Alosteričke promjene konformacije proteina

Badurina, Valentina

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:217:751703

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Valentina Badurina

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

ALOSTERIČKE PROMJENE KONFORMACIJE PROTEINA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Neposredni voditelj rada: /

Zagreb, 2017.

Datum predaje prve verzije Završnog rada: 17. kolovoza 2016.

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

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

Sadržaj

§ SAŽETAK VII

§ 1. UVOD 1

§ 2. MODELI ALOSTERIJE I ALOSTERIJA KOD HEMOGLOBINA, ASPARTAT-TRANSKARBAMOILAZE I FOSFOFRUKTOKINAZE 1 2

2.1. Alosterička regulacija i kooperativnost 2

2.1.1. Hillova jednadžba 3

2.1.2. Adairova jednadžba 4

2.1.3. Usklađeni (MWC, po Monodu, Wymanu i Changeuxu) model alosterije 5

2.1.4. Sekvencijalni (KNF, po Koshlandu, Némethyju i Filmeru) model alosterije – model induciranog pristajanja 6

2.2. Hemoglobin 7

2.2.1. Građa hemoglobina 7

2.2.2. Konformacijske promjene – Perutzov mehanizam 8

2.2.3. Biološka važnost kooperativnosti 11

2.2.4. H^+, CO_2 i Cl^- kao alosterički modulatori 13

2.2.5. Utjecaj 2,3-bisfosfoglicerata (BPG) na vezanje kisika 14

2.3. Aspartat-transkarbamoilaza 16

2.3.1. Regulacija količine pirimidina i purina u stanici 16

2.3.2. Građa ATC-aze 16

2.3.3. Mehanizam konformacijske promjene pri katalizi 17

2.3.4. N-(fosfonacetil)-L-aspartat (PALA) 19

2.3.5. Alosterički modulatori ATP, CTP i UTP 19

2.4. Fosfofruktokinaza 1 20

2.4.1. Raznolikost fosfofruktokinaza 21

2.4.2. Bakterijska PFK: građa, promjene konformacije i modulatori 22

2.4.3. Eukariotska PFK: građa i promjene konformacije 24

2.5. Zaključak 27

§ 3. LITERATURNI IZVORI XXVIII

§ Sažetak

Alosterija je jedan od načina regulacije proteinske aktivnosti. Sposobnost alosteričkih proteina da mijenjaju tercijarnu i kvaternu strukturu, što dovodi do razlike u afinitetu vezanja supstrata, uvelike ih razlikuje od uobičajenih proteina. Pomoću alosterije enzimi mogu gotovo trenutno osjetiti koncentraciju metabolita u stanici i djelovati u skladu s time.

U ovom radu opisana su svojstva, građa i konformacijske promjene triju proteina: hemoglobina, te enzima aspartat-transkarbamoilaze i fosfofruktokinaze. Hemoglobin je prvi protein povezan sa specifičnom fiziološkom funkcijom, prijenosom kisika iz područja viših parcijalnih tlakova kisika u područja nižih parcijalnih tlakova kisika. Također je uzet kao predmet proučavanja kojim je potpomognuto objašnjavanje kontrole enzimske aktivnosti i općenitih mehanizama djelovanja alosteričkih proteina. Postoje dva takva osnovna mehanizma: usklađeni i sekvencijalni model alosterije. Usklađeni model podrazumjeva da se svaka podjedinica nalazi u jednom od dva moguća stanja, T i R, dok sekvencijalni model pretpostavlja postojanje više prijelaznih konformacija između dvije krajnosti, T i R stanja.

Alosterički proteini mogu imati više različitih modulatora koji se mogu vezati na različita mjesta na proteinu. Tako je kod hemoglobina vezno mjesto za kisik ujedno i aktivno (katalitičko) i regulatorno (alosteričko) mjesto i nalazi se na sve četiri podjedinice, dok za njegov modulator 2,3-bisfosfoglicerat postoji samo jedno alosteričko mjesto unutar cijelog tetramera. Aspartat-transkarbamoilaza posjeduje dvije vrste podjedinica sa zasebnom ulogom: regulatornu, koja sadrži alosteričko mjesto, i katalitičku, koja sadrži aktivno mjesto dok se kod fosfofruktokinaze 1 aktivno mjesto nalazi uglavnom pri sredini podjedinice, a regulatorno na sučelju podjedinica.

§ 1. UVOD

Alosterički protein (od grčkog *allos* (ἄλλος), drugi i *stereos* (στερεὸς), prostor)[1] je protein čija je aktivnost pod utjecajem alosteričkih modulatora. Takvi proteini sastavljeni su od više podjedinica, od kojih jedna ili više podjedinica sadrži alosteričko mjesto. Alosterički modulator s alosteričkim mjestom tvori reverzibilne nekovalentne interakcije koje su uzrok promjene konformacije cijelog proteina. Na taj način su alosterički proteini u mogućnosti osjetiti trenutnu koncentraciju određenih metabolita – alosteričkih modulatora te povećati ili smanjiti svoju aktivnost, stoga imaju vrlo važnu ulogu u regulaciji pojedinih mjesta raznih metaboličkih puteva. Primjeri takvih enzima su fosfofruktokinaza 1 s ulogom u metabolizmu ugljikohidrata te aspartat-transkarbamoilaza s ulogom u metabolizmu nukleotida.

Alosterički proteini su polimerne strukture te promjena nekovalentnih interakcija između podjedinica uzrokovana vezanjem ili otpuštanjem modulatora doprinosi (de)stabilizaciji pojedine konformacije u odnosu na drugu na temelju njihovih različitih afiniteta prema supstratu. Bilo koja promjena u međusobnom odnosu podjedinica (rotacija, savijanje) polimera ili unutar njih može rezultirati u promjeni izgleda i svojstava aktivnog mjesta i na taj način dovesti do različitog afiniteta vezanja modulatora i supstrata.

Cilj rada je prikazati kako naizgled jednostavna promjena uslijed djelovanja modulatora, poput sjedanja iona željeza u ravninu hema prilikom vezanja jedne molekule kisika, dovodi do preciznih i kompleksnih radnji neophodnih za normalno funkcioniranje organizma, što je u navedenom slučaju uspješno prenošenje molekule kisika iz područja područja viših u područja nižih parcijalnih tlakova kisika na što se nadovezuju i brojne druge važne aktivnosti.

Svrha rada je pružiti pregled tri proteina (hemoglobina, aspartat-transkarbamoilaze i fosfofruktokinaze 1) s različitom ulogom, koji su različito regulirani i strukturirani, a poveznica između njih je upravo alosterija.

§ 2. MODELI ALOSTERIJE I ALOSTERIJA KOD HEMOGLOBINA, ASPARTAT-TRANSKARBAMOILAZE I FOSFOFRUKTOKINAZE 1

2.1. Alosterička regulacija i kooperativnost

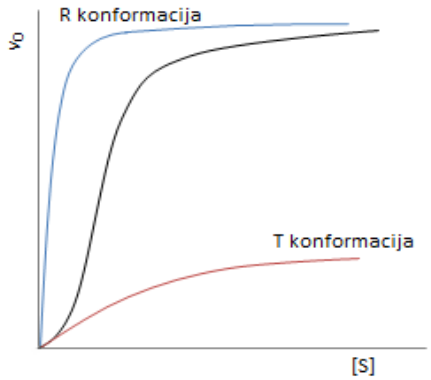
Kooperativnost je važno svojstvo alosteričkih proteina, a govori o utjecaju vezanja jednog liganda (alosteričkog modulatora) na vezanje drugog liganda, na različito mjesto na proteinu. Ukoliko je modulator jednaka molekula kao i ligand, on je homotropan modulator, a ako je različita molekula, tada je modulator heterotropan. Učinak modulatora može biti pozitivno i negativno kooperativan, ovisno o tome povećava li on ili smanjujeafinitet proteina za daljnjim vezanjem supstrata. Pregled nekih alosteričkih modulatora hemoglobina, aspartat-transkarbamoilaze i fosfofruktokinaze je dan u Tablici 2.1, a o njima će se detaljnije govoriti u kasnijim dijelovima rada.

Tablica 2.1.Neki alosterički modulatori hemoglobina (Hb), aspartat transkarbamoilaze (ATC-aza) i fosfofruktokinaze 1 (PFK1) (BPG, bisfosfoglicerat; IHP, imidazol-heksafosfat; PALA,*N*-(fosfonacetil)-aspartat; F2,6BP, fruktoza-2,6-bisfosfat; PEP; fosfoenolpiruvat).

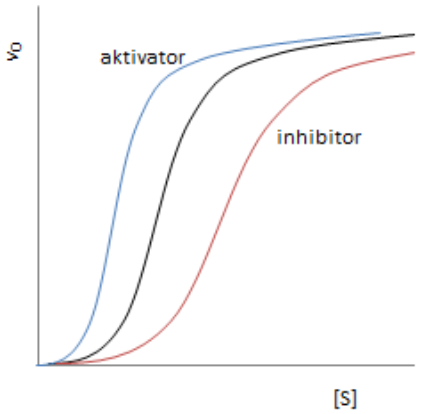
		Hb	ATC-aza	PFK1
homotropni modulatori		O_2	Karbamoil-fosfat, Asp	Fruktoza-6-fosfat
heterotropni modulatori	pozitivni	/	ATP, dATP	AMP, ADP, F2,6BP, cAMP
	negativni	BPG, IHP, CO_2, H^+,Cl^-	CTP, UTP, dCTP, dTTP, PALA	ATP, citrat, PEP

Kooperativno vezanje O_2 za Hb je uzeto kao model alosteričke regulacije vezanja supstrata na enzim. Posljedica kooperativnosti je sigmoidalna krivulja ovisnosti početne brzine reakcije (v_0) o koncentraciji supstrata ([S]). Alosterički proteini mogu postojati u više konformacija: konformaciji većeg afiniteta prema supstratu (R konformacija) i konformaciji manjeg afiniteta prema supstratu (T konformacija). Sigmoidalna krivulja se može predočiti kao zbroj dviju krivulja koje bi odgovarale kinetici Michaelis-Menten: one koja odgovara R konformaciji i

one koja odgovara T konformaciji, što je skicirano na Slici 2.1.1. Pozitivan alosterički modulator (u slučaju enzima - aktivator) stabilizira R konformaciju, dok negativni alosterički modulator (u slučaju enzima - inhibitor) stabilizira T konformaciju (Slika 2.1.2).



Slika 2.1.1. Sigmoidalna krivulja brzine vezanja supstrata na alosterički protein (crna krivulja). Pri niskim koncentracijama [S], krivulja vezanja supstrata na enzim slijedi krivulju za T stanje (crvena krivulja), a povećanjem koncentracije [S], krivulja počinje pratiti krivulju za R stanje (plava krivulja).



Slika 2.1.2. Utjecaj aktivatora i inhibitora na izgled sigmoidalne krivulje vezanja supsrata za alosterički enzim.

2.1.1. Hillova jednadžba

Hill je formirao jednadžbu koja empirijski opisuje vezanje kisika na Hb još 1913., kada nije bila određena kvaterna struktura i broj povezanih podjedinica. Općenit izraz za vezanje supstrata za enzim dan je u nastavku:

$$Y = \frac{[S]^n}{[S]^n + [S_{50}]^n},$$

gdje je *Y* frakcijsko zasićenje, to jest udio veznih mjesta enzima popunjenih supstratom, *n* je broj veznih mjesta, [S] je koncentracija supstrata, a $[S_{50}]$ je koncentracija supstrata kada je enzim poluzasićem supstratom (polovica veznih mjesta je popunjena).

U slučaju Hb kao [S] se uzima parcijalni tlak kisika ($p(O_2)$), a kao $[S_{50}]$ se uzima parcijalni tlak kisika kad je Hb poluzasićen kisikom (p_{50}) te analogna Hillova jednadžba glasi:

$$Y = \frac{p(O_2)^n}{p(O_2)^n + {p_{50}}^n}.$$

Jednostavnosti radi, koristi se linearizirani oblik:

$$\log\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = \log\left(\frac{p(O_2)^n}{{p_{50}}^n}\right) = n\log(p(O_2)) - n\log(p_{50}).$$

Dijagram linearne ovisnost log(*Y* / (1-*Y*)) o log(pO_2), nazvan Hillovim dijagramom, dobro opisuje vezanje kisika za hemoglobin samo u intervalu parcijalnih tlakova kisika od 1333 Pa do 13332 Pa. Pritom *n* (Hillov koeficijent) daje opis kooperativnosti: $n > 1$ ukazuje na pozitivnu kooperativnost (za ljudski hemoglobin *n*iznosi između 2,8 i 3,0), $n = 1$ na nekooperativnost, kad je enzim ligandima stabiliziran u T ili R konformaciji, a $n < 1$ na negativnu kooperativnost. U grafu ovisnosti *Y* o $p(O_2)$, za vrijednosti $n > 1$ krivulja je sigmoidalna, a za $n = 1$ je hiperbolna.

2.1.2. Adairova jednadžba

Adairova jednadžba (A.Adair, 1924.) pruža općenit opis vezanja liganda za protein, no za razliku od Hillove jednadžbe uzima u obzir i oblike proteina kod kojih su vezna mjesta djelomično popunjena. Za četiri vezna mjesta(za hemoglobin) ima oblik:[2]

$$Y = \frac{\frac{[S]}{k_1} + \frac{3[S]^2}{k_1 k_2} + \frac{3[S]^3}{k_1 k_2 k_3} + \frac{[S]^4}{k_1 k_2 k_3 k_4}}{1 + \frac{4[S]}{k_1} + \frac{6[S]^2}{k_1 k_2} + \frac{4[S]^3}{k_1 k_2 k_3} + \frac{[S]^4}{k_1 k_2 k_3 k_4}}.$$

Y je frakcijsko zasićenje, [S] je koncentracija supstrata, k_i je mikroskopska konstanta disocijacije, tj. konstanta disocijacije za pojedino vezno mjesto:

$$k_i = \frac{(n-i+1)[\mathrm{ES}_{i-1}][\mathrm{S}]}{i[\mathrm{ES}_i]} = \left(\frac{n-i+1}{i}\right) K_i.$$

K_i je makroskopska konstanta vezanja i-tog liganda za protein, *n* je broj veznih mjesta na proteinu, $[ES_i]$ je koncentracija kompleksa enzim-supstrat).

Adairova jednadžba matematički pruža dobar opis vezanja liganada za protein, no ne objašnjava kako se i zašto ligand u pojedinim koracima veže uz različite vrijednosti k_i, s različitim afinitetom.

2.1.3. Usklađeni (MWC, po Monodu, Wymanu i Changeuxu) model alosterije

U usklađenom modelu svaka podjedinica se može nalaziti u barem dva konformacijska stanja (R i T) različitog afiniteta vezanja liganda koja su u ravnoteži bez obzira na to koliko je veznih mjesta popunjeno. Ravnoteža između konformacijskih stanja mijenja se vezanjem liganda i sve su podjedinice u istoj konformaciji. Ligand se može vezati za podjedinicu u bilo kojem stanju, a afinitet vezanja ovisi jedino o konformacijskoj promjeni. Nakon konformacijske promjene, simetrija proteina ostaje očuvana.

Usklađeni model opisuje i homotropne i heterotropne interakcije. Jednadžba koja opisuje homotropne interakcije glasi:

$$Y = \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1} + Lc\alpha(1+c\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n + L(1+c\alpha)^n},$$

gdje je *n* broj podjedinica proteina, $L=[T_0]/[R_0]$ je ravnotežna konstanta disocijacije između T i R stanja u odsutnosti liganda, $\alpha=[S]/k_R$ je normalizirana koncentracija liganda, $c=k_R/k_T$, pri čemu su k_R i k_T mikroskopske konstante disocijacije liganda iz kompleksa s proteinom u R stanju, odnosno T stanju, a*c* označava afinitet pojedinog stanja za vezanjem liganda. Za niske vrijednosti *L* očekuje se više R stanja nego za više vrijednosti *L* pri jednakoj *α*. Ukoliko se ligand veže samo na R stanje ($c = 0$) može se očekivati veća kooperativnost vezanja liganda što je više T stanja u odnosu na R. Također, za visoke vrijednosti *L*, konformacija se mora promijeniti u R da bi se da bi se vezao ligand i, time što sve podjedinice tada moraju

promijeniti stanje iz T u R, omogućio vezanje ostalih liganada.Za slučaj da je *L* velika i ligand se može vezati i za protein u T stanju (no s manjim afinitetom nego za R stanje), ako je koncentracija liganda velika, vezat će se za T stanje. Nasuprot tome, ako je njegova koncentracija mala, vezat će se ipak za R stanje, što će stabilizirati R stanje i činiti ga učestalijim i dolazit će do povećanja kooperativnosti.

Usklađeni model za heterotropne interakcije pretpostavlja postojanje triju različitih tipova liganada koji se vežu na različita mjesta na proteinu s različitim afinitetima za pojedina konformacijska stanja:

- supstrat (S) – veže se samo na R stanje;
- aktivator (A) – veže se samo na R stanje;
- inhibitor (I) – veže se samo na T stanje.

Jednadžba koja opisuje usklađeni model za heterotropne interakcije glasi:

$$Y = \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n + \frac{L(1+\beta)^n}{(1+\gamma)^n}},$$

uz α= [S]/k_R, β = [I]/k_T i γ= [A]/k_R. Vezanje aktivatora za protein olakšava vezanje supstrata jer održava veći udio proteina u R stanju, ali smanjuje kooperativnost (pozitivni heterotropni učinak). Vezanje inhibitora otežava vezanje supstrata jer se T stanje teže prevodi u R stanje, čime se povećava kooperativnost (negativni heterotropni učinak).

2.1.4. Sekvencijalni (KNF, po Koshlandu, Némethyju i Filmeru) model alosterije – model induciranog pristajanja

Za razliku od usklađenog modela, sekvencijalni model ne zahtjeva očuvanost simetrije nakon konformacijske promjene , kao ni to da se ligand i vezno mjesto vežu po principu ključ-brava. Sekvencijalni model podrazumijeva da vezanje liganda za jednu podjedinicu inducira konformacijsku promjenu susjedne podjedicine tako da joj se poveća afinitet za vezanjem liganda. Ovaj model stoga zahtjeva postojanje prijelaznih konformacija između T i R stanja. Sekvencijalni model daje dobar opis Adairove jednadžbe jer oblik jednadžbe također ovisi o broju popunjenih podjedinica i objašnjava postojanje više različitih mikroskopskih konstanti disocijacije.

U sekvencijalnom modelu afinitet za vezanjem liganda na protein ovisi o broju vezanih liganada, a u usklađenom modelu o cjelokupnoj konformaciji, tj. kvaternoj strukturi. Većina

alosteričkih proteina ima karakteristike i usklađenog i sekvencijalnog modela. Koji model je bolji za opis kojeg proteina ovisi o jačini i vrsti interakcija između podjedinica i kompaktnosti pakiranja podjedinica.

2.2. Hemoglobin

Hemoglobin je protein sadržan u crvenim krvnim stanicama koji, zahvaljujući svojim alosteričkim svojstvima, ima ulogu u brojnim procesima: prenosi kisik iz pluća (škrga ili kože) u tkiva, pridonosi regulaciji pH te prijenosu ugljikova dioksida u pluća, kojima se izlučuje iz organizma. Razvojem složenijih organizama se morao razviti takav učinkovit prenositelj kisika jer je topljivost kisika u krvnoj plazmi preniska, a brzina difuzije kisika kroz tkiva deblja od 1 mm premala da bi se prenijelo dovoljno kisika za potrebe metaboličkih puteva takvih organizama.

2.2.1. Građa hemoglobina

Hemoglobin je tetramer, sastavljen je od 2α i 2β podjedinice. Svaku podjedinicu čini jedan polipeptidni lanac (globinski dio), na kojeg je nekovalentno vezana prostetička skupina hem. Svaki polipeptidni lanac je strukturiran u 8 α-zavojnica (označavaju se slovima engleske abecede od A do H redom od N-terminalnog kraja prema C-terminalnom kraju, a pojedina aminokiselina svakog lanca se označava slovom zavojnice u kojoj je i brojem, ovisno o tome koja je po redu u zavojnici ili brojem koja je ukupno u polipeptidnom lancu, brojeći od N-terminalnog kraja). Hem čini protoporfirin IX s vezanim atomom željeza u sredini. Protoporfirin IX sadrži četiri pirolna prstena, povezana metilenskim mostovima, na kojima su ukupno četiri metilna, dva propionatna i dva vinilna supstituenta. Dušikovi atomi protoporfirinskog prstena zauzimaju četiri oktaedarska koordinacijska mjesta vezanog željeza. Na peto koordinacijskomjesto vezan je bočni ogranak proksimalnog His, a na šesto koordinacijsko mjesto, nasuprotno od bočnog ogranka His veže se molekula kisika. Na šesto koordinacijsko mjesto željeza se može vezati molekula CO, NO, CN^- ili H_2S s većim afinitetom nego kisik i zbog tog svojstva kompetiranja kisiku su navedene molekule otrovne. Željezo veže kisik samo u oksidacijskom stanju (II). Globinski dio hemoglobina omogućuje reverzibilno vezanje kisika. Bez globinskog dijela bi se željezo (II) oksidiralo u prisutnosti kisika.

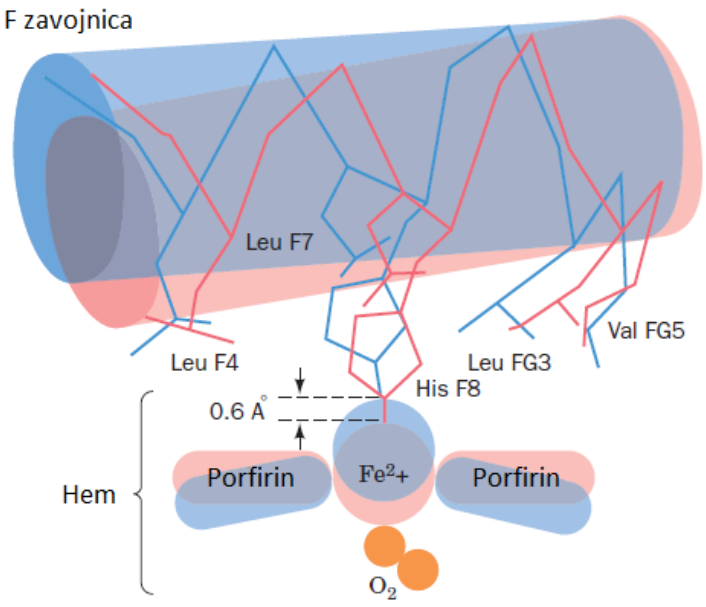
Interakcije između podjedinica α_1 i β_1 te α_2 i β_2 ostvaruju se preko 30 bočnih ogranaka i jače su od onih između α_1 i β_2 te α_2 i β_1 koje se ostvaruju preko 19 bočnih ogranaka. Te interakcije su hidrofobne, dok su interakcije između α_1 i α_2 te β_1 i β_2 polarnog karaktera.

Vezanje kisika za hemoglobin (oksigenacija) dovodi do promjene kvaterne strukture , no simetrija tetramera ostaje sačuvana (pseudo-D_2, modulirani tetraedar). Oksigenacijom konformacija deoksihemoglobina (T stanje) prelazi u konformaciju oksihemoglobina (R stanje).

2.2.2. Konformacijske promjene – Perutzov mehanizam

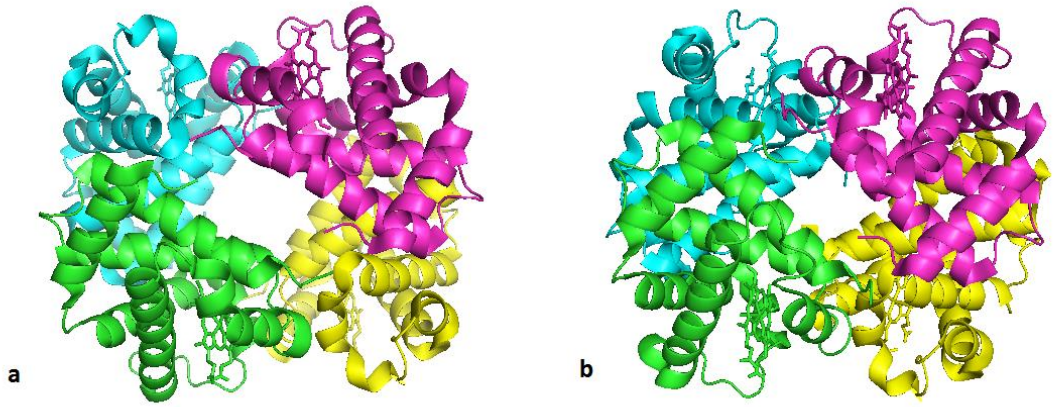
Na osnovi rentgenske kristalne strukturne analize i slika T i R stanja, Perutz je predložio da je promjena iz T stanja u R uvjetovana promjenom položaja bočnih ogranaka aminokiselina koje okružuju hem.

Željezo u hemu, u T stanju je pomaknuto za 0,6 Å iz ravnine porfirinskog prstena prema proksimalnom HisF8 (i F zavojnici) te su veze Fe-$N_{porfirin}$ preduge da bi željezo bilo u ravnini porfirisnkog prstena. Promjena hemskog elektronskog stanja vezanjem kisika i potreba za uklanjanjem steričkih smetnji porfirina pri koordiniranju molekule kisika dovodi do skraćivanja veza Fe-$N_{porfirin}$ i ulaska atoma željeza u ravninu porfirinskog prstena (Slika 2.2.2.1.). Željezo svojim pomicanjem pomiče i reorijentira proksimalni His F8 koji za sobom pomiče ostatak F zavojnice. Reorijentacija proksimalnog His F8 je važna jer bi se inače njegov bočni ogranak sudario s porfirinskim prstenom.



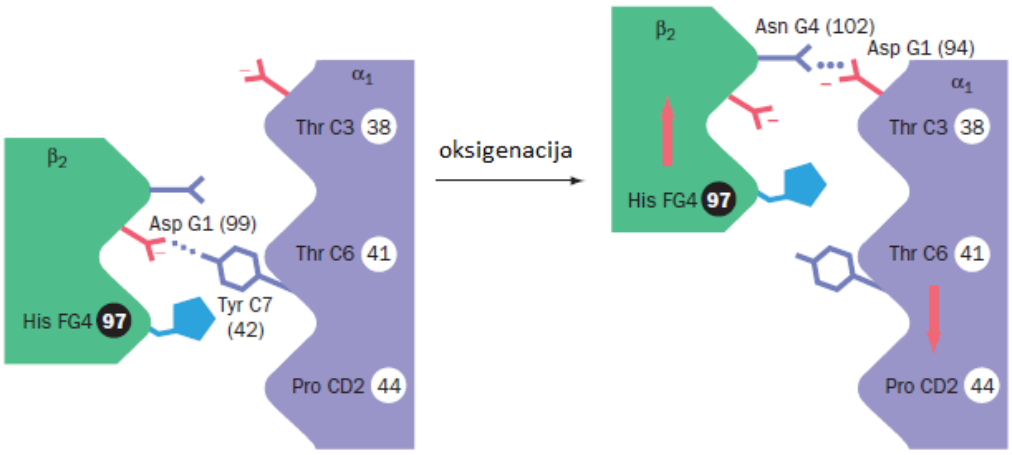
Slika 2.2.2.1. Pomak iona željeza u ravninu hema kad se na željezo veže molekula kisika je prema Perutzu uzrok za prijelaz iz T stanja (plavo) hemoglobina u R stanje (crveno). Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema: D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry,* 4.izdanje, John Wiley & Sons, Inc., 2011, str.336.

C-terminalni kraj pomaknutog lanca leži na sučelju dvaju αβ dimera te je time konformacijska promjena prenesena s jedne podjedinice na ostale. To dovodi do promjene kvaterne strukture pri prijelazu T stanja u R stanje(Slika 2.2.2.2.). Pošto su α_1 i β_1 te α_2 i β_2 podjedinice jače međusobno povezane od α_1 i β_2 te α_2 i β_1, pomak F zavojnice je moguć samo uz rotaciju dimera $\alpha_1\beta_1$ za 15° u odnosu na dimer $\alpha_2\beta_2$ i međusobno približavanje β podjedinica. Promjena sučelja između dva αβ dimera posredno dovodi do povećanja afiniteta hemoglobina za vezanjem ostalih molekula kisika.



Slika 2.2.2.2. Strukture hemoglobina u (a) T stanju i (b) R stanju. Podjedinice su obojane različitim bojama te je vidljivo međusobno približavanje podjedinica, šupljina u središtu je manja kod R stanja. U izradi slike korišten je PyMOL i pdb kodovi 1HGA za T stanje i 1BBB za R stanje.

U T stanju His FG4β_2 je u „džepu“ između Pro CD2α_1 i Thr C6α_1 dok u R stanju isti His FG4β_2 upada u „džep“ između Thr C6α_1 i Thr C3α_1(Slika 2.2.2.3.). Analogna promjena se događa s bočnim ograncima α_2 i β_1 podjedinica. Bočni ogranci su samo u ta dva stanja dodatno stabilizirani vodikovim vezama, stoga su dozvoljene samo dvije stabilne konformacije hemoglobina: T i R. Na prijelaz T stanja u R stanje utječe Val E11 β podjedinica koji priječi put kisiku da se veže za željezo. Time uzrokuje steričko odbijanje između hema i molekule kisika i naprezanje koje potpomaže preskoku konformacije molekule iz T u R stanje. Postojanje samo dvije stabilne konformacije je u skladu s MWC modelom alosterije.



Slika 2.2.2.3. Prikaz sučelja β_2 i α_1 podjedinice (a) T stanja, na mjestu ostvarivanja vodikove veze Tyr C7α_1 s Asp G1β_2 i (b) R stanja, na mjestuostvarivanja vodikove veze Asp G1α_1 s Ans G4β_2. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema:Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, 4.izdanje, John Wiley & Sons, Inc., 2011, str. 337.

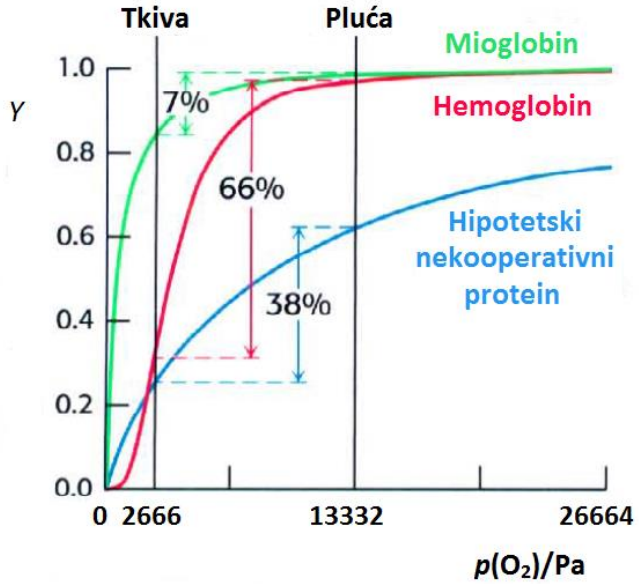
Oba stanja su energetski stabilnija oksigenirana, no T stanje je tada manje stabilno od R. Ukoliko kisik nije vezan, stabilnije je T stanje. Perutz je izračunao $\Delta G(T \rightarrow R) = 3.5$ kcal po podjedinici. U odsutnosti kisika, T stanje je stabilnije jer su C-terminalni krajevi stabilizirani ionskim mostovima koji se javljaju i između i unutar podjedinica. Energija stvaranja Fe-O_2 veze doprinosi pucanju ionskih mostova i destabilizaciji T stanja. Uklanjanje jednog ili svih C-terminalnih krajeva (Arg 141α i His 146β) smanjuje stabilnost T stanja zbog nemogućnosti nastajanja ionskih mostova.

2.2.3. Biološka važnost kooperativnosti

Na hemoglobin se kisik veže pozitivno kooperativno. Kako vezanje jedne molekule kisika povećava afinitet hemoglobina za vezanjem ostale tri molekula kisika, tako i otpuštanje jedne molekule kisika s hemoglobina zasićenog kisikom olakšava otpuštanje ostalih molekula kisika. Način vezanja kisika za hemoglobin može se prikazati dijagramom na čijoj je osi frakcijsko zasićenje hemoglobina kisikom (Y), a na apscisi parcijalni tlak kisika ($p(O_2)$). Krivulja te ovisnosti je sigmoidalna i odnosi se na hemoglobin u eritrocitima, gdje postoje ostali alosterički modulatori poput 2,3-bisfosfoglicerata.

Biološka važnost kooperativnog vezanja kisika za hemoglobin je ta da hemoglobin prenese kisik iz tkiva gdje je $p(O_2)$ visok (u plućima je ~13332 Pa), tj. gdje je kisikom

zasićeno 98% hemoglobina, u tkiva gdje je $p(O_2)$ nizak (~2666 Pa) i kisikom je zasićeno 32% hemoglobina, a gdje je kisik potreban za odvijanje metaboličkih puteva (Slika 2.2.3.).



Slika 2.2.3. Kisik se različito prenosi hemoglobinom i mioglobinom. Hemoglobin prenosi kisik kooperativno, pri čemu 66% veznih mjesta sudjeluje u prijenosu kisika između pluća i ostalih tkiva. Za razliku od hemoglobina, mioglobin prečvrsto veže kisik i samo 7% veznih mjesta prenosi kisik u prikazanom rasponu pa je on loš prenositelj kisika. Umjesto hemoglobina se mogao razviti i hipotetski, nekooperativni protein s hiperboličnom krivuljom zasićenja kao kod mioglobina, koji bi prenosio kisik učinkovitije nego mioglobin, ali još uvjek manje učinkovito nego kooperativni hemoglobin (imao bi 38% veznih mjesta koja prenose kisik između pluća i ostalih tkiva).[4] Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema: J.M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, 6. izdanje, W. H Freeman and Company, New York, 2007.

Zanimljivost

Tjelesna aktivnost utječe na prijenos kisika. Pri odmoru $p(O_2)$ u tkivima je 5333 Pa (Y = 77%), nakon tjelovježbe je $p(O_2)$ jednak 2666 Pa (Y = 32%), a u mišićima može biti i < 2666 Pa, što omogućuje veće korištenje kooperativnog svojstva hemoglobina kao prenositelja kisika pri vježbanju u uvjetima kad je mišićima potrebno više kisika za aeroban rad. Dio između 2666 Pa i 5333 Pa odgovara najstrmijem dijelu krivulje vezanja kisika i razlici frakcijskog zasićenja od čak 45%.

Mutagenezom proksimalnog histidina u glicin i zatim umetanjem imidazola na mjesto imidazolnog bočnog ogranka proksimalnog His, postiže se uklanjanje kovalentne veze s F zavojnicom. Vezanje kisika je i dalje moguće, no glavnina kooperativnosti se gubi, kao i sposobnost konformacijske promjene iz T stanja u R stanje.

2.2.4. H^+, CO_2 i Cl^- kao alosterički modulatori

Hemoglobin igra važu ulogu u prijenosu ugljikova dioksida u krvi. Kad hemoglobin veže kisik pri fiziološkom pH, hemoglobin podliježe ranije opisanoj konformacijskoj promjeni. Vezanjem kisika otpuste se protoni s hemoglobina (ravnoteža 1):

$$HHb(O_2)_n + O_2 \rightleftharpoons Hb(O_2)_{n+1} + xH^+,$$

gdje je x približno jednak 0,6, a n ima vrijednost 0, 1, 2 ili 3, ovisno koliko je molekula kisika vezano. U T stanju, proton se veže na bočni ogranak His HC3 te takav protonirani His stvara ionski most s Asp FG1 stabilizirajući T stanje. Povećanje pH, tj. uklanjanje protona iz ravnoteže 1, pospješuje vezanje kisika za hemoglobin. Ugljikov dioksid nastao u procesu staničnog disanja većinom se preko krvi odvodi u pluća u obliku hidrogenkarbonata (ravnoteža 2):

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-.$$

Enzim ugljična anhidraza koji katalizira gornju reakciju je jako zastupljen u crvenim krvnim stanicama pa ondje dolazi do stvaranja više protona. U kapilarama, gdje je niži $p(O_2)$, hemoglobin veže protone nastale u ravnoteži 2. Time se potiče otpuštanje kisika, ali i ravnoteža 2 pomiče ka stvaranju hidrogenkarbonata i uklanjanju ugljičnog dioksida nastalog u tkivima. Obrnuto se događa u plućima, gdje je $p(O_2)$ visok. Kisik se veže za hemoglobin pri čemu se otpuštaju protoni koji utječu na prevođenje hidrogenkarbonata u ugljikov dioksid. Navedene ravnoteže su usklađene, tako da je promjena fiziološkog pH nezamjetna. Prethodno opisani proces koji obuhvaća obje ravnoteže nazvan je Bohrovim efektom.

Ugljični dioksid se jednim dijelom veže za N-terminalne krajeve i prenosi hemoglobinom i u obliku karbamata:

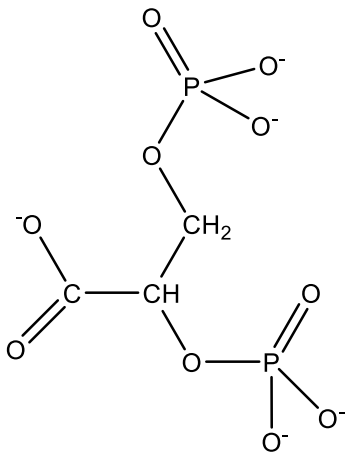
$$R\text{-}NH_2 + CO_2 \rightleftharpoons R\text{-}NH\text{-}COO^- + H^+.$$

Deoksihemoglobin veže za sebe više ugljikovog dioksida kao karbamat nego oksihemoglobin. Negativno nabijeni karbamat stabilizira ionskim interakcijama pozitivno nabijene terminalne amino-skupine koje leže između dvaju αβ dimera. Time se stabilizira T stanje i nastali proton potiče otpuštanje kisika prema ravnoteži 1.

Kloridni ioni su također modulatori afiniteta hemoglobina za vezanjem kisika tako što ionskim mostovima stabiliziraju T stanje. Nastali hidrogenkarbonatni ion (ravnoteža 2) slobodno difundira iz eritrocita u krvnu plazmu. Kad hidrogenkarbonatni ion napusti eritrocit, zamjenjuje ga kloridni ion koji difundira u eritrocit da bi se održala električka neutralnost na obje strane membrane eritrocita. Kloridni ioni u ionskim mostovima povezuju pozitivno nabijenu amino skupinu N-terminalnog kraja α_2 podjedinice s pozitivno nabijenom bočnim ogrankom arginina na C-terminalnom kraju α_1 podjedinice. Oni utječu na to da navedene skupine α_1 i α_2 podjedinica čvršće vežu protone, čime se p*K*, uobičajene vrijednosti za amino skupine N-terminalnih krajeva 8,0, povećava. Time se Bohrov efekt smanjuje. Na njegovo smanjenje također utječe porast p*K* vrijednosti imidazolne skupine (sa 7,1 na 8,0) bočnog ogranka His 146β, koja stvara ionski most s karboksilnom skupinom bočnog ogranka Asp 94β, kao i interakcije nekih bočnih ogranaka histidina kojima se mijenja okolina prijelazom R stanja u T.

2.2.5. Utjecaj 2,3-bisfosfoglicerata (BPG) na vezanje kisika

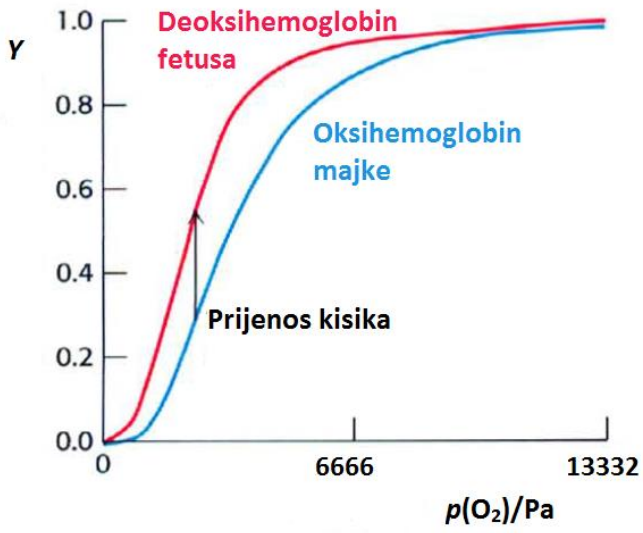
BPG također smanjuje afinitet hemoglobina za kisikom tako da se veže za T stanje i stabilizira ga ionskim mostovima i vodikovim vezama. Imidazol-heksafosfat (IHP) kod ptica ima istu ulogu kao i BPG kod ostalih životinja i ljudi.



Slika 2.2.5.1. Struktura BPG

BPG se smješta u središnju šupljinu deoksihemoglobina te je njegov ukupni naboj 5- stabiliziran s osam pozitivno nabijenih skupina: bočnim ograncima po dva Lys EF6, His H21, His NA2 i amino skupinama N-terminalnih krajeva oba β lanca. Pošto se β podjedinice približavaju prijelazom u R stanje, BPG tada ima nedovoljno mjesta i ne može se vezati.

Fetalni hemoglobinje za razliku od adultnog hemoglobina sastavljen od αγ dimera. γ lanac dijeli 72% identičnih aminokiselina s β lancem, no bitna razlika je zamjena His 143β nenabijenim serinom u γ lancu. Time se smanjuje broj interakcija hemoglobina s BPG, što ima za posljedicu smanjen afinitet fetalnog hemoglobina za BPG u odnosu na adultni hemoglobin. Fetalni hemoglobin ima veći afinitet prema kisiku od adultnog, premda su koncentracije BPG u krvi fetusa i majke jednake pa se pri istom $p(O_2)$ kisik prenosi s oksihemoglobina majke na deoksihemoglobin fetusa (Slika 2.2.5.2.).

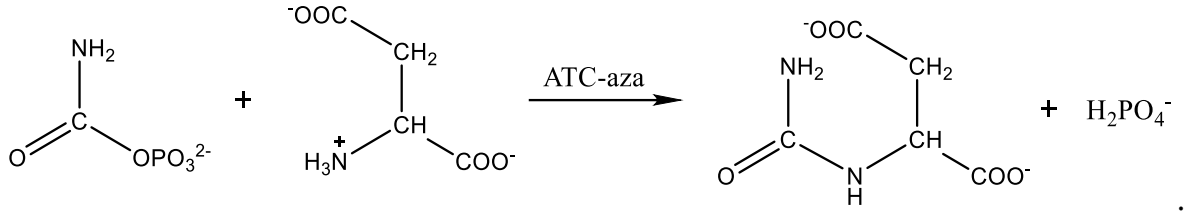


Slika 2.2.5.2. Krivulja frakcijskog zasićenja fetalnog hemoglobina je pomaknuta u lijevo od one za adultni hemoglobin. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema:M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, 6. izdanje, W. H Freeman and Company, New York, 2007.

BPG utječe i na visinsku prilagodbu. Visinska prilagodba uključuje povećanu količinu hemoglobina po eritrocitu i povećanje broja eritrocita boravkom na višim nadmorskim visinama. Uzrok tome je povećanje koncentracije BPG na višim nadmorskim visinama uz povećanje tlaka krvi pri kojem je hemoglobin poluzasićen kisikom (p_{50}) Krivulja zasićenja je tada pomaknuta u desno. Povećanje p_{50} odgovara smanjenju afiniteta za vezanjem kisika, tj. povećava se količina kisika koju hemoglobin otpušta u kapilarama.

2.3. Aspartat-transkarbamoilaza

Aspartat-transkarbamoilaza (ATC-aza) je enzim koji katalizira početni korak biosinteze pirimidina kod bakterije *Escherichia coli*, stvaranje *N*-karbamoilaspartata (CA) iz karbamoil-fosfata (CP) i aspartata (Asp):



ATC-aza pokazuje pozitivno kooperativno vezanje CA i Asp.

2.3.1. Regulacija količine pirimidina i purina u stanici

Konačni produkt, nakon šest reakcijskih koraka, je citidin-trifosfat (CTP), koji je inhibitor ATC-aze, što je primjer inhibicije povratnom spregom. Postoji li u stanici višak CTP jer se ne stigne upotrijebiti toliko brzo koliko se stvara, CTP će se vezati na ATC-azu i inhibirati daljnju proizvodnju CTP. Ako u stanici postoji potreba za CTP, CTP vezan na ACT-azu će se otpustiti da zadovolji potrebe stanice i neinhibirana ATC-aza će nastaviti katalizirati reakciju stvaranja N-karbamoil aspartata. Pošto biosinteza purina i pirimidina treba biti usklađena, koncentracije CTP i ATP u stanici trebaju odgovarati tome. Koncentracija ATP je veća od koncentracije CTP jer ATP sudjeluje i u mnogim drugim metaboličkim putevima. Ukoliko ima puno više ATP-a, on djeluje kao aktivator ATC-aze koja tada omogućava veću proizvodnju CTP dok se ne koncentracije CTP i ATP ne usklade.

2.3.2. Građa ATC-aze

ATC-aza iz *E. coli* je dodekamer, sastavljena je od 6 katalitičkih (c) i 6 regulatornih (r) podjedinica. Katalitičke podjedinice su raspoređene u 2 seta trimera (c_3), a regulatorne u 3 seta dimera (r_2). Regulatorni dimer spaja po dvije katalitičke podjedinice različitih trimera. Simetrija enzima je pritom D_3.

Pošto je CTP strukturno dosta različit i od supstrata i od produkata katalizirane reakcije, veže se na zasebno mjesto na ATC-azi. Alosterička (regulatorna) mjesta i aktivna (katalitička) mjesta nalaze na zasebnim polipeptidnim lancima (podjedinicama). Regulatorna podjedinica (jedan polipeptidni lanac) je sastavljena od dvije domene. Domena kojom je regulatorna

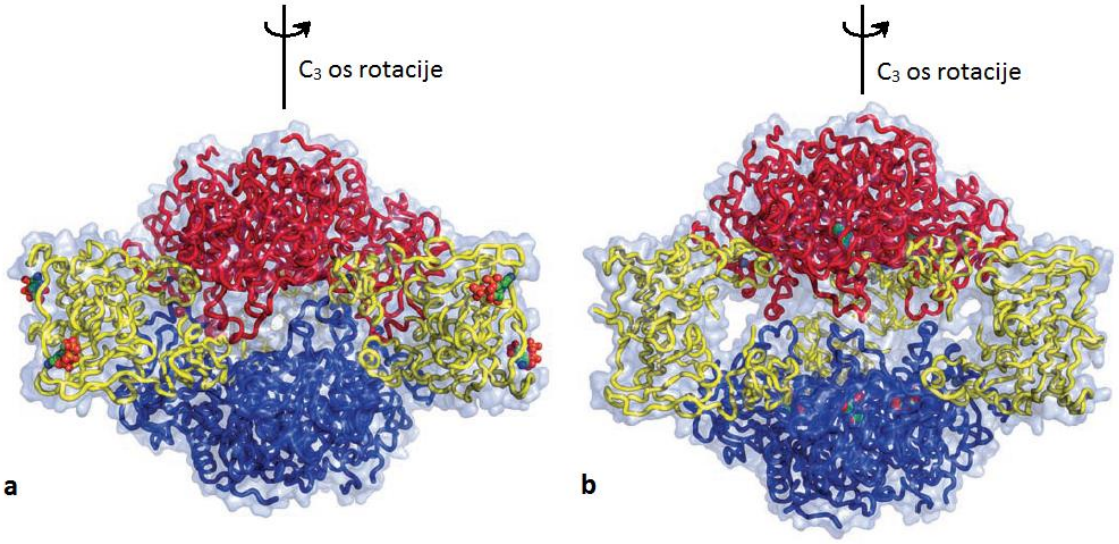
podjedinica u kontaktu s c podjedinicom sadrži ion cinka vezan bočnim ograncima cisteina. Druga domena, koja nije u kontaktu s katalitičkom podjedinicom, sadrži alosteričko mjesto na koje se vežu CTP i ATP. Katalitička podjedinica se također sastoji od dvije domene: domene koja veže karbamoil fosfat i one koja veže Asp. Ta vezna mjesta čine aktivno mjesto. Svaki katalitički trimer ima dakle po 3 aktivna mjesta.

Katalitička i regulatorna komponenta se mogu izdvojiti i promatrati zasebno. To su učinili J. Gerhart i H. Schachman. Dodatkom *p*-hidroksimerkuribenzoata (ili *p*-kloromerkuribenzoata)[5] dolazi do reakcije sa sulfhidrilnim skupinama bočnih ogranaka cisteina ATC-aze. Ta modifikacija dovodi do razdvajanja katalitičkih trimera od regulacijskih dimera. Dimeri i trimeri se razlikuju nabojem i veličinom pa se mogu lako razdvojiti kromatografijom na ionskom izmjenjivaču, odnosno ultracentrifugiranjem u gradijentu saharoze. Da bi se dobile čiste regulacijske podjedinice za daljnja istraživanja, vezani *p*-hidroksimerkuribenzoat se odstrani dodatkom merkaptoetanola u suvišku. Pomješane podjedinice brzo rekonstruiraju holoenzim. Izdvojeni katalitički trimer zadržava enzimsku aktivnost, ali gubi kooperativnost i na njega ne utječu alosterički regulatori ATP i CTP. Zasebni regulatorni dimer je lišen enzimske aktivnosti, no veže ATP i CTP, stoga se može zaključiti da su upravo regulatorne podjedinice zaslužne za alosterička svojstva ATC-aze.

2.3.3. Mehanizam konformacijske promjene pri katalizi

Interakcije koje stabiliziraju R i T konformaciju ATC-aze, a mijenjaju se se promjenom konformacije su vodikove veze. Na slici 2.3.3.a je prikaz T stanja, u sredini ATC-aze vidljive su dvije omče sačinjane od slijeda aminokiselina od 230. do 250., od kojih svaka pripada jednoj podjedinici različitih katalitičkih trimera. Taj dio podliježe najvećim promjenama pri promjeni konformacije. U T konformaciji te su omče jedna do druge i svaka čini po dvije vodikove veze s nasuprotno postavljenom katalitičkom podjedinicom (omča c1 sa c4, c2 sa c5, c3 sa c6, c4 sa c1, c5 sa c2 i c6 sa c3) različitog trimera i po jednu vodikovu vezu unutar same petlje. Vezanje najprije CP pa Asp na njihova vezna mjesta uzrokuje pucanje gore navedenih vodikovih veza. Tada dolazi do odmicanja nasuprotno postavljenih podjedinica (monomera) i njihove rotacije da bi došlo do prijelaza u R konformaciju (Slika 2.3.3.b) i stvaraju se nove stabilizirajuće vodikove veze unutar pojedinih petlji. R stanje je katalitički aktivno. Domene s vezanima CP i Asp se približe da bi omogućile njihovu reakciju i stvaranje CA. Karbonilna skupina bočnog ogranka Glu 239 je akceptor prethodno navedenih vodikovih

veza između podjedinica T stanja i onih unutar podjedinica R stanja. Prevede li se Glu 239 u Gln, te vodikove veze iščezavaju kao i homotropni i heterotropni učinci te je kvaterna struktura između T stanja i R stanja.[2]



Slika 2.3.3. (a) T stanje ATC-aze stabilizirano vezanim CTP i (b) R stanje u kompleksu s PALA. Regulatorni dimeri (žuto) spajaju gornji katalitički trimer (crveno) s donjim katalitičkim trimerom (plavo). Rotacija katalitičkih dimera uzrokuje odmicanje katalitičkih trimera duž C_3 osi. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema: D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, 4.izdanje, John Wiley & Sons, Inc., 2011.

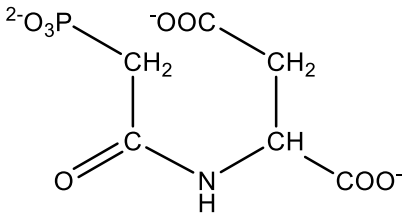
Katalitičko mjesto ATC-aze može biti različite veličine, ovisno o tome je li za njega vezan ligand ili je prazno, te o vrsti vezanog liganda. U T stanju to je mjesto prazno, a dok je CP vezan, šupljina aktivnog mjesta se smanjuje. Ukoliko je za njega vezan N-(fosfonacetil)-L-aspartat (PALA; poglavlje 2.3.4.) ili CP i sukcinat (zbog sličnosti s Asp), šupljina se jos više smanjuje. Kompleks ATC-aze i PALA je stabilan, jer je inače za oslobađanje nastalog CA potrebna energija, koja se dobiva razlaganjem tetraedarskog međuprodukta reakcije CP i Asp na CA i ortofosfat.

Vezanje modulatora ATP i CTP za regulatorno mjesto uključuje ionske i nepolarne interakcije. Većina bočnih ogranaka regulatornog mjesta je uključena u vezanje i ATP i CTP. Okosnice Ile 12, Tyr 89 i bočni ogranci Asp 19, Lys 60 i Lys 94 tvore ionske interakcije s nukleotidom, dok Ala 11, Val 17 i Ile 86 tvore nepolarne interakcije. Vezanjem nukleotida, regulatorno mjesto se proširuje oko nukleozidnog, a suzuje oko fosfatnog dijela. Ta promjena

se manifestira u promjeni na sučelju regulatornih podjedinica i širi se na sučelje r i c podjedinice da bi došlo do promjene u kvaternoj strukturi.

2.3.4. N-(fosfonacetil)-L-aspartat (PALA)

Pomiješa li se Asp s kompleksom ATC-aze i CP, promjena iz stanja T u R se događa vrlo brzo (50 ms pri 4 °C). Tada je cijeli kompleks u R stanju, gdje ostaje dok se ne formira produkt. Otpuštanjem produkta se konformacija mijenja u T, također brzo (oko 1,5 s). Struktura ATC-aze je zato riješena rendgenskom strukturnom analizom u prisutnosti inhibitora koji stabiliziraju pojedino stanje. PALA (Slika 2.3.4.) stabilizira R stanje.



Slika 2.3.4. Kompetitivni inhibitor ATC-aze, *N*-(fosfonacetil)-aspartat (PALA).

Vezanje PALA uzrokuje udaljavanje katalitičkih trimera za 12Å i njihovu rotaciju za oko 10° oko osi C_3. Pritom se regulatorni dimeri zarotiraju za oko 15° oko osi C_2.

Pri niskim koncentracijama Asp i kad je ATC-aza zasićena karbamoil-fosfatom, mala koncentracija PALA je aktivator ATC-aze, no pri povećanim koncentracijama Asp ili PALA, PALA je inhibitor. To objašnjava MWC model. Mala koncentracija PALA stabilizira R stanje vezanjem na manj broj katalitičkih mjesta pa ne smeta vezanju Asp na ostala katalitička mjesta. Ukoliko je prisutno više PALA, sva aktivna mjesta se popunjavaju i ATC-aza postaje inaktivna.

2.3.5. Alosterički modulatori ATP, CTP i UTP

Inhibitor CTP i aktivator ATP vežu se na regulatorno mjesto. CTP stabilizira i veže se preferirano na T stanje, a ATP stabilizira i veže se preferirano na R stanje. Vezanja CTP i ATP na manje preferirano stanje ne mogu dovesti do potpune promjene konformacije u preferirano stanje. Veže li se CTP na R stanje, reorijentiraju se bočni ogranci u regulatornom mjestu koji uzrokuju skraćivanje regulatornog dimera. To dovodi do promjene interakcija

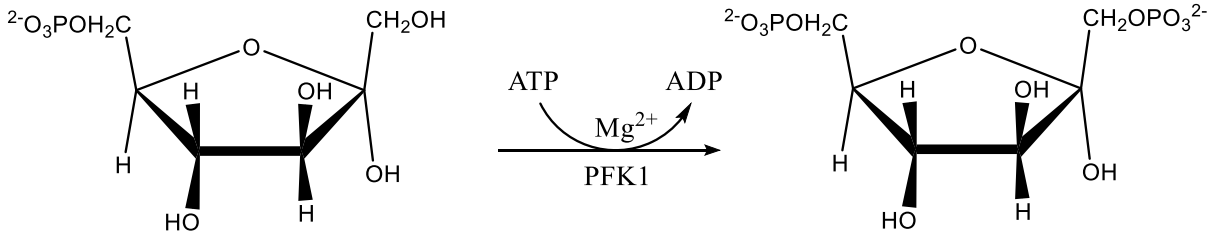
bočnih ogranaka u sučelju r i c podjedinica i približavanja katalitičkih trimera za 0,5 Å. Tada se reorijentiraju i bočni ogranci aktivnog mjesta što smanjuje katalitičku aktivnost enzima. ATP ima suprotan učinak veže li se na T stanje i u konačnici uzrokuje udaljavanje katalitičkih trimera za 0,4 Å i povećava katalitičku aktivnost ATC-aze. Doda li se ATP kompleksu ATC-aze i CTP, učinak inhibicije se gubi i vraća se aktivnost enzima.

Zamijeni li se Ala 241 obje katalitičke podjedinice (npr. c1 i c4) cisteinom, moguće je stvaranje disulfidnih mostova koji fiksiraju R konformaciju. Uklone li se katalitičke podjedinice *p*-hidroksimerkuribenzoatom, preostanu kovalentno vezani katalitički trimeri. Takav c_6 heksamer sadržava homotropnu kooperativnost vezanja supstrata, no neosjetljiv je na utjecaj CTP i ATP.[5]

Sam UTP je slab inhibitor ATC-aze, ali u kombinaciji s CTP inhibira ATC-azu još učinkovitije nego sam CTP. UTP se sintetizira u koraku koji prethodi sintezi CTP pa se viškom pirimidina i njegova sinteza zaustavlja. UTP zauzima tri regulatorna mjesta dok CTP zauzima ostala tri regulatorna mjesta po principu induciranog pristajanja (KNF model). CTP povećava afinitet ATC-aze za vezanjem UTP i obrnuto. Predloženo je da svaki regulatorni dimer ima po jedno mjesto s većim afinitetom za CTP i drugo mjesto s većim afinitetom za UTP. U odsutnosti UTP, vezna mjesta s većim afinitetom za UTP pokazuju mali afinitet za CTP. Sam UTP vezan na vezna mjesta s većim afinitetom za CTP nema utjecaj na aktivnost ATC-aze.[5]

2.4. Fosfofruktokinaza 1

Fosfofruktokinaza 1 (PFK) sudjeluje u trećem koraku glikolize, gdje katalizira prijenos fosforilne skupine na fruktozu-6-fosfat (F6P), čime nastaje fruktoza-1,6-bisfosfat (F1,6BP).



Za PFK se najprije veže F6P, zatim Mg-ATP. Dolazi do reakcije nakon čega se otpušta Mg-ADP pa F1,6BP. U glikolizi su samo tri koraka izrazito ireverzibilna. Njih kataliziraju heksokinaza (1. korak), PFK te piruvat-kinaza (10. korak), koji su važni regulatorni enzimi. Glukoza-6-fosfat (G6P) i fruktoza-6-fosfat se ne moraju nužno razgraditi do piruvata, dok je F1,6BP usmjerena isključivo u glikolizu. U mišićima je često izvor G6P glikogen i kontrola heksokinaze nije potrebna pa je odlučujući korak, tj. prva ireverzibilna reakcija za glikolizu upravo ona koju katalizira PFK.

Reakciju obrnutu onoj koju katalizira PFK katalizira fruktoza-1,6-bisfosfataza (FBP-aza). Odvijaju li se te dvije reakcije istovremeno, sumarna reakcija bila bi hidroliza ATP, stoga suPFK i FBP-aza recipročno regulirane. Aktivatori PFK su inhibitori FBP-aze.

U slučaju PFK je zadovoljavajuć MWC model alosterije, no neki smatraju da je za potpun opis potrebno uzeti u obzir više od dvije konformacije[3].

2.4.1. Raznolikost fosfofruktokinaza

Brojne različite oligomerne PFK koje postoje danas potekle su iz enzima koji je imao podjedinicu veličine svega oko 40 kDa.

Bakterijske PFK mogu koristiti ATP, ADP ili pirofosfat kao donor fosfata. PFK koje koriste ATP su alosterički regulirane te im je aktivator AMP i inhibitor fosfoenolpiruvat (PEP). One koje koriste ADP nemaju svojstva alosteričke regulacije i pokazuju Michaelis-Menteninu kinetiku, dok neke od PFK koje koriste pirofosfat jesu alosterički regulirane, neke nisu. Eukariotske PFK koriste isključivo ATP te su im aktivatori F2,6BP, ADP i AMP, a inhibitori ATP i citrat.

> *Zanimljivost*
>
> Gljivica *Amycolatopsis methanolica* uzgojena na glukozi eksprimira samo PP_i-PFK, no uzgoji li se na metanolu ili formaldehidu kao izvoru ugljika, eksprimira ATP-PFK.

Ako je organizam orijentiran na što manji utrošak energije, imat će PFK koja koristi ADP ili pirofosfat jer su njihove reakcije prijenosa fosfatne skupine reverzibilne ili gotovo reverzibilne. Oni organizmi kojima je važnija preciznija kontrola glikolitičkog puta, koristit će

PFK koja koristi ATP zbog ireverzibilnosti prijenosa fosfata u staničnim uvjetima jer je veza koja veže γ-fosfat najbogatija energijom. Preciznija kontrola košta energetski više, što, na primjer, mogu priuštiti organizmi koji vrše fotosintezu ili kralježnjaci.

Eukariotska PFK ima podjedinice koje su više nego dvostruko veće od podjedinica bakterijskih PFK. Do toga je došlo duplikacijom gena, ekspresijom oba gena u jednu mRNA i translacije u jedan protein. N-terminalna polovica i C-terminalna polovica podjedinice međusobno sliče, a ti segmenti sliče i cijeloj podjedinici bakterijske PFK.[6] N-terminalne polovice sadrže katalitičko mjesto, dok je na C-terminalnim polovicama katalitičko mjesto mutacijama dobilo regulatornu ulogu i na njega se veže aktivator fruktoza-2,6-bisfosfat. Kakva je kvaterna struktura PFK, ovisi o organizmu. Postoji mnogo različitih PFK od kojih su neke navedene u tablici 2.4.1.

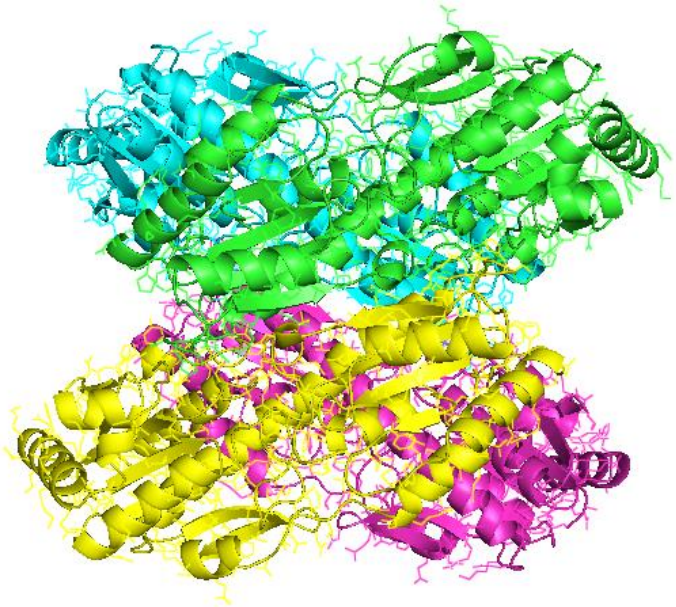
Tablica 2.4.1.Raznolikost kvaternih struktura PFK različitih organizama. PFK mogu biti homooligomeri ili heterooligomeri i razlikuju se po veličini i građi ovisno o organizmu. Ukoliko je riječ o heterooligomeru, α i β podjedinice su vrlo slične. Sve navedene vrste imaju PFK koje koriste ATP kao izvor fosfata, osim krumpira, koji koristi pirofosfat.

vrsta PFK	kvaterna struktura
iz *E. coli*	α_4
iz *Saccharomyces cerevisiae* (pivski kvasac)	$\alpha_2\beta_2$
iz *Pichia pastoris* (kvasac)	$\alpha_4\beta_4\gamma_4$
rekombinantna pročišćena PFK trombocita čovjeka	α_4
mišićna PFK zeca	α_2
iz *Solanum tuberosum* (krumpir)	$\alpha_2\beta_2$

2.4.2. Bakterijska PFK: građa, promjene konformacije i modulatori

Najbolje proučene PFK su one iz *Escherichia coli* (Slika 2.4.2.1.) i *Bacillus stearothermophilus*, koje su vrlo slične. Svaka podjedinica ima dva vezna mjesta za ATP: katalitičko, gdje se ATP veže kao supstrat i regulatorno, gdje se ATP veže kao inhibitor. Popune li se sva katalitička mjesta, ako je koncentracija ATP velika, počnu se popunjavati i

regulatorna mjesta i reakcija postaje inhibirana. Katalitičko mjesto jednako dobro veže ATP u T i u R stanju dok regulatorno mjesto bolje veže ATP u T stanju.

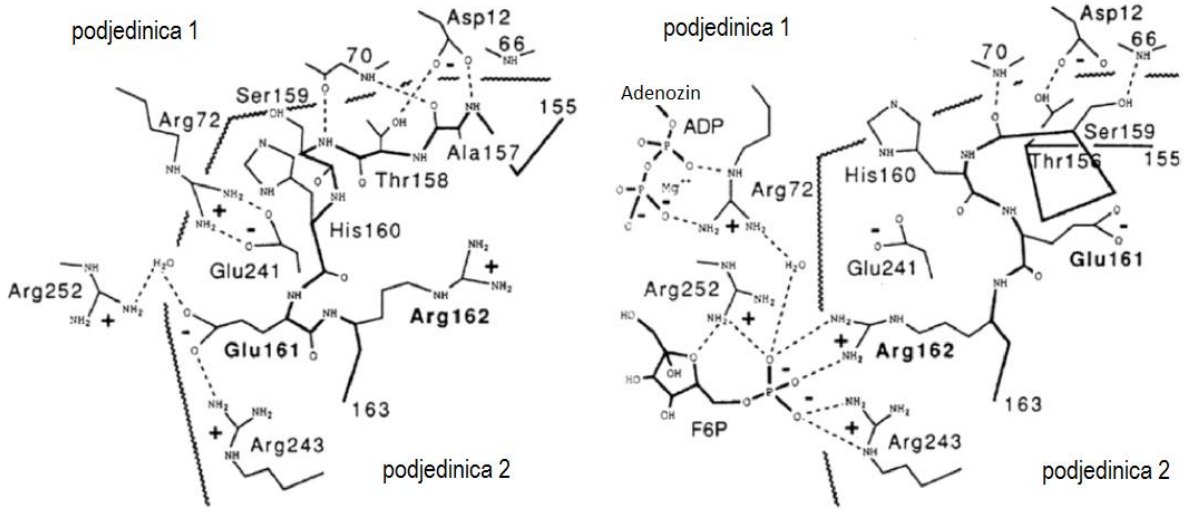


Slika 2.4.2.1.Struktura T stanja *E. coli*. Podjedinice su različito obojene. U izradi slike korišten je PyMOL i pdb kod 6PFK.

Konformacija aktivnog mjesta za ATP se ne mijenja, mijenja se konformacija aktivnog mjesta drugog supstrata, F6P. Dodatkom aktivatora ADP kooperativnost za vezanjem F6P raste i snižava se K_m. Aktivno mjesto za ATP je u potpunosti sadržano na svakoj od podjedinica, dok se aktivno mjesto za F6P i regulatorno mjesto za koje se vežu ADP ili PEP nalaze na sučeljima podjedinica. Aktivno mjesto za F6P se sastoji od dijela jedne podjedinice i petlje iz druge podjedinice. Promjena konformacije iz T u R zahtjeva preraspodjelu bočnih ogranaka iz obje podjedinice, koji sačinjavaju njegovo aktivno mjesto. To što je aktivno mjesto za F6P na sučelju podjedinica objašnjava kooperativnost vezanja tog supstrata za razliku od ATP.

R stanje PFK *B. stearothermophilus* na koju je vezan F6P je stabilizirano ionskim mostom između negativno nabijene fosfatne skupine F6P i pozitivno nabijenog bočnog ogranka Arg 162. Prijelazom u T konformaciju, dio lanca za kojeg je vezan Arg 162 se okreće te u blizinu fosfata F6P dolazi negativno nabijeni bočni ogranak Glu 161 (Slika 2.4.2.2.). Zbog odbijanja te dvije skupine, T konformacija ima znatno smanjen afinitet prema F6P. Uz inhibitor PEP T stanje postaje stabilizirano i K_m se poveća. Vezanjem PEP (relativno male molekule uzevši u

obzir ostale modulatore) na regulatorno mjesto, domene tog mjesta koje su smještene na različitim podjedinicama se približavaju i utječu na pozicioniranje Glu 161 u blizinu fosfatne skupine F6P. Naprotiv, veže li se veća molekula ADP, domene regulatornog mjesta se odmiču što za sobom nosi pozicioniranje Arg 162 bliže fosfatu F6P i tako se stabilizira enzim u R stanju.[3]



Slika 2.4.2.2. Katalitičko mjesto PFK *B. stearothermophilus* je na sučelju dvije podjedinice. Lijevo je prikazan slobodni enzim u T konformaciji, a desno je prikazana PFK s vezanim ADP i F6P. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema: T. Traut, *Regulatory Allosteric Enzymes*, Springer Science+Business Media, LLC, New York, 2008, str. 147.

2.4.3. Eukariotska PFK: građa i promjene konformacije

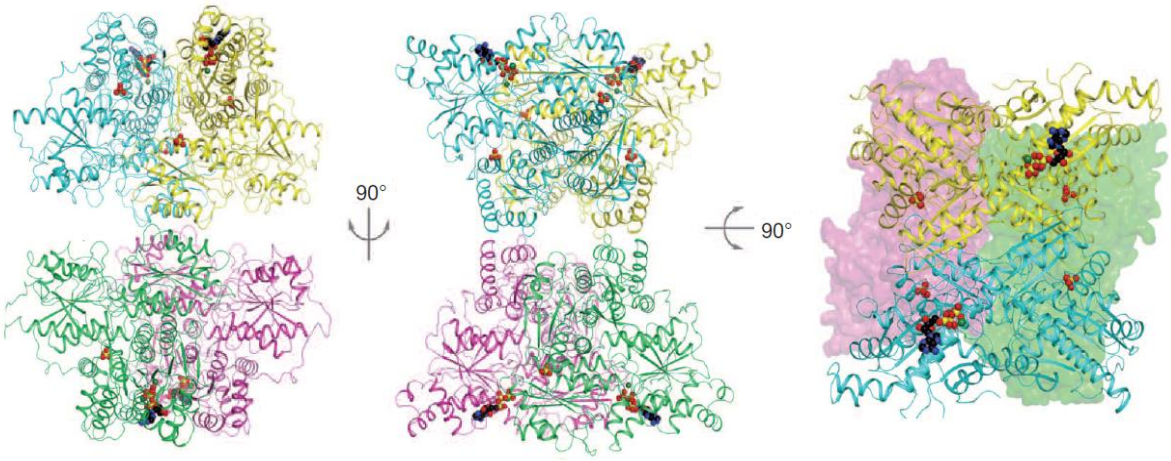
PFK iz *Pichia pastoris* je dodekamer tri različite podjedinice, ($\alpha_4\beta_4\gamma_4$). α i β podjedinice su dosta strukturno slične (55%), dok se γ razlikuje u većoj mjeri od ostalih podjedinica. γ podjedinica nema katalitičku aktivnost ali premošćuje ostale podjedinice i važna je u finom podešavanju alosteričke regulacije ATP, F2,6BP i AMP i prijelazu između konformacija.

Kod sisavaca postoje tri izozima PFK: mišićni (PFKM), jetreni (PFKL), te trombocitni i moždani (PFKP). PFKM ima najveći afinitet za F6P i najmanje je osjetljiv na inhibiciju ATP, PFKL ima manji afinitet za F6P i osjetljiviji je na inhibiciju ATP, a PFKP ima najmanji afinitetza F6P i najosjetljiviji je na inhibiciju ATP. Izozim PFKL ima manji afinitet za F2,6BP i veže ga pozitivno kooperativno , dok PFKM pokazuje manju kooperativnost i velik afinitet za F2,6BP. Ta regulacija je važna jer, ukoliko ima puno glukoze u krvi, iz F6P će se (katalizirano fosfofruktokinazom 2) stvarati F2,6BP i aktivirati PFK da se razgradnja glukoze

ubrza. Inhibitorski utjecaj većih koncentracija ATP dominira nad ostalim modulatorima. Bez obzira koliko F2,6BP ima, pri velikoj koncentraciji ATP, enzim će biti inhibiran.

Promjena pH također utječe na aktivnost PFK. Optimalan pH za aktivnost PFK je 8,0. Spusti li se ispod 6,8, aktivnost opada za 90%, što sprječava daljnju proizvodnju mliječne kiseline u mišićima pri anaerobnom radu i spuštanje pH na razine koje bi mogle biti štetne za okolno tkivo. U jetri se ne proizvodi laktat pa pH ne utječe na PFKL. PFKL je inhibirana citratom. Citrat je važan kao inhibitor PFK jer povezuje ciklus limunske kiseline s glikolizom.

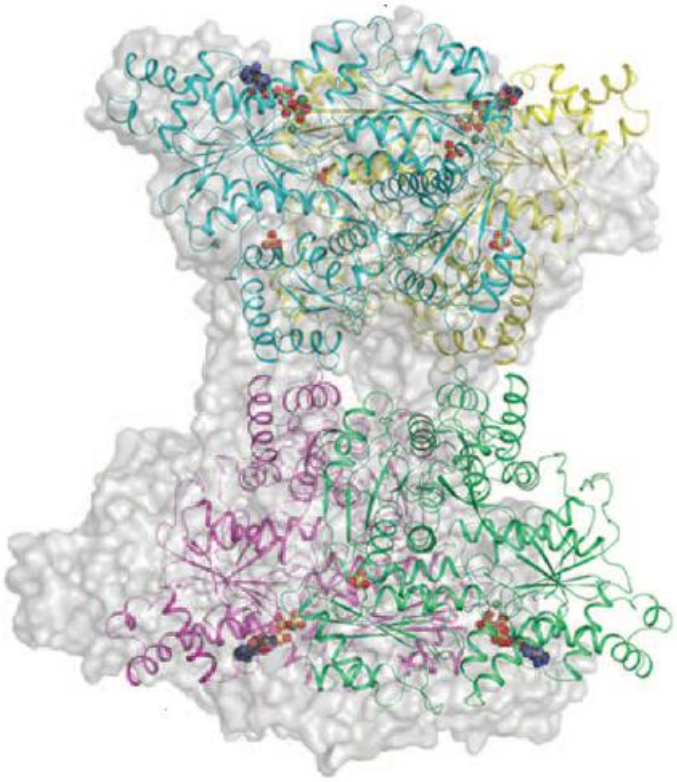
Kod sisavaca većina tkiva eksprimira sva tri izozima PFK. Pročišćavanje nekog od ta tri izozima u čovjeka je problematično, stoga je za proučavanje ljudske PFK stvorena rekombinantna pročišćena PFK trombocita. Njena kristalna struktura je određena u kompleksu s ATP-Mg^+ (Slika 2.4.3.1.)



Slika 2.4.3.1. Struktura rekombinantne pročišćene PFK čovjeka u katalitički aktivnoj konformaciji (R). Prikazan je međusoban položaj podjedinica iz različitih kuteva gledanja. Za alosteričko mjesto je vezan ATP (crno) i Mg^+ (tamnozeleno). Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema: B. A. Webb, F. Forouhar, F. Szu, J. Sectharaman, L. Tong, D. L. Barber, *Nature* **523** (2015) 111-114.

Asimetrična jedinica PFKP čovjeka sadrži dva tetramera. Četiri podjedinice svakog tetramera su složene u po dva para dimera, a dimeri se međusobno razlikuju u položajima dvije petlje.[7] Podjedinice svakog dimera su orijentirane antiparalelno (C-terminalni kraj jedne je kraj N-terminalnog kraja druge podjedinice). Aktivno mjesto je smješteno na sučelju dvije podjedinice svakog dimera. Pri kataliziranoj reakciji, PFK podliježe velikim strukturnim promjenama. U kompleksu s ADP, domene vezanja F6P i ATP katalitičkog mjesta su

razmaknutije za 8 Å u odnosu na domene kompleksa s Mg-ATP (Slika 2.4.3.3). Time se katalitičko mjesto otvara, što bi moglo igrati ulogu u oslobađanju produkata s enzima. Hidrofobne reakcije (između Tyr 65 i Phe 649 u sučelju dvije podjedinice) su važne za formiranje i stabilnost tetramera, a teramerna struktura je neophodna za aktivnost PFK. Optimalnoj aktivnosti pridonose još i elektrostatske interakcije. Ionski most između Arg 613 jedne i Glu 657 susjedne podjedinice se javlja samo kod strukture s Mg-ATP, no ne i one s ADP.



(Slika 2.4.3.2. Preklopljene strukture rekombinantne, pročišćene PFK čovjeka u R i T konformaciji. R konformacija (u kompleksu s ATP-Mg^{+}) je raznoliko obojena, a T konformacija (u kompleksu s ADP) je siva.Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema: B. A. Webb, F. Forouhar, F. Szu, J. Sectharaman, L. Tong, D. L. Barber, *Nature* **523** (2015) 111-114.

2.5. Zaključak

Alosterička kontrola je vrlo važan način regulacije aktivnosti proteina. Gotovo trenutni odgovor stanice na koncentraciju metabolita važan je u kontroli mnogih metaboličkih puteva. Na primjer, vrlo precizna regulacija supstratnog ciklusa koji obuhvaća djelovanja PFK1 i FBP-aze omogućava organizmu da prema trenutačnim potrebama „odluči“ hoće li metabolite glukoneogenezom usmjeriti u skladištenje ili glikolizom posredno u proizvodnju energetske valute ATP potrebne za rad.

Regulatorna mjesta mogu biti različito smještena kod različitih proteina. Kod hemoglobina su neka od tih mjesta ujedno i aktivna mjesta. Kod PFK su aktivno i regulatorno mjesto u zasebnim domenama pojedine podjedinice, dok kod ATC-aze aktivno i regulatorno mjesto nisu čak ni na istim podjedinicama, a niti domene koje ih sadrže međusobno graniče. Zanimljivo je također da kad dođe do zasićenja aktivnih mjesta, ista molekula koja ima ulogu supstrata tada dobiva ulogu inhibitora te se veže na alosterička mjesta i utišava aktivnost enzima, kao što je slučaj ATP kod PFK.

Međusobno relativne koncentracije ATP, ADP i AMP predstavljaju energetski status stanice pa su upravo oni česti alosterički modulatori aktivnosti raznih enzima.

Alosterija je prisutna u temeljnim točkama regulacije važnih metaboličkih puteva upravo zbog toga što početna mala strukturna promjena uzrokovana vezanjem modulatora uzrokuje vrlo brz i precizan odgovor aktivnosti alosteričkih proteina.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. E. Guarnera, I. N. Berezovsky, *Curr. Opin. Struct. Biol.***37** (2016) 1-8
2. D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, 4.izdanje, John Wiley & Sons, Inc., 2011, str. 323-358, 469-481, 619-637, 1088-1093.
3. T. Traut, *Regulatory Allosteric Enzymes*, Springer Science+Business Media, LLC, New York, 2008, str. 77-84, 105-124, 139-159.
4. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, 6. izdanje, W. H Freeman and Company, New York, 2007, str. 183-194, 433-437.
5. J. Gerhart, *FEBS J.***281** (2014) 612-620.
6. T. Schöneberg, M. Kloos, A. Brüser, J. Kirchberger, N. Sträter, *Biol. Chem.* **394** (2013) 977-993.
7. B. A. Webb, F. Forouhar, F. Szu, J. Sectharaman, L. Tong, D. L. Barber, *Nature* **523** (2015) 111-114.
8. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 6. izdanje, W. H Freeman and Company, New York, 2013, str.226-228, 549-550, 604-606.
9. E. R. Kautrowitz, *Arch. Biochem. Biophys.***519** (2012) 81-90
10. http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do (9.rujna 2017.)