

# Uloga niklovih iona u metaloenzimima

---

**Dunatov, Marko**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

*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:217:981757>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-23**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Marko Dunatov

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **ULOGA NIKLOVIH IONA U METALOENZIMIMA**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Ivica Đilović

Zagreb, 2018.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

12. rujna 2018.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

21. rujna 2018.

Mentor rada: doc. dr. sc. Ivica Đilović

Potpis:



## Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VI
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Enzimi .....	1
1.2. Biodostupnost i kemija nikla.....	4
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME .....	6
2.1. Ureaza .....	6
2.2. Metil-koenzim M reduktaza.....	10
2.3. Superoksid-dismutaza .....	13
2.4. [NiFe]-hidrogenaza .....	15
§ 3. ZAKLJUČAK .....	18
§ 4. LITERATURNI IZVORI.....	I



## § Sažetak

Cilj ovog rada je prikazati odnos strukture i funkcije, odnosno reakcijske mehanizme odabranih enzima koji u nativnom stanju u aktivnom mjestu sadrže niklove ione. U uvodnom dijelu ovog rada bit će opisane bitne značajke niklovih iona, njihova biodostupnost, kao i pojam enzima, to jest metaloenzima. Potom će biti opisana uloga niklovih iona u odabranim enzimima te raznolikost funkcija tih metaloenzima.

Iako je nikal posljednji kemijski element prve prijelazne serije periodnog sustava elemenata čija je prisutnost potvrđena u organizmima, enzimi koji sadrže niklove ione imaju važnu ulogu u metabolizmu bakterija, arheja, gljiva, algi i viših biljnih vrsta. Metaloenzimi koji sadrže niklove ione kataliziraju raznovrsne kemijske reakcije koristeći metalne centre raznih struktura u kojima se niklovi ioni pojavljuju u mono-, di- i heteronuklearnim okruženjima pa čak i složenijim podjedinicama koje sadrže tetrapirole i slično.

## § 1. UVOD

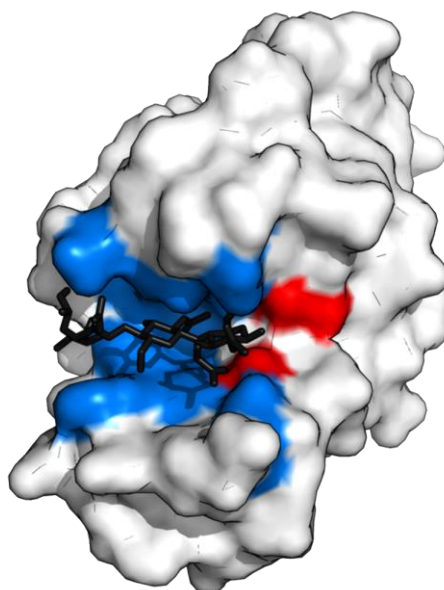
### 1.1. Enzimi

Kemijske se reakcije u velikoj većini bioloških sustava provode pomoću specifičnih proteina ili proteinskih kompleksa – enzima. Njihove bitne odrednice su visoka specifičnost prema supstratu (kemijska vrsta koju je potrebno „preraditi“) i izvanredna katalitička moć. Poznato je mnogo slučajeva u kojima enzim katalizira samo jednu ili skup vrlo srodnih kemijskih reakcija. S druge pak strane, zbog blagih reakcijskih uvjeta iste bi se kemijske reakcije bez pomoći katalizatora odvijale jako sporo (ugrubo, čak i do milijun puta sporije).

Zgodan primjer koji demonstrira razliku između bioloških i industrijskih procesa jest sinteza amonijaka iz dušika i vodika. Industrijski proces, poznatiji pod imenom Born-Haberov proces obično se provodi pri 150–250 bar i 300–550 °C, tako da se plinovi propuštaju preko nekoliko katalizatora. Iskorištenje pojedinačnog prijelaza je oko 15 % pa je neizreagirane plinove potrebno ohladiti i vratiti u proces. Ukupno, moguće je postići 97 %-tno iskorištenje.<sup>1</sup> Nitrogenaza je proteinski kompleks kojemu su, pri neusporedivo blažim reakcijskim uvjetima, za nastanak molekule amonijaka (ili amonijevog iona) potrebne dvije molekule adenozin trifosfata (ATP). U ovom je trenutku ključno za napomenuti da enzimi ili općenito katalizatori mijenjaju mehanizam kemijske reakcije, odnosno, provode je nekim energijski povoljnijim putem (pa je tako sintagmu „sniženje energije aktivacije“ nužno uzeti s velikom rezervom).

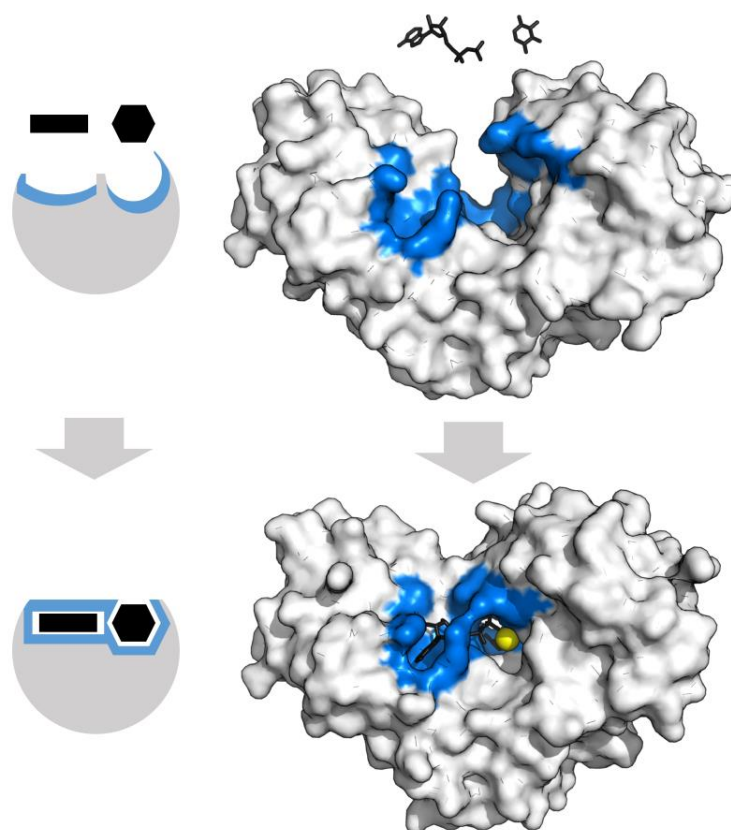
U reakcijskom ciklusu enzima svakako najzanimljiviji trenutak je stvaranje kompleksa između enzima i supstrata. To se događa u posebno „dizajniranom“ prostoru proteina koji se zove aktivno mjesto. Postojanje kompleksa između enzima i supstrata potvrđeno je brojnim eksperimentalnim tehnikama, od krio-elektronske mikroskopije, rendgenske strukturne analize, do raznih spektroskopskih i biofizikalnih metoda. Aktivno mjesto je uglavnom maleni dio enzima, a koje može biti izgrađeno od aminokiselina i/ili prostetičkih skupina, metalnih iona ili kompleksnijih metalnih centara, kofaktora i slično (slika 1).





**Slika 1.** Struktura lizozima: vezno mjesto je prikazano plavom, katalitičko mjesto crvenom, a supstrat peptidoglikan (štapici) crnom bojom.<sup>2</sup>

Postoji više modela koji opisuju specifičnost enzima za pojedini supstrat, a dva najvažnija modela su model ključa i brave te model inducirano pristajanja.<sup>3</sup> Model ključa i brave temelji se na pretpostavci da supstrat mora oblikom odgovarati aktivnom mjestu, odnosno da postoji svojevrsna kemijska komplementarnost. Model relativno dobro opisuje specifičnost enzima, ali ima ograničenja, pogotovo kod objašnjenja stabilizacije prijelaznog stanja. U procesu inducirano pristajanja „oblik“ aktivnog mjesta se mijenja, to jest, prilagođava „potrebama“ supstrata (slika 2). Ulazak supstrata u aktivno mjesto mijenja i njegovu konformaciju, što proces molekuskog prepoznavanja čini vjernijim i pouzdanijim (svojevrsna „konformacijska lektura“, engl. *conformational proofreading mechanism*).<sup>4</sup>



**Slika 2.** Heksokinaza značajno mijenja svoju konformaciju prilikom vezanja molekule ATP-a (crni pravokutnik) i molekule ksiloze (crni šesterokut). Vezna mjesta prikazana su plavom, supstrati crnom, a magnezijev kation (kofaktor) žutom bojom.<sup>5</sup>

Trećina svih poznatih proteina i enzima u svojoj strukturi sadrži ione metala. Metaloenzimi su proteini u kojima je ion nekog metala vezan kovalentnom vezom kao kofaktor u aktivnom mjestu, te izravno sudjeluje u mehanizmu katalize. U usporedbi s brojem enzima koji sadrže ione nekih uobičajenih metala kao što su željezo, cink i bakar, enzimi koji sadrže niklove ione nisu toliko brojni, no njihove su funkcije raznolike.\* Sedam od osam poznatih enzima koji sadrže niklove ione uključuju korištenje i/ili proizvodnju plinova (primjerice, ugljikovog(II) oksida, ugljikovog(IV) oksida, metana, vodika, amonijaka i kisika) koji imaju važne uloge u biološkim ciklusima ugljika, dušika i kisika.<sup>6</sup>

---

\* U proteinskoj bazi podataka (<https://www.rcsb.org/>) moguće je pronaći mnogo proteina koji u svojoj strukturi sadrže niklove ione, ali kojima niklov ion nije esencijalan za obavljanje funkcije. To je uglavnom posljedica načina pročišćavanja proteina afinitetnom kromatografijom u kojoj se često koriste histidinom označeni proteini.

## 1.2. Biodostupnost i kemija nikla

Nikal je kemijski element desete skupine periodnog sustava elemenata s atomskim brojem 28. Atom nikla u osnovnom stanju ima elektronsku konfiguraciju  $[\text{Ar}] 3d^8 4s^2$ . Koordinacijska kemija nikla obuhvaća razne geometrije, koordinacijske brojeve i oksidacijska stanja. Uobičajena oksidacijska stanja nikla su nula ili +II, ali u određenim uvjetima nalazimo i oksidacijska stanja +I ili +III.<sup>7</sup> Uglavnom je poznato da aktivna mjesta proteina mogu stabilizirati manje zastupljena oksidacijska stanja metalnih iona [primjerice, željezov(IV) ion u citokromu P450 i slično].<sup>8</sup> Oksidacijsko stanje +II je povezano s oktaedarskom ili distortiranom oktaedarskom geometrijom, no poznati su i spojevi u kojima je geometrija kvadratno-planarna, tetraedarska, kvadratno-piramidalna ili trigonsko-bipiramidalna.<sup>9</sup> Geometrija oksidacijskog stanja +I je distortirana oktaedarska ili kvadratno-planarna, dok su spojevi niklovih(III) iona trigonsko-bipiramidalne ili distortirane oktaedarske geometrije (tablica 1).

**Tablica 1.** Učestalost pojedinih geometrija niklovih spojeva u različitim spinskim stanjima.<sup>9</sup>

		visokospinski		niskospinski	
		oktaedarski	tetraedarski	oktaedarski	tetraedarski
Ni(I)	$[\text{Ar}] d^9$	(tetragonski)	rijetko	rijetko	uobičajeno
Ni(II)	$[\text{Ar}] d^8$	dominantno	rijetko	rijetko	uobičajeno
Ni(III)	$[\text{Ar}] d^7$	često	često	rijetko	uobičajeno

Aktivna mjesta enzima koji sadrže niklove ione izložena su iznimnoj plastičnosti koordinacija tijekom redoks-procesa. Metalni centar superoksid-dismutaze mora biti sposoban provoditi redoks-procese s potencijalima koji se protežu od 890 do -160 mV, dok u metil-koenzim M reduktazi taj potencijal doseže i -600 mV. Prema tome, niklovi centri u enzimima pokrivaju raspon potencijala  $\approx 1.5$  V.<sup>6</sup>

Iako je nikal biljkama esencijalni kemijski element, znatno se više pažnje pridavalo njegovoj toksičnosti nego njegovom nedostatku. Masena koncentracija nikla, kao sastavnog dijela biljnog tkiva, iznosi 0,05-10 ppm u suhoj tvari. Premda je granična koncentracija za letalnu toksičnost manja od 100 ppm, u blizini rafinerija i ljevaonica nikla, u biljkama su pronađene koncentracije i do šest puta veće. U uvjetima viška ili nedostatka nikla, višim biljnim vrstama nikal je dostupan putem korijena i lišća. Bez ekstremno povišene koncentracije nikla u zraku, lišće apsorbira samo onu količinu koja je biljkama potrebna, stoga nikal nema izravni toksični utjecaj na metabolizam biljke.

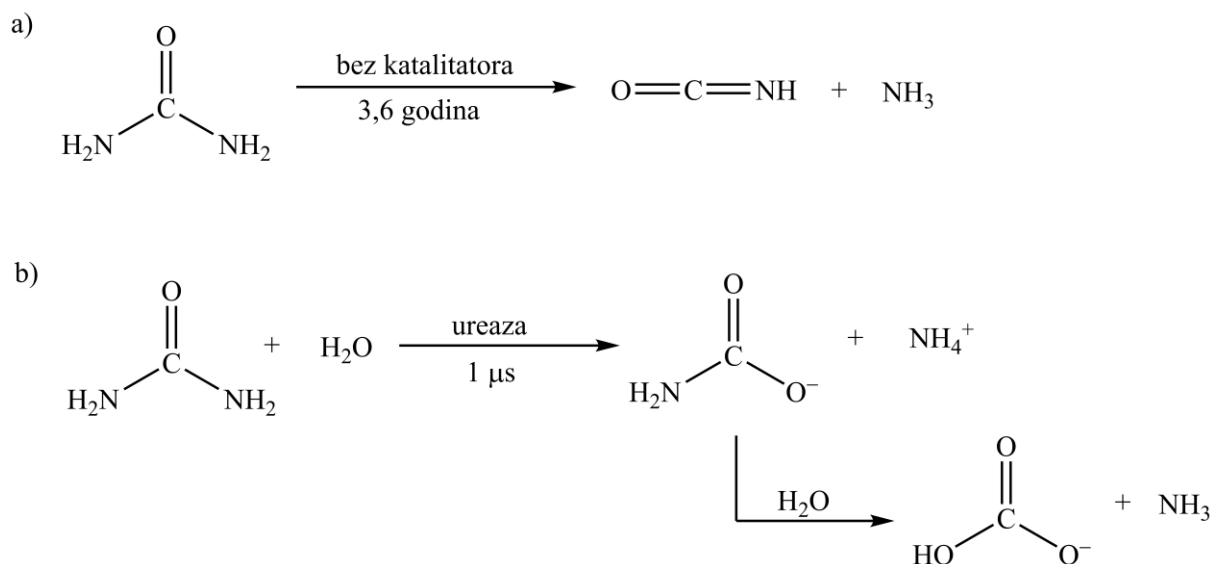
Nedostatak ili višak elemenata u tragovima u tijelu ljudi i životinja može izazvati metaboličke poremećaje i bolesti, pa tako nedostatak nikla u tijelu uzrokuje niski rast, smanjenu sposobnost razmnožavanja i povećanje prenatalne smrtnosti (kod životinja), dok višak uzrokuje karcinom pluća i kontaktni dermatitis (uglavnom kod žena).<sup>9</sup> Tijekom prošlog stoljeća primijećen je znatan porast koncentracije teških metala u tlu, moru i slatkoj vodi. Porast koncentracije uočen je i u zabačenim područjima, tisućama kilometara od velikih antropogenih izvora, što upućuje na dalekosežni atmosferski transport. Procijenjuje se da tijekom godine između 106 i 544 kilotona nikla (odnosno, s niklom povezanih kemijskih vrsta) dospije u tlo, stoga je za usporedbu važno poznavati podatke o koncentracijama elemenata u tragovima u nezagađenim područjima. Uobičajene metode kvantitativnog odeđivanja nikla u uzorcima su atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS), induktivno spregnuta optička emisijska spektrometrija (ICP-OES) te induktivno spregnuta masena spektrometrija (ICP-MS). Masena koncentracija nikla u Zemljinoj kori iznosi oko 80 ppm, dok koncentracija u nekim stijenama poput peridotita i serpentina doseže i 2000 ppm. Nikal u prirodi tvori različite sulfide, arsenide i antimonide (npr. NiS, NiAs, NiAs<sub>2-3</sub>, NiAsS, NiSb, NiSbS). Važni komercijalno dostupni oblici su nalazišta sulfidnih ruda te lateritnih ruda kao što je garnierit [(Mg,Ni)<sub>3</sub>(OH)<sub>4</sub>(Si<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)]. Glavni svjetski proizvođači nikla su Kanada, Rusija, Indonezija i Australija.<sup>11</sup>

Uloga niklovih iona, to jest prisutnost niklovih iona u živim organizmima otkrivena je relativno kasno u odnosu na druge do tada potvrđene esencijalne elemente. Razlog tome bile su teškoće povezane s detekcijom. Niklovi ioni koordinirani fiziološki važnim ligandima ne pokazuju posebno vrpce u UV/VIS-spektrima. Nije aktivan u elektronskoj paramagnetskoj rezonanciji (EPR) te izotopi nikla nisu prikladni za Mössbauerovu spektroskopiju.

## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. Ureaza

Ureaza (urea aminohidrolaza E.C. 3.5.1.5) je enzim pronađen u citoplazmi nekih bakterija, arheja, gljiva, algi i biljaka. Katalizira naizgled jednostavnu hidrolizu molekule uree na molekulu amonijaka i molekulu karbaminske kiseline koja se spontano raspada na još jednu molekulu amonijaka i molekulu ugljične kiseline (slika 3).



**Slika 3.** Shematski prikaz reakcije raspada uree **a)** bez katalizatora i **b)** uz prisutnost ureaze.

Porast koncentracije amonijaka povećava pH-vrijednost te stoga kataliza ureazom nalazi primjene u medicini i poljoprivredi. Proizvodnja amonijaka djelovanjem ureaze može imati i negativne posljedice na ljudsko zdravlje pa je tako ureaza iz patogenih bakterija povezana s nastankom kamenca u mokraćnom traktu, pijelonefritisom, jetrenom encefalopatijom i hepatičnom komom. Uz to, bakterija *Helicobacter pylori* koristi povećanje pH-vrijednosti uzrokovano hidrolizom uree kako bi se naselila u želudac. U poljoprivredi je ureaza uključena u kruženje određenih dušikovih vrsta, prije svega u gnojiva na bazi uree. Velike količine amonijaka proizvedene hidrolizom uree mogu izazvati oštećenje biljaka, kao i porast pH-vrijednosti tla, što uzrokuje ekološke pa i ekonomske probleme. Također, ureaza ima ulogu

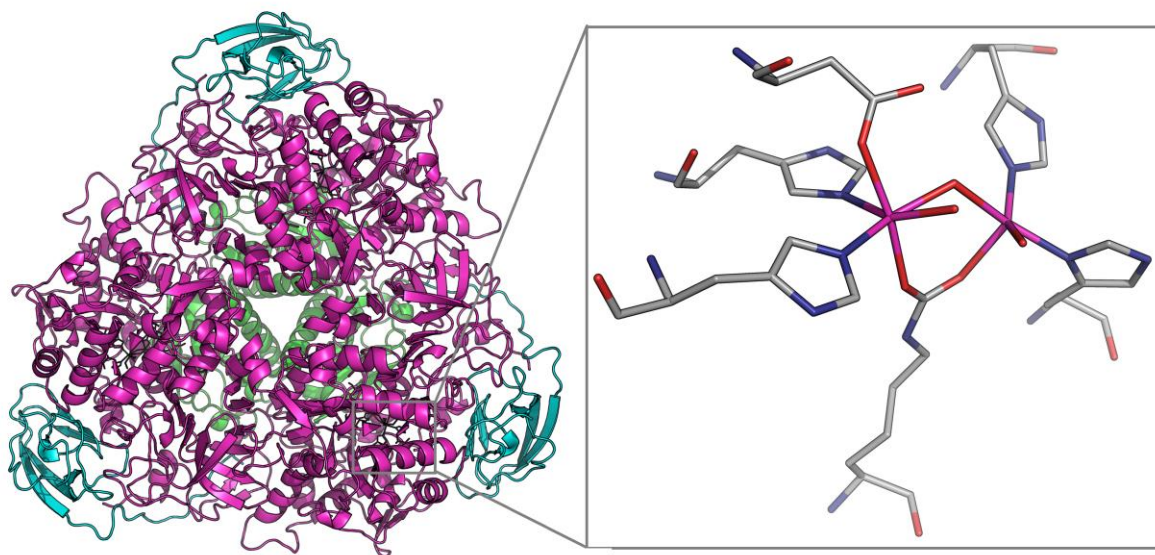
u nicanju sjemena razgrađivanjem uree nastale aktivnošću arginaze (ezim koji u aktivnom mjestu sadrži manganove(II) ione, a katalizira hidrolizu arginina u ornitin i ureu).<sup>12</sup> Ureaza iz grahorice *Canavalia ensiformis* je prvi kristalizirani enzim<sup>13</sup> zbog čega je James Sumner zajedno s Johnom Northropom i Wendellom Stanleyjem podijelio Nobelovu nagradu za kemiju 1926.<sup>14</sup> Potonji dvojac dobio je nagradu zbog svog doprinosa u pripravi čistih enzima i virusa. Kristalnu strukturu ureaze odredio je Paul Karplus 1995.<sup>15</sup> Također, ureaza je prvi protein za kojeg je dokazano da sadrži ione nikla(II) u aktivnom mjestu.

Uglavnom, ureaze dijele osnovnu trimernu strukturu  $(\alpha\beta\gamma)_3$  s ukupno tri dinuklearna katalitička mjesta (dakle, svaki monomer  $\alpha\beta\gamma$  sadrži jedan centar). Iako se kvaterne strukture mnogih ureaza međusobno razlikuju, monomeri od kojih su izgrađene se u pravilu smataju na sličan način. U bakterijama iz roda *Helicobacter*, nekim gljivama i biljkama, dva ili tri dimera  $(\alpha\beta)$  su povezana u veće cjeline poput  $(\alpha\beta)_3$  ili  $[(\alpha\beta)_3]_4$ .<sup>11</sup> Taj način organizacije enzima rezultira većim brojem aktivnih mjesta čijim se djelovanjem lokalno povećava pH-vrijednost. Time se smanjuje mogućnost inaktivacije enzima gubitkom niklovihi(II) iona iz aktivnog mjesta uslijed djelovanja kiseline.<sup>12</sup>

Aktivno mjesto ureaze sadrži dva niklova(II) iona koji su međusobno udaljeni od 3,5 do 3,7 Å. Niklovi(II) ioni su premošteni karboksilnom skupinom karbamiliranog lizinskog ostatka i molekulom vode. Svaki niklov(II) ion dodatno je koordiniran terminalnom molekulom vode i dvama histidinskim bočnim ograncima. Jedan od iona također je koordiniran aspartatom (slika 4). Nastajanje ovog aktivnog mjesta složen je proces koji u većini bakterijskih sustava uključuje četiri dodatna proteina. Postoje također dokazi da ureaze biljaka i gljiva zahtijevaju dodatne proteine za aktivaciju.<sup>11</sup>

Molekula uree se eliminacijskim procesom spontano raspada u vodi na molekulu cijanske kiseline i molekulu amonijaka s vremenom poluraspada  $\approx 3,6$  godina pri 38 °C. Djelovanjem ureaze kao katalizatora, vrijeme poluraspada uree smanjuje se na red veličine mikrosekunde. Bez djelovanja ureaze, velike količine uree akumulirale bi se u okolišu (primjerice, jedan čovjek proizvede oko 10 kg uree godišnje). Osim za ureu, ureaza pokazuje katalitičku aktivnost i za neke druge supstrate kao što su formamid, acetamid, metilurea, hidroksiurea, dihidroksiurea i drugi, no sa znatno nižim vrijednostima  $k_{cat}$ . Ureaza pokazuje tipičnu Michaelis-Mentenovu kinetiku bez naznaka o inhibiciji supstratom ili alosteriji. Za razliku od vrijednosti  $K_M$  (1-100 mmol dm<sup>-3</sup>), vrijednosti  $k_{cat}$  i  $k_{cat}/K_M$  ovise o pH-vrijednosti, te enzim pokazuje maksimalnu aktivnost pri pH-vrijednostima od 7,5 do 8, s maksimalnim vrijednostima

$k_{\text{cat}} = 3000 \text{ s}^{-1}$  i  $k_{\text{cat}}/K_M = 1000 \text{ s}^{-1} \text{ mmol dm}^{-3}$ . Ireverzibilna denaturacija i gubitak niklovih(II) iona pri  $\text{pH} < 5$  inaktivira enzim, ali postoji određena grupa ureaza kojima su  $\text{pH}$ -vrijednosti od 2 do 4,5 optimalne za rad.<sup>11</sup>

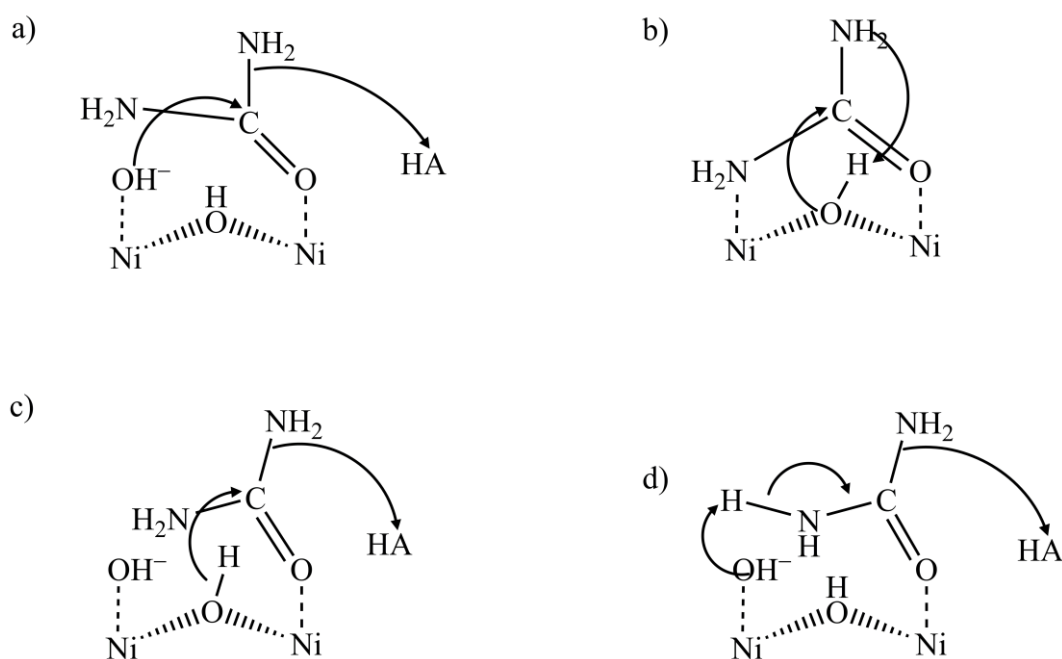


**Slika 4.** Kvaterna struktura trimera ureaze iz *Klebsiella aerogenes* s uvećanim prikazom jednog aktivnog mjesta.<sup>16</sup>

U literaturi su predložena četiri osnovna mehanizma za ureaze<sup>12</sup> (slika 5.):

- Davno prije nego je bila poznata prva kristalna struktura ureaze predložen je mehanizam u kojem sudjeluju dva niklova(II) iona. U tom mehanizmu karbonilni atom kisika iz molekule uree zamijenjuje molekulu koja je bila vezana na niklov(II) ion. Molekula vode, vezana za drugi niklov(II) ion, napada karbonilni atom ugljika iz molekule uree formirajući tako tetraedarski međuprodukt koji se raspada uz pomoć obližnjeg histidinskog ostatka (koji služi kao Brønsted-Lowryjeva kiselina).
- Mehanizam predlaže zamjenu molekula vode u aktivnom mjestu molekulom uree koja se veže didentatno. Premošćujuća hidroksidna skupina napada potom karbonilni atom ugljika iz molekule uree što vodi do nastajanja tetraedarskog međuprodukta, dok proton s hidroksidne skupine izlazi s molekulom amonijaka.
- Treći mehanizam sjedinjuje prva dva predlažući vezanje uree na niklov(II) ion te potom napad premošćujućeg hidroksida na karbonilni atom ugljika dok obližnji histidinski ostatak djeluje kao Brønsted-Lowryjeva kiselina.

- d) Četvrti mehanizam temelji se na biomimetičkim i računalnim metodama. Osnovna ideja je odvajanje jednog protona s atoma dušika iz molekule uree što rezultira otpuštanjem molekule amonijaka i formiranjem cijanatnog međuprodukta. Cijanat se zatim hidratizira te tvori karbamat. Cijanat nikad nije detektiran kao produkt niti je on supstrat za ureazu. Unatoč predloženom mehanizmu, mogla bi se očekivati zamjena niklovih(II) iona drugim ionima olakšavajući tako hidrolizu uree. Uistinu, ureaza iz bakterije *Klebsiella aerogenes*, kojoj su niklovi(II) ioni zamijenjeni manganovim(II) ili kobaltovim(II), ima znatnu enzimsku aktivnost, dok je iz bakterije *Helicobacter mustelae* izolirana i pročišćena ureaza koja sadrži željezove(II) ione.



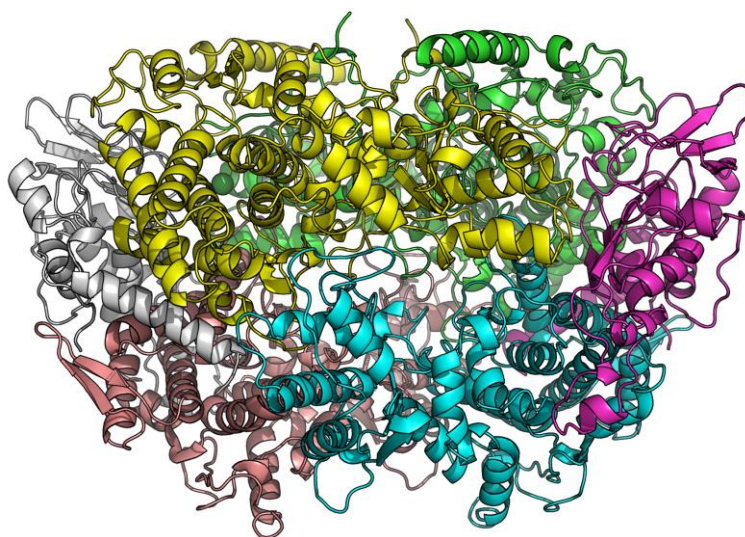
**Slika 5.** Pojednostavljeni prikaz predloženih mehanizama (a-d) raspada uree.



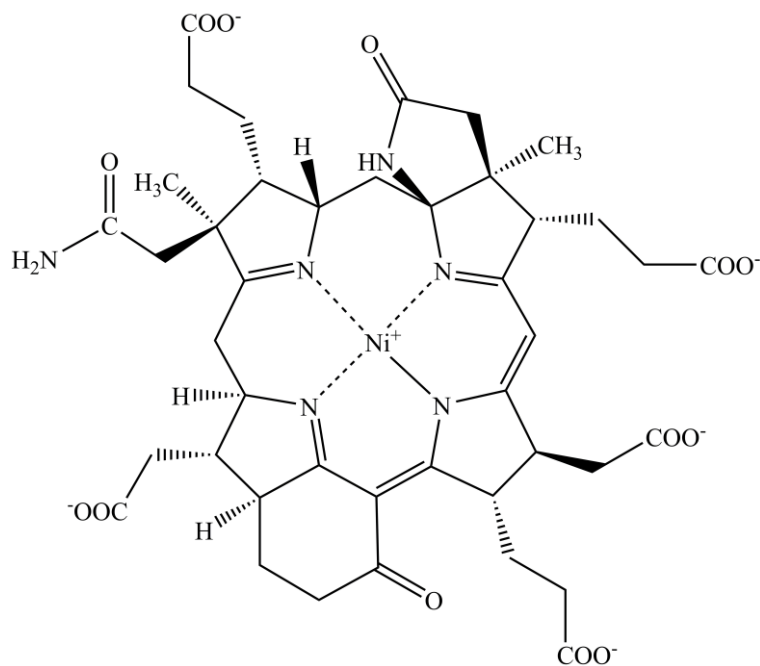
## 2.2. Metil-koenzim M reduktaza

Metil-koenzim M reduktaza (MCR) katalizira reakciju pretvorbe metil-koenzima M s koenzimom B na metan i heterodisulfid (CoM-S-S-CoB) što ga čini vrlo bitnim u globalnom ciklusu ugljika. Sav biološki metan proizvode metanogene arheje uz pomoć metil-koenzim M reduktaze, dok je povratna reakcija katalizirana drugom arhejom, koja katalizira anaerobnu oksidaciju metana zajedno sa sulfat-reducirajućom bakterijom. Metanogene arheje u posljednje vrijeme privlače sve više pažnje zbog mogućnosti pretvorbe biorazgradivog otpada u bioplin koji se dalje može rabiti kao gorivo.<sup>16</sup> Zanimljivo, maseni udio nikla u organizmima koji provode ovu zapanjujuću reakciju je  $\approx 7\%$ .

Iz riješene kristalne strukture uočeno je da je metil-koenzim M reduktaza heksamer izgrađen od tri različite podjedinice ( $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ , slika 6).<sup>12</sup> Aktivno mjesto enzima nalazi se u  $\alpha$ -podjedinici, koja uključuje i koenzim F430 – tetrapirolo koji u središtu ima vezan niklov(II) ion (ujedno, to je najreduciraniji poznati tetrapirolo u čijoj molekuli ima samo pet dvostrukih veza, slika 7). Koenzim F430 je nekovalentnim interakcijama „privezan“ za kraj hidrofobnog kanala koji sprječava prodor otapala (vode) u aktivno mjesto. Niklov ion je u aksijalnom položaju koordiniran bočnim ogrankom glutamina dok je preostalo, šesto, koordinacijsko mjesto namijenjeno vezanju supstrata. Koenzim F430 je aktivan kada se niklov ion nalazi u +I stanju, ali vrlo se lako konvertira u druga oksidacijska stanja.<sup>12</sup>



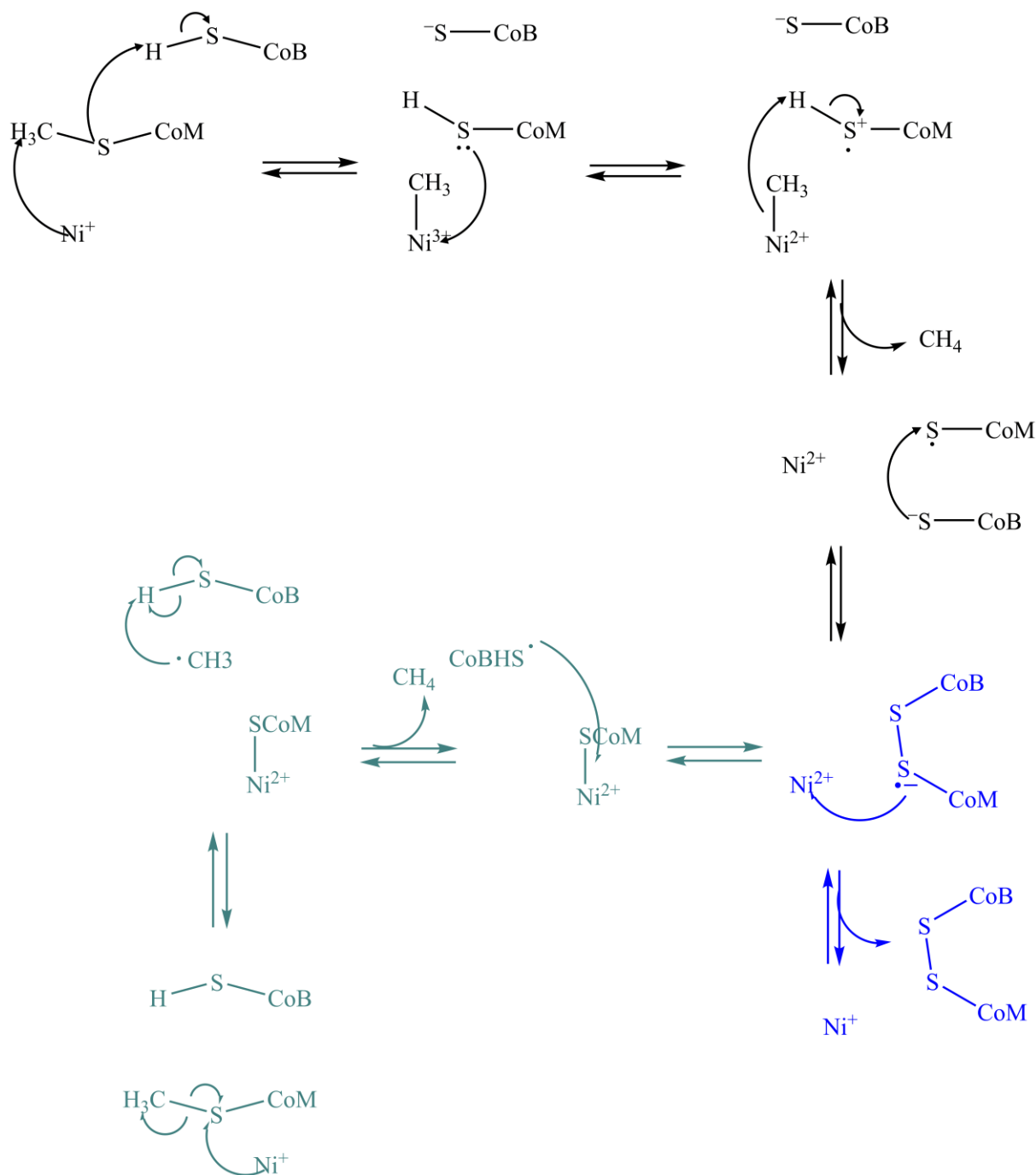
**Slika 6.** Prikaz strukture metil-koenzim M reduktaze iz arheje *Methanothermobacter marburgensis* (podjedinice u heksameru prikazane su različitim bojom, a niklovi ioni su prikazani kao zelene kuglice).<sup>18</sup>



**Slika 7.** Sažeti strukturni prikaz koenzima F430

Iako reakcijski mehanizam enzima nije u potpunosti razjašnjen, postoje dva vjerojatna scenarija<sup>12</sup> (slika 8):

1. Pojednostavljeno, niklov(II) centar reakcijskim mehanizmom  $S_N2$ -tipa preuzima metilnu grupu iz metil-koenzima M pri čemu nastaje metil-Ni(III) koenzim F430. Potom dolazi do prijelaza elektrona s atoma sumpora (vezanog za koenzim M) i povratka niklovih iona u +II stanje. Metilna skupina se protonira, molekula metana izlazi van, a susjedni atomi sumpora, iz koenzimâ M i B, se povezuju tvoreći disulfidni most. Pri tome dolazi do redukcije niklovih(II) iona i enzim je spreman za novi ciklus.
2. Drugi je mehanizam većinom utemeljen na teorijskim izračunima, a pretpostavlja da koenzim F430 katalizira homolitičko cijepanje C–S veze u metil-koenzimu M pri čemu nastaje metilni radikal, a niklov(II) ion se veže na atom sumpora iz tiolne skupine koenzima M. Metilni radikal se protonira pomoću tiolne skupine koenzima B. Dalje, kao i u prvom mehanizmu, nastaje isti disulfidni anionski radikal koji se oksidira, a reducirani niklov ion je spreman za novi ciklus.



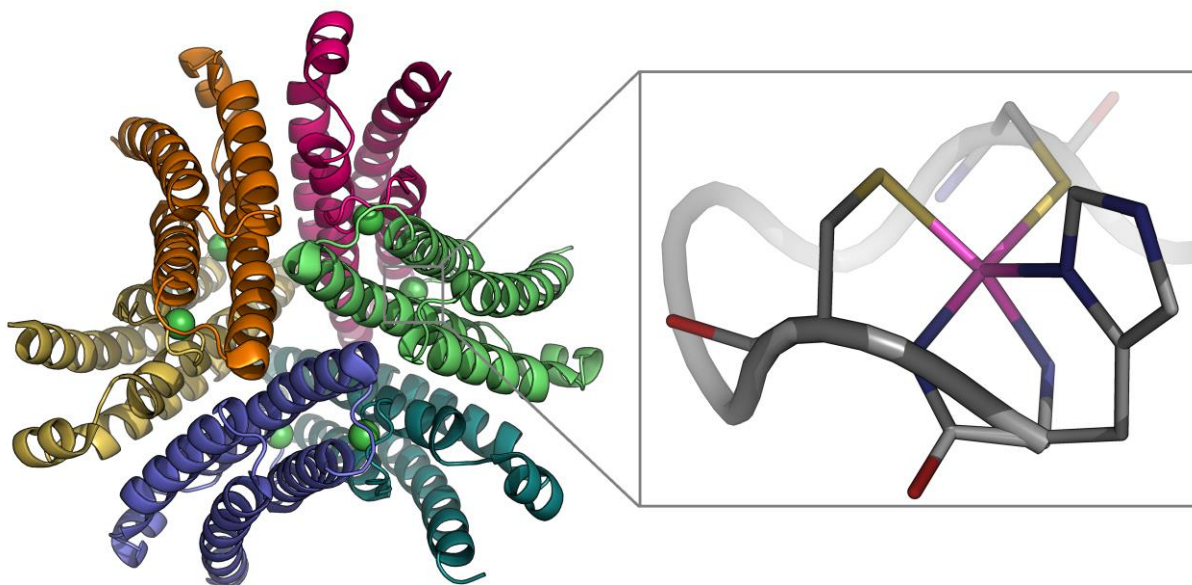
**Slika 8.** Vjerojatni reakcijski mehanizmi metil-koenzim M reduktaze. Zbog jasnoće prikaza izostavljen je tetrapirolni dio koenzima F430. Prvi je mehanizam prikazan crnom, a drugi sivom bojom. Produkti prikazani plavom bojom su u oba mehanizma identični.

### 2.3. Superoksid-dismutaza

Prilikom staničnog disanja, iz molekule kisika nastaje superoksidni anion ( $O_2^-$ ) koji je vrlo reaktivan (reagira s npr. Fe–S klasterima) i uključen je u razvoj raznih bolesti. Enzim superoksid-dismutazu stanice koriste kako bi taj reaktivni radikal prevele do molekule kisika i molekule vodikova peroksida. Sve superoksid-dismutaze u svojim aktivnim mjestima imaju metalne ione, a većina formi enzima koristi dušikove i kisikove donore za vezanje mononuklearnih željezovih(II) ili manganovih(II) centara i dinuklearnih centara cink(II)/bakar(II) ili nikal(II)/nikal(III). Reakcija prijenosa reaktivnog radikala sastoji se od jednoelektronske redoks-reakcije.

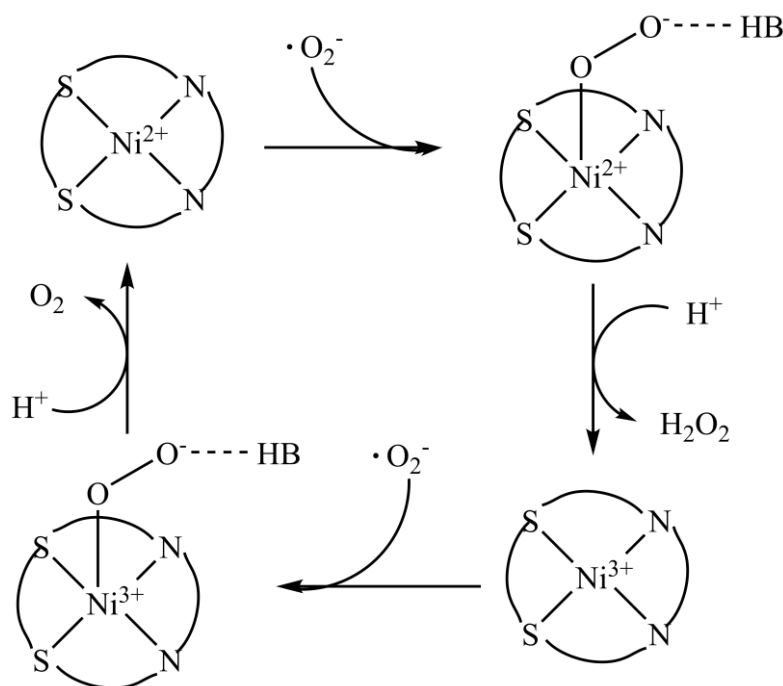
Niklove superoksid-dismutaze (NiSOD) nastale su konvergentnom evolucijom kada je zbog porasta koncentracije kisika u oceanima smanjena aktivnost željezove superoksid-dismutaze (FeSOD). NiSOD koja sadrži mononuklearni niklov kompleks izolirana je iz nekolicine bakterija. Taj je enzim karakteristikama sličan ostalim superoksid-dismutazama, uz nekoliko razlika (primjerice, nema homologije s ostalim SOD). Rješavanjem kristalne strukture NiSOD iz bakterije *Streptomyces seoulensis* pokušala se objasniti koordinacijska geometrija niklovih(II) iona. Otkriveno je i da kvaterna struktura NiSOD nije poput struktura ostalih superoksid-dismutaza, te da je NiSOD homoheksamerni kompleks mase 80 kDa čiji se monomere sastoje od četiri antiparalelne zavojnice (slika 9).<sup>12</sup> Homoheksamerna struktura u otopini ima globularni oblik u kojem svi atomi proteina tvore šuplju sferu vanjskog promjera 72 Å i unutarnjeg promjera 23 Å. Interakcije podjedinica su uglavnom hidrofobnog karaktera, dok su na N-krajevima između aktivnih mjesta interakcije polarne prirode.

Aktivno mjesto NiSOD nalazi se na N-terminalnom kraju proteina. U aktivnom mjestu NiSOD nalaze se niklov(II) i niklov(III) ion koji su međusobno udaljeni od 23,4 do 27,7 Å. Niklov(II) ion u enzimu ima kvadratno-planarno okruženje, a koordiniran je amidom cisteinskog bočnog ogranka, aminom s N-terminalnog kraja i dvama tiolatnim ligandima (iz cisteina). Niklov(III) ion je kvadratno-piramidalno okružen, a uz spomenute ligande vezan je još na bočni ogranak histidina. Dakle, samo nekolicina aminokiselinskih ostataka može biti vezana na niklove(II) i niklove(III) ione u superoksid-dismutazi. Koncentracija niklovih(II) iona utječe na količinu aktivnog NiSOD jer ti ioni imaju regulatornu ulogu u transkripciji NiSOD gena i posttranslacijskoj doradi proteina. Koordinacija niklovih iona u aktivnom mjestu NiSOD pogoduje katalizi (slika 9).<sup>12</sup>



**Slika 9.** Prikaz heksamerne strukture NiSOD iz bakterije *Streptomyces coelicolor* (lijevo) i uvećani prikaz aktivnog mjesta (desno).<sup>19</sup>

Od svih redoks-aktivnih metalnih iona pronađenih u SOD jedino niklovi ne mogu katalizirati disproporcioniranje superoksida u vodenom mediju. Spektroskopske i računalne metode proučavanja NiSOD pokazuju da su tiolatni i imidazolni ligandi zaslužni za stvaranje uvjeta koji smanjuju redukcijski potencijal nikla i omogućuju katalitičku reakciju dismutacije. Pretpostavlja se da se katalitički mehanizam NiSOD, kao i kod ostalih SOD, odvija u dva koraka. Elektron se prenosi s niklovog(II) na superoksidni anion, te sa superoksidnog aniona na niklov(III), te se katalitički proces nastavlja tzv. *ping-pong* mehanizmom u kojem se metalni centar prvo reducira, a zatim oksidira superoksidnim anionom (slika 10).<sup>12</sup>



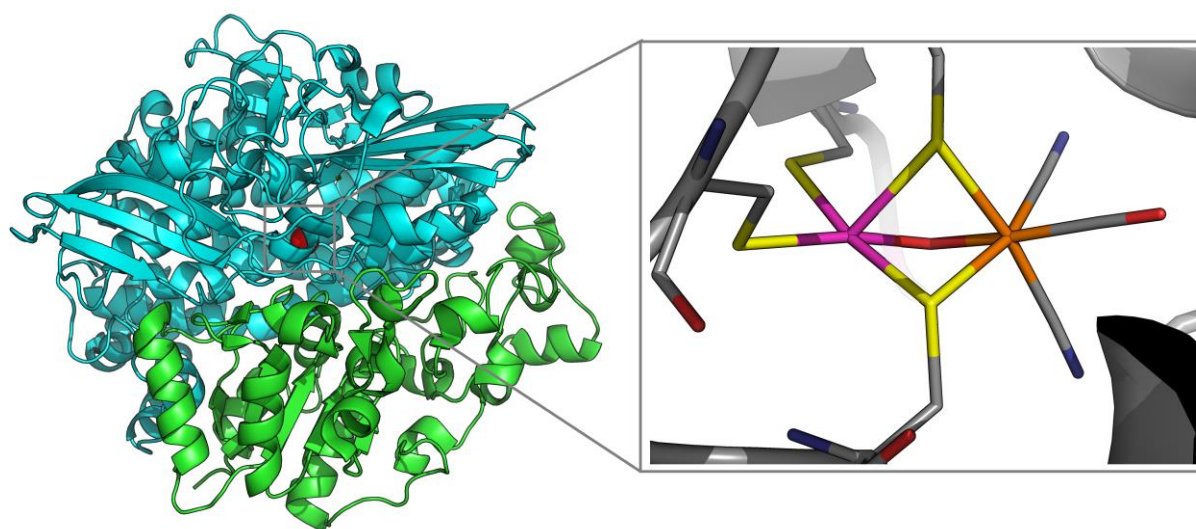
**Slika 10.** Shematski prikaz reakcijskog mehanizma NiSOD.

## 2.4. [NiFe]-hidrogenaza

Hidrogenaze se prema tipu i broju metalnih centara u aktivnom mjestu općenito dijele u tri skupine. Postoje [FeFe]-hidrogenaze koje u aktivnom mjestu imaju dva željezova iona i [Fe-S]-klastere. Drugi tip hidrogenaza su [Fe]-hidrogenaze koje u aktivnom mjestu imaju željezove ione, ali bez [Fe-S]-centara. Potonji služi kao reducens metilentetrahidrometanopterina u metanogenim arhejama. Treći tip hidrogenaza su upravo heterodinuklearne [NiFe]-hidrogenaze, enzimi pronađeni u arhejama, bakterijama i nekim eukariotima koji kataliziraju reakciju pretvorbe plinovitog vodika u protone i elektrone. Reakcija se odvija za zbrinjavanje viška reducensa ili za proizvodnju elektrona potrebnih za cikluse dobivanja energije.

[NiFe]-hidrogenaze (slika 11) sastoje se od najmanje dvije podjedinice, velike katalitičke podjedinice (60 kDa) u kojoj se nalazi [NiFe]-centar i male podjedinice (30 kDa) koja služi za prijenos elektrona, a sastoji se od više [Fe-S]-centara. U [NiFe]-hidrogenazi bakterije *Desulfovibrio fructosovorans* mala podjedinica se sastoji od tri [Fe-S]-centara (proksimalni [4Fe-4S], distalni [4Fe-4S] i [3Fe-4S]-centar koji ih razdvaja).<sup>12</sup>

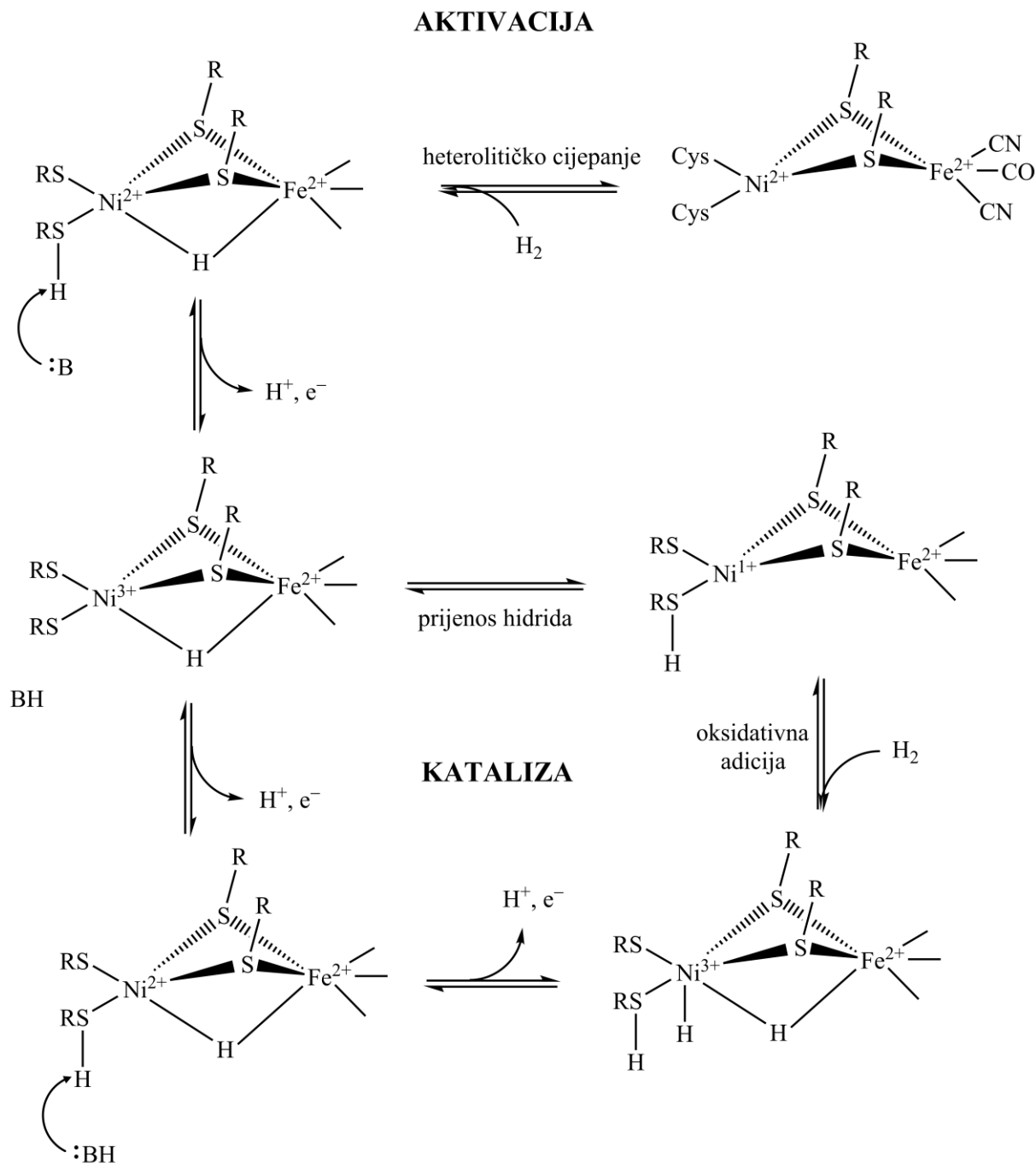
Aktivno mjesto nalazi se duboko unutar velike podjedinice, a niklov(II) ion koordiniran je sa četiri bočna ogranka cisteina. Dva koja koordiniraju niklov(II) ion koordiniraju i željezov(II) ion čiju koordinacijsku sferu upotpunjuju dva manja liganda, a ovisno o podrijetlu enzima ta dva liganda mogu biti cijanidni ioni, molekula ugljikovog monoksida i slično. Neke od [NiFe]-hidrogenaza posjeduju selenocistein kao ligand koji zamjenjuje cisteinski ligand u aktivnom mjestu. Biosinteza aktivnog mjesta [Ni-Fe]-hidrogenaze sastoji se od kompleksnog procesa u kojem sudjeluju brojni proteini „pomagači“. Najviše je proučavano nastajanje aktivnog mjesta hidrogenaze-3 iz bakterije *Escherichia coli*. Najbitniji su Hyp proteini, koji proizvode i dodaju cijanidnu skupinu na željezov(II) ion i obavljaju energijski zahtjevno umetanje niklovih(II) iona, dok je izvor ugljikova monoksida još uvijek nepoznat. Završni korak formiranja aktivnog mjesta je preraspored proteinske strukture kako bi se aktivno mjesto pozicioniralo u strukturi. Aerobno pročišćavanje hidrogenaze često rezultira neaktivnim enzimima koji se vrlo lako mogu aktivirati u određenim (reducirajućim) uvjetima.



**Slika 11.** Shematski prikaz strukture molekule [NiFe]-hidrogenaze iz bakterije *Desulfovibrio fructosovorans* (lijevo) i uvećani prikaz aktivnog mjesta (desno)<sup>20</sup>

Ukupna reakcija [NiFe]-hidrogenaze usporena je potrebom da supstrati (vodik, elektroni, protoni) dođu do zaštićenog aktivnog mjesta. U bakteriji *Desulfovibrio fructosovorans*, molekule vodika prolaze kroz hidrofobni kanal, što je potvrđeno analizom kristalne strukture. Molekula vodika se heterolitički cijepa na proton i hidrid, uz micanje elektrona iz hidrida kako bi došlo do stvaranja još jednog protona. Prijenos elektrona ide preko tri [Fe-S]-centra od kojih

je jedan povezan s površinom proteina i može dalje sudjelovati u redoks reakciji (slika 12). Putevi prijenosa protona nisu dobro objašnjeni, no moguće je da se odvijaju preko cisteinskog ostatka nakon čega bi u reakciji prijenosa mogli sudjelovati razni protonirajući bočni ogranci ili čak molekule vode kako bi se protoni izbacili izvan proteina.<sup>12</sup>



Slika 12. Shematski prikaz reakcijskog mehanizma [NiFe]-hidrogenaze.



## § 3. ZAKLJUČAK

Unatoč toksičnom djelovanju nikla na biljke, bakterije, gljive, alge i arheje neke su vrste razvile sposobnost akumulacije i/ili koriste niklove ione u mnogim enzima. Poznavanje reakcijskih mehanizama enzima koji sadrže niklove ione tek je djelomično poznato, dok su mehanizmi unosa i transporta nikla i dalje sasvim nepoznati. Razumijevanje katalitičkih mehanizama enzima koji sadrže niklove ione moglo bi doprinijeti razvoju lijekova korisnih za obranu ljudskog i životinjskog organizma od raznih bakterija.

Bitno je napomenuti da funkcije enzima koji u svojoj strukturi sadrže niklove ione, neophodne za pravilan rad enzima, pripadaju naizgled primitivnim sustavima. Metaloenzimi koji sadrže nikal najkorisniji su u metabolizmima baziranim na spojevima kao što su metan i vodik te se razvojem aerobnih organizama njihova vrijednost smanjila. Iako je aktivnost niklovih iona potvrđena u višim organizmima, ograničena je na jedan enzim, ureazu. Anaerobne bakterije, posebice metanogene bakterije, zadržale su nikal-hidrogenaze i ostale enzime koji sadrže nikal, te su uglavnom zaostale u dijelovima Zemljine unutrašnjosti u kojima kisik nije dostupan.

Proučavanjem enzima koji sadrže niklove ione pokušava se doći i do industrijski korisnih postupaka. Jedan od primjera je proučavanje aktivnog mjesta [NiFe]-hidrogenaze s ciljem dizajniranja malih molekula koje bi imitirale sposobnost enzima da katalizira reverzibilnu reakciju redukcije protona do vodika.

## § 4. LITERATURNI IZVORI

1. H. Heinz, U. W. Suter, *Journal of Physical Chemistry B* **108** (2004) 18341-18352.
2. [https://en.wikipedia.org/wiki/Enzyme#/media/File:Enzyme\\_structure.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Enzyme#/media/File:Enzyme_structure.svg) (preuzeto i prilagođeno 14. rujna 2018.)
3. L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 1991, str. 89-99.
4. Y. Savir, T. Tlusty, E. Scalas, *PLoS ONE* **5** (2007) 468.
5. [https://en.wikipedia.org/wiki/Enzyme#/media/File:Hexokinase\\_induced\\_fit.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Enzyme#/media/File:Hexokinase_induced_fit.svg) (preuzeto i prilagođeno 14. rujna 2018.)
6. S. W. Ragsdale, *The Journal of Biological Chemistry* **284** (2009) 18571-18575.
7. C. Y. Lin, P. P. Power, *Chem. Soc. Rev.* **46** (2017) 5347-5399.
8. Maraia E. Ener et al., *PNAS* **107** (2010) 18783-18786.
9. R. M. Roat-Malone, *Bioinorganic chemistry - a short course*, John Wiley & Sons, Chichester, 2007, str. 1-6.
10. J. J. R. Frausto da Silva, R. J. P. Williams, *The Biological Chemistry Of Elements*, Butler & Tanner, Frome, 1991, str. 400-541.
11. A. Sigel, H. Sigel, R.K.O. Sigel, *Nickel and Its Surprising Impact in Nature*, John Wiley & Sons, Chichester, 2007, str. 1-439.
12. J. L. Boer, S. B. Mulrooney, R. P. Hausinger, *Arch. Biochem. Biophys.* **544** (2014) 142-152.
13. J. B. Sumner, *J. Biol. Chem.* **37** (1919) 137-142.
14. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1946/sumner/biographical/> (datum pristupa 20. rujna 2018.)
15. P. A. Karplus, M. A. Pearson, *Acc. Chem. Res.* **30** (1997) 330-337.
16. M. A. Pearson, L. O. Michel, R. P. Hausinger, P. A. Karplus, *Biochemistry* **36** (1997) 8164-8172.
17. U. Ermler, *Dalton Transactions* **21** (2005) 3451-3458.
18. U. Ermler, W. Grabarse, S. Shima, M. Goubeaud, R. K. Thauer, *Science* **278** (1997) 1457-1462.
19. D. P. Barondeau, C. J. Kassmann, C. K. Bruns, J. A. Tainer, E. D. Getzoff, *Biochemistry* **43** (2004) 8038-8047.

- 
20. A. Volbeda, L. Martin, C. Cavazza, M. Matho, B. W. Faber, W. Roseboom, S. P. Albracht, E. Garcin, M. Rousset, J. C. Fontecilla-Camps, *J. Biol. Inorg. Chem.* **10** (2005) 239-249.