

Koenzimi na bazi vitamina B skupine

Ćosić, Jela

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:607781>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Jela Čosić

Koenzimi na bazi vitamina B skupine

Završni rad

Doc.dr.sc. Martina Šrajer Gajdošik

Osijek, 2019. godine

SAŽETAK

Koenzimi su male složene organske molekule koje uglavnom potječu od vitamina i drugih esencijalnih hranjivih tvari. Sveprisutni su u prirodi te sudjeluju u enzimski kataliziranim reakcijama. Koenzimi vitamina B skupine pripadaju najvažnijim koenzimima u ljudskom metabolizmu te imaju različite uloge koje omogućavaju normalno funkcioniranje stanica u svakodnevnom životu. Sudjeluju u poboljšanju metabolizma, imunološkog i živčanog sustava, čuvaju kožu i mišiće, potiču rast i podjelu stanica te imaju mnoge druge pozitivne učinke na zdravlje organizma. Nedostatak jednog ili više njih djeluje negativno na metabolizam, a naposljetku i na zdravlje. Koenzimi vitamina B skupine su: tiamin-pirofosfat (TPP), flavin-mononukleotid (FMN), flavin-adenin-dinukleotid (FAD), nikotinamid-adenin- dinukleotid (NAD^+), nikotinamid- adenin-dinukleotid fosfat (NADP^+), koenzim A (CoA), piridoksal-5'-fosfat (PLP), biocitin, tetrahidrofolat (THF) i koenzim B_{12} . Zajedničko evolucijsko podrijetlo ovih koenzima učinilo ih je neophodnim za *in vivo* stanične metaboličke procese. Cilj ovoga rada je opisati koenzime vitamina B skupine i njihove funkcije u biosintezi. Koenzimi, kao što su nikotinamid i oksidi flavina u oksidoreduktazama prvi su razmatrani koenzimi u prirodi, dok su varijacije tih organskih molekula nedavno otkrivene.

Ključne riječi : koenzimi, vitamini B skupine, metabolizam, biosinteza

ABSTRACT

Coenzymes are small complex organic molecules that mostly originate from vitamins and other essential nutrients. They are common in nature and they participate in enzymatically catalysed reactions. Vitamin B coenzymes are some of the most important coenzymes in the human metabolism and they are responsible for various functions that enable normal functioning of the cells in everyday life. Their function plays a part in the improvement of metabolism, the immune system, and the nervous system, as well as preserving the skin and the muscles, aiding in the growth and division of cells, and many other positive effects for the health of the organism. A deficiency of one or more of those coenzymes has a negative effect on the metabolism, and ultimately on the human health. Coenzymes from the vitamin B complex are: thiamine-pyrophosphate (TPP), flavin-mononucleotide (FMN), flavin-adenine-dinucleotide (FAD), nicotinamide-adenine-dinucleotide (NAD^+), nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate (NADP^+), coenzyme A (CoA), pyridoxal-5'-phosphate (PLP), biocytin, tetrahydrofolate (THF), and coenzyme B_{12} . The common evolutionary origin of these coenzymes has made them essential for in vivo cellular metabolic processes. The aim of this paper is to describe the coenzymes of the vitamin B complex and their functions in biosynthesis. Coenzymes like nicotinamide and flavin oxides in oxidoreductases are the first considered coenzymes in nature, while variants of those organic molecules have been discovered only recently.

Keywords: coenzymes, B vitamin complex, metabolism, biosynthesis

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	5
2. KOENZIM VITAMINA B₁-TIAMIN PIROFOSFAT (TPP).....	6
2.1. SVOJSTVA I STRUKTURA TIAMIN PIROFOSFATA	6
2.2. BIOKEMIJSKE REAKCIJE I MEHANIZAM DJELOVANJA TPP KOENZIMA.....	7
3. KOENZIMI VITAMINA B₂.....	10
3.1. SVOJSTVA I STUKTURA FLAVIN ADENIN DINUKLEOTIDA (FAD)	10
3.2. BIOKEMIJSKE REAKCIJE I MEHANIZAM DJELOVANJA FAD-a	12
4. KOENZIMI VITAMINA B₃.....	14
4.1. BIOKEMIJSKE REAKCIJE I SINTEZA KOENZIMA NIKOTINAMID- ADENIN-DINUKLEOTIDA	14
4.2. BIOKEMIJSKE REAKCIJE KOENZIMA NIKOTINAMID-ADENIN- NUKLEOTID FOSFATA.....	16
5. KOENZIM VITAMINA B₅.....	19
5.1. BIOKEMIJSKA SINTEZA KOENZIMA A	20
6. KOENZIM VITAMINA B₆.....	21
6.1. SVOJSTVA PIRIDOKSAL -5'-FOSFATA I MEHANIZAM TRANSAMINACIJE	21
7. KOENZIM VITAMINA B₇.....	23
8. KOENZIM VITAMINA B₉.....	24
9. KOENZIM VITAMINA B₁₂.....	25
10. ZAKLJUČAK.....	27
11. POPIS LITERATURE I SLIKOVNIH PRIKAZA.....	28

1. UVOD

Koenzimi su specifične, termostabilne, male organske molekule koje mogu biti čvrsto ili slabo povezane s enzimom. Koenzime dijelimo na prostetičke skupine i kosupstrate. Prostetičke skupine su kovalentnim vezama trajno vezane na apoenzim, a kosupstrati su slabo vezani na apoenzimski dio te mogu lako disocirati. Koenzimi se razlikuju od supstrata ne samo zbog toga što su derivati vitamina, već i zbog toga što jednu vrstu koenzima mogu koristiti različiti enzimi. Enzimi koji koriste istu vrstu koenzima obično kataliziraju slične kemijske reakcije. Koenzimi su potrebni za različite reakcije od kojih su najpoznatije oksidoredukcijske reakcije, reakcije prijenosa grupa, izomerizacije, hidrolitičke te mnoge druge reakcije. Vitamini B skupine su: tiamin (B₁), riboflavin (B₂), pantotenska kiselina (B₅), niacin (B₃), piridoksin (B₆), biotin (B₇), folna kiselina (B₉) i kobalamin (B₁₂). Ovi vitamini ulaze u sastav mnogih koenzima. Topljivi su u vodi pa se mogu urinom izlučiti te se stoga rijetko nakupljaju u organizmu. Strukturna karakteristika zajednička za mnoge koenzime je da sadrže purinski adeninski prsten vezan s D-ribozom i fosforom skupinom. Zbog toga se mnogi koenzimi smatraju derivatima adenozin-monofosfata (AMP).[1,2]

2. KOENZIM VITAMINA B₁-TIAMIN PIROFOSFAT (TPP)

Tiamin pirofosfat je koenzim koji je prisutan u svim živim organizmima, u kojima katalizira nekoliko biokemijskih reakcija, a ključnu ulogu ima u metabolizmu ugljikohidrata i aminokiselina. Derivat je vitamina B₁ koji nastaje enzimom tiamin-difosfokinazom u ATP-ovisnoj reakciji. Glavna funkcija TPP-a u enzimskim reakcijama je prijenos aktivirane aldehidne skupine, a prostetička skupina je piruvat dehidrogenaze. [1]

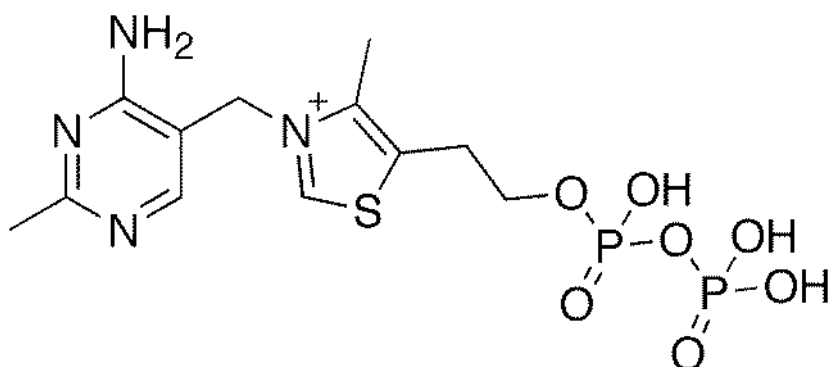
Tiamin-pirofosfat se sintetizira u citosolu u kojem je potreban za aktivnost transketolaze. U mitohondrijima je ključan za aktivnost alfa-ketoglutarata, piruvat-dehidrogenaze i razgranatog lanca α -keto-dehidrogenaze, ti su enzimi uključeni u puteve koji omogućuju proizvodnju ATP-a, NADPH i riboze-5-fosfata koji su zaslužni za stvaranje stanične energije i proizvodnju aminokiselina, nukleinskih kiselina i masnih kiselina. [3]

Nedostatak vitamina tiamna, kao bitnog nutrijenta u prehrani, izaziva beri-beri, tj. poremećaj smanjenog energetskeg metabolizma posebno u mišićima i mozgu. Bakterijski sintetiziran TPP u debelom crijevu biodostupan je i može doprijeti ukupnoj homeostazi vitamina tiamina i staničnoj prehrani lokalnih kolonocita. [4]

2.1. SVOJSTVA I STRUKTURA TIAMIN PIROFOSFATA

TPP se sastoji od pirimidinskog prstena koji je spojen na tiazolni prsten te povezan pirofosfatnom funkcionalnom skupinom (Slika 1.). Dio molekule TPP-a koja je najčešće uključena u reakcijama je tiazolni prsten koji sadrži dušik i sumpor. Prema tome, tiazolni prsten je dio reagirajuće molekule. [1]

Ugljik C2 tiazolnog prstena može djelovati kao kiselina koja donira svoj proton te formira karbanion. Reakcije koje tvore karbanione su vrlo nepovoljne, ali pozitivni naboj na tetravalentnom dušiku koji se nalazi neposredno uz karbanion stabilizira negativan naboj, čineći reakciju mnogo povoljnijom. Spoj s pozitivnim i negativnim nabojem na susjednim atomima naziva se ilid pa se ponekada karbanionski oblik TPP-a naziva „ilidni oblik“.



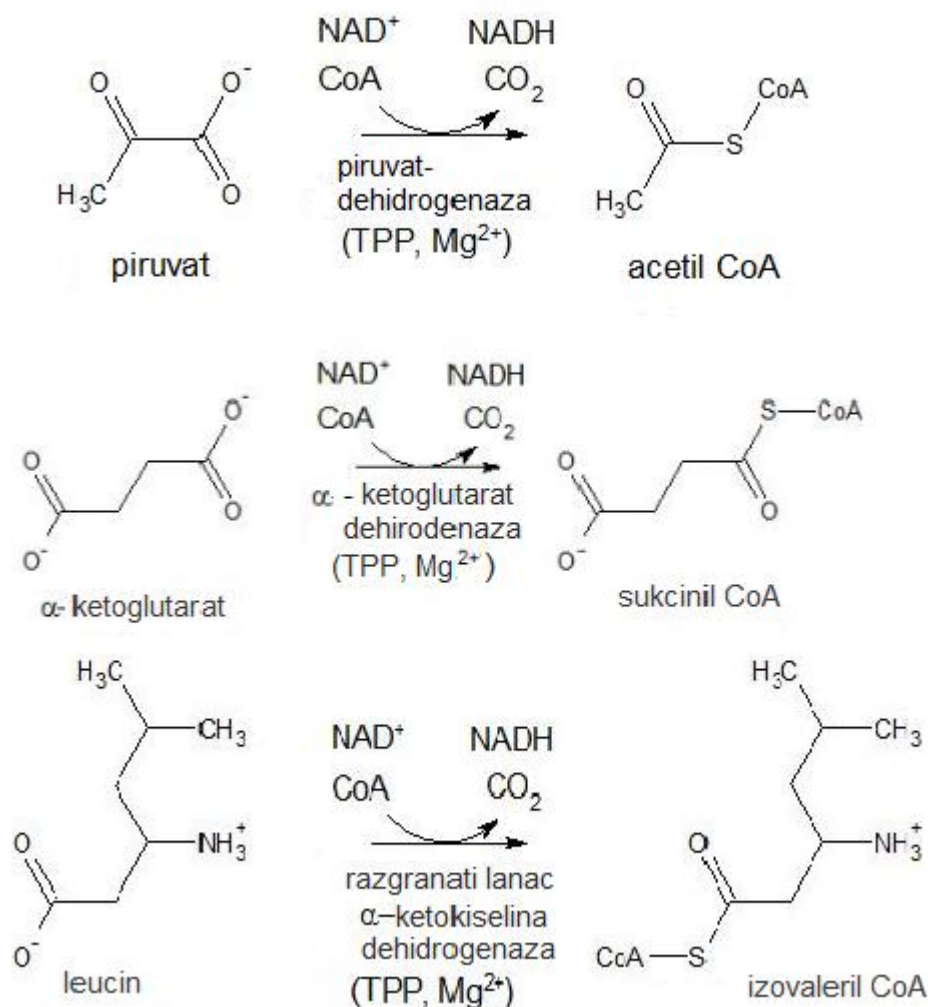
Slika1. Struktura tiamin-pirofosfata

Najnoviji trag o načinu djelovanja TPP-a proizašao je iz promatranja u NMR eksperimentu da se proton vezan na ugljik C2 tiazolnog prstena mijenja s deuterijem u D₂O otapalu. Promatranjem razmijene protona sugerirano je da je kemijsko svojstvo TPP-a koje je u pozadini njegove ko-katalitičke aktivnosti zapravo njegova sposobnost stabilizacije karbaniona nastalog gubitkom protona na ugljiku C2 tiazolnog prstena.[5]

2.2. BIOKEMIJSKE REAKCIJE I MEHANIZAM DJELOVANJA TPP KOENZIMA

Tiamin-pirofosfat djeluje u mnogim enzimskim reakcijama u kojima sudjeluju enzimi kao što su: kompleks piruvat- dehidrogenaze, piruvat -dekarboksilaze u fermentaciji etanola, kompleks α -ketoglutarat-dehidrogenaze, razgranati lanac aminokiselinskih dehidrogenaza, 2-hidroksifitanoil-CoA-liaza, transketolaza.[3]

α -ketoglutarat-dehidrogenaza (KGDH), piruvat- dehidrogenaza (PDH), i razgranati lanac α -ketokiselinske dehidrogenaze (BCKDC) nalaze se u mitohondrijima i služe za oksidaciju njihovih odgovarajućih karboksiliranih supstrata. Gubitkom CO₂ ti enzimi tvore tioestere iz ovih supstrata uz istovremenu redukciju nikotinamid- adenin- dinukleotida (NAD⁺) kako bi nastao NADH (Slika 2.) U prisutnosti koenzima A (CoA), PDH oksidira piruvat u acetil-koenzim A (acetil CoA) koji je polazni spoj za ciklus limunske kiseline. BCKDC katalizira oksidaciju aminokiselina razgranatog lanca uključujući valin, leucin, izoleucin, kako bi nastali odgovarajući tioesteri s acetil CoA. U biljkama i bakterijama, BCKDC je uključen u stvaranje razgranatih lančanih aminokiselinskih derivata dugolančanih ugljikovodika i dugolančanih masnih kiselina.[3]

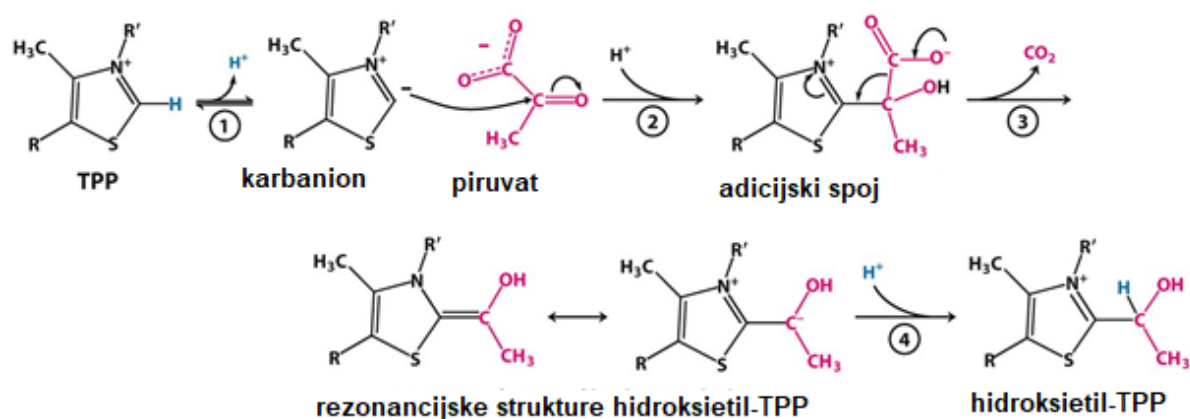


Slika 2. Reakcije enzima koji koriste TPP kao kofaktor

Osim enzima koji koriste TPP kao kofaktor za oksidaciju svojih supstrata, postoje između ostalog i transketolazni enzimi koji kataliziraju prijenos C2 aldehidnog dijela pomoću TPP-a. U oksidacijskoj fazi puta pentoza fosfata, transketolaza služi za kataliziranje prijenosa glikoaldehida iz ksiluloze-5-fosfata u ribozu-5-fosfat, pri čemu nastaje sedoheptuloza-7-fosfat i gliceraldehid-3-fosfat. U neoksidacijskoj fazi, transketolaza katalizira prijenos istog dijela iz ksiluloze-5-fosfata, ali u eritrozu-4-fosfat te nastaje gliceraldehid-3-fosfat i fruktoza-6-fosfat.[3]

TPP katalizira reverzibilnu reakciju karboksilacije tj. cijepanje supstrata na spoj ugljik-ugljik koji povezuje karboksilnu skupinu supstrata sa susjednom reaktivnom skupinom, obično karboksilnom, kiselinom ili alkoholom. Primjer takve reakcije je mehanizam dekarboksilacije enzimom piruvat-dehidrogenazom (E_1) pri čemu ionizacijom ugljika nastaje

karbanion TPP-a koji nukleofilno napada karbonilnu skupinu supstrata, odnosno piruvata. Nastaje jedinstvena veza između TPP-a i piruvata tj. adicijski spoj, pri čemu je veza u piruvatu pokidana, a elektroni odlaze prema TPP-u. To stvara dvostruku vezu između ugljika piruvata i ugljika TPP-a te potiskuje elektrone u dvostrukoj vezi N-C u cijelosti na atom dušika, reducirajući ga iz pozitivnog u neutralni oblik, pri čemu nastaje stabilizirani rezonacijski oblik. Protoniranjem nastaje hidroksietil-TPP koji potom ulazi u reakciju oksidacije. (Slika 3.)[1]



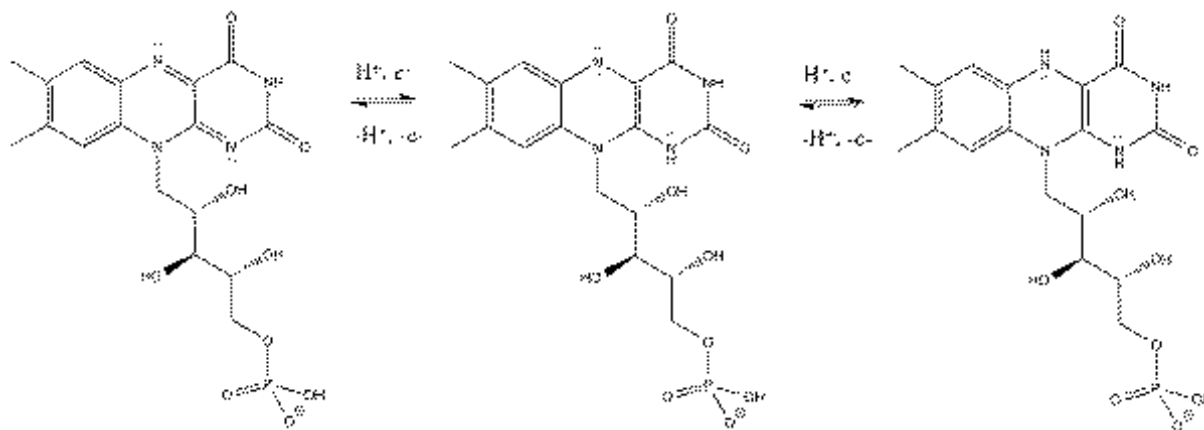
Slika 3. Mehanizam dekarboksilacije reakcije enzimom E₁

3. KOENZIMI VITAMINA B₂

Koenzimi vitamina B₂ su flavin-adenin-dinukleotid (FAD) i flavin-mononukleotid ili riboflavin-5-fosfat (FMN). Glavna funkcija FMN-a i FAD-a u enzimskim reakcijama je prijenos elektrona. FMN i FAD nisu kovalentno vezani za svoje enzime, a gotovo uvijek djeluju kao prostetičke skupine i mjesta za pohranjivanje elektrona unutar proteina.[1]

FAD je redoks-aktivni koenzim povezan s različitim proteinima, te je uključen u nekoliko važnih enzimskih reakcija u metabolizmu kao što su ciklus limunske kiseline i β-oksidacija masnih kiselina. Flavoprotein je protein koji sadrži flavinsku skupinu, a može biti u obliku FAD-a i FMN-a.

FMN je koenzim koji nastaje iz riboflavina enzimom riboflavin-kinazom i djeluje kao prostetička skupina raznih oksidoreduktaza uključujući NADH- oksidoreduktazu. Tijekom katalitičkog ciklusa dolazi do reverzibilne interkonverzije oksidiranog (FMN), semikinonskog (FMNH[•]) i reduciranog (FMNH₂) oblika u različitim oksidoreduktazama (Slika 4.) FMN je jaki oksidirajući agens, a posebno je koristan jer može sudjelovati u prijenosu jednog ili dva elektrona. Također je glavni izvor riboflavina u stanicama i tkivima.[6]

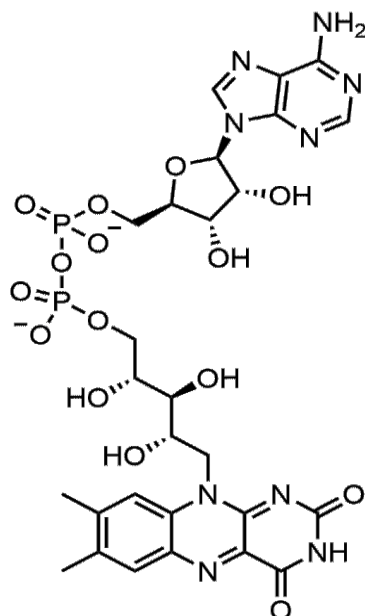


Slika 4. Oksidirani, polukinonski i reducirani oblik FMN-a

3.1. SVOJSTVA I STUKTURA FLAVIN ADENIN DINUKLEOTIDA (FAD)

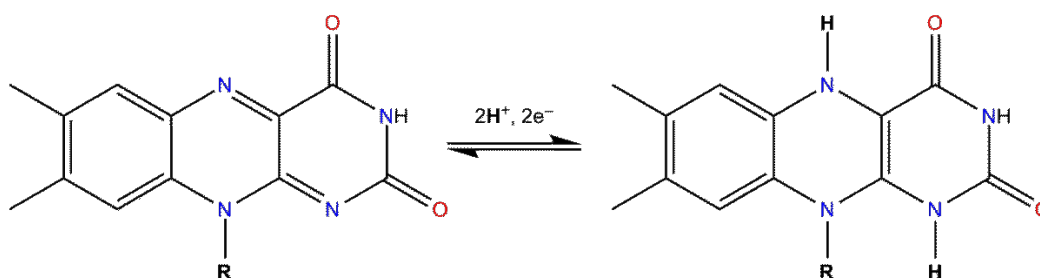
FAD se sastoji od dva glavna dijela, adenozin-monofosfata i flavin-mononukleotida (FMN), koji su povezani preko svojih fosfatnih skupina (Slika 5.) Adenin se veže na ribozu na C1 položaj, a fosfatna skupina se veže na C5 položaj da bi nastao adenozin-monofosfat.

Riboflavin nastaje vezom ugljik-dušik između izoaloksazina i D-ribitola. Fosfatna se skupina veže na terminalni ribozni ugljik pa nastaje FMN. Veza između izoaloksazina i ribitola ne smatra se glikozidnom vezom pa zbog toga FMN nije uistinu nuklotid.[1]



Slika 5. Struktura FAD-a

Prsten izoaloksazina može prihvatiti ili prenositi elektrone jedan po jedan, iako mogu nositi do dva elektrona. Ova sposobnost prihvatanje jednog ili dva elektrona od velike je važnosti za biološke reakcije (Slika 6.)[1]

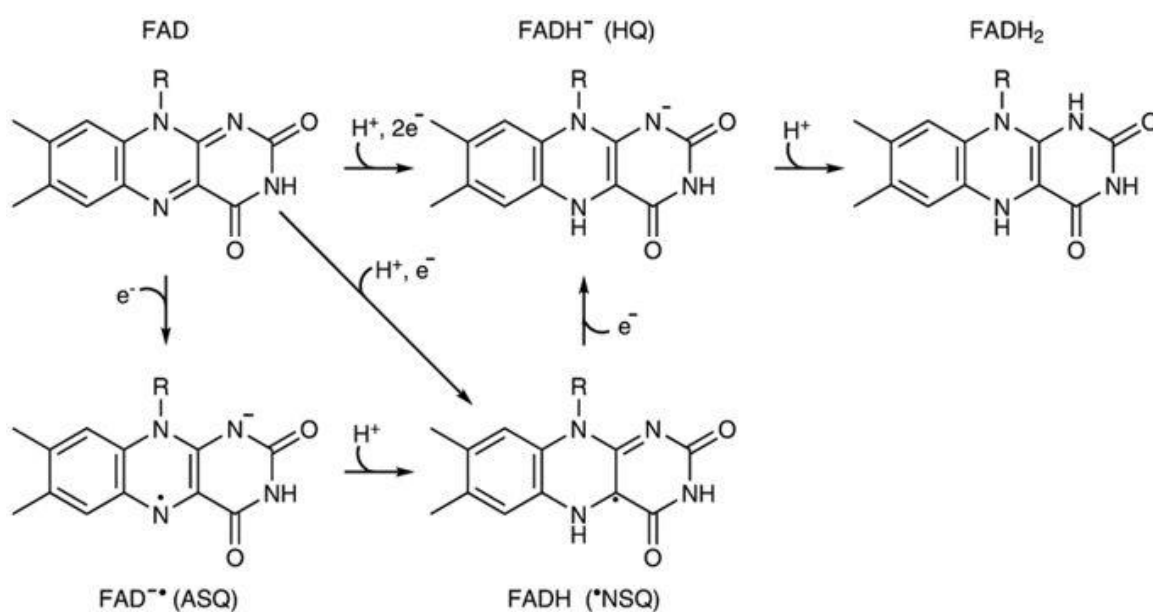


Slika 6. Oksidirani (FAD) i reducirani (FADH₂) oblik

Na temelju oksidacijskog stanja flavini su različito obojeni. FAD je potpuno oksidirani i žute je boje, FADH je djelomično reduciran, a može biti plavo ili crveno obojen. FADH₂ je bezbojan i on je potpuno reducirani oblik.[7]

3.2. BIOKEMIJSKE REAKCIJE I MEHANIZAM DJELOVANJA FAD-a

FAD postoji u četiri različita oksidacijska stanja, a to su kinonski (FAD), semikinonski ($\text{FADH}^\bullet$), hidrokinonski (FADH_2) i flavin-N(5)-oksid. (Slika 7.) FAD prelazi između tih stanja prihvatanjem ili doniranjem elektrona. FAD u potpuno oksidiranom stanju prihvata dva H^+ i dva elektrona, pri čemu nastaje hidrokinonski oblik, FADH_2 . Semikinonski oblik ($\text{FADH}^\bullet$) može nastati redukcijom FAD ili oksidacijom FADH_2 . Oblik FAD može se ponovno stvoriti daljnjim gubitkom H^+ i elektrona. Flavín-N(5)-oksid je superoksidni oblik kofaktora flavina.[8]



Slika 7. Oksidacijska stanja FAD

Proteini ovisni o FAD-u djeluju u velikom broju metaboličkih puteva, uključujući prijenos elektrona, popravak DNA, katabolizam aminokiselina i ciklus limunske kiseline. Sukcinat dehidrogenaza zahtijeva kovalentno vezani FAD za katalizu oksidacije sukcinata u fumarat uz istovremenu redukciju ubikinona u ubikinol. Postoje i redoks flavoproteini koji se ne-kovalentno vežu za FAD kao što je acetil-CoA-dehidrogenaza, koja je uključena u beta-oksidaciju masnih kiselina i katabolizam aminokiselina poput leucina, izoleucina, valina i lizina. FAD sudjeluje u stvaranju svjetlosti kod bioluminiscentnih bakterija.[1, 7]

Bakterije i biljke mogu sintetizirati riboflavin, a čovjek je tijekom evolucije izgubio sposobnost sintetiziranja vitamina riboflavina. Stoga ga ljudi unose pomoću prehrambenih namirnica. Uneseni riboflavin transportira se iz tankog crijeva stanice putem proteinskog

nosača. Riboflavin-kinaza riboflavinu dodaje fosfatnu skupinu kako bi nastao FMN, a zatim se FAD-sintetazom veže adeninski nukleotid i nastaje FAD, pri čemu oba koraka zahtijevaju ATP.[9]

4. KOENZIMI VITAMINA B₃

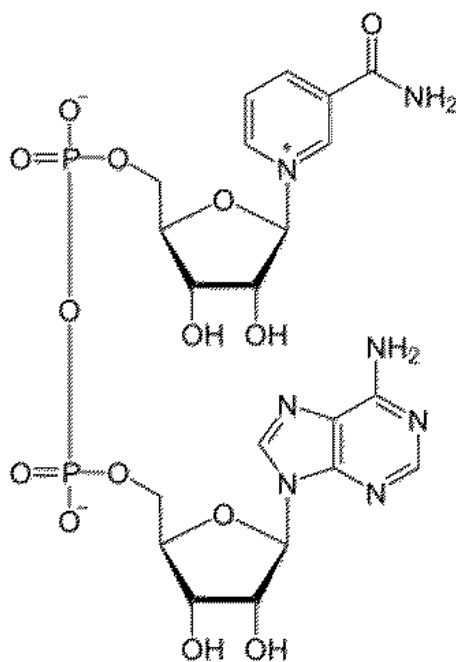
Koenzimi vitamina B₃ su nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD⁺) i nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (NADP⁺). Glavna funkcija u enzimskim reakcijama im je prijenos elektrona. NAD⁺ i NADP⁺ su dva najčešće korištena koenzima u staničnom metabolizmu. Više od 500 poznatih enzima koristi NAD⁺ ili NADP⁺ za katalizu oksidacijsko-redukcijskih reakcija. Neki od njih su dobro proučavani enzimi koji sudjeluju u metabolizmu energije, biosintezi, degradaciji i obrani od oksidativnog oštećenja. Nalaze se u mitohondrijima, kloroplastima, peroksisomima te citosolu u ukupnoj koncentraciji od 0,1 do 1 milimola.[10]

NAD⁺ je oksidirani oblik nikotinamid-adenin-dinukleotida koji se nalazi u svim živim stanicama. U metabolizmu, NAD⁺ je uključen u redoks reakcije noseći elektrone iz jedne reakcije u drugu. Jedna od glavnih uloga NAD⁺ je regulacija bioloških funkcija, a važan učinak obavlja na polimeraza i riboziltransferaza. Ti enzimi sudjeluju u popravku DNA, u reakcijama endokrine signalizacije te u mnogim drugim reakcijama. NAD⁺ pokazuje snažno djelovanje kod enzima koji kataliziraju reakcije modifikacije proteina, što dovodi do promjene u funkciji proteina.[11]

NADP⁺ djeluje kao univerzalni nosač elektrona, nastaje u anaboličkim reakcijama tj. reakcijama koje stvaraju velike molekule iz malih, kao što su Calvinov ciklus, sinteza lipida, nukleinskih kiselina, a koje zahtijevaju NADPH kao redukcijsko sredstvo. [1]

4.1. BIOKEMIJSKE REAKCIJE I SINTEZA KOENZIMA NIKOTINAMID-ADENIN-DINUKLEOTIDA

Nikotinamid-adenin-dinukleotid se sastoji od dva nukleotida povezana preko fosfatnih skupina. Jedan nukleotid sadrži adeninsku bazu, a drugi nikotinamid (Slika 8.) Nikotinamid-adenin-dinukleotid postoji u oksidiranom (NAD⁺) i reduciranom obliku (NADH). NAD⁺ je oksidirajući agens što mu omogućuje da prihvata elektrone iz drugih molekula.



Slika 8. Struktura NAD^+

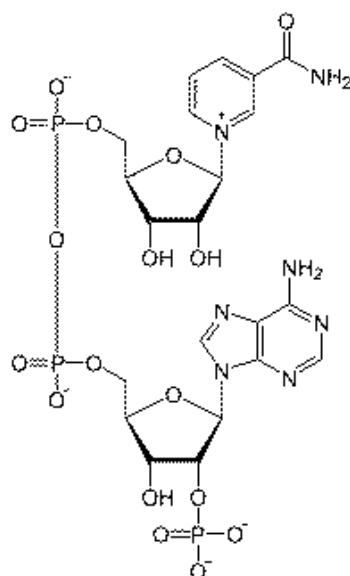
NAD^+ je središnji redoks koenzim koji sudjeluje u staničnom metabolizmu te djeluje kao akceptor hidridne skupine formirajući NADH uz istodobnu oksidaciju metabolita dobivenih iz ugljikohidrata, aminokiselina i masti. Oksidacijske reakcije zahtijevaju NAD^+ kao akceptora hidrida, dok glukoneogeneza, ketogeneza, detoksifikacija reaktivnih kisikovih vrsta i lipogeneza zahtijevaju smanjenje koenzima NADH i NADPH kao donora hidrida. Osim uloge koenzima, djeluje i kao donor ADP-riboznih dijelova u reakcijama ADP-ribozilacije, kao perkursor cikličke ADP-riboze te također djeluje kao supstrat za ADP-riboza polimerazu. ADP riboza-sintetaza hidrolizira vezu između nikotinamida i ADP-riboznih dijelova NAD^+ koja signalizira oštećenje DNA, mijenja ekspresiju gena, kontrolira post-translacijske modifikacije i regulira signalizaciju kalcija. [12,13]

NAD^+ sudjeluje u kataboličkim reakcijama, glikolize, ciklusa limunske kiseline i oksidativne fosforilacije. Redoks reakcije su katalizirane oksidoreduktazama u svim dijelovima metabolizma. Oslobođena energija koja je nastala iz glukoze i masnih kiselina prenosi se na NAD^+ redukcijom u NADH . Elektrone koje nosi NADH kod eukariota, koji se proizvodi u citoplazmi, prenose se u mitohondrij. Mitohondrijski NADH se oksidira lancem za prijenos elektrona, koji pumpa protone kroz membranu u procesu oksidacijske fosforilacije. [1,2]

NAD^+ se može sintetizirati kroz dva metabolička puta. Jedan put je *de novo* put, koji je sintetiziran pomoću aminokiselina, tj. pomoću kinolinata. Sisavci i neke bakterije sintetiziraju kinolinat iz triptofana kinureninskim putem, dok ga druge bakterije, kao što je *Escherichia coli*, sintetiziraju iz asparaginske kiseline. Prvi enzim na tom putu je L-Asp-oksidaža i oksidira L-Asp kako bi nastala α -iminosukcinska kiselina. U slijedećem koraku α -iminosukcinat se kondenzira s gliceraldehid-3-fosfatom, a ciklizacijom pomoću kinolinske-sintaze dobije se kinolinska kiselina. Treći korak katalizira fosforibozil-transferaza kinolinske kiseline koja tvori mononukleotid nikotinske kiseline iz kinolinske kiseline i fosforibozil-pirofosfata. Zatim, slijedeća dva koraka pretvaraju mononukleotid nikotinske kiseline u NAD^+ . Nedavno je pronađeno da nekolicina bakterija sintetizira NAD^+ iz triptofana, pri čemu se L-Trp degenerira preko kinurenina u kinolinsku kiselinu u pet enzimskih koraka. Koraci koji vode od kinolinske kiseline do NAD^+ sačuvani su među prokariotima i eukariotima i katalizirani istim skupom enzima. U mnogim organizmima uključujući i biljke, nikotinamid i nikotinska kiselina ponovno se upotrebljavaju za sintezu purinskih nukleotida drugim putem, tzv. spasonosnim putem. Ovaj je put nastao recikliranjem prethodno oblikovanih komponenata, kao što su nikotinamid, nikotinska kiselina ili nikotinamid ribozid, natrag u NAD^+ . [14]

4.2. BIOKEMIJSKE REAKCIJE KOENZIMA NIKOTINAMID-ADENIN-NUKLEOTID FOSFATA

NADPH sudjeluje u biokemijskim reakcijama gdje služi kao donor elektrona. NADPH donira proton i dva elektrona pri čemu oksidira molekulu i nastaje NADP^+ . NADP^+ se razlikuje od NAD^+ u dodatnoj fosfatnoj skupini na C2 položaju riboznog prstena koji nosi adeninski dio (Slika 9.) Dodatni fosfat se dodaje NAD^+ -kinazom, a uklanja NADP^+ -fosfatazom. [1,15]



Slika 9. Struktura NADP^+

NADP^+ djeluje zajedno s nizom enzima kako bi osigurao energiju za mnoge reakcije. To se obično radi tijekom fotosinteze kod biljaka ili kao dio probave šećera kod životinja. Oslobođanje energije iz šećernih veza ili unos energije suncem, omogućuje stanicama tih organizama da vežu vodik s dva elektrona u NADP^+ stvarajući NADPH koji može premjestiti tu energiju elektrone i vodik u novu reakciju unutar stanice. [16]

U reduciranom obliku, NADPH sudjeluje u reduktivnoj biosintezi, regeneraciji glutaciona i detoksifikaciji stanica te ima ključnu ulogu u oksidativnoj obrani sustava, ali također može uzrokovati i oksidacijsko oštećenje djelovanjem pomoću NADPH oksidaze. Generiranje NADP^+ djelovanjem NAD^+ kinaze ključna je odrednica stanične koncentracije NADP^+ . NAD^+ kinaza prenosi fosfatnu skupinu iz ATP-a na 2'-hidroksilnu skupinu adenozin riboznog dijela NAD^+ te time NADP sinteza ovisi o dostupnosti NAD-a. Aktivnost NAD^+ kinaza ključna je za preživljavanje stanica. [17]

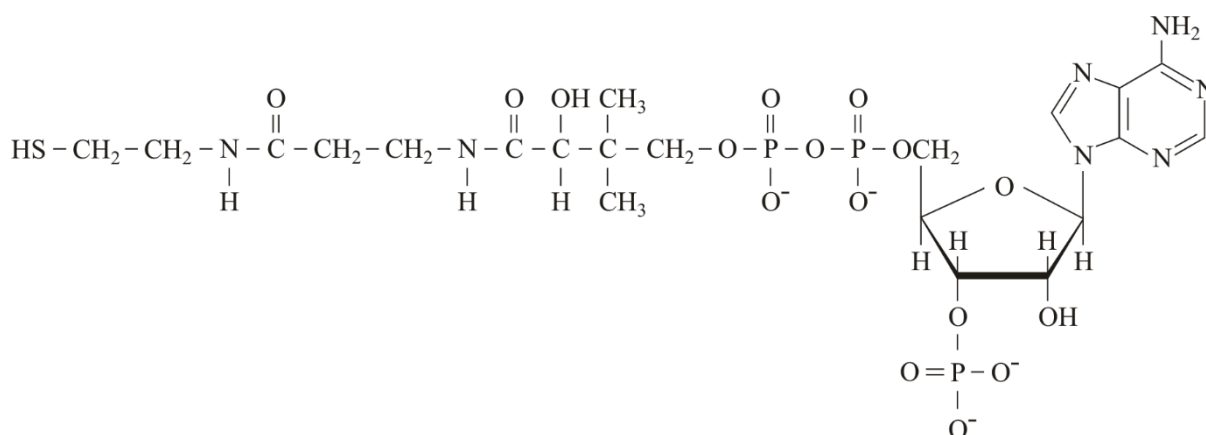
Glavna uloga NADP^+ je prijenos staničnih elektrona. Redoksna stanja NAD^+ i NADP^+ piridinskih nukleotidnih bazena imaju važnu ulogu u definiranju aktivnosti energetskih puteva, u pokretanju oksidacijskog stresa i u održavanju antioksidacijske obrane. Općenito, NAD^+ je primarno uključen u regulaciju kataboličkih procesa proizvodnje energije, dok je NADP^+ uključen u obranu od antioksidanata i stvaranja slobodnih radikala. Istaknuti predstavnik koji katalizira ograničenje brzine pentoza fosfatnog puta je glukoza-6-

fosfat dehidrogenaza, a nedostatak tog enzima narušava vitalnost eritrocita. Put pentoza fosfat je glavni izvor NADPH kod životinja i drugih ne-fotosintetskih organizama.[17]

NADPH osigurava redukcijsku snagu koja pokreće brojne anaboličke reakcije, uključujući one odgovorne za biosintezu svih glavnih staničnih komponenti mnogih proizvoda u biotehnologiji. Za povećanje dostupnosti NADPH koriste se dehidrogenazne reakcije puta pentoza fosfata i korak izocitrat-dehidrogenaze u ciklusu limunske kiseline. Feredoksin-NADP⁺-reduktaza glavni je izvor NADPH u fotosintetskim organizmima. Ovaj se enzim pojavljuje se u posljednjem koraku elektronskog lanca svjetlosnih reakcija fotosinteze, no NADPH se koristi i kao reducirajuća snaga za biosintetske reakcije u Calvinovom ciklusu kako bi se asimilirao ugljični dioksid u glukozu. [17]

5. KOENZIM VITAMINA B₅

Koenzim vitamina B₅ je koenzim A (CoA). Koenzim A je sveprisutni i esencijalni kofaktor koji je uključen u veliki dio svih metaboličkih funkcija. U većini reakcija, ovaj kofaktor djeluje kao acil–nosač, aktivira acilnu skupinu za prijenos ili elektrofilni napad ili povećava kiselost protona susjednom karbonilu kako bi se olakšalo stvaranje nukleofilnog enolata. Struktura CoA sastoji se od pantotenske kiseline što je ujedno i preteča koenzima A, β-merkapt-etilamina i adeninskog nukleotida s 5'-pirofosfatom i 3'-monofosfatom. (Slika 10.) [18,19]



Slika 10. Struktura koenzima A

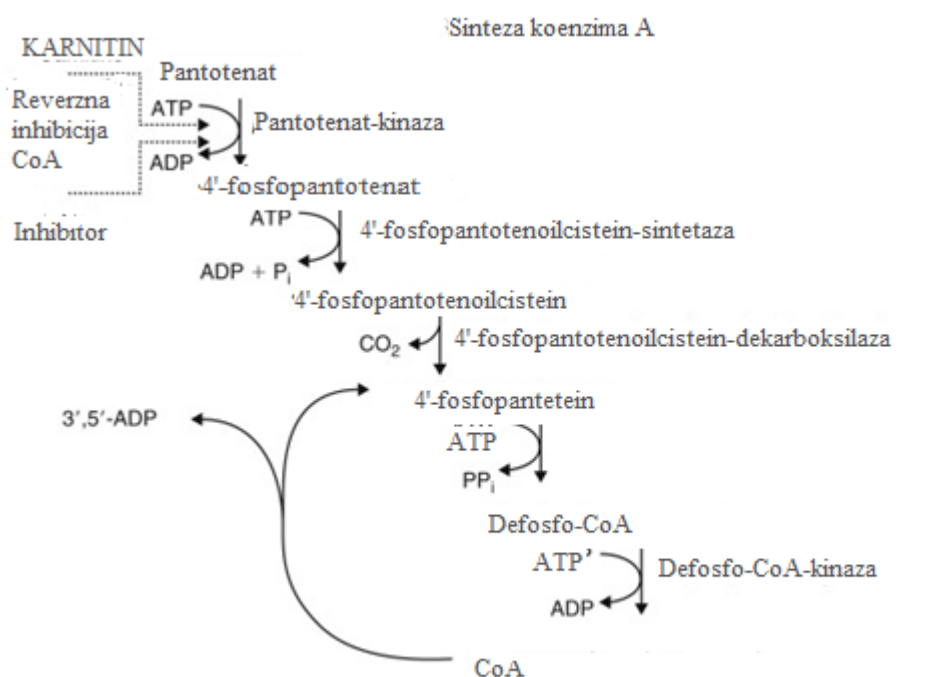
Značajnu ulogu ima u sintezi i oksidaciji masnih kiselina i oksidaciji piruvata u ciklusu limunske kiseline. Većina karboksilnih kiselina, npr. masnih kiselina mora se aktivirati za ulazak u metaboličke puteve pretvorbom u njihove odgovarajuće acil-S-CoA (R-CO-S-CoA) tioestere. Sulfhidrilna skupina (-SH) β-merkapt-etilenaminske komponente CoA je mjesto na kojem se vežu karboksilne kiseline kako bi se formirali acil-tioesterski derivati. Tioesteri su jedini oblik u kojem je poznato da CoA djeluje u biološkim sustavima. Mnoge enzimske katalizirane reakcije u kojima karboksilne skupine podliježu nastanku veze ugljik/ugljik, ugljik/dušik ili ugljik/ sumpor koriste acil-S-CoA tioestere kao acil-donor supstrat.[19]

U svojoj acetilnoj formi, koenzim A je vrlo svestrana molekula koja služi metaboličkim funkcijama u anaboličkim i kataboličkim putevima. Acetil-CoA se koristi u alosteričkoj regulaciji piruvat-dehidrogenaze i karboksilaze.[1]

5.1. BIOKEMIJSKA SINTEZA KOENZIMA A

Koenzim A se prirodno sintetizira iz pantoteinske kiseline, odnosno vitamina B₅, kroz niz od pet enzimski kataliziranih reakcija. Vitamin B₅ se nalazi u hrani kao što su mahunarke, meso, žitarice, jaja i mlijeko. Kod ljudi biosinteza zahtijeva cistein, pantotensku kiselinu i adenozin-trifosfat (ATP). [18]

U prvom koraku sinteze pantotenat se fosforilira u 4'-fosfopantotenat pomoću enzima pantotenat-kinaze, to je ujedno i najviše regulirani korak u sintezi CoA, a reguliran je inhibicijom povratne sprege od CoA i njegovih tioestera. U drugom koraku cistein se dodaje 4'-fosfopantotenatu da se dobije 4'-fosfopantotenoilcistein pomoću enzima fosfopantotenoilcistein sintaze da bi nastao 4'-fosfo-*N*-pantotenoilcistein. Taj korak spojen je s ATP hidrolizom, a zatim je 4'-fosfo-*N*-pantotenoilcistein dekarboksiliran do 4'-fosfopanteteina pomoću fosfopantotenoilcistein-dekarboksilaze. Obje reakcije u drugom i trećem koraku katalizirane su bifunkcionalnim enzimom. Zatim dolazi do adenilacije 4'-fosfopanteteina pomoću enzima fosfopantetein-adenilil-transferaze, a to je ujedno i sekundarna regulatorna točka koja je odgovorna za stvaranje defosfo-CoA. Posljednji korak u biosintezi CoA je kataliziran defosfo-CoA kinazom, koja dodaje ATP-izvedenu fosfatnu skupinu na 3'-hidroksil defosfo-CoA. (Slika 11.) [20]

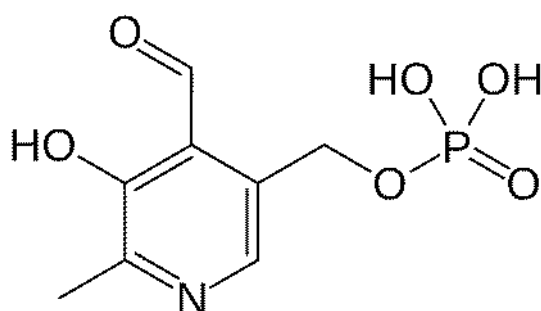


Slika 11. Sinteza koenzima A

6. KOENZIM VITAMINA B₆

Piridoksal-5'- fosfat (PLP) je biološki aktivni oblik vitamina B₆. PLP ima važnu ulogu kao koenzim u više od 160 različitih enzima koji djeluju na različite supstrate i inhibitore koji uglavnom posjeduju aminske i karboksilatne dijelove. Ključno obilježje PLP-ovisnih enzima je katalitička raznovrsnost, kataliziraju reakcije transaminacije, dekarboksilacije i β i γ -eliminacije, supstitucije, racemizacija, formiranje ugljik-ugljik veza preko nekoliko katalitičkih intermedijara. [1]

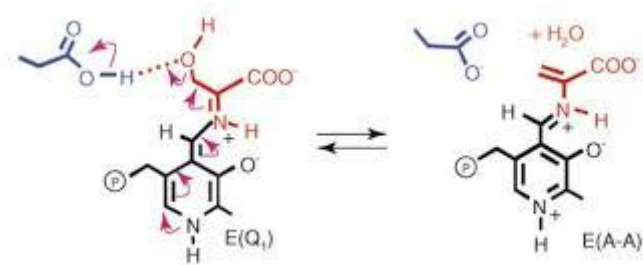
PLP po svojoj strukturi podsjeća na benzaldehid, sadržava piridinski prsten koji je slabo bazičan, a na njega je vezana hidroksilna skupina koja je slabo kisela. (Slika 12.) Međutim, svojstva karbonilne skupine su modificirana prisutnošću i susjedne hidroksilne skupine i dušika u prstenu u para poziciji, čije stanje protonacije ima dubok utjecaj na reaktivnost kofaktora. Poznato je da su ta svojstva PLP-a od temeljne važnosti za katalizu provedenim na kofaktoru i na njegovim analogima. [1,21]



Slika 12. Struktura PLP-a

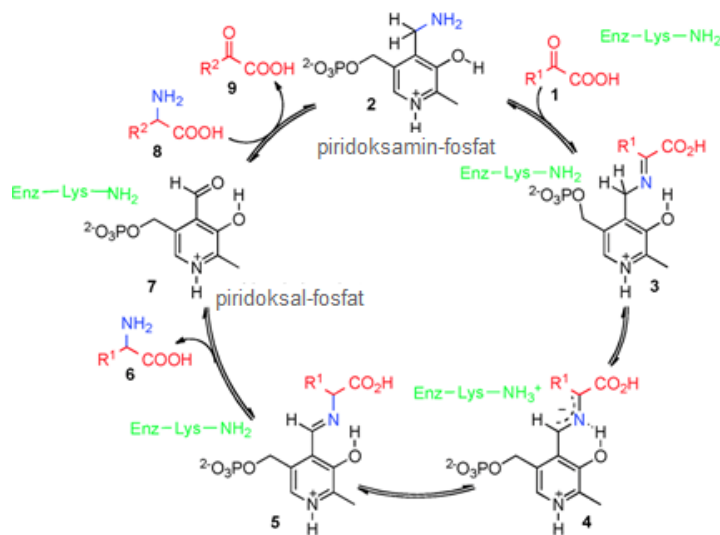
6.1. SVOJSTVA PIRIDOKSAL -5'-FOSFATA I MEHANIZAM TRANSAMINACIJE

Piridoksal-5'-fosfat ovisni enzimi kataliziraju bezbrojne biokemijske reakcije. U katalizu su uključena dva osnovna, međusobno ovisna kemijska svojstva PLP-a . Prvo je sposobnost stvaranja imina s primarnom amino-skupinom pomoću vlastite aldehidne skupine, a drugo je svojstvo stabilizacija karbanionskih produkata koji se razvijaju putem heterolitičkog cijepanja kemijskih veza. Kofaktor tvori dva tipa imina , tj . unutarnji i vanjski aldimin koji sudjeluju u mehanizmu transaminacije. (Slika 13.)[22]



Slika 13. Strukturni prikaz unutrašnjeg i vanjskog aldimina

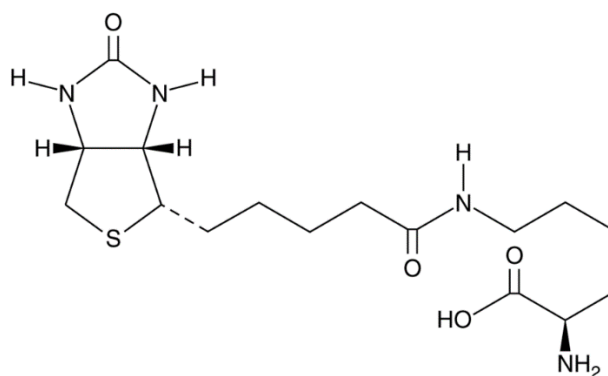
Mitohondrijska aspartat-aminotransaminaza katalizira reakciju transaminacije ovisnu o PLP koenzimu. U mehanizmu transaminacije, aldehidna skupina PLP-a tvori sa svojim aminokiselinskim supstratima kovalentne produkte. Odsutnošću supstrata, aldehidna skupina PLP-a tvori Schiffovu bazu s ϵ -amino-skupinom lizinskog ostatka u aktivnom mjestu enzima. Ulaskom aminokiselinskog supstrata dolazi do stvaranja nove Schiffove baze. Potom se α -amino-skupina aminokiselinskog supstrata zamjenjuje s ϵ -amino-skupinom lizinskog ostatka iz aktivnog mjesta enzima. Schiffova baza, stvorena između PLP-a i aminokiseline, ostaje čvrsto vezana višestrukim ne-kovalentnim vezama uz enzim. Zatim vanjski aldimin otpušta proton i nastaje kinoidni međuprodukt. Ponovnim vezanjem na aldehidni ugljikov atom na kinoidni međuprodukt nastaje ketimin. Potom dolazi do hidrolize ketimina pri čemu nastaje PLP i α -ketokiselina. Ta tri koraka zapravo čine pola ukupne reakcije transaminacije, druga polovica zbiva se obratom gornjeg niza reakcija. Važan korak u drugom dijelu mehanizma je u tome što druga α -ketokiselina reagira s piridoksamin-fosfat-enzimom. (Slika 14.)[1]



Slika 14. Mehanizam transaminacije

7. KOENZIM VITAMINA B₇

Koenzim vitamina B₇ je biocitin, prirodni analog biotina niske molekularne težine i primarni izvor esencijalnog metabolita za sisavce. Glavna funkcija koenzima je prijenos CO₂ u reakcijama karboksilacije. Životinjski enzimi karboksilaze, tj. enzimi koji dodaju CO₂, zahtijevaju biotin topiv u vodi. Biotin je kovalentno vezan na enzim pomoću amidne veze na bočni lanac lizina. Biocitin je konjugat D-biotina i L-lizina, pri čemu je karboksilat D-biotina povezan s ε-aminom L-lizina preko sekundarne amidne veze. (Slika 15.)[23,24]

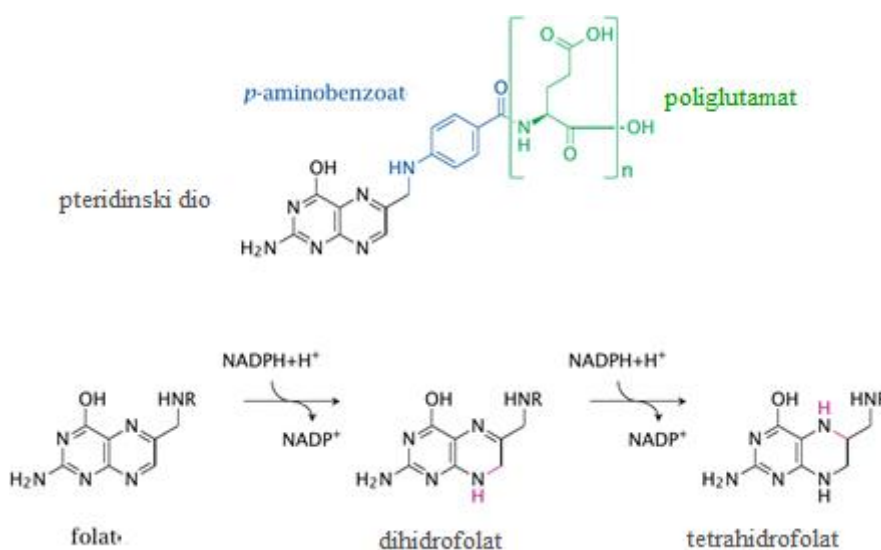


Slika 15. Struktura biocitina

Glavni nedostatak povezan s biocitinom je njegov relativno kratki poluživot *in vivo* zbog brzog cijepanja sekundarnog amida u prisutnosti biotinidaze, enzima prisutnog u biološkim tkivima. Biocitin je također svestran marker za neuroanatomska istraživanja, koja su pokazala da ovaj koenzim može imati višestruke primjene, posebno za obilježavanje neurona. [24]

8. KOENZIM VITAMINA B₉

Koenzim vitamina B₉ je tetrahidrofolat, također poznat kao tetrahidrofolna kiselina, bitan je u metabolizmu aminokiselina i nukleinskih kiselina. Djeluje kao donor jedinica s jednim atomom ugljika. Nedostatak folne kiseline može uzrokovati megaloblastičnu anemiju, a tetrahidrofolat se koristi u liječenju megaloblastične anemije i makrocitne anemije. Folna kiselina pretvara se u aktivni koenzim pomoću dvije uzastopne redoks reakcije ovisne o NADPH koje su katalizirane dihidrofolat-reduktazom, koja se nalazi u jetri. (Slika 16.) [25]



Slika 16. Nastanak tetrahidrofolata

Tetrahidrofolat djeluje kao nosač ugljika. Ugljik može biti prisutan u većini njegovih mogućih oksidacijskih stanja, osim u obliku karbonata. Jedinica ugljika je vezana za molekulu tetrahidrofoata na položaju N5, na položaju N10 ili nastankom mosta između položaja N5 i N10.[1]

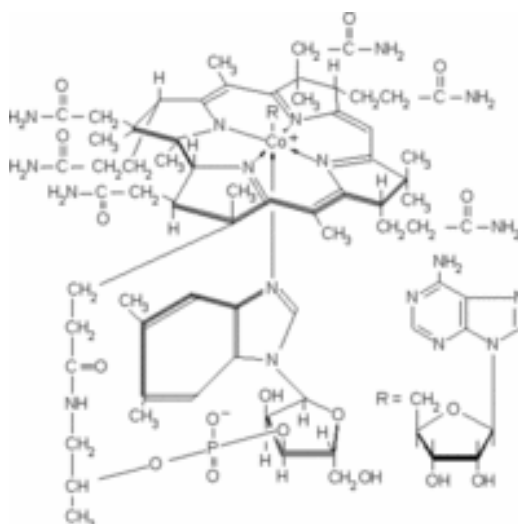
Tetrahidrofolat je potreban za brojne biosintetske enzime. Tijekom sinteze timidina, tetrahidrofolat se pretvara u dihidrofolat, zatim se dihidrofolat reducira u tetrahidrofolat kako bi se obnovio aktivni kofaktor, budući da je timidin potreban za sintezu DNA i zbog toga što stanice koje se dijele moraju sintetizirati DNA, inhibicija dihidrofolat-reduktaze sprječava staničnu diobu.[26]

Tetrahidrofolat se može sintetizirati iz polaznog materijala dihidropteroat- difosfata i p-amino benzojeve kiseline (PABA) pomoću dihidropteroat-sintaze, a to su ujedno i polazni materijali koje proizvode bakterije.[25]

9. KOENZIM VITAMINA B₁₂

Koenzim B₁₂ otkrili su prije 50 godina Barker i suradnici, a njegova organometalna priroda otkrivena je rendgenskom analizom u laboratoriju D. C. Hodgkina. Utječe na stanični metabolizam i zajedno s folatom vitamina B₉ sudjeluje u sintezi nukleinskih kiselina, pomaže u održavanju zdravih krvnih stanica, održava živčani sustav i pomaže u sprječavanju različitih tipova anemija.[27]

Koenzim B₁₂ sastoji se od nekoliko jedinstvenih strukturnih jedinica, a to su makrociklička jezgra korin sa svojim Co³⁺ centrom, i organometalni 5'-deiksiadenozil ligand.(Slika 17.) Koenzim B₁₂ i vitamin B₁₂ su potpuni korinski nukleotidi, a uklanjanjem nukleotidnog dijela nastaju nepotpuni korini kao što su kobrinska kiselina i kobinamidi. [27]



Slika 17. Struktura koenzima B₁₂

Koenzimi B₁₂ ili kobalamini su složeni makrocikli čija je reaktivnost povezana s jedinstvenom vezom kobalt-ugljik. Dva biološki aktivna oblika su metilkobalamin (MeCbl) i adenzilkobalamin (AdoCbl) i njihovi usko povezani oblici kobamida. MeCbl sudjeluje kao intermedijarni nosač aktiviranih metilnih skupina. Tijekom katalitičkog ciklusa koenzim prelazi između MeCbl i visoko nukleofilnog klipa. Primjeri enzima ovisnih o MeCbl uključuju metionin-sintazu i koenzim M-metil-transferazu. AdoCbl djeluje kao izvor slobodnih radikala temeljenih na ugljiku koji se otkrivaju homolizom koenzimske veze kobalt-ugljik. Slobodni radikali se zatim upotrebljavaju za uklanjanje ne kiselnih

vodikovih atoma iz supstrata kako bi se olakšale različite reakcije koje uključuju cijepanje ugljik-ugljik, ugljik-kisik i ugljik- dušik veze. [28]

10. ZAKLJUČAK

Vitamini su organske molekule koje su u malim količinama potrebne u prehrani, a gotovo svi koenzimi izvedeni su iz vitamina i drugih esencijalnih hranjivih tvari. Vitamini B skupine, prije obavljanja različitih funkcija u metabolizmu, moraju modificirati u svoje aktivne oblike. Tiamn-pirofosfat aktivni je oblik tiamina, koenzim je nekoliko enzima uključenih u metabolizam aminokiselina razgranatih lanaca, a bitnu ulogu ima u mijeni ugljikohidrata. Enzimi koji koriste aktivirane prenositelje elektrona pri oksidaciji molekula goriva, kao što su NAD^+ i FAD i njihovi reducirani oblici, važni su u farmakologiji i istraživanjima usmjerenim ka liječenju bolesti. U većini redukcijskih biosinteza donor elektrona je reducirani oblik NADPH , a njegova dodatna fosfatna skupina jest oznaka po kojoj enzimi mogu raspoznati treba li elektrone visokog potencijala upotrijebiti u anabolizmu ili katabolizmu. Aktivirani prijenosnik fragmenta s dva ugljikova atoma je koenzim A, koji je ujedno i središnja molekula u metabolizmu. Kinetička stabilnost aktiviranih prenositelja u odsutnosti specifičnih katalizatora bitna je za njihovu biološku funkciju, jer to zapravo enzimima omogućuje kontrolu tijeka slobodne energije i redukcijske snage. Aktivni oblik piridoksina je PLP koji stvara međuprodukte Schiffove baze s aminotransferazama u reakcijama transaminacije. Tetrahidrofolat zajedno s koenzimom B_{12} sudjeluju u sintezi nukleinskih kiselina, koje sudjeluju u pohrani, prijenosu i ekspresiji genetske informacije. Nedavna otkrića ovih koenzima pokazuje nam kako je priroda snalažljiva i potiče istraživanja prema otkrivanju ovih mehanizama reakcije.

11. POPIS LITERATURE I SLIKOVNIH PRIKAZA

- [1] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Streyer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013.
- [2] D. W. Martin, P. A. Mayes, V. W. Rodwell, D. K. Granner, *Harperov pregled biohemije*, Savremena administracija, Beograd, 1989.
- [3] http://thiamine.dnr.cornell.edu/Thiamine_biochemistry.html (25.6. 2019.)
- [4] S. M. Nabokina, H. M. Said, *AM J PHYSIOL-GASTR L*, **303** (2012), 389-395.
- [5] <http://guweb2.gonzaga.edu/faculty/cronk/CHEM440pub/TPP.html> (25.6.2019.)
- [6] J. C. Tsibris, D. B. McCormick, L. D. Wright, *J BIOL CHEM*, **241** (1966), 1138-1143.
- [7] H. J. Kim, D. R. Winge, *BIOCHIM BIOPHYS ACTA*, **1872** (2013), 627-636.
- [8] R. Teufel, V. Agarwal, B. S. Moore, *CURR OPIN CHEM BIOL*, **31** (2016), 31-39.
- [9] M. Barile, T. A. Giancaspero, C. Brizio i sur, *CURR PHARM DESIGN*, **19** (2013), 2649-2675.
- [10] K. Yamada, N. Hara, T. Shibata i sur., *ANAL BIOCHEM*, **352** (2006), 282-285.
- [11] A. A. Sauve, *J PHARMACOL EXP THER*, **324** (2008), 883-893.
- [12] P. Belenky, K. L. Bogan, C. Brenner, *TRENDS BIOCHEM SCI*, **32** (2009), 12-19.
- [13] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5062546/> 6.7.2019.
- [14] A. Katohik, K. Uzenohara, M. Akita, T. Hashimoto, *J PLANT PHYSIOL*, **141** (2006), 891-857.
- [15] L. Agledal, M. Niere, M. Ziegler, *FRONT MICROBIOL*, **15** (2013), 1-10.
- [16] <https://biologydictionary.net/nadp> 5.7.2019.
- [17] S. K. Spanas, R. A. Weusthuis, J. van der Oost, S. W. M. Kenegen, *FRONT MICROBIOL*, **6** (2015), 742.
- [18] H. W. Liu, L. Mander, *Comprehensive Natural Product II*, Elsevier Science, Amsterdam, 2010.

- [19] W. J. Lennarz, M. D. Lane, *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Academic Press, Cambridge, 2013.
- [20] R. Leonardi, S. Jackowski, *HHS Public Access*, **2** (2007), 2.
- [21] M. L. Di Salvo, N. Budisa, R. Contestabile, *PLP-dependent Enzymes*, Beilstein-Institut, Berlin, 2013.
- [22] N. M. F. S. A. Cerqueira, P.A. Fernandes, M. J. Ramos, *J CHEM THEORY COMPUT*, **7** (2011), 1356-1368.
- [23] http://www.npmrd.org/natural_products/NP0001253 14.7.2019.
- [24] A. Mishra, K. Dhingra i sur., *ACS CHEM NEUROSCI*, **1** (2010), 129-138.
- [25] P. T. R. Rajagopalan, Z. Zhang i sur., *P NATL ACAD SCI USA*, **99** (2002), 13481-13486.
- [26] <http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Metabolism/FolateB12.html> (16.7.2019.)
- [27] B. Krätler, *BIOCHEM SOC T*, **33** (2005), 1-22.
- [28] E. N. Marsh, *ESSAYS BIOCHEM*, **34** (1999), 139-154.

SLIKOVNI PRIKAZI

Slika 1. Struktura tiamin-pirofosfata

(<https://vub.hr/images/uploads/1403/omkib-predavanje-sat-7.pdf>) 25.6.2019.

Slika 2. reakcije enzima koji koriste TPP kao kofaktor

(http://thiamine.dnr.cornell.edu/Thiamine_biochemistry.html) 25.6.2019.

Slika 3. Mehanizam dekarboksilacije reakcije enzimom E1

(<http://oregonstate.edu/instruct/bb451/winter14/lectures/citricacidcycleoutline.html>)
25.6.2019.

Slika 4. Oksidirani, polukinonski i reducirani oblik FMN-a

(<https://employees.csbsju.edu/cschaller/Reactivity/oxphos/OPcomplexI.htm>) 29.6. 2019.

Slika 5. Struktura FAD-a

(https://www.wikiwand.com/en/Flavin_adenine_dinucleotide) 24.7.2019.

Slika 6. Oksidirani (FAD) i reducirani (FADH₂) oblik

(https://sh.wikipedia.org/wiki/Flavin_adenin_dinukleotid) 29.6.2019.

Slika 7. Oksidacijska stanja FAD

(<https://www.semanticscholar.org/paper/Photochemistry-of-flavoprotein-light-sensors.-Conrad-Manahan/670c7eef2b0cba8e66668372b809b3dfc90f82ac/figure/0>) 30.6.2019.

Slika 8. Struktura NAD⁺

(https://en.wikipedia.org/wiki/Cofactor_engineering) 2.7.2019.

Slika 9. Struktura NADP⁺

(https://en.wikipedia.org/wiki/Nicotinamide_adenine_dinucleotide_phosphate) 2.7.2019.

Slika 10. Struktura koenzima A

(<https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=koenzim+a>) 10.7.2019.

Slika 11. Sinteza koenzima A

(<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/pantothenic-acid>) 10.7.2019.

Slika 12. Struktura PLP-a

(https://sr.wikipedia.org/wiki/Piridoksal_fosfat#/media/%D0%94%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%82%D0%B5%D0%BA%D0%B0:Pyridoxal-phosphate.svg) 12.7.2019.

Slika 13. Strukturni prikaz unutrašnjeg i vanjskog aldimina

(<https://www.x-mol.com/paper/5707132>) 12.7.2019.

Slika 14. Mehanizam transaminacije

(<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/cs/c4cs00507d#!divAbstract>) 13.7.2019.

Slika 15. Struktura biocitina

(<https://www.caymanchem.com/product/16751>) 14.7.2019.

Slika 16. Nastanak tetrahidrofolata

(<http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Metabolism/FolateB12.html>) 20.7.2019.

Slika 17. Struktura koenzima B₁₂

(<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c0884?lang=en®ion=HR>) 22.7.2019.