Dinamički aspekti alosteričkih promjena

Mišura, Ozana

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:217:528636

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Ozana Mišura

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Dinamički aspekti alosteričkih promjena

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za fizikalnu kemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša
Neposredni voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Zagreb, 2017.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:	26. srpnja 2017.
Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:	1. rujna 2017.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša	Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK VII
§ 1. UVOD 8
1.1. Alosterija kroz prizmu povijesti 8
1.2. Dinamičan razvoj alosterijskih koncepata 9
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME 11
2.1. Razvoj eksperimentalnih tehnika 11
2.1.1. Difrakcija rentgenskog zračenja 12
2.2. Strukturna podloga 12
2.2.1. MWC ili usklađeni model opisa alosterije 13
2.2.2. KNF ili sekvencijski model opisa alosterije 14
2.3. Kontekst novih otkrića 15
2.3.1. Dinamika u kontekstu alosterije 16
2.3.2. Neuređenost u kontekstu alosterije 18
2.4. Objedinjeni pogled 19
§ 3. LITERATURNI IZVORI XXI

§ Sažetak

Prije pedesetak godina postavilo se pitanje alosterije[1] čime je taj biološki fenomen stavljen u fokus mnogih narednih znanstvenih istraživanja. Puno se truda uložilo u razne obrade, opise i analize alosterije koje su uslijedile. Iako su se objašnjenja logično nizala i nametala skoro pa sama od sebe, svaki je odgovor otvarao nove nepoznanice. Time je početno pitanje fenomenološki opaženog biološkog procesa vrlo brzo preraslo u opsežnu alosteričku problematiku. Njezin potpun i objedinjen pregled zahtijevao je, i još uvijek zahtijeva, korištenje širokog spektra različitih znanstveno-istraživačkih metoda koje se koriste za istraživanje alosterije u različitim sustavima.

Brojni faktori koji pogone alosteriju, znanstvene metode kojima se alosterički procesi mogu promatrati, sustavi u kojima se alosterija može očitovati i mnoge druge značajke alosterije koje su detektirane, kategorički su grupirane. One, iako se razlikuju u principima i modelima na kojima se temelje, pružaju glavne pristupe obrascima alosterije. U cjelokupnom znanstvenom razvoju alosterijskog konteksta, određeni su aspekti uzrokovali značajniji preokret alosterijske paradigme. Tako su otkrića i upotreba određenih eksperimentalnih metoda imale iznimno važan utjecaj na razvitak novog načina proučavanja alosterijskog fenomena čime su udarile temelj sasvim novog shvaćanja tog biokemijskog pojma. Isto tako, otkriće dinamički pogonjene alosterije otvorilo je široku perspektivu načina proučavanja alosterije, kao i nove mogućnosti matematičke kvantifikacije tog procesa.

Danas je veliki naglasak stavljen na važnost emergencije svih različitih pristupa alosteriji. Iako svaki pojedini obrazac na svojstven način, eksplicitno ili implicitno definira alosteričke pojmove, objedinjeni pogled omogućava opažanje svojstava koje pojedinačne komponente pružaju nepotpuno ili ne mogu pružiti uopće.

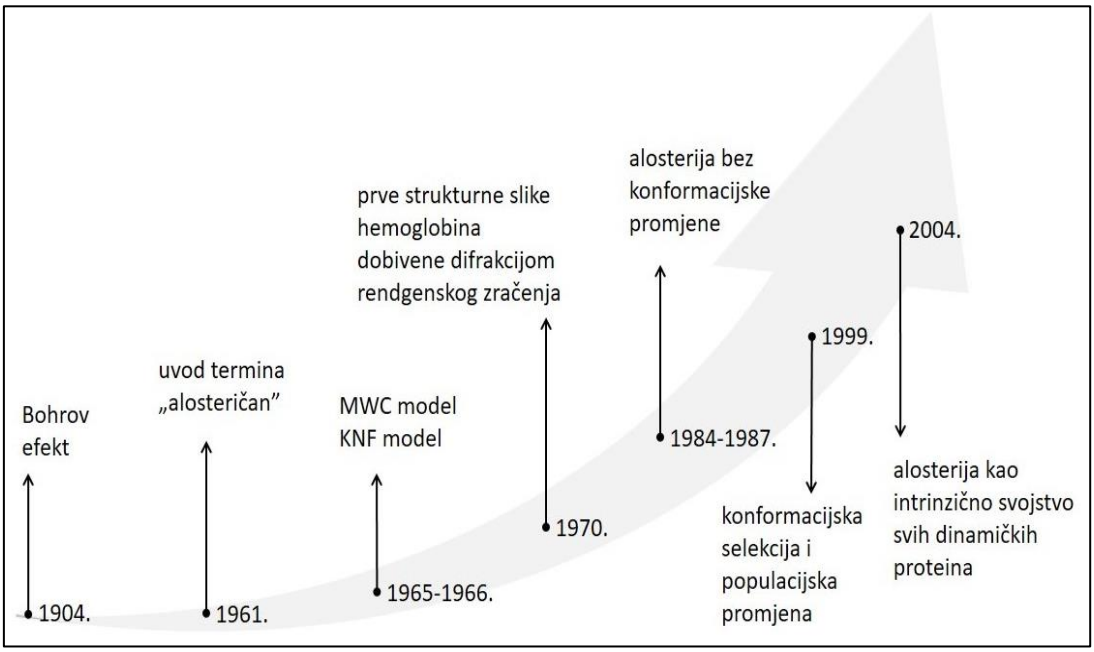
§ 1. UVOD

1.1. Alosterija kroz prizmu povijesti

U proučavanju bioloških odnosno biokemijskih sustava danas, neizbježno je primijetiti koncept alosterije. Iako je taj biološki fenomen opažen davno, naziv je dobio nakon dugo vremena i puno istraživanja. Prva pojava alosterije krije se pod nazivom Bohrov efekt kojeg je opazio Christian Bohr 1904. godine u pokusima istraživanja utjecaja ugljikovog(IV) oksida na vezni afinitet hemoglobina prema kisiku. Riječ alosterija, s druge strane, skovana je tek 1961. godine kad je proizašla iz pojma alosteričke inhibicije koju su opisali Jacques Monod i Francis Jacob kao mehanizam u kojem „inhibitor nije sterički analog supstrata“.[2] Alosterija je dosta dugo bila nedefiniran, razjedinjen, a samim time i nejasan pojam. Kako to inače biva u razjašnjavanju novih i nepoznatih termina, alosterija je prvotno bila opisana jednostavnom slikom koja se tek s vremenom postupno upotpunjavala sve mnogobrojnijim i kompleksnijim detaljima. Prvi temelj bila je strukturna slika bioloških agenata koji očituju alosteriju svojom konformacijskom promjenom. Karakterističnu strukturnu podlogu poduprla su 2 opisna modela alosterije koji su sljedećih desetak godina postali dominantna paradigma: sekvencijski ili KNF (Koshland-Nemethy-Filmer) model i usklađeni ili MWC (Monod-Wyman-Changeux) model.[3] Navedeni modeli stvorili su uvriježen, statički pogled na alosteriju koji je poljuljao Cooper, tek dva desetljeća kasnije, kada je 1984. godine predložio mogućnost alosteričke komunikacije između 2 udaljena mjesta na proteinima koja se odražava bez konformacijskih promjena. Time se otkrila proteinska dinamika kao jedan od bitnih faktora za razumijevanje alosterije.[4] Takvo novootkriveno shvaćanje alosterijskih puteva ubrzo je zahtijevalo i preciznije eksperimentalne tehnike kojima bi se date postavke mogle proučavati, a samim time i objasnilo zašto se takav pogled nije nametao u samim počecima opisa alosterije. Kada je, zahvaljujući razvijanju raznih eksperimentalnih tehnika, pogotovo NMR spektroskopije, postalo moguće prikupiti informacije ne samo o proteinskoj strukturi već i o njegovoj dinamici pa čak i termodinamici, formiralo se sasvim novo shvaćanje, koje je sugeriralo cijeli niz dinamičkih faktora koji mogu pogoniti alosteriju.

Vrlo brzo uvriježio se pojam dinamičke alosterije iako se u interpretaciji često krivo shvaćao pri čemu se pod pojmom dinamike mislilo na kretanja određenih grupa unutar molekule.[3] Uz

dinamički aspekt koji se zaista pokazao kao prekretnica u shvaćanju pokretanja alosterije, jednako je važno bilo proučavanje neuređenih sustava u kojima je alosterija također prisutna. Taj se pogled suprotstavio klasičnom pogledu koji za objekte alosteričkih promjena ima strukturirane proteine. Koncizni prikaz povijesne dinamike razotkrivanja alosterijskih pojmova prikazan je na slici 1.



Slika 1. Vremenski prikaz ključnih termina u povijesti alosterije.

1.2. Dinamičan razvoj alosterijskih koncepata

Budući da je alosterija sama po sebi vrlo složen i kompleksan pojam kako na mikroskopskoj, tako i na makroskopskoj razini, njezin opis zahtijeva poglede s različitih strana. Cilj je ovog rada upoznati se s datim opisima i istraživanjima te njihovim kronološkim slijedom. U tu svrhu navodi se i ukratko objašnjava kratki pregled relevantnih pojmova s posebnim naglaskom na predstavljanje i razvijanje dinamičkog aspekta koji je dugo kroz povijest bio zanemarivan. Širok raspon interesa istraživanja alosterije ne čudi s obzirom na njezinu ulogu u mnogim biološkim sustavima, a isto tako i nezaobilaznu primjenu u farmakologiji. U biosustavima pojava alosterije važna je u brojnim signalnim putevima i komunikaciji između različitih

biomolekula, a isto tako ključna je za razumijevanje bolesti i razvitka novih lijekova.[5] Iz navedenih, a i mnogih drugih mogućih razloga, intenzivno se provode znanstvene studije o alosteričkim pojavama. Istraživanja su mnogobrojna, kao što je i bogat repertoar literature u kojoj alosterija nalazi svoje mjesto. Biologija, biomedicina, biotehnologija, farmakologija samo su neka od područja koja u svom znanstvenom radu primjenjuju alosterijske koncepte.

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Razvoj eksperimentalnih tehnika

Ključni segment koji je gotovo eksponencijalno otvorio mogućnosti istraživanja alosterijskih mehanizama bio je razvoj metoda za proučavanje istih. Moglo bi se čak reći da su prvenstveno te metode upravljale okvirima promatranja alosterije. Svaka je metoda, shodno svom načinu izvođenja, omogućila uvid u određene pojedinosti. Eksperimentalnim metodama dobivene su strukturne slike visoke rezolucije. Računalnim metodama računate su fizikalne veličine promatranog sustava.[3]

Do danas su se razvile i konstantno se nadograđuju mnoge tehnike koje omogućuju različit način istraživanja bioloških makromolekula. Bez razvoja tih grana proučavanje kompleksnih pojava kao što je alosterija bilo bi iznimno teško, ako ne i nemoguće. Neke su tehnike optimalne za proučavanje određenih podjedinica proteina ili čak i manjih dijelova, a neke su bolje za detekciju cjelokupne makromolekulske strukture. Isto tako, neke eksperimentalne metode daju prvenstveno strukturne slike odgovarajuće rezolucije, a neke pružaju i uvid u dinamičke procese koji se odvijaju u kratkom vremenu. Primjenjivost NMR spektroskopije na proteinske sustave u vidu istraživanja dinamike sustava intenzivno se unapređuje. Odlične studije dvaju sustava[6] otkrile su važne poveznice između dinamike i funkcije preko kvantifikacije procesa konformacijske izmjene koja regulira katalitičku aktivnost. U statističkoj analizi ansambla struktura omogućena je realnija slika sustava na makroskopskoj razini. Takav pristup nadilazi poteškoće kod tumačenja dinamičkih promjena. S druge strane, računalno istraživanje pojedinačnih struktura pruža mogućnost uočavanja suptilnih razlika između pojedinih struktura na mikroskopskoj razini. Svaka pojedina tehnika ima sebi svojstvene prednosti, a isto tako i nedostatke. Stoga bi se tehnike trebale međusobno kombinirati i upotpunjavati što najčešće i jest slučaj. Broj metoda pogodnih za analize alosteričkih sustava danas[7] zaista je pozamašan i teško bi bilo izdvojiti one koje su imale ključnu ulogu u omogućavanju ozbiljnijeg pristupa proučavanju alosteričkih procesa u kontekstu bioloških objekata. Ipak, prve strukturne slike makromolekula omogućila je difrakcija rentgenskog zračenja čime je postala velika potpora teorijskim modelima stoga će se ona opisati pobliže.

2.1.1. Difrakcija rentgenskog zračenja

Jedna od iznimno bitnih metoda u proučavanju alosterije jest difrakcija rentgenskog zračenja, o čemu svjedoči njezina široka uporaba. Difrakcijske metode mogu se podijeliti na više načina; s obzirom na vrstu uzoraka (difrakcija zračenja na jediničnom kristalu i difrakcija na polikristalu) pri čemu je kristalno stanje tvari općenit uvjet moguće izvedbe eksperimenta, s obzirom na vrstu zračenja (rentgenska difrakcija, neutronska difrakcija i elektronska difrakcija) i slično.

Rentgensko zračenje pripada onim valnim duljinama u elektromagnetnom spektru koje se nalaze između UV i gama zračenja. Te su valne duljine reda veličine razmaka atoma u kristalu. Kristalični se uzorci stoga ponašaju kao optička rešetka za rentgensko zračenje. Kada to zračenje padne na pozicioniran uzorak, dolazi do ogiba ili difrakcije svjetlosti. Rezultat je difraktogram iz kojeg se pomoću matematičkih alata rješava struktura datog kristala. Svaka elementarna tvar, kao i kemijski spoj, ima svoj karakteristični difraktogram odnosno difrakcijsku sliku, različitu od svih ostalih. Analiza difraktograma koja uključuje matematičko prevođenje podataka iz nečitljive u čitljivu domenu te utočnjavanje za rezultat ima riješenu kristalnu strukturu analizirane tvari.[8-9]

Difrakcija rentgenskog zračenja prva je eksperimentalna metoda kojom se proučavala alosterija. Protein u kojem se ona istraživala bio je hemoglobin. Taj primjer opisa detaljnije je opisan u sljedećem poglavlju.

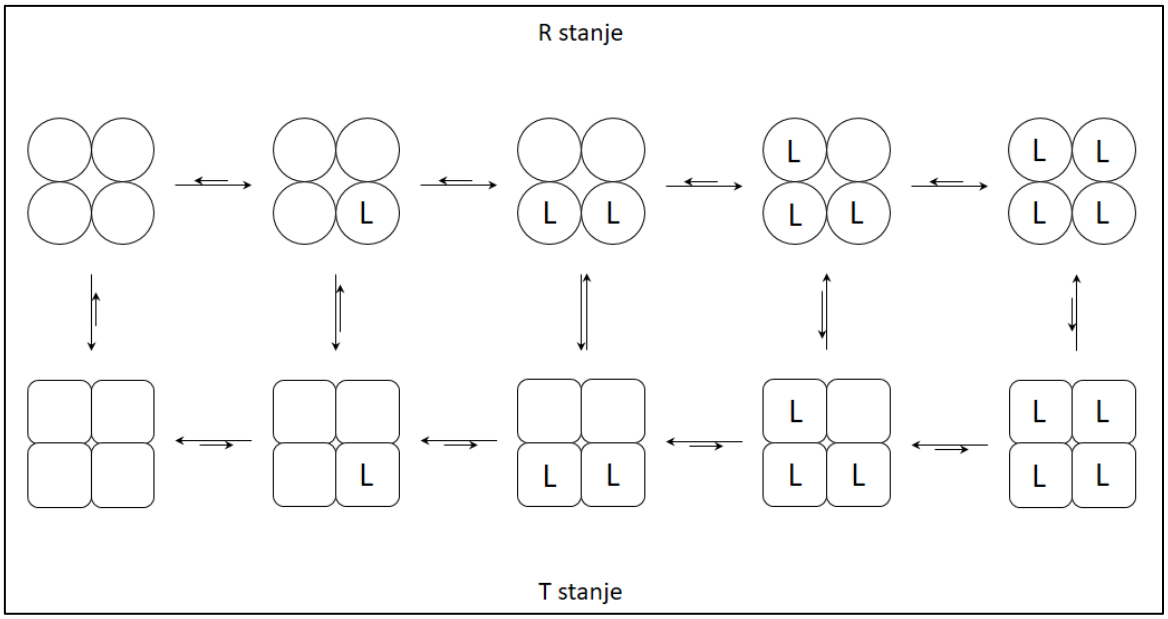
2.2. Strukturna podloga

Kao što je već navedeno, sam početak opisa i shvaćanja pojave alosterije bio je fenomenološki. Tako je alosterija u prvim eksperimentalnim pokusima primijećena kao komunikacija dvaju dijelova jedne molekule, koji su po svoj prilici međusobno udaljeni, ali unatoč toj udaljenosti reagiraju zavisno. Vrlo brzo postalo je jasno da je potonju pojavu jako teško interpretirati bez određenih podataka o strukturi molekule ili biokemijskih podataka o vezanju liganada na neko mjesto u strukturi biološke makromolekule.[3] Rješenje navedene problematike na koju je naišlo prvotno tumačenje alosterije proizašlo je radom Maxa Ferdinanda Perutza. On je, naime, svojim istraživanjem i detekcijom strukture hemoglobina pokrenuo lavinu razvoja strukturne biologije

koja je nadalje omogućila i usmjerila mnoga dotadašnja istraživanja. Hemoglobin je time kao prvi protein kojem je određena kristalna struktura „odigrao važnu ulogu u povijesti biokemije“.[10] Novootkriveni strukturni pogled na aktere koji pokazuju neobično svojstvo posredne komunikacije međusobno udaljenih mjesta postao je podloga prvim modelima kojima se pokušala objasniti narav opaženog ponašanja. Ti su modeli, detaljnije opisani u nastavku, nastali kao prvi kvantitativni modeli opisa alosterijskog efekta i kao takvi preuzeli glavnu riječ u interpretaciji alosteričkih pojava narednih dvadesetak godina.

2.2.1. MWC ili usklađeni model opisa alosterije

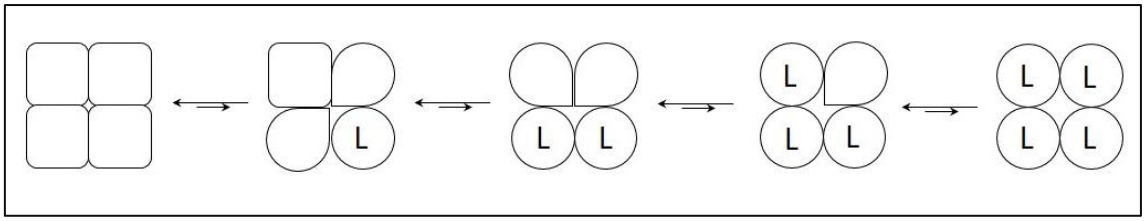
Prvi model koji se opisuje je *MWC model*. Ime je dobio prema trojici znanstvenika koji su ga postavili, čija su imena redom: Jacques Monod, Jeffries Wyman i Jean-Pierre Changeux, a naziva se još i *usklađeni model*. Dati model pretpostavlja jednake podjedinice proteina (za koji se podrazumijeva da posjeduje kvaternu strukturu) i dva moguća stanja odnosno dvije definirane konformacije u kojima se svaka od podjedinica može naći, nazvane T stanje (engl. tensed – napet) i R stanje (engl. relaxed – relaksiran). Imena tih stanja proizlaze iz struktura proteina pri čemu je stanje T ono u kojem su prisutne mnoge interakcije između podjedinica proteina. Isto tako, podjedinice simultano podliježu prijelazu iz jedne u drugu konformaciju. Pretpostavka je modela da, iako se ligand može vezati na protein koji se nalazi u bilo kojem od navedena dva stanja, vezanjem liganda ravnoteža se pomiče prema R stanju. Uz navedenu pretpostavku, vrijedi i da je generalno afinitet proteina prema ligandu veći kad se protein nalazi u R stanju naspram proteina u T stanju. Shema ovog modela prikazana je na slici 1.[10,11]



Slika 1. Usklađeni model. Sve su molekule ili u R stanju (prikazano krugom) ili u T stanju (prikazano kvadratom). Vezanjem liganda (L) ravnoteža se pomiče pri čemu R stanje ima veći afinitet prema ligandu od T stanja.

2.2.2. KNF ili sekvencijski model opisa alosterije

Drugi model koji su nedugo zatim postavili D. E. Koshland, G. Nemethy i D. Filmer poznat je i pod nazivom *sekvencijski model*. Ovaj model dijeli zajedničko gledište s *usklađenim modelom* prema kojem je afinitet proteina u R stanju veći prema ligandu od afiniteta proteina u T stanju prema tom istom ligandu. Međutim, on promatra promjenu afiniteta na razini podjedinice proteina. Vezanjem liganda na određenu podjedinicu mijenja se konformacija te podjedinice pri čemu dana promjena utječe na promjenu afiniteta susjednih podjedinica prema ligandu. U ovom modelu postoji više potencijalnih intermedijernih stanja. Prikaz ovog modela nalazi se na slici 2.[10,11]



Slika 2. Sekvencijski model. Vezanjem liganda mijenja se konformacija date podjedinice. Ta promjena potiče promjene konformacija susjednih podjedinica čime mijenja njihov afinitet prema ligandu.

Ovi su modeli prvi pokušaji objašnjavanja alosterije koja je prvi put primijećena u sustavu kooperativnog vezanja kisika na tetramerni hemoglobin. Osim ta dva, i mnogi su drugi modeli pokušavali objasniti datu kooperativnost. Ipak, usklađeni MWC model dvaju stanja ističe se kao najbolji model tog vremena. Nedostatak tog modela bio je izostanak strukturnog mehanizma. Taj je propust nadopunio Max F. Perutz 1970. godine na temelju pažljivog uspoređivanja dviju struktura; samog hemoglobina i hemoglobina s vezanim kisikom, a koje je dobio difrakcijom rentgenskog zračenja.[1]

Bitno je shvatiti da su ovi modeli imali ne samo definiran način pogleda na slijed događaja koji se manifestiraju kao alosterija, već i definirane objekte za koje se taj slijed (skoro pa isključivo) opisuje. Isto je tako važno razumjeti da su ova 2 modela krajnje mogućnosti u kojem se vjerojatno niti jedan realni sustav nikada ne bi u potpunosti našao, već se i opis tog sustava temelji na ravnoteži i zastupljenosti obaju modela.

2.3. Kontekst novih otkrića

Po uzoru na uspješan alosterički model kooperativnog vezanja koje je prvi put opisano za sustav hemoglobin – kisik, razvijali su se mnogi koncepti alosteričkih shema. Njima se htjelo, ili razumjeti kako alosterički mehanizam funkcionira, ili kvantitativno opisati alosteričko ponašanje. Veliku su važnost imali funkcionalni modeli koji su razvijeni na zahtjev farmakološkog razvoja. Ti su modeli omogućavali kvantitativno mjerenje alosteričke

efikasnosti lijekova na temelju eksperimentalnih krivulja konstruiranih iz praćenja odgovora sustava na njegovu različitu koncentraciju. Tu je sposobnost kvantificiranog mjerenja uvjetovao termodinamički pogled na alosteriju. Naime, u tu su svrhu formulirane različite matematičke jednadžbe u kojima se određeni parametri alosteričkog sustava mogu izraziti preko koncentracije.[1]

Dinamičku alosteriju prvi su put eksplicitno artikulirali A. Cooper i D. T. F. Dryden u svom radu 1984. godine u kojem su pokazali teorijsku važnost potpunog entropijskog energetskog doprinosa biološkoj funkciji.[12] Temeljem tadašnjih saznanja o dinamičkim svojstvima proteina, razvijen je jedan od alternativnih mehanizama za interakcije dalekog dosega. Predstavljen je opći model prema kojem promjene u proteinskoj dinamici, a koje su potaknute vezanjem liganda, mogu prouzročiti alosterijsku komunikaciju, čak i u odsutnosti konformacijskih promjena. Na statističkoj termodinamici vezanja liganda bazirale su se teorijske analize koje su pokazale da se predstavljenim mehanizmom mogu generirati kooperativne interakcijske slobodne energije reda veličine nekoliko kJ mol^{-1}. Dati efekt posljedica je mogućih promjena u frekvencijama i amplitudama makromolekulskih termalnih fluktuacija kao odgovor na vezanje liganda, a može uključivati –sve oblike dinamičkog ponašanja. Dinamička alosterija takvog oblika primarno je entropijski efekt i shodno tome izvedeni su aproksimativni opisi koji omogućuju izračun interakcijskih veličina realnog sustava direktno iz eksperimentalnih opažanja. Osim uvođenja pojma dinamike, za alosteriju je iznimno dostignuće bilo shvaćanje mogućeg očitovanja alosterije u neuređenim sustavima.

2.3.1. Dinamika u kontekstu alosterije

Jacques Monod je u svom početnom radu,[13] u kojem je zajedno sa suradnicima razradio prethodno opisan početni model alosterije, naglasio da se koncept konformacijske promjene koji se uvodi mora shvatiti u svojoj najširoj konotaciji. Ipak, dugo se nije pridavala velika važnost mogućnosti da se slika dvaju krajnjih strukturnih stanja proteina zamijeni mnogobrojnijim slikama svih veznih i neveznih konformacijskih stanja kroz koje protein prolazi tijekom procesa vezanja i otpuštanja liganda. Prvi značajniji preokret paradigme koja se izgradila na temeljima istraživanja šezdesetih godina prošlog stoljeća napravili su Cooper i Dryden. Oni su naime uveli novi koncept prijenosa informacije koju sadrže makromolekule. Prema njemu[12], ta informacija nije sadržana samo u prosječnim konformacijama datih

makromolekula, već i u frekvencijama i amplitudama fluktuacija oko te konformacije. Samim time nameće se i alternativan način prijenosa informacija putem promjena tih dinamičkih frekvencija i amplituda. Takav se prijenos dakako može ostvariti neovisno o konformacijskim promjenama pa čak i u njihovoj odsutnosti. Shodno tome, namjera novog opisa nije opovrgavanje ili negiranje alosteričke komunikacije opisane konformacijskim promjenama, već predstavljanje drugačijeg pogleda na alosteriju koji je komplementaran prethodno opisanim modelima i upotpunjuje razumijevanje alosterije. Taj se pogled temeljio na tadašnjim saznanjima o dinamičkim svojstvima proteina. Cjelokupni izvod proizašao je iz teorijske analize bazirane na statističkoj termodinamici vezanja liganda pri čemu je alosterički efekt posljedica mogućih promjena u frekvencijama i amplitudama termalnih fluktuacija makromolekule koje se induciraju datim vezanjem liganda. Cooper i suradnici takvim su opisom uveli entropijski efekt kao primarni uzrok dinamičke alosterije. Prema toj postavci mogli su se izvesti opisi koji omogućuju račun onih veličina koje su prisutne u promatranim realnim sustavima. Formalizam statističke termodinamike pokazao se kao obećavajući alat istraživanja alosterije. Otvaranje tog novog aspekta u proučavanju faktora koji uzrokuju alosteriju oblikovalo je pojam dinamičke alosterije. Posljedice rada Coopera i njegovih suradnika bile su dalekosežne. Tako su se nakon njegovog uvođenja uloge entropije mnogi znanstvenici okrenuli teorijskom i računalnom istraživanju podloge alosterije. Time je računalni pristup postao komplementaran eksperimentalnom istraživanju alosterije kod proteina. Budući da računalne metode daju detaljan uvid u dinamička svojstva sustava koji posjeduju alosteriju, vrlo su često korištene u istraživanju alosterije bioloških makromolekula. Osobito često se primjenjuju simulacijske tehnike temeljene na polju sila kao što su metode molekulske dinamike te Monte Carlo konformacijske pretrage.[3] U prilog cijelom novom pogledu, opažen je[4] velik broj alosteričkih sustava koji ne sadrže nikakav dokaz prisutnosti strukturnih promjena uslijed alosteričke komunikacije. Nadalje, NMR analize[3] alosteričkih proteina otkrile su pregršt načina na koje se dinamičke promjene mogu povezati s alosteričkim promjenama. Dinamika je, zahvaljujući mnogim radovima, prihvaćena kao središnja, ako ne i ključna za alosteriju. Alosterijska molekula nakon vezanja liganda prolazi kroz različite strukture u ovisnosti o vremenu što čini dinamiku cijelog procesa stoga su „dinamika i alosterički procesi gotovo tautološki povezane“.[14]

2.3.2. Neuređenost u kontekstu alosterije

Postoje mnogi proteini koji alosterički sudjeluju u staničnim signalnim putevima, a u svojoj strukturi sadrže nesrazmjeran broj domena ili segmente koji su u nativnoj konformaciji intrinzično neuređeni. U mnogim je slučajevima akcija smatanja tih segmenata datih proteina spregnuta s njihovim vezanjem jednog ili više interakcijskih partnera. To opažanje navodi na moguću važnu ulogu intrinzične neuređenosti. Brojne pretpostavke o ulozi intrinzično neuređenih domena u regulaciji ukazuju na potrebu ustanovljenja mehanističkog modela koji bi mogao kvantitativno procijeniti važnost takvih domena u intramolekularnoj komunikaciji dvaju mjesta, komunikaciji koja je obilježje svih alosteričkih proteina. Takav nalaz, ne samo da bi objasnio nadmoć intrinzično neuređenih domena u regulatornim proteinima, već bi i osporio klasični mehanistički pogled propagacije energije u proteinima prema kojem je sprezanje dvaju mjesta maksimalno onda kada se ta dva mjesta povežu tek nastankom određene smotane strukture. Prisutnost intrinzične neuređenosti za posljedicu ima mehanizam sprezanja koji je neovisan o mreži interakcija koje fizički spajaju dva mjesta koja se sprežu. Jasan prikaz toga daje jedinstven uvid u osnovna energetska pravila koja u svim proteinima usmjeravaju komunikaciju među dvjema pozicijama.

Ovakav se pogled početkom 21. stoljeća suprotstavio uvriježenom mišljenju da funkcionalnost proteina proizlazi iz visokog stupnja uređenosti njihovih struktura. Opažene su tisuće raznih proteina, koji su najvjerojatnije intrinzično neuređeni ili imaju intrinzično neuređene domene u nativnim konformacijama, zastupljenih u staničnim signalnim putevima.[15] U prilog tome, mnoge su detaljne studije pokazale da je u takvim proteinima strukturna formacija povezana s vezanjem liganda u drugom dijelu molekule. Potonja opažanja indiciraju povezanost prijelaza strukture proteina s neuređene na uređenu s dalekosežnom alosteričkom komunikacijom unutar molekule.

Važnost navedenog pogleda je dvostruka. Prvo, on omogućuje opće kvantitativno objašnjenje opažanja da upravo mnogi regulatorni proteini imaju intrinzično neuređene regije. Drugim riječima – intrinzična neuređenost može maksimizirati alosteričku vezu između dva mjesta. Drugo, takav pogled može otkriti opća termodinamička pravila koja omogućuju tu vezu. Time propagacija efekta vezanja nije nužno zadana povezivanjem dvaju mjesta putem mreže interakcija, već energetskom ravnotežom unutar proteina. Jedan od opisanih modela sugerira da je priroda u evoluciji alosteričkog sprezanja odabrala mehanizam prema kojem postoji skup

stanja u proteinu. Taj skup stanja posljedica je stabilnosti različitih domena i interakcija među njima. Sva su stanja optimirana da odgovore na vezanje liganda. Nakon vezanja, taj se skup stanja preraspodjeljuje i posljedično se mijenjaju njegova svojstva. Ovakav mehanizam ovisi samo o relativnoj stabilnosti domena, a ne specifičnim strukturnim značajkama te stabilnosti. Stoga se takav pogled razilazi s klasičnim mehanističkim pogledom na alosteriju prema kojem strukturne perturbacije koje se šire od jednog do drugog mjesta olakšavaju komunikaciju dvaju mjesta. Iznesene hipoteze koje objašnjavaju zašto priroda koristi intrinzičnu neuređenost primarno su fokusirane na pitanje kako ona potpomaže molekulsko prepoznavanje. Modeli koji omogućuju poveznicu s eksperimentalno mjerljivim veličinama u proučavanju proteina s intrinzično neuređenim domenama su obećavajući.[15]

2.4. Objedinjeni pogled

Brojni su pristupi uložili iznimno puno truda u proteklih 50 godina kako bi objasnili alosteriju, istražili njezine obrasce i detektirali posljedice. Svaka je tema doprinijela izgradnji sve većeg temelja razumijevanja alosteričkog fenomena. Ipak, različiti istraživani principi dugo se nisu preklapali u pogledima pa tako nisu konvergirali sveobuhvatnoj točki gledišta. Studije alosterije koje su se do danas provodile i na kojima se i dalje radi mogu se općenito svrstati u tri glavne kategorije.[1] U prvu kategoriju potpadaju konceptualni modeli kao što su konformacijska selekcija i inducirano pristajanje. Ti su modeli razvijeni kako bi opisali načine na koje se kroz alosteriju postižu biološke funkcije. Druga kategorija temelji se na principu termodinamičke ravnoteže. Nekoliko matematičkih modela formuliralo se u potrazi za kvantitativnim opisom mjerljivih alosteričkih značajki. Iako je termodinamička perspektiva ponudila takav opis, nije objasnila jednu od mnogih značajki alosterije, a to je zašto ligandi koji su međusobno slični pri vezanju na isto alosteričko mjesto mogu djelovati i kao protagonisti i kao antagonisti. Treća kategorija ujedinjuje brojne implicitne i eksplicitne pristupe strukturnog temelja alosterije.

Iako se sva znanstvena pozadina mijenjala toliko dinamičnije koliko su se brzo razvijale različite tehnike i metode koje su ju sve više upotpunjavale najrazličitijim detaljima čime je postajala izrazito kompleksna, dati smjer otvorio je novo pitanje. To se pitanje ticalo problematike sveobuhvatnosti alosteričkog konteksta. Na prvi pogled, dva se potonje opisana alosterička pogleda – termodinamički i strukturni ne dotiču puno osim u krajnjem ishodu

alosteričke aktivacije. Izazov zajedničkog opisa otežavaju različiti faktori koji pogone alosteriju kao i vrste sustava u kojima se alosterija očituje. Zapravo, nijedan opis ne zahtijeva drugi da bi objasnio alosteriju. Unatoč tome, danas se teži onim pristupima koji naglašavaju više komplementarnost nego kontradikciju različitih opisa.[1,16]

Reprezentacija alosterije koja uzima u obzir i njezinu statičku i njezinu dinamičku narav bitna je jer ju stavlja u sklop statističkog gledišta. Prema jednom takvom ujedinjenom modelu[3] alosterijska aktivnost neke promatrane molekule bit će, u najopćenitijem slučaju, zajednički doprinos svih oblika te molekule (od aktivnih do neaktivnih) prisutnih u otopini, neovisno o tome koliko se te molekule međusobno razlikuju u svojoj strukturi. Iz toga se može zaključiti da nije presudno identificirati samo jednu konformaciju za koju se smatra da je upravo aktivni oblik promatrane molekule, već detektirati sve molekule ili dijelove molekule koji se nalaze u aktivnoj konformaciji, odnosno zastupljenost aktivne konformacije kako bi se na temelju toga interpretirala raspodjela stanja u kojima bi se ta molekula mogla naći. Isto se tako datim iskazom zapravo nadilazi uobičajena deterministička slika određenog alosteričkog puta prema kojoj svaka pojedina molekula u svakom trenutku ima istu konformaciju ili se ta molekula može predstaviti prosječnom konformacijom.

Nezaobilazan zahtjev koji uvjetuje razvoj novih saznanja jest podložnost dinamičkih, neuređenih, ali i svih ostalih sustava eksperimentalnim ispitivanjima. Time se omogućuje proučavanje i utvrđivanje odrednica alosterije. Razumijevanje tih odrednica okosnica je kvantitativnog opisa bioloških procesa, a dati opisi uvjetuju razvoj ujedinjenog okvira koji će povezati intrinzičnu neuređenost, konformacijske fluktuacije i klasične modele alosterije, te pridonijeti slaganju potpunog alosteričkog mozaika.[1,3,15]

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. C. J. Tsai, R. Nussinov, *PloS Comput. Biol.* **10** (2014) 1–12.
2. J. Monod, F. Jacob, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **26** (1961) 389–401.
3. H. N. Motlagh, J. O. Wrabl, J. Li, V. J. Hilser, *Nature* **508** (2014) 331–339.
4. T. C. B. McLeish, T. L. Rodgers, M. R. Wilson, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **26** (1961) 1–20.
5. M. Gaczynska, P. A. Osmulski, *Antioxid. Redox Signaling* **21** (2014) 2286–2301.
6. S. R. Tzeng, C. G. Kalodimos, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21** (2011) 62–67.
7. A. W. Fenton, *Allostery Methods and Protocols*, Humana Press, Kansas City, 2012, str. 117–132.
8. B. Kaitner, *Difrakcija rendgenskih zraka na monokristalu*, Upute za internu upotrebu, Zagreb, 1983.
9. B. Prugovečki, E. Meštrović, *Difrakcija rentgenskog zračenja u polikristalnom uzorku*, Skripta za internu upotrebu, Zagreb, 2011.
10. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 186–190.
11. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles Of Biochemistry*, W. H. Freeman And Company, New York, 2008, str. 160–166.
12. A. Cooper, D. T. F. Dryden, *Eur. Biophys. J.* **11** (1984) 103–109.
13. J. Monod, J. Wyman, J. P. Changeux, *J. Mol. Biol.* **12** (1965) 88–118.
14. D. Kern, E. R. P. Zuiderweg, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13** (2003) 748–757.
15. V. J. Hilser, E. B. Thompson, *PNAS* **104** (2007) 8311–8315.
16. J. Liu, R. Nussinov, *PloS Comput. Biol.* **12** (2016) 1–5.