



SEMINARSKI RAD

TEMA: Interakcije kompleksa prelaznih metala sa proteinskim biomolekulima

Mentor: Doc. dr Milica Kosović-Perutović

Student: Vukotić Jelena 5/24

Podgorica, decembar 2024. god

SADRŽAJ

1. Uvod.....	3
2. Uloga metaloproteina i metaloenzima u biološkim procesima.....	4-5
3. Reakcije disocijacije i asocijacije.....	5-6
4. Redoks reakcije.....	6-7
5. Reakcije sa specifičnim ligandom.....	7
6. Metalni toksični kompleksi.....	8
7. Interakcije sa ligandom.....	9
8. Stabilnost kompleksa i selektivnost prema proteinima.....	10
8.1. Termodinamička stabilnost.....	10-11
8.2. Veza između termodinamičke i kinetičke stabilnosti.....	11
8.3. Veličina centralnog metalnog katjona.....	11-12
8.4. Tip koordinacije.....	12
9. Eksperimentalne metode za proučavanje interakcije.....	12-13
9.1. MS.....	13-14
9.2. Rendgenska kristalografija i rentgensko raspršenje.....	14
9.3. Rendgenska apsorpciona spektroskopija.....	14-15
9.4. Kalorimetrijske metode.....	15
9.5. SPR.....	16
10. Primjeri značajnih metaloproteina.....	17
11. Plavi bakarni proteini.....	17
12. Mioglobin i hemoglobin.....	18
13. Generisani organski radikali.....	19
14. Literatura.....	20-21

1. Uvod

Interakcija kompleksa prelaznih metala sa proteinskim biomolekulima predstavlja jednu od ključnih oblasti istraživanja biohemije i bioneorganske hemije. Kompleksi imaju značajnu ulogu u biološkim procesima, jer prelazni metali, poput gvožđa, cinka, bakra imaju jedinstvena hemijska svojstva koja omogućavaju stvaranje stabilnih koordinacionih jedinjenja sa proteinima.

Njihov značaj se ogleda u raznim biološkim funkcijama, uključujući katalizu enzima, transport kiseonika, regulaciju redoks ravnoteže i signalizaciju unutar ćelija. Na primjer, hemoglobin i mioglobin sadrže gvožđe, koje omogućava vezivanje i transport kiseonika, dok enzimi poput superoksid dismutaze koriste bakar i cink za neutralisanje slobodnih radikala.

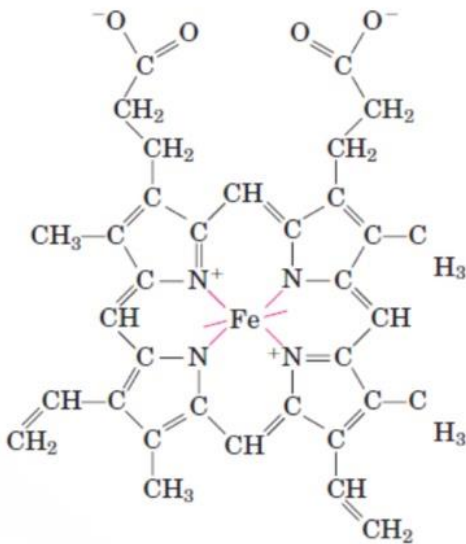
Vezivanje prelaznih metala za proteinske biomolekule obično uključuje koordinacione veze između metalnog centra i funkcionalnih grupa proteina, kao što su imidazolne grupe histidina, tiolne grupe cisteina ili karboksilne grupe aspartata i glutamata. Priroda ovih interakcija zavisi od vrste metala, liganda i strukture proteina, što utiče na stabilnost kompleksa i njegovu biološku aktivnost.

Interakcije kompleksa prelaznih metala sa proteinskim biomolekulima se proučavaju uz pomoć neke od sljedećih metoda: UV-VIS spektroskopija, fluorescentna spektroskopija, NMR spektroskopija, masena spektrometrija (MS), kružna dichroizam spektroskopija (CD), X-raz kristalografija, izotermalna titraciona kalorimetrija, elektrohemijske metode poput ciklične voltametrije, FTIR.

Ova tema je od posebnog značaja za medicinu jer mnogi lijekovi funkcionišu zahvaljujući sposobnosti prelaznih metala da interaguju sa biomolekulima, pri čemu se koristi njihova reaktivnost u borbi protiv bolesti. Razumjevanje ovih interakcija omogućava razvoj novih terapijskih sredstava i biomaterijala.

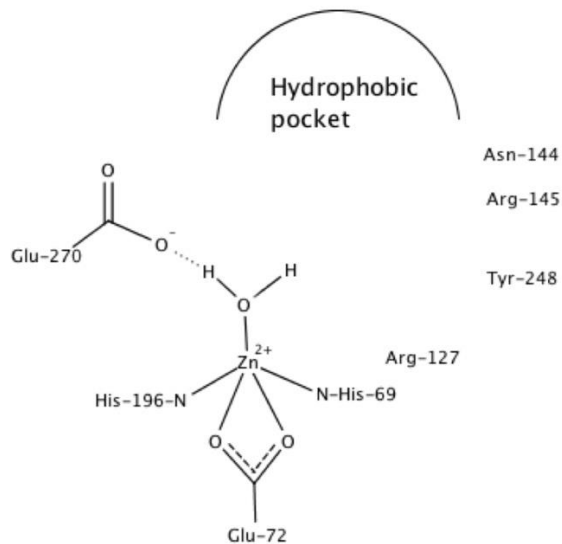
2. Uloga metaloproteina i metaloenzima u biološkim procesima

Protein koji sadrži jedan ili više jonskih metala čvrsto vezanih za bočne lance amino-kiselina naziva se metaloprotein. Metaloprotein koji katalizuje hemijsku reakciju naziva se metaloenzim. Dakle, svi metaloenzimi su metaloproteini, ali obrnuto ne važi. Nedavne procjene sugerišu da više od 40% svih poznatih enzima zahtjeva bar jedan metalni jon za svoju aktivnost, uključujući skoro sve enzime odgovorne za sintezu, duplikaciju i popravku DNK (dezoksiribonukleinske kiseline) i RNK (ribonukleinske kiseline).[1]



Slika 1. Struktura hema vezana sa jonom gvožđa [2]

Na primjer u hemoglobinu i mioglobinu (slika 1.), gvožđe je koordinovano sa četiri atoma azota iz porfirinskog prstena, a dodatno se veže za kiseonik. U metaloenzimima poput alkalnih fosfataza ili karboksipeptidaza A (slika 2.), metalni jon (kao što je cink ili mangan) igra ključnu ulogu u aktivaciji supstrata i stabilizaciji prelaznog stanja reakcije. [1]



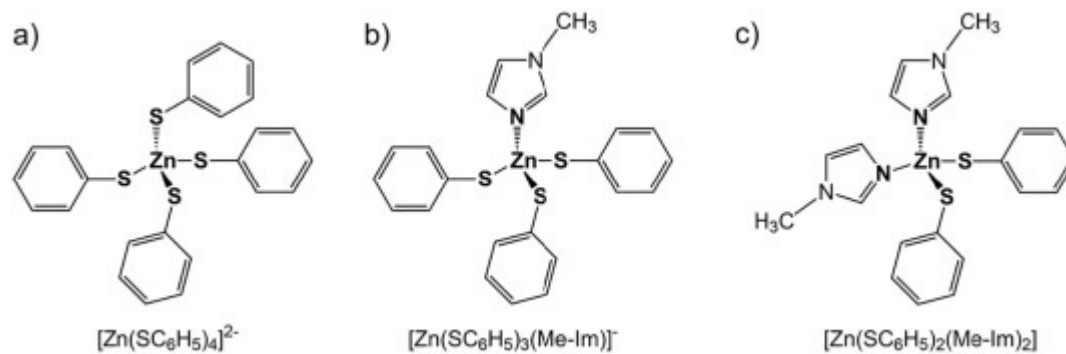
Slika 2. Struktura kaboksipeptidaze A [3]

3. Reakcije disocijacije i asocijacije

U mnogim biološkim procesima, metalni joni se mogu osloboditi iz koordinacionog kompleksa ili se vezati za slobodne metalne jone, što ima značajan uticaj na funkciju proteina. [1]

Disocijacija može biti izazvana promjenama u koncentraciji metalnih jona u okolini (npr. smanjenje koncentracije Cu²⁺ ili Zn²⁺ može dovesti do gubitka metalnog jona iz enzima).

Asocijacija može biti regulisana različitim signalima unutar ćelije, kao što su promjene u pH, promjena u koncentraciji drugih jona ili interakcija sa drugim biomolekulama.



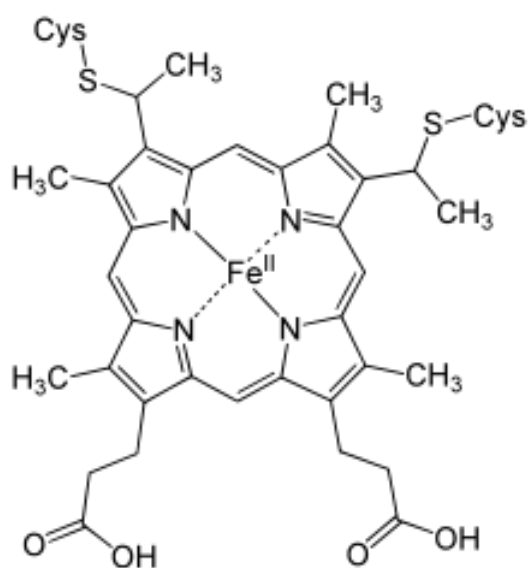
Slika 3. Kompleksi sa cinkom kao centralnim atomom [4]

Zinc fingers (*cinkovi prsti*) su mali proteinski molekuli koji koriste atom cinka (Zn) kao strukturni element da bi stabilizovali svoju trodimenzionalnu strukturu. Njihova glavna uloga je vezivanje za DNK, RNK ili druge proteine i često se nalaze u transkripcionim faktorima. U ovom slučaju, jon cinka se kordinuje sa bočnim lancima cisteina i histidina u proteinu, stabilizujući njegovu strukturu i omogućavajući interakciju sa DNK. Na slici 3 prikazano kompleksno jedinjenje označeno a) naziva se tetrakis- feniltiolat -cinkat -(II) -jon, oznakom b) prikazano jedinjenje je tris-feniltiolat-metilimidazol-cinkat(I)- jon, a sa c) označeno jedinjenje je bis-feniltiolat-bis-metilimidazol-cink-(II). [4]

Atom cinka je koordinovan sa specifičnim aminokiselinama, obično cisteinima (Cys) i/ili histidinima (His). Najpoznatija uloga je interakcija sa specifičnim sekvencama DNK, gdje alfa-heliks ulazi u glavni žlijeb DNK i ostvaruje kontakt sa bazama. Neki cinkovi prsti se vežu za RNK molekule, stabilizujući njihove sekundarne strukture. Cinkovi prsti mogu služiti i kao platforme za interakciju sa drugim proteinima. [5]

4. Redoks reakcije (oksidacija-redukcija)

Prelazni metali često učestvuju u redoks reakcijama gdje se njihova oksidaciona stanja mijenjaju, što je ključno za katalizu i signalizaciju. Oksidacija i redukcija mogu izazvati promjene u strukturi proteina ili aktivnostima enzima. [1]

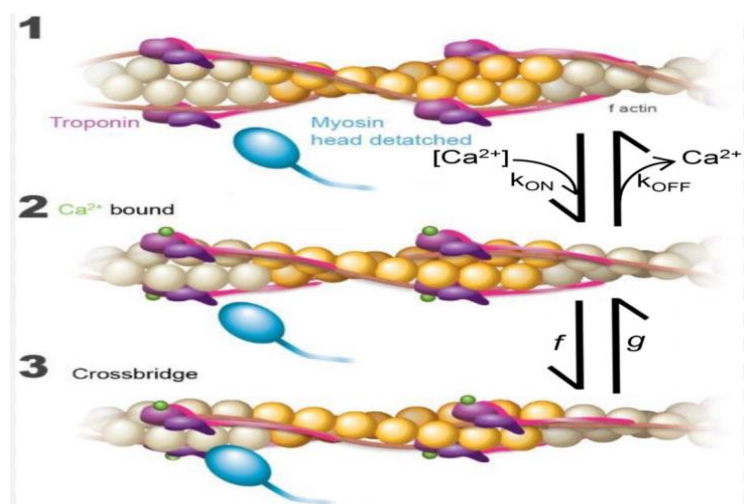


Slika 4. Citohrom oksidaza c [5]

Enzim citohrom c oksidaza, koji sadrži gvožđe ili bakar kao centralni atom, koristi redoks reakcije za transport elektrona u ćelijskom disanju (slika 3). U ovom procesu, metalni joni mijenjaju svoje oksidaciono stanje, omogućavajući prenos elektrona i proizvodnju energije. [1] Citohromi su jednoelektronski prenosioci, gvožđe prelazi iz +3 u +2, a bakar iz +2 u +1 stanje. Uobičajeno je svih 6 koordinativnih veza Fe popunjeno, te se O₂ ne može direktno vezati za njih. Izuzetak je citohrom oksidaza, jedini član respiratornog lanca koji može da reaguje sa kiseonikom, za koji ima veoma veliki afinitet; reakcija prenosa redukcionih ekvivalenata na kiseonik je jedina nepovratna reakcija u lancu. Ove dvije osobine omogućavaju neprekidni jednosmjerni prenos elektrona, čak i kada je parcijalni pritisak kiseonika mali. [5]

5. Reakcije sa specifičnim ligandom (prenos metala)

U nekim slučajevima, metalni jon u kompleksu može da interaguje sa specifičnim biomolekulima ili ligandom. Ove interakcije mogu biti kratkoročne i regulisane zavisno od potrebe ćelije.

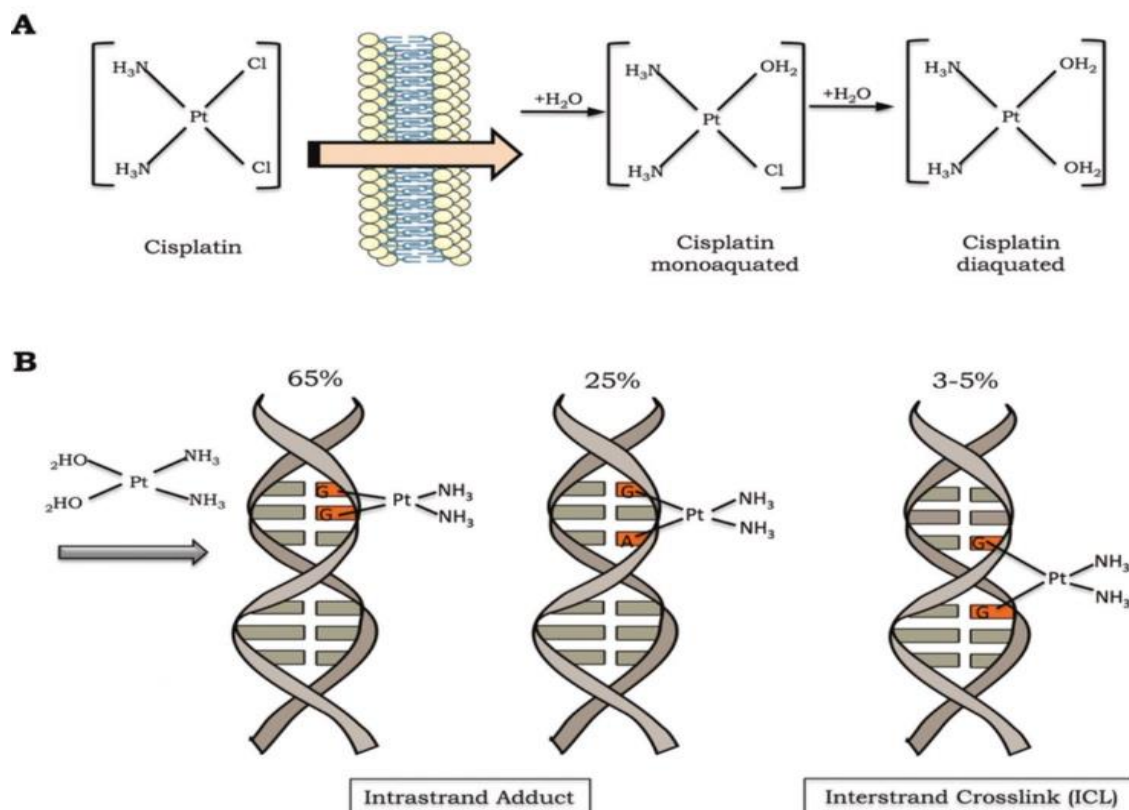


Slika 5. Kompleksno jedinjenje kalcijuma i troponina [5]

Kalcijum je ključni signalni metal koji utiče na mnoge biološke procese. Kalcijumovi kompleksi sa različitim proteinima (kao što su kalmodulin ili troponin) omogućavaju signalizaciju unutar ćelije, kao što je kontrakcija mišića ili neurotransmisija. Na slici 5 je prikazan proces vezivanja miozina za aktin u prisustvu kalcijuma (Ca²⁺), što je ključni korak u mišićnoj kontrakciji. Proces prikazan na slici opisuje kako se aktinski i miozinski filamenti međusobno interaguju tokom kontrakcije mišića, uključujući uloge kalcijuma i troponina. [1]

6. Metalni toksični kompleksi

Osim što su metalni kompleksi esencijalni za normalnu funkciju proteina mogu biti i toksični u određenim koncentracijama. Prelazni metali poput žive (Hg^{2+}), kadmijuma (Cd^{2+}) i bakra (Cu^{2+}) mogu formirati štetne komplekse sa proteinima, što može dovesti do oksidativnog stresa, oštećenja proteina, pa čak i apoptoze (programirane ćelijske smrti). [1]

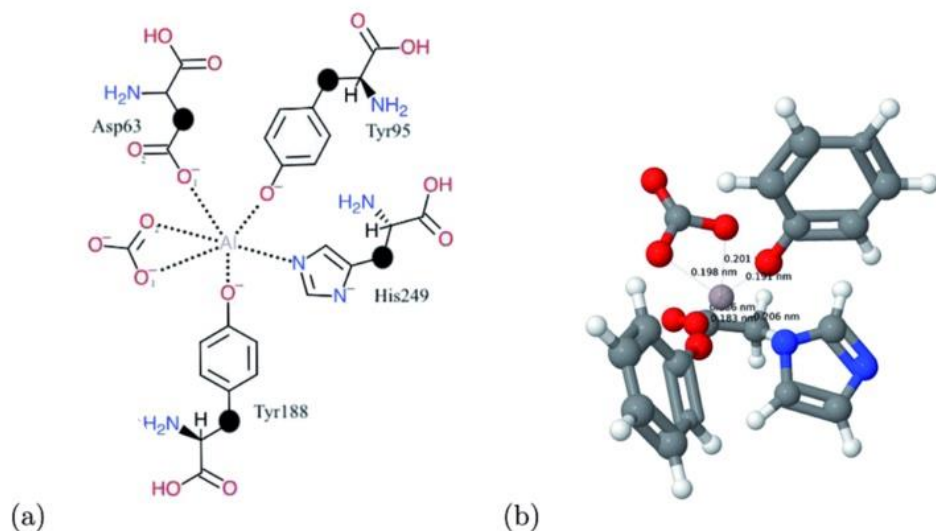


Slika 6. Cisplatina [7]

Cisplatina-metalni kompleks sa platinom, koristi se kao lijek u terapiji raka, ali može izazvati toksične efekte vezujući se za DNK u ćelijama i izazivajući njihovo oštećenje. Cisplatin ($[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$) je kompleks platine sa dva hloridna liganda. Kada uđe u ćeliju, hloridni ligandi se zamjenjuju molekulima vode (hidracija), što stvara reaktivne oblike cisplatina (mono- i diaquated cisplatin) (slika 6). Ovi oblici su hemijski aktivni i mogu da reaguju sa DNK. [1]

7. Interakcije sa ligandom (helacija i metalni transport)

Metalni joni u koordinacionim kompleksima mogu biti vezani za helatorske molekule u proteinu ili van njega, što omogućava transport metala ili njihovo skladištenje u specifične kompartimente ćelije. [1]



Slika7. Transferin [8]

Transferin (slika 7) je protein koji se veže za gvožđe (Fe^{3+}) u krvi i transportuje ga do ćelija koje ga koriste, kao što su ćelije koje prerađuju gvožđe u hemoglobin. [1] Gvožđe se u krvi vezuje za glikoprotein plazme transferin (Tf). Jedan molekul transferina može da veže dva molekula Fe^{3+} tako da postoje tri forme transferina: apotransferin (transferin + 0 Fe^{3+}), transferin + 1 Fe^{3+} (Tf-Fe1) i transferin + 2 Fe^{3+} (Tf-Fe2). Transferin je najpoznatiji transporter gvožđa do različitih ćelija. On održava Fe^{3+} u rastvornom obliku, sprječava eliminaciju preko bubrega i jetre. U fiziološkim uslovima oko 30% plazma transferina je zasićeno gvožđem. Kada je nivo zasićenja transferina gvožđem manji od 16% smatra se da postoji nedostatak gvožđa u organizmu, dok zasićenost iznad 45% ukazuje na preopterećenje. Kada zasićenje transferina prekorači 60%, slobodno gvožđe se akumulira u cirkulaciji i oštećuje parenhimske ćelije, posebno hepatocite, putem oksidacionih reakcija. Gvožđe u ulazi isključivo vezano za transferin putem receptor posredovane endocitoze. Ove ćelije na svojoj membrani imaju receptore za transferin (TfR) koji je vezao Fe^{3+} , ali ne i za slobodno gvožđe. [9]

8. Stabilnost kompleksa i selektivnost prema proteinima

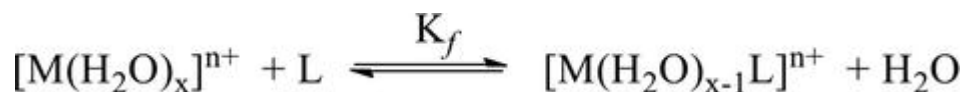
Stabilnost kompleksa prelaznih metala sa proteinima zavisi od više faktora, uključujući hemijske osobine metala, strukturu proteina, pH sredine, prisustvo drugih liganada, kao i tip interakcije između metala i proteina. [9]

8.1. Termodinamička stabilnost

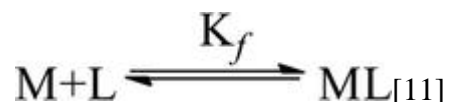
Termodinamička stabilnost kompleksa odnosi se na njegovu zavisnost od uslova ravnoteže. Ona određuje u kojoj mjeri će kompleks nastati ili se pretvoriti u drugi kompleks kada se dostigne ravnoteža. Drugim riječima, termodinamička stabilnost kompleksa mjeri sklonost metalnog jona da selektivno formira određeni metalni kompleks i direktno je povezana s energijama veza između metala i liganda. Stabilnost kompleksa obično se izražava putem konstantne formacije, poznate i kao konstanta stabilnosti, koja je ravnotežna konstanta dobijena za formiranje metalnog kompleksa. [10]

Metalni kompleksi se obično ne pripremaju iz početnih materijala u gasovitoj fazi, već u vodenim rastvorima. U vodi, metalni jon (M^{n+}) se hidratiše tako da formira vodeni (aqua) kompleks oblika: $[M(H_2O)_x]^{n+}$ (gdje je x broj molekula vode vezanih za metal, a n oksidacioni broj metala). [11]

Kada ligand (L) zamijeni molekul vode iz ovog kompleksa, nastaje novi metalni kompleks i uspostavlja se ravnoteža:



Za pojednostavljenje, reakcija se može zapisati u opštem obliku:



Konstanta ravnoteže K_f je definisana odnosom:

$$K_f = \frac{[ML]}{[M][L]}$$

Ako je $K_f > 1$ kompleks ML je stabilan, jer se ligand (L) jače vezuje za metalni jon nego voda (H_2O). L je jači ligand od H_2O .

Ako je $K_f < 1$ kompleks ML je manje stabilan, jer se ligand L slabije veže za metal od vode.

Ako metal može vezati više liganada, konstante za vezivanje svakog narednog liganda postepeno opadaju : $K_1 > K_2 > K_3 > \dots > K_n$. To znači da je vezivanje prvog liganda najsnažnije, a svakog sledećeg sve slabije, zbog smanjenja dostupnih mesta za koordinaciju i promene interakcija. [11]

8.2. Veza između termodinamičke i kinetičke stabilnosti

Za metalne komplekse, stabilnost i reaktivnost se opisuju u termodinamičkim i kinetičkim terminima. Naime, pojmovi stabilan i nestabilan odnose se na termodinamičke aspekte, dok se pojmovi labilan i inertan odnose na kinetičke aspekte. Kao pravilo, metalni kompleks se smatra labilnim ako reaguje unutar 1 minuta na $25^\circ C$, a ako reakcija traje duže, smatra se inertnim.

Termodinamička stabilnost odnosi se na promjenu energije koja se dešava kada se početni materijali pretvore u proizvode, tj. ΔG za reakciju. Promena slobodne energije data je jednačinom $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K$, gdje su ΔS entropija, ΔH entalpija, a K je konstanta ravnoteže za reakciju. Kinetička stabilnost se odnosi na reaktivnost ili sposobnost metalnog kompleksa da prolazi reakcije zamjene liganda. Kompleksi koji brzo reaguju u reakcijama zamjene liganda nazivaju se labilnim kompleksima, dok se kompleksi koji reaguju veoma sporo nazivaju inertnim kompleksima. Ponekad su termodinamička i kinetička stabilnost kompleksa paralelne, ali često nisu. [11]

8.3. Veličina centralnog metalnog katjona

Stabilnost metalnog kompleksa raste sa smanjenjem veličine metalnih katjona. Za M^{2+} jone, opšti trend u stabilnosti kompleksa je: $Ba^{2+} < Sr^{2+} < Ca^{2+} < Mg^{2+} < Mn^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} > Zn^{2+}$.

Manji joni, poput Fe^{2+} , Zn^{2+} ili Cu^{2+} formiraju stabilnije komplekse. [11]

8.4. Tip koordinacije:

Koordinacioni (oktaedarski, tetraedarski ili kvadratno-planarni) oblici utiču na stabilnost. Oktaedarski kompleksi su najstabilniji za mnoge prelazne metale, posebno kada su u pitanju manji metali poput Fe^{2+} , Co^{2+} i Ni^{2+} . Stabilnost se često povezuje s time što oktaedarski oblik omogućava optimalnu prostoriju za koordinaciju sa šest liganada, što dovodi do snažnijih interakcija. [10]

Specifičnost i selektivnost značajno utiču na stabilnost kompleksa. Primjer za to su metaloenzimi ili metaloproteini koji prirodno formiraju stabilne komplekse sa određenim metalima (npr. hemoglobin sa Fe^{2+} , karboanhidraza sa Zn^{2+}). Ovi metali su ključni za biološku funkciju proteina. [9]

Stabilnost kompleksa zavisi od **pH** jer on utiče na jonizaciju funkcionalnih grupa proteina i dostupnost metala. Kiseli uslovi podstiču oslobađanje metala usljed protonacije funkcionalnih grupa dok bazni uslovi omogućavaju jače vezivanje zbog deprotonacije ligandnih grupa.

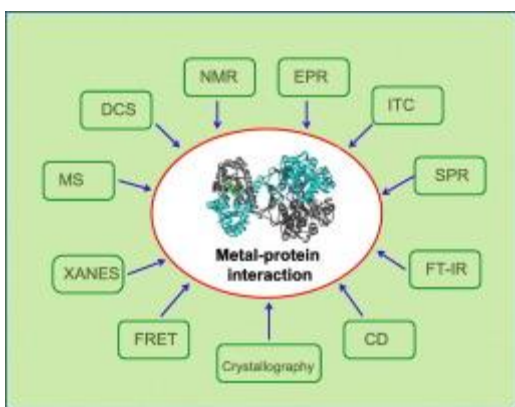
Prisustvo drugih liganada, poput EDTA ili fosfata, može destabilizovati kompleks, jer ovi ligandi imaju tendenciju da "otmu" metalne jone od proteina. [9]

9. Eksperimentalne metode za proučavanje interakcije

Konformaciona analiza

Konformaciona analiza je ključna metoda koja omogućava proučavanje molekularne strukture kompleksa metal-protein. Njena svrha je da otkrije kako vezivanje metalnog jona utiče na prostorni raspored atoma u proteinu, tj. njegovu konformaciju. Ovo je važno jer promjene u konformaciji direktno utiču na funkciju proteina, kao što su kataliza, transport, ili regulacija ćelijskih procesa.

Metalni joni (poput Zn^{2+} , Fe^{2+}/Fe^{3+} , Cu^{2+} , itd.) često imaju ulogu kofaktora u enzimima i proteinima. Kada se jon metala veže na specifične biomolekule proteina (npr. cistein, histidin ili aspartat) dolazi do formiranja koordinacionih kompleksa. Ova veza može promijeniti prostorni raspored (konformaciju) proteina na način koji utiče na njegovu funkcionalnost. Kada se jon veže, dolazi do promjene u lokalnoj strukturi proteina u blizini mjesta vezivanja. Te lokalne promjene mogu uticati na čitavu molekulsku strukturu, što može dovesti do promene u fleksibilnosti, stabilnosti, ili aktivnom mestu proteina. Konformaciona analiza pruža uvid u to kako metalni jon direktno mijenja strukturu proteina, što je ključno za razumijevanje funkcionalnih mehanizama metaloproteina. Ove promjene često predstavljaju osnovu za biološke funkcije proteina, uključujući enzime, transportne proteine i signalne molekule. [12]



Slika 6. Metode konformacije[12]

9.1. Masena spektrometrija (MS)

Ispitivanje koordinacione veze između prelaznih metala i proteina pomoću masene spektrometrije (MS) omogućava analizu interakcija metala sa proteinima na visokom nivou preciznosti. MS se koristi za identifikaciju metalnih jona koji su koordinisani sa specifičnim amino kiselinama u proteinima, što je ključno za razumjevanje njihove funkcionalnosti i uloge u biološkim procesima. [12]

Metoda se zasniva na jonizaciji proteina (ili njihovih kompleksa sa metalima) u gasnoj fazi, obično korišćenjem elektrosprejne jonizacije (ESI), što omogućava detekciju i kvantifikaciju

metal-protein kompleksa. Nakon toga, spektrometrijske analize mogu identifikovati mjesto vezivanja metala, kao i promene u masama proteina koje nastaju prilikom vezivanja ili oslobađanja metala.

Ova tehnika omogućava istraživanje strukturalnih promena u proteinima usled interakcije sa metalima, kao i određivanje specifičnih koordinacionih veza između metalnih jona i amino kiselina u proteinu. Takođe, MS može biti koristan za proučavanje dinamike tih veza, kao i za analizu stabilnosti metal-protein kompleksa pod različitim uslovima. [12]

9.2. Rendgenska spektrometrija

Povećan broj kristalnih struktura ključnih proteina u poslednjim decenijama značajno je unapredio istraživanja interakcija metala i proteina. Rendgenska kristalografija je postala osnovna tehnika za određivanje 3D struktura proteina i metaloproteina, jer omogućava visoko preciznu analizu njihove prostorne organizacije na atomskom nivou. Ova tehnika omogućava istraživačima da dobiju detaljne informacije o rasporedu atoma u molekuli proteina, uključujući mjesta vezivanja metala, što je ključno za razumjevanje funkcije i mehanizma njihovog djelovanja. [12]

Nakon što se kristali proteina formiraju, koriste se rendgenski zraci kako bi se analizirala difrakcija svjetlosti kroz kristal, čime se dobija obrazac koji se koristi za rekonstrukciju 3D strukture. Rezultati rendgenske strukturne analize mogu otkriti kako se metalni joni koordinuju sa proteinom, kao i kako metal-protein interakcije utiču na njegovu funkciju.

9.3. Rendgenska apsorpciona spektroskopija

Rendgenska apsorpciona spektroskopija koja uključuje XAFS (rendgenska apsorpciona fina struktura) pokazala se kao odlična metoda za proučavanje metaloproteina i drugih materijala koji sadrže metalne jone. Ova tehnika je naročito korisna jer omogućava analizu lokalnog okruženja metalnog jona, što je ključno za razumevanje kako metal utiče na strukturu i funkciju proteina. XAS (X-ray absorption spectroscopy) je veoma osjetljiva metoda koja može pružiti informacije o koordinaciji metala, geometriji koordinacionih veza, kao i o elektronskoj strukturi metala u kompleksima. Pri rendgenskoj apsorpciji, rendgenski zrak uzbuđuje jezgri elektroni metala, koji

zatim prelazi na viši energetski nivo ili se potpuno izbaci iz atoma. Ovaj proces generiše apsorpciono spektralno područje koje se deli na dva glavna dela: XANES (X-ray absorption near edge structure) i EXAFS (Extended X-ray absorption fine structure). [12]

XANES region daje informacije o okruženju metala, kao što su oksidacioni broj, koordinacija i geometrija vezivanja. Ovaj region je posebno koristan za analizu hemijskih stanja metala, kao i za razumjevanje veza sa ligandima u kompleksima.

EXAFS region, s druge strane, pruža podatke o dužini i vrstama veza između metala i njegovih susjednih atoma. Ovaj region daje visoku prostornu rezoluciju, do 0,1 Å, i omogućava detaljnu analizu strukture metalnih kompleksa na atomskom nivou. [12]

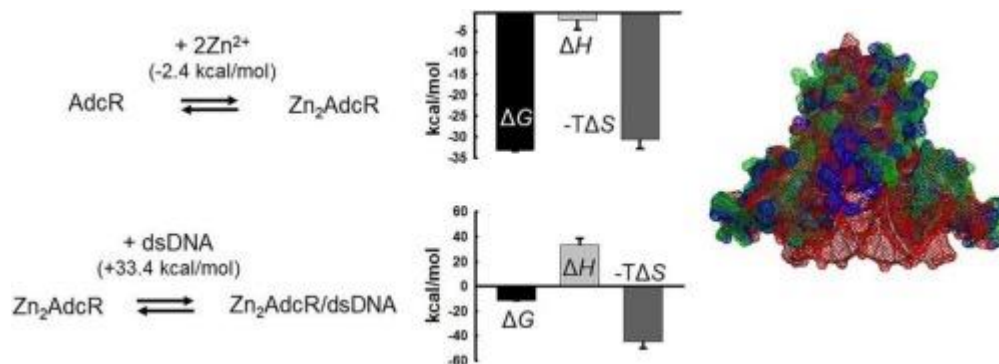
Zbog svoje visoke osjetljivosti i sposobnosti da istraži metale u različitim hemijskim okruženjima, XAS se široko koristi u istraživanjima metaloproteina, katalitičkih mehanizama, kao i u proučavanju biomolekula koje sadrže metale u industriji i medicini.

9.4. Kalorimetrijske metode

Izotermna titracijska kalorimetrija (ITC) je moćna tehnika koja se koristi za kvantitativno određivanje termodinamičkih parametara u interakcijama metala i proteina. Ova metoda omogućava direktno mjerenje promjena u entalpiji (ΔH°), entropiji (ΔS°), i Gibbsovoj slobodnoj energiji (ΔG°) tokom formiranja kompleksa između metalnog jona i proteina, što je ključno za razumjevanje mehanizma i stabilnosti tih interakcija. [12]

ITC funkcioniše tako što mjeri toplotne promjene koje nastaju kada se metalni jon postepeno dodaje u rastvor proteina. Promjene u toplini povezane su sa procesima vezivanja, što omogućava određivanje stehiometrije (n), odnosno broja molekula metala koji se vežu na jedan molekul proteina. Takođe, ITC može da izračuna konstantu asocijacije (K) i disocijacije (K_d), što je korisno za procjenu afiniteta između metala i proteina.

Ova tehnika pruža visok nivo detalja u pogledu termodinamičkih svojstava, uključujući toplotnu kapacitivnost vezivanja (ΔC_p), što može biti od značaja za razumjevanje promjena u stabilnosti kompleksa pri različitim temperaturama. ITC je izuzetno korisna jer ne zahtjeva označavanje ili druge indirektno tehnike, a omogućava mjerenje svih ključnih parametara u jednom eksperimentu, što je čini jednim od najjednostavnijih alata za proučavanje metaloproteinskih interakcija. [12]



Slika 9- kalorimetrijska analiza reakcije Zn^{2+} jona i DNK molekula [13]

9.5. SPR (Rezonancija površinskog plazmona)- surface plasmon resonance

Rezonancija površinskog plazmona (SPR) je tehnika koja omogućava kvantitativno praćenje interakcija između biomolekula, poput proteina i liganda, u realnom vremenu. Jedna od glavnih prednosti SPR-a je što ne zahtjeva označavanje biomolekula, što znači da je mogu koristiti neoznačeni proteini ili drugi biomolekuli. SPR je izuzetno koristan za proučavanje afiniteta vezivanja, kao i za analizu kinetike tih interakcija i molekularnih mehanizama konformacijskih promjena koje nastaju tokom vezivanja.

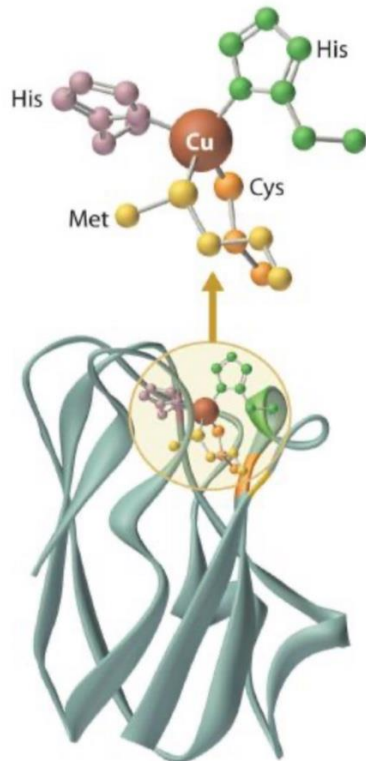
Princip SPR-a zasniva se na detekciji promjene refraktivnog indeksa na površini, koja nastaje kada molekule (poput proteina) vežu svoje ligande na imobilizovanoj površini. U tipičnom SPR eksperimentu, rastvor proteina bez označivača se imobilizuje na tankoj zlatnoj površini, a zatim se ligand, koji se također može biti neoznačen, dodaje u rastvor. Kroz analizu promjena u plazmonskom signalu, može se pratiti brzinu vezivanja (asocijaciju) i brzinu otpuštanja (disocijaciju) liganda, kao i kvantifikovati afinitet vezivanja između molekula. [12]

Ova tehnika je posebno korisna za proučavanje dinamičkih interakcija, jer omogućava analizu u realnom vremenu, pri čemu se mogu pratiti konformacijske promjene koje proteini doživljavaju kada se vežu za ligande. Takođe, SPR je veoma efikasan za proučavanje stanja agregacije proteina, jer omogućava istraživanje promjena u interakcijama proteina sa drugim molekulama ili čak sa samim sobom, što je važno za razumjevanje bioloških funkcija i patologija koje uključuju agregaciju proteina.

10. Primjeri značajnih metaloproteina

10.1. Metaloprotein sa bakrom kao centralnim atomom

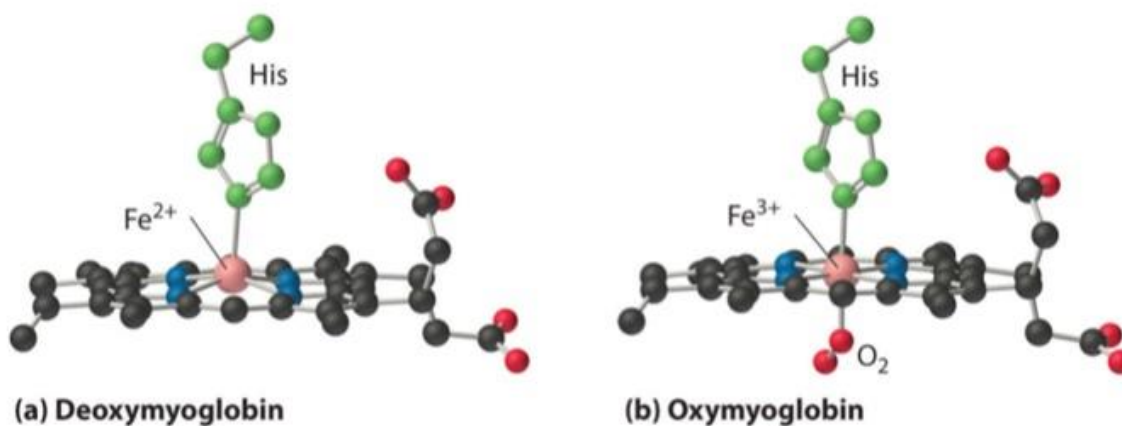
Plavi proteini bakra prvi put su izolovani iz bakterija 1950-ih, a iz biljnih tkiva početkom 1960-ih. Intenzivna plava boja ovih proteina potiče od snažne apsorpcije svetlosti na talasnoj dužini od oko 600 nm. Iako su jednostavni kompleksi bakra(II), poput $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ i $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. Bakar u ovim proteinima ima izmenjenu tetraedarsku strukturu i vezan je za četiri bočna lanca aminokiselina. Najčešće su strukture za bakar(II) i bakar(I) u kompleksima kvadratno-planarna i tetraedarska. Zahvaljujući minimalnoj promeni strukture tokom prelaska između oksidovanog i redukovanog oblika, prenos elektrona u ovim proteinima je vrlo brz. [14]. Kod jednostavnih metalnih kompleksa, prenos elektrona je spor ako se strukture oksidovanog i redukovanog oblika značajno razlikuju. U plavim bakarnim proteinima, slične strukture omogućavaju brz prenos elektrona. Ovaj princip (minimalna reorganizacija nakon prenosa elektrona) koristi se i u drugim metalnim centrima u biološkim sistemima koji učestvuju u prenosu elektrona.



Slika 11. Metaloprotein sa bakrom kao centralnim atomom [14]

10.2. Mioglobin i hemoglobin

Mioglobin je relativno mali protein koji sadrži 150 aminokiselina. Njegova funkcionalna jedinica je kompleks gvožđa i porfirina ugrađen u protein. U mijoglobinu, gvožđe u hem grupi je petokoordinirano, pri čemu se jedina veza ostvaruje sa imidazolnim ligandom histidina iz proteina, pored četiri atoma azota iz porfirinskog prstena. Drugi histidinski imidazol nalazi se s druge strane hem grupe. On je previše udaljen od gvožđa da bi formirao vezu s njim. Kao rezultat toga, atom gvožđa ima jedno slobodno koordinaciono mjesto, gdje se vezuje kiseonik (O_2). [14] Ova slobodna pozicija omogućava mioglobinu da efikasno skladišti kiseonik u mišićima, pružajući energiju tokom intenzivne aktivnosti. Hemoglobin, za razliku od mioglobina, ima kvaternarnu strukturu i sastoji se od četiri podjedinice, pri čemu svaka sadrži hem grupu sličnu onoj u mioglobinu. Njegova glavna uloga je transport kiseonika iz pluća do tkiva i vraćanje ugljen-dioksida nazad u pluća. Hemoglobin pokazuje kooperativno vezivanje kiseonika, što znači da vezivanje jednog molekula kiseonika olakšava vezivanje sledećeg. Ovo svojstvo omogućava hemoglobinu da efikasno prenosi kiseonik u različitim fiziološkim uslovima. Mioglobin ima mnogo veći afinitet prema kiseoniku nego hemoglobin. Ovo je ključna razlika koja omogućava da kiseonik prelazi iz hemoglobina (u krvi) u mioglobin (u mišićima), obezbeđujući skladištenje kiseonika za kasniju upotrebu tokom mišićne aktivnosti. [14]



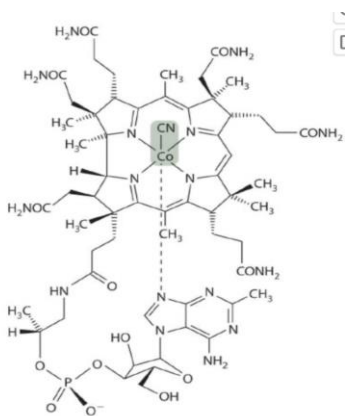
Slika 12. Deoksimioglobin i oksimioglobin [14]

10.3. Enzimi koji koriste metale da generišu organske radikale

Organski radikal je organska vrsta koja sadrži jedan ili više nesparenih elektrona. Iako se organski radikali često smatraju veoma reaktivnim česticama koje uzrokuju neželjene reakcije – na primjer one povezane s nepovratnim hemijskim promjenama tokom starenja – iznenađujuće je da su oni ključne komponente mnogih značajnih enzima. Većina ovih enzima koristi metalne jone za generisanje organskih radikala unutar svoje strukture. Ovi enzimi imaju ključnu ulogu u sintezi hemoglobina i DNK, kao i u raznim terapijama za liječenje bolesti poput anemije i raka. [14]

Vitamin B12 i radikalni enzimi Jedna klasa radikalnih enzima koristi vitamin B12 za svoju funkciju. Vitamin B12 je otkriven 1940-ih kao aktivni sastojak u liječenju anemije koja ne reaguje na povećan unos gvožđa u ishrani. Ljudskom organizmu su potrebne izuzetno male količine vitamina B12. [14]

Struktura vitamina B12 je slična strukturi hem grupe, ali sadrži kobalt umesto gvožđa i znatno je složenija. Vitamin B12 se često opisuje kao najsloženija nepolimerna biološka molekula i bio je prvi prirodno prisutni organometalni spoj koji je izolovan. Kada se vitamin B12 unese putem ishrane (u obliku dodataka prehrani), njegov cijanidni ligand na osi se zamenjuje složenom organskom grupom, koja omogućava njegovo uključivanje u biološke procese. Vitamin B12 ima ključnu ulogu u metaboličkim procesima i sintezi DNK, zbog čega njegov nedostatak može uzrokovati ozbiljne zdravstvene probleme poput neuroloških poremećaja i anemije. Njegova složena struktura i interakcija s metalima čine ga fascinantnim primjerom u bioorganskoj hemiji. [14]



Slika 13- Vitamin B12 [14]

Literatura

[1] : LibreTexts. (n.d.). *Nomenclature and ligands*. In *Inorganic Chemistry (LibreTexts)*.

Retrieved from

[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Inorganic_Chemistry_\(LibreTexts\)/09%3A_Coordination_Chemistry_I_-_Structure_and_Isomers/9.03%3A_Nomenclature_and_Ligands](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Inorganic_Chemistry_(LibreTexts)/09%3A_Coordination_Chemistry_I_-_Structure_and_Isomers/9.03%3A_Nomenclature_and_Ligands)

[2]: Hemoglobin- funkcija i struktura, Josipa Hajduković

[3]:https://epgp.inflibnet.ac.in/epgpdata/uploads/epgp_content/S000005CH/P000670/M013994/ET/1455878385CHE_P15_M16_e-Text.pdf

[4]: Susana M. Quintal, Queite Antonia dePaulaa ,Nicholas P. Farrell. Zinc finger proteins as templates for metal ion exchange and ligand reactivity Chemical and biological consequences, February 2011

[5]:https://www.ucg.ac.me/skladiste/blog_22199/objava_40433/fajlovi/MEDICINA%20Oksidativna%20fosforilacija.pdf

[6]: Takeda S, Yamashita A, Maeda K., Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca(2+) -saturated form, July 2003

[7]: Clarissa Ribeiro Reily Rocha, Matheus Molina Silva, Annabel Quinet, Januario Bispo Cabral-Neto, Carlos Frederico Martins Menck, DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship, Sep. 2018

[8]: Bryan Wang, Xuan Luo, Potential chelation agents and indicators of Alzheimer's disease, 2018

[9]: J. Derek Woollins, ChemInform Abstract: The Chemistry of Transition Metal Complexes Containing Catechol and Semiquinone Ligands, March 2007

[10]: S. F. A. Kettle, Biological coordination chemistry, a confluence of chemistry and biochemistry, February 2005

[11] : [Stability of Metal Complexes | IntechOpen](#)

[12]: Witkowska D, Rowińska-Żyrek M. Biophysical approaches for the study of metal-protein interactions. J Inorg Biochem. 2019

[13] Alexander J. Cutright , Thualfeqar Al Mohanna , Erin Matthews , James M. Aulds , Justin A. Thornton, Sean L. Stokes , Joseph P. Emerson, Journal of Inorganic Biochemistry, October 2023

[14]: LibreTexts. (n.d.). Transition metals in biology (*LibreTexts*). Retrieved from [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Supplemental_Modules_and_Websites_\(Inorganic_Chemistry\)/Descriptive_Chemistry/Elements_Organized_by_Block/3_d-Block_Elements/1b_Properties_of_Transition_Metals/Transition_Metals_in_Biology](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Supplemental_Modules_and_Websites_(Inorganic_Chemistry)/Descriptive_Chemistry/Elements_Organized_by_Block/3_d-Block_Elements/1b_Properties_of_Transition_Metals/Transition_Metals_in_Biology)