

# Fe-S klasteri u proteinima: struktura i svojstva

---

**Puđa, Nikola**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*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:217:728132>

*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  
Kemijски odsjek

Nikola Puđa

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **Fe–S klasteri u proteinima: struktura i svojstva**

## **Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ivica Đilović

Zagreb, rujan 2020.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

5. lipnja 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

25. rujna 2020.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ivica Đilović

Potpis:



# SADRŽAJ

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>1</b>
<b>§1. UVOD .....</b>	<b>2</b>
<b>§2. PRIKAZ ODABRANE TEME.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Povijesni pregled otkrića Fe–S proteina i teorija o Fe–S svijetu .....</b>	<b>3</b>
2.1.1. <i>Pregled istraživanja Fe–S proteina .....</i>	3
2.1.2. <i>Teorija o Fe–S svijetu .....</i>	6
2.1.3. <i>Novija otkrića i istraživanja Fe–S proteina .....</i>	7
<b>2.2. Kemija Fe–S proteina .....</b>	<b>8</b>
2.2.1. <i>Elektronska struktura i veze u Fe–S klasterima .....</i>	8
2.2.2. <i>Stabilnost Fe–S klastera.....</i>	10
2.2.3. <i>Oksidativna oštećenja Fe–S klastera te adaptacije na kisik .....</i>	10
<b>2.3. Najčešće strukturne vrste Fe–S klastera u proteinima.....</b>	<b>12</b>
2.3.1. <i>Rubredoksini .....</i>	12
2.3.2. <i>Feredoksini.....</i>	13
2.3.3. <i>Rieskeovi proteini.....</i>	14
2.3.4. <i>Strukturna fleksibilnost i poveznica s funkcijom.....</i>	15
2.3.5. <i>Ostali strukturni tipovi .....</i>	15
<b>2.4. Funkcija Fe–S proteina .....</b>	<b>16</b>
2.4.1. <i>Prijenos elektrona.....</i>	16
2.4.2. <i>Ostale funkcije Fe–S proteina.....</i>	17
<b>2.5. Karakteristični Fe–S proteini u živim sustavima .....</b>	<b>18</b>
2.5.1. <i>Kompleks nitrogenaze .....</i>	18
2.5.2. <i>Ubikinol-citokrom-c-reduktaza .....</i>	21
2.5.3. <i>Akonitaza.....</i>	22
<b>§3. LITERATURNI IZVORI .....</b>	<b>XXIV</b>



## § SAŽETAK

Fe–S proteini su posebna skupina proteina koje karakterizira prisutnost kofaktora koji su građeni od željezovih i sulfidnih iona. Budući da željezov ion može postojati u više oksidacijskih stanja, ta činjenica omogućuje da proteini s ovim kofaktorima djeluju kao „elektronske sklopke“\*. Osim u proteinima respiracijskog lanca, Fe–S klasteri prisutni su i kod drugih enzima koji, primjerice, sudjeluju u staničnom metabolizmu (akonitaza u ciklusu limunske kiseline) ili u fiksaciji dušika (nitrogenaza u bakterijama tla).

Pretpostavlja se da su sama sinteza i evolucijski razvoj Fe–S klastera u živim organizmima povezani s činjenicom da su se prvi primitivni jednostanični i višestanični organizmi razvijali na stjenovitim podlogama koje su bile bogate željezovim rudama i sumporovim spojevima. Nadalje, ustanovljeno je i da su svi kompleksniji metabolički putevi izrasli upravo iz onih koji su izravno koristili željezove i sulfidne ione kao prenositelje elektrona.

Fe–S proteine osim funkcionalne, određuje i strukturna raznolikost. Tri su osnovna strukturna tipa Fe–S proteina: rubredoksini, feredoksini te Rieskovi proteini. Željezovi su ioni u većini strukturnih tipova premošteni sulfidnim ionom, koji se često naziva i *anorganskim sumporom* da bi se naglasilo anorgansko porijeklo sumporova iona. Uz to, željezovi su ioni koordinirani i atomima sumpora ili dušika iz bočnih ogranaka aminokiselina cisteina i histidina.

Kemija Fe–S proteina je vrlo bogato područje koje se još uvijek detaljno proučava. Otkriveno je da postoje različiti kemijski spojevi koji mogu negativno utjecati na aktivnost Fe–S proteina, a tu se posebno ističu reaktivne kisikove vrste (ROS – engl. *reactive oxygen species*) koje su u povećanim koncentracijama prisutne u stanici u uvjetima oksidativnog stresa.

---

\* Molekulski sustavi koji mogu primati elektrone od elektron-donora te predavati elektrone elektron-akceptorima u oksidacijsko-redukcijskim reakcijama.



## §1. UVOD

Fe–S proteini, odnosno željezo-sumpor proteini, su posebna skupina proteina u kojima su prisutni kofaktori oblika *klastera* ili „nakupina“ koje tvore međusobno kovalentno vezani željezovi i sulfidni ioni. U takvim klasterima, željezovi ioni su međusobno premošteni sulfidima, a mogu i graditi vezu s atomima sumpora iz bočnih ogranaka aminokiselina koje se nalaze u samom proteinu, poput veze između željezovog iona i atoma sumpora iz tiolne skupine bočnog ogranka cisteina.

Fe–S proteini se ubrajaju u najstarije poznate biokatalizatore, tj. enzime. Budući da se željezovi ioni mogu nalaziti u različitim oksidacijskim stanjima (najčešće +II i + III, no u nekim se slučajevima mogu javiti i u oksidacijskom stanju +IV kao kod peroksidaze), jedna od najvažnijih funkcija Fe–S klastera jest prijenos elektrona, odnosno djelovanje kao „elektronska sklopka“. Upravo taj proces prijenosa elektrona koji se odvija kroz niz elektronskih akceptora u respiracijskom lancu vodi do nastanka protonskog gradijenta u mitohondrijima koji pokreće sintezu ATP-a, za kojega je poznata činjenica da u stanici djeluje kao „energetska valuta“, odnosno njegovom se hidrolizom oslobađa energija koja omogućuje brojne biokemijske reakcije.

Uz to, Fe–S proteini sudjeluju i u drugim bitnim biokemijskim procesima, kataliziraju reakcije koje ne uključuju nužno izmjenu elektrona među kemijskim vrstama te također sudjeluju i u regulacijskim procesima.

Cilj ovoga Završnog rada jest predstaviti Fe–S proteine kao važne proteine i enzime, koji sudjeluju u mnogim biokemijskim reakcijama u živim organizmima, te se osvrnuti na njihovo otkriće, strukturu i funkciju.

## §2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. Povijesni pregled otkrića Fe–S proteina i teorija o Fe–S svijetu

Iako se danas zna da se Fe–S proteini nalaze i kod eukariotskih, i kod prokariotskih organizama, Fe–S klasteri ipak nisu među prvim otkrivenim kofaktorima. Jedan od razloga za njihovo relativno kasno otkriće jest nedostatak obojenosti, budući da drugi proteini koji sadrže željezove ili neke druge ione, ali ne u obliku Fe–S klastera već vezan u hemske prostetičke skupinama pokazuju apsorpciju vidljive svjetlosti. Nadalje, Fe–S centri su podložni destabilizaciji prilikom izlaganja kisiku pa stoga rad s njima zahtijeva posebne uvjete poput anaerobnih okolina, i metode poput spektroskopije elektronske paramagnetske rezonancije (EPR) i Mössbauerove spektroskopije.

Važno je imati na umu da područje Fe–S proteina zapravo predstavlja vrlo značajnu okolinu u kojoj se nužno rabe metodologije koje djeluju na dodirnim površinama između fizike, kemije i biokemije. Te metodologije, u kontekstu energija primijenjenog zračenja, pokrivaju veliki dio elektromagnetnog spektra, od mikrovalova do rendgenskih zraka. U tijeku otkrivanja struktura Fe–S proteina važnu je ulogu imala i spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije zbog poteškoća koje se povezuju s karakterizacijom paramagnetskih centara.<sup>2</sup>

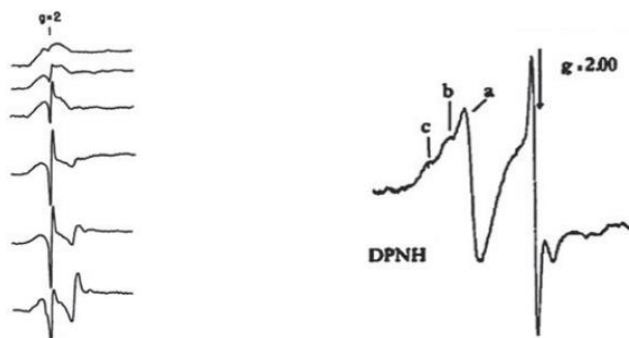
#### 2.1.1. Pregled istraživanja Fe–S proteina

Znanstvenici su 1951. opazili da određena tamnosmeđa frakcija dobivena iz ekstrakta lišća uz uporabu amonijevog sulfata posjeduje svojstvo ubrzavanja redukcije methemoglobina<sup>†</sup>. Ovo otkriće najvjerojatnije je prvi spomen aktivnosti Fe–S proteina, no u istraživanju nisu dani dodatni uvidi u prirodu tih reducirajućih enzima. Nadalje, u razdoblju od 1956. do 1958. u više

---

<sup>†</sup> Hemoglobin koji sadrži hem s željezovim ionom u oksidacijskom stanju +III (normalno je da se željezov ion nalazi u oksidacijskom stanju +II) te kao takav nema sposobnost vezanja kisika.<sup>20</sup>

je navrata primijećen vezani nehemski željezov ion u životinjskom tkivu, osobito u ekstraktima dobivenima lizom mitohondrija.



Slika 1. Prvi EPR<sup>‡</sup>-spektri Fe-S objavljeni 1960. i 1961.<sup>6,7</sup>

Uvođenje i primjena EPR spektroskopije (čija je osnovna funkcija istraživanje sustava koji sadrže nesparene elektrone) dovela je do ubrzanja u istraživanju i otkrivanju Fe-S proteina (slika 1). Paramagnetski signali koji potječu od nehemskog željeza prvo su otkriveni kod sukcinat-dehidrogenaze, a također su kod istog enzima otkriveni i sulfidni ioni.

Ubrzo nakon radova o mitohondrijskom nehemskom željezu u proteinima, izolirani su jedni od najstabilnijih i najčešćih strukturnih tipova Fe-S proteina, *klostridijski feredoksini* koji se često označuju notacijom [4Fe-4S]. Ovakva notacija upućuje na sustav koji se sastoji od četiri željezova iona te četiri sulfidna iona. Proteine su 1962. izolirali i imenovali L. Mortenson i suradnici.

Više vrsta Fe-S proteina je otkriveno, što uključuje i proteine iz anaerobne fotosintetske ljubičaste bakterije *Chromatium vinosum*, kod koje se nalaze i nestandardni klasteri [4Fe-4S]. Otkriveni su i proteini u kojima dva bočna ogranka histidina, umjesto uobičajenih cisteinskih, koordiniraju željezove ione, kao i proteini u kojima je jedan željezov ion tetraedarski

<sup>‡</sup> Spektroskopija elektronske paramagnetske rezonancije rabi se za proučavanje molekulskih sustava koji sadrže elektrone koji posjeduju spinski i orbitalni magnetski moment. G-faktor pokazuje spregu između tih dvaju momenata.

koordiniran četirima bočnim ograncima cisteina u odsustvu sulfidnih iona. Sva su ova i mnoga druga otkrića sabrana u knjizi *Non Heme Iron Proteins* koju je uredio A. S. Pietro i objavio 1965.

Prvi strukturni model Fe–S proteina predložen je 1966. i bio je utemeljen na interpretaciji EPR-spektra biljnog feredoksina. Izotopna supstitucija i analiza spektara kasnije je potvrdila točnost predložene strukture, kao i činjenicu da struktura uključuje dva atoma sumpora koja se ne mogu razlikovati.

Bilo je potrebno nekoliko godina da bi se kristalografski potvrdile prethodne pretpostavljene strukture. Kristali klostridijskih 2[4Fe–4S] feredoksina dobiveni su još 1966., no sve do sedamdesetih godina korisne su kristalografske strukture bile nedostupne. Skupina koju je predvodio Lovenberg predstavila je strukturu rubredoksina, nakon čega su uslijedile i strukture klostridijskog feredoksina te biljnog feredoksina (njegovu su strukturu potvrdili iz podataka dobivenih NMR-om).

Nakon ranije opisanih otkrića, riješene su brojne druge strukture Fe–S proteina, a postupno je rasla i kompleksnost proučavanih sustava. Istraživanja su napredovala od rubredoksina s jednim te feredoksina s dva željezova iona, sve do nevjerojatno složenih flavo-molibdo-željezovih kofaktora. Potome su se započeli istraživati i proteini koji se sastoje od više podjedinica te proteini koji sadrže metalne klustere koji dijele ligande iz različitih polipeptidnih lanaca ili sadrže ligande koji ne potječu od aminokiselina. Bitan trenutak je prvi prijedlog strukture enzima nitrogenaze.

Tijekom sedamdesetih godina prošlog stoljeća, kemičari su uspjeli sintetizirati i karakterizirati više strukturnih analoga Fe–S klastera. Skupine koje su vodili Holm i drugi znanstvenici istraživale su svojstva klastera poput relativne stabilnosti te prirode, veličine i reaktivnosti terminalnih liganada. Njihovi zajednički naponi doveli su do otkrivanja slijeda individualnih reakcija koje vode do izgradnje tih klastera. Izvorni je rad bio izveden u sustavima bez prisustva vode, no ubrzo je pokazano da se ista kemija zbiva i u micelarnim sustavima i vodenim puferima, kao i u reakcijama s drugim metalima uz uporabu enzima koji kataliziraju pojedine korake u ukupnom lancu reakcija. Upravo ta mogućnost rekonstrukcije i replikacije različitih Fe–S centara koji se nalaze u proteinima dokazala je da je struktura proteina faktor koji utječe na strukturu klastera, kao i poduprijela koncept da su Fe–S centri modularni i da

posjeduju neobičnu sposobnost interkonverzije između vrsta. Primjerice, dva [2Fe–2S] klastera mogu tvoriti jedinstven [4Fe–4S] kompleks. Nadalje, ovim je istraživanjima također dokazano da su Fe–S klasteri robusniji i sličniji tipičnim kofaktorima nego što se ranije smatralo.

Ukratko, otprilike jedno desetljeće nakon objave San Pietrove knjige, nova saznanja iz područja Fe–S proteina toliko su narasla da bi se mogla sabrati u knjigu u dva dijela. Prvu takvu proširenu zbirku objavio je Walt Lovenberg (*Iron-Sulfur Proteins*), a nekoliko godina kasnije objavljen je i treći dio zbirke.

Do sredine sedamdesetih godina prošlog stoljeća, prikupljeno je dovoljno informacija o strukturnim svojstvima Fe–S proteina te njihovoj raspodjeli kroz carstva živih organizama da se počelo ozbiljno razmatrati o tome kada su se prvi put pojavili u živim sustavima. Istraživanja u molekularnoj evoluciji dovela su do povećane osviještenosti o činjenici da su Fe–S strukture i proteini koji ih okružuju vjerojatno postojali još od ranih dana anaerobnog života na Zemlji i da su se te strukture mijenjale brojnim procesima.<sup>2</sup>

### 2.1.2. Teorija o Fe–S svijetu

Günter Wächtershäuser, potaknut i podržan od strane jednog od najutjecajnijih filozofa prošlog stoljeća Karla Poppera, objavio je u vremenskom razdoblju od 1988. do 1992. niz znanstvenih radova kroz koje je predložio svoju teoriju o porijeklu života i ranoj evoluciji živih organizama. U svojoj teoriji, Wächtershäuser predlaže da su se rani oblici života razvili na površini koja je bogata mineralima željezovih sulfida.

Po ovoj teoriji, najraniji oblik života nazvan je „pionirskim organizmom“ te taj organizam potječe s vulkanskih staništa u kojima vladaju visoki tlak i temperatura. Kod tog organizma, postojao je određen broj katalitičkih centara s ionima prijelaznih metala (najvjerojatnije željezovih i niklovih, no ne isključuju se i kobaltovi, manganovi i cinkovi). Takvi katalitički centri katalizirali su autotrofnu fiksaciju ugljika iz anorganskih plinova (poput ugljikova monoksida ili dioksida te cijanovodika) uz nastanak malih, nepolimernih organskih molekula. Sam proces fiksacije ugljika vjerojatno je postao autokatalitički stvaranjem metaboličkog ciklusa koji se može smatrati primitivnim oblikom ciklusa limunske kiseline koji je ovisan o sumporu. Daljnji napredak i razvoj života počiva na razvoju sve složenijih metaboličkih puteva i sintezi sve složenijih organskih spojeva.

Budući da Wächtershäuser predlaže ideju da su se prvi živi organizmi razvijali na podlogama koje su bogate željezovim sulfidima, mogla bi se povući paralela s Fe–S proteinima i pretpostaviti da su Fe–S klasteri nastali još kod tih hipotetskih primitivnih organizama zbog obilne prisutnosti željeza i sumpora u staništu. Može se zaključiti da su prvi takvi Fe–S klasteri prolazili kroz određene kemijske promjene, preslagivanja, prestrukturiranja i promjene u funkciji kako je život napredovao, što je konačno dovelo do velikog broja različitih strukturnih tipova i funkcija Fe–S proteina.<sup>3,4,5</sup>

### 2.1.3. Novija otkrića i istraživanja Fe–S proteina

U ranim 1990.-im, otkrivena je još jedna potencijalna uloga Fe–S proteina, uz onu da djeluju kao elektronske sklopke. Znanstvenici su proučavali regulaciju unutarstaničnog metabolizma željeza te su identificirali i protein kod sisavaca koji je odgovoran za regulaciju translacije feritina i stabilizaciju transkripta koji kodira transferinski receptor (poznat kao vezni protein za elemente osjetljive na željezo, IRE-BP). Otkriveno je da taj protein ima neočekivano veliku sličnost u sekvenci aminokiselina s mitohondrijskom akonitazom. Bilo je poznato da stanice sisavaca sadrže još jednu akonitazu, koja se nalazi u citosolu te istraživanje njezine sekvence dokazalo je da joj je IRE-BP protein identičan. Kasnije je ustanovljeno da ključ prijelaza iz aktivne akonitaze u regulatorni protein za željezove ione leži u gubitku [4Fe–4S] klastera.

Nedugo poslije otkriven je još jedan primjer u kojemu Fe–S klaster djeluje kao senzor: kod bakterijske fumarat-nitrat-reduktaze postoji labilan Fe–S klaster koji je ključan senzor za kisik te utječe na transkripciju u svrhu prijelaza s aerobnog na anaerobni metabolizam.

Otkriveno je još funkcija Fe–S proteina koje nisu redoks-tipa. U jednom su revijalnom radu iz 1997. brojna opažanja dovela do zaključka da Fe–S klasteri sada po svojoj učestalosti i kompleksnosti djelovanja stoje zajedno s prostetičkim skupinama poput hema i flavina. Nove se uloge stalno otkrivaju, te se također sada zna da Fe–S proteini igraju važne uloge u metabolizmu i održavanju integriteta molekula DNA.<sup>2</sup>

## 2.2. Kemija Fe–S proteina

Fe–S proteini se nalaze kod svih živih organizama te sudjeluju u velikom rasponu biokemijskih reakcija. Brojnost Fe–S klastera povezuje se s velikom dostupnošću željeza i sumpora i mogućnošću njihova kemijskog spajanja. Ove su pretpostavke dovele i do nagađanja da su jednostavni Fe–S proteini doista bili prvi proteini koji djeluju u prijenosu elektrona. Nadalje, Fe–S klasteri posjeduju mnoga fizikalna svojstva koja ih čine učinkovitima u mnogim svrhama.

Željezo je prijelazni metal koji se obično javlja u oksidacijskim stanjima +II, +III, a ponekada i u stanju +IV te posjeduje različita spinska stanja. Sumpor se također može nalaziti u više oksidacijskih stanja, od –II do +VI te s jednakom lakoćom i gradi i gubi veze. Najjednostavniji tipovi Fe–S klastera sastoje se od jednog do četiri željezova iona koji su tetraedarski koordinirani atomima sumpora.

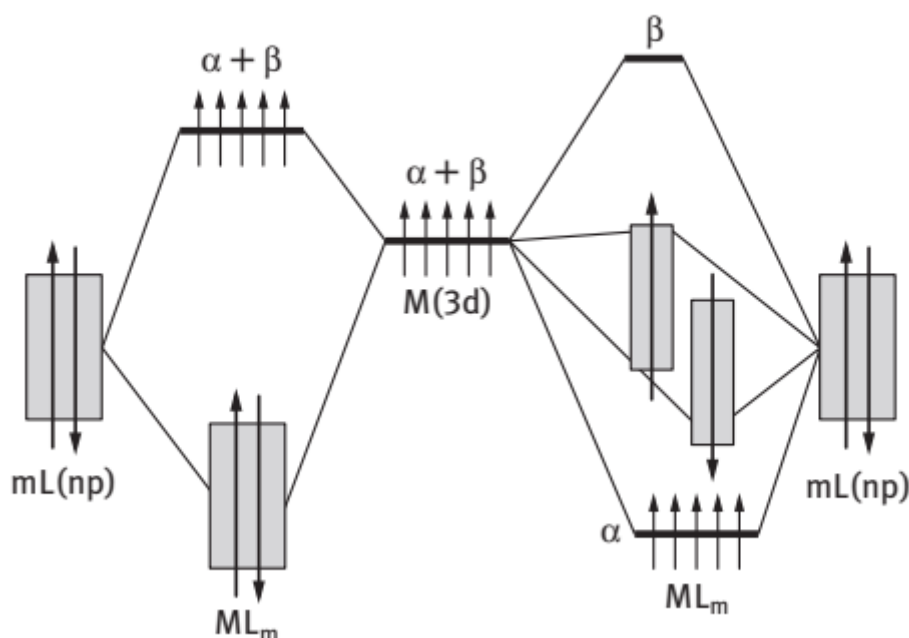
Fe–S aktivna mjesta proučavana su biomimetičkim kemijskim metodama tako što su sintetizirani analozi Fe–S klastera koji oponašaju njihovu strukturu i elektronska svojstva. Nadalje, budući da su klasteri stabilni izvan proteinske okoline, oni se mogu karakterizirati i brojnim drugim eksperimentalnim tehnikama uz veću točnost nego metodama koje se izvode s klasterima s proteinskom okolinom.<sup>2</sup>

### 2.2.1. Elektronska struktura i veze u Fe–S klasterima

Elektronski naboji u Fe–S klasterima koncentrirani su na atomima sumpora i cisteinskim ligandima. XANES-spektroskopijom je pokazano da su sve veze koje uključuju sumpor visoko kovalentnog karaktera te da su čak dva do tri puta jačeg kovalentnog karaktera od tiolatih veza.

Svojstva elektronske strukture Fe–S kompleksa povezuju se s visokospinskim željezom koje je obično tetraedarski koordinirano atomima sumpora. Neobična redoks-svojstva Fe–S klastera proizlaze iz svojstava poput jakog kovalentnog karaktera veza metal-ligand, spinskog sprežanja metal-metal te rezonantne delokalizacije spinova metal-metal, s time da treba imati na umu da se posljednja dva svojstva javljaju kod klastera s više od jednog željezovog iona.

Fe–S komplekse karakteriziraju jake veze metal-ligand uslijed veznih interakcija i jakih spin-polarizacijskih efekata. Nadalje, ti jaki spin-polarizacijski efekti dovode do spinskog spreznjanja i delokalizacije u klasterima s više od jednog željezova iona. Spinska polarizacija proizlazi iz činjenice da u ligandnom polju atoma sumpora dolazi do jakog cijepanja  $\alpha$ - i  $\beta$ -spinova između energijskih razina. To cijepanje spinova vodi do stabilizacije razina  $\alpha$ -spinova i destabilizacije razina  $\beta$ -spinova u odnosu na 3p-razinu, što se razlikuje od normalne raspodjele energijskih razina u kojoj su razine  $\alpha$ - i  $\beta$ -spinova obje destabilizirane u odnosu na popunjene 3p-orbitale liganda (slika 2).



Slika 2. Usporedba normalne (lijevo) i raspodjele energijskih razina uslijed spinske polarizacije (desno).<sup>2</sup>

Nadalje, Fe–S kompleksi posjeduju slabe metal-metal vezne interakcije između željezovih iona u kompleksima s dva ili više atoma željeza, što se povezuje sa spreznjanjem spinova pojedinih atoma. Te se interakcije nazivaju *Heisenbergovim razmjenjujućim spreznjanjem* koje obično favorizira suprotne magnetne orijentacije spinova susjednih atoma. To znači da su kompleksi kod proteina s tipom  $[\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{Cys})_4]$  obično antiferomagnetični te ta



činjenica vodi do različitih duljina veza Fe–S kod proteina koji posjeduju takve  $[\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{Cys})_4]$  klastera.<sup>2</sup>

### 2.2.2. Stabilnost Fe–S klastera

Sulfidni ion se ubraja u meke Lewisove baze pa omogućuje željezu da zadrži svoje visokospinsko stanje, što vodi do relativne labilnosti klastera. Također, pokazano je da se klasteri mogu distorzirati pod utjecajem proteinske strukture. Nadalje, osjetljivi su na kisik, njegove redukcijske produkte te također i na dušikov monoksid te suvišak sulfidnih i tiolnih aniona, a podliježu i hidrolizi uslijed visoke ili niske vrijednosti pH.

Važan faktor je i prisutnost aminokiseline cisteina. Cisteinski su ligandi potrebni za sintezu stabilnih klastera te stoga zamjena jednog cisteina s drugim funkcionanim ogrankom se tolerira kod nekih vrsta, no klasteri ostaju stabilni kao i ranije samo ukoliko je cistein zamijenjen histidinom.

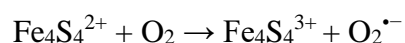
Iako su polipeptidni lanci bitni za stabilizaciju klastera, njihov zaštitni učinak je promjenjive prirode: životni vijek Fe–S proteina na zraku varira od nekoliko sekundi do nekoliko tjedana.<sup>2</sup>

### 2.2.3. Oksidativna oštećenja Fe–S klastera te adaptacije na kisik

Već je dulje vrijeme poznato da kisik te njegove odgovarajuće reaktivne vrste utječu na aktivnost Fe–S proteina. Doista, ranija istraživanja na enzimu dihidroksikiselinskoj dehidratazi pokazala su da superoksidni ion umanjuje njegovu aktivnost. Pored toga, pokazano je i da se  $[\text{4Fe–4S}]^{2+}$  klaster enzima djelovanjem superoksidnog iona ili vodikova peroksida može prevesti u metastabilni  $[\text{4Fe–4S}]^{3+}$  klaster koji brzo otpušta ion željeza koji je esencijalan za katalizu te stoga tom se oksidacijom enzim inaktivira.

Kao još jedan primjer štetnog utjecaja oksidacije kisikom jest oksidacija  $[\text{4Fe–4S}]$  klastera regulatora redukcije fumarat nitrata (FNR), čime nastaje superoksidni radikal koji

potom uzrokuje dodatna oksidativna oštećenja. Opisanu oksidaciju opisuje sljedeća jednačica kemijske reakcije:



FNR djeluje kao sklopka između aerobnog i anaerobnog metabolizma kod anaerobnih mikroorganizama<sup>§</sup>. Pod anaerobnim uvjetima, FNR je homodimer u kojemu svaki monomer sadrži jedan [4Fe–4S] klaster te je u ovakvome obliku FNR sposoban vezati određene palindromske sekvence DNA u svrhu aktivacije ili represije velikog broja gena. Kada se izloži molekulama kisika, odnosno kada se organizam nalazi u aerobnom okolišu, klaster se brzo prevede u [2Fe–2S] oblik preko prijelaznog nestabilnog [4Fe–3S] oblika. FNR koji posjeduje [2Fe–2S] klastere postaje monomerni te gubi sposobnost vezanja DNA, što rezultira metaboličkim preuređenjima i promjenama. Kroz ova opažanja, znanstvenici su došli do zaključka da FNR koristi reaktivnost [4Fe–4S] klastera s reaktivnim kisikovim vrstama kao „osjetilo“ ili senzor za razine molekulskog kisika u okolišu te u svrhu regulacije genske ekspresije, ovisno o trenutnim uvjetima.

Kao što je ranije spomenuto, u Wächstershäuserovoj teoriji prvi su se organizmi razvijali na podlogama bogatima željezom i sumporom prije pojave oksidativne fotosinteze. Ti su se organizmi morali prilagoditi promjenama koje su proizašle iz pojave atmosferskog kisika te su stoga razvijene različite adaptacije. Jedno od najjednostavnijih rješenja jest izbjegavanje izlaganja kisiku tako da ne dođe do metaboličkih promjena. Za ovu je svrhu potrebno naseliti ekološke niše u kojima se mogu održati i očuvati strogi anaerobni uvjeti. S druge strane, alternativno rješenje bilo je zadržavanje u aerobnim uvjetima razvijanjem alternativnih metaboličkih uvjeta uz očuvanje onih puteva koji se odvijaju u anaerobnim uvjetima. Primjer ove adaptacije jest bakterija *Escherichia coli*, koja živi u čovjekovu probavilu u kojemu varira koncentracija kisika te je stoga bakterija razvila sposobnost prelaska iz anaerobnog u aerobni modus metabolizma i obrnuto. To čini tako što aktivira enzim [Ni,Fe]-hidrogenazu koja troši kisik te time omogućuje nastavak funkcije anaerobnih metaboličkih puteva.

---

<sup>§</sup> Fakultativni anaerobni organizmi vrše aerobnu respiraciju u prisustvu kisika, no posjeduju sposobnost prelaska na fermentaciju ili anaerobnu respiraciju ukoliko je kisik odsutan u okolišu organizma.

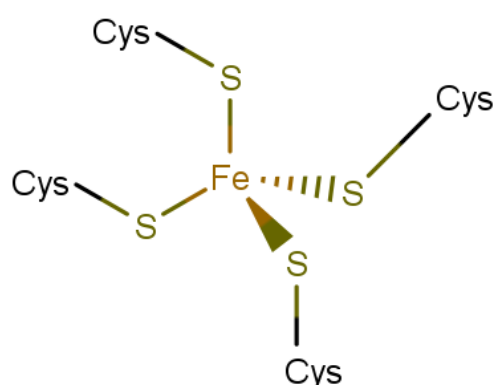
Određene su stanice, pak, kao treći oblik adaptacije na kisik i reaktivne kisikove vrste razvile zaštitne enzime superoksid dismutazu i katalazu: prvi enzim katalizira pretvorbu superoksidnih iona u molekule kisika i vodikovog peroksida, a drugi enzim katalizira pretvorbu nastalog vodikova peroksida u kisik i vodu.<sup>2</sup>

### 2.3. Najčešće strukturne vrste Fe–S klastera u proteinima

Tri su temeljne strukturne vrste Fe–S klastera, no otkriveni su i drugi, manje učestali strukturni tipovi.

#### 2.3.1. Rubredoksini

Rubredoksini su Fe–S proteini manjih molekulskih masa koji su prisutni kod raznih sumpornih bakterija. Njihova biološka funkcija, nažalost, još uvijek nije pouzdano određena, no pretpostavlja se da služe u prijenosu elektrona. Iako se klasificiraju u Fe–S proteine, postoje oblici koji ne sadrže anorganske sulfidne ione. Aktivno mjesto rubredoksina sadrži ion željeza koji je koordiniran atomima sumpora iz bočnih ogranaka cisteina, tvoreći gotovo pravilan tetraedar. Često se struktura rubredoksina označuje kao [1Fe-0S] analogno standardnoj nomenklaturi Fe–S centara, s ciljem naglaska na odsutnost anorganskih sulfida (slika 4).



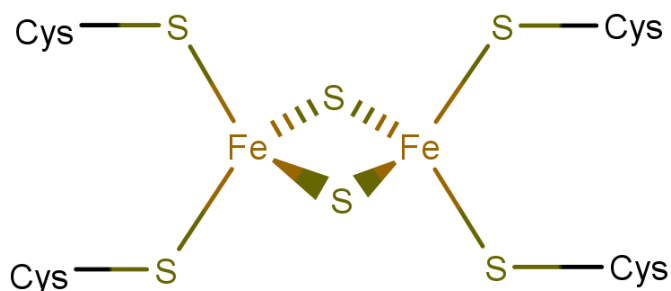
Slika 3. Struktura Fe–S klastera kod rubredoksina. Slika je nacrtana u programu *MarvinSketch* 20.17 tvrtke ChemAxon.

Rubredoksini sudjeluju u jednoelektronskim prijenosnim procesima. Središnji željezov ion prelazi iz +II u +III oksidacijsko stanje i obrnuto te u oba oksidacijska stanja zadržava visokospinsko stanje, što pomaže u umanjivanju strukturnih promjena (Franck-Condonovo pravilo). Redukcijski potencijal rubredoksina je najčešće u području od +50 do -50 mV. Lako se može razlikovati oksidacijsko stanje u kojem se nalazi željezov ion: u oksidiranom stanju vodena otopina proteina poprima crveno obojenje zbog prijenosa naboja između metala i liganda, dok je u reduciranom stanju bezbojan jer elektronski prijelaz ima energiju koja odgovara infracrvenom zračenju koje ljudsko oko ne registrira.

Iako je velika većina rubredoksina topljiva, postoje i membranski-vezani rubredoksini poput rubredoksina A kod oksigenih fotoautotrofa.<sup>10</sup>

### 2.3.2. Feredoksini

Feredoksini su Fe-S proteini koji sudjeluju u mnogim metaboličkim reakcijama kao elektronski nosači. U svome aktivnom mjestu posjeduju [2Fe-2S] klaster kojega tvore dva tetraedarski koordinirana željezova iona premoštena sulfidima (slika 4).



Slika 4. Struktura Fe-S klastera kod feredoksina.

Jedna se skupina feredoksina, koji se nalaze u membranama kloroplasta, naziva *feredoksinima biljnog* ili *kloroplastnog tipa* te oni posjeduju tipični Fe-S klaster koji je gore opisan. Oni djeluju kao nosači elektrona u fotosintetskim elektronskim prijenosnim lancima, ili kao elektron-donori u enzimima poput glutamat-sintaze te nitrit- i sulfid-reduktaze.

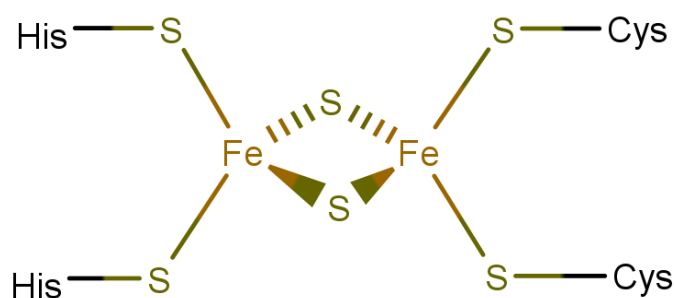
Osim feredoksina bilnog tipa, postoje još i:

- *feredoksini nalik tioredoksinima* kao primjerice [2Fe–2S] feredoksin iz vrste *Clostridium pasteurianum*, koji posjeduju jedinstvenu sposobnost izmjene dvaju cisteinskih liganada. Još uvijek nije s pouzdanošću određena njihova fiziološka uloga, no pokazalo se da stvaraju jake i specifične interakcije s Fe-Mo kofaktorima.
- *feredoksini nalik adrenodoksinima*, koji uključuju topljive [2Fe–2S] proteine koji djeluju kao jednoelektronski nosači te se najčešće nalaze kod proteobakterija te eukariotskih mitohondrija. Primjerice, adrenoredoksin mitohondrijskih monooksigenaznih sustava prenosi jedan elektron od enzima NADPH:adrenodoksin-reduktaze do membranski vezanog citokroma P<sub>450</sub>.

Još jedna važna skupina feredoksina su [4Fe–4S] te [3Fe–4S] feredoksini. [4Fe–4S] su posebno zanimljivi jer se dijele na feredoksine visokog redukcijskog potencijala (sadrže željezove ione koji posjeduju oksidacijske brojeve [u omjeru 2Fe(III): 2Fe(II)]) te feredoksine niskog redukcijskog potencijala (sadrže željezove ione koji posjeduju oksidacijske brojeve [u omjeru 1Fe(III), 3Fe(II)]). Feredoksini visokog redukcijskog potencijala posebni su po tome što sudjeluju u anaerobnim elektronskim prijenosnim lancima.<sup>11,12,13</sup>

### 2.3.3. Rieskeovi proteini

Rieskovi Fe–S proteini su komponente citokrom-bc<sub>1</sub> i citokrom-b<sub>6</sub>f kompleksa. Otkriveni su 1964. Njihov je Fe–S klaster sličan onima koji se često susreću kod feredoksina, no razlikuju se po tome što se u koordinacijskoj sferi jednog od željezovih iona nalaze bočni ogranci histidina (slika 5). Kao i ostale vrste Fe–S proteina, i Rieskovi proteini sudjeluju u prijenosu elektrona u nekim biološkim sustavima. Primjer Rieskova proteina jest protein ubikinol-citokrom-c-reduktaza.<sup>14,15,16</sup>



Slika 5. Struktura Fe–S klastera kod Rieskeovih Fe–S proteina.

#### 2.3.4. Strukturna fleksibilnost i poveznica s funkcijom

Iako su necisteinske koordinacije u aktivnim mjestima Fe–S proteina relativno rijetke, one određuju svojstva poput redukcijskog potencijala te moduliraju kemijsku reaktivnost klastera.

Kristalografski se mogu odrediti strukturna odstupanja koja su uvedena od strane polipeptidnih lanaca proteina ili uslijed prenošenja elektrona. Iako bismo mogli pomisliti da su Fe–S proteini krute strukture, oni posjeduju aktivna mjesta s metalima koji su asocirani s doista fleksibilnim polipeptidnim lancima. Dok esencijalne funkcije Fe–S proteina, a osobito prijenos elektrona, preferiraju umanjenu strukturnu fleksibilnost (kao kod feredoksina), druge funkcije zahtijevaju fleksibilnost polipeptidnih lanaca i metalnih klastera.<sup>18</sup>

#### 2.3.5. Ostali strukturni tipovi

Otkriveni su proteini koji sadrže velike metalne klasterne koji se ubrajaju u Fe–S komplekse, no posjeduju još i dodatne ione poput molibdenovih i vanadijevih iona, a postoje i kompleksi koji su *de facto* superpozicija dva jednostavnija strukturna tipa, poput P-klastera kod nitrogenaze. Drugi su strukturni tipovi izvedeni iz jednog [4Fe–4S] klastera u kojemu se dodatno nalazi metalni ion poput niklovog.

Kod većine takvih proteina s velikim metaloklasterima opaženi su i netipični proteinski ligandi poput bočnog ogranka serina (koji rijetko koordinira metalne ione u proteinima) te drugi neproteinski ligandi, kao što su homocitrat, ditioli, karboksilati te ugljikov monoksid i cijanid.<sup>18</sup>

## 2.4. Funkcija Fe–S proteina

### 2.4.1. Prijenos elektrona

Kao nositelji elektrona, Fe–S proteini djeluju u respiracijskom lancu u mitohondrijima, čija je funkcija pogon sinteze ATP-a koji je izvor energije u stanicama. Ukupno je opaženo 14 različitih Fe–S klastera u cjelokupnom respiracijskom lancu. Primjerice, NADH-dehidrogenaza sisavaca, jedan od enzima u respiracijskom lancu, sadrži osam do devet Fe–S klastera te je ujedno i najveći poznati protein s više Fe–S klastera.

Zanimljivo je proučavati redukcijske potencijale Fe–S proteina. Ukupni je raspon vrijednosti potencijala vrlo širok te na njega utječe više čimbenika:

- strukturne osobitosti pojedinih proteina,
- ligandi koji su koordinirani na željezove ione,
- polarnost medija,
- prisutnost susjednih naboja.

Raznim je pokusima pokazano da varijacije svakog od navedenih parametara mogu dovesti do promjena u potencijalu za više od 50 mV. Primjerice, kod Rieskeovih proteina, prisutnost dvaju histidinskih liganada na istom željezovom ionu povećavaju njegov redukcijski potencijal u dovoljnoj mjeri da je mu je omogućeno reducirati se pri višim potencijalima, za razliku od željezovih iona koji su koordinirani samo bočnim ograncima cisteina.

Novija se istraživanja bave proučavanjem i razvojem algoritama za izračunavanje redukcijskih potencijala Fe–S klastera iz raspodjela naboja i dipola u njihovoj blizini.<sup>19</sup>

### 2.4.2. Ostale funkcije Fe–S proteina

Mnogo je drugih funkcija Fe–S proteina, od kojih neke nisu nužno redoks-prirode. Ovdje je iznesen kratki pregled nekih od tih funkcija:

- *senzorne i regulatorne funkcije.* Kao što je u ranijim poglavljima rečeno, Fe–S proteini su osjetljivi na kisik i druge reaktivne vrste za čiji je nastanak potrebno željezo te stoga mogu služiti kao prirodni senzori za kisik te kao regulatorna sredstva.
- *aktivna mjesta enzima.* Najbolji primjer ove funkcije gdje jedan od željezovih iona u klasteru djeluje kao aktivno mjesto, jest akonitaza. Kod ovoga su enzima samo tri cisteinska liganda u okruženju klastera pa neokruženi željezov ion može proširiti svoju koordinaciju iz tetra- u heksa-koordiniranu i vezati supstrate, citrat ili izocitrat. Stoga, akonitaza može služiti kao Lewisova kiselina u dehidraciji supstrata u *cis*-akonitat te rehidraciji u alternativni supstrat s inverzijom položaja vodikovih i hidroksidnih supstituenata. Slične su promjene u koordinaciji jednog od željezovih iona opažene u reakcijama drugih enzima koji poput akonitaze također sadrže 4Fe-klaster sa samo tri cisteinska liganda.
- *redukcija disulfidnih veza* odvija se enzimskim putevima, kao kod primjerice biljne tioredoksin-reduktaze. Za vrijeme reakcije dolazi do širenja koordinacijske sfere jednog od željezovih iona na način da cijeli klaster poprima oblik  $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{3+}$ , što je potvrđeno EPR-om. Također, atomi sumpora ili cisteinski ligandi mogu djelovati kao nukleofili koji napadaju disulfidne veze.
- *inicijacija lančanih reakcija radikala.* Postoji velik broj enzima koji koriste kemiju slobodnih radikala uz potporu adenozilmetionina u svrhu izvršavanja supstitucijskih reakcija na neaktiviranim atomima ugljika. Kod tih enzima klaster oblika  $[4\text{Fe}-4\text{S}]^+$  sa samo tri cisteinska liganda cijepa adenozilmetionin prenoseći jedan elektron te generirajući adenozilni radikal koji potom može inicirati radikalski lančani mehanizam.
- *ostvarenje redukcijske moći.* Kod nekih enzima, reducirani 4Fe-klaster u sprezi s hidrolizom MgATP-a služi za postizanje redukcijskih reakcija nad supstratima



za koje su redukcijski potencijali iznosa oko 1 V, što je, primjerice, potrebno za redukciju aromatskih spojeva ili molekuskog dušika. Kod tih enzima, 4Fe-klaster nastaje između dvaju proteinskih podjedinica koje sadrže po dva cisteinska liganda koje doprinose klasteru. U takvom se strukturnom rasporedu konformacijska energija može izvesti iz vezanja i hidrolize MgATP-a te se dobivena energija potom može učiniti dostupnom za redukciju određenog supstrata.

- *stabilizacija struktura* kod nekih enzima odvija se preko mreže liganada koji okružuju Fe–S klaster.<sup>19</sup>

## 2.5. Karakteristični Fe–S proteini u živim sustavima

Do sada je kod gotovo svih živućih organizama otkriven veliki broj različitih Fe–S proteina, s različitim strukturama Fe–S centara te različitim funkcijama i metaboličkim putevima u koje su uključeni. Kroz sljedećih nekoliko podnaslova posvetit ćemo pažnju nekima od najvažnijih Fe–S proteina s ciljem da bolje osvijestimo njihovu strukturnu, funkcionalnu i biološku raznolikost i važnost.

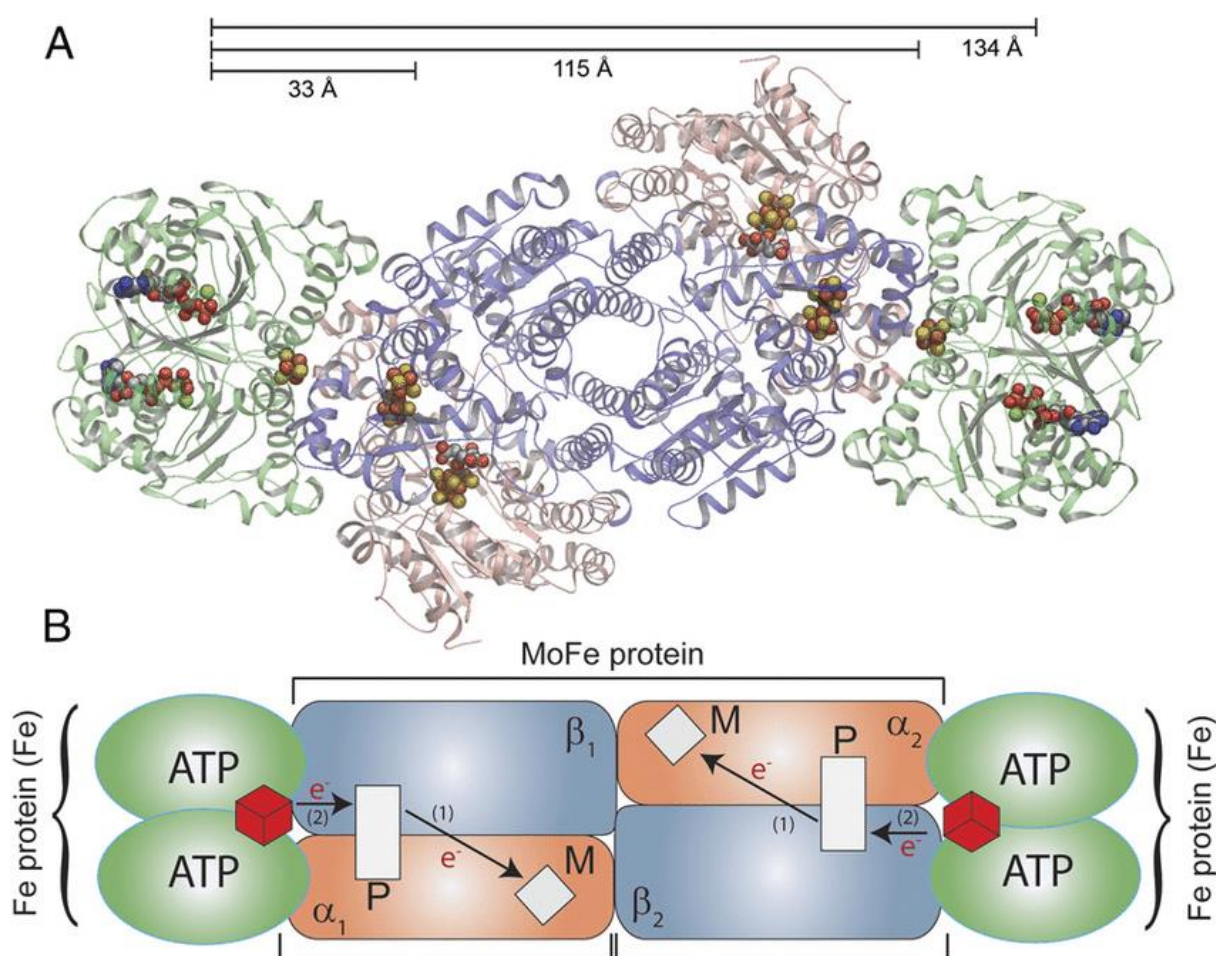
### 2.5.1. Kompleks nitrogenaze

Dušik je bitan biogeni element te ulazi u biosintezu aminokiselina, a time i proteina u obliku amonijaka ili amonijeva kationa, a također kod nekih organizama, u obliku nitratnog aniona služi kao konačni akceptor elektrona u respiracijskom lancu, umjesto kisika. U površinskim slojevima zemlje žive mnogi bakterijski organizmi koji mogu fiksirati dušik iz atmosfere te ga prevesti u amonijak, nitrite ili nitrate, koje potom biljke preuzimaju i koriste za sintezu vlastitih proteina.

Kovalentna veza između atoma dušika u molekuli dušika posjeduje vrlo visoku energiju disocijacije ( $930 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Iz toga razloga, fiksacija dušika ima vrlo veliku energiju aktivacije te je atmosferski dušik gotovo kemijski inertan pri uobičajenim atmosferskim uvjetima.

Amonijak se inače industrijski pripravlja iz vodika i dušika Haber-Boschovim procesom koji uključuje temperature od 400 do 500 °C te tlakove od nekoliko stotina bara, kao i prisustvo katalizatora.

Biološka fiksacija dušika, s druge strane, mora se zbivati pri biološkim temperaturama i parcijalnom tlaku dušika od oko 0,8 bara pa stoga valja energijsku barijeru prevladati na drugi način. U jednom od najsloženijih enzima uopće, nitrogenazi, taj je proces potpomognut vezanjem i hidrolizom molekula ATP-a.



Slika 6. A) Trodimenzijski i B) jednostavniji grafički prikaz strukture nitrogenaze.<sup>9</sup>

Nitrogenazni kompleks je vrlo očuvan od vrste do vrste te njegove su glavne podjedinice enzimi dinitrogenaza reduktaza i dinitrogenaza (slika 6). Dinitrogenaza reduktaza jest

homodimerni enzim koji sadrži jedan [4Fe–4S] redoks-centar između dvaju podjedinica, koji se može oksidirati ili reducirati jednim elektronom. Nadalje, ova podjedinica kompleksa sadrži i vezna mjesta za ATP i ADP.

Dinitrogenaza jest heterotetramer koji sadrži dva važna kofaktora koji sadrže željezove ione i služe u prijenosu elektrona. Prvi kofaktor, P-klaster, sadrži par od dva [4Fe–4S] centra koji dijele jedan atom sumpora pa stoga efektivno grade jedan [8Fe–7S] centar (dvije kocke spojene zajedničkim vrhom). Drugi kofaktor jest FeMo kofaktor koji se sastoji od sedam željezovih iona, devet sulfidnih iona, bočnog ogranka cisteina i jednog atoma ugljika u samom središtu Fe–S klastera, a također uključuje i molibdenov ion.

Fiksacija dušika koristi visoko reducirani oblik dinitrogenaze i zahtijeva osam elektrona: šest za redukciju dušika i dva za nastanak jedne molekule vodika. Navedeni proces opisuje sljedeća jednažba (Pi je fosfat):



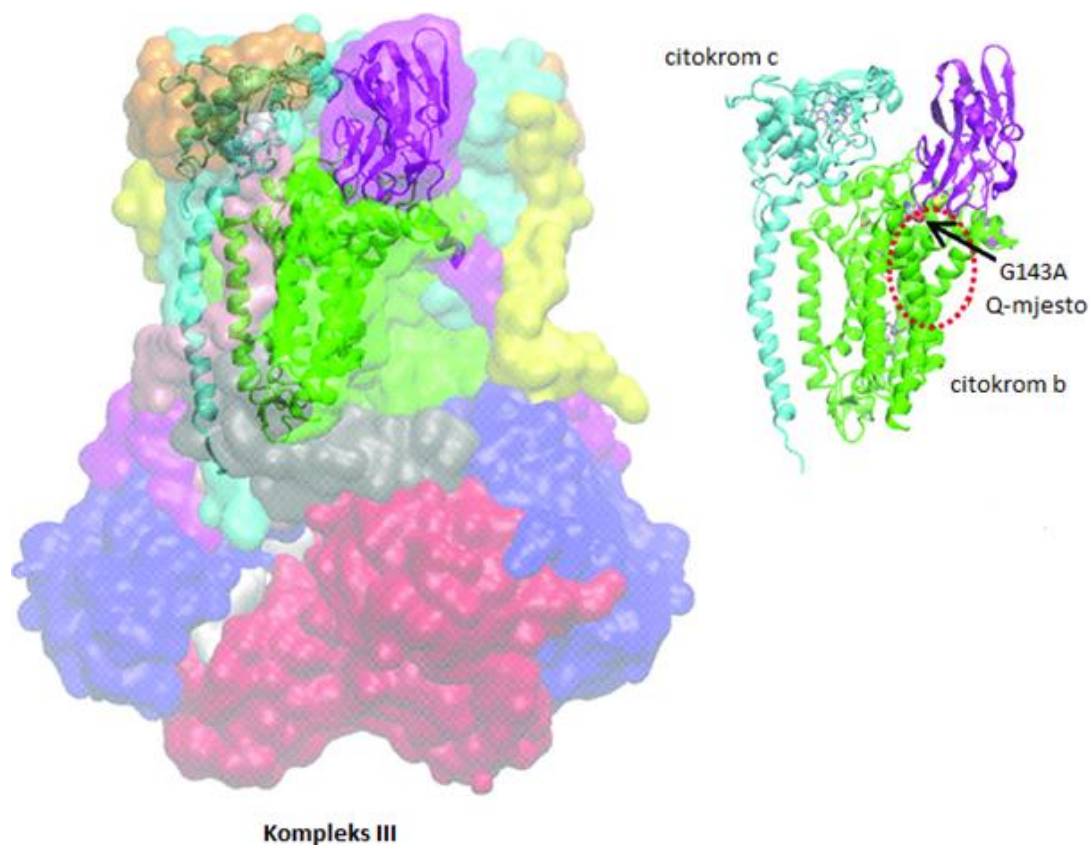
Elektroni prelaze jedan po jedan s reduktaze na dinitrogenazu, čime se ona reducira. Dinitrogenazni tetramer posjeduje dva vezna mjesta za reduktazu te nakon predaje elektrona oksidirana reduktaza disocira s dinitrogenaze i ponovno se reducira, tvoreći time ponavljajući ciklus predaje elektrona. Svaki ciklus zahtijeva hidrolizu dvije molekule ATP-a koju katalizira reduktaza, a kao izvor elektrona za reduktazu služi reducirani feredoksin ili flavodoksin.

ATP je iznimno važan za proces vezanja dušika i redukciju u amonijev kation ne samo zato što svojom hidrolizom osigurava energiju za proces, već dodatno omogućuje napredovanje procesa jer svojim vezanjem za reduktazu smanjuje njezin redukcijski potencijal s  $-300$  na  $-420$  mV, što pojačava njezinu redukcijsku moć te također dovodi do konformacijske promjene samog kompleksa koja priližava [4Fe–4S] centar reduktaze i P-klaster dinitrogenaze, što olakšava prijenos elektrona između tih dviju podjedinica.<sup>22</sup>

### 2.5.2. Ubikinol-citokrom-c-reduktaza

Ubikinol-citokrom-c-reduktaza jest protein koji je još poznat i kao kompleks III ili kompleks  $bc_1$  te je uključen u bakterijske i mitohondrijske sustave za oksidativnu fosforilaciju. Naime, ovaj protein katalizira redoks reakciju koja uključuje ubikinol i citokrom c te njome se doprinosi elektrokemijskom transmembranskom potencijalu koji je ključan za sintezu ATP-a.

Kompleks se sastoji od tri podjedinice (kod većine bakterija) ili od devet podjedinica (kod mitohondrija, slika 7). Obje vrste kompleksa posjeduju podjedinice s citokromima  $c_1$  i b te Rieskeovu podjedinicu koja sadrži  $[2Fe-2S]$  klaster.

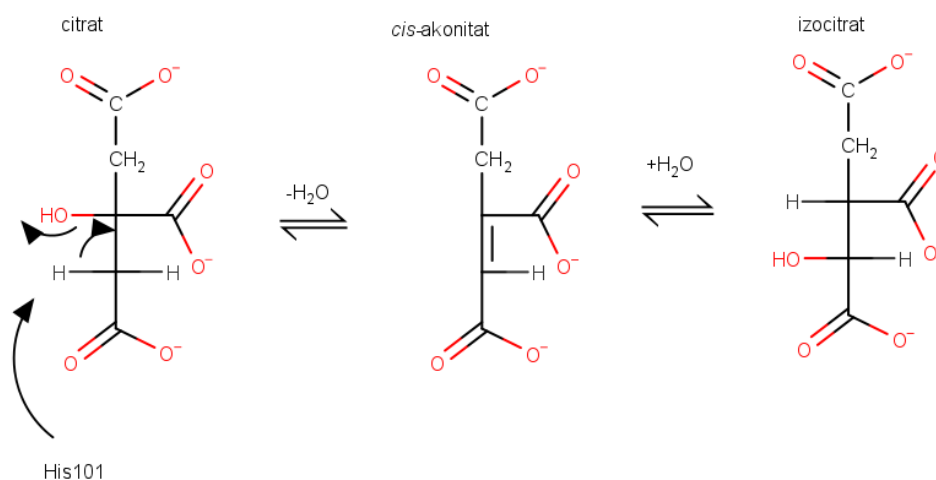


Slika 7. Struktura kompleksa III iz mitohondrija gljive *Zymoseptoria tritici*.<sup>29</sup>

Mitohondrijski tip također sadrži i šest podjedinica koje ne posjeduju redoks-centre. Rieskova podjedinica djeluje tako što veže ili ubikinolni ili plastokinolni anion te potom prenosi jedan elektron na  $[2Fe-2S]$  centar, nakon čega se vezani elektron otpušta i predaje željezovu ionu u hemu citokroma c ili f.<sup>22</sup>

## 2.5.3. Akonitaza

Akonitaza (akonitat-hidrataza) jest enzim koji je uključen u ciklus limunske kiseline te katalizira izomerizaciju citrata u izocitrat preko međuprodukta *cis*-akonitata (slika 8):



Slika 8. Mehanizam pretvorbe citrata u izocitrat.

Sam enzim posjeduje [4Fe-4S] klaster čija je osnovna funkcija pozicioniranje supstrata, odnosno citrata te olakšavanje vezanja molekule vode na molekulu supstrata na novoj poziciji. Nadalje, enzim se sastoji od četiri domene, od kojih su tri krute, a jedna je fleksibilna (slika 9).

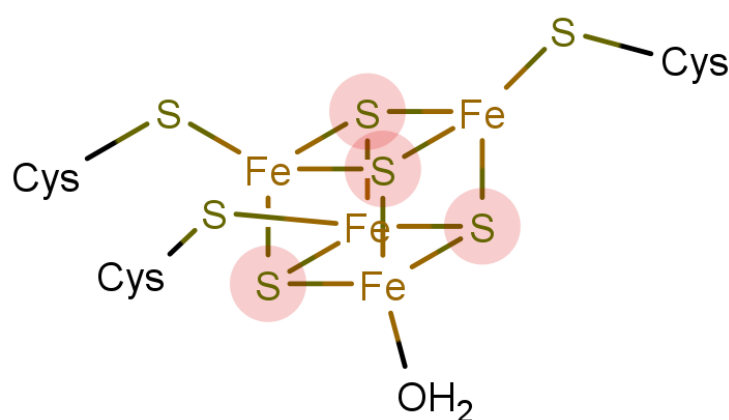


Slika 9. Trodimenzijska struktura akonitaze.<sup>28</sup>

Enzim dolazi u dvije različite strukturne forme, ovisno o tome je li aktiviran. U inaktivnoj formi prepoznaju se četiri domene, od kojih su prve tri uključene u interakcije s

[3Fe-4S] klasterom koji je karakteristika inaktivne forme enzima. Aktivacijom enzima klaster prima dodatni željezov ion (često se u literaturi naziva *labilni željezov ion*) te postaje klaster oblika [4Fe-4S] te se nalazi na samom aktivnom mjestu enzima. Ostatak proteinske strukture aktivacijom enzima ostaje uglavnom nepromijenjen, osim blagih strukturnih varijacija koje ne prelaze pomake od 0,1 Å.

Fe-S klaster aktivne forme enzima koordiniran je s tri cisteinska bočna ogranka, no labilni atom željeza nije koordiniran cisteinskim ligandima, već molekulama vode koje se adiraju na dehidratirani reakcijski međuprodukt (slika 10).



Slika 10: Struktura Fe-S klastera kod akonitaze. Anorganski sulfidni ioni označeni su ružičasto.

Kao što je ranije rečeno, akonitaza je primjer Fe-S proteina u kojemu Fe-S klaster ne djeluje kao nosač elektrona, već izravno dolazi u kontakt sa supstratom te ga smješta u aktivnom mjestu enzima. Poput drugih Fe-S proteina, i akonitaza je podložna inaktivaciji uslijed oksidacije superoksidom ili drugim reaktivnim kisikovim vrstama u stanju oksidativnog stresa stanice. No, otkriveno je i da negativan učinak na aktivnost akonitaze posjeduju i drugi reagensi poput fluoroacetata, što se i povezuje s njegovom toksičnošću.<sup>22-27</sup>

### §3. LITERATURNI IZVORI

1. R. Lill, U. Muehlenhoff, *Trends Biochem. Sci.* **30** (2005) 133–141.
2. T. A. Roualt, *Iron-sulfur clusters in chemistry and biology*, DeGruyter, 2014, str. 1–8, 36–46.
3. G. Wächtershäuser, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **52** (1988) 452–484.
4. G. Wächtershäuser, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **58** (1992) 85–201.
5. G. Wächtershäuser, *Science* **289** (2000) 1307–1308.
6. H. Beinert, R. H. Sands, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **3** (1960) 41–46.
7. H. Beinert, W. Lee, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **5** (1961) 40–45.
8. V. P. Rao, R. H. Holm, *Chem. Rev.* **104** (2004) 527–559.
9. S. Shaw, S. Duval, K. Danyal, T. R. Page, M. Horitani, A. R. Marts, D. Lukoyanov, D. R. Dean, S. Raugei, B. M. Hoffmann, L. C. Seefeldt, E. Antony, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113** (2016) 5783–5791.
10. K. Rose, S. E. Shadle, M. K. Eidsness, D. M. Kurtz, R. A. Scott, B. Hedman, K. O. Hodgson, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **120** (1998) 10743–10747.
11. K. Tagawa, D. I. Arnon, *Nature* **195** (1962) 537–543.
12. J. Armengaud, G. Sainz, Y. Jouanneau, L.C. Sieker, *Acta Crystallogr.* **57** (2001) 301–303.
13. D. Beilke, R. Weiss, F. Löhr, P. Pristovsek, F. Hannemann, R. Bernhardt, H. Rüterjans, *Biochemistry* **41** (2002) 7969–7978.
14. J.S. Rieske, D. H. MacLennan, R. Coleman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **15** (1964) 338–344.
15. A. G. Sykes, u R. Cammack (ur.), *Advances in Inorganic Chemistry*, Vol. 47, Elsevier Academic Press, San Diego, 1999, str. 10–81, 92–211
16. U. Harnisch, H. Weiss, W. Sebald, *Eur. J. Biochem.* **149** (1985) 95–99.
17. E. N. Brown, R. Friemann, A. Karlsson, J. V. Parales, M. M. Couture, L. D. Eltis, S. Ramaswamy, *J. Biol. Inorg. Chem.* **13** (2008) 1301–1313

18. J. Cizek, u P. C. Hariharan (ur.), *Advances in Chemical Physics*, Vol. 14, Wiley-Interscience, New York, 1969, str. 92-211, 3510–3581.
19. H. Beinert, P. J. Kiley, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3** (1999) 152–157.
20. S. J. Lippard, J. M. Berg “*Principles of Bioinorganic Chemistry*” University Science Books, Mill Valley, CA, 1994., str. 115–125., 231–244
21. D. Johnson, D. R. Dean, A. D. Smith, M. K. Johnson, *Annu. Rev. Biochem.* **74** (2005) 247–281.
22. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 6<sup>th</sup> Edition, W.H. Freeman and Company, New York, 2013., str. 882–887.
23. <https://www.rcsb.org/structure/3CX5> (datum pristupa 22.5.2020.).
24. A.H. Robbins, C.D. Stout, *Proteins* **5** (1989) 289–312.
25. A.H. Robbins, C.D. Stout, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86** (1989) 3639–3643.
26. H. Lauble, M.C. Kennedy, H. Beinert, C. D. Stout, *Biochemistry.* **31** (1992) 2735–2748.
27. P. R. Gardner, *Methods Enzymol.* **349** (2002) 9–23.
28. H. Lauble, M. C. Kennedy, H. Beinert, C. D. Stout, *J. Mol. Biol.* **237** (1994) 437–451.
29. A. Arakawa, Y. Kasai, K. Yamazaki, F. Iwahashi, *PLoS One* **13** (2018) 1-3.