

# Potencijalna uloga Fe-S kompleksa u pojavi života

---

**Crnko-Kovač, Ivan**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*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:217:503459>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-01**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijски odsjek

Ivan Crnko-Kovač

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **Potencijalna uloga Fe-S kompleksa u pojavi života**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Morana Dulić

Zagreb, 2024.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

3. srpnja 2024.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

6. rujna 2024.

Mentor rada: doc. dr. sc. Morana Dulić

Potpis:



# Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Kemijska podloga Fe-S kompleksa.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. <i>Strukture Fe-S kompleksa .....</i>	<i>1</i>
1.1.2. <i>Biološke uloge Fe-S kompleksa.....</i>	<i>2</i>
<b>§ 2. Fe-S KOMPLEKSI I POJAVA ŽIVOTA .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Glavne teorije pojave života.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2. Wächtershäuserova hipoteza o željeza-sumpor svijetu .....</b>	<b>6</b>
2.2.1. <i>Formiranje pirita .....</i>	<i>6</i>
2.2.2. <i>Sličnost s ciklusom limunske kiseline.....</i>	<i>7</i>
2.2.3. <i>Teorija površinskog metabolizma .....</i>	<i>10</i>
<b>2.3. Russell-Halova hipoteza željezo-sumpor membrana .....</b>	<b>12</b>
<b>2.4. Potencijalne uloge Fe-S kompleksa u primitivnom metabolizmu.....</b>	<b>14</b>
2.4.1. <i>Slaganje s hipotezom o formiranju pirita.....</i>	<i>14</i>
2.4.2. <i>Hipoteze o evoluciji Fe-S klastera .....</i>	<i>14</i>
2.4.3. <i>Fe-hidrogenaze i nitrogenaze .....</i>	<i>15</i>
2.4.4. <i>Feredoksini.....</i>	<i>15</i>
2.4.5. <i>Evolucija ranih metaboličkih puteva .....</i>	<i>16</i>
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XVII</b>



## § Sažetak

Željezo-sumpor (Fe-S) kompleksi jedni su od najučestalijih bioloških kofaktora, prisutni u raznim strukturama od jednostavnih oblika poput [1Fe-0S] klastera rubredoksina do složenijih poput [8Fe-7S] klastera nitrogenaza dok su najčešći oblici [2Fe-2S], [3Fe-4S], i [4Fe-4S] klasteri. Imaju ključne uloge u prijenosu elektrona tijekom staničnih procesa kao što su stanično disanje i fotosinteza, omogućujući stvaranje ATP-a. Također sudjeluju u regulaciji enzimske aktivnosti, primjerice u Krebsovom ciklusu te u održavanju integriteta genoma kroz uloge u enzimima replikacije i popravka DNA.

Fe-S klasteri također reguliraju ekspresiju gena, reagirajući na promjene u staničnom mediju preko transkripcijskih faktora poput FNR i SoxR. Osim toga, sudjeluju u biosintezi bioloških molekula kao što su biotin i lipoična kiselina te u fiksaciji dušika.

Teorije o podrijetlu života, kao što su Wächtershäuserova hipoteza o željezo-sumpor svijetu i Russell-Halova hipoteza željezo-sumpor membrana, predlažu ključnu ulogu Fe-S kompleksa u ranim biokemijskim procesima. Wächtershäuserova hipoteza sugerira da su minerali željezovih i niklovih sulfida u hidrotermalnim izvorima osigurali katalitičku površinu za sintezu organskih spojeva iz anorganskih, dok Russell-Halova hipoteza predlaže da su željezo-sumpor membrane stvorile odjeljke koji su omogućili razvoj prvih biokemijskih reakcija i protonski gradijent za oksidativnu fosforilaciju.

Cilj ovog završnog rada je istražiti biološke funkcije Fe-S kompleksa, njihovu ulogu u ranim biokemijskim procesima i teorijama o podrijetlu života, te pružiti sveobuhvatan pregled njihove strukture, mehanizama djelovanja i značaja u suvremenoj biokemiji.





## § 1. UVOD

### 1.1. Kemijska podloga Fe-S kompleksa

#### 1.1.1. Strukture Fe-S kompleksa

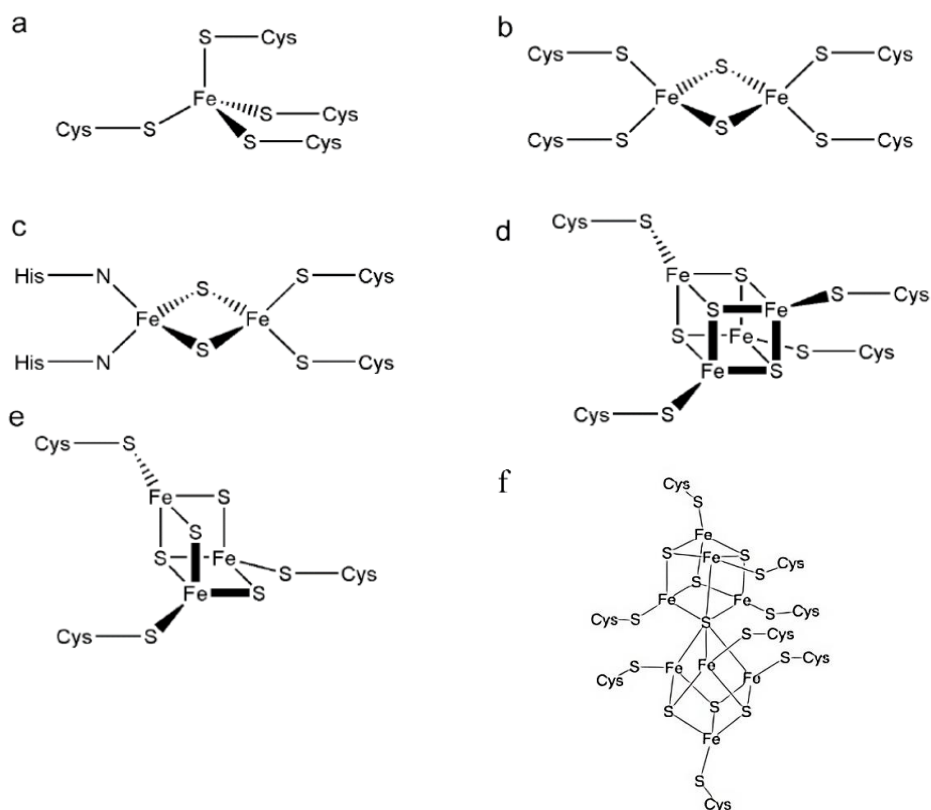
Željezo-sumpor (Fe-S) kompleksi jedni su od najučestalijih kofaktora u prirodi i čine najveću klasu metaloproteina.<sup>1</sup> Ovi kompleksi nalaze se u različitim strukturama, od jednostavnih oblika poput [1Fe-0S] klastera rubredoksina u sumpornim bakterijama, gdje je jedan atom željeza koordiniran s četiri cisteinska ogranka,<sup>2</sup> do složenijih oblika poput [8Fe-7S] klastera u nitrogenazama bakterija koje fiksiraju dušik (Slika 1).<sup>3</sup> Najčešći oblici klusterskih struktura su [2Fe-2S], [3Fe-4S] i [4Fe-4S].<sup>4</sup>

Nakon klastera rubredoksina, najjednostavniji od njih je [2Fe-2S] klaster, rompske strukture koju sačinjavaju dva atoma željeza povezana s dva atoma sumpora (Slika 1), a često se nalaze u feredoksinima kao što je adrenodoksin, Fe-S protein uključen u sintezu steroida u nadbubrežnim žlijezdama.<sup>5</sup> Kompleksi su uglavnom koordinirani s četiri cisteinska ogranka, no postoje tzv. Rieske proteini koji djeluju u kompleksu III u respiracijskom lancu prijenosa elektrona (RLPE) i njihov Fe-S klaster koordiniran je s dva cisteinska i dva histidinska ogranka (Slika 1).<sup>6</sup>

[4Fe-4S] klasteri imaju kubičnu strukturu s atomima željeza i sumpora poredanih po kutovima kocke (Slika 1).<sup>7</sup> Svaki atom željeza koordiniran je s tri atoma sumpora i jednim cisteinskim ogrankom što čini strukturu ovog kompleksa vrlo stabilnom.<sup>8</sup> Nalaze se u feredoksinima bakterija i unutar mitohondrijskih respiratornih kompleksa, kao što je N2 klaster u kompleksu I RLPE.<sup>9</sup>

[3Fe-4S] kompleksi, iako rjeđi od [4Fe-4S] tipa, također su prisutni u raznim tipovima feredoksina te hidrogenaza i u kinonskom veznom mjestu kompleksa II RLPE.<sup>10</sup> Ovaj se klaster sastoji od tri atoma željeza i četiri atoma sumpora, a struktura se može usporediti s kubičnom strukturom kojoj nedostaje jedan vrh.

Najsloženiju strukturu od spomenutih tipova kompleksa ima oblik [8Fe-7S] koji se sastoji od 8 atoma željeza i 7 atoma sumpora (Slika 1). Takva jedinstvena struktura ovog klastera čini ga pogodnim za sudjelovanje u višeelektronskim redoks procesima nitrogenaznih enzima potrebnim za fiksaciju i prevođenje molekularnog dušika do amonijaka.<sup>11</sup>



Slika 1. Strukture najčešćih oblika Fe-S kompleksa: a) [1Fe-0S] – u rubredoksinu, b) [2Fe-2S] – u feredoksin, c) [2Fe-2S] –u Rieske proteinu, d) [4Fe-4S] – u feredoksin, e) [3Fe-4S] – u feredoksinu i f) [8Fe-7S] klaster.<sup>7</sup>

### 1.1.2. Biološke uloge Fe-S kompleksa

Fe-S proteini imaju ključnu ulogu u raznim biološkim procesima. Jedna od njihovih zadaća je osigurati pravilan prijenos elektrona u stanicama. Prisutni su u lancima prijenosa elektrona, osobito u mitohondrijima i kloroplastima, gdje olakšavaju prijenos elektrona tijekom procesa staničnog disanja, odnosno fotosinteze. Elektroni donirani od NADH i FADH<sub>2</sub> kofaktora prenose se uz pomoć različitih Fe-S klastera kroz komplekse I, II i III respiracijskog lanca prijenosa elektrona sve do krajnjeg akceptora elektrona, kisika, iz kojeg se formira voda, a kroz cjelokupan proces se stvaranjem protonskog gradijenta generira velika količina ATP-a. U obliku Rieske proteina kompleksa *b<sub>6f</sub>* te tri [4Fe-4S] klastera, u fotosustavu I fotosintetskog

lanca prijenosa elektrona služe u direktnom prijenosu elektrona na feredoksin, reducens potreban za sintezu NADPH.<sup>12</sup>

Osim prijenosa elektrona, Fe-S proteini sudjeluju u regulaciji enzimske aktivnosti. Na primjer, Fe-S centri prisutni su u akonitazi, enzimu Krebsovog ciklusa, koji je odgovoran za izomerizaciju citrata u izocitrat. Akonitaza posjeduje [4Fe-4S] klaster u aktivnom mjestu koji je neophodan za njezinu katalitičku funkciju. Nadalje, kada je stanica izložena oksidativnom stresu, primijećeno je kako Fe-S klasteri akonitaze osim katalitičke imaju i regulatornu ulogu, u obrani stanice od reaktivnih kisikovih vrsta gdje promjene u redoks stanju Fe-S klastera, iz [4Fe-4S]<sup>2+</sup> u nestabilno [4Fe-4S]<sup>3+</sup> stanje, mogu inicirati signalne puteve koji aktiviraju zaštitne mehanizme stanice, kao što su aktivacija antioksidacijskih enzima, poput superoksid-dismutaze i glutation-peroksidaze, ili popravak oštećenja DNA.<sup>13</sup>

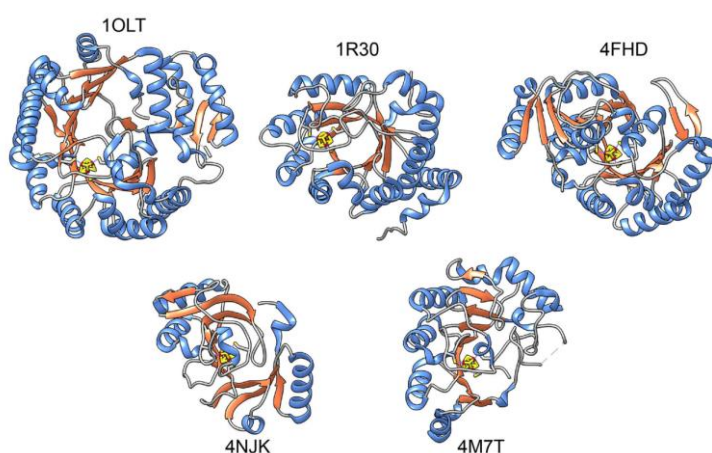
Fe-S proteini također imaju važnu ulogu u održavanju integriteta genoma. Prisutni su u enzimima poput DNA-polimeraza, helikaza i glikozilaza koji su uključenu u replikaciju i popravak DNA. Fe-S klasteri pomažu u stabilizaciji strukture tih enzima i omogućuju njihovo pravilno vezanje na DNA.<sup>14,15</sup> Bez odgovarajuće funkcije Fe-S proteina u tim procesima, organizmi bi bili izloženi većem riziku od genetskih mutacija i oštećenja DNA.<sup>5</sup>

Još jedno važno djelovanje Fe-S kompleksa je u regulaciji ekspresije gena. Transkripcijski faktori poput regulatora redukcije između fumarata i nitrata (engl. *Fumarate and Nitrate Reductase Regulatory*, FNR) i regulatora superoksidnog odgovora (engl. *superoxide response regulator*, SoxR) sadrže [4Fe-4S] klaster koji služe kao senzori koji reagiraju na promjene u staničnom okruženju, kao što su promjena razine kisika i oksidativni stres. Ti faktori mogu aktivirati ili potisnuti ekspresiju gena kao odgovor na promjene u okolini, što omogućuje stanicama da se adaptiraju na različite uvjete. Na primjer, u uvjetima niske razine kisika, FNR iz *E. coli* aktivira ekspresiju stotine gena uključene u proces anaerobnog disanja poput *sodB*, *maeA*, *gmpA*, *metE*, *folE*, i *folX*, omogućujući organizmu da preživi u hipoksičnim uvjetima.<sup>16</sup> Slično tome, Fe-S kompleksi uključeni su i u mehanizam regulacije željeza u stanici. Proteini za regulaciju željeza (engl. *Iron regulatory proteins*, IRP) sadrže [4Fe-4S] klaster koji reagiraju na unutarstanične razine željeza i reguliraju ekspresiju gena uključenih u metabolizam željeza. Kada je razina željeza u stanici niska, IRP-ovi se vežu za mRNA navedenih gena, regulirajući njihovu translaciju kako bi se osigurala ispravna homeostaza željeza.<sup>17</sup>

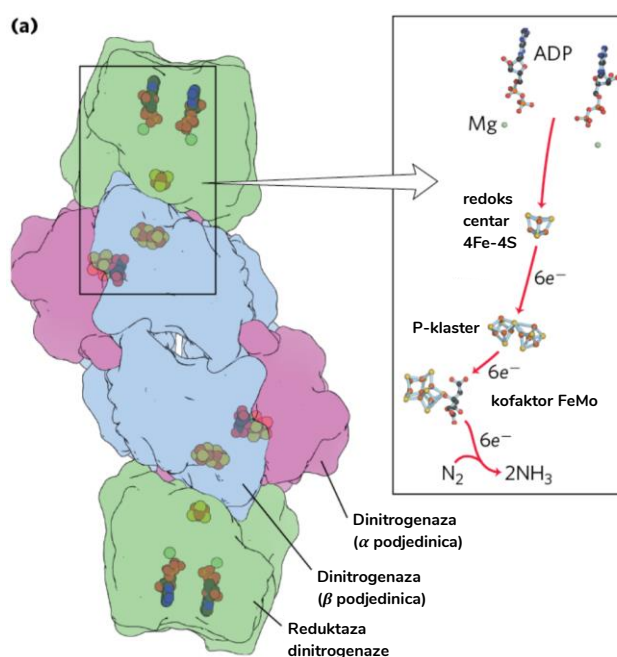
Osim navedenog, Fe-S klasteri sastavni su dio reakcijskog centra u radikal-S-adenozilmetonin (engl. *radical-S-adenosylmethionine*, SAM) superobitelji enzima (Slika 2)

koji kataliziraju reduktivno cijepanje SAM-a te nastanak 5'-deoksiadenozil radikala koji potom aktivira supstrat uklanjanjem vodikovog atoma. Ovakav radikalni mehanizam sveprisutan je u biosintezi mnogih bioloških molekula poput biotina i lipoične kiseline.<sup>18,19</sup>

Nadalje, Fe-S kompleksi ključni su u fiksaciji dušika u kvržicama korijena leguminoza. Kompleks nitrogenaza (Slika 3), koji reducira atmosferski dušik u amonijak, sadrži [4Fe-4S] klustere koji su neophodni za njegovu aktivnost.<sup>3</sup> Ovi su procesi ključni za rast i razvoj biljaka, ali i za ostatak živog svijeta koji ovise o biljkama kao izvoru nutrijenata. Sličan primjer su i sulfid reduktaze s Fe-S klasterima ključne za metabolizam sumpora, koji je važan za sintezu esencijalnih aminokiselina i drugih biomolekula.<sup>20</sup>



Slika 2. Prikaz [4Fe-4S] klastera u različitim enzimima iz radikal-S-adenozilmetionin superobitelji enzima.<sup>21</sup>



Slika 3. Prikaz enzima i kofaktora kompleksa nitrogenaza.<sup>22</sup>

## § 2. Fe-S KOMPLEKSI I POJAVA ŽIVOTA

### 2.1. Glavne teorije pojave života

Podrijetlo života na Zemlji često je raspravljana i detaljno istraжена tema, s nekoliko predloženih teorija koje objašnjavaju potencijalni način pojave živog svijeta iz neživog. Jedna od najstarijih teorija je hipoteza o primordijalnoj juhi, koja sugerira da je život započeo u toplom jezeru sa smjesom bogatom raznim organskim spojevima gdje su se pod utjecajem munja ili UV zračenja formirale jednostavne biomolekule koje su svojim razvojem dovele do života. Još jedna značajna teorija je hipoteza RNA svijeta, koja predlaže da je život započeo nastankom samoreplicirajućih RNA molekula. Međutim, u posljednja dva desetljeća dvadesetog stoljeća pojavile su se dvije istaknute hipoteze koje se usredotočuju na ulogu sulfida prijelaznih metala u pojavi života, posebice Wächtershäuserova hipoteza o željezo-sumpor (Fe-S) svijetu i Russell-Hallove hipoteza željezo-sumpor membrana.<sup>23</sup>

Wächtershäuserova hipoteza o željezo-sumpor svijetu predlaže da je život nastao kemijskim reakcijama na površinama minerala željezovih i niklovi sulfida u hidrotermalnim izvorima. Ti minerali mogli su osigurati potrebnu katalitičku površinu za sintezu organskih biomolekula iz anorganskih spojeva u uvjetima visokog tlaka i temperature<sup>24</sup>. Ova hipoteza pretpostavlja da su rani oblici života bili autotrofi, sposobni sintetizirati vlastite biomolekule iz jednostavnih anorganskih spojeva poput CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S i PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, bez upotrebe ikakvih organskih spojeva iz okoline.<sup>25</sup>

Druga istaknuta hipoteza je Russell-Hallove hipoteza željezo-sumpor membrana koja također pretpostavlja razvoj prvog života na područjima rubnih (engl. *off-ridge*) hidrotermalnih izvora. Oni predlažu da je život nastao unutar željezo-sumporovih membrana u kojima su se spontano razvili odjeljci koji su omogućili potrebnu organizaciju i koncentraciju biomolekula, povećavajući međusobne interakcije, za razvoj prvog živog organizma.<sup>26</sup> Nadalje, te membrane služile su kao primitivne stanične stijenke, stvarajući okolinu pogodnu za primitivne biokemijske reakcije.<sup>27</sup> Obje hipoteze temelje se na katalitičkoj ulozi Fe-S kompleksa u nastanku života, sugerirajući da su ti spojevi bili ključni za pojavu prvih metaboličkih putova i sintezu životno važnih biomolekula.<sup>28</sup>

## 2.2. Wächtershäuserova hipoteza o željeza-sumpor svijetu

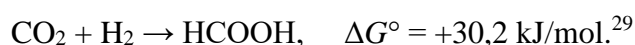
### 2.2.1. Formiranje pirita

Wächtershäuser predlaže da je reakcija formiranja pirita bila potencijalni izvor primordijalne energije, nužne za razvoj života na Zemlji. U reakciji reagiraju željezov(II) sulfid (FeS) i sumporovodik (H<sub>2</sub>S) formirajući pirit (FeS<sub>2</sub>) i vodik (H<sub>2</sub>). Naime, radi se o egzergonoj reakciji s promjenom Gibbsove energije od  $\Delta G^\circ = -41,9$  kJ/mol prema prvotnom Wächtershäuserom izračunu, koji je kasnije sveo na  $\Delta G^\circ = -38,4$  kJ/mol.<sup>29</sup> Schoonen i suradnici su naknadno dobili nešto nižu vrijednost od -31,2 kJ/mol koristeći novije termodinamičke podatke:



Relativno niska vrijednost promjene Gibbsove energije ove reakcije pri standardnim uvjetima omogućuje da u kombinaciji s nekim endergonim reakcijama, poput redukcije CO<sub>2</sub> do metanske kiseline, koje su inače termodinamički nepovoljne čini termodinamički povoljnima.

Endergona reakcija redukcije CO<sub>2</sub> do metanske kiseline:



Kombinirana reakcija redukcije CO<sub>2</sub> i formiranja pirita:



Nadalje, sporija kinetika formiranja pirita, koje se u idealnom slučaju događalo samo u kombinaciji s redukcijom CO<sub>2</sub> ili s nekom drugom organskom reakcijom, prevenirala bi nepotreban gubitak redukcijskog potencijala i osigurala održivu proizvodnju energije potrebne za primordijalne biokemijske reakcije.<sup>29</sup>

Teorija o kemo-auto-nastanku života spregnuta piritom (engl. *pyrite-pulled chemo-auto-origin*) temelji se na oksidativnom formiranju pirita, u kojem protoni i ugljikov dioksid međusobno konkuriraju za mjesto krajnjeg akceptora elektrona. Međutim, takav princip djelovanja je u neslaganju s od prije poznatim vjerovanjem da je za formiranje pirita potreban elementarni sumpor ili spojevi ekvivalentni njemu (npr. polisulfidi ili tiosulfati) koji bi bili nužna oksidacijska sredstva u reakciji. Snaga oksidansa ili reducensa ovisi o njihovom

standardnom elektrodnom potencijalu, koji mjeri sposobnost molekule da primi ili donira elektrone u određenim uvjetima. Na primjer, FeS/H<sub>2</sub>S sustav je snažno redukcijsko sredstvo jer ima vrlo negativan standardni elektrodni potencijal ( $E^{\circ} = -620$  mV), što znači da lako donira elektrone. Elementarni sumpor te polisulfidi i tiosulfati, s druge strane, tradicionalno se smatraju boljim oksidansima zbog višeg elektrodnog potencijala ( $E^{\circ} > 0$  mV) te lakšeg primanja elektrona što omogućuje formiranje piritita. Berner je primijetio da reakcija nastajanja piritita nije proučavana u prirodnom geokemijskom okruženju, već samo u simuliranim uvjetima korozije.<sup>25</sup> Drobner i suradnici su prvi napravili eksperiment u kojima su simulirali prirodne geokemijske uvjete poput onih na vulkanskim, hidrotermalnim te sedimentarnim staništima i primijetili kako su se pirit i molekularni vodik razvijali bez prisustva elementarnog sumpora potvrđujući činjenicu da je FeS/H<sub>2</sub>S sustav snažno redukcijsko sredstvo, te da je predložena reakcija bila moguć izvor energije za razvoj prvog života.<sup>31</sup>

### 2.2.2. Sličnost s ciklusom limunske kiseline

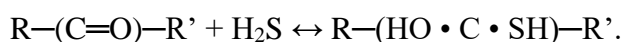
Istraživanje evolucije fiksacije ugljika ključno je za razumijevanje teorija o nastanku života. Rekonstruiranje prvog autokatalitičkog ciklusa fiksacije ugljika podrazumijeva proučavanje jednostavnijih i manjih ciklusa, poput reduktivnog ciklusa limunske kiseline (engl. *reductive citrate cycle*, RCC) te reduktivnog puta pentozna-fosfata (engl. *reductive pentose-phosphate cycle*, RPC). Ovi ciklusi su autokatalitički, što znači da se provođenjem reakcija generira sve više novih CO<sub>2</sub> akceptora što u konačnici ubrzava cikluse. Između dva navedena, RCC se smatra starijim zbog više razloga. Jedan od njih je njegova karakteristika da udvostručuje akceptore CO<sub>2</sub> svakim provedenim ciklusom, dok je kod RPC-a to povećanje oko 1,2 puta. Osim toga, reaktanti RCC-a imaju karboksilne skupine koje dobivaju fiksacijom ugljikova dioksida, za razliku od fosfatnih skupina RPC-a, koje ne proizlaze iz fiksacije CO<sub>2</sub>. Također, za razliku od RPC-a, RCC u svojim reakcijama sadrži tioestere i Fe-S enzime, koji su ključni za redoks i ostale reakcije.<sup>24</sup>

Wächtershäuser je također postulirao da je većina reakcija RCC-a isprva koristila tio-analoge metaboličkih intermedijera, poput tiomalata umjesto malata, što je prema njemu imalo dvije ključne prednosti. Jedna od njih se odnosi na određene reakcije karboksilacije, poput  $\beta$ -karboksilacije piruvata za nastanak oksaloacetata, koje su vrlo nepovoljne bez prisutnog katalizatora. Wächtershäuser je pretpostavio da tio-analozi intermedijera, poput tiopiruvata, imaju povoljniju kinetiku. Druga prednost koju je pretpostavio jest sprega tih tio-analoga

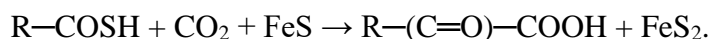


intermedijera RCC-a s formiranjem pirita što bi, kao u već spomenutom primjeru s redukcijom CO<sub>2</sub>, učinilo reakcije termodinamički povoljnijima.<sup>24,29</sup>

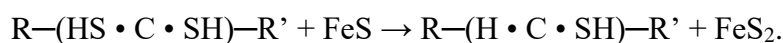
Kako bi tio-analogni RCC mogao funkcionirati, postulirano je i razdvojeno u 4 kategorije nekoliko osnovnih reakcija. Prva je A klasa reakcija i ona uključuje formiranje monotioketala, ditioketala i aminotioketala iz keto karbonila pri visokim koncentracijama H<sub>2</sub>S:



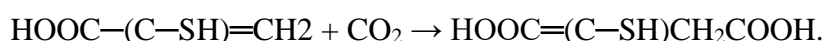
Reakcijska klasa B uključuje reduktivnu karboksilaciju tio-kiseline gdje je produkt  $\alpha$ -keto kiselina. Na primjer, jedna od predloženih reakcija je nastanak pirogroždane kiseline iz tiooctene kiseline i CO<sub>2</sub> koristeći sumpor iz FeS kao donor elektrona:



Klasa C obuhvaća reakcije reduktivne desulfurizacije:



Posljednja reakcijska klasa D, koja još nije eksperimentalno potvrđena, uključuje reakcije  $\beta$ -karboksilacije 2-entiol-karboksilnih kiselina:



Kao što se može primijetiti, za razliku od A i D klase, B i C klase obuhvaćaju reakcije spregnute s nastajanjem pirita. Zajedno s tiokiselinskim-karboksilnim ravnotežama, dodatkom i eliminacijom H<sub>2</sub>S, te reakcijama retro-aldolnih cijepanja, ove četiri klase reakcije čine Wächtershäuserov tio-analogni RCC (Slika 4). U suvremenom RCC-u, reakcije koje su tu spregnute piritom zamijenjene su kofaktorima poput željezo-sumpor proteina i adenozin trifosfata (ATP).<sup>23,24,32</sup>



### 2.2.3. Teorija površinskog metabolizma

Wächtershäuser pretpostavlja da pirit, osim što svojim nastajanjem djeluje kao pokretač raznih biokemijskih reakcija i fiksacije ugljika, ujedno sudjeluje kao bogata reakcijska podloga na kojoj se bazira površinski metabolizam. On predlaže da su metabolički intermedijeri anioni koji se vežu za pozitivno nabijenu površinu pirita (Slika 5). To mogu biti anorganski anioni poput  $\text{HS}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$  i  $\text{HPO}_4^{2-}$  te organski poput karboksilata ( $-\text{COO}^-$ ), tiolata ( $-\text{S}^-$ ) i fosfata ( $-\text{O}-\text{PO}_3^{3-}$ ). Vežanje organskih molekula sintetiziranih tijekom RCC-a za površinu pirita bilo je nužno kako se ne bi zauvijek izgubili u prostranim, vrlo razrijeđenim vodama praocéana. Nadalje, primijećeno je da površina pirita selektivno adsorbira određene molekule, što je olakšalo evoluciju te polimerizaciju adsorbiranih anionskih monomera. Primjerice, to svojstvo pirita promovira nastajanje peptida sačinjenih od uzastopnih reakcija kondenzacije aminokiselina.<sup>23,25,33</sup>

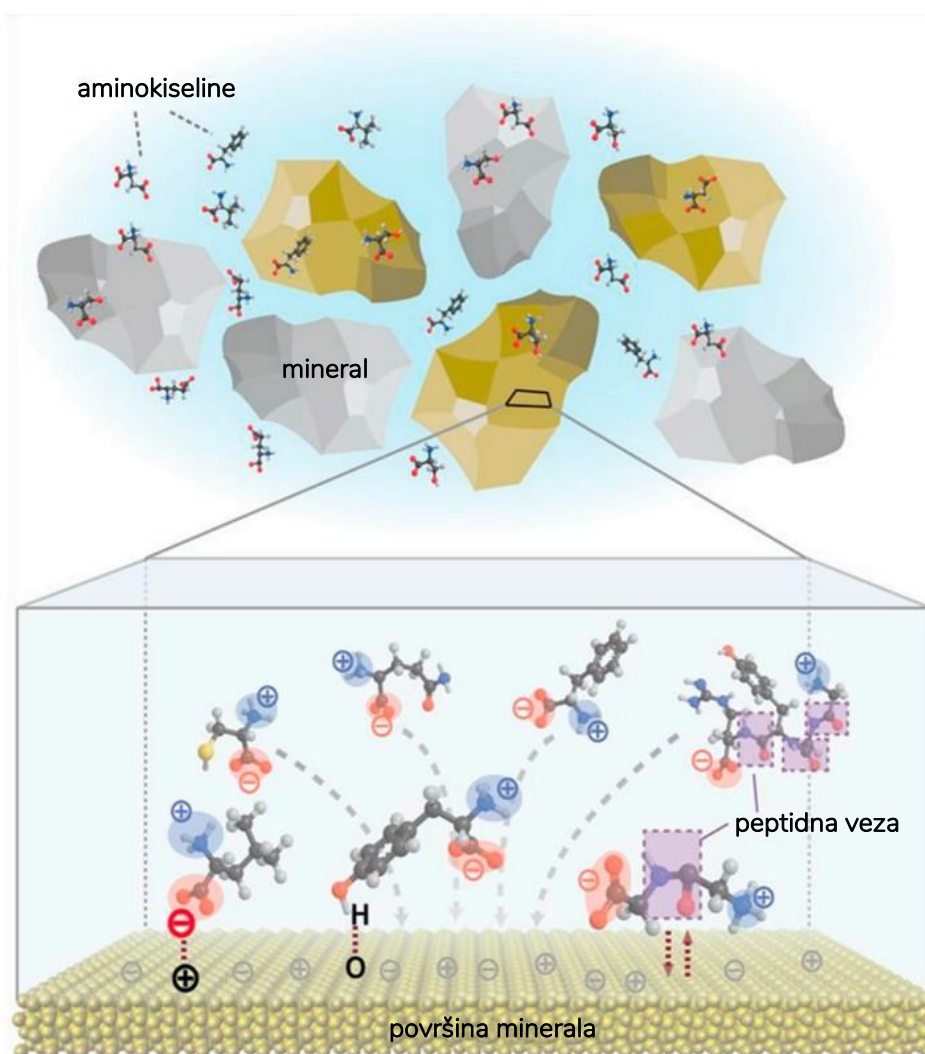
Naboj površine pirita važan je faktor koji treba uzeti u obzir prilikom promatranja površinskog metabolizma. Naime, on ovisi o pH vrijednosti na način da je pozitivan pri niskim pH (<2,0), te upravo su takvi uvjeti potrebni za većinu Wächtershäuserovih predloženih reakcija koje uključuju visoke koncentracije  $\text{H}_2\text{S}$ .<sup>34</sup> Problem s takvim uvjetima je da će dosta organskih, uglavnom slabih, kiselina uključenih u proces pri toj vrijednosti pH biti protonirane zbog svoje relativnog niske vrijednosti pKa od 3,0 do 4,0. Međutim, Bebie and Schoonen su proučavajući vežanje aniona organskih kiselina primijetili kako se acetat adsorbira na površinu pirita pri pH vrijednosti od čak 4,0, pri kojoj je površina pirita negativno nabijena, iz čega su zaključili kako određeni anioni uspijevaju prevladati ukupno Coulombovo odbijanje naboja površine pirita kako bi se adsorbirali.<sup>35</sup>

Jačina kojom se anioni vežu za pirit može značajno utjecati na ishod reakcija jer ovisno o tome hoće li ostati adsorbirani ili ne određena je njihova prisutnost u drugim reakcijama ili gubitak u okolinu. Vrijeme zadržavanja organskih produkata na površini pirita eksponencijalno se povećava s energijom vežanja tih produkata, a može trajati od  $10^{-10}$  sekundi pri fizisorpciji ( $E(\text{vežanja}) = 17 \text{ kJ/mol}$ ) do 125 godina pri kemisorpciji ( $E(\text{vežanja}) = 125 \text{ kJ/mol}$ ).<sup>36</sup>

Točnu jačinu vežanja raznih organskih spojeva za pirit kompleksno je predvidjeti, međutim Paneth i Fajansovo pravilo taj postupak malo olakšava. To pravilo povezuje jačinu vežanja s netopljivosti spoja u vodi.<sup>37</sup> Primjerice, hidrofilna monokarboksilna kiselina stvara slabe veze s površinom pirita zbog svoje dobre topljivosti u vodi dok na primjer hidrofobne dugolančane masne kiseline, zbog svoje loše topljivosti, ostvaruju čvrstu vezu s piritom. Prema

istom principu, polikarboksilati, poput oksalata ili sukcinata, tioli, poput cisteina ili glutationa, te spojevi s fosfatnim grupama, posebice u fosforiliranim ugljikohidratima, tvore čvrste veze s površinom pirita.<sup>38</sup>

Prema Wächtershäuserovoj teoriji, prvi živi organizmi zamišljeni su dakle na površini pirita imajući spomenuti „površinski metabolizam“ pomoću kojeg su preživljavali i evoluirali u kompleksnije organizme. Zamišljeno je da su ti rani organizmi međusobno izmjenjivali biološke molekule s organizmima sa susjednih kristala pirita lateralnom migracijom što im je pomagalo u širenju populacije. Takva dvodimenzionalna difuzija molekula na površini pirita omogućila je provedbu višestrukih reakcija odjednom, bez odvajanja reaktanata od površine što se može usporediti sa suvremenim multienzimskim kompleksima.<sup>23</sup>



Slika 5. Prikaz interakcija između aminokiselina i površine pirita.<sup>39</sup>

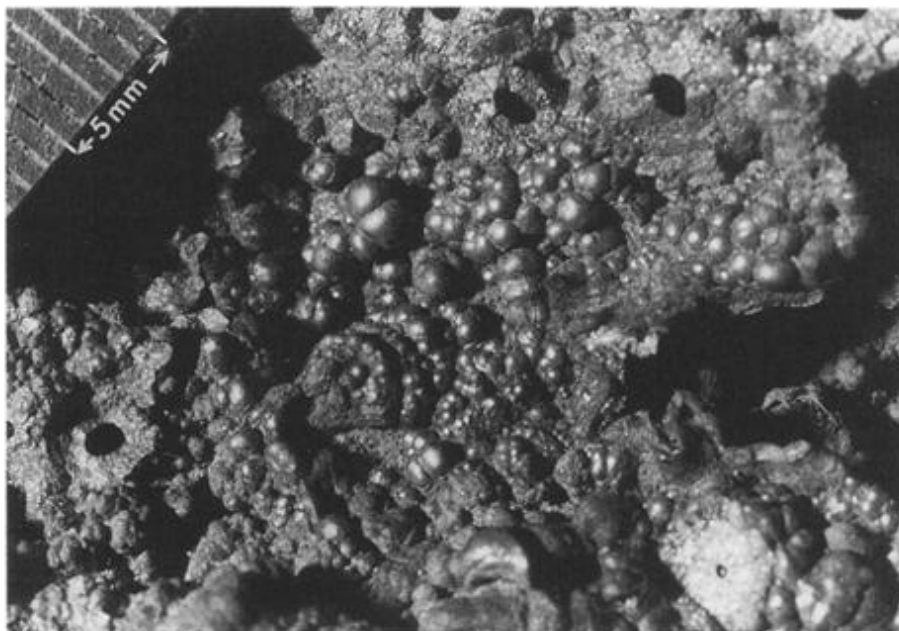
### 2.3. Russell-Hallova hipoteza željezo-sumpor membrana

Russell-Hallova hipoteza željezo-sumpor membrana predlaže da se prvi život razvio iz „mjehurića“ željezova(II) sulfida na podmorskim, tzv. rubnim hidrotermalnim izvorima (Slika 6 i 7). Pretpostavljeno je da su prije 4,2 milijarde godina, vrući, bazični hidrotermalni izvori interagirali s kiselim praooceanom bogatim željezom i spontano tvorili koloidne FeS membrane. Te željezo-sumpor membrane, koje su sadržavale i druge elemente poput nikla, služile su kao primitivne semipermeabilne katalitičke ovojnice. Pomoću energije protonskog gradijenta na njenoj površini (oko 300 milivolta), ta je membrana pokretala reakcije sinteze organskih aniona kroz hidrogenaciju i karboksilaciju hidrotermalnih organskih prekursora.<sup>27</sup>

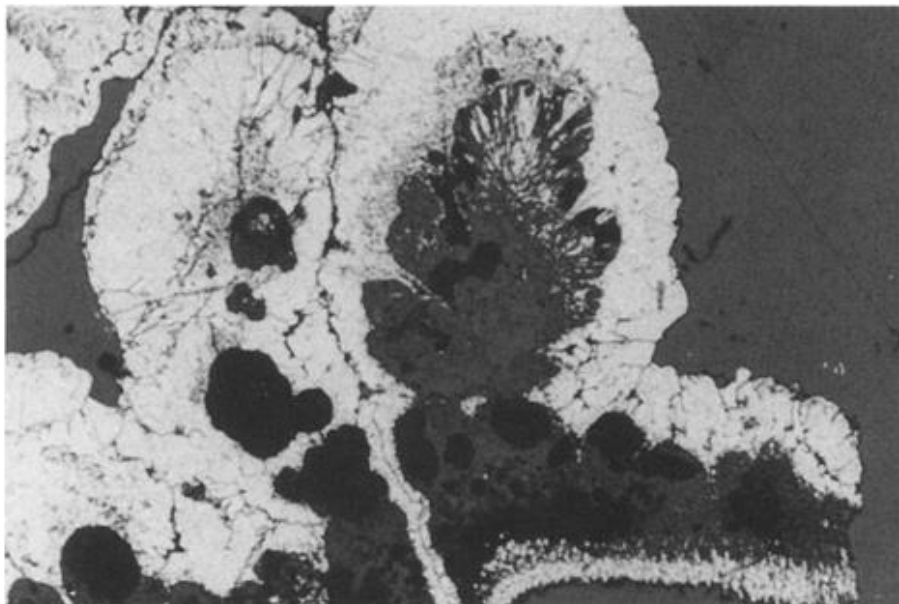
Katalitičku snagu membrane dodatno su pojačavali atomi nikla u njoj koji su na sebe vezali molekule hidrotermalnog vodika iz kojeg su nastajali kratkoživući hidridi. Preostali protoni nastali kroz taj proces neutralizirani su u proto-citoplazmi, a elektroni su, „krećući se“ po željeznom sloju, transportirani kroz membranu do krajnjeg akceptora poput Fe(III) izvan membrane. Ovim je procesom moglo doći do nastajanja tiolata unutar mjehurića, što je potencijalno dovelo do formiranja protoferedoksina. Smatra se da su protoferedoksini, koji sadrže klastere strukture kubana poput  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ , pokretali prijenos elektrona kroz membranu.<sup>40,41,42</sup> Osim prijenosa elektrona izvan, kroz membranu, nužan je bio i prijenos ugljikovog dioksida, u obliku poput  $\text{HCO}^{3-}$ , u unutrašnjost željezo-sumpor mjehurića. Russell-Hallovu hipotezu dodatno potvrđuje činjenica da je jedno od svojstava membrane da odvaja okolinski medij niskog pH od unutrašnjeg medija visokog pH. Usporedili su svojstvo postojanja protonskog gradijenta na membrani mitohondrija s istim svojstvom na željezo-sumpor membranama i zaključili kako je to potencijalno omogućilo prvim organizmima razvoj procesa poput oksidativne fosforilacije.<sup>32</sup>

Hipoteza željezo-sumpor membrana se od Wächtershäuserove hipoteze razlikuje prvenstveno po tome što ne govori da se život razvio na površini piritu već u spomenutim mjehurićima te ne misle da pirit služio kao katalizator u organosintetskim reakcijama. Russell i Hall tvrde da njihova hipoteza bolje opisuje uloge željeza i sumpora u primordijalnim biokemijskim procesima. Predlažu da membrane prolaze kroz geokemijsku transformaciju, formirajući katalitičke faze mješovitih nabojnih brojeva koje koriste elementarni vodik kao primarni donor elektrona. Smatraju da su najučinkovitiji katalizatori bili oni strukture kubana

poput greigita ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) te violarita ( $\text{FeNi}_2\text{S}_4$ ) koji su po strukturi bili slični suvremenim feredoksinima.<sup>27,32,38</sup>



Slika 6. Okrugle šuplje kvržice (mjehurići) pirita iz Tynagh rudnika u Irskoj.<sup>43</sup>



Slika 7. Presjek okrugle šuplje kvržice (mjehurića) pirita iz Tynagha.<sup>43</sup>

## 2.4. Potencijalne uloge Fe-S kompleksa u primitivnom metabolizmu

Željezo-sumpor kompleksi nužni su kofaktori u raznim biokemijskim procesima te je njihova uloga u pojavi života zasigurno jedna od istraženijih u prebiotičkoj biokemiji. U suvremenoj biokemiji Fe-S kompleksima pridaju se razne uloge, od onih u redoks, ali i ostalim procesima brojnih metaboličkih puteva. Zbog funkcioniranja u anaerobnim uvjetima pretpostavlja se da njihovo postojanje datira još iz prebiotičkog vremena. Spontano formiranje različitih vrsta Fe-S kompleksa iz jednostavnih anorganskih supstanci, poput  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{RS}^-$  i  $\text{S}^{2-}$ , podupire teoriju da su ti klasteri bili prisutni u primordijalnim uvjetima na Zemlji i mogli reagirati u primitivnim biokemijskim sustavima.<sup>44,45,46,47</sup>

### 2.4.1. Slaganje s hipotezom o formiranju pirita

Glavnom hipotezom o ulozi Fe-S kompleksa u pojavi života smatra se njihova uključenost u proces formiranja pirita. Načelom uzajamne evolucijske ekstrapolacije (engl. *the principle of mutual evolutionary extrapolation*) pretpostavljeno je da mehanizmi stvaranja pirita mogu dati uvid u strukturu i funkcije postojećih Fe-S enzima. Tim se načelom predlaže da su anorganski Fe-S klasteri, slični onima pronađenim u modernim enzimima, sudjelovali u reakcijama na rastućim kristalima pirita u primordijalno doba. To podrijetlo podupire provedena sinteza klastera  $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SH})_4]^{2-}$  koji ima strukturu kubana te činjenica da su svi poznati Fe-S klasteri u željezo-sumpor enzimima negativno nabijeni (anioni) što je potrebno za vezanje na površinu pirita.<sup>46</sup>

### 2.4.2. Hipoteze o evoluciji Fe-S klastera

Smatra se da je do pretvorba iz anorganskih Fe-S klastera do biološki integriranih Fe-S enzima došlo zbog postupne zamjene anorganskih SH-skupina u klasteru s cisteinskim ograncima s površinski vezanih peptida i kasnije smotanih enzima. Takav je mehanizam kasnije i potvrđen zbog strukturne sličnosti između anorganskih Fe-S klastera i klastera u suvremenim enzimima.<sup>29</sup>

Prema ovoj hipotezi disulfidni mostovi (H-S-S- ili -S-S-) u Fe-S klasterima bili su strukturni elementi ili međuprodukti u mehanizmu nastajanja željezo-sumpor enzima. Takav mehanizam potvrdio je eksperiment kojeg su 1991. godine proveli Sellmann i suradnici.<sup>48</sup> Pokazali su da iz elementarnog sumpora,  $\text{Fe}^{2+}$  iona i polidentatnog tioeter-tiolatnog liganda

mogu proizvesti [2Fe-2S] klaster u kojem dva atoma sumpora tvore most između dva  $\text{Fe}^{2+}$  centra. Takav se klaster po svojim svojstvima pokazao vrlo sličnim H-klasteru Fe-hidrogenaze. Zbog te sličnosti i dokazanog stvaranja elementarnog vodika na površini pirita, smatra se da je i [2Fe-2S] klaster s  $\text{H}_2\text{S}$  i  $\text{HS}^-$  ligandima sudjelovao u reakcijama na toj površini, gdje mu je glavna uloga vjerojatno bila taloženje nastalih  $\text{FeS}_2$  molekula na rastuću površinu pirita. Mehanizam koji uključuje disulfidne mostove objašnjen je formiranjem Fe-H grupe na jednom željeznom centru i H-S-S-Fe grupe na drugom centru istog klastera ili na centru drugog klastera. Nadalje, za H-S-S- $\text{Fe}^+$  je pretpostavljeno da se nakuplja na površini, a za H-S- $\text{Fe}^+$  da se odvađa od površine pirita. Takav mehanizam pokazuje slično djelovanje kao kod [3Fe-4S] i [4Fe-4S] klastera suvremenog enzima akonitaze.<sup>25</sup>

#### 2.4.3. Fe-hidrogenaze i nitrogenaze

Fe-hidrogenaze uz specifične H-klastere sadrže i željezo-sumpor klastere za koje se pretpostavlja da služe u prijenosu elektrona između H-klastera i izvora elektrona. Njihova starost objašnjena je *in vitro* reverzibilnošću procesa koji provode te postojanjem velikog broja njihovih struktura. Postoje još i Ni-hidrogenaze koje uz Ni reakcijske centre za unos vodika sadrže dva Fe-S klastera. Za njih se smatra da su nešto mlađe i da su zapravo evoluirale iz Fe-hidrogenaza. Funkcija obje hidrogenaze u suvremeno doba je stvaranje ili oksidacija molekularnog vodika.<sup>49,50,51,25</sup>

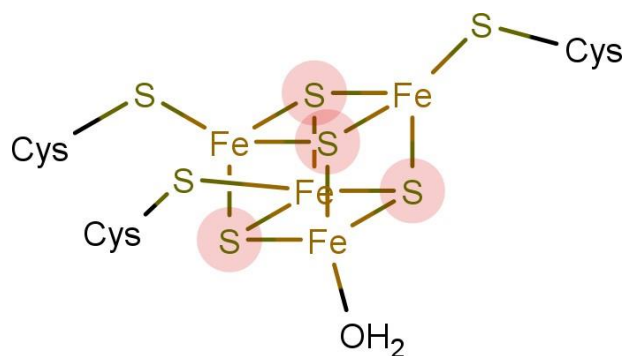
Fe-nitrogenaze su smatrane jednim od najranijih enzima koji fiksiraju dušik i stvaraju vodik kao nusprodukt te se pretpostavlja da dijele podrijetlo s površine pirita zajedno s Fe-hidrogenazama. Supresija proizvodnje vodika vjerojatni je uzrok evolucije nitrogenaza i nastanak specijaliziranih oblika koje u sebi sadrže atome vanadija ili molibdena.<sup>25</sup>

#### 2.4.4. Feredoksini

Feredoksini su poznati po raznovrsnosti svojih struktura za koju se smatra da je evoluirala iz početnog „master“ feredoksina od dva [4Fe-4S] klastera.<sup>53,54,55</sup> Pretpostavlja se da je takva struktura posljedica duplikacije gena.<sup>45</sup> Prvi klaster vezan je s tri cisteinska ogranka u prvoj domeni i s jednim ogrankom u drugoj domeni, dok je drugi klaster vezan s tri cisteinska ogranka u drugoj domeni i s jednim cisteinskim ogrankom u prvoj domeni. Moguće je da takva struktura klastera, zajedno s hipotezom o duplikaciji gena, dovodi do toga da je početna „master“ struktura samo s jednim [4Fe-4S] klasterom imala 3 cisteinska ogranka vezana na tri željezna



centra te da je na 4. željezni centar bio vezan H-S- ili neki drugi ligand. Opisana struktura zapravo odgovara strukturi klastera akonitaze, što bi značilo da feredoksini i akonitaza dijele zajedničko podrijetlo. Kako oba ta enzima prenose najviše jedan elektron odjednom, a za većinu reakcija potreban je prijenos dva elektrona, kod djelovanja tih enzima potreban je posredni redoks član koji prima dva zasebna elektrona i donira elektronski par. Taj je problem u suvremenim organizmima riješen skupinom koenzima koja se naziva flavini, iz čega se može pretpostaviti da su oni evoluirani te mlađi enzim od feredoksina i akonitaze.<sup>25</sup>



Slika 8. Struktura [4Fe-4S] klastera enzima akonitaze. Na 4. željezni centar vezana je molekula vode, a anorganski sulfidni ioni označeni su ružičastom bojom.<sup>56</sup>

#### 2.4.5. Evolucija ranih metaboličkih puteva

Uloga željezo-sumpor klastera u pokretanju redoks reakcija bila je ključna prekretnica u evoluciji i nastajanju ranih metaboličkih procesa, posebno u anaerobnim uvjetima. Primjerice, reakcije redukcije tiokiselina do aldehida ili fiksacije ugljikovog dioksida mogle su biti katalizirane Fe-S klasterima. Prijelaz s Wächtershäuserove hipoteze o reakcijama spregnutim nastajanjem pirita do enzimski kataliziranih reakcija pokazuje postepeni napredak prema suvremenom metabolizmu s naglaskom na ključnu ulogu Fe-S klastera u evoluciji tih ranih metaboličkih procesa. Evolucija Fe-S kompleksa od anorganskih struktura na površini pirita do složenih enzimskih komponenti pokazuje usku povezanost geologije i biologije u istraživanju pojave života. Također, naglašava njihovu prilagodljivost i funkcionalnu svestranost te potvrđuje njihovu važnost u biokemijskim temeljima života na Zemlji.<sup>25</sup>

## § 3. LITERATURNI IZVORI

1. H. Beinert, R. H. Holm, E. Münck, *Science*, **277** (1997) 653–659.
2. M. J. Warren, A. G. Smith, *Tetrapyrroles: Birth, Life and Death*, Springer Science & Business Media, 2009, str. 162.
3. O. Einsle, D. C. Rees, *Chem. Rev.* **120** (2020) 4969–5004.
4. M. K. Johnson, A. D. Smith, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9** (2005) 162–173.
5. R. Lill, U. Mühlhoff, *Annu. Rev. Biochem.* **77** (2008) 669–700.
6. L. M. Hunsicker-Wang, R. L. Pacoma, G. Chen, J. A. Fee, *Biochim. Biophys. Acta* **1604** (2003) 159–170.
7. J. Hwang, J. Han, *Res. Knowl.* **1** (2015) 53–61.
8. H. Beinert, P. J. Kiley, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3** (1999) 152–157.
9. R. G. Efremov, R. Baradaran, L. A. Sazanov, *Nature* **465** (2010) 441–445.
10. E. A. Berry, L. S. Huang, *Biochim. Biophys. Acta* **1807** (2011) 969–977.
11. B. K. Burgess, D. J. Lowe, *Chem. Rev.* **96** (1996) 2983–3012.
12. J. Couturier, B. Touraine, J.F. Briat, F. Gaymard, N. Rouhier, *Front. Plant Sci.* **4** (2013) 259.
13. J. A. Imlay, *Mol. Microbiol.* **59** (2005) 1073–1082.
14. M. F. White, *Biochem. Soc. Trans.* **37** (2009) 547–551.
15. J. Stiban, G. A. Farnum, S. L. Hovde, L. S. Kaguni, *J. Biol. Chem.* **289** (2014) 24032–24042.
16. A. S. Fleischhacker, P. J. Kiley, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15** (2011) 335–341.
17. P. J. Kiley, H. Beinert, *Curr. Opin. Microbiol.* **6** (2003) 181–185.
18. M. Atta, E. Mulliez, S. Arragain, F. Forouhar, J. F. Hunt, M. Fontecave, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20** (2010) 684–692.
19. M. Fontecave, *Nat. Chem. Biol.* **2** (2006) 171.
20. B. R. Crane, E. D. Getzoff, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6** (1996) 744–756.
21. G. L. Holliday, E. Akiva, E. C. Meng, S. D. Brown, S. Calhoun, U. Pieper, A. Sali, S. J. Booker, P. C. Babbitt, V. Bandarian, *Methods Enzymol.* **606** (2018) 1–71.
22. A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, New York, 2017, str. 2806.

23. G. Wächtershäuser, *Microbiol. Rev.* **52** (1988) 452–484.
24. G. Wächtershäuser, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87** (1990) 200–204.
25. G. Wächtershäuser, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **58** (1992) 85–201.
26. J. Chela-Flores, F. Raulin, *Exobiology: Matter, Energy, and Information in the Origin and Evolution of Life in the Universe*, Springer, Dordrecht, 1998, str. 206–214.
27. M. J. Russell, A. J. Hall, *J. Geol. Soc. Lond.* **154** (1997) 377–402.
28. M. J. Russell, A. J. Hall, A. R. Mellersh, *Terra Nova* **15** (2003) 363–369.
29. G. Wächtershäuser, *Nature* **332** (1988) 804–805.
30. M. A. A. Schoonen, Y. Xu, J. Bebie, *Science* **275** (1999) 1473–1476.
31. E. Drobner, H. Huber, G. Wächtershäuser, D. Rose, K. O. Stetter, *Nature* **346** (1990) 742–744.
32. G. D. Cody, *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* **32** (2004) 569–599.
33. W. Schubert, *J. Phys. Chem.* **71** (1967) 4101–4107.
34. J. S. Yadav, et al., *J. Theor. Biol.* **142** (1989) 439–456.
35. J. Bebie, M. A. A. Schoonen, *Geochem. Trans.* **1** (2000) 35–38.
36. H. Erkelens, *Chem. Geol.* **84** (1990) 285–292.
37. K. Fajans, P. Richter, *Ann. Phys.* **352** (1915) 97–122.
38. G. Wächtershäuser, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85** (1988) 1134–1138.
39. R. Afrin, T. A. Yano, T. Z. Jia, H. J. Cleaves, M. Hara, *Biophys. Chem.* **260** (2020) 106–119.
40. F. Bonomi, et al., *J. Biol. Chem.* **260** (1985) 7262–7267.
41. J. Müller, R. Schladerbeck, *J. Inorg. Biochem.* **24** (1985) 207–217.
42. R. H. Holm, *Science* **257** (1992) 1109–1115.
43. M. J. Russell, R. M. Daniel, A. J. Hall, J. A. Sherringham, *J. Mol. Evol.* **39** (1994) 231–243.
44. A. J. Thomson, *Annu. Rev. Biochem.* **54** (1985) 93–125.
45. H. Beinert, *Science* **252** (1990) 384–389.
46. A. Müller, A. Schladerbeck, *J. Am. Chem. Soc.* **108** (1986) 2205–2207.
47. R. L. Switzer, *Molecular Evolution*, 1989, str. 233–255.
48. D. Sellmann, F. Geipel, J. Sutter, *J. Inorg. Biochem.* **43** (1991) 213–225.
49. Grahame, J., *Science* **240** (1988) 323.
50. Adams, M. W. W., *Nature* **343** (1990a) 460–461.

51. Adams, M. W. W., *Trends Biochem. Sci.* **15** (1990b) 351–355.
52. G. N. George, R. C. Prince, *Biochim. Biophys. Acta* **832** (1985) 159–181.
53. M. Fitch, M. Bruschi, *Trends Biochem. Sci.* **12** (1987) 13–14.
54. A. Otaka, T. Ooi, *Biochim. Biophys. Acta* **911** (1987) 45–55.
55. A. Otaka, T. Ooi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **158** (1989) 56–62.
56. N. Puđa, *Fe-S klasteri u proteinima: struktura i svojstva*, Završni rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2020, str. 23.