

# Triptofan-sintaza: multienzimski kompleks s intramolekulskim tunelom

---

**Bošnjaković, Marta**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2015**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:433277>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**TRIPTOFAN-SINTAZA: MULTIENZIMSKI KOMPLEKS S INTRAMOLEKULSKIM  
TUNELOM**

**TRYPTOPHAN-SYNTHASE: A MULTIENZYME COMPLEX WITH AN  
INTRAMOLECULAR TUNNEL**

**SEMINARSKI RAD**

Marta Bošnjaković

Preddiplomski studij molekularne biologije

Undergraduate study - molecular biology

Mentor: prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

Zagreb, 2015.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. SINTEZA AROMATSKIH AMINOKISELINA I SINTETSKI PUT TRIPTOFANA DO KORIZMATA .....	2
3. TRIPTOFAN-SINTAZA .....	3
3.1. $\alpha$ PODJEDINICA.....	6
3.2. $\beta$ PODJEDINICA.....	8
3.2.1. Faza 1 .....	9
3.2.2. Faza 2 .....	11
4. KOMUNIKACIJA IZMEĐU $\alpha$ I $\beta$ PODJEDINICE I NJIHOVA AKTIVACIJA .....	12
5. ZAKLJUČAK .....	17
6. LITERATURA.....	18
7. SAŽETAK.....	20
8. SUMMARY .....	20

## 1. UVOD

Četiri osnovne skupine makromolekula u stanici su nukleinske kiseline, lipidi, ugljikohidrati i proteini. Proteini su nam posebno zanimljivi zbog njihovog velikog potencijala u stanici, odnosno širokog spektra djelovanja. Mogu imati enzimsku aktivnost, biti strukturni elementi, signalni receptori ili transporteri. Oni su polimeri aminokiselina. Svi organizmi, od najjednostavnijih do sve složenijih koriste set istih 20 aminokiselina prilikom izgrađivanja svojih proteina. Ovisno o primarnoj strukturi (slijedu aminokiselina), sekundarnoj (prostorni raspored aminokiselina koji se u aminokiselinskom slijedu međusobno nalaze u blizini), tercijarnoj (3D struktura jednog polipeptidnog lanca) i kvaternoj (prostorni raspored polipeptidnih lanaca kod oligomenih proteina), protein dobiva funkciju.

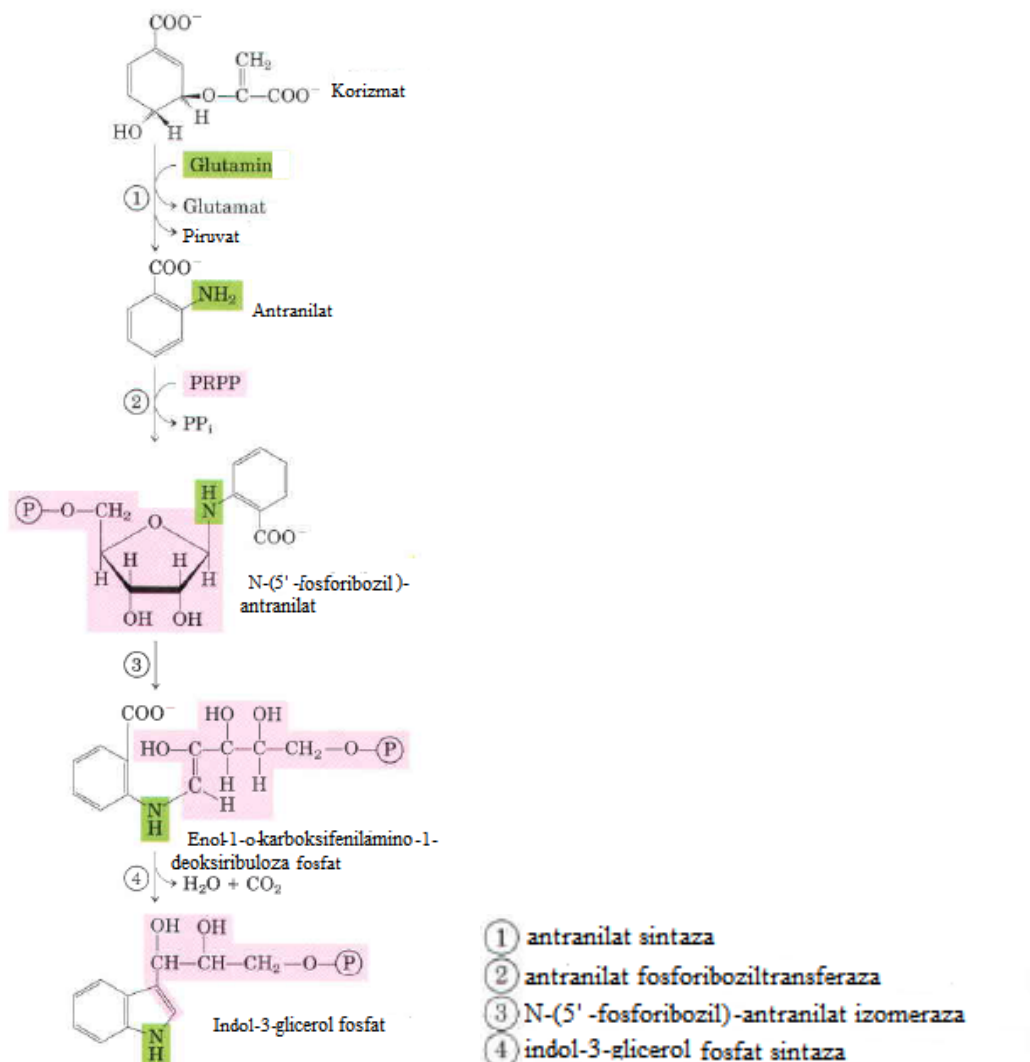
Aminokiseline prema strukturi i polarnosti njihove varijabilne skupine možemo klasificirati na nepolarne (alifatske), aromatske, polarne nenabijene, te pozitivno nabijene i negativno nabijene. Neki organizmi nemaju sposobnost sinteze svih aminokiselina te ih onda moraju unositi prehranom. No osim izgradnje proteina, aminokiseline mogu imati i različite druge uloge kao primjerice u sintezi drugih spojeva ili mogu imati funkciju neurotransmitera.

S obzirom na ovako široku i raznoliku iskoristivost aminokiselina, nije ni čudno da u samoj njihovoj sintezi možemo pronaći vrlo zanimljive makromolekularne mašinerije i preciznu regulaciju sintetskih puteva. Jedan od posebno interesantnih primjera je enzim triptofan-sintaza, bifunkcionalni enzim koji katalizira zadnja 2 koraka u sintezi triptofana.

## 2. SINTEZA AROMATSKIH AMINOKISELINA I SINTETSKI PUT TRIPTOFANA OD KORIZMATA - KORACI KOJI PRETHODE TRIPTOFAN-SINTAZI

Sinteza aromatskih aminokiselina, triptofana, fenilalanina i tirozina, događa se kod bakterija, arheja, gljiva i biljaka, ali ne i životinja. Stoga ih životinje moraju unositi prehranom. Osnovni polazni spojevi od kojih se kreće su fosfoenolpiruvat i eritroza-4-fosfat. Nizom reakcija uz NADPH, ATP te uz još jedan fosfoenolpiruvat, preko šikimata nastaje korizmat, zajednički intermedijer od kojeg dalje ide grananje u tri smjera za sintezu spomenutih aromatskih aminokiselina.

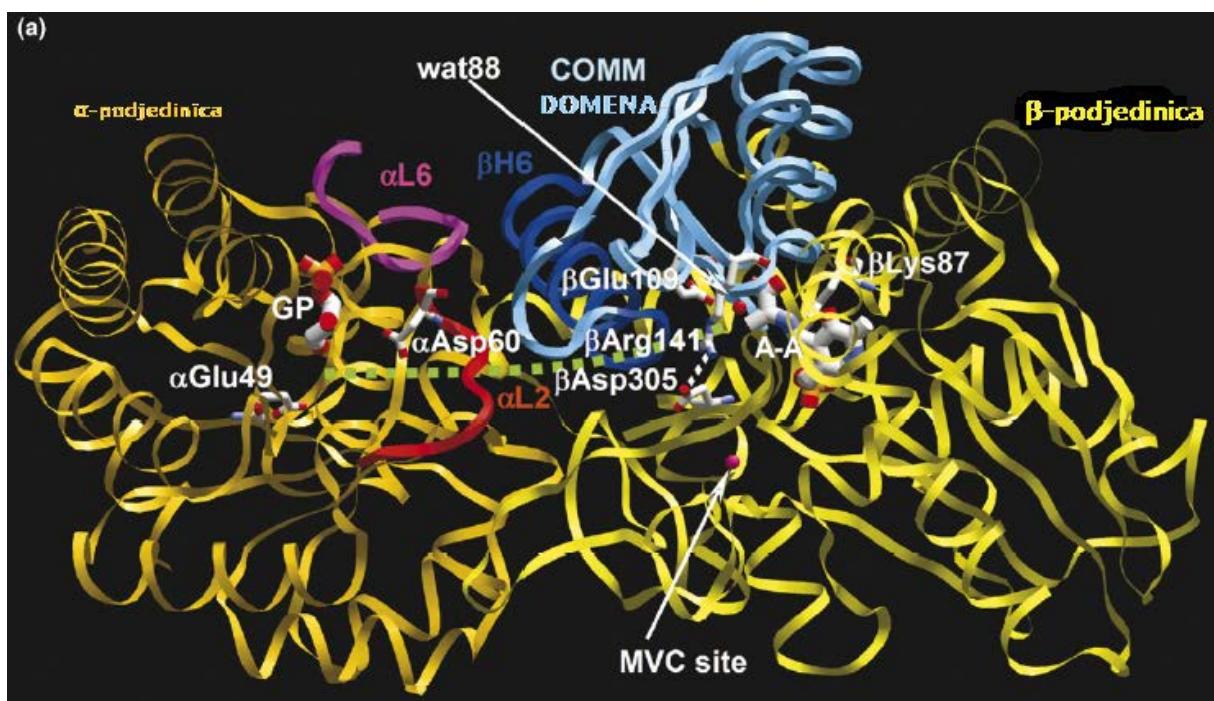
Prilikom sinteze triptofana, od korizmata sinteza dalje ide prema Slici 1. do indol-3-glicerol-fosfata.



**Slika 1.** Biosinteza triptofana iz korizmata kod biljaka i bakterija (enzimi antranilat sintaza i antranilat fosforiboziltransferaza kod bakterija su dijelovi jedinstvenog kompleksa). (Preuzeto i prilagođeno iz Lehninger, Principles of Biochemistry, sixth edition)

### 3. TRIPTOFAN SINTAZA

Posljednja dva koraka u sintezi L-triptofana katalizira enzimski kompleks triptofan-sintaza. Charles Yanofski i Irving Crawford su iz izolirane TrpS iz bakterije *Escherichia coli* otkrili da se sastoji od dvije alfa i dvije beta podjedinice koje formiraju heterotetramerni enzim građen u simetričnom rasporedu  $\alpha\beta\beta\alpha$  (Slika 2.). Osao Adachi je prvi pročistio i kristalizirao  $\alpha_2\beta_2$  kompleks (Miles 2001.). No zbog bolje kvalitete samih kristala, tek difrakcijom rentgenskih zraka na kristalu enzima dobivenom iz bakterije *Salmonella typhimurium*, određena je detaljnija struktura TrpS. Svaka samostalna podjedinica je enzimski aktivna no kada su u kompleksu dolazi do povećanja učestalosti obje reakcije kao i povećanja afiniteta za njihove supstrate i to za 1 do 2 reda veličine.



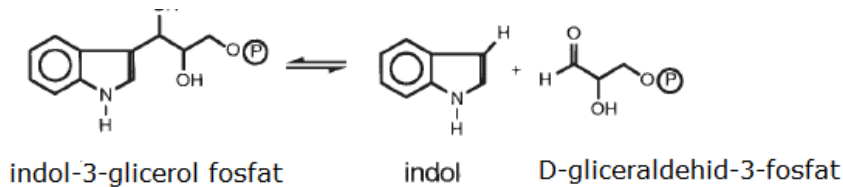
**Slika 2.** Struktura triptofan-sintaze i prikaz osnovnih katalitičkih mjesta o kojima će više biti kasnije. (Preuzeto i prilagođeno iz Dunn i sur., 2008.)

$\alpha$  podjedinica se sastoji od 268 aminokiselinskih ostataka i građena je od 8 puta ponovljenog motiva  $\alpha$  zavojnice i  $\beta$  ploče, koji onda čine strukturu  $\alpha/\beta$  bačve. Takav strukturni motiv pronađen u 10% svih poznatih proteinskih struktura (Voet, Biochemistry, fourth edition).  $\alpha$  podjedinica katalizira raspad 3-indol-D-glicerol-3'-fosfata (IGP) na indol i D-gliceraldehid 3-fosfat (G3P) (Slika 3.). Indol dalje prolazi kroz 25 Å dugačak tunel do  $\beta$  podjedinice.

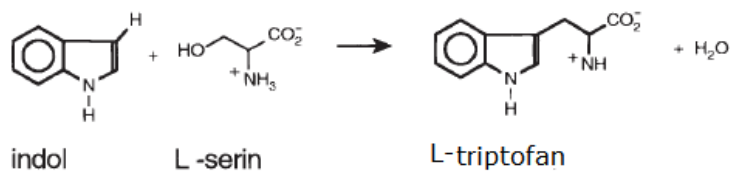
$\beta$  podjedinica se sastoji od 396 aminokiselinskih ostataka. Sadrži 2 domene koje imaju sličnu zavojnica/ploča/zavojnica strukturu. Posljednja reakcija u sintezi triptofana tu se događa zapravo u dvije faze, uz piridoksal-5'-fosfat (PLP) kao koenzim koji je smješten

između te dvije domene. U prvoj fazi vanjski aldimin L-serina (E(Aex<sub>1</sub>)) prolazi reakciju β-eliminacije pri čemu nastane vanjski aldimin α-aminoakrilata (E(A-A)). U drugoj fazi indol koji je nastao u α-aktivnom mjestu intramolekulskim tunelom dolazi do β-podjedinice i reagira s E(A-A) pri čemu nastane L-triptofan (Slika 3.).

#### α-reakcija



#### β .reakcija



**Slika 3.** Ukupne reakcije u α i β aktivnim mjestima. (Preuzeto i prilagođeno iz Miles 2001.)

No zašto je uopće potrebno usmjereno prevođenje supstrata iz jednog u drugo aktivno mjesto odnosno "substrate channeling"? Osim što se na taj način mnogostruko povećava brzina reakcije nastajanja L-triptofana, spriječena je difuzija indola u otopinu, te s obzirom na to da je indol hidrofobna, neutralna molekula, njegov izlazak iz stanice.

Kako bi reakcije na α i β podjedinici bile usklađene, i kako bi se spriječio gubitak indola, potrebna je i recipročna alosterička regulacija između samih podjedinica. Kao posljedica postoji izmjena između otvorene, slabo aktivne konformacije koja omogućava dolazak i vezanje supstrata i zatvorene odnosno visoko aktivne konformacije obaju aktivnih mjesta. Ravnoteža između tih dvaju oblika ovisi o ligandu vezanom na α aktivno mjesto i o kovalentnim intermedijerima vezanim na β mjesto, no o tome će biti rečeno nešto više kasnije.

Ovaj enzim je bio prvi u kojem je dokazan mehanizam usmjerenog prevođenja supstrata između aktivnih mjesta. Dugo vremena je smatran kao unikatan primjer, no kasnije je pronađeno još enzima s tim svojstvom, primjerice piruvat-dehidrogenaza, karbamoil-fosfat-sintaza (CPS), fosforibozilpirofosfa-amidotransferaza (GPATaza)... (Miles i sur., 1999.), a

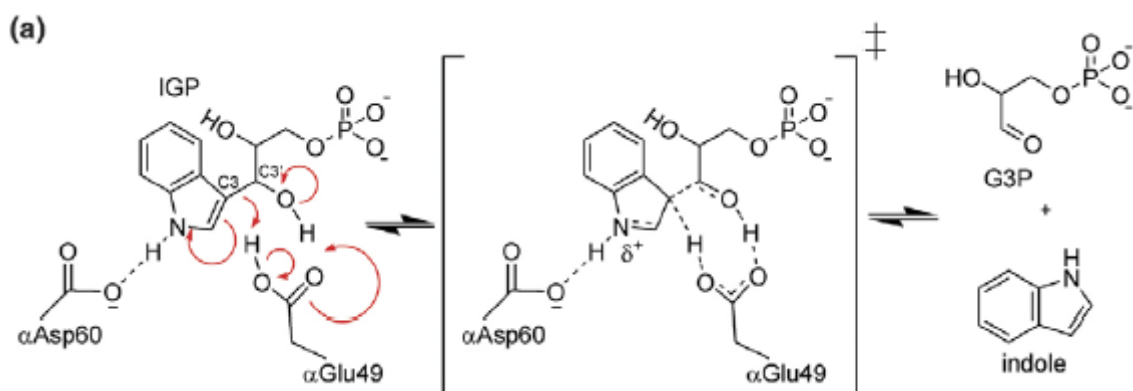
čak se smatra da i multiproteinski kompleksi kao npr. asocirani enzimi ciklusa limunske kiseline, zapravo funkcioniraju na taj način.



### 3.1. $\alpha$ -PODJEDINICA

Aminokiselinski ostatci važni za katalizu na  $\alpha$  podjedinici su  $\alpha$ Glu49,  $\alpha$ Asp60 i  $\alpha$ Thr183. Stoga je njihovo precizno pozicioniranje sustavom vodikovih veza ključno.  $\alpha$ Asp60 ima esencijalnu ulogu u stabiliziranju naboja koji nastaje na indolnom prstenu IGP-a prilikom kidanja C-C veze. Ako samo aspartat zamjeni asparagin,  $\alpha$ Asp60Asn, dolazi do destabilizacije ovih interakcija i narušavanja katalize u  $\alpha$  mjestu te gubitka alosteričke komunikacije.

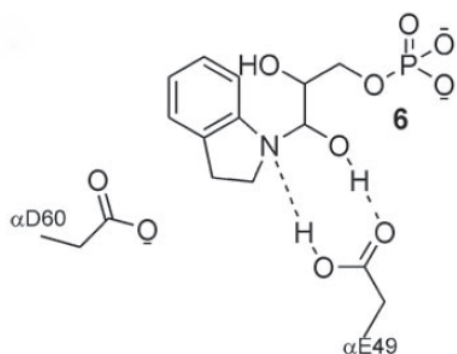
Vezanje IGP-a inducira zatvorenu konformaciju  $\alpha$  mjesta u kojoj se petlja  $\alpha$ L2 ( $\alpha$ 53 do  $\alpha$ 69, L od engleskog *loop*) pomiče prema aktivnom mjestu i orijentira petlju  $\alpha$ L6 ( $\alpha$ 179 do  $\alpha$ 193) tako da se  $\alpha$ L6 veže za  $\alpha$ L2 preko vodikove veze između  $\alpha$ Thr187 na  $\alpha$ L6 i  $\alpha$ Asp60 na  $\alpha$ L2. Zbog toga dolazi do orijentiranja  $\alpha$ Asp60 tako da može stabilizirati naboj koji nastane na indolnom atomu dušika prilikom kidanja veze između indola i G3P, odnosno C3-C3' veze IGP-a. C3'-OH proton se prenosi na atom C3 indola pomoću katalitičkog  $\alpha$ Glu49 "push-pull" mehanizmom. U različitim kristalnim strukturama se mogu vidjeti dvije različite konformacije  $\alpha$ Glu49, inaktivna koja je orijentirana od supstrata i aktivna, prema supstratu odnosno C3'-OH i C3 atomima. Stoga se pretpostavlja da je  $\alpha$ Glu49 važan u aktivaciji i deaktivaciji aktivnog mjesta na  $\alpha$  podjedinici. Metilna skupina  $\alpha$ Thr187 gura indolnu skupinu prema katalitičkom  $\alpha$ Glu49 i pomaže C3 atomu da poprimi tetraedarsku konformaciju koja je nužna za postizanje prijelaznog stanja (Slika 4. i 6.).



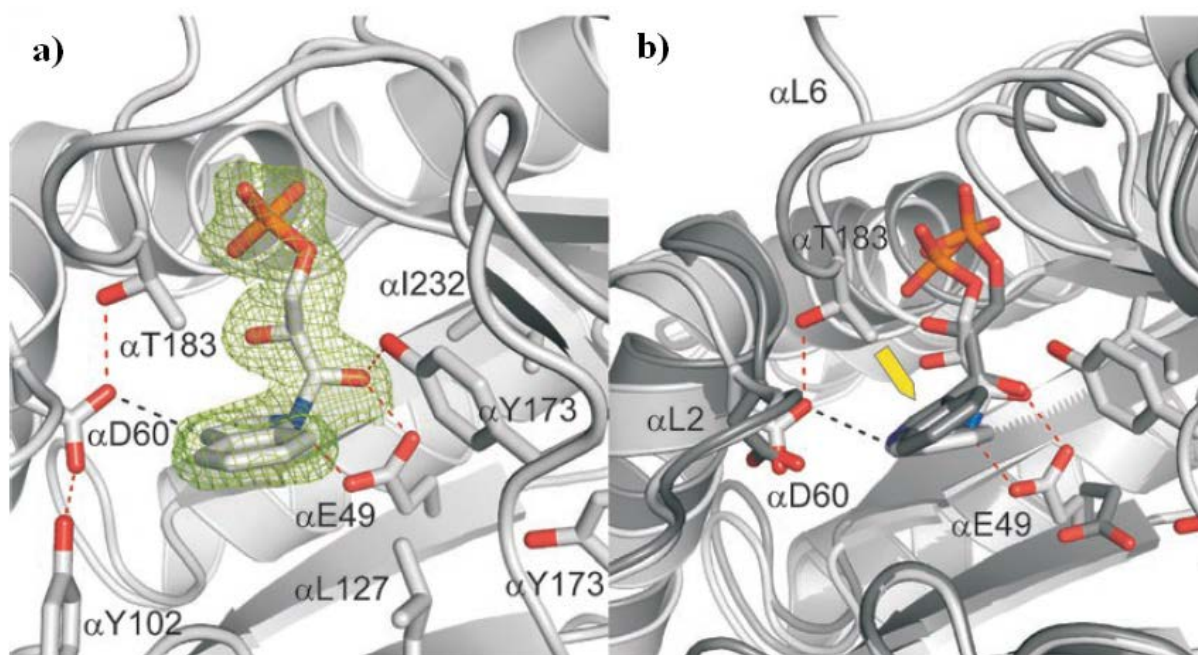
**Slika 4.** Mehanizam katalize  $\alpha$  reakcijskog mjesta. (Preuzeto iz Barends i sur., 2008a)

Za istraživanje katalitičkog mehanizma  $\alpha$  aktivnog mjesta, koristili su se ponajviše *in situ* sintetizirani analozi IGP-a nazvani ASL od engleskog *alpha-site ligands*. Kao i originalni supstrati (IGP i G3P), oni promoviraju zatvorenu konformaciju  $\alpha$  podjedinice i imaju

alosterički efekt na  $\beta$  podjedinicu. S obzirom da zapravo ne dolazi do reakcije prekidanja C-C veze između indola i G3P-a kod tih analoga, koriste se i za istraživanje prve faze  $\beta$ -reakcije, odnosno ranih alosteričkih interakcija. Kao analog prijelaznog stanja  $\alpha$  reakcije se koristi primjerice indolin-G3P prikazan na slikama 5. i 6.



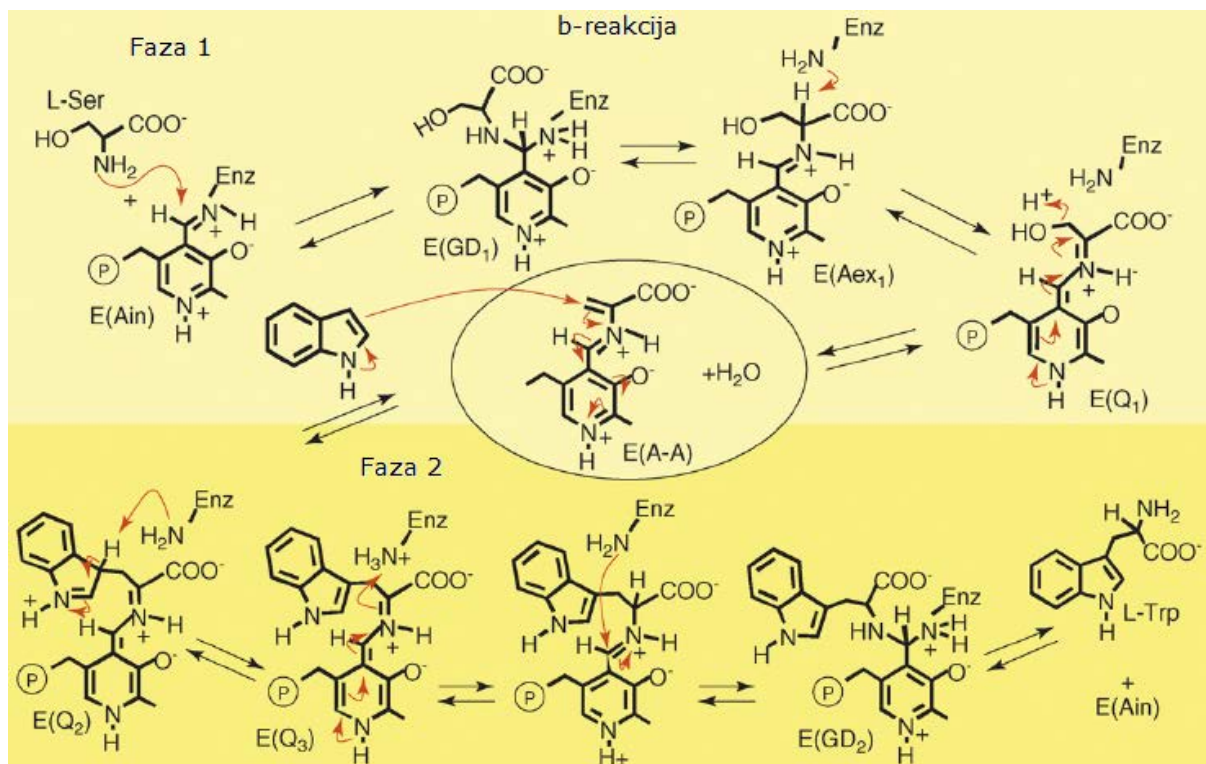
**Slika 5.** Indolin-G3P kao analog prijelaznog stanja  $\alpha$  reakcije (Preuzeto iz Barends i sur., 2008b)



**Slika 6.** Prikaz  $\alpha$  reakcijskog mjesta, a), pod b) prikaz promjena pozicija aminokiselinskih ostataka uključenih u katalizu i ostvarivanje interakcije s indolin-G3P-a koji služi kao dobar analog prijelaznog stanja. Žuta strelica označava smjer u kojem  $\alpha$ 183 djeluje na indolin tako što ga gura prema  $\alpha$ Glu49. Svijetlo sivom bojom je prikazan indolin-G3P a tamno sivom IGP. Promjene u poziciji aminokiselinskih ostataka su također prikazane odgovarajućim bojama (svijetlo siva-vezan je indolin-IGP, tamno siva-vezan je IGP). (Preuzeto iz Barends i sur., 2008b)

### 3.2. $\beta$ -PODJEDINICA

$\beta$  podjedinica u fazi 1 katalizira reakciju pretvorbe L-serina u aminoakrilat uz koji nastaje i molekula vode, a u fazi 2 reakciju aminoakrilata s indolom pri čemu nastaje L-triptofan (Slika 7.). Reakcije su potpomognute piridoksal-fosfatom (PLP), koji služi kao kofaktor te sudjelovanjem samih bočnih ogranaka enzima u katalizi. PLP je kofaktor u svim transaminacijskim reakcijama te u određenim dekarboksilacijama, deaminacijama i reakcijama racemizacije aminokiselina. Stabilizira negativne naboje na supstratu. Reakcijska specifičnost PLP enzima se može shvatiti korištenjem Dunathanove hipoteze - zbog stereoelektronskih svojstava, od tri veze vezane na  $\alpha$ -ugljikov atom koji je vezan za PLP, ona koja je okomita na ravninu PLP  $\pi$ -sustava će biti najlakše pokidana (Barends i sur., 2008a). PLP je vezan kao unutrašnji aldimin (imin analog aldehida) odnosno Schiffova baza preko  $\epsilon$ -amino grupe lizinskog ostatka, točnije  $\beta$ Lys87 u TrpS. Takvo vezanje PLP-a je karakteristično za gotovo sve enzime kojima on služi kao kofaktor.  $\beta$ Lys87 djeluje kao glavna kiselinobazna katalitička skupina prilikom prijenosa protona na  $\alpha$ -C atom vanjskog aldimina i na indolni prsten, na C-3 atom, prilikom pretvorbe E(Q<sub>2</sub>) u E(Q<sub>3</sub>) (kvinoidni intermedijeri enzima u fazi 2, nazvani tako jer njihove strukture nalikuju kvinonu) te kao nukleofil u reakcijama pretvorbi unutrašnjih i vanjskih aldimina. (Slika 7.)



**Slika 7.** Reakcije  $\beta$  aktivnog mjesta enzima TrpS: Faza 1 (svijetlo žute boje) i Faza 2 (tamnija žuta)

boja). Različiti intermedijeri na  $\beta$  reakcijskom mjestu: E(Ain)-unutrašnji aldimin enzima, E(Aex<sub>1</sub>)-vanjski aldimin L-serina, E(A-A)-vanjski aldimin  $\alpha$ -aminoakrilata, E(Q<sub>1-3</sub>)-kvinonidni intermedijer, E(GD<sub>1-2</sub>)-gem-diamin (Preuzeto i prilagođeno iz Dunn i sur., 2008.)

Iduća važna aminokiselina je  $\beta$ Glu109. Ima dvije osnovne uloge: u fazi 1 djeluje kao osnovni kiselinsko-bazni katalizator za pretvorbu E(Aex<sub>1</sub>) (vanjski aldimin L-serina) u E(A-A) preko E(Q<sub>1</sub>) (kvinoidni intermedijer enzima u fazi 1) te u fazi 2, stabilizacija naboja kako bi se omogućio nukleofilni napad indola na E(A-A) pri čemu nastaje E(Q<sub>2</sub>).

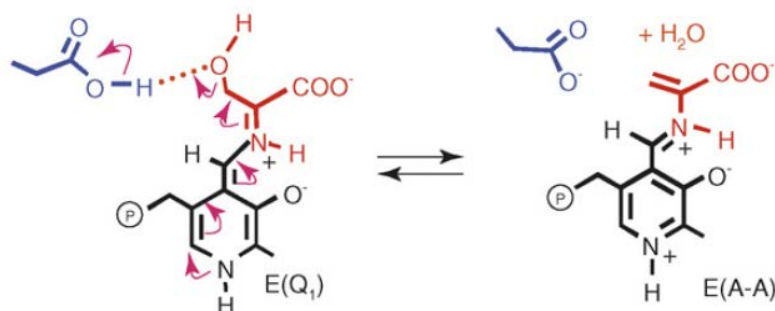
### 3.2.1. Faza 1

Kod TrpS, petlja  $\beta$ L3 ( $\beta$ 109- $\beta$ 115), na COMM domeni o kojoj će biti više kasnije, formira specifično vezno mjesto za karboksilnu skupinu supstrata. To je dokazano uvođenjem točkastih mutacija, primjerice  $\beta$ Thr110Val TrpS varijant u kojem zbog nove metilne skupine na valinu dolazi do smanjenja sposobnosti formiranja vodikove veze s karboksilatom. U fazi 1, L-Ser brzo reagira s unutrašnjim aldiminom, E(Ain), čime nastaje oblik koji se naziva gem-diamin, odnosno označava sa E(GD<sub>1</sub>).

Kinetičke studije su pokazale da strukture E(Ain)(S) i E(GD) imaju  $\alpha$  podjedinicu u otvorenoj konformaciji, što nužno povlači i činjenicu da je i  $\beta$  podjedinica također u otvorenoj konformaciji. Oblici enzima E(Aex<sub>1</sub>) i E(Aex<sub>2</sub>) (vanjski aldimini) također su u inaktivnom obliku, parcijalno zatvorenim konformacijama obaju podjedinica, što je u ovom slučaju i direktno pokazano kristalnim strukturama dobivenim pomoću supstratnih analoga.

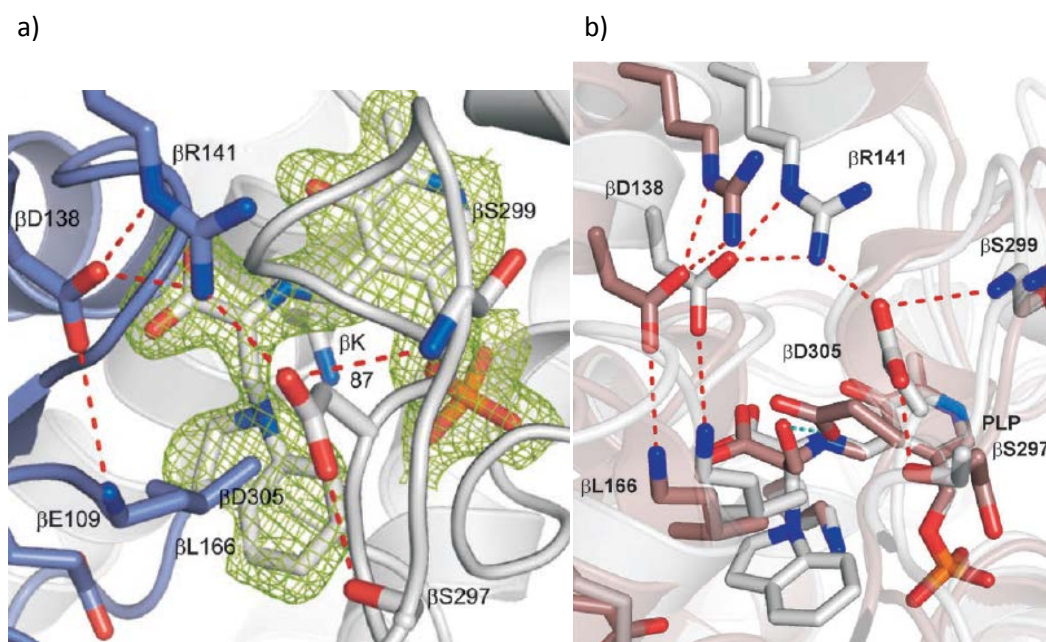
E(Aex<sub>1</sub>) hidroksil je savijen od  $\beta$ Glu109, na udaljenosti od oko 7 Å, te je povezan vodikovom vezom s dušikom iz okosnice  $\beta$ Ala112 i na karboksilnu skupinu  $\beta$ Asp305. U 3 od 5 nativnih kompleksa E(Aex<sub>1</sub>),  $\beta$ Glu109 je ograničen vodikovim vezama na molekulu vode, koja je također vodikovom vezom povezana s Aex<sub>1</sub> karboksilatom (Dunn i sur., 2008.). Svrha tih interakcija je stabilizacija E(Aex<sub>1</sub>) oblika u odnosu na E(Q<sub>1</sub>) i E(A-A) u otvorenoj konformaciji čineći tako eliminaciju hidroksila nepovoljnom. Također, ni  $\beta$ Asp305 karboksilat nije dostupan za formiranje ionskog mosta s  $\beta$ Arg141 i vodikovom vezom s  $\beta$ Ser297, što je nužno za ostvarivanje zatvorene konformacije.

Za izmjenu u zatvorenu konformaciju, otvorena inaktivna konformacija E(Aex<sub>1</sub>) β podjedinice mora rotirati hidroksilnu skupinu na Aex<sub>1</sub> na novi položaj na kojem stvara vodikove veze sa βGlu109. (Slika 8. i 9.)



**Slika 8.** Predložena uloga βGlu109 u fazi 1 (Preuzeto iz Dunn i sur., 2008.)

U zatvorenoj strukturi, ε-NH<sub>2</sub> od βLys87 je pozicioniran za prebacivanje protona prema α-C atomu.



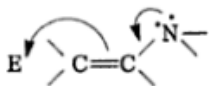
**Slika 9.** Prikaz β aktivnog mjesta pod a). Na slici pod b) je prikazana usporedba otvorene(smeđe boje) i zatvorene(sive boje) konformacije odnosno promjena pozicija aminokiselinskih ostataka. Otvorena struktura riješena je pomoću analoga F9 (N-(4'-trifluorometoksybenzensulfonil-2-aminoetil-fosfat)), u kompleksu oblika F9E(Aex<sub>1</sub>), a zatvorena pomoću (indolin-G3P)E(Q<sub>indolin</sub>) kompleksa. (Preuzeto iz Barends i sur., 2008b)

Promjena konformacije uključuje promjenu pozicije COMM domene koja primiće α-C atome βArg141 i βAsp305 bliže za oko 1,3 Å, pomiče βAla112 dalje od Aex<sub>1</sub> za oko 0,8 Å i zakreće

$\beta$ Asp305 karboksilat za  $100^\circ$  kako bi se formirao ionski most između njega i  $\beta$ Arg141. Zbog toga dolazi do nastanka novih vodikovih veza i kidanju određenih starih što za posljedicu ima rotaciju hidroksila za  $120^\circ$ - $130^\circ$  što omogućava da zamijeni vodu u E(A-A) strukturi i dođe u blizinu  $\beta$ Glu109. O promjeni konformacija će biti rečeno nešto više kasnije.

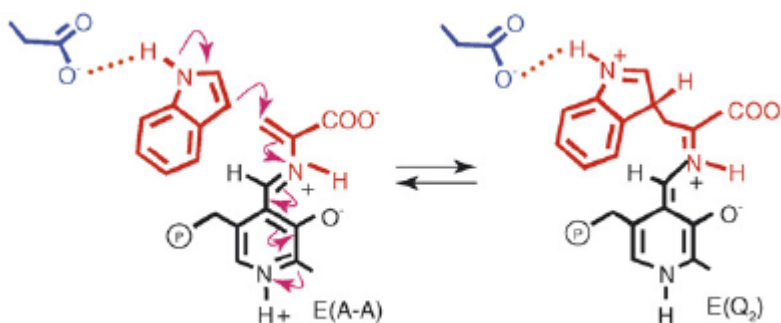
### 3.2.2. Faza 2

Faza 2 sinteze L-Trp započinje nukleofilnim napadom C-3 atoma indola na  $\beta$ -C atom E(A-A). C-3 je vrlo efikasan nukleofil zbog svojih enaminskih karakteristika. (Slika 8.)



**Slika 10.** Opća shema nukleofilnog napada enamina (Preuzeto iz Enamines: Synthesis: Structure, and Reactions, second edition)

U prijelaznom stanju na indolnom dušiku postoji velika količina pozitivnog naboja. Pretpostavlja se da upravo  $\beta$ Glu109, odnosno njegova karboksilna skupina ima glavnu ulogu u stabiliziranju nastalog naboja. Ovo je posebno dokazano kod vrste E(Aex<sub>2</sub>), odnosno vanskog aldimina u fazi 2, kod koje je i povezana vodikovom vezom za indolni atom dušika.



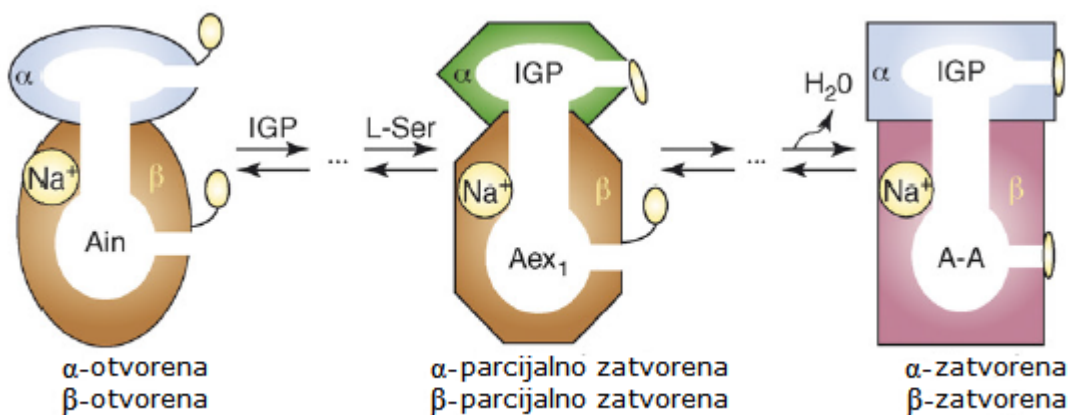
**Slika 11.** Predložena uloga  $\beta$ Glu109 u fazi 2 (Preuzeto iz Dunn i sur., 2008.)

Deprotonacijom kvinonoidne vrste E(Q<sub>2</sub>) nastaje E(Q<sub>3</sub>) a u tome pomaže kiselinско-bazni katalizator  $\beta$ Lys87. Također,  $\beta$ Leu166 se pomiče u aktivno mjesto pri čemu zajedno sa  $\beta$ Phe306 i  $\beta$ Thr190 se formira džep u koji se veže indol.

#### 4. KOMUNIKACIJA IZMEĐU $\alpha$ I $\beta$ PODJEDINICE I NJIHOVA AKTIVACIJA

Kako bi mogli akomodirati različite intermedijere i katalizirati međusobne kemijske transformacije, svi enzimi, pa tako i TrpS, moraju imati fleksibilna aktivna mjesta. Istraživanja su pokazala da se okidač za pretvorbu između otvorene i zatvorene konformacije cijelokupnog enzima, nalazi upravo na  $\beta$  podjedinici. Prvo dolazi do pretvorbe  $\beta$  podjedinice iz otvorene, inaktivne u zatvorenu, aktivnu. Aktiviranjem  $\beta$  podjedinice odnosno nastankom E(A-A) oblika enzima,  $\alpha$  podjedinica se također dodatno aktivira (25 puta više nego kada je  $\beta$  mjesto inaktivno) i mijenja konformaciju iz otvorene u zatvorenu. Sve to je potrebno kako bi se izbjegao gubitak indola, vrlo vrijednog intermedijera, te kako bi reakcije na dva aktivna mjesta bile usklađene. Iako su aktivna mjesta udaljena čak 25 Å, komunikacija između njih je vrlo precizno regulirana.

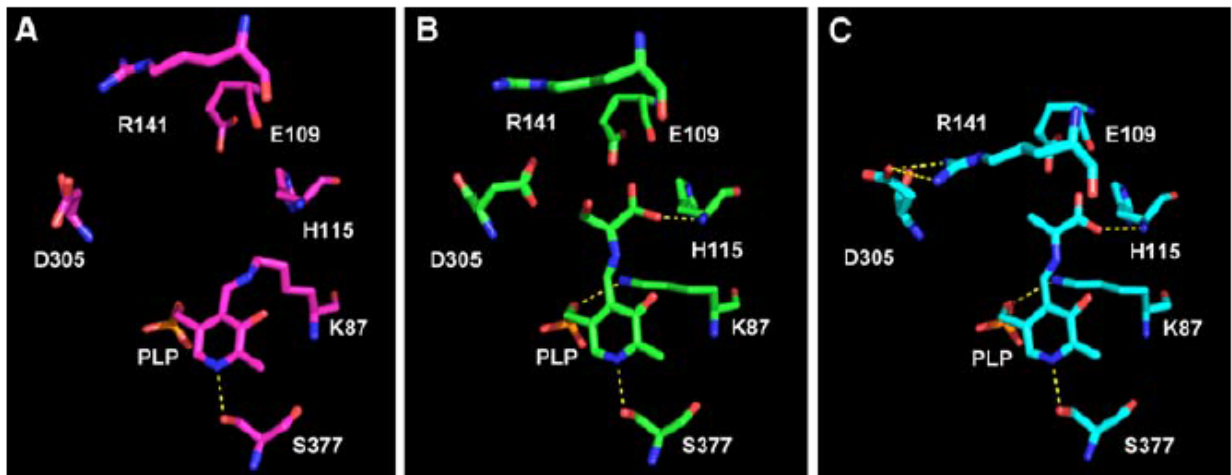
Samo u slučaju kada je  $\beta$  podjedinica u obliku potpuno zatvorene konformacije E(Q) ili E(A-A) (vanjski aldimin  $\alpha$ -aminoakrilata), dolazi do aktiviranja  $\alpha$ -mjesto, dok ga konverzija u obrnutom smjeru deaktivira (Slika 12.).



**Slika 12.** Aktiviranje  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinica-podjedinice u otvorenom i parcijalno zatvorenom stanju pokazuju nisku katalitičku aktivnost za razliku od onih u zatvorenom. (Preuzeto iz Dunn i sur., 2008.)

Parcijalno zatvorena, još uvijek inaktivna konformacija kompleksa E(Aex1) je stabilizirana s vodikovim vezama između  $\beta\text{Asp305}$  i  $\beta\text{Ala112}$  te hidroksilne skupina samog E(Aex1). Prilikom prebacivanja u zatvorenu konformaciju, ove vodikove veze se narušavaju, a kako se COMM domena (o kojoj će više biti rečeno u idućem paragrafu) pomiče na novu

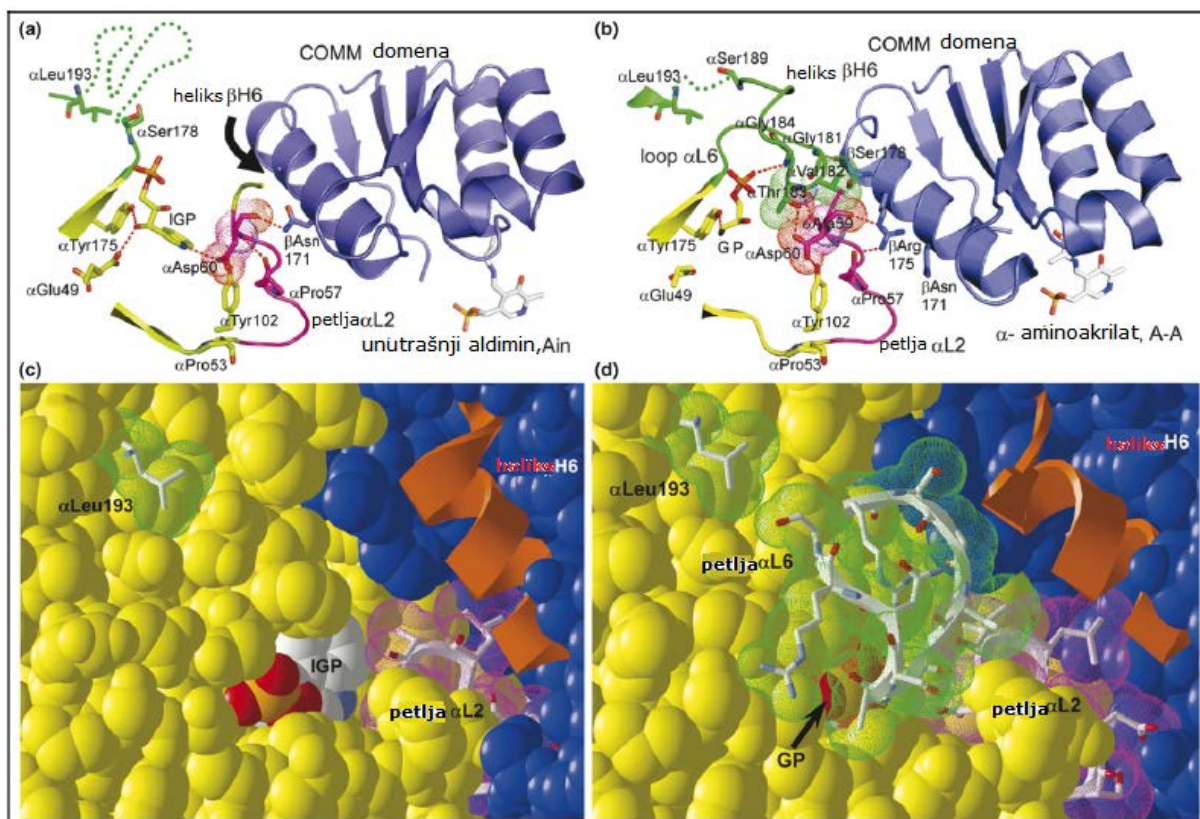
poziciju, hidroksilna skupina Aex1 se rotira i formira vodikovu vezu s  $\beta$ Glu109 (kiselinski katalizator). Za to vrijeme  $\beta$ Asp305 i  $\beta$ Arg141 formiraju ionski most s vodikovim vezama prema  $\beta$ Ser297 i  $\beta$ Ser299 (Slika 13). (Dunn i sur., 2008.)



**Slika 13.** Promjene u  $\beta$  podjedinici (aktivnom mjestu) prilikom konformacijske promjene iz otvorene u zatvorenu konformaciju, različite faze katalize. Pod a) je prikazan oblik E(Ain) pod b) E(Aex) a pod c) E(A-A) u prisutnosti liganda  $\alpha$ -podjedinice, G3P-a (Preuzeto iz Raboni i sur., 2009.)

Strukturni element koji služi za koordinaciju između  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinice je domena koju formiraju aminokiselinski ostaci  $\beta$  podjedinice,  $\beta$ 102- $\beta$ 189, a zove se pomična ili COMM domena (eng. *communication*). Upravo njezino pozicioniranje definira otvoreno ili zatvoreno stanje  $\beta$  podjedinice (u otvorenom stanju je PLP slobodan dok u zatvorenom zbog primicanja COMM domene prema PLP-u, nije). Unutar same COMM domene je zavojnica  $\beta$ H6 ( $\beta$ 165- $\beta$ 181) (H od engleskog *helix*) koja je centar za alosteričku komunikaciju između podjedinica. U otvorenoj konformaciji  $\beta$ Asn171 na  $\beta$ H6 interagira s  $\alpha$ Asp60 na  $\alpha$ L2 petlji, dok u zatvorenoj konformaciji  $\beta$ H6 je pomaknuta za jedan okret zbog zatvaranja  $\alpha$ L6 petlje i dolazi do postavljanja  $\beta$ Arg175 u kontakt s  $\alpha$ Asp60 i  $\alpha$ Pro57 te formiranja vodikove veze između  $\alpha$ Gly181 na  $\alpha$ L6 i  $\beta$ Ser178 na  $\beta$ H6 (Barends i sur. 2008a). Također, pretpostavlja se da interakcije između  $\beta$ H6,  $\alpha$ L2 i  $\alpha$ L6 u zatvorenom stanju potpomažu zatvaranje i  $\alpha$ -mjesta. Iako se COMM domena dosta pomakne prilikom prelaska iz jedne u drugu konformaciju enzima, primjerice neki aminokiselinski ostatci se pomaknu za 5 Å u odnosu na  $\alpha$  podjedinicu, konformacija same COMM domene se ne promjeni previše. Najveća se promjena zapravo dogodi u petlji koja povezuje  $\beta$ H5 i  $\beta$ H6 zavojnice te u prvih nekoliko  $\beta$ H6 aminokiselina. (Slika 14.)





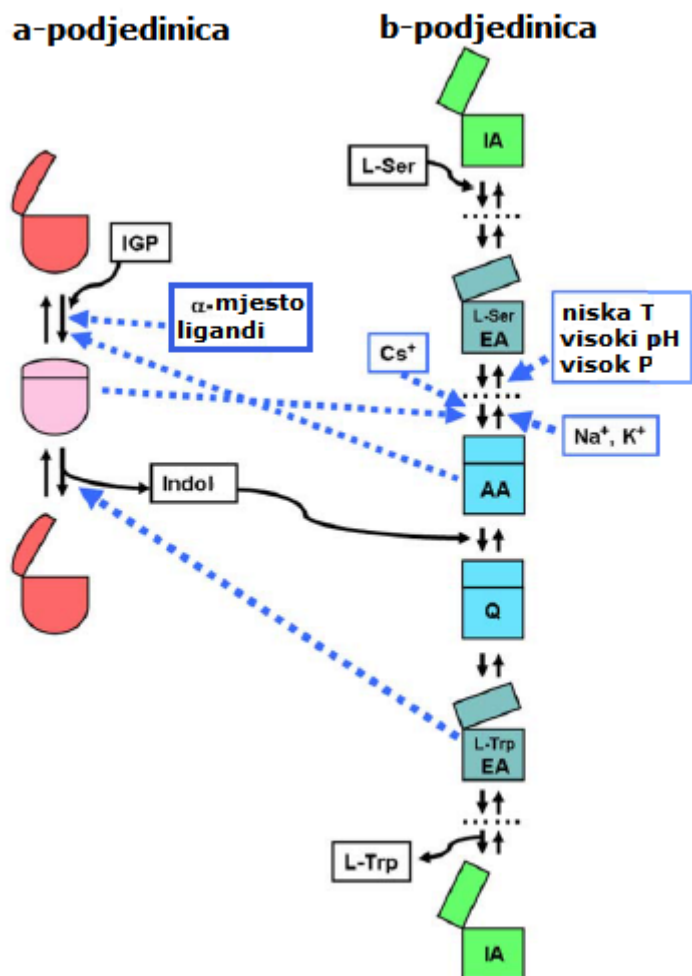
**Slika 14.** Usporedba otvorene (a i c) i zatvorene konformacije (b i d) TrpS sa prikazom ključnih razlika na  $\alpha$  mjestu i COMM domeni. (Strukturni model otvorene konformacije je IGP-E(A-A) oblik enzima a zatvorene GP-E(A-A)); Oznake: COMM domena- plave boje, petlja  $\alpha$ L2-magenta, petlja  $\alpha$ L6-zelena; IGP-u sredini, žute boje, Ain (unutrašnji aldimin) sive boje; štapićasti prikaz molekula-crveno=kisik, plavo=dušik.  $\alpha$ Glu49 karboksilat u otvorenoj strukturi zauzima 2 konformacije, vodikovim vezama povezanu za  $\alpha$ Tyr175 i na IGP-ov hidroksil.  $\alpha$ Asp60 karboksilat je vodikovom vezom povezan za dušik indolskog prstena IGPa. U otvorenoj strukturi 14 aminokiselinskih ostataka petlje  $\alpha$ L6 fale i prikazani su sa zelenim točkicama dok ih je u zatvorenoj na isti način prikazano samo 3. Pretvorba otvorene konformacije pod a) u zatvorenu pod b) uzrokuje pomicanje heliksa  $\beta$ H6 i COMM domene (prikazano crnom strelicom pod a) prema  $\alpha$  podjedinici i pod b) se vidi da rezultira u pozicioniranju ak. ostataka  $\alpha$ 180- $\alpha$ 192 petlje  $\alpha$ L6, i nastanku novog seta vodikovih veza i van der Waalsovih interakcija između petlji  $\alpha$ L6 i  $\alpha$ L2 te heliksa  $\beta$ H6. Stabilizirajuće interakcije koje osigurava pozicioniranje  $\alpha$ L6 uključuju: van der Waalsove kontakte između petlji  $\alpha$ L6 i  $\alpha$ L2 (prikazano istočkanim površinama); vodikove veze između  $\alpha$ Gly181- $\beta$ Ser178,  $\alpha$ Thr183- $\alpha$ Asp60,  $\alpha$ Ala59- $\beta$ Arg175,  $\alpha$ Ala59- $\alpha$ Thr183 and  $\alpha$ Pro57- $\beta$ Arg175; i GP vodikove veze prema  $\alpha$ Gly184 i  $\alpha$ Tyr175. c) i d)  $\alpha$  podjedinica je prikazana žuto a  $\beta$  plavo, prikazane su van der Waalsove površine. Heliks  $\beta$ H6 je prikazan kao smeđa zavojnica. Petlje  $\alpha$ L2 i  $\alpha$ L6 su prikazane štapićima a za  $\alpha$ L2, van der Waalsove površinske interakcije su prikazane u magenta boji, dok su za  $\alpha$ L6 prikazane u zelenoj boji. Na slici pod c) nije prikazan  $\alpha$ L6 (osim  $\alpha$ Leu 193) zbog njegove neuređenosti što indicira da je u otvorenoj konformaciji  $\alpha$  mjesto dostupno. Petlja  $\alpha$ L6 je savijen preko otvora  $\alpha$  mjesta na petlju  $\alpha$ L2 u zatvorenoj konformaciji. (Preuzeto i prilagođeno iz Dunn i sur., 2008.)

Vežna energija IGP-a osigurava najveći dio energije potrebne za promjenu  $\alpha$  podjedinice u zatvoreni oblik, ostatak je povezan s konformacijskom promjenom  $\beta$

podjedinice kao što je već opisano. No također, i reakcije koje se zbivaju na  $\alpha$  mjestu utječu na  $\beta$  podjedinicu, pa tako vezanje G3P-a primjerice povećava afinitet  $\beta$  aktivnog mjesta za aminokiseline.

Petlje  $\alpha$ L2 i  $\alpha$ L6 imaju ključne uloge u vezanju liganda i samom prijenosu informacije na  $\beta$  podjedinicu. Obje petlje u kristalnoj strukturi pokazuju slabu elektronsku gustoću što znači da su relativno fleksibilne odnosno neuređene. Zatvaranje petlje  $\alpha$ L6 prilikom vezivanja G3P-a je dalje stabilizirano konformacijskom promjenom u  $\beta$  podjedinici koju uzrokuje L-serin. Zbog zatvaranja petlje dolazi do izoliranja aktivnog mjesta  $\alpha$  podjedinice od otapala i nastajanja novih interakcija:  $\alpha$ Thr183 u  $\alpha$ L6 sa  $\alpha$ Asp60 u  $\alpha$ L2 petlji. Ova interakcija stabilizira petlju L2 čime se stabilizira interakcija aminokiselinskih ostataka sa nje sa aminokiselinama u  $\beta$  podjedinici. (Miles, 2001.)Upravo ova interakcija možda predstavlja put za recipročnu interakciju između alfa i beta podjedinice.

Mnogi drugi faktori utječu na konstantu ravnoteže između otvorenih i zatvorenih struktura, kao što su primjerice monovalentni kationi( vezno mjesto je negdje na  $\beta$  podjedinici), temperatura, otapala u kojima se izvode eksperimenti... Ukupni prikaz utjecaja koje različiti faktori mogu imati na TrpS prikazan je na Slici 15.



**Slika 15.** Efekti liganda i katalitičkih intermedijera na konformaciju  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinice TrpS

Oznake: IA-unutrašnji aldimin (otvorena konformacija), EA-vanjski aldimin (parcijalno zatvorena), AA- unutrašnji aldimin aminoakrilata(zatvorena), Q-kvinonidna vrsta (zatvorena).

Isprekidane plave linije predstavljaju alosterički efekt. Alosterički efektori su uokvireni u plave kutije a supstrati i produkti u crne. (Preuzeto iz Raboni i sur., 2009.)

## 5. ZAKLJUČAK

Saznanja o triptofan-sintazi, njezinoj građi, funkcioniranju, katalizi, aktivaciji i prijenosu informacije, važna su iz više razloga. Prvo, razumijevanje konkretno ovog enzima pomaže u razumijevanju i ostalih sličnih enzima koji dijele određene karakteristike sa TrpS. To je enzimski kompleks koji nam može poslužiti kao model za 1) "substrate channeling" 2) alosteričku komunikaciju i 3) PLP biokemiju. Drugo, nova znanja nam mogu biti korisna prilikom sinteze herbicida ili lijekova za različite bolesti iz razloga što samo dio organizama ima triptofan-sintazu. Potencijalne zarazne bolesti za koje se trenutno smatra da bi se mogle rješavati na ovaj način su primjerice uzrokovane *Chlamydom trachomatis* i *Mycobacterium tuberculosis* (Dunn i sur., 2008.).

Rezultati brojnih istraživanja su pokazali da su tri osnovne karakteristike esencijalne za efikasnu sintezu L-triptofana. Prvo, reakcija L-Serina u aktivnom mjestu  $\beta$  podjedinice prilagođava formiranje indola u  $\alpha$ -aktivnom mjestu kako indol, kao vrlo vrijedan produkt, ne bi nastajao prije vremena. Drugo, prijenos indola iz  $\alpha$  aktivnog mjesta u  $\beta$  aktivno mjesto je vrlo brz. I treće, reakcija indola i E(A-A) je izuzetno brza i ireverzibilna.

No, iako je dosta toga otkriveno u zadnjih 20-ak godina, razumijevanje triptofan-sintaze ipak još uvijek nije potpuno. Još uvijek nam nisu poznate strukture E(Ain) i E(GD), i ne zna se točno vezno mjesto za monovalentne katione. Zasada još nisu u upotrebi herbicidi i lijekovi koji se baziraju na inhibiranju TrpS, iako su istraživanja u tijeku. Upravo iz razloga što mnogo toga može imati utjecaj na promjenu konformacije TrpS iz otvorene u zatvorenu i obratno, potrebno je precizno dizajnirati eksperimente i poznavati ponašanje enzima.

## 6. LITERATURA

Barends TR, Dunn MF, Schlichting I. 2008a Tryptophan synthase, an allosteric molecular factory. *Curr Opin Chem Biol.* **12**, 593-600.

Barends TR, Domratcheva T, Kulik V, Blumenstein L, Niks D, Dunn MF, Schlichting I. 2008b Structure and mechanistic implications of a tryptophan synthase quinonoid intermediate. *Chembiochem.* **5**, 1024-8.

Cook G., 1988. Structure and physical properties of enamines. Enamines: synthesis, structure, and reactions. Cook G, Marcel Dekker, New York, 1-3

Dunn MF, Niks D, Ngo H, Barends TR, Schlichting I. 2008. Tryptophan synthase: the workings of a channeling nanomachine. *Trends Biochem Sci.* **33**, 254-64.

Smith Gorzynski J., *Organic Chemistry, Second Edition*, McGrawHill, 2007.

Pan P, Woehl E, Dunn MF. 1997. Protein architecture, dynamics and allostery in tryptophan synthase channeling. *Trends Biochem Sci.* **22**, 22-7.

Merkl R., 2007. Modelling the evolution of the archeal tryptophan synthase. *BMC Evol Biol.* **7**:59.

Miles EW. 2001. Tryptophan synthase: a multienzyme complex with an intramolecular tunnel. *Chem Rec.* **1**, 140-51.

Miles EW, Rhee S, Davies DR. 1999. The molecular basis of substrate channeling. *J Biol Chem.* **274**, 12193-6.

D.L. Nelson and M.M. Cox: *Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition*, W.H. Freeman & Co., New York, 2013., 898-901.

Raboni S., Bettati S., Mozzarelli A. 2009. Tryptophan synthase: a mine for enzymologists. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 2391–2403.

L.D. Voet and J.G. Voet: *Biochemistry*, Fourth Edition, J.Wiley and Sons, New York; 2011, 1075-1078.

## 7. SAŽETAK

Triptofan-sintaza je bifunkcionalni multienzimski kompleks koji katalizira posljednja dva koraka u sintezi triptofana. Triptofan spada u aromatske kiseline te stoga početak sinteze dijeli sa aminokiselinama fenilalaninom i tirozinom. Sintetiziraju ga prokarioti, gljive i biljke. Cilj ovog seminarskog rada je opisati građu triptofan-sintaze, potanko objasniti reakcijski mehanizam na svakoj od podjedinica te pojasniti prijenos informacija između njih. Također, triptofan-sintaza je enzim preko kojeg se mogu shvatiti određena svojstva koja posjeduju i mnogi ostali enzimi a važna su za njihovo efikasno funkcioniranje kao što su alosterička regulacija, prijenos supstrata kroz intramolekulski tunel i biokemija koenzima PLP-a (piridoksal-fosfat). Saznanja o načinu funkcioniranja ove nanomašinerije imaju i direktnu korist u primjerice dizajniranju herbicida ili lijekova protiv različitih bolesti. Usprkos tome što je struktura triptofan-sintaze poznata već dosta dugo vremena, relativno nedavno uporabom sofisticiranijih metoda istraživanja je otkrivena njezina detaljnija struktura. No, još uvijek određene intermedijalne strukture nisu riješene te su stoga potrebna i daljnja istraživanja.

## 8. SUMMARY

Tryptophan-synthase is a multienzyme complex, catalyzing the last two steps in the synthesis of tryptophan. Tryptophan is one of the aromatic acids so it shares the beginning of the synthesis with amino acids phenylalanine and tyrosine. It is synthesized by prokaryotes, fungi and plants. Here we describe the structure of tryptophan-synthase, explain in detail mechanism of the reaction at each subunit and explain the transfer of information between them. Moreover, tryptophan-synthase may be used as a model enzyme to understand certain properties that are present in many other enzymes and are important for their efficiency, like allosteric regulation, substrate channeling through the intramolecular tunnel and biochemistry of coenzyme PLP (pyridoxal-phosphate). The understanding of molecular mechanism of this nano-machine, have direct benefits, for example in design of herbicides or drugs against various diseases. Despite the fact that the structure of tryptophan-synthase is known for a quite long time, relatively recently, because of use of more sophisticated methods of research, details of the structure have been revealed. But, there are still certain intermediate structures that are unknown and therefore, further research is needed.