

Reakcije tiamin-pirofosfata

Šerić, Mateo

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:217:809683>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-21**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Mateo Šerić

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

REAKCIJE TIAMIN-PIROFOSFATA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Željka Car

Zagreb, 2022.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

15. srpanj 2022.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

23. rujan 2022.

Mentor rada: doc. dr. sc. Željka Car

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. VITAMIN B ₁	2
§ 3. DEKARBOKSILACIJA PIRUVATA	5
3.1. Kompleks piruvat-dehidrogenaze.....	5
3.2. Piruvat-dekarboksilaza	7
3.3. Piruvat-dekarboksilaza i TPP u reakcijama organske sinteze	8
§ 4. 2-KETOGLUTARAT-DEHIDROGENAZA	11
§ 5. KOMPLEKS DEHIDROGENAZA 2-KETOKISELINA RAZGRANATIH LANACA	13
§ 6. TRANSKETOLAZA	15
§ 7. ZAKLJUČAK	18
§ 8. LITERATURNI IZVORI.....	XIX

§ Sažetak

Tiamin je esencijalni mikronutrijent poznatiji kao vitamin B₁. Svoju ulogu u živim bićima iskazuje u obliku pirofosfata kao koenzim enzima te sudjeluje u katalizi nekoliko reakcija metaboličkih puteva ugljikohidrata i aminokiselina. Transketolaza, piruvat-dekarboksilaza, kompleksi piruvat-dehidrogenaze, dehidrogenaza α -ketokarboksilnih kiselina razgranatih lanaca te 2-ketoglutarat-dehidrogenaze samo su neki od enzima koji koriste tiamin-pirofosfat u svojim katalitičkim mehanizmima.

Ovaj rad sadrži pregled katalitičkih mehanizama navedenih enzima u kojima sudjeluje spomenuti koenzim. Dodatno, opisana je njihova uporaba kao potencijalnih katalizatora u reakcijama organske sinteze.

§ 1. UVOD

Enzimi, većinom proteini, su biološki katalizatori koji svoju funkciju obavljaju koristeći kompleksne strukture polipeptidnih lanaca sastavljenih od aminokiselina čiji bočni ogranci omogućuju provođenje kemijskih reakcija. Reakcije koje enzimi kataliziraju često zahtijevaju pomoć dodatnih molekula i njihovih funkcijskih skupina kako bi im katalitička aktivnost bila olakšana.¹ Kofaktori su male neproteinske molekule (koenzimi) ili metalni ioni koji uz odgovarajući enzim formiraju *holoenzime*.² *Apoenzimi*, enzimi u odsustvu svojeg kofaktora, su katalitički neaktivni enzimi i beskorisni za metaboličke procese u organizmu.³

Najčešći ioni metala koji služe kao kofaktori su magnezijevi, manganovi, cinkovi te željezo-sumpor klasteri. Koordinirani su na bočne ogranke aminokiselina i imaju ulogu u stabilizaciji prijelaznog stanja reakcije koju enzim katalizira, pozicioniranju supstrata te ulogu prenositelja elektrona u oksidoredukcijskim procesima. Navedeni ioni mogu i imati strukturnu ulogu pri čemu stabiliziraju kvaternu strukturu enzima koordinacijom bočnih ogranaka njegovih aminokiselinskih ostataka.

Koenzimi su male organske ili metaloorganske molekule koje na enzim mogu biti slabo vezane (kosupstrati) ili čvrsto pozicionirane u aktivnom mjestu enzima (prostetičke skupine). Ponašaju se kao prenositelji funkcijskih skupina te potpomažu prijelaz molekula u oblike koji su potrebni za daljnji katalitički proces. Neki enzimi mogu koristiti nekoliko kofaktora, npr. kompleks piruvat-dehidrogenaze koji će kasnije biti detaljnije obrađen.

Sredinom 20. st. utvrđeno je da koenzimi potječu od vitamina.⁴ Vitamini su organske molekule, mikronutrijenti, esencijalni za normalnu funkciju organizma. Poznato je 13 vitamina koji se dijele na one topljive u vodi ili u mastima. U vodi topljivi vitamini B skupine, među kojima je i tiamin, potpomažu niz enzimskih reakcija u metaboličkim putevima ugljikohidrata, masti i aminokiselina (Tablica 1).

Tablica 1. Najvažniji koenzimi koji potječu od vitamina B skupine i njihova uloga³

Koenzim	Vitamin	Uloga koenzima
tiamin-pirofosfat (TPP)	vitamin B ₁ (tiamin)	Dekarboksilacija, prijenos karbonilne skupine
flavin-adenin-dinukleotid (FAD)	vitamin B ₂ (riboflavin)	Prijenos dva atoma vodika u redoks reakcijama
nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD/NADP)	vitamin B ₃ (nikotinska kiselina)	Prijenos hidridnog iona u redoks reakcijama
Koenzim A (CoA)	vitamin B ₅ (pantotenska kiselina)	Prijenos acilnih skupina
Piridoksal-5'-fosfat (PLP)	vitamin B ₆ (piridoksin)	Prijenos amino skupine
Tetrahidrofolat (THF)	vitamin B ₉ (folna kiselina)	Prijenos skupina s jednim ugljikovim atomom
5'-deoksiadenozilkobalamin	vitamin B ₁₂ (kobalamin)	Reakcije intramolekulskih pregradnji, prijenos metilne skupine

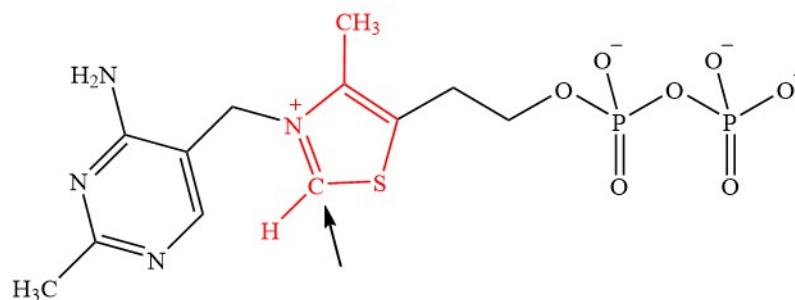
§ 2. VITAMIN B₁

Vitamin B₁ (tiamin) široko je rasprostranjen, esencijalan mikronutrijent, no većina hrane ga sadrži u maloj količini (< 1 g na 100g namirnice). Najbogatiji izvori tiamina su kvasac, razne vrste mesa (najviše svinjetina) te žitarice. Konzumacijom se apsorbira u tankom crijevu pasivnom difuzijom, a u krvi se veže na serumski albumin. U stanice ulazi pomoću tiaminskih transportera (THTR1 i THTR2) ili difuzijom gdje se brzo fosforilira u katalitički aktivni koenzim tiamin-pirofosfat (TPP).⁵

Nedostatak vitamina B₁, a time i TPP-a može uzrokovati razna oboljenja. Primjerice, beriberi je bolest srca, krvožilnog i živčanog sustava uzrokovana nedostatkom ovog mikronutrijenta u prehrani. Najčešće se pojavljuje u zemljama u kojima se prehrana sastoji od visoko prerađenih žitarica bogatih ugljikohidratima, a siromašnih vitaminima. Simptomi beriberi bolesti uključuju anoreksiju, gubitak funkcije neurona, umor te propadanje mišića i oštećenje zglobova u nogama i rukama. Zbog bitne uloge TPP-a u kataboličkom putu ugljikohidrata, prvenstveno glukoze, njegov nedostatak ima teške posljedice na mozak koji

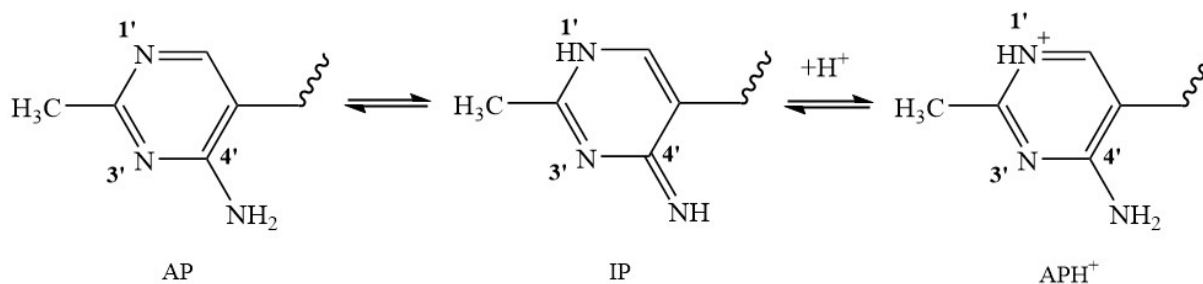
energiju dobiva uglavnom aerobnom oksidacijom tog šećera. Obzirom da se tiaminski receptori mogu inhibirati etanolom nedostatak TPP-a odnosno vitamina B₁ uočen je kod osoba koji pretjerano konzumiraju alkohol.⁶

Struktura tiamin-pirofosfata uključuje dva prstena premoštena metilenskom skupinom: aminopirimidinski i tiazolni. Na tiazolni prsten je povezana difosforilirana hidroksietilna skupina (slika 1).



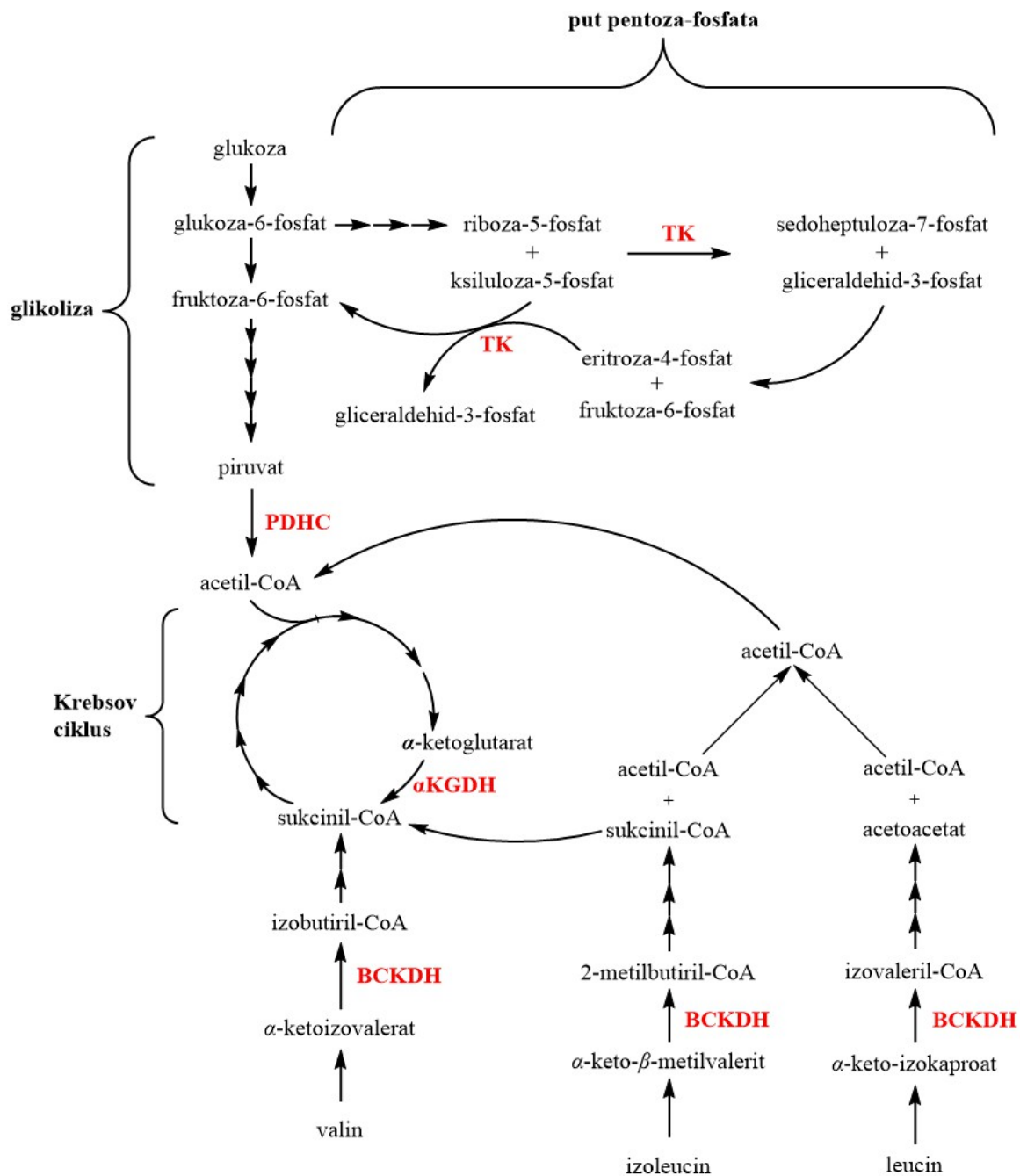
Slika 1. Struktura tiamin-pirofosfata. Crveno je označen tiazolni prsten, a strelicom njegov atom ugljika C2

Katalitički bitan dio molekule je tiazolni C2 atom koji je smješten između kvarternog dušikovog atoma i atoma sumpora. U poziciji između dva elektronegativnija elementa, C-H veza slabi i C2 atom se lako deprotonira. Uslijed gubitka protona nastaje karbanion poznat kao ilid. Nastali negativni naboj je stabiliziran susjednim pozitivno nabijenim dušikovim atomom i atomom sumpora. Negativno nabijeni C2 atom ponaša se kao nukleofil i sudjeluje u kovalentnim katalizama oksidativne i neoksidativne dekarboksilacije te reakcijama prijenosa karbonilnih skupina. Nukleofilni ilid napada elektrofilne C atome karbonilnih skupina α -ketokiselina i šećera ketoza. Postoje tri tautomerne i ionizacijske vrste aminopirimidinskog prstena (slika 2): 4'-aminopirimidin (AP), 1',4'-iminopirimidinski tautomer (IP) i 4'-aminopiridinijev kation (APH⁺).⁷



Slika 2. Tautomerne i ionizacijske vrste aminopirimidinskog prstena TPP-a

Kao koenzim, TPP sudjeluje u katalizi reakcije puta pentoze-fosfata, razgradnje aminokiselina, Krebsovog ciklusa te reakciju koja povezuje glikolizu i Krebsov ciklus (slika 3).



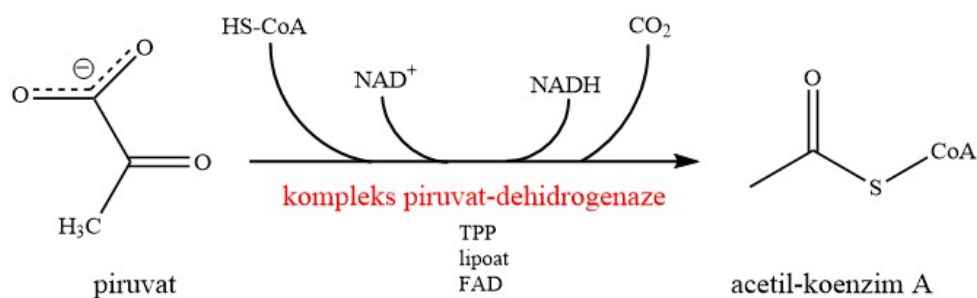
Slika 3. Shematski prikaz metaboličkih puteva u kojim TPP sudjeluje kao koenzim. Enzimi u čijoj strukturi se nalazi su: TK – transketolaza, PDHC – kompleks piruvat-dehidrogenaze, αKGDH – kompleks 2-ketoglutarat-dehidrogenaze, BCKDH – kompleks dehidrogenaza α-ketokiselina razgranatih lanaca⁵

§ 3. DEKARBOKSILACIJA PIRUVATA

Razgradnjom ugljikohidrata (uglavnom glukoze) glikolitičkim reakcijama nastaje piruvat koji ima dvije sudbine: aerobna oksidativna dekarboksilacija u acetil-koenzim A, te ovisno o organizmu, anaerobna fermentacija u laktat ili etanol. Enzimi koji kataliziraju ove procese i sadrže TPP u svojoj strukturi su kompleks piruvat-dehidrogenaze te piruvat-dekarboksilaza.

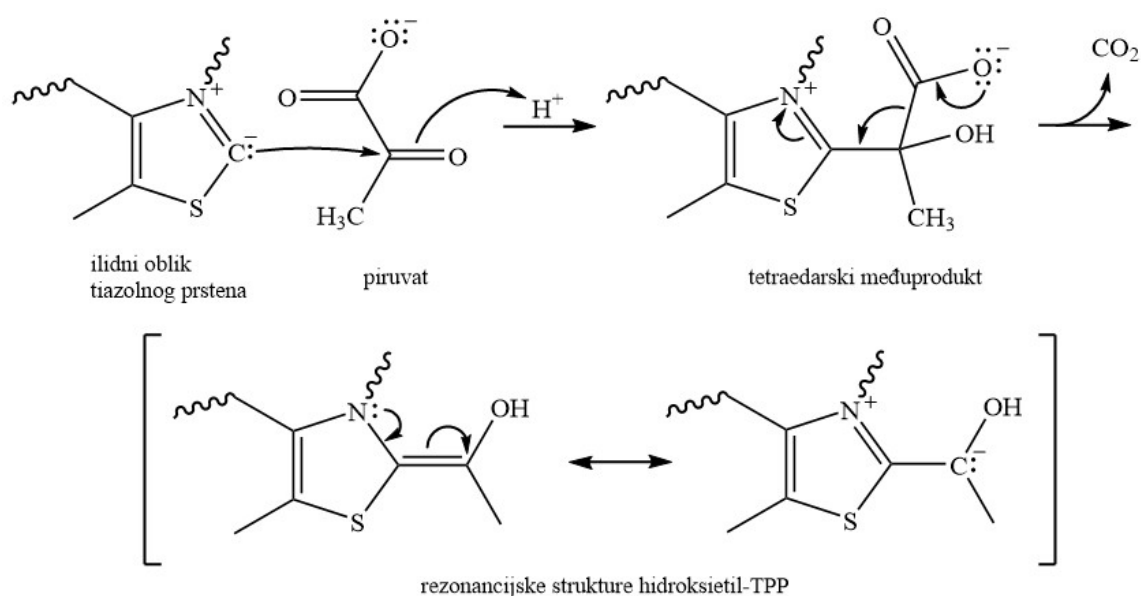
3.1. Kompleks piruvat-dehidrogenaze

Ireverzibilnu pretvorbu piruvata u acetil-koenzim A (slika 4) katalizira kompleks piruvat-dehidrogenaze (PDHC). To je mitohondrijski multienzimski kompleks koji se sastoji od tri glavne podjedinice: piruvat-dehidrogenaze (E_1), dihidrolipoamid-transacetilaze (E_2) te dihidrolipoamid-dehidrogenaze (E_3). Usklađena kataliza oksidativne dekarboksilacije piruvata u acetil-koenzim A popraćena je s dva koenzima (koenzim A i NAD^+) i tri prostetičke skupine (TPP, lipoat i FAD).² Srž kompleksa tvore E_2 komponente koje sadrže E_1 - i E_3 - veznu domenu, aciltransferaznu te lipoilnu domenu. Na amino-kraju E_2 komponente nalazi se lizinski aminokiselinski ostatak na čiji se bočni ogranak veže prostetička skupina lipoat. Tako povezan lipoat tvori katalitički vrlo važnu fleksibilnu „lipoamidnu ruku” koja omogućuje prenošenje međuprodukata između podjedinica enzima.⁶ Također, u kompleks ulaze regulatorni protein kinaza i fosfoprotein fosfataza koji kontroliraju aktivnost kompleksa reverzibilnom kovalentnom modifikacijom (fosforilacija/defosforilacija).⁶ Složena struktura kompleksa omogućuje katalitičku efikasnost i koordiniranost podjedinica.²



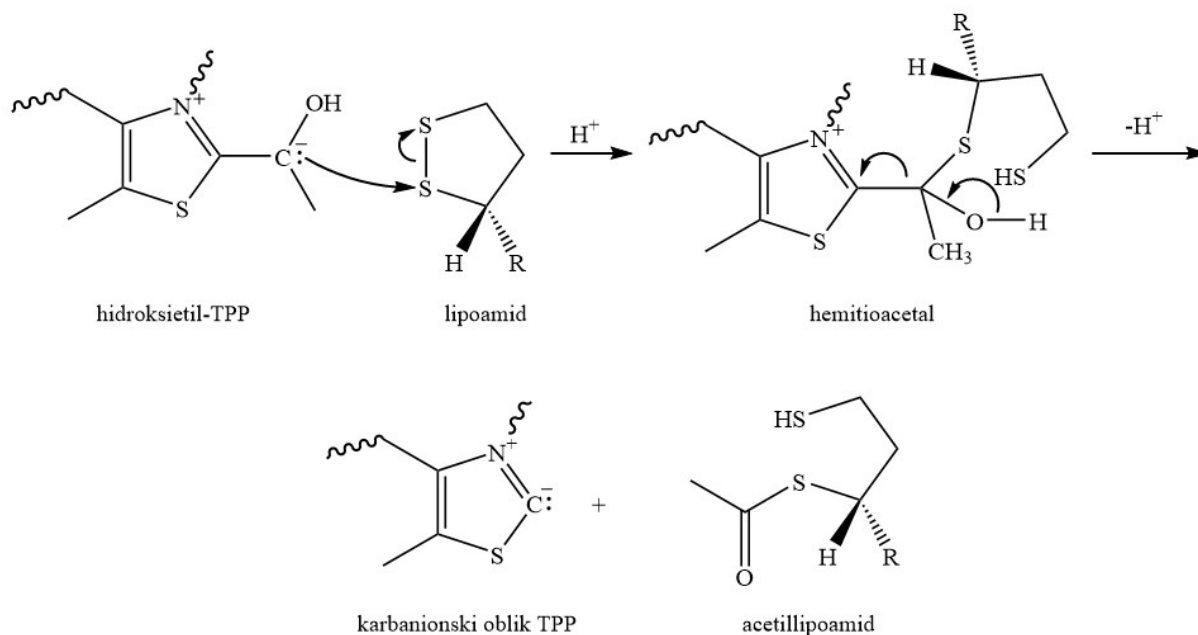
Slika 4. Reakcija prevođenja piruvata u acetil-koenzim A katalizirana kompleksom piruvat-dehidrogenaze

E_1 podjedinica je tetramerni ($\alpha_2\beta_2$) protein čija je struktura stabilizirana vodikovim vezama, ionskim mostovima te strukturnim ionom Mg^{2+} na kojeg se koordiniraju bočni ogranci aminokiselinskih ostataka sa O-donornim ligandima. Vežanjem dvije molekule tiamin-pirofosfata formiraju se dva aktivna mjesta, a C2 atom tiazolnog prstena postavlja se u blizinu bočnog ogranka s kiselinsko-baznim svojstvima (ovisno o organizmu glutamat ili histidin) koji pomaže u stvaranju tiazolnog ilida.^{8,9} E_1 sudjeluje u dvije reakcije: dekarboksilacija piruvata i prijenos acetilne skupine na lipoamidnu ruku. Katalitički mehanizam dekarboksilacije započinje nukleofilnim napadom C2 karbaniona tiazolnog prstena na elektrofilni karbonilni C atom piruvata čime nastaje tetraedarski međuprodukt (slika 5). Nadalje, dolazi do izlaska prvog produkta CO_2 , a na enzimu zaostaje vezan hidroksietil-TPP. Pozitivni naboj na dušiku omogućuje rezonancijsku stabilizaciju nastalog negativnog naboja koji se prenosi na prsten prilikom dekarboksilacije.²



Slika 5. Mehanizam dekarboksilacije piruvata kataliziran E_1 podjedinicom PDHC

E_1 podjedinica katalizira sljedeći korak, prijenos acetilne skupine na lipoamidnu ruku te regeneraciju karbanionskog oblika TPP (slika 6). Elektronima bogat karbanion hidroksietilne skupine nukleofilno napada lipoamidni atom sumpora, dolazi do pucanja disulfidne veze i nastaje hemitioacetalni međuprodukt. Slijedi oksidacija i raspad međuprodukta, izlazi regenerirani karbanionski tiamin-pirofosfat, a acetilna skupina ostaje povezana na lipoamid tioestreskom vezom.²



Slika 6. Mehanizam prijenosa acetilne skupine sa E₁ na E₂ komponentu

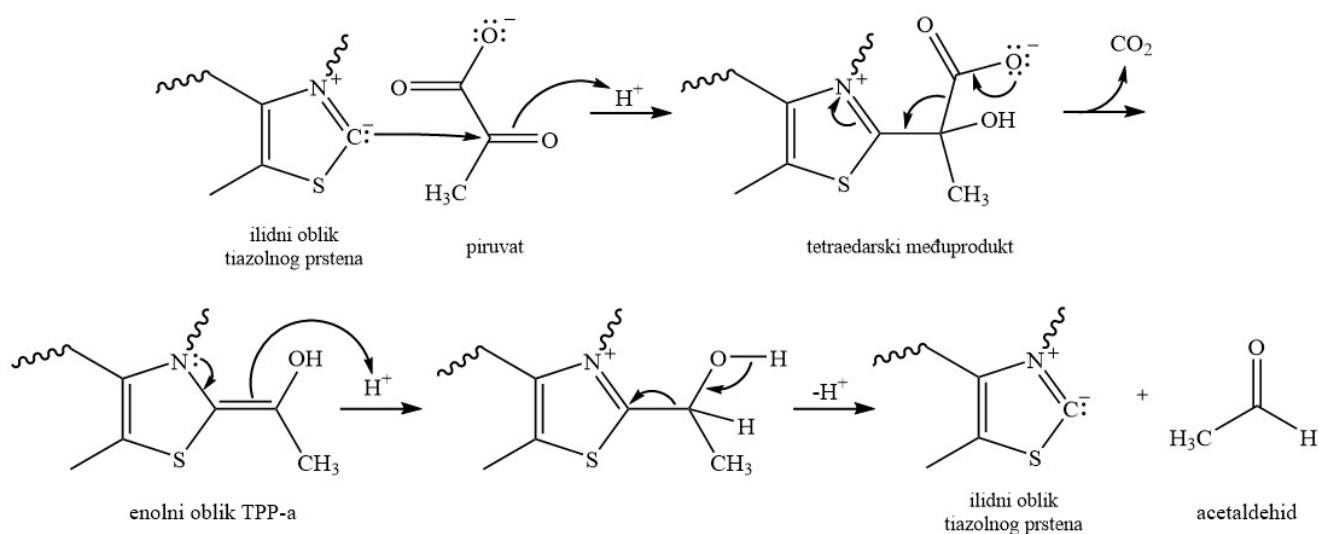
E₂ podjedinica katalizira prijenos acetilne skupine sa nastalog acetillipoamida na koenzim A te nastaje reducirani dihidrolipoamid kojeg E₃ podjedinica regenerira pomoću prostetičke skupine FAD. Oslobođeni acetil-koenzim A svoj put nastavlja u Krebsovom ciklusu.²

3.2. Piruvat-dekarboksilaza

Anaerobnu fermentaciju etanola u kvascima i bakterijama kataliziraju dva enzima: piruvat-dekarboksilaza (PDC) i alkohol dehidrogenaza. PDC katalizira neoksidativnu dekarboksilaciju piruvata u acetaldehid. Za aktivnost enzima potrebni su ion Mg²⁺ i prostetička skupina TPP. Uz aldehid u reakciji nastaje i CO₂ što je razlog dizanja tijesta pri uporabi, primjerice, pekarskog kvasca.⁶

PDC iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* je homotetramer (dimer dimera) sa dva aktivna mjesta. Vezanje tiamin-pirofosfata na enzim potpomognuto je ionom magnezija kojeg koordiniraju pirofosfatna skupina TPP-a te bočni ogranci aminokiselinskih ostataka enzima. Također su uočene vodikove veze između bočnih ogranaka proteina i aminopirimidinskog prstena TPP-a. U aktivnom mjestu je ključan i bočni ogranak glutamata čija je uloga deprotoniranje tiazolnog prstena.¹⁰

Mehanizam katalize započinje deprotonacijom tiazolnog prstena i napadom nastalog karbaniona na karbonilnu skupinu piruvata (slika 7). Protonirani bočni ogranak glutamata predaje proton na negativno nabijeni kisikov atom. Nastupa ireverzibilna dekarboksilacija međuprodukta nakon čega zaostaje rezonancijski stabilizirani enolni oblik TPP-a. Protonacijom enola i deprotonacijom hidroksidne skupine dolazi do izbacivanja slobodnog acetaldehida.



Slika 7. Mehanizam neoksidativne dekarboksilacije piruvata u acetaldehid

3.3. Piruvat-dekarboksilaza i TPP u reakcijama organske sinteze

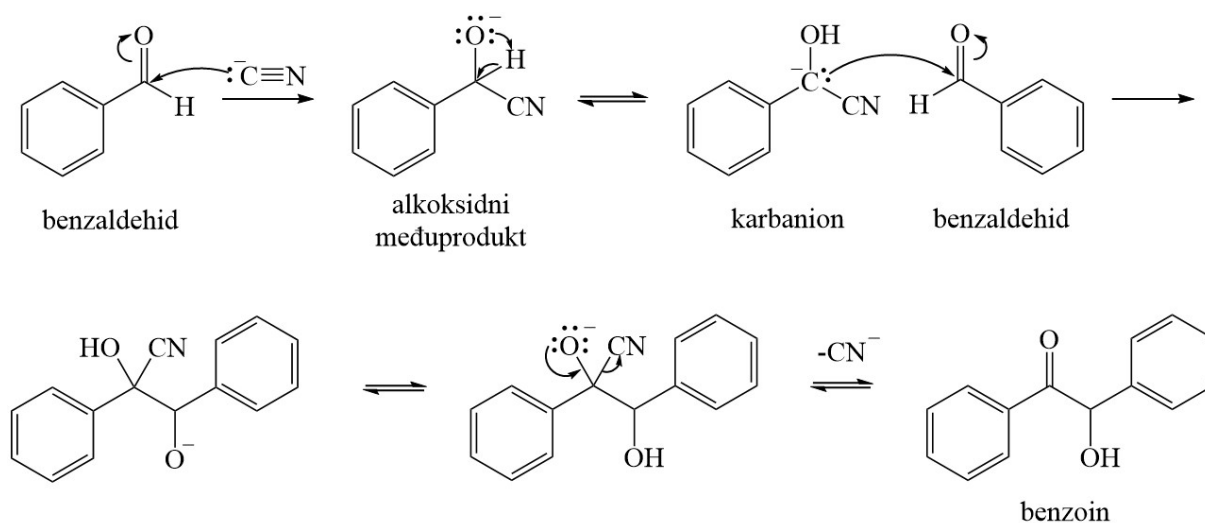
Istražen je katalitički potencijal TPP-ovisnih enzima kao ekološki održiva i potencijalno ekonomski isplativija metoda pripreve spojeva u organskoj sintezi. Enzimi, pa tako i oni koji sadrže TPP kao koenzim se sve više koriste za katalizu kemo-, regio- i enantioselektivnih reakcija. Osobito su zanimljivi oni enzimi koji kataliziraju reakcije u kojima C-C i C-H veze pucaju ili se stvaraju.¹¹ Jedan od tih enzima je piruvat-dekarboksilaza (PDC) iz kvasca *S. cerevisiae* koja katalizira aciloiniske i benzoinske kondenzacije ne samo na prirodnim već i na širokom spektru neprirodnih supstrata.¹²

Aciloiniska kondenzacija je reakcija adicije dvije molekule aldehida čime nastaje molekula α -hidroksiketona tj. aciloin. Kada se radi o kondenzaciji alifatskih aldehida reakcija se provodi u prisutstvu elementarnog natrija i mehanizam je radikalski. Ako u reakciji sudjeluju aromatski aldehidi radi se o tzv. benzoinskoj kondenzaciji koju je moguće provesti u

blažim uvjetima. Međumolekulska klasična benzoinska kondenzacija uobičajeno kataliziraju cijanidne soli u vodenoj otopini etanola.¹³

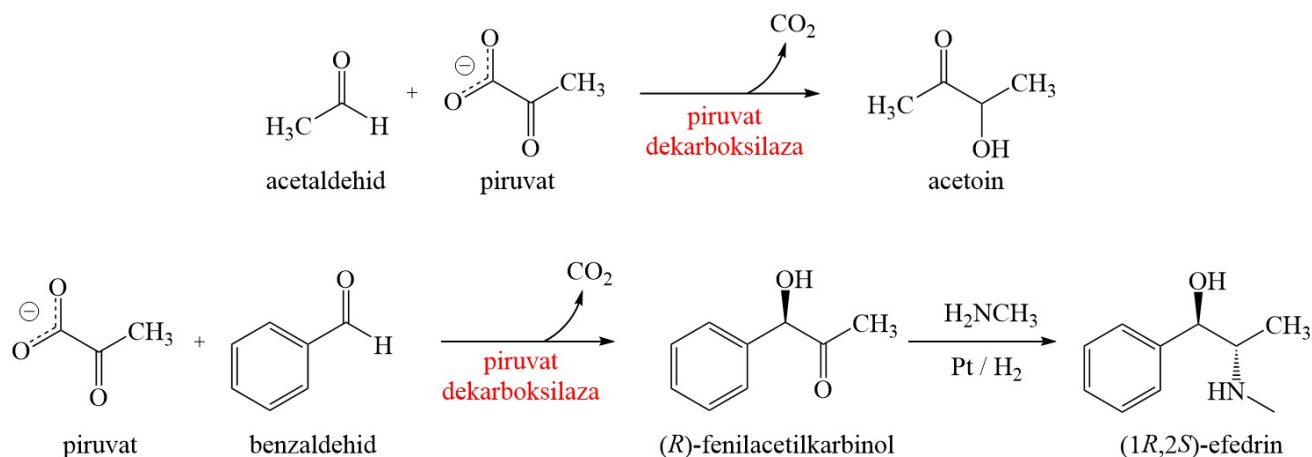
Mehanizam klasične benzoinske kondenzacije sastoji se od nekoliko koraka (slika 8):

- cijanidni anion nukleofilno napada karbonilnu skupinu prve molekule aldehida
- preuređivanjem nastalog međuprodukta (alkoksida) nastaje karbanion
- karbanion nukleofilno napada karbonilnu skupinu druge molekule aldehida
- koraci deprotonacije i protonacije alkoksidnih skupina
- izlazak cijanidnog aniona i formiranje aciloinskog produkta



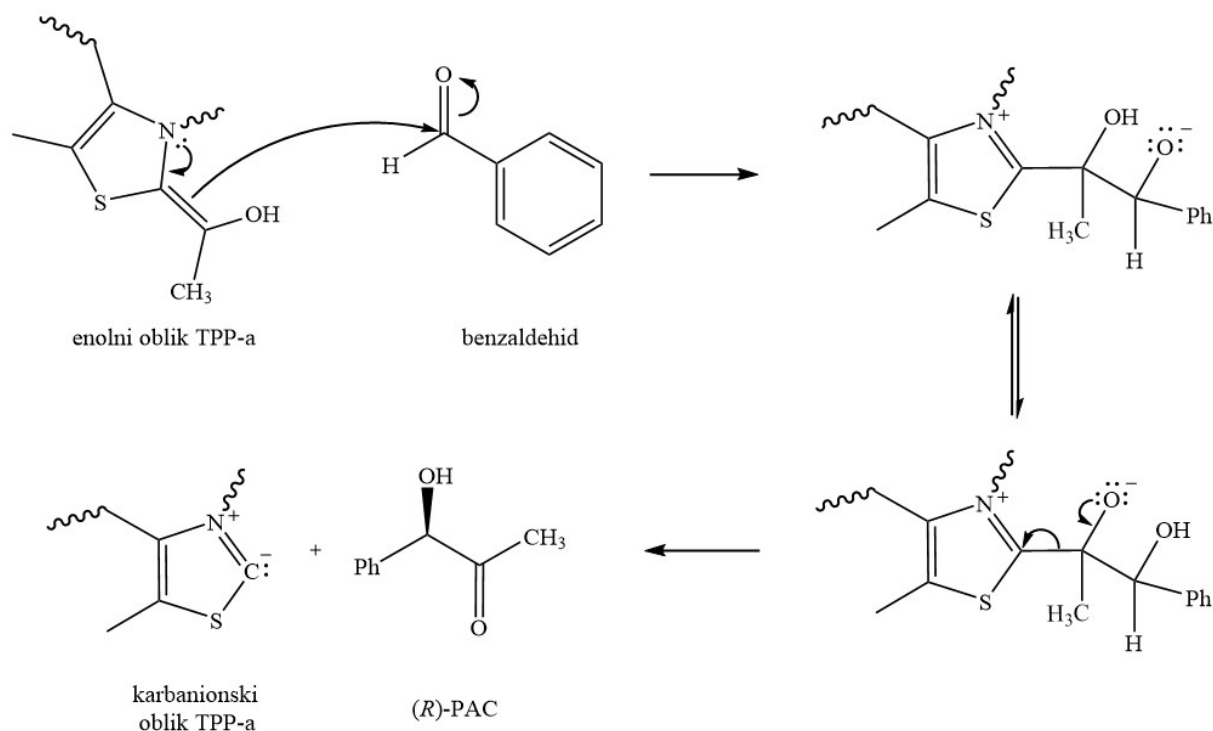
Slika 8. Mehanizam klasične benzoinske kondenzacije

U enzimskim aciloinskim/benzoinskim kondenzacijama, kataliziranim piruvat-dekarboksilazom, TPP imitira cijanidni anion.¹³ Enzimski kataliziran mehanizam reakcije pokazuje da TPP ima liaznu i karboligaznu aktivnost. Nakon dekarboksilacije piruvata u aktivnom mjestu ostaje vezan enolni oblik TPP-a, aktivirani acetaldehid koji u karbanionskom obliku može nukleofilno napasti karbonilnu skupinu druge molekule aldehida.¹² Napadom na acetaldehid nastaje acetoin (simetrični aciloin), a ako je u reakcijskoj smjesi prisutan benzaldehid (slika 9) nastaje fenilacetilkarbinol (asimetrični aciloin).¹⁴ Na ovaj način pripremljen je poznati bronhospazmolitik (1*R*,2*S*)-efedrin. Najprije je provedena enzimski katalizirana aciloinska kondenzacija pomoću PDC enzima nakon koje je uslijedio korak klasične reduktivne aminacije. Ovakvi kemo-enzimski pristupi sve su popularniji u sintezama biološki aktivnih spojeva i farmaceutika.



Slika 9. Aciloiniska kondenzacija katalizirana piruvat-dekarboksilazom na neprirodnim supstratima

U mješovitoj enzimski kataliziranoj aciloinskoj kondenzaciji moguća su četiri kiralna aciloinška produkta. Regioselektivnost i stereoselektivnost reakcije ovisi o strukturi aktivnog mjesta enzima, strukturi supstrata i reakcijskim uvjetima. U sintezi fenilacetilkarbinola (PAC) (*R*)-enantiomer je preferirani produkt što se objašnjava strukturom aktivnog mjesta enzima. Molekula aldehida koja je akceptor može enolnom obliku TPP-a prići paralelno ili antiparalelno što rezultira odgovarajućim enantiomerom produkta. Prostor dostupan za vezanje aldehida akceptora je ograničen, pa antiparalelno vezanje, koje rezultira (*S*)-enantiomerom nije sterički dopušteno.¹²



Slika 10. Mehanizam enzimski katalizirane mješovite aciloinske kondenzacije

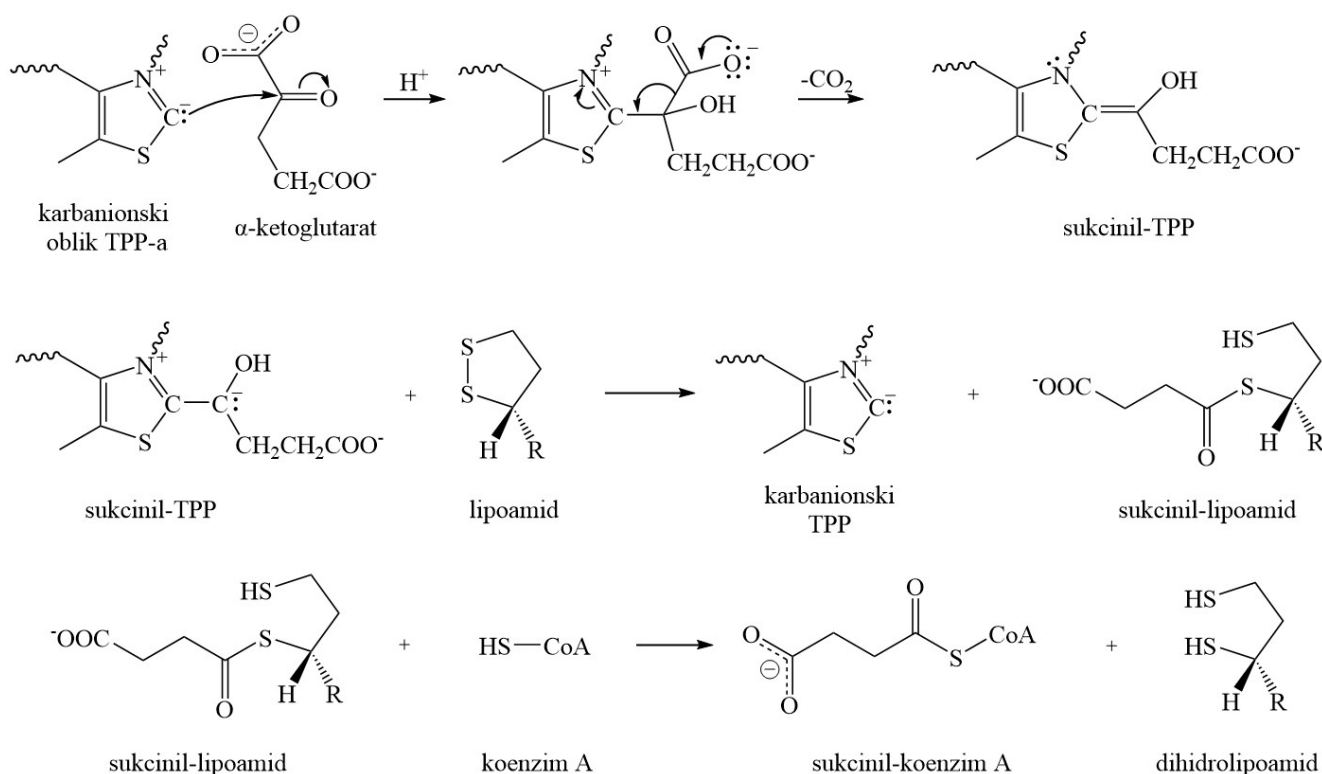
§ 4. 2-KETOGLUTARAT-DEHIDROGENAZA

Krebsov ciklus središnji je skup metaboličkih puteva stanice aerobnog organizma. Ključan je proces koji povezuje kataboličke i anaboličke reakcije metabolizma ugljikohidrata, masnih kiselina i proteina. Bitan je dio staničnog disanja u kojem kroz osam reakcija dolazi do oksidacije acetil-koenzima A u ugljikov(IV) oksid te oslobađanja reduciranih, energijom bogatih kofaktora u matriks mitohondrija. Nadalje se oslobođeni kofaktori iskorištavaju za sintezu ATP-a u oksidativnoj fosforilaciji. Također, međuprodukti Krebsovog ciklusa imaju ulogu kao prekursori u biosintezi širokog spektra biomolekula.⁶

Jednu od reakcija Krebsovog ciklusa katalizira enzimski kompleks α -ketoglutarat-dehidrogenaze. Pripada grani multienzimskih kompleksa dehidrogenaza α -keto karboksilnih kiselina uz kompleks piruvat-dehidrogenaze te kompleks dehidrogenaza α -ketokiselina razgranatih lanaca. Kao i PDHC sastoji se od 3 homologna enzima: α -ketoglutarat-dehidrogenaze (E_1), dihidrolipoamid-sukcinitransferaze (E_2) te flavoprotein dihidrolipoamid

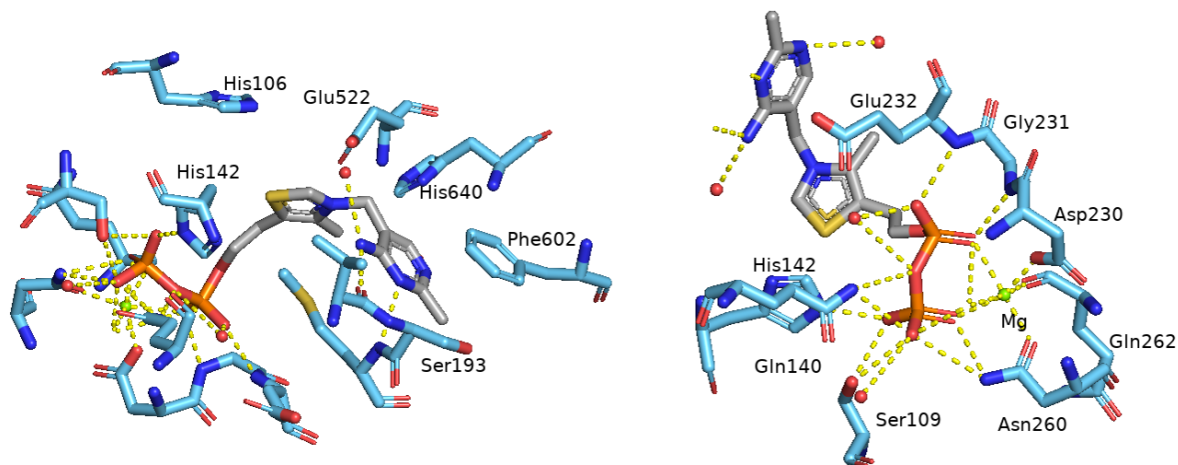
dehidrogenaze (E_3). Nevalentnim povezivanjem više kopija navedenih enzimskih komponenti nastaju masivni kompleksi molarne mase reda veličine 10^6 g mol^{-1} .¹⁵

Slično kao i kod PDHC, kompleks α -ketoglutarat-dehidrogenaze koristi pet kofaktora u katalizi: TPP, FAD, lipoamid, NAD^+ te koenzim A, a katalizira ireverzibilnu oksidativnu dekarboksilaciju α -ketoglutarata u sukcinil-CoA (slika 11). U reakciji se oslobađaju CO_2 i NADH. Katalitički mehanizam analogan je mehanizmu kompleksa piruvat-dehidrogenaze.



Slika 11. Reakcijski mehanizam kompleksa α -ketoglutarat-dehidrogenaze u kojem sudjeluje i TPP

Prema podacima difrakcije rentgenskih zraka na uzorku kompleksa α -ketoglutarat-dehidrogenaze iz *E. coli* ustanovljeno je da se u aktivnom mjestu nalazi ion magnezija, tiamin-pirofosfat, bočni ogranak glutamata te niz od 6 negativno nabijenih bočnih ogranaka (slika 12). Glutamat sudjeluje u deprotonaciji tj. aktivaciji tiazolnog prstena, a negativno nabijeni bočni ogranci omogućuju prijenos protona. Također, u aktivnom mjestu kompleksa uočeni su histidinski bočni ogranci za koje se smatra da sudjeluju u pozicioniranju α -ketoglutarata nevalentnim interakcijama.^{9,16}



Slika 12. Aktivno mjesto E₁ komponente kompleksa piruvat-dehidrogenaze. Atomske koordinate preuzete su iz baze Protein Data Bank pod kodom 1L8A. Slika je izrađena u programu PyMOL.

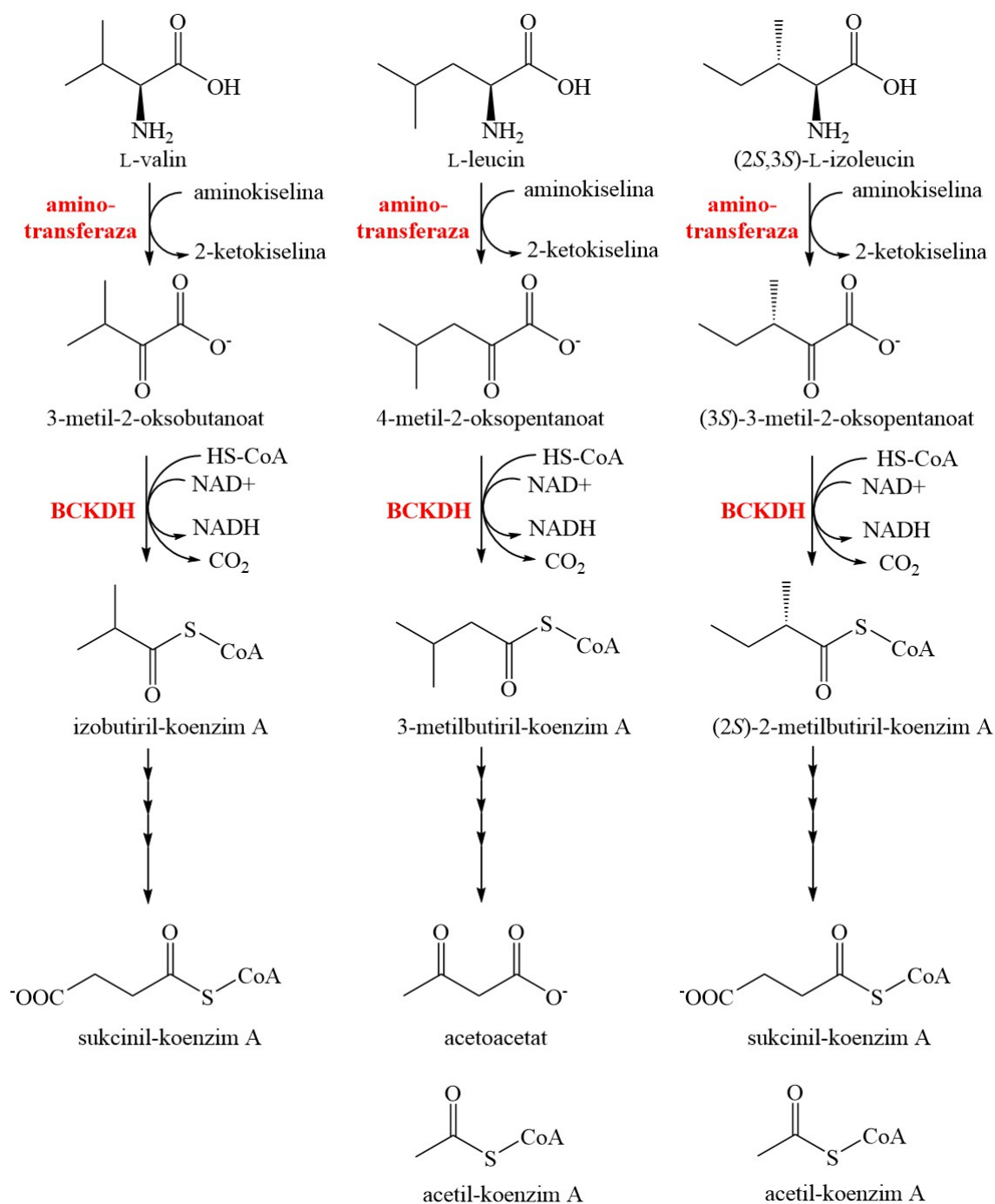
§ 5. KOMPLEKS DEHIDROGENAZA 2-KETOKISELINA RAZGRANATIH LANACA

Katabolizam aminokiselina s razgranatim bočnim ograncima (valin, leucin i izoleucin) događa se u stanicama ekstrahepatičnih tkiva. Stanice ovih tkiva sadrže dva važna enzima koji kataliziraju razgradnju navedenih aminokiselina: aminotransferaza aminokiselina s razgranatim bočnim ograncima te kompleks dehidrogenaza α -ketokiselina razgranatih lanaca (BCKDH). Prvi korak razgradnje je uklanjanje aminoskupine i prevođenje aminokiseline u odgovarajuću α -ketokiselinu (slika 13). Odgovarajuća aminotransferaza katalizira reakciju transaminacije za sve tri aminokiseline s razgranatim bočnim ograncima. Nadalje, mitohondrijski kompleks BCKDH katalizira ireverzibilnu oksidativnu dekarboksilaciju sve tri α -ketokiseline uz oslobađanje CO₂ te molekule acil-koenzima A.

Kompleks BCKDH pripada grani multienzimskih kompleksa dehidrogenaza α -keto karboksilnih kiselina i njegova struktura je homologna strukturi PDHC. Kompleks se sastoji od više kopija triju enzima: dehidrogenaza α -ketokiselina razgranatih lanaca (E₁), dihidrolipoamid transacilaza (E₂) te dihidrolipoamid dehidrogenaza (E₃). TPP kao koenzim koristi E₁ komponenta u katalitičkom mehanizmu dekarboksilacije.⁶

Mehanizam razgradnje aminokiselina pomoću dehidrogenaze započinje stvaranjem ilidnog oblika tiamin-pirofosfata, deprotonacijom C2 atoma tiazolnog prstena. Nastali

karbanion nukleofilno napada keto skupinu α -ketokiseline i nastaje tetraedarski međuprodukt. Međuprodukt se dekarboksilira i stvara rezonancijski stabilizirani enamin tj. karbanion. Kao i kod PDHC, dolazi do transacilacije sa TPP na lipoamidnu ruku E₂ komponente. Nakon nastanka acil-koenzima A nastavlja se metabolički put razgradnje aminokiselina s razgranatim bočnim ograncima do međuprodukata Krebsovog ciklusa.

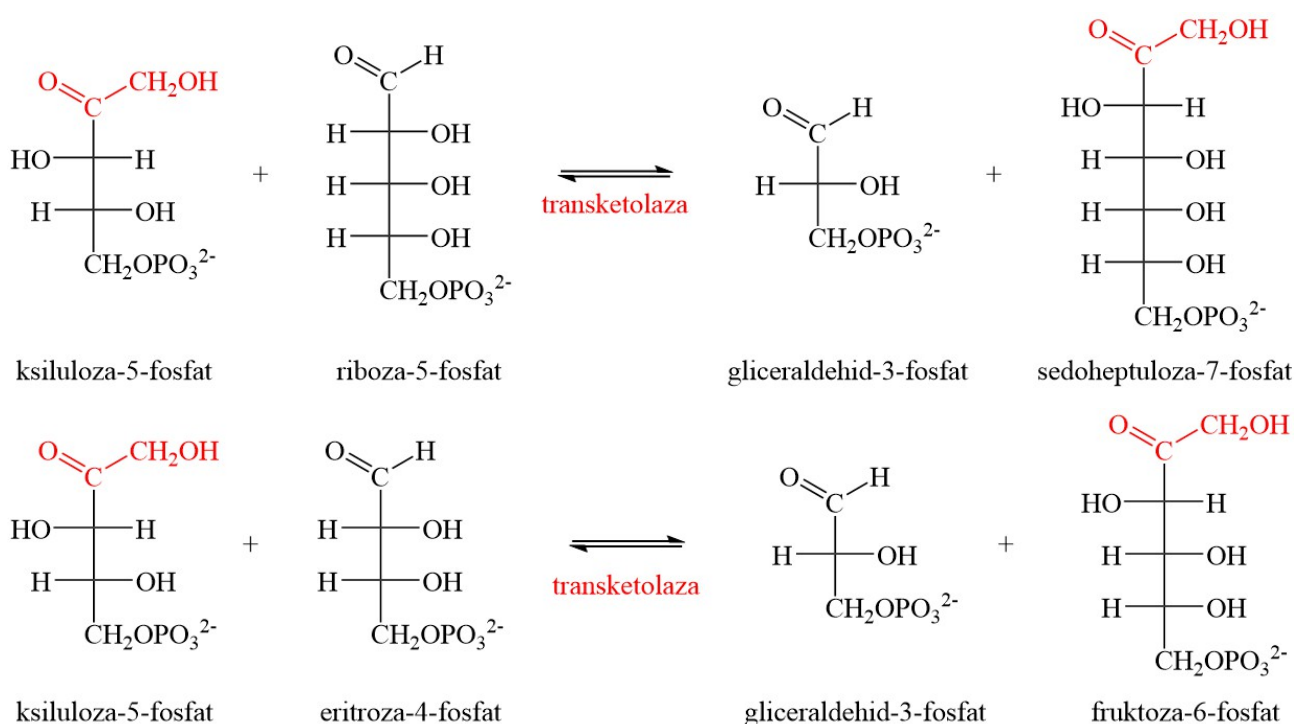


Slika 13. Put razgradnje aminokiselina s razgranatim bočnim ograncima.

§ 6. TRANSKETOLAZA

Put pentoza-fosfata je oksidativni katabolički put glukoza-6-fosfata kojim stanice stvaraju reducirani NADPH te pentoze potrebne za sintezu nukleinskih kiselina i kofaktora. Odvija se u citoplazmi stanice i dijeli se na dvije grane: oksidativnu i neoksidativnu. U oksidativnoj grani dolazi do pretvorbe glukoza-6-fosfata u ribulozu-5-fosfat uz oslobađanje NADPH te CO_2 . U neoksidativnoj grani šest nastalih ribuloza-5-fosfata se u nizu reakcija pregradnji pretvara u pet heksoza-6-fosfata (glukoza, fruktoza). Transketolaza i transaldolaza, dva su enzima karakteristična za ovaj put te kataliziraju reakcije neoksidativne grane.²

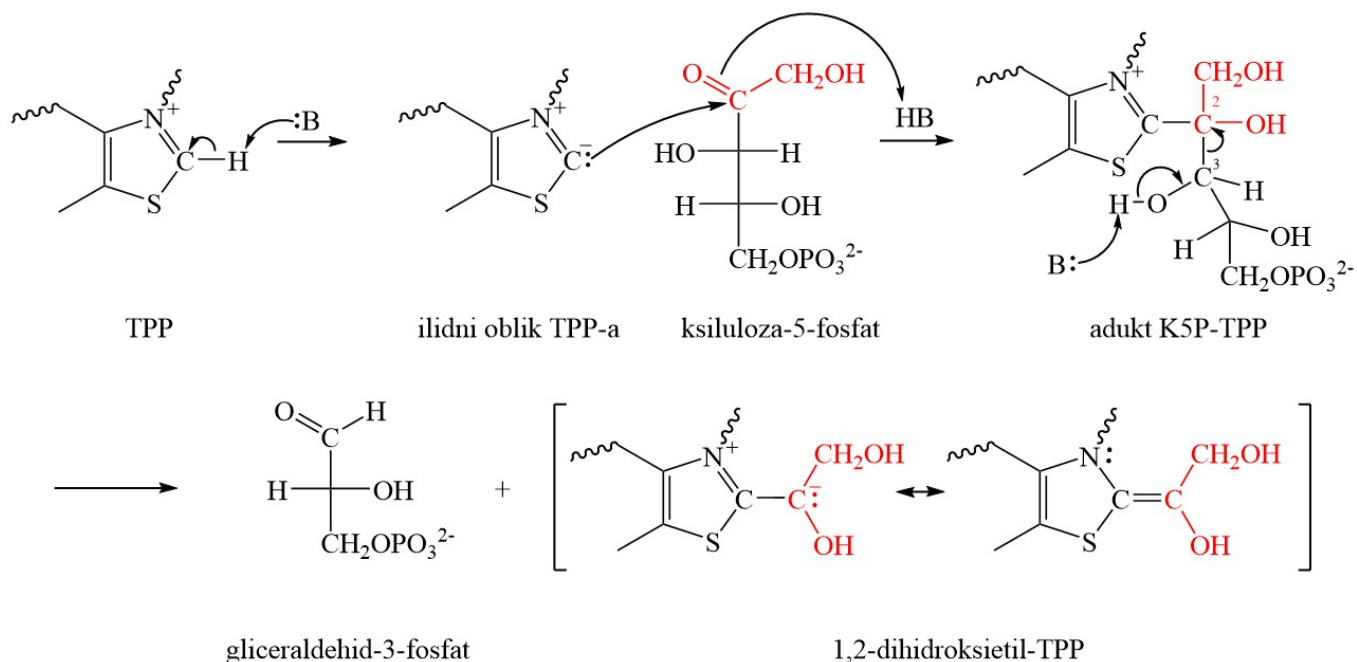
Transketolaza katalizira dvije reakcije reverzibilnog prijenosa dva ugljikova atoma sa donora ketoze-fosfat na akceptor aldozu-fosfat (slika 14). Donor je ksiluloza-5-fosfat, a akceptor obično eritroza-4-fosfat i riboza-5-fosfat. Za aktivnost enzima potrebni su tiamin-pirofosfat te ion Ca^{2+} također u ulozi kofaktora.



Slika 14. Reakcije katalizirane transketolazom

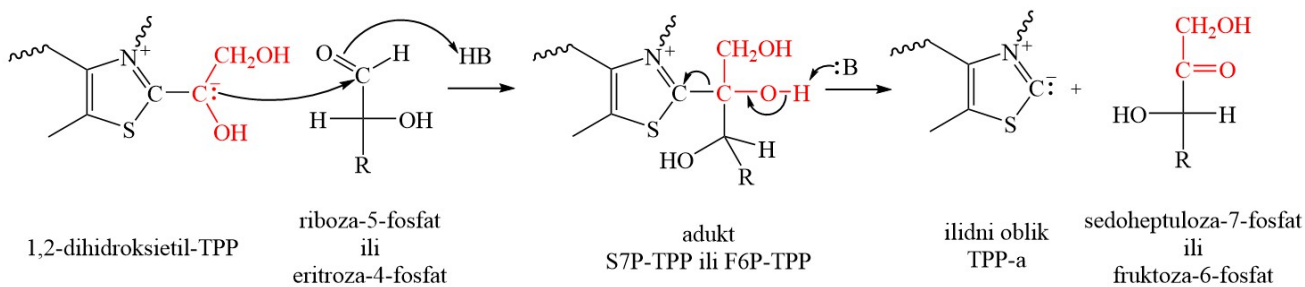
Mehanizam prijenosa (slika 15) započinje deprotonacijom C2 atoma tiazolnog prstena TPP-a te napadom istog na karbonilnu skupinu ksiluloze-5-fosfat (K5P). Protoniranjem

alkoksidne skupine nastaje adukt K5P-TPP. Cijepanjem C2-C3 veze i deprotoniranjem adukta nastaje prvi produkt, gliceraldehid-3-fosfat, a na TPP-u ostaje vezana 1,2-dihidroksietilna skupina.¹⁷



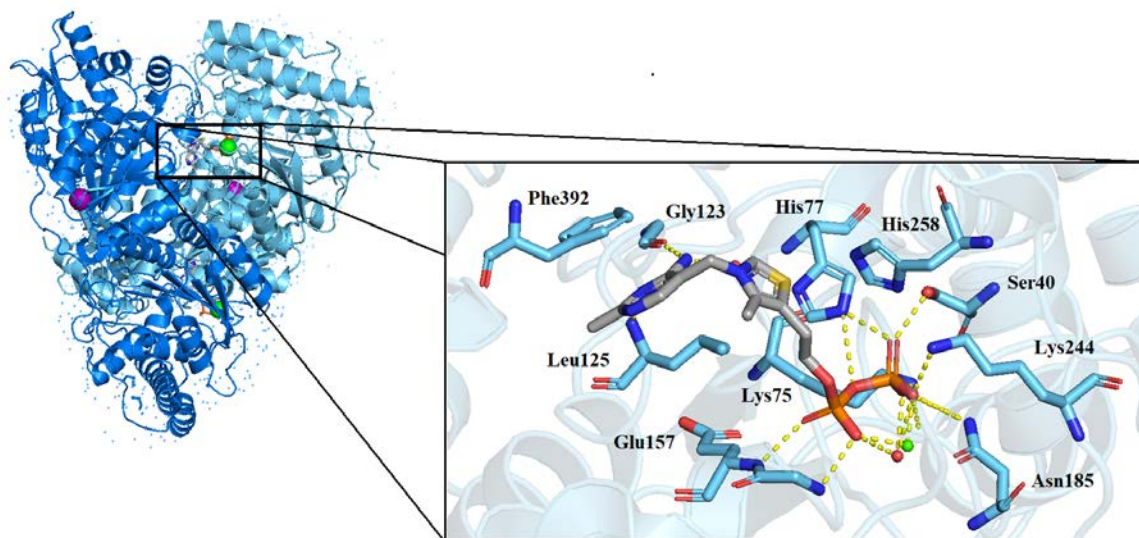
Slika 15. Prvi dio mehanizama transketolaze u kojem dolazi do prijenosa podjedinice od dva ugljikova atoma sa ketoze na TPP

Drugi dio mehanizma (slika 16) podrazumijeva prijenos skupine sa ugljikova atoma C2 na akceptor ribozu-5-fosfat ili eritrozu-4-fosfat. Karbanionski oblik 1,2-dihidroksietil-TPP-a prvo napada C1 karbonilnu skupinu akceptora i nakon protoniranja nastaje adukt sedoheptuloza-7-fosfat-TPP ili fruktoza-6-fosfat-TPP (ovisno o aldozi koja ulazi u reakciju). Deprotoniranjem hidroksilne skupine i pucanjem C-C veze regenerira se ilidni oblik TPP-a i nastaju produkti, sedoheptuloza-7-fosfat ili fruktoza-6-fosfat.¹⁷



Slika 16. Drugi dio mehanizma transketolaze u kojem dolazi do prijenosa podjedinice od dva ugljikova atoma sa TPP-a na aldozu

Ljudska transketolaza je homodimerni protein veličine oko 70 kDa. Spajanjem dimera nastaju dva aktivna mjesta između podjedinica. Ulaz u aktivno mjesto je pozitivno nabijeno te ima ulogu vezanja fosfatne skupine supstrata, a samo aktivno mjesto je negativnog naboja. Tiamin-pirofosfat ostvaruje polarne interakcije preko fosfatnih skupina s ionom Ca^{2+} te aminokiselinskim ostatcima. Bočni ogranak His258 koji se nalazi u blizini C2 atoma tiazolnog prstena ima ulogu vezanja supstrata te stabilizacije međuprodukata tijekom katalize. Aminopirimidinski prsten TPP-a ostvaruje π - π interakcije sa bočnim ogrankom Phe392, a povezan je i vodikovim vezama s enzimom.¹⁷



Slika 17. Kvarтерна struktura i aktivno mjesto ljudske transketolaze. Atomske koordinate preuzete su iz baze Protein Data Bank pod kodom 3MOS. Slika je izrađena u programu PyMOL.

§ 7. ZAKLJUČAK

Tiamin-pirofosfat, uz ostale derivate vitamina B skupine, ima ulogu kofaktora u važnim reakcijama metabolizma ugljikohidrata i aminokiselina. Nedostatak vitamina B₁ u prehrani dovodi do neurološke bolesti beriberi koja rezultira oštećenjem živčanog i krvožilnog sustava. Funkcionalni dio kofaktora je tiazolni prsten koji uslijed deprotonacije postaje karbanion koji može nukleofilno napasti ugljike karbonilnih skupina molekula supstrata. TPP sudjeluje u reakcijama oksidativnih i neoksidativnih dekarboksilacija te reakcijama prijenosa podjedinica od dva ugljikova atoma, kakve nalazimo primjerice u putu pentoza-fosfata.

Enzimi koji koriste TPP kao koenzim svoju ulogu sve češće pronalaze u reakcijama sintetske organske kemije kao potencijalno isplativa i ekološki održiva metoda regioselektivnog i enantioselektivnog stvaranja C-C veza u kemo-enzimskim pristupima. Jedna od reakcija koja se može provesti takvim pristupom jest, u ovom radu opisana, benzoiniska kondenzacija na neprirodnim supstratima.

§ 8. LITERATURNI IZVORI

1. R. A. Copeland, *Enzymes : A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*, Wiley, 2000, str. 42.
2. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2006.
3. E. D. Harris, Cofactors: Organic, *Encyclopedia of Human Nutrition(3rd Edition)*, Academic Press, 2013.
4. R. D. Semba, *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* **82** (2012), 310-315.
5. G. F. Combs, J. P. McClung, Thiamin, *The Vitamins(5th Edition)*, Elsevier, 2017, str. 297-314.
6. D. L. Nelson, M. M. Cox, A. A. Hoskins, *Lehringer Principles of Biochemistry(8th Edition)*, Macmillan Learning, 2021.
7. M. S. Patel, N. S. Nemeria, W. Furey, F. Jordan, *J. Biol. Chem.* **289** (2014) 16615-16623.
8. J. Sgrignani, J. Chen, A. Alimonti, A. Cavalli, *Scientific Reports* **8** (2018) 14683.
9. R. A. W. Frank, C. M. Titman, J. V. Pratap, B. F. Luisi, R. N. Perham, *Science* **306** (2004) 872-876.
10. P. Arjunan, T. Umland, F. Dyda, S. Swaminathan, W. Furey, M. Sax, B. Farrenkopf, Y. Gao, D. Zhang, F. Jordan, *J. Mol. Biol.* **256** (1996) 590-600.
11. G. A. Sprenger, M. Pohl, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **6** (1999) 145-149.
12. M. Pohl, C. Dresen, M. Beigi, M. Muller, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis(3rd Edition)*, Wiley-VCH, 2012, str. 919-945.
13. M. Wilding, M. Goodall, J. Mickefield, *Comprehensive Chirality Vol. 7* (2012) Elsevier, str. 402-429.
14. P. A. Dalby, J. M. Ward, H. C. Hailes, *Comprehensive Chirality Vol. 7* (2012), Elsevier, str. 372-389.
15. K. R. Sheu, J. P. Blass, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **893** (2006) 61-78.
16. R. A. W. Frank, A. J. Price, F. D. Northrop, R. N. Perham, B. F. Luisi, *J. Mol. Biol.* **368** (2007) 639-651.

-
17. L. Mitschke, C. Parthier, K. S. Tittmann, J. Coy, S. Ludtke, K. Tittmann, *J. Biol. Chem.* **285** (2010) 31559-31570.