Struktura sintaze masnih kiselina eukariota

Pinević, Bruno

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:039035

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Bruno Pinević

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

STRUKTURA SINTAZE MASNIH KISELINA EUKARIOTA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Zagreb, 2017. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada: 7. srpnja 2017.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita: 22. rujna 2017.

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK 6

§ 1. UVOD 7

§ 2. KRISTALNE STRUKTURE EUKARIOTSKIH SINTAZA MASNIH KISELINA 10

2.1. Proces određivanja struktura makromolekula 10

2.2. Struktura sintaze masnih kiselina jednostanične gljive *Thermomyces lanuginosus* 12

2.2.1 Kanaliziranje supstrata 16

2.3. Sintaza masnih kiselina kod sisavaca 17

2.3.1 Organizacija domena i reakcijske komore 18

2.4. Sintaza masnih kiselina kao meta anti-tumorskih lijekova 20

2.4.1 Orlistat 20

2.4.2 Omega-3 masne kiseline 21

2.4.3 Utjecaji na budući razvoj 22

3 LITERATURNI IZVORI XXIII

§ Sažetak

Sintaza masnih kiselina jedan je od najvažnijih enzima u eukariota općenito. Riječ je o jedinom enzimu odgovornom za *de novo* sintezu masnih kiselina čiji je spektar uloga u svakom organizmu izrazito širok – od stvaranja prekursora fosfolipida odgovornih za fizičku izgradnju svake stanice pa sve do energije koju, doduše najčešće tek u nedostatku glikogena, tijelo dobiva upravo razgradnjom masnih kiselina. U ovom radu fokus je uglavnom na strukturi dvije vrste navedenog enzima – sintaze masnih kiselina u gljiva i sisavaca. Riječ je naravno o dvije strukturno poprilično različite inačice istog enzima a što je uvjetovano različitim potrebama dvaju organizama za *de novo* sintezom masnih kiselina i lipida koja kod sisavaca koji masnoće intenzivno unose i prehranom zasigurno nije ista kao kod gljiva kod kojih je situacija potpuno različita.

Sintaza masnih kiselina jedan je od oglednih primjeraka multienzimskih proteina odnosno enzima koji sadrže više katalitički aktivnih mjesta povezanih katalitički neaktivnim regijama. Upravo na njenom primjeru vidjeti ćemo tako na koji način takvi enzimi obavljaju svoj dio posla u stanici i zašto su gotovo uvijek bolji od monoenzimskih proteina. Riječ je naravno o procesu kanaliziranja supstrata kojim enzim na različite načine vodi supstrat od jedne do druge aktivne regije koje su prostorno gledano nerijetko organizirane na način da je prijenos supstrata od jedne do druge energetski najpovoljniji.

Pored upravo kako joj i samo ime govori sintetske uloge sintaze masnih kiselina osvrnuti ćemo se i na potencijalnu ulogu FAS (eng. fatty acid synthase) kao mete antitumorskih lijekova upravo zbog širokog spektra primjene krajnjeg produkta njenog rada a to je masna kiselina (u najvećem broju slučajeva palmitat). Osnovni cilj antitumorskih lijekova jest odgovoriti na maligne procese u organizmu na način da se onemogući rapidna sinteza stanica odnosno da dođe do apoptoze već postojećih tumorskih stanica. Već danas postoji poprilično broj kako sintetskih tako i bioloških molekula za koje postoji osnovana očekivanja da svojom aktivnošću mogu na neki od četiri, kako je razjašnjeno u kasnijem tekstu, zasad najbolje objašnjena načina djelovanja dovesti do smrti maligne stanice. Krajnjeg rješenja zasad još nema ali uzimajući u obzir ulaganja na upravo ovom području istraživanja potencijalnih antitumorskih lijekova nije nemoguće da se do rješenja problema dođe u skorijoj budućnosti.

§ 1. UVOD

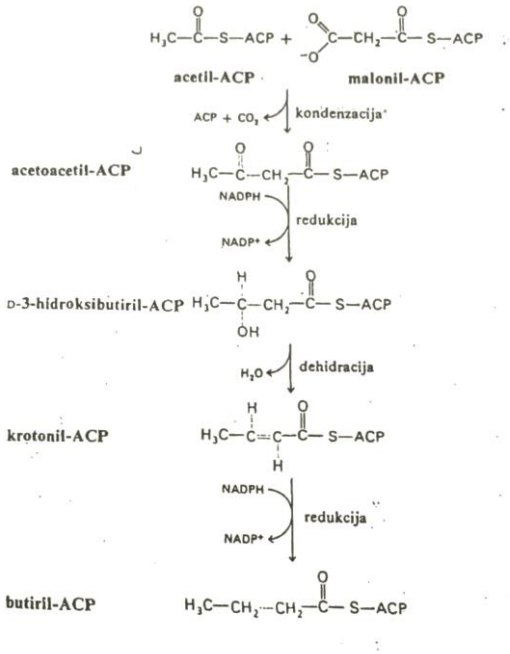
Masne kiseline pripadaju skupini spojeva koji sadrže dugi ugljikovodični lanac i krajnju karboksilnu skupinu a imaju nekoliko vrlo važnih uloga u funkcioniranju živih bića u cijelosti. Masne kiseline sastavni su dio fosfolipida i glikolipida, a riječ je o amfipatskim molekulama koje imaju iznimnu ulogu u biomembranama. Pored toga, masne se kiseline nazivaju još i molekulama metaboličkog goriva. U organizmu se skladište u obliku triacilglicerola – estera alkohola glicerola s masnim kiselinama, poznatih i kao neutralne masti odnosno trigliceridi. Na svojstva samih masti, na puteve sinteze odnosno razgradnje, ponajviše utječe raznolikost struktura masnih kiselina odnosno (ne)zasićenost alkilnog lanca pa tako razlikujemo zasićene (npr. palmitat, stearat), i nezasićene (npr. oleat, linoleat) masne kiseline.

Triacilgliceroli predstavljaju vrlo koncentrirana skladišta metaboličke energije a u sisavaca se nalaze u citoplazmi adipoznih (masnih) stanica gdje udruživanjem u veće kuglice nerijetko zauzimaju najveći dio volumena same stanice. U trenutcima dakle kada je organizmu potrebna energija doći će do mobilizacije triacilglicerola. Prvi korak u razgradnji jest hidroliza pomoću lipaza a čija je aktivnost naravno hormonski regulirana. Triacilglicerol se tako hidrolizom u tri koraka raspada na tri masne kiseline i alkohol glicerol. I dok će se glicerol djelovanjem glicerol-kinaze odnosno glicerol-fosfat-dehidrogenaze potom prevesti do dihidroksiaceton-fosfata odnosno D-gliceraldehid-3-fosfata (međuprodukata procesa glikoze odnosno glukoneogeneze), pred masnim kiselinama je potom proces aktivacije koji se događa na vanjskoj membrani mitohondrija (dakle idalje u citoplazmi), a katalizira ga enzim acil-CoA-sintetaza. U tom procesu ATP svojom razgradnjom energetski potiče stvaranje tioesterske veze između karboksilne skupine masne kiseline i sulfhidrilne skupine koenzima A. Proces se odvija u dva koraka a krajnji je produkt aktivirana masna kiselina u obliku acil-CoA. Acil-CoA potom ulazi u matriks mitohondrija gdje će kasnije doći do oksidacije na način da s dipolarnim alkoholom karnitinom uz djelovanje enzima karnitin-aciltransferaza-I tvori kompleks acil-karnitin koji difuzijom prolazi kroz membranu te se potom djelovanjem karnitin-aciltransferaze-II prevodi natrag do acil-CoA.

Glavni princip procesa oksidacije masnih kiselina jest kružna odgradnja po dva C atoma alikilnog lanca procesom od 4 koraka. Acil-CoA se prvotno oksidira djelovanjem acil-CoA-dehidrogenaze uz FAD do trans-Δ^2-enoil CoA kod kojeg je prisutna αβ dvostruka veza. Potom dolazi do adicije vode na dvostruku vezu nakon čega se, koristeći NAD+ kao oksidans L-3-

hidroksiacil-CoA oksidira do 3-ketoacil-CoA. U zadnjem se koraku posljednje navedeni spoj tiolizira do po jedne molekule acetil-CoA i acil-CoA koji je sada naravno skraćen za 2 C atoma te je ujedno početni spoj u novom krugu razgradnje masnih kiselina. To je, generalno gledano, put razgradnje (oksidacije) masnih kiselina. Navedeni put konkretno vrijedi u slučaju razgradnje zasićenih masnih kiselina s parnim brojem C atoma. Ostala dva česta slučaja – razgradnja nezasićenih masnih kiselina, odnosno masnih kiselina s neparnim brojem atoma sadrže manje razlike u samom putu razgradnje, ali cilj te produkti su isti ili veoma slični (kod masnih kiselina s neparnim brojem atoma razgradnja ide do propionil-CoA koji potom u dva koraka prelazi u sukcinil-CoA – međuprodukt ciklusa limunske kiseline).

Proces biosinteze masnih kiselina (slika 1) u principu je vrlo sličan procesu razgradnje uz neke važne razlike. Sinteza se naime događa u citoplazmi a međuprodukti su tioesterskom vezom vezani za fosfopanteteinsku 'ruku' ACP (eng. acyl carrying protein) za razliku od procesa razgradnje kada tu ulogu ima strukturno vrlo slični koenzim A.



Slika 1. Shema metaboličkog puta sinteze masnih kiselina[1] (ilustracija preuzeta i prilagođena literaturnom izvoru)

Možda i najveća razlika dva procesa jest što kod sinteze sav posao obavlja multienzimski protein – sintaza masnih kiselina ili FAS (eng. fatty acid synthase). Prvi i ključan korak u sintezi jest aktivacija početne supstancije u sintezi masnih kiselina acetil-CoA. Proces naravno katalizira FAS i to njen specifični dio acetil-CoA-karboksilaza uz biotin kao kofaktor a produkt je malonil-CoA. Acetil-transferaza potom prevodi acetil-CoA do acetil-ACP. Isti proces s malonil-CoA obavlja malonil-transferaza i na taj način nastaju dva spoja koja kreću u proces

sinteze lanca masne kiseline. β-ketoacil-ACP-sintaza potom kondenzira dva spoja do acetoacetil-ACP. Taj se međuprodukt sinteze masnih kiselina potom uz NADPH reducira do D-3-hidroksibutiril-ACP-a koji se potom dehidratira do krotonil-ACP-a (trans-Δ^2-enoil ACP). Završni korak obavlja enoil-ACP-reduktaza a ponovno je riječ o redukciji uz potrošnju NADPH gdje nastaje butiril ACP. Proces ponovno kreće u krug, butiril-ACP ulazi u kondenzaciju s acetil-ACP i tako dalje sve dok ne nastanje lanac od 16 ugljikovih atoma kada tioesteraza 'odreže' ACP i ostaje masna kiselina palmitat. Što se nezasićenih masnih kiselina tiče, dvostruke se veze uvode pomoću molekulskog kisika. Zanimljivo je kako sisavci ne mogu sami stvarati nezasićene masne kiseline u kojima bi dvostruka veza bila iza C_{10} pa je takve masne kiseline potrebno unositi prehranom te ih upravo zbog toga nazivamo esencijalnim masnim kiselinama. Stehiometrija reakcija razgradnje odnosno sinteze palmitata prikazana je na slici 2.

$$\text{palmitoil-CoA} + 7\,\text{FAD} + 7\,\text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} + \text{CoA} \longrightarrow$$
$$\longrightarrow \quad \text{C}_{n-2}\text{-acil-CoA} + \text{FADH}_2 + \text{NADH} + \text{acetil-CoA} + \text{H}^+$$

$$8\,\text{acetil-CoA} + 7\,\text{ATP} + 14\,\text{NADPH} \longrightarrow$$
$$\longrightarrow \quad \text{palmitat} + 14\,\text{NADP}^+ + 8\,\text{CoA} + 6\,\text{H}_2\text{O} + 7\,\text{ADP} + \text{P}_i$$

Slika 2. Stehiometrija reakcija razgradnje i sinteze palmitata

Naknadno je naravno moguća i acilacija glicerol-3-fosfata pomoću acil-CoA kao aktiviranih prekursora sve do fosfatidilne kiseline koja je zajednički prekursor kako neutralnih masti tako i membranskih fosfolipida čija sinteza ovisi o potrebama organizma u određenom trenutku.

§ 2. KRISTALNE STRUKTURE EUKARIOTSKIH SINTAZA MASNIH KISELINA

2.1. Proces određivanja struktura makromolekula

Da bi analiza struktura makromolekula te njihovo djelovanje uopće bilo moguće proučavati, potrebno je nekom od tehnika do strukture i doći. Postoje tri tehnike koje se najčešće koriste u svrhu što preciznijeg određivanja strukture većih molekula i molekulskih sustava a riječ je o (i) NMR spektroskopiji, (ii) elektronskoj mikroskopiji i (iii) kristalografiji x-zraka pri čemu posljednje navedena predstavlja jedinu tehniku s mogućnošću određivanja strukture makromolekula na razini atoma. Sam proces počevši već od priprave uzoraka, kristalizacije pa sve do prikupljanja i analize podataka može biti iznimno zahtjevan. Ipak, motivira činjenica kako je od početka korištenja ovog načina izolirano i na zavidnoj razini određeno mnogo struktura biološki važnih molekula, a među kojima su i dvije najistaknutije vrste enzima sintaza masnih kiselina – one koje nalazimo kod gljiva i sisavaca a čija će struktura i djelovanje i biti glavna tema ovog rada.

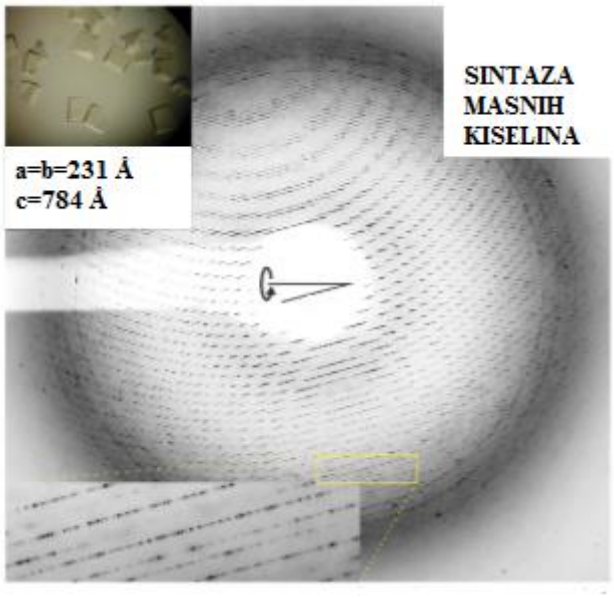
Samom procesu kristalizacije ciljane molekule naravno prethodi prikupljanje čim veće količine uzorka visoke čistoće. Kada je riječ o jediničnim proteinima ili manjim kompleksima navedeno se postiže metodom heterologne prekomjerne ekspresije rekombinantnih proteina i purifikacijom procesom afinitetnog označavanja (tagiranja). Nažalost, rekombinantna ekspresija najčešće nije najbolja opcija kod makromolekula koje se onda moraju izolirati iz prirodnih izvora. U tom slučaju važno je prethodno odgovoriti na mnoga pitanja od kojih je najvažnije kolika je ustvari ekspresija ciljanog gena u određenom organizmu ili tkivu. Prilikom izolacije FAS kod gljiva primjerice bilo je važno koristiti fermentor kapaciteta čak 200 l kako bi se prikupila dovoljna količina staničnog materijala i optimizacijom sastava medija povećala razina ekspresije gena. Purifikacija se u takvim slučajevima najčešće zasniva na klasičnim biokemijskim metodama kao što je precipitacija koju ovisno o veličini makromolekula prate kromatografske ili ultracentrifugalne tehnike.

Pri samom procesu kristalizacije važno je biti siguran kako je riječ o homogenom uzorku odnosno kako nisu prisutne molekule koje bi eventualnom ugradnjom mogle narušiti strukturu kristala Najčešća metoda same kristalizacije makromolekulskih kompleksa je takozvana robotska provjera upravo zbog toga što navedena metoda omogućuje provjeru utjecaja velikog

broja uvjeta na uzorak a što se može pokazati kao iznimno važno obzirom na velik broj specifičnosti dimenzija ćelija ili samih kristalizacijskih uvjeta na koje se nailazi prilikom analize tako velikih kompleksa.

Potom se ulazi u post-kristalizacijske postupke među kojima važnu ulogu igra dehidratacija kristala. Redukcija količine otapala unutar kristala utječe na način pakiranja i može dovesti do promjene u načinu kristalizacije. Ovakvim postupcima moguće je doći do kristala koji bolje difraktiraju. Primjerice, izlaganjem FAS kod gljiva većim koncentracijama polietilen-glikola dovodi do transformacije rešetke od ortorompske do primitivne monoklinske što povećava rezoluciju difrakcije s 8 na 4 Å. Također, od iznimne je važnosti i da se podaci skupljaju pri temperaturama nižim od -150 ^{o}C što smanjuje evenutalnu štetu koju može nanijeti zračenje i samim time povećati životni vijek kristala pod djelovanjem x-zrake.

Proces obrade podataka također nosi nove izazove. Kristalima velikih makromolekulskih kompleksa često su karakteristične velike dimenzije jediničnih ćelija. Takve će ćelije puno slabije difraktirati zračenje obzirom da smanjenjem broja jedinićnih ćelija u volumenu kristala raste raspršenje. Nadalje, duže osi jediničnih ćelija za posljedicu imaju da su udaljenosti između reflektiranih točaka u recipročnom prostoru male odnosno točke nastale difrakcijom padaju pre blizu jedna drugoj na detektoru. Iz navedenog možemo zaključiti kako je ključ uspješnog prikupljanja mjernih podataka, osim naravno najboljih mogućih instrumenata, i dobra strategija prikupljanja. Tako orijentacija jediničnih ćelija prilikom zračenja može biti vrlo važan parametar. Ukoliko je jedna od osi jedinične ćelije znatno duža od ostalih najbolje je da bude orijentirana u smjeru okomitom na rotaciju kristala kako bi se izbjeglo preklapanje reflektiranog zračenja i nepreciznost u mjerenju a što se pokazalo kao krucijalno prilikom snimanja difrakcijskih slika (slika 3) između ostalog i sintaze masnih kiselina.



Slika 3: Prikaz difrakcije zračenja na kristalu sintaze masnih kiselina[2]
(naznačena je os rotacije jediničnog kristala prilikom snimanja, ilustracija preuzeta i prilagođena literaturnom izvoru)

Još jedan od faktora koji mogu utjecati na kvalitetu prikupljenih podataka jest jačina zračenja i vremenski period u kojem je kristal izložen zračenju. Prejako zračenje i preduga ekspozicija nerijetko dovode do potpune nemogućnosti prikupljanja podataka, čak i pri temperaturama nižim od -150 ^{o}C. Kristal je ipak post-kristalizacijskim metodama moguće pripremiti na takve uvjete kao što je moguće i na najbolji mogući način snimanju prilagoditi dimenzije jedinične ćelije. Posljednji korak u prikupljanju podataka je izračun mape elektronske gustoće koja mora biti u skladu sa mjerenim intenzitetima difrakcije makromolekulskog kristala. Pitanje je naravno koja je to minimalna rezolucija mape elektronske gustoće koja će dati precizne odgovore na ključna biokemijska pitanja u analizi strukture. Znanstvena su istraživanja pokazala kako je najbolje koristiti mapu elektronske gustoće rezolucije manje od 4.5 Å odnosno 3.6-4.0 Å.

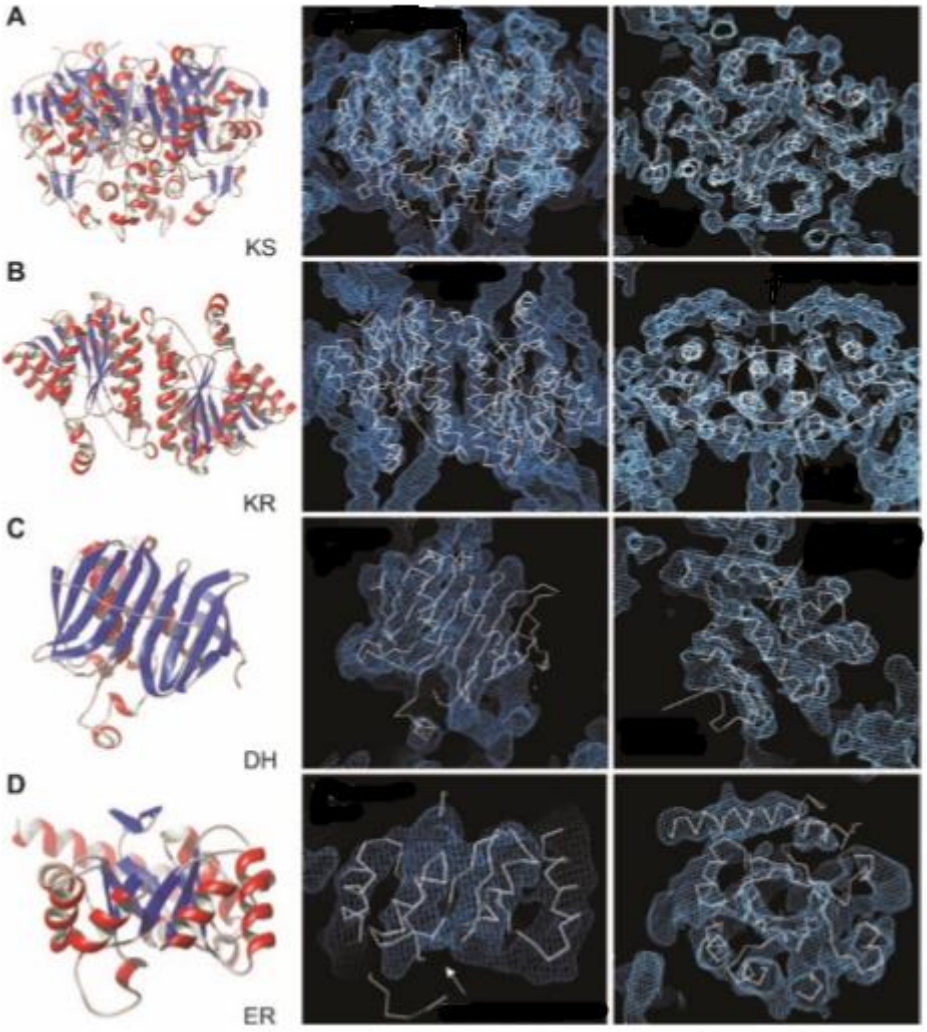
2.2. Struktura sintaze masnih kiselina jednostanične gljive *Thermomyces lanuginosus*

Sintaza masnih kiselina je multienzimski protein odgovoran za sintezu masnih kiselina. Strukturno gledano razlikujemo dvije vrste sintaza masnih kiselina – tip I odgovoran za sintezu kod sisavaca i jednostaničnih eukariota, čija struktura i djelovanje i jesu središnja tema ovog rada, i tip II karakterističan za većinu bakterijskih organizama i biljaka. Najvažnija strukturna

razlika dvaju sintaza jest to što je kod većine bakterija i biljaka (FAS I) riječ o skupini zasebnih, monofunkcionalnih enzima (proteina) čiju sintezu samim tim kodiraju različiti geni dok je kod sisavaca i gljiva (FAS II) u pitanju multienzimski polipeptid.

Kada govorimo o sintazi masnih kiselina kod gljiva riječ je o polipeptidu strukture $\alpha_6\beta_6$ približne relativne molekulske mase $2{,}6 \cdot 10^6$. Precizna 3D struktura multienzima određena je 'fitanjem' struktura homolognih enzima koji kataliziraju pojedine korake u sintezi masnih kiselina na mapu elektronske gustoće pri rezoluciji od 5 Å izrađenu prema kristalografskom modelu enzima dobivenom tehnikom x-zraka. Za potrebe ovog eksperienta sintaza masnih kiselina izolirana je iz jednostanične gljivice *Thermomyces lanuginosus*.

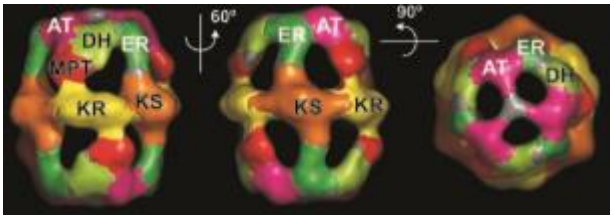
Za multienzimske proteine karakteristično je kanaliziranje supstrata kojim se postiže velika lokalna koncentracija međuprodukata što naravno ubrzava cjelokupni proces. Kod gljiva, u procesu sinteze masnih kiselina sudjeluju acetil- odnosno malonil-transferaza (AT/MPT) koje prebacuju aktiviranu acetilnu odnosno malonilnu skupinu s koenzima A na ACP, zatim ketoacil-sintaza (KS) odgovorna za nastanak acetoacetil ACP-a od kojeg potom serijom reakcija, prvotno na ketoacil-reduktazi (KR), zatim dehidratazi (DH) i na kraju enoil-reduktazi (ER) nastaje butiril-ACP. Krug se potom ponavlja još 6 puta sve do nastanka palmitoil-ACP-a i finalne reakcije sinteze kada MPT mijenja ACP za CoA i daje finalni produkt – palmitoil-CoA. Svaki od navedenih enzima ima određenu karakterističnu strukturu što je uvelike olakšalo prepoznavanje pojedinih proteinskih sekvenci na mapi elektronske gustoće obzirom da pri rezoluciji od 5 Å nije moguće nedvojbeno odrediti konkretni aminokiselinski slijed već je prepoznavanje sekvenci provođeno na temelju prepoznavanja strukturnih specifičnosti kako je i prikazano na slici 4.



Slika 4. Pregled procesa 'fitanja' struktura homolognih enzima na mapu elektronske gustoće cjelokupne sintaze masnih kiselina pri rezoluciji od 5 Å. Slike redom prikazuju strukture ketoacil-sintaze (pod A), ketoacil-reduktaze (pod B), dehidrogenaze (pod C) i enoil-reduktaze (pod D).[3] (ilustracija preuzeta i prilagođena literaturnom izvoru)

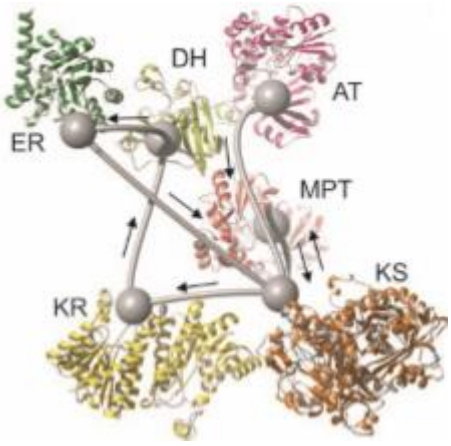
Struktura enzima u cijelosti određena je kako detekcijom i pozicioniranjem katalitički aktivnih dijelova enzima (slika 4), tako i organizacijom katalitički neaktivnih dijelova enzima koji ustvari služe tek kao kostur cjelokupne strukture naoko bačvastog izgleda. Visina 'bačve' iznosi 260 Å, širina 230 Å. Katalitički dijelovi KS i KR nalaze se u središnjem dijelu strukture, u takozvanoj ekvatorijalnoj regiji. Iz ekvatorijalne regije prema gore i prema dolje šire se polipeptidni krakovi koji se pri vrhu odnosno dnu strukture približavaju i na sebi nose ostale katalitičke regije multienzimskog proteina kakav je FAS. U dijelu koji je povezan na KR pronalazimo MPT dok drugi intenzivni izvor elektronske gustoće označava ER. Na kraju AT i DH zatvaraju strukturu kompleksa. Ovakva struktura uz sve je i u skladu sa pretpostavkom

kako je ekvatorijalna regija sastavljena od α lanaca dok je kod lukova riječ o β lancima. Pretpostavljena struktura cjelokupnog enzima prikazana je na slici 5.



Slika 5. Pretpostavljena struktura multienzimskog proteina sintaze masnih kiselina izolirane iz gljive Thermomyces lanuginosus načinjena mapiranjem elektronske gustoće pri rezoluciji od 5 Å.[3] (ilustracija preuzeta i prilagođena literaturnom izvoru)

Enzim se kako je i na slici 5 vidljivo sastoji od dvije reakcijske komore od kojih su obe opremljene sa po 3 seta katalitičkih domena potrebnih za sintezu masnih kiselina. KS i KR dimeri u ekvatorijalnoj regiji imaju po jednu podjedinicu sa slanje međuprodukata kako u gornju tako i u donju komoru. Sve upućuje na to kako reaktanti i međuprodukti reakcije sinteze u komore ulaze kroz kanale širine do 25 Å pogodne za ulazak manjih molekula ali i koji zaustavljaju pasivnu difuziju makromolekula. Možemo također zaključiti kako je ACP ograničen unutar komore obzirom da je to jedini način na koji bi ACP i mogao ostvariti transfer supstrata. Ipak, udaljenost između aktivnih mjesta veća je od dužine fosfopantetinske ruke ACP-a čija duljina iznosi 18 Å te stoga ACP ne može samo prebacivati supstrat od jedne domene do druge već je ključan u procesu dostavljanja reakcijskih međuprodukata u hidrofobne utore aktivnih mjesta. Shema transfera ACP od jedne do druge katalitičke domene prikazana je na slici 6.[3]

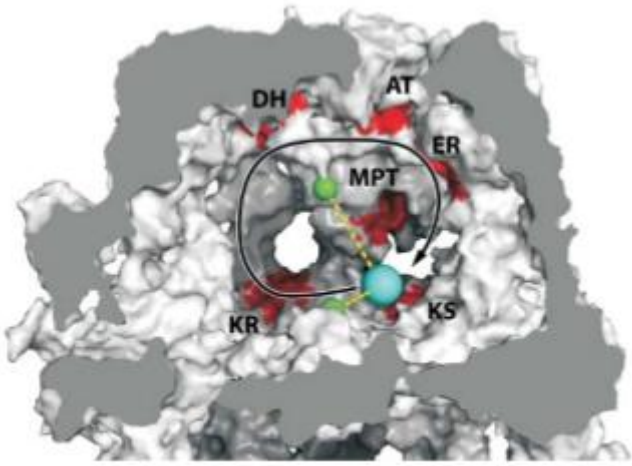


Slika 6. Shema transfera ACP do pojedinih katalitičkih domena [3]

2.2.1 Kanaliziranje supstrata

Struktura sintaze masnih kiselina od specifične je važnosti za sami proces sinteze. Glavni razlog zašto je sami enzim toliko učinkovit i dobar u onome što radi jest upravo raspodjela aktivnih mjesta na enzimu, a čega je posljedica mehanizam kanaliranja supstrata. U ovom procesu međuprodukti reakcije sinteze su kovalentno vezani za ACP što sprečava njihovu eventualnu difuziju u prostor citoplazme tijekom samog transfera između aktivnih mjesta. Koncentracija ACP-a je pored toga dovoljno velika unutar reakcijske komore da se proces može neometano odvijati – drugačije rečeno, ACP u ovom slučaju nije limitirajući reaktant već su to upravo međuprodukti same reakcije sinteze masnih kiselina. Ovakva uspostava mehanizma svakako ima mnoge prednosti pred sintazom masnih kiselina tipa 2, među kojima su povoljniji reakcijski uvijeti u vidu koncentracije pojedinih sudionika pa sve do olakšane regulacije obzirom da postoje samo α i β lanci a ne čak 8 različitih proteina.

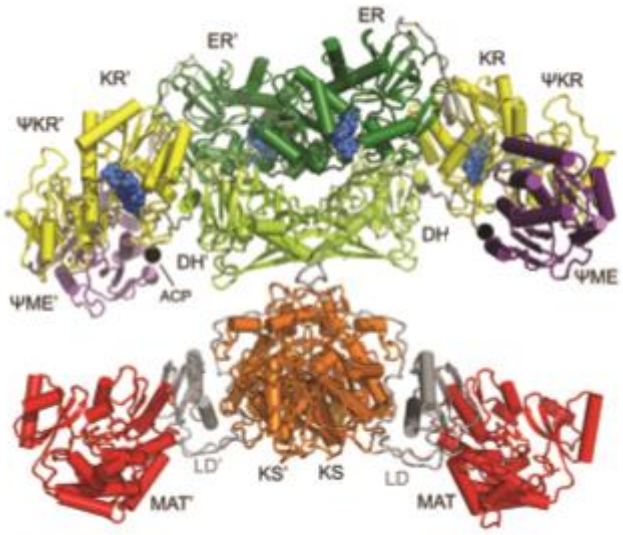
Određen je i najvjerojatniji katalitički put pri čemu su u obzir uzeta usmjerenja aktivnih mjesta enzima unutar jedne reakcijske komore, duljina 'dohvata' ACP-a kao i energetski najpovoljnija shema koja ACP na kraju kruga dovodi natrag na početak kako bi mogao sudjelovati u novom krugu enlongacije lanca. Mehanizam je slikovito uspoređen sa loptom privezanom na dvije opruge a koja bi u ovom slučaju simbolizirala ACP odnosno međuprodukte katalize koja kružnim kretnjama, u aproksimiranoj ravnini, oko ravnotežnog položaja dolazi do aktivnih mjesta enzima (slika 7). [4]



Slika 7. Put ACP-a tijekom jednog kruga sinteze masnih kiselina[4] (ilustracija preuzeta i prilagođena literaturnom izvoru)

2.3. Sintaza masnih kiselina kod sisavaca

Struktura sintaze masnih kiselina kod sisavaca bitno se razlikuje od strukture sintaze kod gljiva. Zajedničko je to da je i u ovom slučaju riječ u multienzimskom proteinu odgovornom za sve korake u cjelokupnom procesu sinteze masnih kiselina. I ovdje se izmjenjuju katalitičke i nekatalitičke regije dok cjelokupnu strukturu možemo podijeliti na dva dijela – kondenzirajući i modificirajući. Specifičnost strukture su i dvije dodatne nekatalitičke regije – pseudo-ketoreduktaza i periferna-pseudo-metiltransferaza kao pokazatelj strukturnih promjena kroz koje je enzim kroz vrijeme prolazio. Struktura je i u ovom slučaju određena fitanjem struktura pojedinih aktivnih mjesta na mapu elektronske gustoće. Ipak, nije bilo moguće nedvojbeno locirati i konkretno utvrditi strukturu veznih regija (regija koje povezuju domene enzima). Također, nemoguće je sa sigurnošću reći gdje se točno nalaze ACP i TE domene zbog njihove fleksibilnosti odnosno nefiksirane pozicije na samom enzimu o čemu će više biti riječi kasnije. Enzim se dakle sastoji od dvije identične podjedinice gdje se tri katalitičke domene – ketoacil sintaza, malonil/acetil-transferaza i dehidrataza nalaze na kondenzirajućem (N-terminus) dijelu dok su enoil reduktaza i ketoacil reduktaza locirane na kondenzirajućem (C-terminus) dijelu. Slika 8 prikazuje strukturu sintaze masnih kiselina kod sisavaca.



Slika 8. Struktura sintaze masnih kiselina kod sisavaca[5] (ilustracija preuzeta i prilagođena literaturnom izvoru)

Unatoč činjenici što znamo kako je riječ o homodimeru i kako svaki monomer sadrži sva potrebna aktivna mjesta za provođenje elongacijskog ciklusa, preniska rezolucija prilikom određivanja kristalne strukture odgovorna je za nemogućnost točne organizacije domena unutar

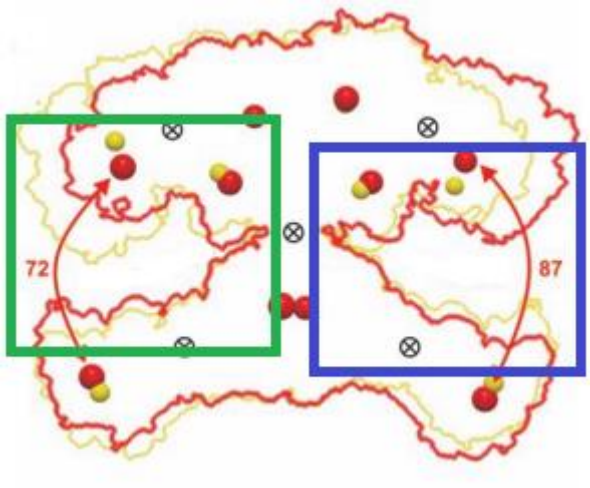
pojedinog lanca upravo zbog već navedene činjenice kako je nemoguće nedvojbeno locirati i konkretno utvrditi strukturu veznih regija.[5]

2.3.1 Organizacija domena i reakcijske komore

Sintaza masnih kiselina kod sisavaca podložna je specifičnim konformacijskim promjenama koje se događaju tokom svakog pojedinog elongacijskog ciklusa. Navedena činjenica dokazana je na više načina simulacijom ponašanja molekule tokom njena djelovanja. U prvom slučaju utvrđeno je međudjelovanje odnosno dimerizacija pojedinih domena FAS-a – konkretno KS i ER. Interakcija je uočena usporedbom sa bakterijskom FAS kod koje nema govora o multienzimskom proteinu već je riječ o zasebnim proteinima koji onda puno lakše dolaze u interakciju. Utvrđeno je tako da homofilna interakcija KS i ER domena utječe na dimerni karakter cjelokupne molekule obzirom da je riječ o aktivnim mjestima na potpuno suprotnim stranama enzima. Kontakti između podjedinica na dijelu između kondenzirajućeg i modificirajućeg dijela također utječu na dimerni karakter kao i interakcija zasad još nedovoljno određenih veznih regija.

Tehnikom pozicioniranja homolognih struktura poznatog katalitičkog mehanizma na mapi elektronske gustoće s popriličnom su preciznošću locirana aktivna mjesta enzima. Veliku ulogu u potvrđivanju ovih podataka odigrala je uloga ACP domene enzima. Tijekom katalitičkog ciklusa rastući lanac je vezan za fosfopanteteinsku skupinu ACP-a. Iz lokacije KR domene s kojom je ACP usko povezan i lokacije TE domene moguće je pretpostaviti poziciju ACP na dijelu enzima kojeg se u nekim slučajevima naziva i 'ruka enzima' a riječ je o rubnom dijelu modificirajućeg dijela proteina u neposrednoj blizini KR domene. Obzirom na prostornu ograničenost djelovanja ACP jasno je kako enzim u principu sadrži dvije reakcijske komore ovisno o dostupnosti tog dijela enzima ACP-u. Teško je očekivati kako će ACP vezan na jednoj strani 'ruke enzima' moći dosegnuti drugu stranu odnosno suprotnu reakcijsku komoru ne samo zbog fizičke udaljenosti već i orijentacije KS i DH koji izlaze iz ravnine koju tvori ostatak enzima i na taj način priječe put eventualnom prijenosu rastućeg lanca do druge komore. Iz ovih podataka i mape elektronske gustoće moguće je zaključiti kako se domene MAT i KS pojedine reakcijske komore nalaze i na istoj podjedinici enzima. U kondenzirajućem dijelu enzima ACP mora međuprodukte elongacijskog ciklusa prenositi između aktivnih mjesta čija udaljenost varira oko 70 Å dok se prelaskom u gornji dio enzima te udaljenosti smanjuju na tridesetak angstrema (primjerice udaljenost od KR do DH iznosi 37 Å dok potom udaljenost od DH do ER iznosi tek 32 Å i fosfopantetinska ju ruka može premostiti i bez da fizički mijenja položaj).

Proučavajući kristalnu strukturu FAS u nedostatku kofaktora ili supstrata utvrđena je razlika između dvije reakcijske komore pri čemu u užoj između kondenzirajućeg i modificirajućeg dijela enzima ACP treba prenijeti međuprodukte na udaljenosti od 72 Å dok u široj taj razmak raste na 87 Å kao što je prikazano na slici 9. Čak je i rekonstrukcija elektronskim mikroskopom uz prisustvo supstrata nerijetko ukazivala na asimetričnost strukture – dovoljno da se posumnja fiziološku važnost opažene asimetrije iako je nemoguće u potpunosti isključiti opciju kako je enzim kristaliziran u samo jednoj od mogućih konformacija. Ipak, moguće je kako opažen fenomen možda zaista utječe na razmak dvaju dijelova enzima odnosno na otvorenost reakcijske komore.



Slika 9. Lokacija reakcijskih komora na FAS i razlika između one uže (zeleno) i šire (plavo)[6] (ilustracija preuzeta i prilagođena literarnom izvoru)

Sve navedeno ipak pokazuje kako kada govorimo o ACP-u ne govorimo o fiksiranoj 'opruzi' koja međuprodukte reakcije vodi od jednog do drugog aktivnog mjesta koja su egzaktno određena strukturom enzima već je, da bi došlo do elongacijskog ciklusa, ključna znatna fleksibilnost fosfopanteteinske ruke u kombinaciji sa nešto manjim ali postojećim konformacijskim promjenama reakcijske komore. Interakcija međuprodukata i domena DH, ER, KR i TE uvijek je interakcija aktivnih mjesta na istoj podjedinici enzima dok je upravo tim malim konformacijskim promjenama tijekom elongacijskog ciklusa otvorena mogućnost izmjene međuprodukata među podjedinicama i to u fazama koje kataliziraju KS i MAT. Tako je u čak 20-35% elongacijskih ciklusa opažen alternativni put katalize tj. izmjena aktivnosti među podjedinicama.

2.4. Sintaza masnih kiselina kao meta anti-tumorskih lijekova

Poznato je kako stanice raka uvelike ovise o procesu glikolize kojim stvaraju energiju potrebnu za sintezu DNA i proteina prilikom rasta malignih stanica. Dokazano je i kako u cijelom procesu veliku ulogu igraju i lipidi obzirom da je tumorima kod razvitka potreban visok tempo diobe stanica, čiji su kao i inače lipidi najvažniji dijelovi, a što je izravno ukazalo na sintazu masnih kiselina kao potencijalnu metu anti-tumorskih lijekova obzirom da je to jedini enzim u tijelu čovjeka sposoban sintetizirati masne kiseline *de novo*.

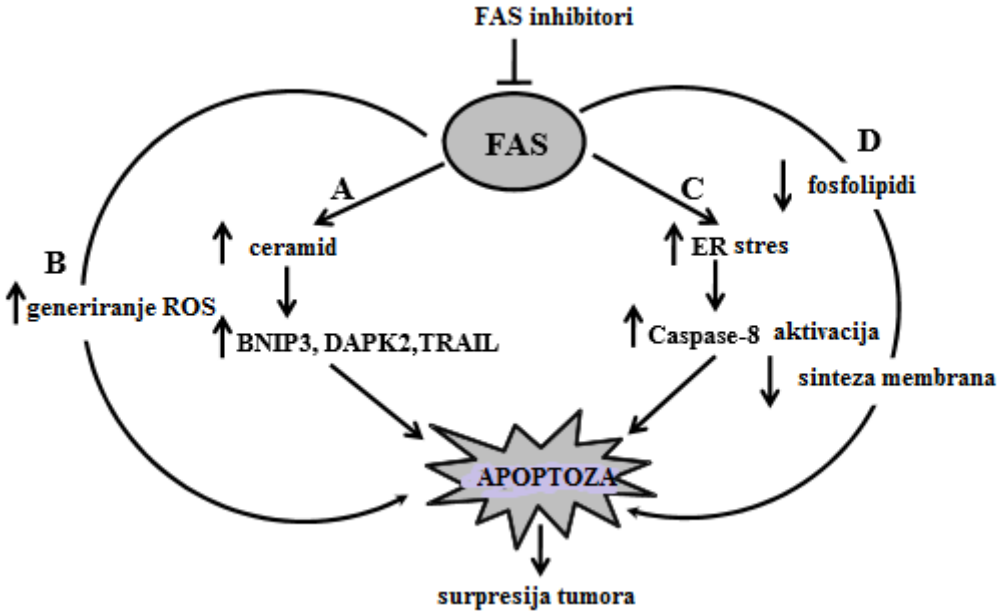
Stanice raka procesom glikolize stvaraju energiju. Obzirom da je taj proces izrazito aktivan, nastaju i poprilične količine piruvata koji potom u mitohondrijima u Krebsovom ciklusu daje ATP u reakciji čiji je jedan od međuprodukata i acetil-CoA. Zajedno sa malonil-CoA, kao što je opširno prikazano u prvom dijelu rada, acetil-CoA postaje supstrat sintaze masnih kiselina te nastaje palmitat. Novonastali palmitat može potom transformacijama u neke druge masne kiseline i kompleksne lipide tvoriti (i) membranske strukture, (ii) modificirati proteine i sudjelovati u specifičnim reakcijama u stanici i izvan nje ili pak (iii) sudjelovati u signalizaciji prilikom različitih procesa a među kojima su potencijalno oni zloćudnog karaktera.[4]

Razmišljanja u tom smjeru do neke su mjere već i potvrđena. Povećana ekspresija gena za sintazu masnih kiselina opažena je u više slučajeva tumora, a istraživanja idu i do te mjere da su sintetizirane neke molekule koje svojim djelovanjem na različite načine dovode do morfoloških promjena stanice a na kraju i smrti (apoptoze), kao i saznanja o pojedinim biološkim molekulama (npr. Omega-3 masnim kiselinama) koje također na određene načine dovode do apoptoze stanice.

2.4.1 Orlistat

Orlistat je primjer sintetskog lijeka originalno osmišljenog za tretiranje pretilosti. Primarna mu je zadaća bila onemogućavanje apsorpcije masti unešenih prehranom što je naravno trebalo smanjiti kalorijski unos. Orlistat radi na principu inhibicije lipaze koja se nalazi u gušterači a služi za hidrolizu triglicerida do slobodnih masnih kiselina koje se potom mogu metabolizirati. Pored toga, Orlistat je također i potencijalni inhibitor sintaze masnih kiselina, konkretno njene tioesterazne djelatne komponente. U nedavnim istraživanjima pokazano je kako tretman Orlistatom dovodi do smanjenja sinteze DNA, onemogućenja obnavljanja i jačanja stanice a što rezultira apoptozom. Slika 10 prikazuje smjerove odnosno načine djelovanja inhibitora sintaze masnih kiselina. Inhibitorski put A je preko ceramida, spoja koji aktivira pro-apoptotske gene

kao što su na slici prikazani BNIP3, TRAIL ili DAPK2. Inhibitorski put B temelji se na sintezi reaktivnih kisikovih vrsta čija povećana koncentracija također dovodi do apoptoze. Put C rezultat je snažnog stresa endoplazmatskog retikuluma prilikom djelovanja inhibitora na sintazu masnih kiselina. Posljedica je sinteza caspase-8 proteina, poznatih generatora apopotoze u stanici. Četvrti način odnosno put D prikazuje fizičko zaustavljanje daljnjeg napretka tumora na način da se usporava ili čak potpuno zaustavlja sinteza fosfolipida te posljedično nema niti sinteze membrana. Svi mehanizmi dovode do surpresije tumora kao konačnog produkta djelovanja inhibitora.



Slika 10. Putevi djelovanja inhibitora sintaze masnih kiselina

2.4.2 Omega-3 masne kiseline

S druge strane, kako je prethodno i navedeno, postoje i biološke molekule čija aktivnost može dovesti do apoptoze. Jedna takva vrsta su upravo omega-3 masne kiseline za koje je također već potvrđeno kako posjeduju mogućnost anti-tumorskog djelovanja. Mehanizam djelovanja ipak je nešto kompleksniji i nije još uvijek u potpunost razjašnjen. Razmišljanja ipak najčešće idu u smjeru toga da su omega-3 kiseline ugrađene u membrane te da povećanjem njihove koncentracije dolazi do strukturnih promjena kao i promjena u sastavu membrane za koje se vjeruje da pogoduju anti-tumorskom djelovanju. Omega-3 masne kiseline također gase ekspresiju gena odgovornih za sintezu masnih kiselina na način da inhibiraju transkirpcijski faktor SREBP-1 a koji je poznat i kao najjači regulator gena za sintezu lipida što ustvari znači kako je upravo FAS meta potencijalnog anti-tumorskog djelovanja omega-3 masnih kiselina. [5]

2.4.3 Utjecaji na budući razvoj

Velika učestalost ekspresije FASN gena kod većine vrsta tumora kao i ključna uloga masti u rastu i razvitku tumorskih stanica kao što je već navedeno nedvojbeno upućuje na sintazu masnih kiselina kao metu antitumorskih lijekova. Ipak, čak i najatraktivniji među postojećim inhibitorima FAS među kojima je i gore navedeni lijek Orlistat, u dosada provedenim istraživanjima pokazuju previše nuspojava da bi se njihovo djelovanje pokazalo kao korisno za organizam. Očekivano, najčešća nuspojava navedenih lijekova je upravo udar na cjelokupni tjelesni sustav razgradnje masti što kao rezultat ima prilično ozbiljne probleme kao što su anoreksija i nekontrolirani gubitak kilograma. Eksperimentalno je konkretno dokazano kako utječu na CPT-1 – gen odgovoran za regulaciju mitohondrijske oksidacije masnih kiselina a što je potaknulo razvoj takozvane druge generacije inhibitora FAS a koji se odlikuju većom selektivnošću što kao posljedicu ima smanjenu ekspresiju gena CPT-1. Jedan od takvih lijekova nazvan je C93.

Na novonastali trend identifikacije i razvijanja potencijalnih inhibitora FAS odgovorila je i grupa znanstvenika na čelu s dr. Freier-om koja je razvila i patentirala potpuni novi koncept reduciranja ekspresije specifičnog hibridizacijom određenih nukleotida – konkretno u ovom slučaju nukleotida odgovornih za kodiranje FAS. Izoliran je i mRNA vezni protein ljudske sintaze masnih kiselina a koji također može poslužiti prilikom provedbe testova kojima bi se dokazalo koje molekule i u kojoj mjeri utječu na ekspresiju navedenog gena.

3 LITERATURNI IZVORI

1. L. Streyer, *Biochemistry*, II. izdanje, San Francisco, 1975, 347
2. M. Mueller, S. Jenni, N. Ban, *Current Opinion in Structural Biology* **17** (2007) 572 – 579.
3. S. Jenni, M. Leibundgut, T. Maier, N. Ban, *Science* **311** (2006) 1263 – 1267.
4. S. Jenni, M. Leibundgut, D. Boehringer, C. Frick, B. Miholasek, N. Ban, *Science* **316** (2007) 254 – 261.
5. T. Maier, M. Leibundgut, N. Ban, *Science* **321** (2008) 1315 - 1322
6. T. Maier, S. Jenni, N. Ban, *Science* **311** (2006) 1258 – 1262
7. S. F. Jones, J. R. Infante, *Clinical Cancer Research* **21** (2015) 5434 – 5438
8. P. R. Pandey, W. Liu, F. Xing, K. Fukunda, K. Watabe, *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* **7** (2012) 185 - 197
9. A. Bhargava – Shah, K. Foygel, R. Devulapally, R. Paulmurugan, *Nanomedicine* **11(3)** (2016) 235 – 247
10. http://www.life-enhancement.com/magazine/article/797-omea-3-fatty-acids-may-have-anticancer-benefits (datum pristupa 13. 7. 2017.)