Biološki ligandi za metalne ione

Bešić, Sabina

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:417743

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Preddiplomski studij kemije

Sabina Bešić

Biološki ligandi za metalne ione

Završni rad

Mentor: izv. prof. dr. sc. Berislav Marković

Osijek, 2017.

§ Sažetak

U ovom radu opisane su interakcije metalnih iona s raznim vrstama biomolekula (proteinima, enzimima, nukleinskim kiselinama i sl.). Općenito, interakcije ovise o biološkoj vrsti i svojstvima promatrane specije, te o prijelazima elektrona unutar atoma, što ima utjecaj na kemijsku aktivnost i sposobnost elementa da stupi u reakciju s ciljanim odredištem u tkivu – ligandima. Poseban naglasak je stavljen na esencijalne elemente (npr. Cu, Se, Fe, Zn) čiji nedostatak može dovesti do ozbiljnih poremećaja u funkcioniranju organizma pa i smrti, dok s druge strane, velike količine ovih elemenata mogu imati toksičan efekt. Biološki ligandi najčešće ostvaruju veze s metalima preko atoma dušika, kisika ili sumpora, te koordiniraju metalni centar na strogo određen način. Ulogu biološkog liganda u organizmu najčešće može imati voda, anorganski anioni (Cl^-, CO_3^{2-}, PO_4^{3-}), razni proteini, porfirini te nukleinske kiseline. Biološki ligandi od značaja još su i različiti koenzimi, vitamini te mnoge druge organske molekule koje sudjeluju u metabolizmu (npr. riboflavini, nikotinamidi, biotin).

Ključne riječi: biološki ligandi, esencijalni elementi, proteini

§ Abstract

This thesis gives an overview of metal ion interactions with different kinds of biomolecules (proteins, enzymes, nucleic acids etc.). In general, the interactions depend on the biological species and their properties, as well as on the electron transitions inside the atom, which affects the chemical activity and the ability of the element to react with the target tissue – ligands. More detailed consideration is given to the essential elements (e.g. Cu, Se, Fe, Zn), due to the fact that their absence in the organism leads to various disfunctions, including death, while, on the other hand, in abundance, these elements might have a toxic effect. Biological ligands most commonly form bonds with metal ions via nitrogen, oxygen or sulphor atoms, and coordinate the metal center in a strictly specific way. The role of the biological ligand in the organism is most frequently taken by water, inorganic anions (Cl^-, CO_3^{2-}, PO_4^{3-}), various proteins, porphyrins and nucleic acids. Other significant biological ligands are various coenzymes, vitamins and many other organic molecules which partake in the metabolism (e.g. riboflavin, nicotinamide, biotine).

Key words: biologial ligands, essential elements, proteins

Sadržaj

§ Sažetak ... **ii**

§ Abstract ... **ii**

§ 1. Uvod ... **1**

1.1. Esencijalni kemijski elementi ... **1**

1.2. Biološki značaj metala ... **1**

1.2.1. Biološki značaj natrija i kalija ... *2*

1.2.2. Biološki značaj magnezija ... *2*

1.2.3. Biološki značaj cinka ... *2*

1.2.4. Biološki značaj bakra ... *2*

1.2.5. Biološki značaj kobalta ... *3*

1.2.6. Biološki značaj kalcija ... *3*

1.2.7. Biološki značaj mangana ... *3*

1.3. Ligandi ... **4**

1.4. Teorija ligandnog polja ... **4**

§ 2. Razrada teme ... **6**

2.1. Teorija tvrdih i mekih kiselina i baza ... **6**

§ 3. Biološki ligandi za metalne ione ... **7**

3.1. Bioanorganska kemija metalnih iona ... **7**

3.2. Vrste liganada u metaloproteinskim sustavima ... **7**

3.3. Aminokiseline kao ligandi ... **8**

3.4. Proteini koji vežu cink ... **9**

3.5. Neproteinski ligandi ... **11**

3.6. Kelataza: mehanizam unošenja metala u porfirinski kompleks ... **13**

3.7. Metaloporfirini kao prenositelji kisika ... **15**

3.8. Imidazol: načini vezanja na metal ... **16**

3.9. Željezo-sumpor klasteri ... **17**

3.10. Nastanak željezo-sumpor klastera ... **19**

3.11. Umetanja bakra u superoksid – dismutazu ... **20**

3.12. Složeniji kofaktori ... **21**

3.12.1. MoCo kofaktor ... *21*

3.12.2. FeMoCo kofaktor ... *22*

3.12.3. P-klasteri ... *23*

3.12.4. H-klasteri ... *24*

3.13. Siderofore ... **24**

3.14. Vitamin B_{12} ... **25**

3.15. Teški metali u biološkim sustavima ... **26**

§ 4. Zaključak ... **28**

§ 5. Literaturna vrela ... **29**

§ 1. Uvod

1.1. Esencijalni kemijski elementi

Bioanorganska kemija uključuje proučavanje metalnih vrsta u biološkim sustavima. Kao uvod u osnovu anorganske kemije potrebne za razumijevanje bioanorganskih procesa, u ovom ćemo poglavlju razmotriti esencijalne kemijske elemente, njihovu svrhu i učestalost pojavljivanja u biološkim vrstama te utjecaj ligandnog polja na središnji metalni ion. Priroda je tokom evolucije odabrala komponenete ne samo iz organskog svijeta, nego i iz anorganskog kojima izgrađuje živi svijet. Kemijski procesi u prirodi vezani su za esencijalne kemijske elemente koje možemo podijeliti u četiri kategorije: (1) većinski (engl. *bulk*) elementi koje čine H, C, N, O, P, S; (2) makrominerale i ione, poput Na^{+}, K^{+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Cl^{-}, $PO4^{3-}$, $SO4^{2-}$; (3) mikroelemente ili elemente u tragovima, poput Fe, Zn, Cu; (4) elemente u ultratragovima koji obuhvaćaju nemetale (F, I, Se, Si, As, B) i metale (Mn, Mo, Co, Cr, V, Ni, Cd, Sn, Pb, Li). Prema učincima koje imaju u ljudskom tijelu, najjednostavnija definicija esencijalnih elemenata bi bila da su to elementi čiji nedostatak može dovesti do ozbiljnih poremećaja u funkcioniranju organizma pa i smrti, dok s druge strane velike količine ovih elemenata mogu imati toksičan efekt. Mehanizam djelovanja elemenata u tragovima/ultratragovima sastoji se u tome da su oni ili integralni dio enzima – metaloenzima, ili djeluju kao enzimski aktivatori. Metalni kofaktori kao što su Fe, Co, Cu, Mn, Mg, Zn, Se i drugi sudjeluju, dakle, u preciznoj interakciji enzima i supstrata na način da pomažu približavanju aktivnog mjesta i supstrata, te direktno sudjeluju u kemijskim reakcijama s kompleksom enzim-supstrat.[1]

1.2. Biološki značaj metala

U različitim biološkim sustavima, od onih najjednostavnijih pa do čovjeka, prisutni su metali (Na, K, Mg, Ca, Zn, Mn, Mo, Fe, Cu, Co) značajni za životnu aktivnost. Ovi metali se još nazivaju i „biometalima''. Mogu biti prisutni u tragovima, pa sve do gramskih količina, u promjenjivim oksidacijskim stanjima. Metalni ioni mogu obavljati više funkcija ovisno o njihovom položaju u biološkim sustavima, te načinu na koji stupaju u reakcije. Biometale mogu zamijeniti ioni nekih drugih metala (Pb, Cd i dr.) sličnih fizikalno-kemijskih osobina (veličine iona, naboj, polarizabilnost, ionizacijski potencijal i dr.). Oni mogu stupati u

interakcije s dijelovima biomolekula i tako postati konkurentni biometalima vezujući se u aktivna mjesta enzima čime ostvaruju toksičan efekt.[2] U nastavku ćemo razmotriti neke bitne biološke značajke potonjih metala.

1.2.1. Biološki značaj natrija i kalija

Natrij i kalij izrazito su važni mikroelementi za ljude. Mehanizam koji održava stalnu ravnotežu između natrijevih i kalijevih kationa te prenosi natrijeve katione iz stanice, a kalijeve katione u stanicu naziva se natrij/kalij crpka. Taj je mehanizam odgovoran za održavanje staničnog membranskog potencijala. Biometali iz prve i druge skupine periodnog sustava elemenata uglavnom imaju strukturnu ulogu ili/i održavaju osmotsku ravnotežu i stalnu koncentraciju naboja, kako bi se očuvala neutralnost.

1.2.2. Biološki značaj magnezija

Magnezij je esencijalni element za sve žive stanice, a značajan doprinos ima u funkciji molekula ATP, DNA i RNA. Također, ulazi u sastav velikog broja enzima i omogućava njihovu funkciju. Posebne karakteristike magnezija čine ga jedinstvenim među biološki značajnim kationima. Stvara velik broj spojeva (svi redom imaju oksidacijski broj +2) te je neophodan za metabolizam – kontrakciju mišića i prijenos živčanih signala.

1.2.3. Biološki značaj cinka

Cink je neophodan esencijalni mikroelement, kojeg u ljudskom organizmu ima 2 do 3 grama. Sastavni je dio enzima koji, primjerice, u probavnom sustavu sudjeluju u razgradnji proteina, u gušterači pomaže kod skladištenja inzulina, te omogućava vezanje metala za aktivni centar enzima. Također ima i strukturnu ulogu u transkripcijskim faktorima, čime se kontrolira prenošenje genetičke informacije. Nadalje, gradi komplekse različite koordinacije, što omogućava proteinima da brzo mijenjaju konformacije u toku bioloških reakcija.

1.2.4. Biološki značaj bakra

Premda je bakar element koji u organizmu nije prisutan u velikim količinama, ipak je metabolički važan za funkciju aktivnog centra niza enzima. Prisutan je u enzimima važnim za metabolizam željeza, potreban je za sintezu hemoglobina i normalnu eritropoezu, važan je za procese staničnog disanja jer se ugrađuje u enzim citokrom c oksidazu te aktivira enzim superoksid dismutazu koji je jak antioksidans. Ovakva raznovrsna uloga bakra vezana je uz mogućnost opstanka u različitim multivalentnim stanjima te mogućnost njegovih iona da

grade kompleksne spojeve. Prema tome, deficit bakra povezan je sa anemijom, dok se višak manifestira nagomilavanjem u jetri (Wilsonova bolest).

1.2.5. Biološki značaj kobalta

Poznato je da spojevi iona kobalta (III) imaju iznimno važnu ulogu u procesima koji se odvijaju u ljudskom organizmu. Najpoznatiji primjer biološki aktivnog spoja kobalta (III) je cijanokobalamin, odnosno vitamin B_{12}, koji indirektno regulira sintezu DNA. Preko vitamina B_{12} doprinosi normalnom funkcioniranju hematopoetskog sustava, gdje sudjeluje u procesu sazrijevanja eritrocita. Također stimulira i produkciju eritropoetina, čija je funkcija povećanje iskorištenja željeza u stanicama koštane srži. Kao sastavni dio metaloenzima (metiltransferaze i metioninsintetaze) sudjeluje u metabolizmu proteina kao prijenosnika metilnih skupina.

1.2.6. Biološki značaj kalcija

Kalcij je najzastupljeniji biometal u organizmu čovjeka. Esencijalan je za živi svijet jer kretanje iona kalcija služi kao signal za veliki broj staničnih procesa. Kao tvrda Lewisova kiselina, ion Ca^{2+} ima posebno izražen afinitet prema kisiku. Prema tome, unutarstanične razine Ca^{2+} moraju se održavati niskim kako bi se spriječilo taloženje karboksiliranih i fosforiliranih spojeva koji s Ca^{2+} stvaraju slabo topljive soli. Kalmodulin, protein koji veže kalcij, sadržava četiri slične jedinice u jedinstvenome polipeptidnom lancu (svaka jedinica veže kalcijev ion). Služi kao senzor za Ca^{2+} u gotovo svim eukariotskim stanicama. Nadalje, vezanje kalcija ima učinak i na protrombin – vezanje Ca^{2+} povezuje protrombin s fosfolipidnom membranom oslobođenom iz krvnih stanica zbog ozljede. Vezanje je protrombina na fosfolipidnu membranu bitno jer se tako protrombin dovodi u blizinu dvaju proteina koji kataliziraju njegovu pretvorbu u trombin.

1.2.7. Biološki značaj mangana

Mangan ima nezamjenjivu ulogu u fotokemijskim reakcijama u procesu fotosinteze, kao dio golemog transmembranskog kompleksa, nazvanog *fotosustav II*. Uloga manganskog središta, u reduciranom obliku, jest da oksidira dvije molekule vode stvarajući jednu molekulu kisika. Manganovi su ioni tijekom evolucije odabrani za ovu ulogu jer imaju sposobnost egzistiranja u različitim oksidacijskim stanjima: Mn(II), Mn(III), Mn(IV), Mn(V), te stvaraju veze sa spojevima koji sadržavaju kisik. Bitno je još napomenuti da je Mn(II) aktivni centar enzima arginaze koji sudjeluje u ciklusu uree.[3]

1.3. Ligandi

Biološki ligandi najčešće ostvaruju veze sa metalima preko atoma dušika, kisika ili sumpora. Oni koordiniraju metalni centar na strogo određen način, te ovisno o uvjetima koji prevladavaju grade asocijate različite geometrijske strukture.

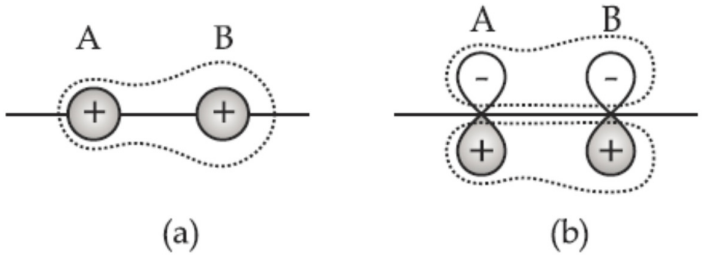
Ulogu biološkog liganda u organizmu može imati voda, anorganski anioni (Cl^-, CO_3^{2-}, PO_4^{3-}) koje nalazimo slobodne ili uglavnom vezane za složene biomolekule, te biopolimere na koje ćemo staviti najveći naglasak u ovom radu – proteine, porfirine, nukleinske kiseline, polisaharide te lipide. Biološki ligandi od značaja su još i različiti koenzimi, vitamini te mnoge druge organske molekule koje sudjeluju u organizmu (riboflavini, nikotinamidi, biotin, askorbinska kiselina i dr.). Kelatacija je važna pojava u biološkim procesima i, kao takva, ima veliki biokemijski značaj. Kompleksi koji nastaju su izrazito stabilni i ta stabilnost raste s porastom broja prstenova. Sposobnost metala da grade kelatne komplekse značajna je za njihovu apsorpciju, transport te detoksikaciju organizma.

1.4. Teorija ligandnog polja

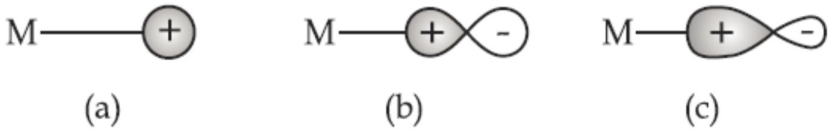
Prijelazni metali izuzetno su značajni za funkcioniranje brojnih bioloških sustava. Kompleksi 3*d* metala su molekulske strukture u kojima su jedan ili više centralnih atoma 3*d* metala vezani s određenim brojem drugih atoma ili molekulskih fragmenata, takozvanim ligandima. Prva teorija koja je objasnila magnetska svojstva 3*d* kompleksa bila je teorija kristalnog polja. Po toj se teoriji *d*-nivo u centralnom metalnom ionu cijepa pod utjecajem kristalnog polja liganda, aproksimiranih točkastim nabojima. Međutim, ta teorija nije dobro opisivala nastajanje kemijske veze, pa su joj naknadno dodani elementi *metode molekulskih orbitala*, koja je nosila potpuniji opis liganda pomoću njihovih atomskih orbitala. Novonastala teorija nazvana je *teorijom ligandnog polja*. Ligandno polje, dakle, na temelju σ interakcije djelomično uklanja peterostruku degeneraciju 3*d* orbitala atoma metala. Energetska razlika Δ_0 ovisit će o jačini σ interakcije između metala i liganda. Ova veličina omogućuje razlikovanje dviju skupina oktaedarskih kompleksa: one s jakim ligandnim poljem (velik Δ_0) i one sa slabim poljem (mali Δ_0). Jako kristalno polje uzrokuje konfiguracije sa sparenim elektronima (niskospinsko osnovno stanje), a slabo kristalno polje konfiguracije s nesparenim elektronima (visokospinsko osnovno stanje).[4] To svojstvo, zajedno s brojem dostupnih 3*d* elektrona iz metala diktira način popunjavanja orbitala. Za razliku od izoliranih atoma, u kristalnim rešetkama 3*d* metala, najmanju energiju među

valentnim orbitalama ima 3*d* orbitala, dok 4*s* ima nešto veću. Uslijed otpuštanja elektrona, 3*d* metali najprije otpuštaju 4*s* elektrone, a tek nakon toga 3*d* elektrone.

Prema načinu prekrivanja orbitala obzirom na os koja povezuje A i B centre, najčešće se ističu dva tipa interakcije: σ i π interakcije, što prikazuje slika 1. Kada se prekrivanje orbitala događa simetrično oko navedene osi, tada nastaje σ interakcija, dok kod π interakcija najveće prekrivanje postiže se „sa strane'', simetrično obzirom na ravninu koja sadrži spojnu os.[5]



Slika 1. Shematski prikaz σ interakcije na primjeru *s* orbitala dva susjedna atomska centra (a) i π interakcije na primjeru jednako orijentiranih *p* orbitala (b). Slika preuzeta iz [5].



Slika 2. U teoriji ligandnog polja, *s* (a) i *p* orbitale liganda (b) koje ulaze u σ interakciju s atomom metala na temlju iste vrste simetrije unutar kompleksa, tretiraju se kao jedinstvena hibridna *s-p* orbitala (c). Slika preuzeta iz [5].

§ 2. Razrada teme

2.1. Teorija tvrdih i mekih kiselina i baza

Teoriju „tvrdih'' kiselina i „mekih'' baza (engl. *The principle of hard and soft acids and bases*, HSAB) predložio je Pearson. Kationi (Lewisove kiseline) i ligandi (Lewisove baze) kvalitativno su podijeljene na meke (soft) i tvrde (hard), dok su ostale granični slučajevi. Meke kiseline i baze najčešće stvaraju kovalentne veze u međusobnim reakcijama, a tvrde kiseline i baze uglavnom se povezuju ionskim silama. Glavno je pravilo da se tvrde kiseline dobro vežu s tvrdim Lewisovim bazama koje imaju lokalizirane elektrone, a meke se kiseline bolje vežu s mekim bazama sklonim polarizaciji, onima koje imaju delokalizirane elektrone.

Teorija je ostala na kvalitativnom nivou oko 25 godina. Pearson je kasnije pokušao ustanoviti kvantitativnu skalu tvrdoće i mekoće kiselina i baza, temeljenu na ionizacijskim potencijalima (*I*) i elektronskim afinitetima (*A*). Apsolutnu tvrdoću karakterizira veličina η, pa je u tom modelu tvrdoća kiseline metalnog iona definirana jednadžbom $\eta_M = ½ (I_C - A_e)$, a apsolutna mekoća (σ) izrazom $\sigma = 1 / \eta$. Konačno se definira i apsolutna elektronegativnost veličinom χ, koja je dana Mullikenovom definicijom: $\chi = ½ (I_C + A_e)$. Jakost interakcije između neke Lewisove kiseline i Lewisove baze određena je stupnjem prijenosa elektrona $\Delta N = (\chi_1 - \chi_2) / 2(\eta_1 - \eta_2)$. Zaključno se može reći da je svaka od spomenutih skala manjkava, te da su potrebna barem dva parametra da se korelira nukleofilnost i bazičnost.[6]

Tablica 1. Lista tvrdih i mekih kiselina i baza

Tvrde kiseline:	H^+, Li^+, Mg^{2+}, Cr^{3+}, Co^{3+}, Fe^{3+}
Meke kiseline:	Cu^+, Ag^+, Pd^{2+}, Pt^{2+}, Hg^{2+}, Ti^{3+}
Granični slučajevi:	Mn^{2+}, Fe^{2+}, Zn^{2+}, Pb^{2+}
Tvrde baze:	F^-, Cl^-, H_2O, NH_3, OH^-, H_3CCOO^-
Meke baze:	I^-, CO, $P(C_6H_5)_3$, C_2H_4, CH_3CH_2SH
Granični slučajevi:	N_3^-, C_5H_5N, NO_2^-, Br^-, SO_3^{2-}

§ 3. Biološki ligandi za metalne ione

3.1. Bioanorganska kemija metalnih iona

U većini bioloških sustava ion metala ima katalitičku i metaboličku ulogu. Djelovanjem metalnog iona kao dijela aktivnog mjesta je dvojako. Metalni ion se veže s reagirajućim specijama i elektronski aktivira jednu od njih (ili obje). Pri tome se reagirajuće specije u aktivnom mjestu enzima, kao ligandi vezani na ion metala, i specifično razmještaju u prostoru. Prijenos elektrona je ovisan o aktivnim mjestima koje uključuju brojne oksidacijsko-redukcijske osjetljive sustave koji sadrže ione metala. Danas je poznat relativno veliki broj biološki važnih oksidacijsko-redukcijskih sustava poput Fe(II)/Fe(III)/Fe(IV), Cu(I)/Cu(II), Co(I)/Co(II)/Co(III), Mn(II)/Mn(III)/Mn(IV), Mo(IV)/Mo(V)/Mo(VI), Ni(I)/Ni(II)/Ni(III). Njihova postojanost uvelike je određena specifičnošću bioloških liganada. Posebno su zanimljive interakcije metalnih iona s aminokiselinama histidinom, metioninom, cisteinom, tirozinom, triptofanom, glutamatom i aspartatom.

Prijelazni metali izuzetno su značajni za funkcioniranje brojnih bioloških sustava. Posebna pažnja posvećuje se interakcijama između metalnog iona i proteina. Najčešće jako i kinetički inertno vezanje omogućuje proteinu da zadrži ion metala bez potrebe da bude vezan i u neki makrociklički spoj. Mnogi metabolički aktivni proteini koji sadrže željezo imaju i slične analoge, koji su ovisni o bakru. Također, kompleksi bakra(II) s aminokiselinama dobri su jednostavni modeli za izučavanje bakar-protein interakcija i specifičnost utjecaja bioloških liganada na postojanost oksidacijskog stanja metalnog iona. Otkrivanje mehanizma anorganskih i biokemijskih reakcija temelj je razumijevanja specifičnih bioloških funkcija esencijalnih elemenata. Spoznavanje specifičnih funkcija anorganskih komponenti u biološkim sustavima trebalo bi u konačnici omogućiti praktičnu primjenu biokemijskim reakcijskih slijedova za stvaranje složenijih ciljanih sustava čija će svojstva i funkcije biti unaprijed poznati.

3.2. Vrste liganada u metaloproteinskim sustavima

Potencijalne ligande koji mogu vezati metalne ione općenito možemo podijeliti na: (1.) aminokiseline koje se javljaju u samom proteinu; (2.) aminokiseline koje su kemijski modificirane kako bi vezale specifične metalne ione - na primjer, ion kalcija Ca^{2+}; (3.) anorganske ligande male molekularne mase - poput karbonata, cijanida i ugljikovog monoksida; (4.) organske kofaktore ugrađene u proteine, koji vežu metale - porfirini, korini

i željezo-sumpor klasteri, molibdenski kofaktori MoCo, te FeMoCo i *P*-klasteri nitrogenaze; (5.) molekule izbačene iz stanice, koje se zatim vežu na metale – siderofore.[7]

Metalni ioni od biološke važnosti, kao i njihovi ligandi, klasificiraju se prema, prethodno izloženoj, teoriji „tvrdih i mekih kiselina i baza“. Većina metalnih iona, uz neke iznimke, veže se za svoje ligande kako predviđa ta teorija: tvrde kiseline (metalni ioni) se vežu za tvrde baze (ligande), dok se meke kiseline vežu na meke baze.

3.3. Aminokiseline kao ligandi

Proteini su izgrađeni od dvadeset različitih aminokiselina. Međutim, samo mali broj molekula aminokiselina potencijalni su polidentatni ligandi. Svoje vezanje na ion metala mogu ostvariti na više načina: preko kisikovih atoma karboksilne skupine, dušikovih atoma amino skupine te ponekad i heteroatomima aminokiselinkog ogranka (preko atoma N, O ili S). Strukturno motivi koji nastaju kao posljedica vezanja su različiti. Molekule aminokiselina najčešće se na metalne ione vežu didentatno i to dušikovim atomom amino skupine i kisikovim atomom iz karboksilne skupine u α-položaju. Takavim načinom povezivanja nastaju peteročlani kelatni prstenovi koji mogu biti planarni, no češće poprimaju poprimaju konformaciju otvorene omotnice. Molekule aminokiselina mogu se vezati didentatno na metalni ion i drugim izborom atoma: tako se histidin često na ione metala veže *N,N′* – didentatno, odnosno atomom dušika iz amino skupine te atomom dušika iz imidazolne skupine. Takvim pak načinom povezivanja nastaju šesteročlani kelatni prstenovi. No, potonji slučajevi su zaista rijetki i specifični.

Tridentatno vezanje aminokiselinskih liganada koje povezuje dva iona metala je zapravo najčešće i na taj način nastaju dimerni, trimerni, oligomerni ili polimerni sustavi. Tako vrlo često bakrovi atomi dopunjuju svoju koordinacijsku sferu ostvarujući koordinacijske veze s atomima kisika iz karboksilnih skupina susjednih koordinacijskih jedinica. Tridentatno vezanje aminokiselinski ligand može ostvariti i s jednim ionom metala – na takav način vezan je histidinski ligand u mještovitom kompleksu bakra(II). Konačno, poznat je glicinatni kompleks u kojem je glicinatni ligand monodentatno vezan na bakrov(II) ion. Do pripravljanja potonjeg kompleksa, takav način vezanja aminokiselinskih liganada nije bio poznat. Ovakvo ponašanje aminokiselinskih liganada je kompromis između njihovih koordinacijskih funkcija. S jedne strane molekula je karboksilna kiselina za koju je karakteristično stvaranje karboksilatnih mostova i nastajanje binuklearnih kompleksa, dok s

druge strane prisutnost amino skupine u α ili β položaju pruža mogućnost stvaranja postojanih peteročlanih (ili iznimno šesteročlanih) kelatnih prstenova.

Najzastupljeniju grupu ovih liganada čine, dakle, tiolna skupina cisteina (Cys), imidazolna skupina histidina (His), karboksilne skupine glutamata (Glu) i aspartata (Asp), te fenolna skupina tirozina (Tyr). Manje se često susrećemo s tioeterskom skupinom metionina (Met), amino skupinom lizina (Lys), gvanidinska skupinom arginina (Arg), te amidnim skupinama asparagina (Asn) i glutamina (Gln).[2]

Cistein se može vezati i na jedan i na dva metalna iona, te često koordinira željezo u željezo-sumpor klasterima te bakar u bakrovim šaperonima (prenositeljima bakra do određenih proteina na koje se veže). Histidin dobro veže bakar(II), dok se kalcijevi ioni dobro vežu s negativno nabijenim atomima kisika smještenima na bočnim lancima glutamata i aspartata, odnosno nenabijenim atomima kisika koji pripadaju karbonilnim skupinama glavnog lanca (odnosno, atomima kisika iz glutamina i asparagina na bočnim lancima). Svojstvo Ca^{2+} da se istodobno koordinira s različitim ligandima – sa šest do osam atoma kisika – daje mu mogućnost unakrsnog povezivanja različitih dijelova proteina, dovodeći tako do konformacijskih promjena. Nuklearna magnetska rezonancija pokazala je da proteini koji se javljaju u procesu zgrušnjavanja krvi, sadrže ostatke γ-karboksiglutamata, koji veže kalcij(II) jače nego što to radi sam glutamat. Dakle, reakcijom karboksiliranja ovisnom o vitaminu K prevodi se glutamat, koji slabo kelira Ca^{2+}, u mnogo jači kelator γ-karboksiglutamat. Vitamin K ima ulogu kofaktora enzimskog sustava.[8] Aktivne tvari koje poništavaju djelovanje vitamina K se, sukladno tome, koriste kao antikoagulansi.

Očito je da su molekule aminokiselina ligandi velikog koordinacijskog potencijala te da svojim vezanjem na ione metala stvaraju različite strukturne motive.

3.4. Proteini koji vežu cink

Posebno ćemo se osvrnuti na djelovanje cinka u staničnim mehanizmima, jer je upravo cink naznačajniji stanični oligoelement i najčešći katalitički metalni ion u citoplazmi. Glavne karakteristike cinka uključuju mali radijus, brzu izmjenu liganada te njegova amfoterna svojstva. Brzo se resorbira u crijevnu stijenku tako da se prvo veže na površinu memebrane, a zatim polako prolazi kroz memebranu vezan na specifični ligand - cisteinom bogati protein (CRIP – *cystein rich intestinal protein*) koji omogućava transcelularni prijenos.[9].

U biološkim sustavima, cink se uglavnom veže na S- i N- donore elektrona. Aminokiseline poput histidina i triptofana imaju pozitivan učinak na njegovu apsorpciju,

dok na smanjenje apsorpcije utječu kationi kalcija i željeza. U obliku proteinskog kompleksa, cink se nalazi u stanicama gotovo svih organa. Najviše ga ima u jetri, bubrezima, slezeni, plućima, srcu, mišićima i pankreasu. U krvnoj plazmi cink se veže za albumine, transferin, α2-glikoprotein i α2-makroglubulin. Vezan s proteinima, sudjeluje u brojnim reakcijama unutar stanice ili na površini iste:

- u jezgri sudjeluje u regulaciji aktivnosti DNA
- inhibira lipidnu peroksidaciju te nastanak slobodnih radikala
- u jetri i kostima stimulira sintezu proteina, dok je u neuronima inhibira
- inducira metalotioneine jetre koji su bogati SH skupinama na koje se vežu toksični metali [10]
- kao dio brojnih staničnih i izvanstaničnih enzima, cink utječe na regulacijske biokatalitičke mehanizme, poput porasta aktivnosti protein kinaze C u membranama limfocita, aktivaciji T-staničnog timulina koji stimulira dozrijevanje T-stanica u timusnom epitelu te sprječavanje apoptoze
- u izvanstaničnom prostoru, cink je dio enzima koji sudjeluju u degradacijskim procesima većine vezivnog tkiva, proteina u probavnom sustavu te peptidnih hormona (endopeptidaza)

Cink omogućava vezanje supstrata u aktivno mjesto čitavog niza enzima, te u mehanizmu djelovanja istih (i metabolizmu općenito) ima trostruku ulogu: katalitičku, kokatalitičku i strukturnu. Kao metalni ion izravno sudjeluje u enzimskoj katalizi te poboljšava katalitičku ulogu u sprezi sa cinkom koji je u aktivnom mjestu istog enzima. Dobar je akceptor elektrona (Lewisova kiselina) koji polarizira skupine na koje se veže, a s donorima elektrona (Lewisove baze) tvori komplekse s učestalošću vezanja His>>Glu>>Cys. U ugljičnoj anhidrazi koordiniran je na molekulu vode i na tri imidazolne skupine, koje pripadaju histidinskim ostacima. Deprotoniranje molekula vode koordinirane na cink ostavlja skupinu OH^- vezanu na cink, koja je u takvom obliku izvanredan nukleofil koji napada CO_2 i pretvara ga u HCO_3^-. Dok potonje aminokiseline prevladavaju kao ligandi cinkovih iona s katalitičkom i strukturnom ulogom, Asp pretežno koordinira metal s kokatalitičkom ulogom sa učestalošću vezanja Asp>His>Glu. Ioni cinka sa strukturnom ulogom u enzimima pronađeni su kod alkoholne dehidrogenaze i aspartat transkarbamoilaze. Kod ova dva enzima cink je potpuno tetraedarski koordiniran s četiri Cys. Strukturna uloga utvrđena je i

kod brojnih drugih proteina, poput ,,zinc finger'' struktura u transkriptazama (hormonskim receptorima na jezgri). Također, postoji čitav niz enzima koji ne vežu cink izravno u aktivnom mjestu. Tada metal djeluje kao veza između tiola (obično četiri) ili u kombinaciji tiola i histidina. Ovakvo vezanje omogućuje kontrolu količine proteina u stanici, stabilizirajući ih i sprječavajući hidrolizu.

Značajnu ulogu ima još i u sintezi DNA i RNA jer sudjeluje u ugradnji timidina. Ustanovljeno je da preko 500 proteina koji su uključeni u regulaciju transkripcije i replikacije sadrže cinkove ione. Tri su tipa regulacijskih proteina koji posjeduju domene za vezanje DNA – „zinc twist'', „zinc finger'' i „zinc cluster''. Iako struktura „zinc finger'' proteina nije u potpunosti poznata, utvrđena je zajednička sekvencija. Cink je smješten u ponavljajućim petljama proteina od tridesetak aminokiselina. Takvi proteini ne posjeduju enzimsku aktivnost, pa se značajno razlikuju u strukturi od cink-vezujućih enzima. Za razliku od enzima u kojima se nalazi do tri cinkova iona, u „zinc finger'' strukturi može ih se pronaći i tridesetak.

Potreban je i za biološku ulogu metalotioneina, koji uklanjaju teške metale iz organizma i sprječavaju oslobađanje slobodnih radikala. Ekspresija gena za metalotioneine regulirana je posredstvom MTF-1 (engl. *Metallothionein Transcription Factor*) i ovisna je o slobodnom cinku. Sintetizirani metalotioneini vežu cink, čime se gubi njegov utjecaj na MTF-1 (MTF-1 tako djeluje kao senzor za cink i regulira njegovu homeostazu).

3.5. Neproteinski ligandi

Osim gore navedenih bočnih ogranaka aminokiselina, u metaloproteinima se mogu naći i brojni ligandi male molekularne mase poput cijanida i ugljičnog monoksida. Općenito, dugo nije bilo poznato zašto metalni atomi, za koje se smatralo da nisu dobre Lewisove kiseline, mogu stvarati spojeve sa CO, slabim elektron-donorima. Aproksimativna metoda LCAO MO (engl. *linear combination of atomic orbitals*) pomogla je rastumačiti stabilnost takvih spojeva kao rezultat interakcije između metala i CO: metal sinergički reagira sa CO, ponašajući se kao kiselina i baza, dok se CO istodobno ponaša kao donor i akceptor elektrona.[6]

U kontekstu bioloških procesa, ustanovljeno je da karbonatni i fosfatni anioni pronalaze ulogu u mehanizmu vezanja željeza. Apsorpcija željeza predstavlja kompleksni proces koji uključuje niz membranskih proteina koji transportiraju željezo kroz membranu enterocita, te proteine koji mijenjaju redoks stanje željeza i tako sudjeluju u transportu. Najveći dio

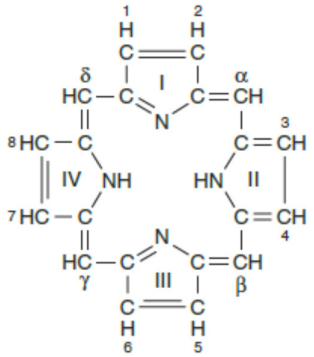
anorganskog željeza u prehrani nalazi se u trovalentnom obliku i prije apsorpcije mora se reducirati u dvovalentni oblik djelovanjem ferireduktaze, duodenalnog citokroma B (DyctB) na četkastom rubu duodenalnog epitela.[11] Nakon ulaska željeza u enterocite preko apikalne membrane, ono može biti pohranjeno u obliku feritina ili transportirano preko bazolateralne membrane u cirkulaciju. Transport preko bazolateralne membrane enterocita koji posreduje feroportin određuje hoće li željezo ući u organizam ili neće. Kada željeza ima dovoljno, smanjena ekspresija feroportina omogućava eritroblastima zadržavanje dovoljne količine željeza koja im je potrebna za sintezu hemoglobina, dok se u uvjetima nedostatka željeza daje prioritet drugim tkivima kako ne bi došlo do teškog nedostatka željeza. Vezanje željeza za transferin, glavni transportni protein željeza u cirkulaciji, omogućava sigurnu i kontroliranu dostavu željeza svim stanicama u organizmu.[12] U stanice, željezo se prenosi endocitozom posredovanom transferinom u takozvanom transferinskom ciklusu.

Transferin je serumski glikoprotein molekulske mase oko 75 – 80 kDa, te pripada velikoj skupini proteina koji funkcioniraju prema istom mehanizmu. Molekula se sastoji od dvije homologne globularne domene, takozvane N- i C-domene, od kojih svaka sadrži specifično vezno mjesto za jedan ion trovalentnog željeza skupa s pripadnim karbonatnim anionom. Svaka je domena sastavljena od dviju podjedinica koje omataju i zatvaraju vezu željezo-karbonat. Ion željeza Fe^{3+} nalazi se u središtu gotovo savršenog oktaedra kojeg čine četiri proteinska liganda, a preostala dva mjesta zauzima karbonatni anion. Naboj Fe^{3+} iona je uravnotežen trima anionskim ligandima proteinskih ostataka (dva tirozina i jedan aspartat), dok je, s druge strane, naboj karbonata uravnotežen pozitivnim nabojem argininskog ostatka. U otvorenoj konformaciji, karbonat se veže na dnu veznog džepa. Nakon vezanja s ionom Fe^{3+}, dva od četiri proteinska liganda se već nalaze u konačnom položaju, a zatvaranjem domena, i preostala se dva liganda dovode na ispravno mjesto. Otpuštanje željeza iz transferina prati velika konformacijska promjena, prilikom koje se domene udaljavaju jedna od druge, te se pretpostavlja da dolazi do protoniranja karbonata i promjene položaja argininskog ostatka, čime se destabilizira koordinacija željezovog atoma. Afinitet molekule transferina za željezo kod fiziološkog pH izrazito je visoki , stoga je gotovo sve željezo u cirkulaciji vezano za transferin. Nakon transporta u stanicu, željezo ulazi u takozvani „labilni odjeljak željeza'' (engl. *labile iron pool*, LIP). Ovaj odjeljak sačinjava željezo koje je slabim afinitetom vezano za druge molekule: citrat, ATP, aminokiseline, askorbinsku kiselinu. Istraživanje je ustanovilo da je glavna komponenta ovog odjeljka dvovalentno željezo vezano za glutation.[13]

U patogenim bakterijama, poput *Haemophilus influenzae* i mnogih vrsta *Neisseria*, Fe^{3+} ion se prenosi proteinima čija je struktura gotovo identična transferinskim domenama. I ovdje nalazimo četiri proteinska liganda vezana na metal, samo što, za razliku od transferina, aspartat se zamijenjuje glutamatom. S druge strane, umjesto karbonata, ovdje se nalazi fosfat i samo se jedan kisik fosfatne skupine veže na metal dok na šesto koordinacijsko dolazi molekula vode.

3.6. Kelataza: mehanizam unošenja metala u porfirinski kompleks

Umetanje dvovalentnog iona metala u porfirinski prsten sastavljen od četiri povezana pirolska prstena, konačan je korak u biosintezi hema (Fe^{2+}), klorofila (Mg^{2+}), kobalamina (vitamin B_{12} – Co^{2+}) te koenzima F_{430} (Ni^{2+}) koji sudjeluje u formiranju metana zahvaljujući mikrobima metanogenih bakterija. Porfin je nesupstituirani makrociklički spoj sastavljen od četiri pirola koji su spojeni sa α-ugljicima mostovima C-H, što prikazuje slika 3.



Slika 3. Struktura porfina.
Slika preuzeta iz [14].

Porfirini su supstituirani porfini od kojih je protoporfirin IX jedan od najvažnijih, jer je sastavni dio hemoglobina i mioglobina. Uroporfirinogen III je prekusor iz kojeg se dobiva protoporfirin IX, koji se smatra mjestom granjana biosintetskih putova – insercijom iona željeza nastaje hem, dok se insercijom iona magnezija nastavlja biosinteza klorofila.

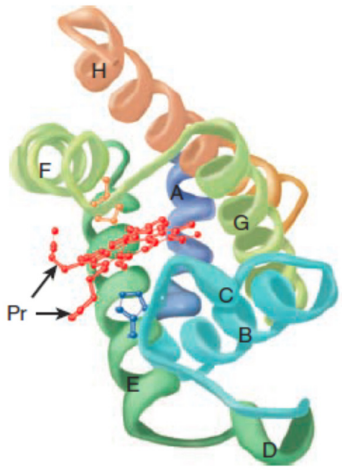
Enzimi koji kataliziraju umetanje iona metala u porfirinski prsten pripadaju klasi enzima nazvanih kelataze. Ferokelataza, zadnji enzim u biosintezi hema, katalizira umetanje iona Fe^{2+} u protoporfirin IX, te se smatra da različite kelataze imaju sličan mehanizam. Gotovo planarni porfirin mora se svinuti da bi se željezo moglo ispravno smjestiti. U prvom koraku, nakon vezanja enzima, dolazi do narušavanja planarne strukture porfirina i nastanka sedlaste strukture u kojoj su dva nasuprotna pirolna prstena savinuta prema gore dok su preostala dva savinuta prema dolje. Nadalje, dva neprotonirana dušikova atoma pirolnog prstena su

usmjerena prema gore, dok su dva protonirana dušikova atoma usmjerena prema dolje s obzirom na porfirinski prsten. Prva veza metal–porfirin formira se nakon iskrivljenja porfirinskoga prstena, nakon čega slijede koraci zamjene liganada koji dovode do formiranja kompleksa. Željezov ion nalazi se na vrhu porfirina koordiniran sa dva atoma dušika, dok su ostala dva atoma dušika još uvijek protonirana. Konačno, metalirani porfirin nastaje slijedom uzastopnih reakcija deprotoniranja dvaju preostala pirolna dušikovih atoma. Deformacija porfirina u obliku sedla događa se izvan ravnine i pod tim okolnostima pirolski prsten može eksponirati dušikov proton i slobodni elektronski par u odgovarajućoj poziciji potrebnoj za reakciju s metalom. Formiranje metaloporfirina ekstremni je primjer sterički kontroliranog supstitucijskog kompleksa.

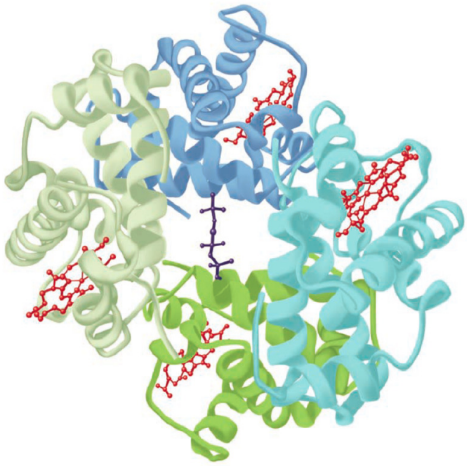
Metaloporfirinski sustav može posredovati pri oksidacijama – npr. pri oksidaciji žive u dvovalentni živin ion. Posrednik je enzim katalaza čija je prostetična skupina feriprotoporfirin IX. Smatra se da se ta oksidacija događa u krvi, a time i detoksikacija, čime se sprječava (ili smanjuje) migracija žive u mozak.

3.7. Metaloporfirini kao prenositelji kisika

Ključna biološka uloga metaloporfirina je ona u okviru prenositelja kisika, te mehanizmu i strukturi istog. Hemoglobin i mioglobin strukturno su slični. Molekularna masa hemoglobina je oko 64.500 i sadrži četiri hemske skupine, dok je molekularna masa mioglobina 17.800 što je približno jedna četvrtina molekularne mase hemoglobina. Mioglobin je sličan jednoj hemskoj skupini hemoglobina.



Slika 4. Struktura mioglobina. Sastoji se od od jednog polipeptidnog lanca, koji čine α-uzvojnice povezane okretima, s jednim veznim mjestom za kisik. Slika preuzeta iz [14].



Slika 5. Kvaterna struktura hemoglobina. Sastoji se od dvaju lanaca α i dvaju lanaca β, funkcionira kao par αβ-dimera. Slika preuzeta iz [14].

Koordiniranje Fe^{2+} na četiri atoma dušika u protoporfirinu IX daje hem, koji u fiziološkim uvjetima nosi negativan naboj jer su karboksilne skupine ionizirane. U vodenoj otopini željezo(II) hema ireverzibilno se oksidira u željezo(III) i tako nastali kompleks zove se hemin.

Hem je povezan na protein u hemoglobinu i mioglobinu preko imidazolskog dušika aminokiseline histidina, tako da je imidazolski dušik koordiniran na željezo, te se naziva proksimalni histidin. U *trans*-položaju prema koordiniranom histidinu vezana je molekula vode u deoksihemoglobinu, odnosno molekula kisika u oksigeniranom spoju. Elektron sa željeza(II) ne prelazi na molekulu kisika, tj. ne dolazi do oksidacije željeza niti stvaranja nepoželjnog nusprodukta (superoksidnog radikalnog aniona).

Hemoglobin dobro veže kisik kod viših tlakova, no kod nižih tlakova kisika kakvi vladaju u mišićnom tkivu, hemoglobin veže kisik bitno slabije od mioglobina. Zato kisik prelazi s

hemoglobina na mioglobin. Osim toga, potrebe za kisikom u mišićima rastu kako se simultano stvara CO_2. Produkcijom CO_2 snizuje se pH, uslijed čega počinje hemoglobin još jače prenositi kisik na mioglobin, što je poznato kao Bohrov efekt. Promjene u koordinacijskoj sferi željeza igraju presudnu ulogu u procesu oksigenacije hemoglobina i prijenosa kisika do stanice (hemoglobin) i u stanicu (mioglobin).

Deoksihemoglobin sadrži visokospinsko željezo(II) s dva elektrona u e_g-orbitalama. Pod tim uvjetima radijus željeza je prevelik i željezo ne stane u porfirinsku ekvatorijalnu ravninu, već je uzdignuto za oko 0,5 Å iznad te ravnine. Veza Fe-N prema histidinu otklonjena je za oko 8° od vertikale te iznosi oko 2,2 Å. Željezo je tako pentakoordinirano i ima konfiguraciju kvadratne piramide, gdje su četiri porfirinska (pirolska) dušika u bazi piramide dok je imidazolski dušik histidina na vrhu piramide. Međutim, kada se molekula kisika poveže u suprotni aksijalni položaj, tada željezo prelazi u niskospinsko stanje u kojemu se elektroni sparuju u t_{2g}-nivou. Očito je da su tada e_g-orbitale prazne, a radijus željeza se toliko smanji da može ući u porfirinsku ravninu što utječe i na Fe-N vezu koja praktički postaje okomita. Spuštanjem željeza u ekvatorijalnu ravninu uzrokuje pomak imidazolskog dušika vezanog na željezo. Taj pomak se prenosi na čitavu uzvojnicu povezanih aminokiselina jedne od četiri podjedinica hemoglobina (ali i dalje na preostale tri podjedinice) što olakšava ukupni oksigenacijski proces u sve četiri podjedinice hemoglobina. Osim promjena u elektronskoj strukturi željeza, također su važne i promjene u strukturi veze između metala i imidazolskog dušika proksimalnog histidina. Tako se pK_a histidina u deoksihemoglobinu bitno povećava u nazočnosti aspartata, jer negativni naboj aspartatovog kisika olakšava protoniranje histidina.[6]

Do oksidacije željeza(II) u željezo (III) može doći kod živih bića, no crvena krvna tjelešca vraćaju Fe^{3+} u Fe^{2+} svojim specifičnim mehanizmima. Ukoliko neki od mehanizama zataji, tada će uzrokovati bolest znanu kao methemoglobinemija.

3.8. Imidazol: načini vezanja na metal

Imidazolski prsten je bitna komponenta mnogih bioloških sustava: pojavljuje se u proteinima kao dio pokrajnog lanca aminokiseline histidina u sastavu hemoglobina i mioglobina, u nukleinskim kiselinama kao dio purinskog prstena adenina i guanina, u citokromima, u vitaminu B_{12}-koenzimu kao benzimidazol, u metaloenzimima poput ugljične anhidraze i drugdje.

Imidazol kao ligand je σ- i π- elektron donor, i to mnogo bolji elektron donor od većine drugih dušikovih heterocikla. Većina imidazola naročito su dobri σ-donori, a umjereno dobri π-donori. U svim spomenutim biološkim sustavima imidazol ima različite uloge: kao proton donor ili proton akceptor pri stvaranju vodikove veze, može imati ulogu specifične baze ili nukleofilnog katalizatora ili je pak ligand za koordinaciju na metal.

Imidazolska jedinica histidinskog ostatka predstavlja kod većine metaloproteina veznu stranu za različite metalne ione kao što su Mn^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Cu^{+}, Cu^{2+} i Zn^{2+}. Poznato je da 1-metilimidazol ima jaki afinitet za Mg^{2+}. Smatra se da je Mg^{2+} koordiniran na *N*-metilhistidin koji je nađen u mišićnom miozinu. Naglašava se da je procjena sposobnosti imidazola za π-vezanje vrlo važna kako bi se mogao razumijeti učinak imidazola na fizikalno-kemijska svojstva hemoproteina i kako ta svojstva mogu biti usklađena s promjenama u duljini veza Fe-imidazol, ili sa orjentacijom imidazola, vodikovim vezama itd.[6]

3.9. Željezo-sumpor klasteri

Tijekom prvih milijardu godina, evolucija se odvijala u anaerobnoj okolini. Obzirom na pregršt atoma željeza i sumpora u tim uvjetima, za očekivati je da su proteini sa klasterima željezo-sumpor (engl. *iron-sulfur cluster*, ISC), zvani i proteini s nehemskim željezom, također bili vrlo rasprostranjeni. Stoga ne čudi što se javljaju među prvim katalizatorima u prirodi. Općenito, „cluster'' (engl.) je skupina, grozd, koji ne posjeduje centralni atom, već postoji sustav veza koje povezuju svaki atom sa susjednim atomom u određenom poliedru. Budući da su na „grozdu'' obično vezani ligandi, to je zapravo poseban polinuklearni kompleks s vezama M-M.

Iako su rasprostranjeni u gotovo svim živim organizmima, kao posebna klasa metaloproteina, prepoznati su tek nakon otkrića njihovog karakterističnog EPR spektra u oksidiranom stanju 1960-ih. U takvim se proteinima atomi željeza vežu na sumpor - bilo vezanjem na polipeptidni lanac preko tiolne skupine cisteina ili preko anorganskog sulfida. S biokemijskog aspekta, važnost Fe-S klastera jest laki prijenos elektrona te tendencija vezanja s atomima kisika i dušika, koji su bogati elektronima, a nalaze se u raznim organskim supstratima. Prema tome, proteini koji sadrže klastere Fe-S sudjeluju u brojnim biološkim redukcijskim reakcijama.

Poznato je nekoliko tipova tih proteinskih Fe-S klastera, koje prema kvantitativnom udjelu atom željeza i sumpora možemo podijeliti na četiri osnovna strukturna motiva. Prema tome, kristalografski ih klasificiramo na sljedeći način:

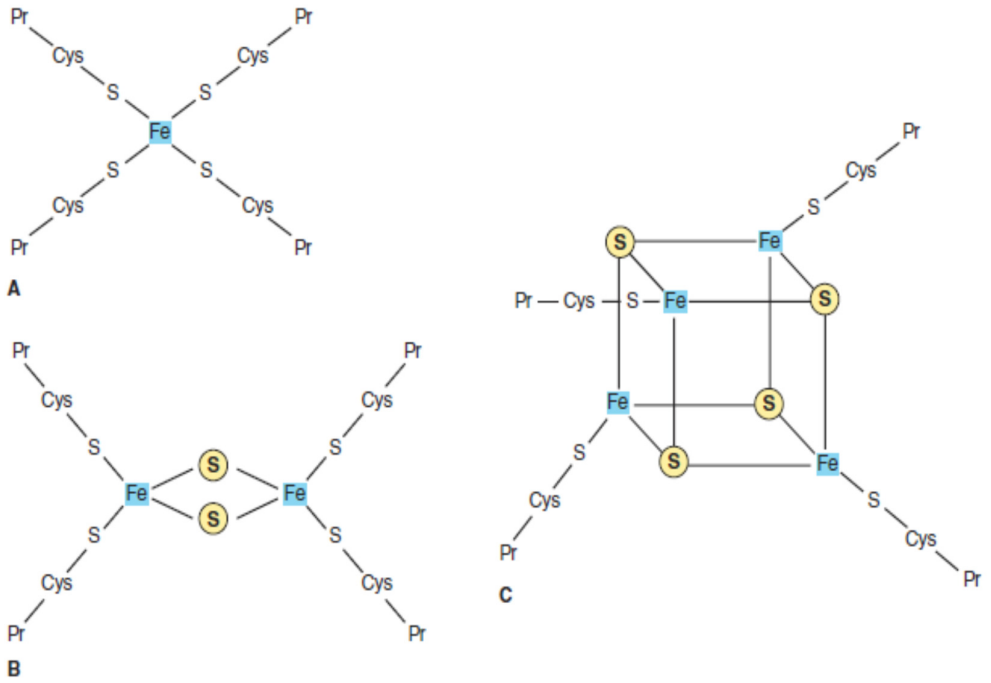
I. [Fe-S], bakterijski rubredoksin – najjednostavniji oblik [Fe-S] klastera u kojemu je jedan ion željeza koordiniran sa sulfhidrilnim skupinama četiriju cisteinska ostatka u proteinu. Željezo u ovom proteinu može biti dvo- i trovalentno.

II. [Fe_2-S_2], rompski klasteri – u kojem se nalaze dva iona željeza, dva anorganska sulfida, te obično četiri cisteinska ostatka. Tipična stabilna oksidacijska stanja klastera su +1 i +2, bez uzimanja u obzir naboje koordiniranih cisteinskih ostataka.

III. [Fe_3-S_4] klasteri – u kojem se nalaze tri iona željeza i četiri anorganska sulfida. Tipična stabilna oksidacijska stanja klastera su 0 i +1.

IV. [Fe_4-S_4] klasteri – sadržava četiri iona željeza, četiri anorganska sulfida i četiri cisteinska ostatka. Tipična stabilna oksidacijska stanja su +1 i +2 za feredoksinski tip klastera, te +2 i +3 za Hipip (engl. *high potential iron-sulfur protein*) klastere. Delokaliziranost elektrona vodi do toga da željezo u tim kompleksima kruži između reduciranog (Fe^{2+}) i oksidiranog stanja (Fe^{3+}).

Ukoliko neki protein male molekularne mase sadrži prvi tip klastera, tada se naziva rubredoksin (Rd), a feredoksinom (Fd) se smatraju proteini u čiji sastav ulaze preostala tri tipa klastera. Najčešće se kao ligandi koriste aminokiseline cisteina, no mogu se pojaviti i neke druge. Protein sa centralnom skupinom [Fe_2-S_2], koji se još naziva *Rieskeovim centrom*, neobičan je po tome što je jedan željezov ion koordiniran na dva histidinska, umjesto na dva cisteinska ostatka. Ta koordinacija stabilizira reducirani oblik centra, što mu podiže redukcijski potencijal, pa on lako prima elektrone.



Slika 6. Klasteri željezo-sumpor.
Jedan ion željeza vezan na četiri cisteinska ostatka. (B) 2Fe-2S klaster, u kojemu su ioni željeza premošteni sulfidnim ionima. (C) Klaster 4Fe-4S. Svaki od tih klastera podliježe oksidoredukcijskim reakcijama. Slika preuzeta iz [14].

3.10. Nastanak željezo-sumpor klastera

Željezo-sumpor klasteri značajni su u kontekstu njihove biološke uloge za željezo-sumpor proteine. Za razliku od većine drugih kofaktora, oni su, u osnovi, anorganske građe, sastavljeni od kationa željeza (Fe^{2+} ili Fe^{3+}) i anorganskih aniona sumpora (S^{2-}). Razumijevanje željezo-sumpor klastera (engl. *iron-cluster assembly*, ICA) u eukariotskim mitohondrijima se uvelike unaprijedilo te je poznat mehanizam njhovog nastanka.

Sustav povezivanja mitohondrijskih klastera vrlo je sličan onom u bakterijama i danas je jasno da mitohondriji igraju glavnu ulogu u biogenezi željezo-sumpor proteina, budući da su oni odgovorni za njihovo dozrijevanje ne samo unutar, već i izvan organela. Nadalje, biogeneza željezo-sumpor proteina u eukariotima uključuje međudjelovanje tri različita sustava kompleksnih multi-proteina, redom: povezivanje ISC-a, izvoz ISC-a, te povezivanje citosolnih željezo-sumpor proteina (engl. *cytosolic iron-sulfur protein assembly*, CIA).

Opća zamisao biogeneze željezo-sumpor klastera uključuje prijelaznu *de novo* sintezu, u kojoj se sumpor iz cisteina dostavlja kao sulfid proteinskom kompleksu Isu1/2, koji pripada

porodici proteinskih skela (engl. *scaffolding proteins*). Zatim se ISC prenosi apoproteinima uz pomoć dodatnih ISC proteina, dok se željezo u obliku iona Fe^{2+}, unosi u membranu pomoću prijenosnih proteina Mrs3 i Mrs4, te ostalih, zasad nepoznatih proteina. Sulfide potrebne za sintezu ISC katalizira cistein desulfuraza ovisna o piridoksal fosfatu, Nfs1. U toj reakciji, atom sumpora prelazi sa slobodnog cisteina na Nfs1 cistein, a kao međuprodukt reakcije nastaje persulfid. Sumpor se zatim prenosi izravno Isu1/2 proteinskom kompleksu, što je nužno kako bi se izbjeglo potencijalno neregulirano otpuštanje toksičnog sulfida. Za redukciju sumpora u sulfid, potrebni su elektroni iz NADH dobiveni iz lanca prijenosa elektrona koji uključuje feredoksin reduktazu Arh1 i feredoksin Yah1. Da bi se željezo vezalo na proteinski kompleks Isu1/Isu2 potreban je protein Yfh1 (poznat pod nazivom frataksin kod čovjeka) kao molekularni pratioc željeza.

3.11. Umetanja bakra u superoksid – dismutazu

Kako bi se uklonila opasnost od slobodnih radikala, stanice posjeduju širok izbor sustava za popravak. Superoksid-dismutaza (SOD) predstavlja prvu liniju obrane od reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, engl. *reactive oxygen species*) i ima ključnu ulogu u zaštiti stanica od oksidacijskih oštećenja. Oksidacijska oštećenja kojima su uzrok reaktivne kisikove vrste smatraju se odgovornima za starenje i za niz bolesti. Općenito, superoksid-dismutaza je metaloprotein sa redoks aktivnim metalom, koji katalizira dismutaciju (disproporcioniranje) superoksidnih radikala u vodikov peroksid i kisik. Četiri su klase SOD-a identificirane ovisno o sadržaju dinuklearnog bakar-cinka ili mononuklearnog željezovog, manganovog ili niklovog kofaktora.

Za početak, CuZn superoksid-dismutaza (SOD1) razvila se neovisno kod eukariota i ima različitu sekvencu u odnosu na strukturno slične Fe SOD i Mn SOD. Nalazi se u citosolu eukariotskih stanica kao homodimer i u kloroplastima biljaka kao homotetramer. Svaka podjedinica sadrži po jedan atom redoks aktivnog metala Cu^{2+}/Cu^{+} i jedan atom Zn^{2+} koji ima strukturnu ulogu. Slobodne razine bakra su izuzetno niske unutar stanice, jer je bakar vezan uz posebnu klasu spojeva poznatijih kao molekularni šaperoni ili molekularni pratioci (CCS, od engl. *Copper Chaperone for SOD1*). Potonje vrste su uključene u ugradnju bakra u metaloenzime. Mehanizam umetanja bakra u enzim SOD1 je predložen na sljedeći način: molekularni pratioci CCS vežu bakrove Cu^{+} ione unešene kroz plazmatske membrane pomoću odgovarajućih Ctr1 proteinskih prenositelja. Interakcijom pratioca i reduciranog ditiolnog oblika enzima SOD1, nastaje pripadni heterodimer. Prilikom izlaganja kisiku ili

superoksidu, prvo nastaje disulfidni most unutar podjedinica heterodimera koji se zatim izomerizira pa nastaje intramolekularni disulfidni most u enzimu SOD1. U trenutku reakcije sa kiskom, bakrov se kation istovremeno prenosi sa pratioca na enzim prilikom čega dolazi do njihovog razdvajanja i otpuštanja monomerne vrste SOD1.

3.12. Složeniji kofaktori

Mehanizam unosa metala u metaloporfirine i željezo-sumpor klastere značajno se produbio zadnjih godina. Osim ovih kofaktora, koji se nalaze u velikom broju metaloproteina, postoji i sve veći broj kompleksnijih kofaktora s nešto specifičnijom rasprostranjenošću.

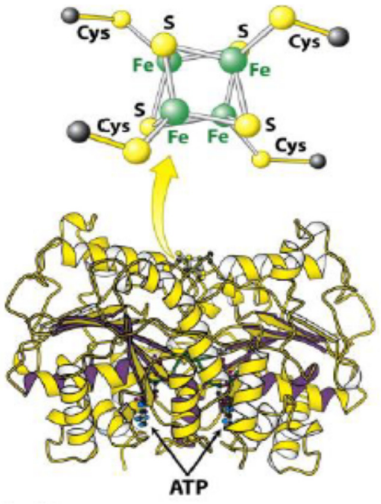
3.12.1. MoCo kofaktor

Prijelazni metal molibden sastavni je dio aktivnog mjesta u širokom rasponu metaloenzima kod bakterija, gljivica, algi, biljkama i životinjama. Unatoč tome, sam po sebi, metal je biološki neaktivan osim ako se javi u obliku MoCo. Uloga molibdena u biokatalizatorima zasnovana je na njegovoj sposobnosti opstanka u različitim oksidacijskim stanjima. Bez obzira na važnu ulogu molibdena kao mikroelementa, mnogo je nepoznanica o detaljima strukture i funkcije Mo-enzima. Glavni razlozi za to su vrlo nizak sadržaj molibdena i složenost strukture ovih multifunkcionalnih enzima. Enzimi iz grupe oksidaza sadrže MoCo–kofaktor, koji gradi peteročlani 1,2-ditiolni kelatni prsten.

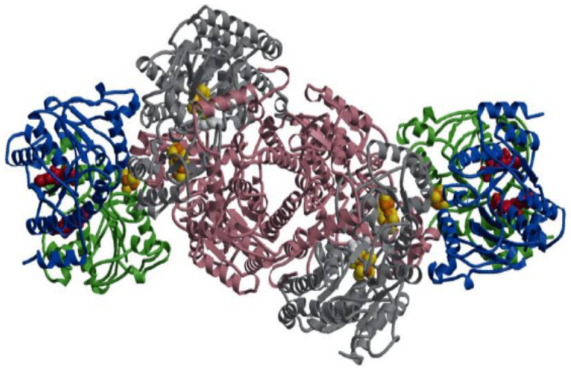
U svim dosad proučavanim organizmima, MoCo se sintetizira visoko očuvanim biosintetskim procesom, koji se može podijeliti u četiri koraka. Utvrđeno je šest različitih enzimskih aktivnosti u MoCo biosintezi (i pripadnim genima) kod biljaka, gljivica i ljudi, a koje su homologne enzimskim aktivnostima kod bakterija. U prvom koraku sinteze molibdenskog kofaktora, MOCS1A i MOCS1B kataliziraju kruženje gvanozin trifosfata (GTP) prekursoru Z. Tri su enzima, MOCS2A, MOCS2B i MOCS3, zatim odgovorna za stvaranje ditiolne skupine. Posljednji koraci sinteze, prijenos i umetanje Mo u MTP, kataliziraju se zasebnim domenama, Geph-G i Geph-E, dvodomenskog proteina koji se kod sisavaca zove gefirin (GPH). Budući da je MoCo nestabilan i osjetljiv na prisustvo kisika, ne čudi da sve stanice sadrže protein nosioc koji veže MoCo-kofaktor i štiti ga od oksidacije, kako bi stanica u svakom trenu bila opskrbljena dovoljnom količinom istoga.

3.12.2. FeMoCo kofaktor

Fiksiranje dušika odvija se pomoću malog broja mikroorganizama, takozvanih diazotrofa, od kojih su neki (iz porodice *Rhizobium*) u simbiozi s biljkama leguminoznih vrsta, što prevode N_2 u NH_3 u tlu. Leguminoze su lepirnjače ili mahunarke, iz porodice dvosupnica kojoj pripadaju neka stabla, grmovi i zeljaste biljke. Plod je mahuna, a porodica obuhvaća više od 10 000 vrsta, poput graha, graška, leće, boba, soje, djeteline i druge. Fiksaciju dušika i redukciju trostruke veze do amonijak radi složeni enzim, kompleks nitrogenaza prikazan na slici 8. Sastoji se od dvije skupine proteinskih komponenata: reduktaze (prikazane na slici 7.), koja osigurava elektrone snažne redukcijske moći i nitrogenaze, koja upotrebljava te elektrone za redukciju N_2 u NH_4^+. Obje su ove komponente proteini koji sadrže klastere željezo-sumpor: željezo je u njima vezano na sumpor cisteinskog ostatka i na anorganski sulfid. Nitrogenazna komponenta (poznata je kao MoFe-protein) sadrži još jedan ili dva atoma molibdena. Reduktaza (Fe-protein) sastoji se od dva identična polipeptida i dva vezna mjesta za ATP. Za prevođenje N_2 u NH_4^+ pomoću kompleksa nitrogenaze potreban je, dakle, adenozin-trifosfat (ATP) i snažan reducens, jer je $N_2 \rightarrow 2\ N^{3-}$ šest-elektronska redukcija. Kod većine mikroorganizama koji fiksiraju dušik, izvor elektrona za tu zahtjevnu redukciju, jest reducirani feredoksin. U tipičnoj nitrogenazi oba proteina, MoFe-protein i Fe-protein dijele jedan [Fe-4S] klaster feredoksinskog tipa.



Slika 7. Fe-protein.
Taj je protein dimer sagrađen od dvaju polipeptidnih lanaca vezanih klasterom 4Fe-4S. Slika preuzeta iz [15].



Slika 8. Enzimi i kofaktori u kompleksu nitrogenaze. Podjedinice nitrogenaze prikazane su sivo i ljubičasto, a podjedinice reduktaze obojane su zeleno i plavo. Vezani ADP je označen crveno, 4Fe-4S kompleks (Fe atomi su narančasti, a S atomi su žuti). Slika preuzeta iz [15].

3.12.3. P-klasteri

Između α i β podjedinica nitrogenaze, nalaze se *P-klasteri*, koji prihvaćaju elektrone s feredoksina. Sa *P-klastera* elektroni putuju do MoFe središta gdje se N_2 reducira u NH_3. Uloga *P-klastera* je da čuva elektrone dok se oni ne mogu efikasno iskoristiti za redukciju dušika na MoFe kofaktoru. Sastoji se od 8 atoma Fe i 7 sulfida povezanih na protein preko 6 cisteina. Dva tiola cisteinskih ostataka služe kao premoščujući ligandi, gdje svaki koordinira po jedan Fe atom iz svakog klastera - to su ista četiri Fe atoma koji su koordinirani na središnji sulfidni ion.

U oksidiranom klasteru s dva elektrona, dva Fe atoma koji su bili povezani na središnji sulfidni ion se udaljavaju od njega, ostavljajući ga tetrakoordiniranim. Isti ti Fe atomi ostaju četverostruko vezani, kroz koordinaciju s amidnom skupinom dušika Cys 87α i bočnim ogrankom hidroksilne skupine Ser 186β.

FeMo-kofaktor se sastoji od [4Fe-3S] klastera i [1Mo-3Fe-3S] klastera, premoštenih trima sulfidnim ionima, tako da je sveukupni anorganski sastav [1Mo-7Fe-9S]. Potonji je kofaktor vezan na protein preko jednog cisteina i jednog histidina, dok je ion Mo koordiniran

približno oktaedarski: s tri sulfidna iona samog kofaktora, krajnjim dušikom imidazolske skupine histidina i dvama kisicima iz molekule homocitrata (trikarboksilne kiseline koja je esencijalna komponenta kofaktora).

3.12.4. H-klasteri

H-klaster enzima hidrogenaze predstavlja još jedan organski kofaktor izuzetne složenosti. U ovom slučaju, spektroskopskim je metodama opažena neuobičajena koordinacija centralnog atoma metala na koji su vezani cijanidni ligandi i ugljični monoksid (rendgenskom kristalografijom se nisu mogle jednostavno razlučiti elektronske gustoće ugljika, dušika i kisika). Na primjeru Fe hidrogenaze iz *Desulfovibrio desulfuricans*, taj je enzim u osnovi sastavljen od dva atoma željeza u aktivnom mjestu, na koje su koordinirani spomenuti cijanidni ligandi i ugljični monoksid te su još premošteni neuobičajenim organskim 1,3-ditiolnim ligandom. Atom željeza označen s Fe^P je vezan na protein preko cisteina. Drugi atom željeza, Fe^D veže ugljični monoksid u reduciranoj formi, koji se prilikom oksidacije mijenja u premošćujući ligand.

3.13. Siderofore

Željezo je esencijalni element za gotovo sve organizme, pa tako i za mikroorganizme. Kako bi snabdjevali stanicu željezom, u uvjetima nedostatka istoga, bakterije i gljivice proizvode siderofore. Siderofori su organski ligandi male molekulske mase, vrlo visokih afiniteta i specifičnosti prema željezu(III), kakve su npr. aerobaktin, enterobaktin i jersiniabaktin. Možemo ih ugrubo klasificirati prema sadržaju veznih grupa na: katekolne, hidroksamate, karboksilate i heterocikličnе spojeve.

Siderofori ciljano tvore kelate sa željezom(III), koji je, u aerobnim uvjetima, najrasprostranjeniji ali biološki nedostupan oblik željeza u okolišu. Tako vezane siderofore s željezom prihvaća bakterija na receptore na svojoj vanjskoj membrani.[16] Ovo pak znači da su sideroforni ligandi tvrdi donori kisika te da tvore termodinamički vrlo stabilne komplekse s željezom(III). Krizobaktin ili α-N-(2,3-dihidroksibenzoil)-D-lizil-L-serin je mono-katekolni siderofor kojeg izlučuje biljna patogena enterobakterija *Erwinia chrysantemi*. Ferikrom, najbolje proučen predstavnik hidroksamatnih siderofora, sastoji se od cikličke heksapeptidne okosnice na koju su spojene tri molekule N-acil-N-hidroksi-L-ornitinske skupine. Enterobaktin, prototip katekolnih siderofora, glavna je siderofora koju proizvodi *Eschericia coli*. Radi se o cikličkom triesteru dihidroksibenzoil-serinu. Prilikom vezanja enterobaktina sa željezom, šest deprotoniranih hidroksilnih skupina

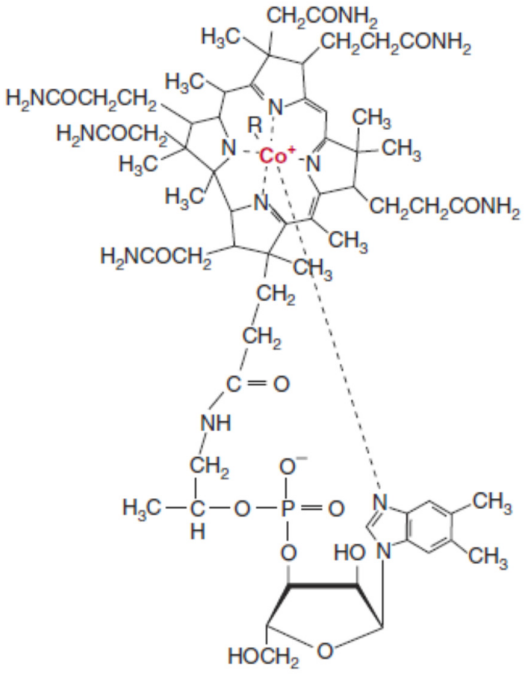
dihidroksibenzoila (odnosno, katekolata) namota se na metalni ion u središtu molekule. Stafiloferin A, siderofora vrste *Staphilococci*, sadrži *D*-ornitinsku okosnicu na koju su spojeni ostaci limunske kiseline. Jersiniabaktin je primjer heterocikličke siderofore iz iznimno patološke porodice *Yersinia*. U feri-jersiniabaktinu atom željeza se nalazi u neuređenoj oktaedarskoj konfiguraciji, okružen trima atomima dušika i trima negativno nabijenim atomima kisika.[7]

3.14. Vitamin B_{12}

Kobalt ulazi u sastavni dio strukture vitaminu B_{12}, što je od iznimnog biokemijskog značaja. Taj je vitamin jedinstven po tome što ga sintetiziraju isključivo mikroorganizmi, posebice anaerobne bakterije. Pomankanje vitamina B_{12} (cijanokobalamina, R = CN; ili drugih važnih kobalamina: adenozilkobalamina, R = adenozil; hidroksokobalamina, R = OH; metilkobalamina, R = CH_3) uzrokuje perniciozu anemiju, bolest koja bi bez liječenja završila smrtno. Inače, perniciozna anemija najčešće je bolest ljudi iznad 40 godina. Cijanokobalamin i hidroksokobalamin djelotvorni su lijekovi za perniciozu anemiju, jer ih organizam može pretvoriti u adenozilkobalamin ili metilkobalamin.

Adenozilkobalamin i metilkobalamin rijetki su primjeri organometalnih spojeva (sadrže σ-vezu kobalt-ugljik) koji se javljaju u prirodi. Molekule tih spojeva imaju korinski makrociklički kostur. Korinski je prsten sličan porfirinskom, no manje je pravilan – ima samo jednu NH-skupinu u središtu tetrapirolskog makrocikličkog kostura. U kobaltaminu ugljikovi atomi na periferiji korinskog prstena zasićeni su i nose sedam amidnih skupina kao supstituente: tri od tih skupina su acetamidi, tri su propionamidi, dok je posljednja amidska skupina N-supstituirani propionamid. Amidski je supstituent propilna skupina čiji je 2-C spojen na neuobičajeni ribonukleotid (neuobičajen zato jer mu je temeljna jedinica 5,6-dimetilbenzimidazol).

Korinski prsten sa navedenim supstituentima, uključivši i fosfat riboze, koji je povezan s kobaltom(III) nosi kolektivno ime kobamid. Ako se uključi i benzimidazol tada se takva struktura naziva kobalamin. Ion Co^{3+} koordiniran je na četiri pirolska prstena i jedan imidazolski dušik, analogno kao i u strukturi hema. U prirodnim je kobalaminima šesta pozicija vezana σ-vezom na ugljikov atom adenozila ili metila (dok je u strukturi hema šesta aksijalna pozicija prazna ili je okupirana molekulom vode ili slabo vezanim kisikom).



Slika 9. Struktura kobalamina.
Slika preuzeta iz [14].

Cijanokobalamin nije sam fiziološki aktivan, već su fiziološki aktivni adenozilkobalamin i metilkobalamin koji *in vivo* nastaju iz iz vitamina B_{12}. Reakcijom hidroksokobalamina s cijanidom u vodenim otopinama gotovo trenutno nastaje cijanokobalamin. U ljudskom organizmu vitamin B_{12} omogućava dvije enzimske reakcije koje se inače ne mogu odvijati:

I. Djelovanje metilmalonil-CoA-mutaze, čime se omogućava pretvorba R-metilmalonil-CoA u R-sukcinil-CoA.
II. Djelovanje metionin-sintetaze koja pretvara S-homocistein u S-metionin. Ova reakcija zahtijeva prisutnost metilkobalamina.

Pretpostavlja se da reakcije spomenute pod I. i II. u odsutnosti kobalamina uzrokuju perniciozu anemiju.[6]

3.15. Teški metali u biološkim sustavima

Čovjek je tijekom evolucije stvorio mehanizme za održavanje pravilne homeostaze i obranu organizma od vanjskih oštećenja. Međutim, zbog nagomilavanja ekoloških produkata,

adaptacijski i evolucijski mehanizmi to ne mogu pratiti pa se koncentracija iona teških metala sve više povećava. Kada zaštitni mehanizmi protiv iona metala postanu insuficijentni, dolazi do njihove inkorporacije u biokemijskim reakcijama, te se vežu za aktivna mjesta u biomolekulama. To posebno vrijedi za živu, olovo i kadmij.

Kadmij ima veliki afinitet prema biološkim ligandima. Inhibira sintezu nukleinskih kiselina, suprimira procese oksidativne fosforilacije, uz inhibiciju mnogih enzima sa SH skupinama. Olovo se veže za tiolske i fosfatne ligande. Ulazi u reakcije s enzimima koji također imaju SH skupine, te inhibira enzim lipoamid dehidrogenazu. Osim toga, inhibira ATP-aze koje su potrebne u transportu iona Na^+ i K^+. Bez pravilnih odnosa Na^+ i K^+, nema polarizacije i repolarizacije stanica, što je presudno važno za stvaranje i transmisiju živčanih impulsa. Nadalje, olovo inhibira inkorporaciju željeza u protoporfirin IX, dakle koči sintezu hema. Male koncentracije žive inaktiviraju enzime sa SH skupinama, što dovodi do manjka energije, a posljedice su regresivno degenerativne promjene. Ulazak iona žive u transportne mehanizme mitohondrija može, posebno u jetri i bubrezima, zaustaviti rad mnogih enzima i oštetiti (ili potpuno zaustaviti) funkcije tih organa. Spojevi žive su nestabilni u kiselom mediju i ako su osigurani optimalni uvjeti, vezat će se s drugim spojevima, poput fosforila i karboksil amido i amino skupine.[17] Na ovim se skupinama inhibiraju aktivna mjesta proteinskih molekula ili se mijenjaju.

Nakon ulaska u organizam, teški metali se vežu za posebne vrste proteina, nazvane metalotioneini. Potonji se sintetiziraju u jetri, a prenose u bubrege. Metalotionein za kadmij je bogat SH skupinama, a sadrži 30% cisteina i 9% sumpora. Živa također ima specifičan protein u jetri s kojim se veže, nakon čega se transportira u bubrege.[18] Prema tome, može se reći da je djelovanje iona teških metala vrlo kompleksno i zahvaća mnoge funkcije stanica.

§ 4. Zaključak

Metali čine više od dvije trećine elemenata u prirodi. Prema Paulingu, četiri petine svih elemenata na našoj planeti su esencijalni metali, koji su funkcionalni sastav bioloških struktura, bez kojih nema života. Svi su drugi metali, kojima nije namijenjena takva uloga, a nađu se u organizmu, toksični. Metalne ione međusobno razlikujemo po kemijskim i fizikalnim svojstvima, te po afinitetu prema organskim specijama. No, zajedničko im je svojstvo da stvaraju stabilne komplekse s različitim ligandima i vežu se za aktivna mjesta u biomolekulama. Najčešće se vežu s kisikom, sumporom, sulfhidrilnim i amino skupinama, imidazolnim, fosfatnim i karboksilnim skupinama, što se odražava na nizu funkcija, koje obavljaju enzimi stanične membrane ili unutarstaničnih struktura. Ioni metala mogu djelovati katalitički na različite načine: ion metala može izravnom koordinacijom olakšati stvaranje nukleofila, kao što je hidroksidni ion (ovu ulogu ima cinkov(II) ion u katalizi ugljičnom anhidrazom); ion metala može poslužiti i kao elektrofil, stabilizirajući negativni naboj na reakcijskom međuproduktu (magnezijev ion ima ovakvu ulogu u enzimima); konačno, ion metala može poslužiti kao most između enzima i supstrata, povećavajući energiju vezanja i držeći supstrat u konformaciji povoljnoj za katalizu (takvom se strategijom koriste gotovo svi enzimi koji rabe ATP kao supstrat).[4]

Rezerve biometala se u ljudskom organizmu popunjavaju svakodnevnim unosom hrane i vode, a u iznimnim slučajevima neophodno je unošenje posebnih farmaceutskih preparata sa nekim bioelementom.

§ 5. Literaturna vrela

1. RM. Roat-Malone, Bioinorganic Chemistry, John Wiley & Sons, New Jersey, 2002., 1-7
2. CE. Housecroft, AG. Sharpe, *Inorganic Chemistry*, 4th ed., Pearson, Essex, England, 2012
3. WHO. Environmental Health Criteria 234. Elemental speciation in human health risk assessment. Pristupljeno: 28.07.2017. Dostupno na: http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9241572345_eng.pdf.
4. D. Grdenić, Molekule i kristali, Školska knjiga, Zagreb, 5th ed., 2005., 341-347
5. L. Mandić, *Disertacija*, Sveučilište u Zagrebu, 2001.
6. S. Ašperger, *Kemijska kinetika i anorganski reakcijski mehanizmi*, Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Zagreb, 1999., 157-159, 233-237, 251-266
7. RR. Crichton, *Biological Inorganic Chemistry*, Elsevier B.V., 2008., 27-41
8. JM. Berg, JL. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013., 296
9. Lj. Kovačević, I. Žugaj, *Kemijski elementi: leksikonski priručnik*, Media sci, Zagreb, 1996
10. Y. Ma, M. Yeh, K. Yeh, J. Glass, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **290** (2006) 417-22
11. AT. McKie, D. Barrow, A. Rolfs, G. Sanger, E. Mudaly i sur., Science **291** (2001) 1755-59
12. HM. Baker, BF. Anderson, EN. Baker, Proc Natl Acad Sci USA **100** (2003) 3579-83
13. RC. Hider, XL. Kong, Biometals **24** (2001) 1179-87
14. VW. Rodwell, DA. Bender, KM. Botham, PJ. Kennelly, PA. Weil, *Harper's Illustrated Biochemistry*, 30th ed., The McGraw-Hill Education, New York, 2015
15. B. Mildner, *Sinteza aminokiselina*, prezentacija, 2016.
16. L. Emody, M. Kerenyi, G. Nagy, Int J Antimicrob Agents, **22** (2003) Suppl 2:29-33
17. Dž. Pezerović i R. Panijan, *ASCRO* **13** (1979) 157-162
18. R. Domitrović i Č. Milin, *Biochemia Medica* **10** (2000) 21–27