

Alosterički komunikacijski putevi u proteinima

Petohleb, Luka

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:217:218826>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-17**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Luka Petohleb

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Alosterički komunikacijski putevi u proteinima

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Zagreb, 2022 godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

26. srpnja 2022.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

20. veljače 2023.

Mentor rada: doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Potpis:

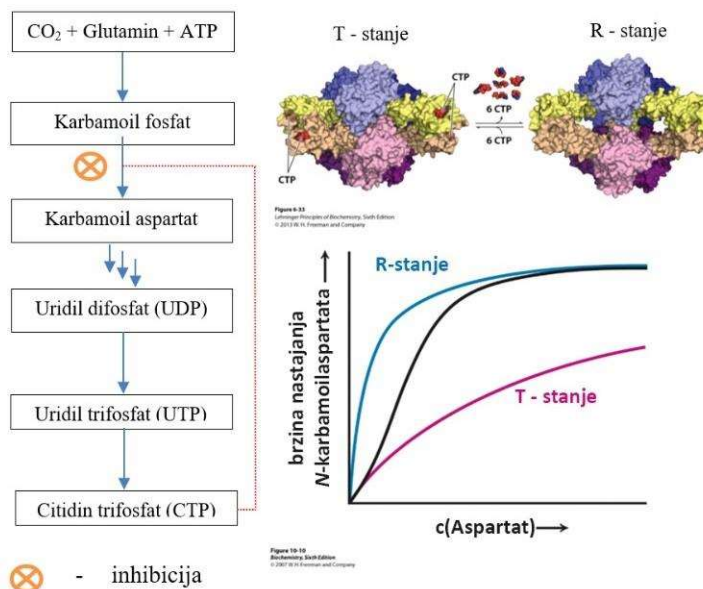
| | |
|---|-----------|
| § 1. UVOD..... | 1 |
| § 2. METODE U RJEŠAVANJU STRUKTURA PROTEINA | 6 |
| 2.1.1. Rendgenska kristalografija..... | 7 |
| 2.1.2. Krio-Elektronska Mikroskopija | 10 |
| § 3. RAČUNALNI PRISTUPI U OTKRIVANJU ALOSTERIČKIH SIGNALNIH PUTEVA | 13 |
| 3.1. Prikaz alosterije teorijom grafova | 14 |
| 3.2. Optimalni alosterički signalni putovi..... | 19 |
| 3.2.1. <i>FIRST</i> | 19 |
| 3.3. Sub-optimalni alosterički putovi..... | 23 |
| 3.4. Zaključak..... | 26 |
| § 4. KRATICE I SIMBOLI..... | 27 |
| § 5. LITERATURNI IZVORI | 27 |

§ Sažetak

Alosterija je jedna od najvažnijih pojava u regulaciji metaboličke i genetske aktivnosti u organizmu. Identifikacijom alosteričkih signalnih puteva pomoću računalnih tehnika predstavljaju moćan alat u proučavanju ponašanja proteina uslijed vezanja modulatora što može služiti u otkrivanju novih lijekova. Signal uslijed vezanja modulatora u alosterički aktivnom proteinu prenesen je preko funkcijskih skupina tog proteina. Signal općenito može biti prenesen najkraćim mogućim putem koji predstavlja optimalan ili onim duljim, sub-optimalnim alosteričkim putem. Na primjeru sinaptičkog proteina izoliranog iz štakora prikazana je primjena programa FIRST u otkrivanju optimalnih signalnih puteva, a na primjeru apo i holo enzima transkarbamoilaze, programom WISP, prikazana je i uspoređena pretraga sub-optimalnih signalnih puteva.

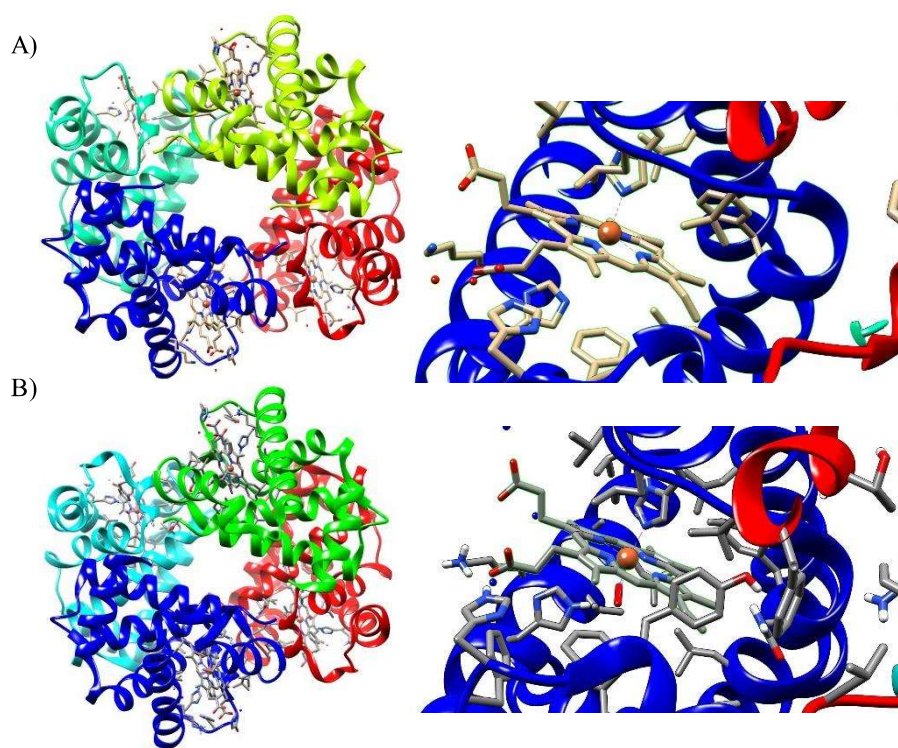
§ 1. UVOD

Koncept alosterije spominje se rane 1904. g. u radu Christiana Bohra gdje se navodi da ugljikov dioksid i pH medija utječu na afinitet vezanja kisika na hemoglobin, a navedeno opažanje je nazvano “Bohrov efekt”.¹ Bohrov efekt je dobio svoje konceptualno proširenje 1961. g. kada su J. Monod i F. Jacob upotrijebili izraz “alosterička inhibicija” za opis Novick-Szilard-Umbarger (NSU) efekta. Danas, NSU efekt predstavlja „feedback inhibition“ ili inhibiciju povratnom spregom, a enzim aspartat-transkarbamoilaza je dan od detaljno izučavanih primjera čija je aktivnost regulirana ovim efektom.² Na **slici 1** prikazan je dio metabolizma bakterije *E. coli*, gdje vezanje CTP-a (metabolički produkt) na aspartat-transkarbamoilazu pomiče konstantu ravnoteže istog prema T stanju, onog koje značajno sporije katalizira prijelaz karbamoil fosfata u karbamoil aspartat.³



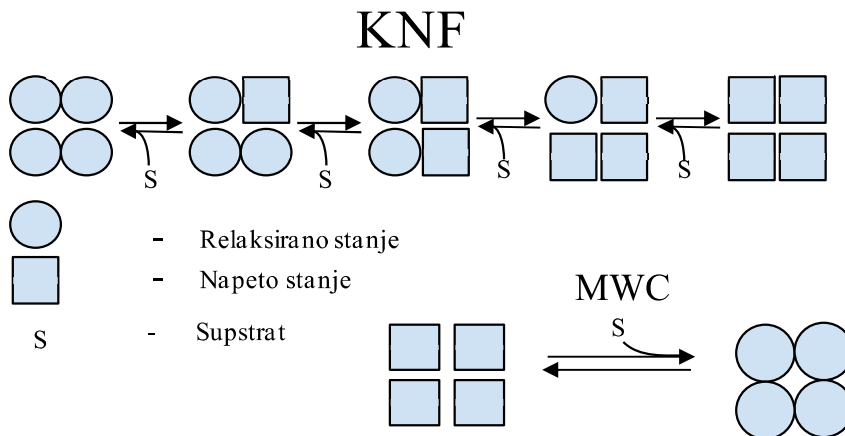
Slika 1. Shematski prikaz inhibicije povratnom spregom metaboličkog sintetskog puta pirimidina u bakteriji *E. coli*, te prikaz R i T stanja aspartat-transkarbamoilaze. Slike su preuzete iz Lehninger; Principles of Biochemistry sixth edition str. 227 i Strayer; Biochemistry sixth edition, str 281.

Drugim riječima, brzina nastajanja metabolita u stanici regulirana je modulatorom (CTP-om) koji je ujedno i krajnji produkt sintetskog puta. U slučaju hemoglobina liagand(kisik) je također i alosterički modulator. Navedeno znači da modulator i supstrat mogu biti iste ili sasvim različite molekule te se vezati u aktivno mjesto na proteinu ili neko distalno, specifično (alosteričko, regulatorno). Na **slici 2** prikazana je struktura hemoglobina s i bez kisika.



Slika 2. Strukturni prikaz deoksihemoglobina (A) u T stanju i oksihemoglobina (B) u R stanju te njihovih aktivnih veznih mjesta. Slika napravljena u programu ChimeraX 1.4.

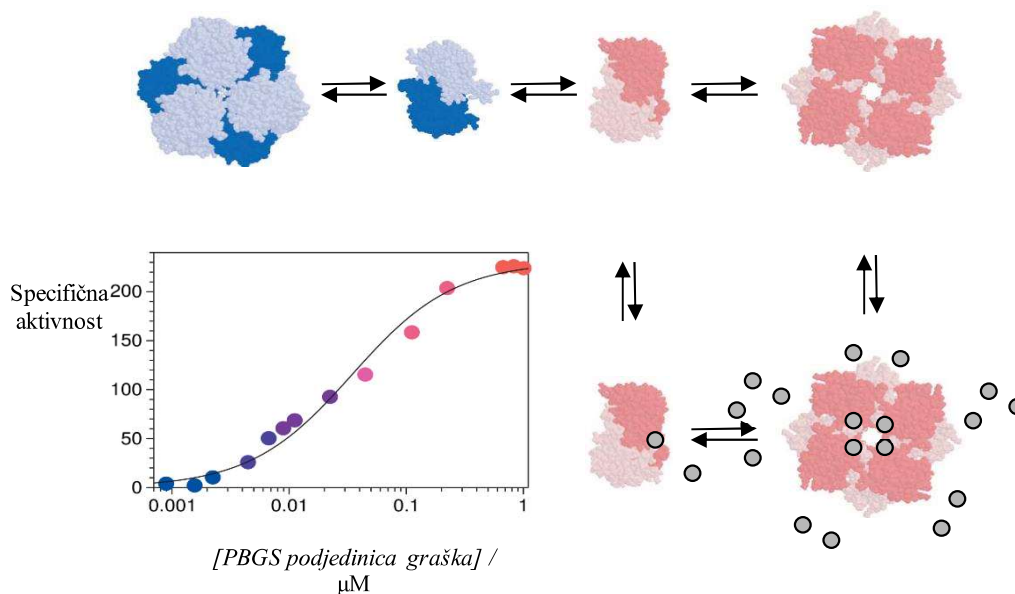
Kasnije, 1965-te i 1966-te objavljena su dva predložka alosteričkih modela: MWC (Monod-Wyman-Changeux) i KNF (Koshland-Nemethy-Filmer).^{4,5} Navedeni modeli shematski su prikazani na **slici 3** te ravnotežni odnosi kvaternih struktura u R i T stanju.



Slika 3. Crtani prikaz usklađenog (MWC) i sekvencijalnog (KNF) modela vezanja modulatora i ravnoteže između R i T stanja. Slika je nacrtana pomoću alata “Google crtež”.

MWC model (usklađeni model) postuliran je na sljedeći način: (1) Alosterički proteini su simetrični oligomeri sačinjeni od identičnih monomera; (2) alosterički efekt je postignut vezanjem liganda koji uzrokuje promjenu kvaterne strukture rotacijom podjedinica oko osi simetrije na način da se sačuva simetrija oligomera. KNF model (sekvencijalni model) za razliku od MWC modela, opisuje vezanje modulatora na oligomernan protein koji potom postepeno mijenja afinitet susjednih veznih mjesta prema supstratu. Drugim riječima, kako se na podjedinice sekvencijalno veže modulator, tako se mijenja afinitet ostalih monomernih jedinica proteina prema supstratu. Navedena kumulativna promjena svakog vezanja nije nužno linearna ni aditivna, već karakteristična za svaki pojedini enzim. Ova se karakteristika naziva kooperativnost, a njena mjera se najčešće određuje kinetički te je izražena Hillovim koeficijentom. Modeli MWC i KNF su prikladni za opis alosterije oligomernog proteina kao što je hemoglobin ili enzim aspartat-transkarbamoilaza, no što ako promjenom konformacije jednog monomera rezultira promjenom oligomernog stanja proteina? Odgovor na navedeno pitanje dan je 2005. godine uvođenjem nove paradigme - morfeinskog modela. Morfein (engl. “*morpheein*”) je izvedenica dvije riječi, “*to morph*” što predstavlja morfološku promjenu i “*protein*”. Ovaj model nadograđuje MWC i KNF modele uvođenjem mogućnosti promjene oligomernog stanja kvaterne strukture proteina što može biti uzrokovano i promjenama sekundarne i tercijarne

strukture. Na **slici 4.** prikazane su konformacije dimera (morfeina) enzima 5-aminolevulinat dehidrogenaze (PBGS) iz graška, koje vode do različitih kvaternih struktura. Morfeini su u međusobnoj kemijskoj ravnoteži s dvije ili više vlastitih konformacija.⁶



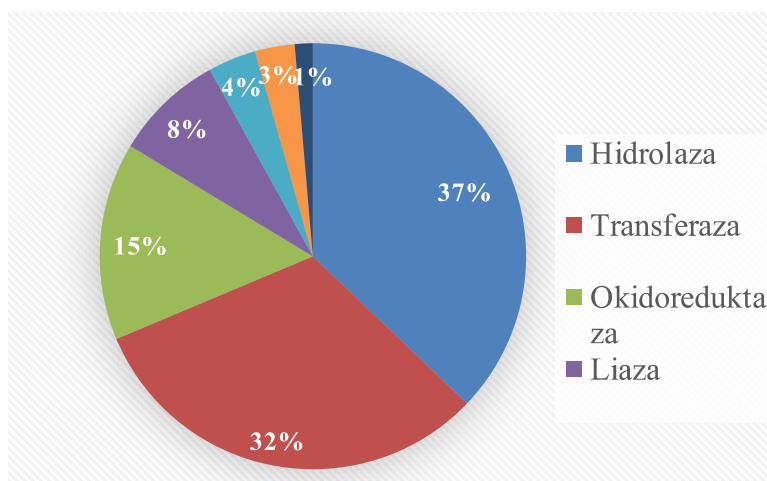
Slika 4. Grafički prikaz morfeinskog modela na biljnom PBGS-u u kemijskoj ravnoteži aktivnog i neaktivnog monomera koji vode do aktivnih oktamera (crveno) koji su dodatno stabilizirani magnezijevim ionima (Mg^{2+}) i neaktivnog heksamera (plavo). Slika je napravljena u programu Google Docs.

Danas alosterija podrazumijeva utjecaj konformacijske promjene na aktivnost proteina ili makromolekule putem vezanja na distalno (alosteričko) mjesto. Alosteričko mjesto jest osjetljiva točka specifične simetrije i kemijskih karakteristika na koje se djelovanjem nekim ligandom može djelovati na aktivnost samog proteina. Fenomen alosterije omogućuje preciznu i visoko specifičnu regulaciju metabolizma, signalnu transdukciju, transkripcijsku regulaciju i rad biomolekularnog stroja u živim organizmima.⁷ Jedan od ključnih problema današnjice jest razumijevanje konformacijski fleksibilnih proteina i proteinskih kompleksa koji oni čine. Jedan od poznatih načina pri određivanju alosteričkog signalnog puta u proteinu jest izučavanje i

razumijevanje njegove prostorne strukture. Budući da su proteini vrlo osjetljivi te njihova konformacija ovisi o trenutnim staničnim uvjetima, potrebno je posegnuti za metodama koje mogu proizvesti navedene uvjete. U proteklih nekoliko desetljeća računalne topološke, simulacijske i vizualizacijske tehnike dale su mogućnost određivanja konformacija proteina u staničnim uvjetima koje omogućuju korištenje ovako prikupljenih i procesiranih podataka u praktične svrhe kao što je istraživanje i dizajn lijekova. U nastavku teksta opisane su najzastupljenije metode u određivanju prostorne strukture te računalne metode za njihovu obradu u svrhu otkrivanja alosteričkog signalnog puta.⁸

§ 2. Metode u rješavanju struktura proteina

Jedan od pristupa istraživanju alosterije proteina jest eksperimentalno određivanje njihovih prostornih struktura. Točna i precizna karakterizacija početne prostorne strukture nekog konformera daje uvid u prirodu samog proteina. Danas je poznato više od 190 000 proteinskih struktura, a u proteklih par godina (2019-2021) prosječno se karakterizira oko 12 700 bioloških struktura.⁹ Pored eksperimentalno riješenih struktura dostupne su strukture u bazi podataka alphafold “AlphaFold Protein Structure Database” koja ima preko 200 milijuna predviđenih struktura proteina. Enzimi predstavljaju jedan od trenutno većeg skupa karakteriziranih proteinskih struktura. Hidrolaze (npr. kimotripsin) i transferaze (npr. aspartat-transkarbamilaza) najraznovrsnije su i najzastupljenije klase enzima u PDB bazi podataka kao što je prikazano na **slici 5**. Posebnost ovako opširne baze podataka čini skup uzorka i primjera na kojima se računalne tehnike mogu usavršavati. U nastavku su opisane neke od najkorištenijih metoda eksperimentalne karakterizacije proteinskih struktura.

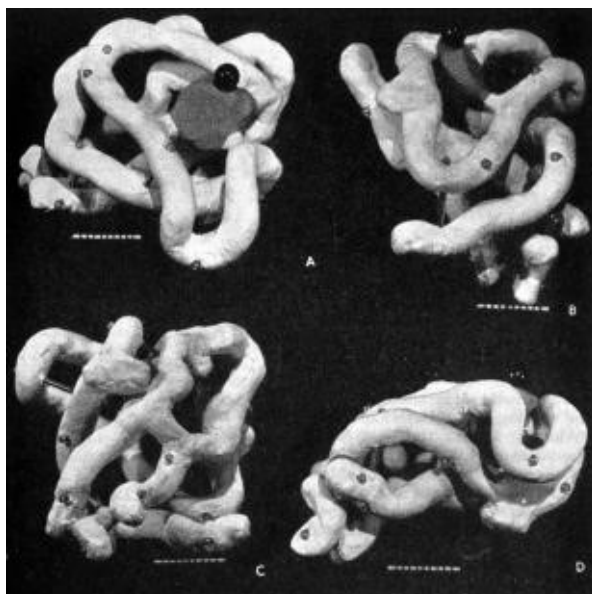


Slika 5. Grafički prikaz zastupljenosti klasa karakteriziranih enzimskih struktura pohranjenih u proteinskoj bazi podataka.¹⁰

Uz PDB bazu podataka postoji i nedavno sastavljena baza podataka AlphaFold2 koja danas sadrži preko 200 milijuna dostupnih proteinskih struktura. Kao dio projekta Deep Mind, tvrtka Google razvija AlphaFold2 u svrhu predikcije 3D struktura proteina iz njihovog aminokiselinskog slijeda. AlphaFold2 je operativni sistem koji koristi umjetnu inteligenciju te na principu pokušaja i pogreške putem neuronske mreže u mogućnosti je naučiti kako se proteini slažu te grafički prezentirati konačni 3D prikaz proteina.^{11,12} AlphaFold2 tako može renderirati 3D model proteina visoke točnosti i rezolucije što znatno ubrzava određivanje mehanizma djelovanja raznih proteina.

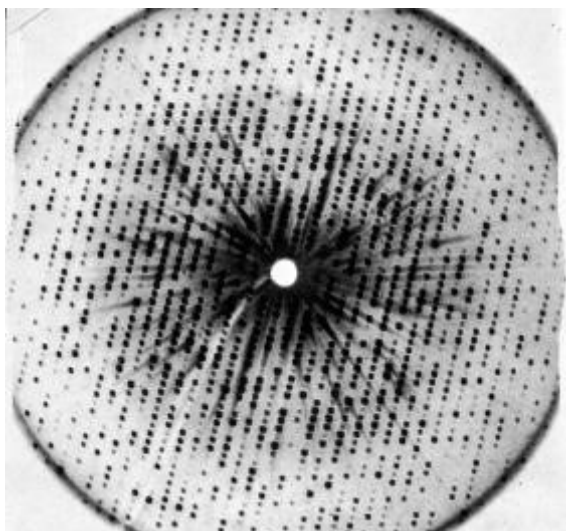
2.1.1. Rendgenska kristalografija

Zasluge za razvoj metode rendgenske kristalografija pripadaju znanstvenicima Max von Laue, koji je otkrio fenomen difrakcije rendgenskih zraka na kristalu i braći W. Henry Bragg i W. Lawrence Bragg koji su razvili rendgensku kristalografiju kao analitičku metodu.^{13,14} Za navedena otkrića dodjeljuje im se Nobelova nagrada za fiziku 1914. (Laue) i 1915. (W. Henry i W. Lawrence Bragg).^{15,16} Skoro pola stoljeća nakon revolucionarnog otkrića 1962. g. Max F. Perutz i Jhon C. Kendrew dobivaju Nobelovu nagradu za kemiju riješivši strukture mioglobina uz korištenje digitalnog računala za izgradnju njegove strukture.¹⁷ Prvi konstruiran model mioglobina prikazan je na **slici 6**, tzv. „model kobasice“, a izoliran je iz mišića kita spermata (*Physeter macrocephalus*).



Slika 6. Maketa rekonstrukcije strukture mioglobina rendgenskom kristalografijom. Slika je preuzeta iz osvrta na izvoran rad.¹⁷

Iste godine (1962. g.) M. H. Frederick, F. H. C. Crick i J. D. Watson nagrađeni su Nobelovom nagradom za medicinu riješivši strukture nukleinskih kiselina i uočavanjem njihove važnosti za prijenos genetičke informacije.^{18,19} Iako rendgenska kristalografija danas nije jedina tehnika za otkrivanje prostornih struktura i dalje je najviše primijenjena te prema statistici PDB baze podataka ovom je metodom riješeno više od 80% proteinskih struktura od momenta karakterizacije mioglobina do danas.²⁰ Rekonstrukcija 3-D modela proteina iz prikupljenog 2-D točkastog rendgenskog uzorka rezultat su translacije točkastih udaljenosti i njihovih intenziteta u opis elektronske gustoće kristalne ćelije. Prikaz navedenog mioglobina prikazan je na **slici 7**.



Slika 7. Prikaz difrakcijskog uzorka kristala mioglobina iz kasnih 1950-ih. Fotografiju je snimio John Kendrew.²¹

Svaka točka, nazvana refleksija, može se opisati kao val određenog smjera, amplitude i faze. Navedeni val naziva se strukturni faktor ($F_{(hkl)}$) i njegov izraz u eksponencijalnoj formi je dan prema formuli (1).

$$(1) \quad F(hkl) = \sum_{j=1}^n f_j e^{2\pi i \left(\frac{hx}{a} + \frac{ky}{b} + \frac{lz}{c} \right)}$$

f_i – valna funkcija i -te difraktirane zrake, n – broj valnih funkcija, (hkl) – millerovi indeksi, (abc) – duljina stranica kristalne ćelije, (xyz) – prostorne koordinate.²²

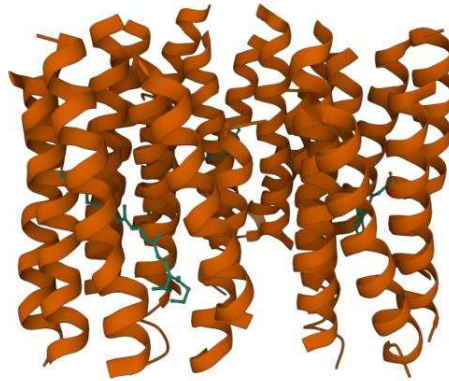
Kako je moguće izmjeriti samo amplitude, a ne i njihove faze, onemogućeno je određivanje elektronske gustoće kristalne ćelije. Bez obzira na navedeno, strukture malih molekula se mogu riješiti i bez informacija o fazi Pattersonovom funkcijom koja stavlja sve faze u nulu, a elektronske gustoće se računaju iz amplituda i prikazuju kao među-atomski vektori tvoreći Pattersonovu mapu. Za N broj atoma, potrebno je $N(N-1)$ vektora što znači da je ova metoda dobra za sustav veličine 20 – 50 atoma. Nadalje, za srednje velike sisteme uglavnom vrijedi da imaju dobro uređene kristalne strukture. Snimanjem difrakcije pri velikim kutovima mogu se dobiti detaljni difrakcijski uzorci iz kojih se zatim mogu odrediti faze iz matematičkih relacija strukturnih faktora. Navedeno se naziva direktna metoda (**DM**) i omogućila je rješavanje sustava do 2000 atoma. Sustavi od nekoliko tisuća atoma (npr. proteini) zahtijevaju alternativne pristupe u rješavanju prostornih struktura. Strukture takvih proteina su često nepravilne, a strukturni faktori mali. Zbog navedenog, postignuta rezolucija je često između 2-3 Å, a idealna

slika za proučavanje alosterije trebala bi iznositi oko 0,5 Å. **MIR** (Multiple Isomorphous Replacement) metoda rješava ovaj problem fiksiranjem proteina s nekom tvari koja dobro difraktira. To su primjerice teški metali koji mogu fiksirati protein u njihovu izomorfnu konfiguraciju s nativnom. Na ovaj način protein pravilnije i lakše kristalizira te omogućuje određivanje faze ciljnih atoma. Ukoliko se želi izbjeći potreba za izomorfnom kristalizacijom proteina, što može u mnogim slučajevima biti neizvedivo, upotrebljava se **MAD** (Multivavelength Anomalous Dispersion) metoda. Ova se metoda temelji na specifičnoj nepravilnosti difrakcije prilikom upotrebljavanja zraka valnih duljina oko apsorpcijskih rubova atoma. Apsorpcijski rubovi su specifični za svaku vrstu atoma, te neki u kristalu biti će pomaknuti u fazi. Navedeno će činiti razliku u difrakcijskom dijagramu, čijom se analizom mogu odrediti početne faze. Ova se metoda uglavnom koristi za proteine koji sadrže metionin, s obzirom na to da se sumpor može zamijeniti selenijem koji ima kemijska svojstva slična sumporu. Ovim se načinom postiže izomorfnost te se amplificira navedena anomalija u difrakciji.²³ Također postoje i metode molekularnih zamjena koje se temelje na usporedbi difrakcije poznatih struktura s nepoznatom te se preklapanjem difraktograma na temelju sličnosti određuje nepoznata struktura. Nadalje, rendgenska kristalografija uzima u obzir molekule otapala (kao što je često voda), metalne ione, kofaktore i vezane ligande što daje realnu sliku o nativnoj proteinskoj strukturi u staničnom kontekstu. Zbog navedenog rendgenska kristalografija čini neizostavnu metodu u karakterizaciji prostorne strukture proteina iz elektronskih gustoća koje su temelj u parametrizaciji proteina za računalnu obradu.

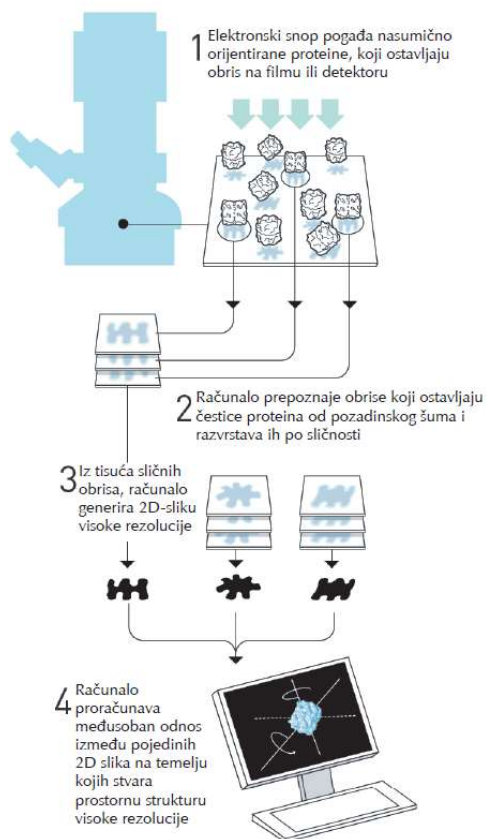
2.1.2. Krio-Elektronska Mikroskopija

1931. g. Ernest Ruska i Max Knoll sastavljaju prvi elektronski mikroskop, a već 1933. g. elektronski mikroskop premašuje rezoluciju standardnog optičkog mikroskopa. Siemens 1938. g. počinje proizvoditi komercijalne elektronske mikroskope. Elektronska mikroskopija zahtjeva snimanje u vakuumu, što podrazumijeva dehidraciju uzorka. Gubitak vode u uzorku promijenilo bi nativnu konformaciju uzorka, stoga se u početku koristila fiksacija biološkog uzorka naparavanjem metala kao što su zlato ili platina. Revolucionaran preokret u metodologiji započeo je '70-ih godina 20. stoljeća, a vrhunac dostiže 1990-ih godina razvojem krio elektronske mikroskopije. Inovativnost ove metode je u vitrificiranju (zamrzavanju) uzoraka na tankom filmu u kupelji tekućeg etana hladenoj tekućim dušikom te uzorak ostaje ohlađen na

temperaturi tekućeg dušika tokom snimanja. Voda u uzorku zamrzava se dovoljno velikom brzinom da ostaje u amorfnom obliku što znači da ne razara biološki uzorak i time proteinski sadržaj može zadržati svoju nativnu strukturu. Nadalje, ovako zaleđen uzorak dovoljno je stabilan da se njegova konformacija bitno ne mijenja iako dođe do pucanja veze tokom snimanja. Iako krio metoda štiti uzorak od elektronskog zračenja, osjetljivost bioloških makromolekula koje sadrže lake elemente je i dalje visoka. Navedeno zahtjeva korištenje minimalnog snopa elektrona što daje sliku niske rezolucije. Visoka se rezolucija postiže korištenjem metode *single particle analysis* (jednočestična analiza) što podrazumijeva snimanje oko 10 000 slika koje se računalno obrađuju kako bi se rekonstruirao 3D model. Za razvoj opisane metode Richard Henderson, Jacques Dubochet i Joachim Frank 2017. g. dobivaju Nobelovu nagradu za razvoj krio-elektronske mikroskopije pomoću koje rješavaju strukturu makromolekule bakteriorodopsina prikazane na **slici 9**. Shema postupka snimanja krio-elektronskom mikroskopijom je prikazana na **slici 10**.



Slika 9. Prikaz kompleksa bakteriorodopsina i retinala iz PDB baze podataka pod identifikacijskom oznakom 1BRD snimljen visoko-rezolucijskom krio-elektronskom mikroskopijom.²⁴



Slika 10. Shematski prikaz rekonstrukcije trodimenzionalne slike krio elektronskom mikroskopijom.²⁵

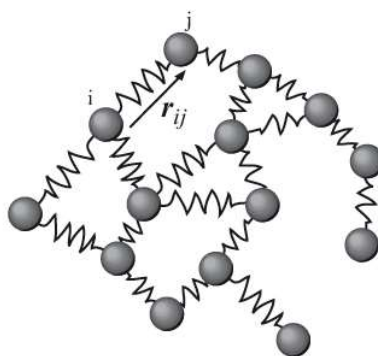
Rendgenskom kristalografijom i krio-elektronskom mikroskopijom može se odrediti mapa elektronske gustoće te izgraditi 3D model proučavanog sustava. Nedostatak je u tome što se proučava samo fiksirana struktura koja je kristalizirana ili vitrificirana, a ne i njena dinamičnost u otopini, odnosno staničnom mediju. Budući da se i ova metoda, kao i rendgenska kristalografija oslanja na kristalizaciju uzorka, mnoge proteinske strukture mogu ostati neopažene. Tako primjerice može biti više konformacija u međusobnoj ravnoteži, a kristalizirati će samo jedna što daje nepotpunu sliku o dinamičnosti proteina. Snimanje uzorka NMR metodom rješava ovaj problem jer se protein nalazi u solvatiranom obliku sličnom onome u stanici i tako može zauzimati više različitih konformacija koje su uočljive na spektru. Međutim, spektre prikupljene NMR metodom za velike proteine i ostale makromolekule je često teško interpretirati zbog velikog broja signala u spektru. Najbolja strategija je korištenje više različitih tehnika pri definiranju svojstva i 3D prikaza nekog proteina.

§ 3. Računalni pristupi u otkrivanju alosteričkih signalnih puteva

“Everything that living things do can be understood in terms of the jiggling and wiggling of atoms.”

– Richard Feynman

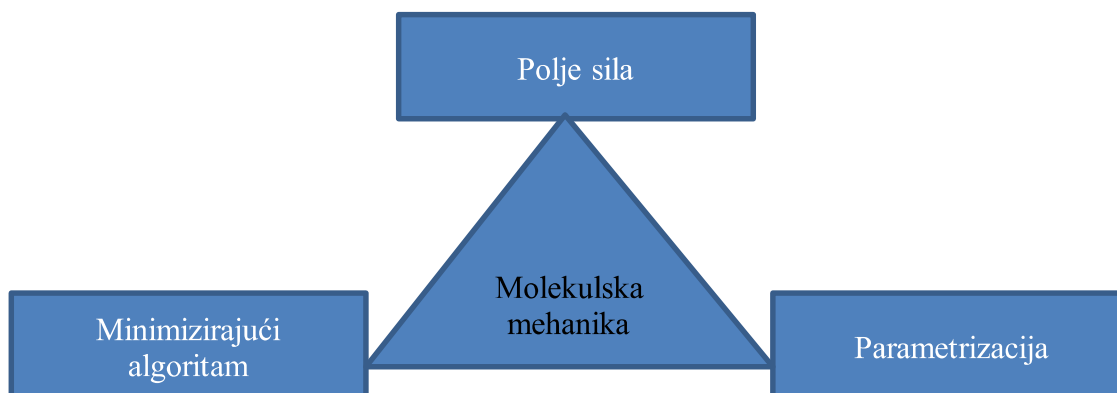
MWC, KNF i morfejskim modelima opisana je alosterija kao promjena konformacije cjelovite strukture ili samo određene domene uslijed vezanja liganda ili promjene okoliša (kao što su promjene u pH ili ionskoj jakosti) u kojem se protein nalazi.⁶ Konformacijska, odnosno strukturna promjena u proteinima često dovodi do promjene u aktivnosti. Pokretljivost proteina može se gledati kao kolektivna ili lokalna te je ključno identificirati takve regije kako bi se mogao istražiti mehanizam njegova djelovanja. Navedene mobilne regije se često nazivaju i transportni kanali energije, a predstavljaju kanal najefikasnijeg prijenosa signala koji izravno djeluje ili na ukupnu alosteričnost ili na specifičnu regiju proteina. Što je točno signal te što predstavlja energetska kanal ili signalni put?



Slika 9. Shematska reprezentacija proteina u aproksimaciji atoma kao sfera s nabojem i kemijskih veza kao elastičnih opruga.²⁶

Sve značajne interakcije u proteinima su elektrostatske prirode, a atome i veze mogu se aproksimirati sferama i oprugama što je shematski prikazano prema **slici 9**. Ovaj prikaz molekule se također naziva elastični mrežni model (engl. Elastic Network Model, ENM). Temelji se na aproksimaciji atoma kao sfernog objekta kojima je pripisana određena inercija i naboj, a kemijske veze opisane su oprugama te u najjednostavnijoj aproksimaciji prate Hookeov zakon. Tako prikazana točkasta tijela se zatim mogu staviti u međusoban odnos koji omogućuje

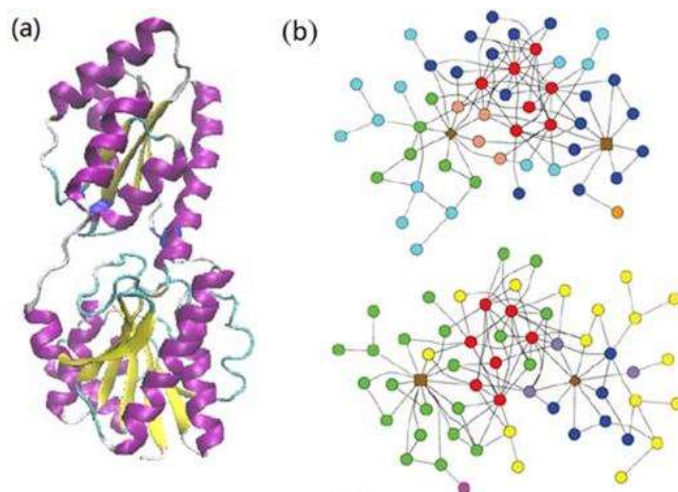
proučavanje njihova ponašanja uslijed elektrostatskog podražaja ili perturbacije. Intramolekulske interakcije bitne u studiji proteinske fleksibilnosti ubrajaju se istežanje, savijanje, istežanje i savijanje, torzija, dipol-dipol interakcije i ostale Van der Waalsove interakcije te vodikove veze. Svaki tip interakcije opisan je odgovarajućim funkcijama potencijala koje imitiraju realne sustave. Prema **slici 10** shematski je prikazana trijada molekulske mehanike koja opisuje tri glavne komponente potrebne za opis ponašanja i svojstva proteina u umjetnom ili prirodnom mediju.



Slika 10. Prikaz shematskog opisa molekulske dinamike koja je prikazana kao trijada koju čine polje sila, parametrizacija i minimizirajući algoritam.²⁷

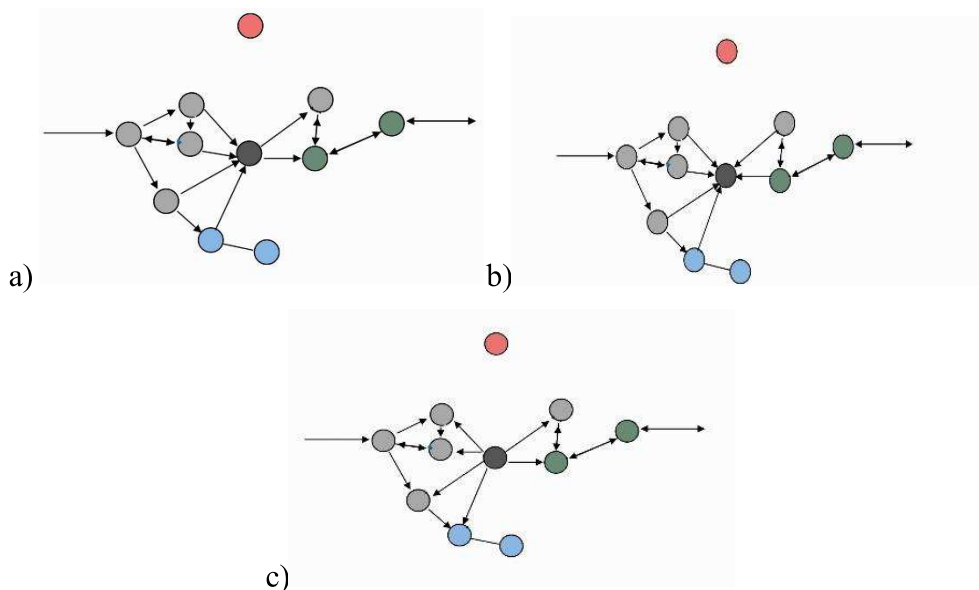
3.1. Prikaz alosterije teorijom grafova

Teorija grafova, elastični mrežni model i perturbacijske metode danas su popularne tehnike u otkrivanju alosteričkih signalnih puteva u proteinima. U ovome poglavlju prikazano je nekoliko metoda koje se koriste u računalnoj kemiji kako bi se mogli predvidjeti alosterički signalni putovi. Kompleksnost intra-molekulskih interakcija proteina može se pojednostaviti grafom koji se naziva “Proteinska strukturna mreža” (engl. Protein Structure Network, PSN).²⁸ Shema takvog grafa prikazana je na **slici 12**, a predstavljen primjer je fosfofruktokinaza, poznati alosterički reguliran enzim.



Slika 12. Prikaz proteina fosfofruktokinaze (PFK) kao modelnog primjera koji pokazuje alosteriju. Pod (a) prikazana je struktura proteina, (b) prikazuje dvije analogne proteinske mreže u kojima raznobojna čvorišta predstavljaju aminokiselinske bočne ogranke, a linije interakcije između istih.²⁹

Svako čvorište može predstavljati atom, bočni ogranak aminokiseline ili regiju na proteinu. Linija predstavlja povezanost čvorišta što ne mora nužno biti kovalentna kemijska veza, već prostorna udaljenost funkcijskih skupina. Između dva čvorišta signal može bit prenesen u jednome smjeru (unidirektan prijenos), u oba smjera (bidirektan prijenos) ili ne može doći do njegova prijenosa. Karakteristično alosteričko regulatorno mjestu ostvaruje veliki broj intramolekulskih interakcija kojima se prenosi signal te ih se može prikazati kao čvorišnu točku. Prema **slici 13** prikazan je hipotetski segment intramolekulskih interakcija koji može pripadati alosteričkom putu. Crvena točka predstavlja segment proteina koji ne sudjeluje u alosteričkom signalnom putu zbog velike udaljenosti od ostalih čvorišta koje je često definirana u graničnim uvjetima, d_{cut} (engl. „cutoff“ vrijednost). Svijetla nijansa sive boje predstavlja regije malog broja interakcije, a najtamnije točke one s najvišim brojem interakcija. Upravo ovakve točke se prepoznaju kao dijelovi alosteričkog puta, ili često nazvanim kanalima za transport energije. Plava čvorišta predstavljaju regije u kojima signal dolazi u „slijepu ulicu“, odnosno do mjesta u kojem može uzrokovati konformacijsku promjenu, no ne pripada alosteričkom signalnom putu. Strijelice predstavljaju dozvoljeni smjer propagacije signala, a ravne linije interakciju bez prijenosa signala.



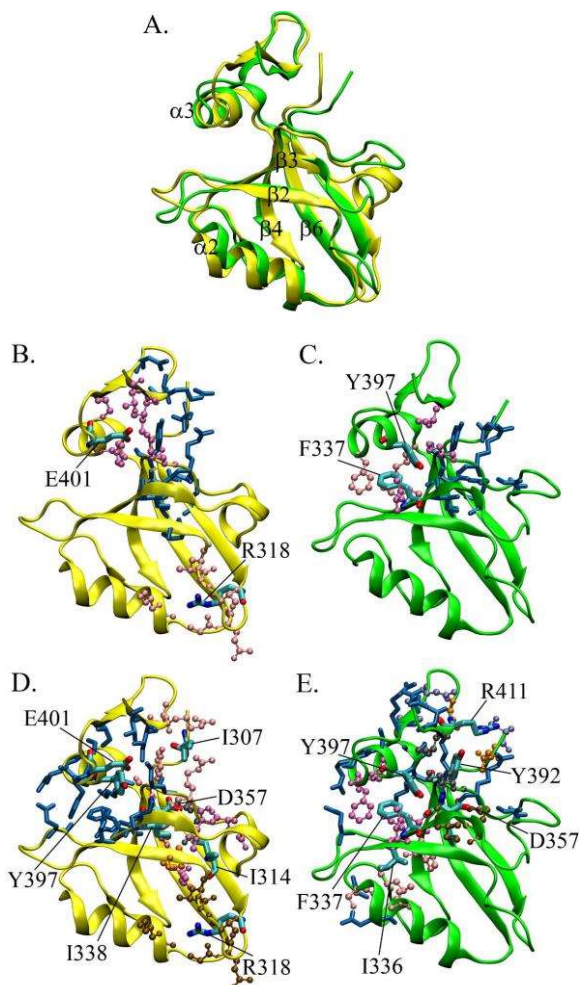
Slika 13. Reprezentacija nekog teorijskog segmenta proteina kao grafa, odnosno mreže interakcija. Slika a) prikaz čvorišta (tamnosiva točka) kao dio alosteričkog puta s najvišim brojem interakcija, b) prikaz čvorišta (tamnosiva točka) kao lijevka u kojem završava signalni put i c) prikaz početnice iz koje izlaze signali. Slika je izrađena u aplikaciji Samsung Notes.

Odabir restrikcije na prostornu udaljenost među čvorištima, (engl. „cutoff“) d_{cutt} prvi je izazov u postavljanju proteinske strukturne mreže. Nadalje, u literaturi pronalaze se dva načina povezivanja čvorišta koja su u interakciji: i) povezana čvorišta opisana matricom susjedstva (sadrži samo nule i jedinice) A_{ij} prikazana prema formuli 6) koja uzima u obzir jesu li čvorišta u interakciji (unutar „cutoff“ vrijednosti) i ii) težinski opis povezanih čvorišta prikazana prema formuli 7), gdje veličina d_{ij} predstavlja udaljenost između dva čvorišta koja su međusobno povezana. Treba naglasiti da ako se težinska interakcijska vrijednost smanji (I_{ij}), onda broj ostvarenih interakcija poraste.

$$(4) A_{ij} = \begin{cases} 1, & \text{ako su } i \text{ i } j \text{ povezani} \\ 0, & \text{ako } i \text{ i } j \text{ nisu povezani} \end{cases}$$

$$(5) I_{ij} = 1/d_{ij}$$

Težinski opis povezanosti čvorišta je vjerodostojniji od onog opisanog matricom A_{ij} jer daju uvid o relativnoj udaljenosti interakcija koje se ostvaruju. Alosteričan put opisan grafom na naveden način bio bi sačinjen od čvorišta s I_{ij} vrijednostima, a alosteričko mjesto predstavljalo bi čvorište s najviše interakcija na grafu.



Slika 14. Prikaz PDZ domene i stvaranja klastera korištenjem susjednih matrica različitih „cutoff“ vrijednosti. Pod **A**) slika prikazuje superponiranje minimizirane (žuto) i MD simulirane strukture (zeleno). Slika pod **B**) prikazuje minimiziranu, a pod **C**) MD simulirani prikaz aminokiselinskih ostataka, čvorišnih točka s najvišim brojem interakcija (predstavljale bi linije koje povezuju čvorišta na grafu) određenih težinskom matricom od $I = 6\%$. **D**) i **E**) slike predstavljaju analogan prikaz aminokiselinskih ostataka koji tvore značajan broj interakcija uz korištenje težinske matrice od od $I = 4\%$.³⁰

Na **slici 14** prikazana je PDZ domena sinaptičkog proteina izoliranog iz štakora, a često prisutna u bakterijama, kvascu, virusima i ostalim životinjama koja je sastavni dio signalnih proteina. Strukturno superponiranje pod **A**) prikazuje minimiziranu (žuto) i MD simuliranu strukturu (zeleno) bez liganada. Struktura pod **B**) prikazuje minimiziranu strukturu uz graničnu $I = 6\%$

koja je ujedno postavljena i u MD simuliranom prikazu pod C). Arg318 i Glu401 na minimiziranoj strukturi (zeleno) prepoznati su kao bitna čvorišta aminokiselinskih ostataka, a pod C) Phe337 i Tyr397. Proširivanjem interakcija na $I = 4\%$, broj interakcija se povećava kao i broj važnih čvorišta u alosteričnom putu. Navedeno može biti uočeno iz slika D) i E) u kojima se može primijetiti da Tyr397 se također pojavljuje kao središte s velikim brojem interakcija.

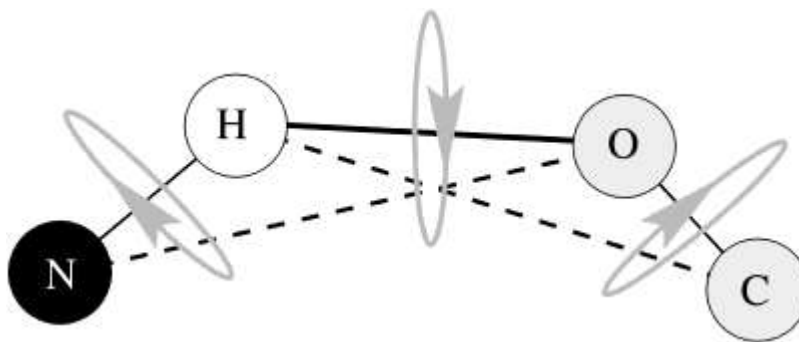
3.2. *Optimalni alosterički signalni putovi*

Kako su svaka mjerenja ograničena instrumentom kojim se ono provodi, tako u računalnim izračunima ograničavajući faktori su računalna moć i vrijeme potrebno za izvršavanje računa. *Ab initio* metode kao što su Hartree Fockova uz korištenje velikog osnovnog skupa za izgradnju atomskih orbitala i opisa njihovih energetske stanja rješavanjem Slaterovih determinanta daju izrazito točnu reprezentaciju kemijskog sustava. Navedena metoda primjenjiva je za male sustave, što većina proteina koji pokazuju alosteriju nisu, stoga se poseže za semiempirijskim metodama. Ove metode koriste eksperimentalne podatke o elektronskoj mapi gustoće dobivene najčešće rendgenskom kristalografijom, NMR-om te krio-elektronskom mikroskopijom koja zatim služi za parametrizaciju atoma u proučavanoj strukturi. Nadalje, iako se postavi navedena aproksimacija i odabere adekvatno polje sila potrebne su dodatne metode za proučavanje blagih konformacijskih promjena kao one što su prisutne u alosteriji. FIRST i CONTACT primjer su računalnih metoda koje koriste teoriju grafova i algoritme kao što je tip „igra kamenčića“ (engl. pebble game).

3.2.1. *FIRST*

FIRST (engl. Floppy Inclusion and Rigid Substructure Topology) je program koji koristi rekurzivan algoritam koji koristi teoriju grafova kako bi odredio fleksibilnost cijelog ili određene regije proteina na temelju samo njegove jedne konformacije određene metodom kao što je rendgenska kristalografija ili NMR metoda.³¹ Navedeni algoritam konstruira graf u obliku 3D mreže, gdje su čvorišta atomi povezani kovalentnim vezama, vodikovim vezama te diedarskim kutovima. Kako bi računalna obrada alosteričke mreže bila moguća moraju se postaviti ograničenja na među-atomske interakcije koje aproksimiraju realni kemijski sustav. Najčešće se navedeno postiže opisom sustava internim koordinatama pri čemu su duljine kovalentnih i vodikovih veza fiksirane, a diedarske rotacije dozvoljene samo oko jednostrukih veza. Navedeno je razlog jer se vodikove veze uglavnom ne mijenjaju tokom blagih konformacijskih promjena kakve su prisutne u alosteriji. **Slika 15** prikazuje način primjene

restrikcije na interakcije među atomima što za posljedicu smanjuje broj slobodnih stupnjeva slobode za faktor 7 koji bi bili prisutni pri korištenju Cartezijevih koordinata.³⁰

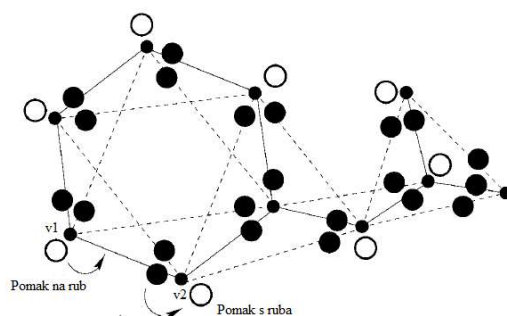


Slika 15. Vodikova veza između donorskog (dušik) i akceptorskog (kisik) atoma opisana s tri restrikcije prikazanim punim linijama. Puna zadebljana crna linija opisana je restrikcijom centralnom silom najbližeg susjeda. Isprekidane linije predstavljaju restrikciju na savijanje vodikove veze s najbližim susjednim atomima. Vodikovo vezi su *a priori* pripisana tri rotaciona diedarska člana prikazana strijelicama.³¹

Nadalje, restrikcija se može smatrati suvišnom ili neovisnom. Suvišna restrikcija je ona koja se odnosi na vezu koja pri pucanju ne utječe na fleksibilnost postavljene mreže. Neovisna se smatra onom koja utječe na istu. *Jacobs et al.* postavljaju proceduru koja određuje fleksibilnost navedenih mreža temeljenoj na dijagonalizaciji matrica:

- 1) Postaviti mrežu atoma te restrikcije njihovih udaljenosti.
- 2) Jedinstveno zamijeniti svaku restriksijsku udaljenost s oprugom jedinstvenih konstanti (ovisno o kemijskim vezama) i duljinama jednakih udaljenosti atomskog para.
- 3) Konstruirati dinamičnu matricu za mrežu opruga te izračunati sve normalne modove (vlastite vrijednosti matrice). Vlastite vrijednosti pokazuju jesu li modovi titranja konačni ili nulte frekvencije (engl. „floppy modes“).
- 4) Dodati sistemu restrikcije udaljenosti, provjeriti jesu li restrikcije neovisne ili suvišne te ponoviti gornje korake.
- 5) Ako je broj prikupljenih nultih frekvencija jednak dana restrikcija je suvišna, inače je neovisna.

Sve prikupljene suvišne restrikcije, odnosno one nulte frekvencije koriste se za izgradnju mreže grafa. Mrežna čvorišta izgrađena s nultim frekvencijama predstavlja mrežu slabih veza čije pucanje ne utječe na ukupnu fleksibilnost proteina ili proučavane domene. U ovom okviru proučavanja među atomskih interakcija, kontinuirana mreža sastavljena je od tetradara (3D generaliziranih trokuta) spojenih preko bridova. Navedeno je opisano prema **slici 16** gdje vrhovi brida predstavljaju atome, bijeli kružići predstavljaju neovisne restrikcije te crni kružići koji leže na bridovima suvišne restrikcije. Rekurzivan algoritam igre kamenčića (engl. „*pebble game*“) služi za redistribuciju stupnjeva slobode po 3D mreži koji omogućuje određivanje jesu li regije krute ili fleksibilne.

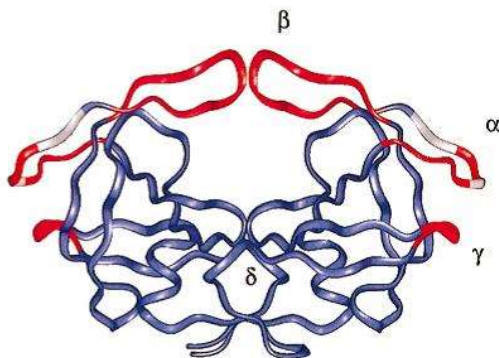


Slika 16. Prikaz algoritma igre kamenčića. Prazni kružići (kamenčići) predstavljaju stupnjeve slobode i postavljeni su na vrhove grafa, kamenčići (ispunjeni crnilom) postavljeni na linije predstavljaju restrikcijsku udaljenost. Kamenčić može biti pomaknut na brid koji izlazi iz vrhova i tako postaje restrikcija, a kamenčić s brida nasuprotnog vrha može bit pomaknut s brida i tako postati stupanj slobode.³¹

Redistribucija se temelji na prepoznavanju neovisnih i suvišnih bridova, odnosno ograničenja. Pomicanjem kamenčića s vrha 1 (v_1) na brid prikazano prema **slici 16**, kamenčić s brida pri vrhu dva izbacuje se s brida kao slobodan. Držeći V_1 konstantnim treba se pokušati napraviti isto s ostalim vrhovima tako da se na vrhu 2 (v_2) prikupi najveći mogući broj kamenčića (što je tri). Ako je navedeno moguće, onda se brid između vrha 1 i vrha 2 smatra neovisnim, odnosno među njima nema značajnih interakcija, no ako je broj prikupljenih kamenčića dva, onda je brid između vrhova suvišan. Na opisan način može se zaključiti jesu li regije: suviše ograničene regije, one s viškom veza potrebnih za opis krutosti regije, premalo ograničene regije, one koje mogu ostvarivati diedarske rotacije te krute regije.

FIRST algoritam može se nadalje proširiti termodinamičkim ograničenjima koja dolaze iz svojstva samih proteina za razvoj metoda kao što je DCM (engl. Distance Constraint Model)

ili sprezanje s Monte Carlo metodom u svrhu pronalaska što točnijeg konformacijskog energetskog profila. Na **slici 17** prikazana je HIV proteaza (HIVP) koja se često koristi u liječenju HIV-a. FIRST programom određene su krute (plavo) i fleksibilne (crveno) regije čija identifikacija omogućuje proučavanje mehanizma proteaze.



Slika 17. Prikaz fleksibilnih i krutih regija dimera proteaze HIVA (HIVP) obrađene FIRST algoritmom. Istaknute su α , β i γ regije na proteinu povećane fleksibilnosti koje su odgovorne za izvršavanje pravilnog rada proteina.³¹

3.3. *Sub-optimalni alosterički putovi*

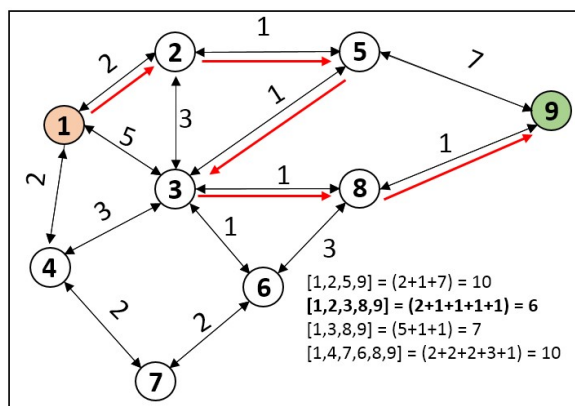
Optimalan alosterički put nije jedini skup atoma, aminokiselinskih ogranka, regija na proteinu sudjeluje u prijenosu signala kroz blage konformacijske transformacije od alosteričkog do aktivnog mjesta. Optimalni alosterički putovi često mogu biti jedinstveni za specifičnu proteinsku konformaciju. Cjelovitiji uvid u alosteriju proučavanog proteina može se prikupiti iz sub-optimalnih alosteričkih putova. Sub-optimalni alosterički putovi su u načelu dulji od optimalnih i često degenerirani. Pri proučavanju apo- i holo-enzima, optimalan put apo-enzima može biti najkraći sub-optimalni put holo-enzima. Drugim riječima, sub-optimalni putovi mogu se aktivirati u optimalne putove uslijed promjene konformacije, supstitucije atoma ili funkcijske skupine na proteinu. *R. Amaro et al* su istraživali alosteriju amidotransferaze alosteričkog puta između aktivnog HisH i alosteričkog HisF mjesta programom vlastite kreacije po imenu Weighted Implementation of Suboptimal Paths (WISP). WISP kao početne strukture koristi PDB datoteke koje sadrže 3D strukturu proteina zajedno s asigniranim trajektorijama molekularne dinamike. Ova se metoda temelji na teoriji grafova gdje su centri mase bočnih ogranka aminokiselina predstavljeni kao čvorišta. Nakon postavljene mreže konstruira se korelacijska matrica (W) koja pokazuje u kolikoj su mjeri dva čvorišta u interakciji, što je prikazano prema formuli (8). Budući da je ovakva matrica prevelika za izračunavanje korelacije čvorišta neke makromolekule unutar razumnog vremenskog perioda, potrebna je njena redukcija. Matrica W može se reducirati konstrukcijom matrice kontakata M_{contact} , analognoj onoj konstruiranoj u programu FIRST, koja opisuje prosječne vrijednosti položaja bočnih ogranka peptida tokom MD simulacije. Matrica M_{contact} reducira se s parametrom maksimalne fizičke udaljenosti, p_{cut} koja postavlja sve interakcije prevelike fizičke udaljenosti na nulu. Množenjem W i M_{contact} , dobije se W_{simp} što predstavlja pojednostavljenu korelacijsku matricu.

$$(6) C_{ij} = \frac{\langle \Delta \vec{r}_i(t) * \Delta r_j(t) \rangle}{(\langle \Delta \vec{r}_i(t)^2 \rangle \langle \Delta \vec{r}_j(t)^2 \rangle)^{1/2}}$$

$$(7) w_{ij} = -\log(|C_{ij}|)$$

$$(8) \Delta \vec{r}_i(t) = \vec{r}_i(t) - \langle \vec{r}_i(t) \rangle$$

Korištenjem Dijkstrinog algoritma počevši od početka i kraja alosteričkog signalnog puta kao što je prikazano na **slici 18**, no s dodatnom funkcijom da pretraživanje počinje ujedno i s broja 9. Pronalaskom zajedničke točke oba puta se zatim spajaju što predstavlja optimalan signalni put. Matrica W_{simp} može se nadalje pojednostaviti uvođenjem uvjeta za odbacivanje svih vrijednosti manjih od d_{cutoff} vrijednosti koje bi predstavljale optimalan signalni put. Na ovaj način sortiraju se samo sub-optimalni signalni putovi jer su po definiciji dulji, odnosno signal je prenesen preko više čvorišta (aminokiselinskih ogranka).



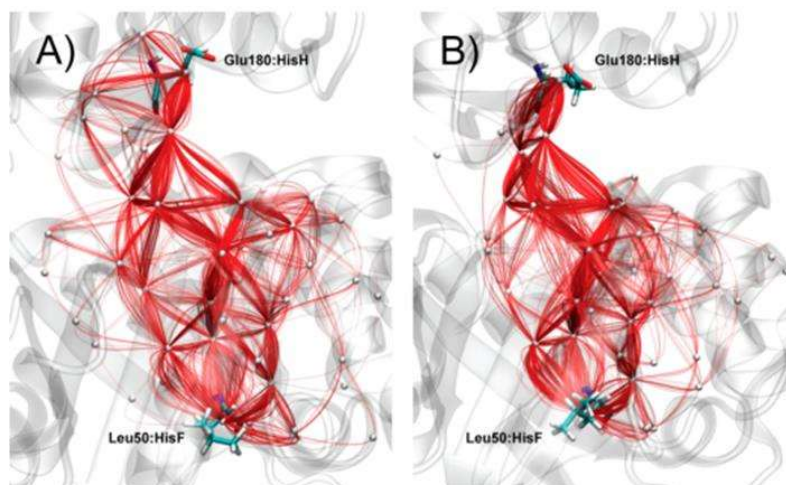
Slika 18. Prikaz odabira najkraćeg puta između čvorišta što opisuje rad Dijkstrovog algoritma od čvorišta 1 do čvorišta 9.³²

Amaro et al. navedeno su primijenili u pronalasku sub-optimalnih puteva u enzima amidotransferaze izoliranog iz fermentivne bakterije *Thermotoga maritima*. U nastavku je prikazano alosteričko (HisF) i aktivno (HisH) mjesto. Apo- struktura proteina 1GPW³³ preuzeta je iz PDB baze podataka, holo struktura je izgrađena usklađivanjem 1GPW i 1OX5³⁴ koja sadrži kokristalizirani ligand *N*1-[(5'-fosforibulozil)-formimino]-5-aminoimidazole-4-carboksamid ribonukleotid (PRFAR). Naknadno je provedena solvatacija u TIP3P molekulama vode i molekularna dinamika duljine 20 ns s vremenskim korakom od 2 fs u CHARMM27 polju sila. Nadalje, korištenjem prije opisanog Dijkstrinog algoritma na W_{simp} matrici pronađena su degenerirana čvorišta. Takva čvorišta sudjeluju u dva ili više alosterička signalna puta. Pretragom apo- i holo- strukture WISP programom može se uočiti kako dolazi do preraspodijele u degeneraciji čvorišta (aminokiselina) prikazanih u žuto osjenčanim dijelovima **Tablice 1**. Svih 700 sub-optimalnih puteva prikazano je na **slici 19** putem programa za vizualizaciju (VMD). Navedenim je dokazano da vezanjem modulatora kao što je PRFAR ukupna promjena blagih konformacija sub-optimalnih puteva može uzrokovati jaku pojavu alosterije. Ovime se

proširuje klasično poimanje o optimalnom alosteričnom signalnom putu kako prijenos signala ne mora nužno biti popraćeno velikom konformacijskom promjenom.

Tablica 1. Degenerirana čvorišta apo- i holo- enzima izračunavanjem 700 sub-optimalnih puteva.

| 700 sub-optimalnih puteva | | | | | | | | | |
|---------------------------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| HisF čvorišta | LEU 47 | VAL 48 | PHE 49 | LEU 50 | VAL 69 | ALA 70 | ILE 73 | ASP 74 | ILE 75 |
| Degeneracija Apo | 139 | 175 | 304 | 700 | 31 | 14 | 11 | 24 | 230 |
| Degeneracija Holo | 47 | 192 | 293 | 700 | 107 | 106 | 189 | 263 | 165 |
| HisH čvorišta | PRO 76 | PHE 77 | THR 78 | VAL 79 | GLY 80 | ALA 97 | ASP 98 | LYS 99 | |
| Degeneracija Apo | 407 | 329 | 228 | 210 | 258 | 117 | 285 | 165 | |
| Degeneracija Holo | 192 | 259 | 227 | 218 | 253 | 32 | 303 | 170 | |
| HisH čvorišta | GLU 180 | LYS 181 | | | | | | | |
| Degeneracija Apo | 700 | 649 | | | | | | | |
| Degeneracija Holo | 700 | 492 | | | | | | | |



Slika 19. Prikaz 700 sub-optimalnih alosteričkih puteva apo- (slika A), i 700 sub-optimalnih alosteričkih puteva holo- (B) enzima amidotransferaze.³⁵

Dodatna prednost WISP programa jest njegova mogućnost korištenja na operativnim sistemima Scientific Linux 6.4, Mac OSX 10.6, Ubuntu 12.04, Windows XP. Navedeno omogućuje korištenje računalnih paketa kao što su Python, NumPy, SciPy i NetworkX koji moraju biti podržani kako bi bilo moguće provoditi potrebne izračune.

3.4. Zaključak

Alosteričnost je jedna od temeljnih pojava u regulaciji rada proteina u kojoj se mogu pronaći odgovori za liječenje raznih bolesti uzrokovane genetskom mutacijom ili vanjskim agensom. KNF, MWC i morfeinski modeli temelj su za objašnjavanje i proučavanje alosterije. U zadnjih par desetljeća tehnike kao što su rendgenska kristalografija, NMR te u najvećem zamahu krio-elektronska mikroskopija postaju sve jeftinije, efikasnije i s mogućnosti stvaranja slika atomskih rezolucija. Velika baza podataka kao što je PDB osigurava dovoljno veliki skup struktura pomoću kojih se mogu usavršavati simulacijske tehnike molekularne dinamike u svrhu predikcije ponašanja proteina u realnim staničnim uvjetima. Zahvaljujući razvijenim poljima sila kao što su AMBER i CHARMM i teoriji grafova proteinski se sustav može opisati grafom često nazvanim proteinska strukturalna mreža. Takva se mreža može dalje obraditi programima kao što su FIRST ili WISP, otkrivajući fleksibilne i krute regije algoritmima poput „pebble game“ ili Dijkstrinog algoritma. Ovim načinom se računalnim komputacijama mogu razaznati energijski transport kanali i ukupna fleksibilnost proteina. Nadalje, *Amaro et al.* otkrivaju da uz optimalne („glavne“) alosteričke signalne putove jednako važnu ulogu za opis alosterije imaju i sub-optimalni alosterički signalni putevi. Sub-optimalni putevi za razliku od klasičnih, ne moraju nužno izvršiti veliku konformacijsku transformaciju za prijenos signala. Prijenos signala se vrši kroz mnogo blagih konformacija što može biti uočeno u preraspodijeli degeneriranih suboptimalnih puteva u primjeru HisH:HisF apo- i holo- enzima transkarbamoylaze.

§ 4. KRATICE I SIMBOLI

CTP – Citidin trifosfat

MD – Molekularna dinamika

PDB – Protein Data Base

§ 5. LITERATURNI IZVORI

- (1) Liu, J.; Nussinov, R. Allostery: An Overview of Its History, Concepts, Methods, and Applications. *PLoS Comput Biol* **2016**, *12* (6), e1004966. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1004966>.
- (2) MONOD, J.; JACOB, F. General Conclusions: Teleonomic Mechanisms in Cellular Metabolism, Growth, and Differentiation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **1961**, *26*, 389–401. <https://doi.org/10.1101/SQB.1961.026.01.048>.
- (3) Cooperman, B. S. Allosteric Regulation. *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition* **2013**, 71–74. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00001-3>.
- (4) Monod, J.; Wyman, J.; Changeux, J. P. ON THE NATURE OF ALLOSTERIC TRANSITIONS: A PLAUSIBLE MODEL. *J Mol Biol* **1965**, *12* (1), 88–118. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80285-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80285-6).
- (5) Koshland, D. E.; Nemethy, J. G.; Filmer, D. Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models in Proteins Containing Subunits. *Biochemistry* **1966**, *5* (1), 365–385. <https://doi.org/10.1021/BI00865A047>.
- (6) Jaffe, E. K. Morpheins--a New Structural Paradigm for Allosteric Regulation. *Trends Biochem Sci* **2005**, *30* (9), 490–497. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2005.07.003>.
- (7) Wodak, S. J.; Paci, E.; Dokholyan, N. v.; Berezovsky, I. N.; Horovitz, A.; Li, J.; Hilser, V. J.; Bahar, I.; Karanicolas, J.; Stock, G.; Hamm, P.; Stote, R. H.; Eberhardt, J.; Chebaro, Y.; Dejaegere, A.; Cecchini, M.; Changeux, J. P.; Bolhuis, P. G.; Vreede, J.; Faccioli, P.; Orioli, S.; Ravasio, R.; Yan, L.; Brito, C.; Wyart, M.; Gkeka, P.; Rivalta, I.; Palermo, G.; McCammon, J. A.; Panecka-Hofman, J.; Wade, R. C.; di Pizio, A.; Niv, M. Y.; Nussinov, R.; Tsai, C. J.; Jang, H.; Padhorny, D.; Kozakov, D.; McLeish, T. Allostery in Its Many Disguises: From Theory to Applications. *Structure* **2019**, *27* (4), 566–578. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2019.01.003>.
- (8) Yao, X. Q.; Momin, M.; Hamelberg, D. Elucidating Allosteric Communications in Proteins with Difference Contact Network Analysis. *J Chem Inf Model* **2018**, *58* (7), 1325–1330. <https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.8B00250>.
- (9) PDB Statistics: Overall Growth of Released Structures Per Year. <https://www.rcsb.org/stats/growth/growth-released-structures> (accessed 2022-05-25).
- (10) PDB Data Distributions: Enzyme Classification Name. https://www.rcsb.org/stats/explore/enzyme_classification_name (accessed 2022-05-25).
- (11) Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Židek, A.; Potapenko, A.; Bridgland, A.; Meyer, C.; Kohl, S. A. A.; Ballard, A. J.; Cowie, A.; Romera-Paredes, B.; Nikolov, S.; Jain, R.; Adler, J.; Back, T.; Petersen, S.; Reiman, D.; Clancy, E.; Zielinski, M.; Steinegger, M.; Pacholska, M.; Berghammer, T.; Bodenstein, S.; Silver, D.; Vinyals, O.; Senior, A. W.; Kavukcuoglu, K.; Kohli, P.; Hassabis, D. Highly Accurate Protein Structure Prediction

- with AlphaFold. *Nature* **2021** 596:7873 **2021**, 596 (7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- (12) AlphaFold Protein Structure Database. <https://alphafold.ebi.ac.uk/> (accessed 2022-08-10).
- (13) Moffat, K. Laue Diffraction and Time-Resolved Crystallography: A Personal History. *Philosophical Transactions of the Royal Society A* **2019**, 377 (2147), 20180243. <https://doi.org/10.1098/RSTA.2018.0243>.
- (14) Yusupova, G.; Yusupov, M. Ribosome Biochemistry in Crystal Structure Determination. *RNA* **2015**, 21 (4), 771. <https://doi.org/10.1261/RNA.050039.115>.
- (15) The Nobel Prize in Physics 1915 - NobelPrize.org. <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1915/summary/> (accessed 2022-05-23).
- (16) The Nobel Prize in Physics 1914 - NobelPrize.org. <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1914/summary/> (accessed 2022-05-23).
- (17) de Chadarevian, S. John Kendrew and Myoglobin: Protein Structure Determination in the 1950s. *Protein Sci* **2018**, 27 (6), 1136. <https://doi.org/10.1002/PRO.3417>.
- (18) The Nobel Prize in Chemistry 1962 - NobelPrize.org. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1962/summary/> (accessed 2022-05-23).
- (19) The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1962 - NobelPrize.org. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1962/summary/> (accessed 2022-05-23).
- (20) PDB Statistics: Growth of Structures from X-ray Crystallography Experiments Released per Year. <https://www.rcsb.org/stats/growth/growth-xray> (accessed 2022-05-12).
- (21) de Chadarevian, S. John Kendrew and Myoglobin: Protein Structure Determination in the 1950s. *Protein Sci* **2018**, 27 (6), 1136. <https://doi.org/10.1002/PRO.3417>.
- (22) (IUCr) Introduction to the calculation of structure factors. <https://www.iucr.org/education/pamphlets/3/full-text> (accessed 2022-05-29).
- (23) Cowtan, K. Phase Problem in X-Ray Crystallography, and Its Solution.
- (24) Sehnal, D.; Bittrich, S.; Deshpande, M.; Svobodová, R.; Berka, K.; Bazgier, V.; Velankar, S.; Burley, S. K.; Koča, J.; Rose, A. S. Mol*Viewer: Modern Web App for 3D Visualization and Analysis of Large Biomolecular Structures. *Nucleic Acids Res* **2021**, 49 (W1), W431–W437. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB314>.
- (25) Nobelova nagrada za kemiju za 2017. godinu: krio- elektronska mikroskopija - CROSBİ. <https://www.bib.irb.hr/911605> (accessed 2022-07-26).
- (26) Anisotropic Network Model - Wikipedia. https://en.wikipedia.org/wiki/Anisotropic_Network_Model#/media/File:Elastic_network_model.png (accessed 2022-07-26).
- (27) Ramachandran, K. I.; Deepa, G.; Namboori, K. *Computational Chemistry and Molecular Modeling: Principles and Applications*; 2008. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-77304-7>.
- (28) *Computational Chemistry and Molecular Modeling*. **2008**. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-77304-7>.
- (29) Sehnal, D.; Bittrich, S.; Deshpande, M.; Svobodová, R.; Berka, K.; Bazgier, V.; Velankar, S.; Burley, S. K.; Koča, J.; Rose, A. S. Mol*Viewer: Modern Web App for 3D Visualization and Analysis of Large Biomolecular Structures. *Nucleic Acids Res* **2021**, 49 (W1), W431–W437. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB314>.
- (30) Sciences, B. *Frontiers in Computational Chemistry (Volume 3)*.
- (31) Jacobs, D. J.; Rader, A. J.; Kuhn, L. A.; Thorpe, M. F. Protein Flexibility Predictions Using Graph Theory. *Proteins* **2001**, 44 (2), 150–165. <https://doi.org/10.1002/PROT.1081>.
- (32) Illustration of Dijkstra's algorithm. | Download Scientific Diagram. https://www.researchgate.net/figure/Illustration-of-Dijkstras-algorithm_fig1_331484960 (accessed 2022-07-24).

-
- (33) Douangamath, A.; Walker, M.; Beismann-Driemeyer, S.; Vega-Fernandez, M. C.; Sterner, R.; Wilmanns, M. Structural Evidence for Ammonia Tunneling across the (B α)8 Barrel of the Imidazole Glycerol Phosphate Synthase Bienenzyme Complex. *Structure* **2002**, *10* (2), 185–193. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(02\)00702-5](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00702-5).
- (34) Chaudhuri, B. N.; Lange, S. C.; Myers, R. S.; Davisson, V. J.; Smith, J. L. Toward Understanding the Mechanism of the Complex Cyclization Reaction Catalyzed by Imidazole Glycerolphosphate Synthase: Crystal Structures of a Ternary Complex and the Free Enzyme. *Biochemistry* **2003**, *42* (23), 7003–7012. <https://doi.org/10.1021/BI034320H>.
- (35) van Wart, A. T.; Durrant, J.; Votapka, L.; Amaro, R. E. Weighted Implementation of Suboptimal Paths (WISP): An Optimized Algorithm and Tool for Dynamical Network Analysis. *J Chem Theory Comput* **2014**, *10* (2), 511–517. <https://doi.org/10.1021/CT4008603>.