinen vedyistä korvattiin bromilla tai bentsyyliiryhmällä (Gehrmann et al., 2022). Kuten edellä mainittiin, halogenointia voidaan yleisesti pitää aktiivisuutta lisäävänä tekijänä, mutta eri halogeeniatomit vaikuttavat eri tavoin ja inhibointikonsentraatioista voidaan päätellä fluorin ja kloorin vaikuttavan aktiivisuuteen lisäävästi ja bromin heikentävästi. Kuvan 13 rakenne tukee myös jo edellä esitettyä väitettä siitä, että dimerisointi on yleisesti aktiivisuutta lisäävä tekijä, sillä silloin substituentteilla on useampia sitoutumispaikkoja.



**Kuva 13.** Tutkimuksessa eristetyt indolikarbatsoliakaloideiden perusrakenne.

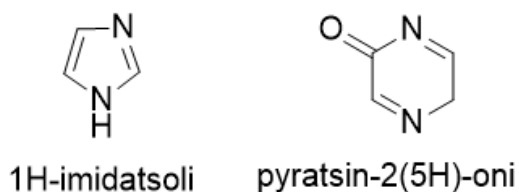
**Taulukko 1.** Yhdisteiden ja standardiantibiootin MIC-arvot kahta MRSA-kantaa vastaan. R<sub>1</sub> ja R<sub>2</sub> viittaavat kuvaan 13. MIC = pienin bakteerien kasvua estävä pitoisuus, LAC = MRSA bakteerikanta JE2 = MRSA bakteerikanta, Bn = bentsyyliiryhmä

Rakenne	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	MIC/LAC* (µg/mL)	MIC/JE2 (µg/mL)
1	H	H	8	4
2	Cl	H	8	8
3	H	Cl	16	
4	Br	H	64	
5	H	Br	>128	
6	OBn	H	128	
7	H	OBn	>128	
8	CN	H	8	8
oksasilliini			32	32

## 5.2 Indolialkaloidit

Useimmiten aktiiviset indoliyhdisteet ovat bis-indolialkaloideja, jolloin rakenneaktiivisuutta on indolialkaloidien kohdalla määritetty vaikutusmekanismien kautta havainnoimalla, kuinka yhdisteiden rakenteen muutos vaikuttaa niiden kykyyn vaikuttaa MRSA:n elintoiintoihin, kuten esimerkiksi pyruvaattikinaasiin tai soluseinän toimintaan. Bis-indolien ollessa indolialkaloidien aktiivisin alaluokka, voidaan olettaa, että indolialkaloidienkin tapauksessa dimerisointi on yleisesti aktiivisuutta lisäävä tekijä. Ensimmäisenä tutkittaessa soluseinän toiminnan estoa inhiboimalla sortaaseja, havaittiin, että indolijykön substituointi vaikuttaa yhdisteen aktiivisuuteen. Yhdisteen dihydrogenointi vähentää huomattavasti aktiivisuutta, jolloin MIC-arvo kasvaa suuremmaksi kuin 100 µg/mL (Oh et al., 2005).

Bis-indolialkaloideja on halogenoitu, kuten karbatsolialkaloideja. Halogeeniatomien vaikutuksia aktiivisuuteen ei ole tarkemmin listattu, mutta tutkimuksessa havaittiin, että karbatsolialkaloidien tavoin yhdisteen substituointi bromilla johti aktiivisuuden menetykseen sortaasien inhiboinnissa. Yleisesti päästiin lopputulemaan, että aktiivisuutta lisääviä tekijöitä soluseinän toiminnan estämisessä bis-indolien näkökulmasta ovat imidatsoli- ja pyratsinonirunkojen liittäminen indolijyköön (kuva 14). Inhibointikonsentraatiot olivat paljon alhaisempia kuin yhdisteillä, jotka sisältävät pelkkiä indolirakenteita (Oh et al., 2005).



**Kuva 14.** Imidatsolin ja pyratsinonin perusrakenne.

Myös potentiaalisten pyruvaattikinaasiin vaikuttavien yhdisteiden rakennetta tarkasteltaessa havaittiin, että tässäkin tapauksessa indoliyksikön hydroksylointi vähentää aktiivisuutta. Halogeeniatomien vaikutus aktiivisuuteen ei sen sijaan ole niin yksiselitteinen kuin aiemmin, sillä potentiaalisimmilla yhdisteillä on indoliyksikössä substituuttina bromia, jonka yleisesti on todettu vähentävän aktiivisuutta. Kuvassa 7 esiintyviä yhdisteitä tarkastelemalla havaitaan niiden sisältävän kuvan 14 imidatsoli- ja pyratsinonirungot, joita voidaan pitää tässäkin keskeisenä rakenteena aktiivisuuden kannalta. Tutkimuksessa mainittiin bis-indolialkaloidi, jolla oli muihin verrattuna selkeästi huonompi MRSA-aktiivisuus ja sen substituuttina oli hydroksyyli-ryhmä, josta voidaan päätellä, ettei hapetus ole yleisesti aktiivisuutta lisäävä tekijä indolialkaloideilla (Zoraghi et al., 2011).

DNA:n synteesin estossa aktiivisimmat yhdisteistä ovat myös bis-indolialkaloideja. Sitoutumisvoimakkuuteen vaikuttavat keskusmolekyylin luonne sekä siihen liittyneiden substituuttien koot. Kuvassa 6 oleva yhdiste on potentiaalinen DNA-synteesin inhiboija, ja rakenteesta nähdään, että siinä ei ole mitään erityisiä substituutteja. DNA-synteesin inhiboinnin kannalta keskeiset rakenteelliset ominaisuudet ovatkin yhdisteen tasomainen rakenne sekä sen kationiset funktionaaliset ryhmät, joka esimerkkirakenteessa on heksahydropyrimidiini, jolla on positiivinen varaus, ja se pystyy sitoutumaan negatiiviseen DNA:han. Kationiset funktionaaliset ryhmät pystyvät muodostamaan vetysidoksia DNA:n kanssa (Opperman et al., 2016).

## 6 Johtopäätökset

Indoli- ja karbatsolialkaloideista on löydetty potentiaalisia yhdisteitä MRSA:ta vastaan. Niiden kemiallinen perusrunko on hyvin muokattavissa, ja yhdisteet jakautuvatkin useaan alaluokkaan esimerkiksi substituenttien perusteella. Alkaloideilla on havaittu selkeästi kolme erilaista vaikutusmekanismia, joilla ne estävät MRSA:n toimintaa. Ensimmäinen mekanismi perustuu DNA-synteesin inhibointiin yhdisteiden sitoutuessa DNA:n pienen uurteen emäspareihin estäen replikaatiota sekä transkriptiota. Toinen mekanismi on pyruvaattikinaasin inhibointi, joka vaikuttaa solun ATP:n tuottoon ja sitä kautta sen toimintaan. Inhiboinnissa yhdisteet sitoutuvat pyruvaattikinaasin alayksiköiden väliseen rajapintaan ja muuttavat hieman alayksiköiden rakennetta. Kolmantena mekanismina tarkastellaan soluseinän toiminnan estoa inhiboimalla sortaseja, jotka vaikuttavat peptidoglykaanin eli soluseinän rakennusaineen muodostumiseen. Jokaiseen mekanismiin on löydetty potentiaalisia yhdisteitä, jotka vaikuttavat MRSA:han halutulla tavalla.

Vaikutusmekanismien lisäksi tarkasteltiin yhdisteiden rakenteen vaikutusta niiden MRSA-aktiivisuuteen. Indoli- ja karbatsolialkaloidien rakenneaktiivisuus poikkesi hieman toisistaan, mutta niille pystyttiin havaitsemaan yleisiä tekijöitä, jotka kummassakin tapauksessa yleisesti lisäävät yhdisteen aktiivisuutta. Näitä tekijöitä olivat dimerisointi ja halogenointi. Karbatsolialkaloideilla myös hapetus sekä indolin ja karbatsolin perusrakenteiden yhdistäminen lisäsi aktiivisuutta. Indoli-alkaloideilla sen sijaan imidatsolin ja pyratsinonin liittäminen rakenteeseen on keskeinen tekijä sen aktiivisuudessa. Kummastakin alkaloidiluokasta on löydetty yhdisteitä, joilla on merkittävää MRSA-aktiivisuutta.

Indoli- ja karbatsolialkaloideja voidaan olettaa tulevaisuudessa käytettävän lääkkeinä antibioottien sijasta, mutta suurimmat haasteet liittyvät niiden tehokkuuteen. Useimpien yhdisteiden MIC-arvot olivat kuitenkin reilusti suurempia kuin vertailuna käytettyjen yleisesti käytössä olevien antibioottien, jolloin niitä tulisi lääkkeenä antaa suurempi annos, jotta teho olisi verrattavissa antibiootteihin. Tehokkaampia niistä saataisiin edelleen synteettisesti muokkaamalla, mikä nykyisten antibioottien kustannuksiin nähden olisi kallista.

## Viitteet

- Burchak, O. N., Pihive, E. Le, Maigre, L., Guinchard, X., Bouhours, P., Jolival, C., Schneider, D., Maurin, M., Giglione, C., Meinel, T., Paris, J. M., & Denis, J. N. (2011). Synthesis and evaluation of 1-(1H-indol-3-yl)ethanamine derivatives as new antibacterial agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *19*(10), 3204–3215. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.03.060>
- Butler, M. M., Williams, J. D., Peet, N. P., Moir, D. T., Panchal, R. G., Bavari, S., Shinabarger, D. L., & Bowlin, T. L. (2010). Comparative in vitro activity profiles of novel bis-indole antibacterials against gram-positive and gram-negative clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(9), 3974–3977. <https://doi.org/10.1128/AAC.00484-10>
- Casciaro, B., Mangiardi, L., Cappiello, F., Romeo, I., Loffredo, M. R., Iazzetti, A., Calcaterra, A., Goggiamani, A., Ghirga, F., Mangoni, M. L., Botta, B., & Quaglio, D. (2020). Naturally-occurring alkaloids of plant origin as potential antimicrobials against antibiotic-resistant infections. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 16). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25163619>
- Cheng, Y., Chen, N., Li, J., Su, J. C., Yang, J., Zhang, C. X., Lin, H. W., & Zhou, Y. (2021). Antimicrobial chlorinated carbazole alkaloids from the sponge-associated actinomycete *Streptomyces diacarni* LHW51701. *Chinese Journal of Chemistry*, *39*(5), 1188–1192. <https://doi.org/10.1002/cjoc.202000736>
- Ding, Y. Y., Zhou, H., Peng-Deng, Zhang, B. Q., Zhang, Z. J., Wang, G. H., Zhang, S. Y., Wu, Z. R., Wang, Y. R., & Liu, Y. Q. (2023). Antimicrobial activity of natural and semi-synthetic carbazole alkaloids. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 259). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115627>
- Gatadi, S., Gour, J., & Nanduri, S. (2019). Natural product derived promising anti-MRSA drug leads: A review. In *Bioorganic and Medicinal Chemistry* (Vol. 27, Issue 17, pp. 3760–3774). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.07.023>
- Gehrmann, R., Hertlein, T., Hopke, E., Ohlsen, K., Lalk, M., & Hilgeroth, A. (2022). Novel small-molecule hybrid-antibacterial agents against s. Aureus and mrsa strains. *Molecules*, *27*(1). <https://doi.org/10.3390/molecules27010061>
- Gluszynska, A. (2015). Biological potential of carbazole derivatives. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 94, pp. 405–426). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.02.059>
- Khan, N. A., Kaur, N., Owens, P., Thomas, O. P., & Boyd, A. (2022). Bis-indole alkaloids isolated from the sponge *Spongisorites calcicola* disrupt cell membranes of MRSA. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(4). <https://doi.org/10.3390/ijms23041991>
- Kim, S. H., Shin, D. S., Oh, M. N., Chung, S. C., Lee, J. S., Chang, I. M., & Oh, K. B. (2003). Inhibition of sortase, a bacterial surface protein anchoring transpeptidase, by  $\beta$ -sitosterol-3-O-glucopyranoside from *Fritillaria verticillata*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *67*(11), 2477–2479. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.2477>

- Knölker, H. J., & Reddy, K. R. (2002). Isolation and synthesis of biologically active carbazole alkaloids. *Chemical Reviews*, *102*(11), 4303–4427. <https://doi.org/10.1021/cr020059j>
- Kong, X., Zhang, H., Cao, C., Zhou, S., Pang, G., & Shi, Y. (2016). Synthesis of fluorinated carbazoles via C-H arylation catalyzed by Pd/Cu bimetal system and their antibacterial activities. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *24*(6), 1376–1383. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.02.013>
- Li, M. C., Sun, W. S., Cheng, W., Liu, D., Liang, H., Zhang, Q. Y., & Lin, W. H. (2016). Four new minor brominated indole related alkaloids with antibacterial activities from *Laurencia similis*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *26*(15), 3590–3593. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.06.015>
- Li, M. fei, Xiao, D., Zhu, L. C., Liu, L., Zheng, J. N., Gu, X. J., Zhu, Y. N., Xie, J., Wang, X., Dai, J. M., Mi, Q. L., Yang, Y. K., Hu, Q. F., Li, Y. K., & Shi, J. Q. (2022). Indole alkaloids from the cigar tobacco-derived endophytic *Fungus Aspergillus oryzae* and their antibacterial activity. *Chemistry of Natural Compounds*, *58*(6), 1093–1097. <https://doi.org/10.1007/s10600-022-03872-x>
- Li, S. M. (2010). Prenylated indole derivatives from fungi: Structure diversity, biological activities, biosynthesis and chemoenzymatic synthesis. *Natural Product Reports*, *27*(1), 57–78. <https://doi.org/10.1039/b909987p>
- Liu, Y., Cui, Y., Lu, L., Gong, Y., Han, W., & Piao, G. (2020). Natural indole-containing alkaloids and their antibacterial activities. In *Archiv der Pharmazie* (Vol. 353, Issue 10). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/ardp.202000120>
- Liu, Z. H., Wang, W. M., Zhang, Z., Sun, L., & Wu, S. C. (2022). Natural antibacterial and antivirulence alkaloids from *Macleaya cordata* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Pharmacology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.813172>
- Maneerat, W., Phakhodee, W., Ritthiwigrom, T., Cheenpracha, S., Promgool, T., Yossathera, K., Deachathai, S., & Laphookhieo, S. (2012). Antibacterial carbazole alkaloids from *Clausena harmandiana* twigs. *Fitoterapia*, *83*(6), 1110–1114. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.04.026>
- Maneerat, W., Ritthiwigrom, T., Cheenpracha, S., Promgool, T., Yossathera, K., Deachathai, S., Phakhodee, W., & Laphookhieo, S. (2012). Bioactive carbazole alkaloids from *Clausena wallichii* roots. *Journal of Natural Products*, *75*(4), 741–746. <https://doi.org/10.1021/np3000365>
- Morshed, M. T., Lacey, E., Vuong, D., Lacey, A. E., Lean, S. S., Moggach, S. A., Karuso, P., Chooi, Y. H., Booth, T. J., & Piggott, A. M. (2021). Chlorinated metabolites from *Streptomyces* sp. highlight the role of biosynthetic mosaics and superclusters in the evolution of chemical diversity. *Organic and Biomolecular Chemistry*, *19*(27), 6147–6159. <https://doi.org/10.1039/d1ob00600b>
- Oh, K. B., Mar, W., Kim, S., Kim, J. Y., Oh, M. N., Kim, J. G., Shin, D., Sim, C. J., & Shin, J. (2005). Bis(indole) alkaloids as sortase A inhibitors from the sponge *Spongosorites* sp. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *15*(22), 4927–4931. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.08.021>
- Omar, F., Tareq, A. M., Alqahtani, A. M., Dhama, K., Sayeed, M. A., Emran, T. Bin, & Simal-Gandara, J. (2021). Plant-based indole alkaloids: A comprehensive overview from a pharmacological perspective. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules26082297>



- Opperman, T. J., Kwasny, S. M., Li, J. B., Lewis, M. A., Aiello, D., Williams, J. D., Peet, N. P., Moir, D. T., Bowlin, T. L., & Long, E. C. (2016). DNA targeting as a likely mechanism underlying the antibacterial activity of synthetic bis-indole antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *60*(12), 7067–7076. <https://doi.org/10.1128/AAC.00309-16>
- Radwanski, E. R., & Last, R. L. (1995). Tryptophan biosynthesis and metabolism: Biochemical and molecular genetics In *The Plant Cell* (Vol. 7). <https://academic.oup.com/plcell/article/7/7/921/5985036>
- Rehberg, N., Sommer, G. A., Drießen, D., Kruppa, M., Adeniyi, E. T., Chen, S., Wang, L., Wolf, K., Tasch, B. O. A., Ioerger, T. R., Zhu, K., Müller, T. J. J., & Kalscheuer, R. (2020). Nature-inspired (di)azine-bridged bisindole alkaloids with potent antibacterial in vitro and in vivo efficacy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medicinal Chemistry*, *63*(21), 12623–12641. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00826>
- Tulloch, L. B., Morgan, H. P., Hannaert, V., Michels, P. A. M., Fothergill-Gilmore, L. A., & Walkinshaw, M. D. (2008). Sulphate removal induces a major conformational change in *Leishmania mexicana* pyruvate kinase in the crystalline state. *Journal of Molecular Biology*, *383*(3), 615–626. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.08.037>
- Wibowo, J. T., Ahmadi, P., Rahmawati, S. I., Bayu, A., Putra, M. Y., & Kijjoo, A. (2022). Marine-derived indole alkaloids and their biological and pharmacological activities. *Marine Drugs*, *20*(1). <https://doi.org/10.3390/md20010003>
- Wiley, W., & Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. In *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS* (Vol. 63, Issue 1). <https://journals.asm.org/journal/mnbr>
- Yan, Y., Li, X., Zhang, C., Lv, L., Gao, B., & Li, M. (2021). *antibiotics Review Research Progress on Antibacterial Activities and Mechanisms of Natural Alkaloids: A Review*. <https://doi.org/10.3390/antibiotics>
- Zoraghi, R., Worrall, L., See, R. H., Strangman, W., Popplewell, W. L., Gong, H., Samaai, T., Swayze, R. D., Kaur, S., Vuckovic, M., Finlay, B. B., Brunham, R. C., McMaster, W. R., Davies-Coleman, M. T., Strynadka, N. C., Andersen, R. J., & Reiner, N. E. (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pyruvate kinase as a target for bis-indole alkaloids with antibacterial activities. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(52), 44716–44725. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.289033>