

# Promiskuitet enzima

---

Radošević, Ela

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:217:936544>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-27**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Ela Radošević

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

## **Promiskuitet enzima**

### **Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

Zagreb, 2018.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

16. srpnja 2018.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

7. rujna 2018.

Mentor rada: prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

Potpis:



# Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VI</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Biokataliza .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Enzimi .....</b>	<b>1</b>
<i>1.2.1. Građa enzima.....</i>	<i>1</i>
<i>1.2.2. Nomenklatura i podjela.....</i>	<i>2</i>
<b>1.3. Kako enzimi rade .....</b>	<b>3</b>
<i>1.3.1. Termodinamika enzimski kataliziranih reakcija .....</i>	<i>3</i>
<i>1.3.2. Kinetika enzimski kataliziranih reakcija.....</i>	<i>4</i>
<i>1.3.3. Mehanizmi enzimski kataliziranih reakcija.....</i>	<i>6</i>
<i>1.3.4. Regulacija enzimске aktivnosti .....</i>	<i>7</i>
<b>1.4. Specifičnost .....</b>	<b>9</b>
<b>§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1. Promiskuitet enzima .....</b>	<b>10</b>
<b>2.2. Mehanistički aspekt promiskuiteta enzima .....</b>	<b>12</b>
<b>2.3. Evolucijski aspekt promiskuiteta enzima .....</b>	<b>20</b>
<b>2.4. Primjena promiskuiteta enzima i evolucijske adaptabilnosti enzima .....</b>	<b>23</b>
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XXVII</b>



## § Sažetak

Biokataliza je jedno od najvažnijih svojstava živog svijeta. Ona omogućava kontrolirano odvijanje kemijskih reakcija brzinom koja omogućava život stanice i multistaničnih organizama. Enzimi, biološki katalizatori, u literaturi su često opisani kao vrlo specifični i efikasni, no u zadnje vrijeme otkriveno je da velik broj posjeduje promiskuitetne aktivnosti. Promiskuitet enzima definira se kao slučajna kataliza reakcija koje se razlikuju od onih za koje je enzim evoluirao. Kataliza promiskuitetnih reakcija se vrlo rijetko događa *in vivo*, a kada i dođe do katalize promiskuitetne reakcije to je često uzrokovano nekom vrstom staničnog stresa. Kataliza promiskuitetnih reakcija može se odvijati u istom aktivnom mjestu kao i kataliza nativne reakcije, ali bočni ogranci aktivnog mjesta koji sudjeluju u katalizi mogu biti različiti i/ili mogu imati različite funkcije u katalizi promiskuitetne reakcije u odnosu na katalizu nativne reakcije.

Pretpostavlja se da su prvi enzimi posjedovali vrlo široku specifičnost, odnosno da je jedan enzim katalizirao cijeli niz reakcija te da su s vremenom kroz duplikacije, mutacije i selekciju postali onakvima kakve znamo danas. Iako još uvijek nema puno informacija o mehanizmima evolucije enzima, pretpostavlja se da promiskuitetne aktivnosti enzima mogu biti početna točka za evoluciju novih funkcija enzima.





## § 1. UVOD

### 1.1. Biokataliza

Biokataliza je svojstvo živog svijeta koje omogućava odvijanje procesa bitnih za život adekvatnom brzinom. Često su uvjeti u kojima živi stanica vrlo blagi te su nekatalizirane reakcije koje su potrebne za život prespore za održavanje istog. Zato su nam potrebni enzimi. Enzimi su biokatalizatori, većina su proteini, a manji dio čine katalitičke RNA. Enzimi u prosjeku imaju  $10^6$  do  $10^{12}$  veći faktor ubrzanja u odnosu na nekatalizirane reakcije te nekoliko redova veličine veći faktor ubrzanja u odnosu na reakcije katalizirane kemijskim katalizatorima (npr. manjim organskim molekulama). Osim što enzimi ubrzavaju biološke reakcije, često su precizno regulirani što omogućuje preciznu kontrolu reakcija *in vivo*, odnosno regulacijom aktivnosti jednog enzima moguće je regulirati dio ili cijeli metabolički put.<sup>1</sup>

### 1.2. Enzimi

#### 1.2.1. Građa enzima

Kao što je već spomenuto, većina enzima su proteini, odnosno građeni su od kovalentnog slijeda aminokiselina, a njihova katalitička aktivnost ovisi o njihovoj trodimenzionalnoj strukturi koju poprimaju u stanici. Svaki enzim sadrži aktivno mjesto. To je mjesto u kojemu se događa reakcija koju enzim katalizira, a sadrži određene aminokiseline koje sudjeluju u katalitičkom procesu. Aktivna mjesta često imaju neku određenu karakterističnu strukturnu značajku koja je bitna za katalizu poput katalitičkih dijada i trijada, oksianionske šupljine i drugih aminokiselinskih motiva.

Nekim enzimima dovoljan je samo proteinski dio, dok je drugim enzimima potreban i kofaktor. Proteinski dio enzima naziva se apoenzim, dok proteinski dio i kofaktor zajedničkim imenom se naziva holoenzim. Proteinski dio enzima, odnosno bočni ogranci aminokiselina

koje ga grade, mogu sudjelovati u kiselinsko-baznim reakcijama, u stvaranju kovalentnog međuprodukta, u elektrostatskoj stabilizaciji naboja, ali nisu u mogućnosti sudjelovati u oksidoredukcijskim reakcijama te u reakcijama prijenosa određenih funkcionalnih skupina. Za takve reakcije su potrebni kofaktori. Oni mogu biti metalni ioni ( metaloenzimi), organske ili metaloorganske molekule (koenzimi) koje kada su čvrsto asocirane s enzimom nazivamo prostetičkim skupinama (na primjer, hem u hemoglobinu).<sup>1</sup>

### 1.2.2. Nomenklatura i podjela

Enzimi se klasificiraju prema reakcijama koje kataliziraju koristeći sustav EC brojeva (eng. *Enzyme Commission Number*), zapisom E.C. 1.1.1.1.

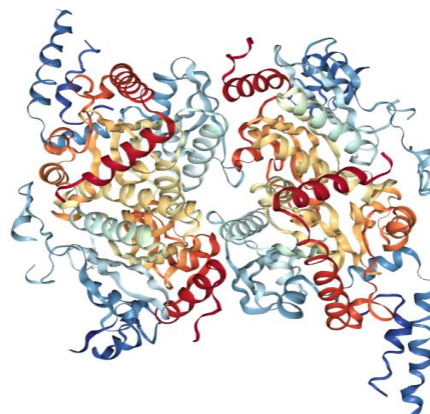
Tablica 1. Podjela enzima na skupine prema reakcijama koje kataliziraju

Broj skupine <sup>a</sup>	Ime skupine	Tip katalizirane reakcije
1	Oksidoreduktaze	Prijenos e <sup>-</sup>
2	Transferaze	Reakcije prijenosa skupina
3	Hidrolaze	Hidrolitičke reakcije
4	Liaze/Lijaze	Adicija na dvostruke veze, nastajanje dvostrukih veza micanjem skupina
5	Izomeraze	Pomicanje skupina u svrhu dobivanja izomera
6	Ligaze	Stvaranje C-C, C-S, C-O, C-N veza, spregnuto s cijepanjem ATP ili sličnog kofaktora

<sup>a</sup>Značenje prve znamenke u E.C. broju (preuzeto i prilagođeno prema ref. 2)

Prva znamenka označava skupinu (eng. *class*). Ukupno postoji šest skupina u koje razvrstavamo enzime, prema funkciji koju vrše. Druga znamenka u E.C. broju označava podskupinu (eng. *subclass*) koja govori koja molekula stupa u reakciju. Na primjer podskupina fosfotransferaze uključuju prijenos fosforilne skupine. Treći i četvrti broj detaljnije opisuju koje skupine i kako stupaju u reakcije, odnosno definiraju donore i akceptore funkcionalnih jedinki (H<sup>+</sup>, e<sup>-</sup>, OH<sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, H<sub>2</sub>O...). Ovaj sustav se morao uvesti zato što je otkriveno mnoštvo enzima i često se koristilo jedno trivijalno ime za više različitih enzima, a ponekad jedan enzim ima nekoliko trivijalnih imena.<sup>1,2</sup>

E.C. 2.1.3.15 - ovaj E.C. broj označava reakciju prijenosa karboksilne skupine na acetil-CoA uz pomoć ATP i prostetičke skupine biotina pri čemu nastaje malonil-CoA,  $H^+$ , ADP i  $P_i$ .<sup>2</sup>



Slika 1. Tercijarna struktura karboksitransferazne podjedinice enzima acetil-CoA-karboksilaza, PDB: 2F9Y, (preuzeto iz ref. 16)

E.C.2. - Transferaze

E.C.2.1. - Prijenos grupa s jednim ugljikom

E.C.2.1.3. Karboksi- i karbamoil transferaze

E.C.2.1.3.15. Acetil-CoA-karboksitransferaza

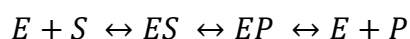
Osim što se enzimi i njihove reakcije klasificiraju prema E.C. broju, moguće ih je podijeliti u obitelji i superobitelji. Enzimske superobitelji sadrže najveću grupaciju enzima za koje se može zaključiti da imaju zajedničkog pretka. Zajednički preci se određuju prema strukturnom slaganju (eng. *structural alignment*) i mehanističkim sličnostima, čak i kada sličnost u redoslijedu aminokiselina nije očita. Podjela u enzimske superobitelji nam je bitna zato što predstavlja trenutne limite u identifikaciji zajedničkih predaka, odnosno enzimske superobitelji su najveća evolucijska grupacija bazirana na dostupnim dokazima. Enzimske superobitelji dijele se na obitelji čiji članovi su međusobno strukturno i mehanistički sličniji od članova unutar superobitelji. Pretpostavljen je i zlatni standard za podjelu enzima te uključuje podjelu u pet superobitelji i 91 obitelj.<sup>3</sup>

### 1.3. Kako enzimi rade

#### 1.3.1. Termodinamika enzimski kataliziranih reakcija

Enzimska kataliza odvija se u aktivnom mjestu enzima. To je mjesto unutar enzima koje ima vrlo specifičan razmještaj funkcionalnih skupina kako bi se supstrat optimalno smjestio i kako bi se reakcija koju enzim katalizira odvila odgovarajućom brzinom. Supstrat je molekula koja

ostvaruje interakciju s enzimom i koja se prevodi u produkt u reakciji koju katalizira enzim. Interakciju enzima i supstrata te katalitički proces opisuje reakcija :



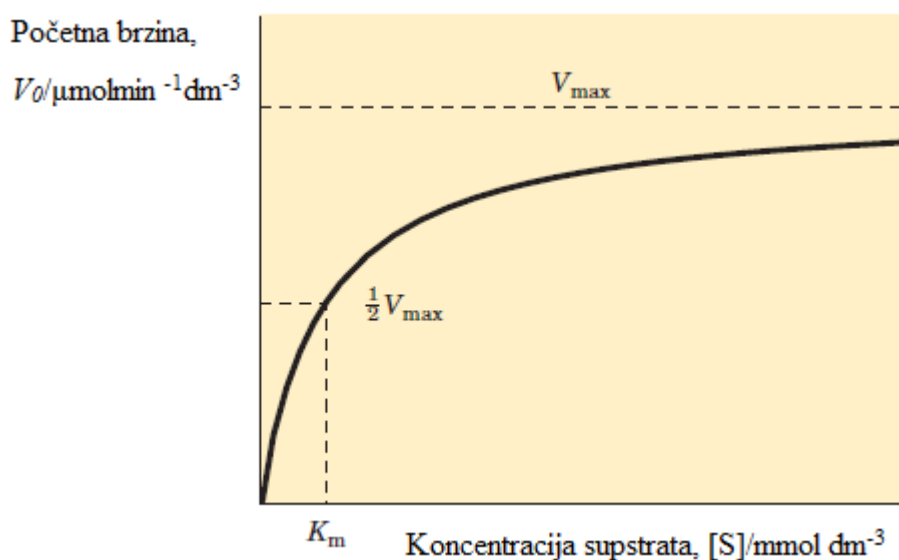
gdje E označava enzim, S supstrat, P produkt, ES nekovalentni kompleks enzima i supstrata, a EP enzim produkt kompleks. Po ovom zapisu možemo vidjeti da se radi o ravnotežnom procesu koji ima svoju određenu konstantu ravnoteže. Bitno je napomenuti da enzim ne utječe na tu konstantu ravnoteže već povećava brzinu kojom sustav dolazi u ravnotežu. Kao i drugi katalizatori, enzimi snižavaju energiju aktivacije. Energije aktivacije su energetske barijere kemijskim reakcijama. Ukoliko ne bi bilo tih barijera, procesi biorazgradnje bi se sami po sebi brzo odvijali, kompleksne molekule bi se raspadale na jednostavnije i kompleksan život ne bi bio moguć.

Kako enzimi snižavaju energiju aktivacije? - Prilikom interakcije enzima i supstrata, odnosno pri nastajanju ES kompleksa gubi se jedan set translacijske i rotacijske entropije, ali dolazi do porasta interne entropije zbog novih načina rotacija i vibracija. Pri toj interakciji se otpušta i određena količina vezne energije kao rezultat povoljnih nekovalentnih interakcija između supstrata i bočnih ogranaka na površini aktivnog mjesta. Supstrati se u aktivno mjesto vežu u neposrednoj blizini i povoljnoj prostornoj orijentaciji prema funkcionalnim skupinama enzima koje sudjeluju u katalizi. Taj proces može biti energetski skup, a entropijska kazna za preorganizaciju se ne plaća prilikom katalize već prilikom nastajanja ES kompleksa. Svaka dodatna interakcija enzima i prijelaznog stanja (ES) dodatno stabilizira prijelazno stanje i smanjuje energiju aktivacije. S obzirom na to da se reakcija odvija u ES kompleksu efektivno se radi o intramolekulskom procesu.<sup>1</sup>

### 1.3.2. Kinetika enzimski kataliziranih reakcija

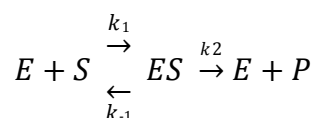
Kinetika enzimskih reakcija je disciplina koja se bavi proučavanjem i određivanjem koeficijenata brzina reakcija s ciljem razjašnjavanja mehanizma enzimski kataliziranih reakcija. Najčešće korišten model za opis enzimski kataliziran reakcija je Michaelis-Mentenin model. Kako bismo došli do potrebnih informacija o reakcijama možemo koristiti razne metode, ali u ovom slučaju koristimo mjerenje početne brzine ( $V_0$ ). Takav eksperiment će se provoditi u uvjetima gdje je koncentracija supstrata  $[S]$  puno veća od koncentracije enzima

[E]. Supstrat se stavlja u velikom suvišku naspram enzima kako bismo ga mogli promatrati kao konstantu. Na taj način možemo ispitivati utjecaj koncentracije supstrata na početnu brzinu. Pri nižim koncentracijama supstrata brzina se mijenja gotovo linearno s promjenom koncentracije supstrata, dok pri višim koncentracijama promjena  $V_0$  postaje sve manja i manja s promjenom koncentracije supstrata do postizanja maksimalne brzine kao što je prikazano na Slici 1. Maksimalna brzina  $V_{\max}$  je najveća brzina koju enzim teoretski može postići, odnosno ona predstavlja brzinu koju bi enzim postigao pri beskonačnoj koncentraciji supstrata. Maksimalna brzina je teoretska veličina i ona predstavlja onu vrijednost  $V_0$  na koju više ne utječe povećanje koncentracije supstrata. Koncentracija pri kojoj početna brzina iznosi pola maksimalne ( $V_0 = 0,5 V_{\max}$ ) označava se s  $K_m$  i naziva se Michaelisova konstanta.



Slika 2. Prikaz ovisnosti početne brzine,  $V_0$ , enzimski katalizirane reakcije o koncentraciji supstrata  $[S]$ . Preuzeto i prilagođeno prema ref. 1.

Reakciju enzimski katalizirane reakcije koja prati Michaelis-Mentenin model shematski, jednostavno zapisujemo kao:



Jednadžba koja opisuje promjenu početne brzine ( $V_0$ ) o koncentraciji supstrata  $[S]$  naziva se Michaelis-Mentenina jednadžba i glasi:

$$V_0 = \frac{V_{\max} * [S]}{K_m + [S]}$$

Michaelisova konstanta  $K_m$  varira od enzima do enzima jednako kao što varira i od supstrata do supstrata za pojedini enzim. To se događa jer  $K_m$  zapravo ovisi o svim koeficijentima brzina reakcija u svim koracima katalize ( $k_1, k_{-1}, k_2, \dots$ ). Druga konstanta kojom karakteriziramo enzime naziva se obrtni broj  $k_{\text{cat}}$ . On je funkcija svih koeficijenata brzina reakcija od trenutka nastanka kompleksa ES do nastanka slobodnog produkta.  $k_{\text{cat}}$  predstavlja broj molova supstrata prevedenog u produkt po molu enzima u jedinici vremena u uvjetima kada je enzim potpuno zasićen supstratom.

Parametri  $k_{\text{cat}}$  i  $K_m$  daju informacije o efikasnosti enzima, ali svaki parametar za sebe ne daje dovoljno informacija za usporedbu enzima. Iz tog razloga uvodi se konstanta specifičnosti ili konstanta efikasnosti koja ovisi i o  $k_{\text{cat}}$  i  $K_m$  -  $k_{\text{cat}}/K_m$ . Što je iznos ove konstante veći, enzim je efikasniji. Bitno je napomenuti da ova konstanta ima svoj limit, a on ovisi o brzini kojom enzim i supstrat difundiraju jedan prema drugome. Enzimi čija konstanta specifičnosti je približna brzini difuzije nazivaju se kinetički savršenim enzimima, a vrijednost  $k_{\text{cat}}/K_m$  iznosi približno  $10^8 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . (ref. 1)

### 1.3.3. *Mehanizmi enzimski kataliziranih reakcija*

Mehanizmi kojima se odvijaju enzimski katalizirane reakcije su često kompleksni i odvijaju se u više koraka. Potpuno razumijevanje mehanizma reakcije zahtijeva identifikaciju svih supstrata, kofaktora, međuprodukata i produkata. Poznavanje strukture enzima, prijelaznih stanja u reakcijskom mehanizmu, te koeficijenata brzina reakcija pojedinačnih koraka, kao i interakcije koje enzim ostvaruje sa supstratom i međuproduktima omogućava detaljno razumijevanje mehanizma katalize.

Postoji mnogo načina na koji enzim i supstrat međusobno interagiraju tijekom katalitičkog procesa. Bočni ogranci mogu stupati u kiselinsko-bazne reakcije sa supstratom, odnosno

moгу se protonirati i deprotonirati i služiti kao donori i akceptori protona tijekom katalize. Katalitički proces može se odvijati i preko nastajanja kovalentne veze između enzima i supstrata. Takva interakcija mijenja reakcijski put na način da novi put ima nižu energiju aktivacije u usporedbi s nekataliziranim. U takvim procesima sudjeluje mnoštvo bočnih ogranaka i raznih kofaktora koji mogu služiti kao nukleofili pri nastajanju kovalentne veze. Enzimi mogu sadržavati i metalne ione, a oni mogu sudjelovati u katalizi tako što elektrostatskim interakcijama stabiliziraju prijelazno stanje, mogu stabilizirati izlazne skupine, pozicionirati supstrate ili mogu stupati u oksidoredukcijske interakcije. Stabilizacija prijelaznog stanja moguća je i putem elektrostatskih interakcija nabijenih bočnih ogranaka enzima i supstrata.

#### *1.3.4. Regulacija enzimске aktivnosti*

U staničnim uvjetima enzimска aktivnost mora biti strogo kontrolirana te postoji mnoštvo strategija na koje to stanica čini:

- Alosterička kontrola - alosterički enzimi su enzimi koji mijenjaju konformaciju vezanjem modulatora te na taj način reguliraju svoju aktivnost. Takvi enzimi imaju jednu konformaciju koja se mijenja vezanjem modulatora u alosteričko mjesto i na taj način postaje manje ili više aktivan, ovisno o tome je li modulator aktivator ili inhibitor aktivnosti. Ova vrsta regulacije je reverzibilna.
- Reverzibilna kovalentna modifikacija - aktivnost enzima regulira se kovalentnom modifikacijom bočnih ogranaka. Stvaranje kovalentne veze između enzima i modificirajuće skupine može rezultirati aktivacijom ili inaktivacijom enzima. Neke od mogućih modifikacija su metilacija, acetilacija, adenilacija, ali najčešća kovalentna modifikacija je fosforilacija. Dodatkom fosforilne skupine na serinske, tirozinske ili treoninske bočne ogranke enzima dolazi do aktivacije ili inaktivacije enzimске aktivnosti, jednako kao i micanjem te skupine (defosforilacija). S obzirom na to da je ATP čest donor fosforilne skupine, reakcije regulirane na ovaj način su direktno povezane s energetska statusom stanice.

- Proteolitička aktivacija - proteini se mogu sintetizirati u inaktivnom obliku, kojega nazivamo zimogen, proenzim ili proprotein. Hidrolitičkim cijepanjem jedne ili više peptidnih veza na točno određenim mjestima dobiva se aktivni oblik enzima. Ovaj proces nije reverzibilan, jednom aktivan enzim nije moguće inaktivirati bez upotrebe specifičnih inaktivatora.
- Regulacija na nivou transkripcije/translacije - s obzirom na to da stanici nisu uvijek potrebni svi enzimi cijelo vrijeme ona se vrlo često koristi ovom metodom. Količina određenog enzima kojeg stanica regulira na ovaj način ovisit će o potrebama stanice, odnosno stanica se transkribirati/translatirati gen za enzim samo ako za to dobije određeni signal.
- Izoenzimi - izoenzimi su enzimi koji mogu imati različit slijed aminokiselina, ali kataliziraju istu reakciju. Njihovo postojanje omogućava regulaciju aktivnosti u različitim tkivima. Međusobno se mogu razlikovati po afinitetu prema supstratu, načinu regulacije, a posljedično imaju i različite kinetičke parametre.
- Interakcija s regulatornim proteinima - aktivacija enzimske aktivnosti vezanjem regulatornog proteina

Neki enzimi su regulirani samo na jedan od načina, ali većina ih ima vrlo kompleksnu regulaciju. Često je slučaj da regulacijom aktivnosti jednog enzima reguliramo aktivnost cijelog metaboličkog puta. Takvi enzimi se nazivaju regulatorni enzimi.<sup>1</sup>

Često je slučaj da regulacijom aktivnosti jednog enzima reguliramo aktivnost cijelog metaboličkog puta. Takvi enzimi se nazivaju regulatorni enzimi. Aktivacija ili inaktivacija enzimske aktivnosti regulatornih enzima često je odgovor na neki stanični signal te na taj način igraju važnu ulogu u održavanju homostaze. Enzimi mogu biti regulirani na jedan od navedenih načina, ali većina ih ima vrlo kompleksnu regulaciju koja uključuje komplementarno korištenje više regulacijskih strategija.



## 1.4. Specifičnost

Bitno svojstvo enzima koje je odgovorno za njihovu efikasnost je njihova specifičnost. Enzimi mogu jako dobro prepoznati svoje supstrate kao i odbaciti one molekule koje to nisu. Svaki enzim ima povoljan razmještaj bočnih ogranaka unutar aktivnog mjesta za određeni supstrat, ali ponekad se dogodi da enzimi kataliziraju reakcije za koje nisu specijalizirani ili da mogu katalizirati reakcije sa strukturno i kemijski sličim supstratima. To se može dogoditi u slučaju da neka molekula sličí supstratu (male strukturne razlike), no kataliza takvih reakcije je uglavnom manje efikasna zbog manjka nekovalentnih interakcija između supstrata i aktivnog mjesta. Specifičnost enzima se može također istraživati pomoću izračunavanja energija vezanja supstrata u aktivno mjesto, odnosno proučavanjem interakcija između supstrata i aktivnog mjesta enzima.<sup>1</sup>

## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. Promiskuitet enzima

Iako se u literaturi enzimi opisuju kao vrlo specifični katalizatori koji kataliziraju jednu reakciju, u posljednjih nekoliko desetljeća pokazano je da brojni enzimi imaju mogućnost katalizirati reakcije za koje nisu specijalizirani, odnosno one za koju nisu evoluirali. Ta pojava naziva se promiskuitet, točnije, promiskuitet enzima je slučajna kataliza one reakcije za koju enzim nije evoluirao i koja nema fiziološku ulogu u organizmu. Osim promiskuitetnih enzima, postoje i enzimi koji su evoluirali na način da mogu katalizirati istu reakciju, ali s više različitih supstrata. Njih nazivamo multispecifičnim enzimima ili enzimima širokog spektra. Primjer takvog enzima je citokrom450 koji sadrži prostetičku skupinu hem, a katalizira reakcije s cijelim nizom različitih supstrata, uglavnom s istom učinkovitosti. Multispecifičnim enzimima svaka reakcija za koju su evoluirali je nativna. Nativne aktivnosti enzima su one aktivnosti koje su fiziološki relevantne i za koje je enzim evoluirao. Primarne aktivnosti enzima su one koje su uključene u centralne reakcije metabolizma, dok sekundarne su one koje sudjeluju u signalizaciji i sporednim reakcijama. I primarne i sekundarne reakcije se definiraju kao nativne.

Postoji nekoliko načina pomoću kojih opisujemo i kvantificiramo promiskuitet enzima:

- Stupanj promiskuiteta (eng. *Degree of Promiscuity*) - govori o tome koliko su različite promiskuitetna i nativna aktivnost enzima. Određuje se proučavanjem veza koje nastaju i nestaju u nativnim, odnosno promiskuitetnim reakcijama enzima i supstrata.
- Indeks promiskuiteta (eng. *Index of Promiscuity*) - računa se pomoću katalitičke učinkovitosti enzima ovisno o supstratu. Ova metoda nije najbolja za opis promiskuitetnih enzima jer podrazumijeva da enzim vrši istu kemijsku transformaciju na različitim supstratima. Ova metoda je dobra za opis i usporedbu pojedinih aktivnosti multispecifičnih enzima.<sup>4</sup>

- Usporedba po E.C. broju - reakcije multispecifičnih enzima s različitim supstratima imat će isti E.C.broj ili će se razlikovati samo po zadnjoj znamenici. Kod promiskuitetnih enzima, E.C. brojevi s različitim supstratima mogu se razlikovati u drugoj ili trećoj znamenici (koje se odnose na različite klase supstrata), a moguće je da se razlikuju i u prvoj znamenici (koja se odnosi na skupinu).
- Magnituda/Razina promiskuiteta (eng. *Magnitude of Promiscuity*) - ova metoda uspoređuje nativnu i promiskuitetnu reakciju po kinetičkim parametrima, odnosno po konstanti specifičnosti/učinkovitosti ( $k_{cat}/K_m$ ). Većina enzima za nativne reakcije ima vrijednost  $k_{cat}/K_m$  u rasponu od  $10^5$  do  $10^8 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , dok za promiskuitetne reakcije ta vrijednost varira i često je znatno niža.<sup>5</sup>

Jako malo promiskuitetnih aktivnosti koje su nađene *in vitro* imaju fiziološko i evolucijsko značenje, a one koje čak i imaju rijetko se zaista događaju *in vivo*. Jedan od razloga je regulacija enzimske aktivnosti. Regulacija na razini transkripcije/translacije štedi energiju stanice i metabolite na način da ne proizvodi enzim u odsutnosti nativnog supstrata. Također, postoje i alosterički enzimi čiji modulatori su njihovi supstrati te u odsutnosti nativnog supstrata enzim neće biti aktivan. Dok regulacija maskira promiskuitetne aktivnosti, multispecifičnim enzimima pomaže pri aktivaciji određenih funkcija bez utjecaja na specifičnost.

Usprkos preciznoj regulaciji neke promiskuitetne aktivnosti se ipak događaju *in vivo*. U laboratorijskim uvjetima pojava promiskuitetnih aktivnosti može se otkriti tako da se nekom organizmu ukloni neki ključni enzim. Na taj način otkrivena je fosfat-ovisna hidrogenazna aktivnost alkalnih fosfataza. Enzim C-P liaza, kodiran operonom *phn*, katalizira oksidaciju fosfita ( $\text{HPO}_3^{2-}$ ) u fosfat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). Uklanjanjem operona *phn* *Escherichia coli* je i dalje mogla preživjeti na podlozi gdje je jedini izvor fosfora bio fosfit. To je ukazivalo na to da organizam posjeduje neki drugi enzim koji može oksidirati fosfit do fosfata. Daljnjim ispitivanjima pokazano je da alkalne fosfataze posjeduju tu promiskuitetnu aktivnost te da je ona dovoljno učinkovita da organizam preživi u danim uvjetima.<sup>6</sup>

Osim niza eksperimentalnih istraživanja poput ovog, proveden je i *in silico* eksperiment u kojemu su pomoću standardnih metoda uklapanja (eng. *docking methods*) ispitali 15 000 mogućih interakcija između 120 ključnih metaboličkih enzima i 125 čestih metabolita u *E.coli* kako bi ispitali razinu isprepletenosti metaboličkih reakcija (eng. *cross-reactivity*). Bitno je napomenuti da u ovom eksperimentu nije ispitivan (moguć) katalitički proces, već samo hoće li doći do vezanja metabolita i enzima. Izračunom energija vezanja između navedenih parova pokazano je da postoji mogućnost da će enzim vezati metabolit koji nije njegov nativni metabolit. Iako ova metoda ima mnogo ograničenja pokazuje kako su mnoge reakcije između enzima i supstrata koji im nisu nativni moguće i energetski povoljne.<sup>7</sup>

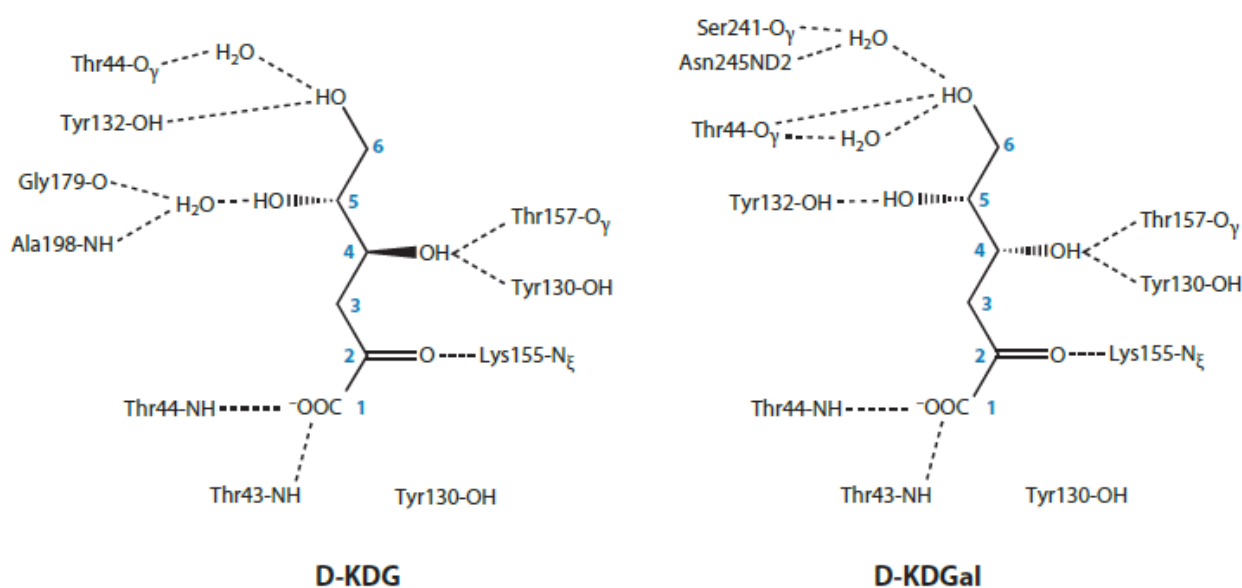
Rezultati raznih istraživanja, poput gore navedenih, dovela su do nove hipoteze koja predlaže da dobro definirani linearni metabolički putovi su zapravo isprepleteni (eng. *cross-wired*), odnosno pokazano je da uklanjanjem nekog enzima postoji mogućnost da će neki drugi enzim uskočiti i izvršiti funkciju uklonjenog. To može značiti da nisu potrebne genetičke modifikacije na organizmu kako bi se generirala nova metabolička aktivnost.<sup>5</sup>

## 2.2. Mehanistički aspekt promiskuiteta enzima

S obzirom na to da su enzimi vrlo specifični katalizatori postavlja se pitanje kako i na koji način oni mogu katalizirati reakcije koje su njima promiskuitetne. Jedna od stvari koja omogućuje katalizu promiskuitetnih reakcija je konformacijska raznolikost. Mnogi enzimi posjeduju nekoliko različitih konformacija, odnosno promiskuitetne aktivnosti katalizirane su u istom aktivnom mjestu kao i nativne, ali u ovom slučaju enzim ima drugačiji prostorni smještaj bočnih ogranaka unutar aktivnog mjesta. Ovim mehanizmom se koriste i multispecifični enzimi kako bi aktivirali pojedinu nativnu reakciju. Tako primjerice izopropilmalat-izomeraza katalizira reakcije dva različita supstrata, a izgled aktivnog mjesta mijenja se u ovisnosti o tome koji supstrat ulazi u reakciju.<sup>5</sup>

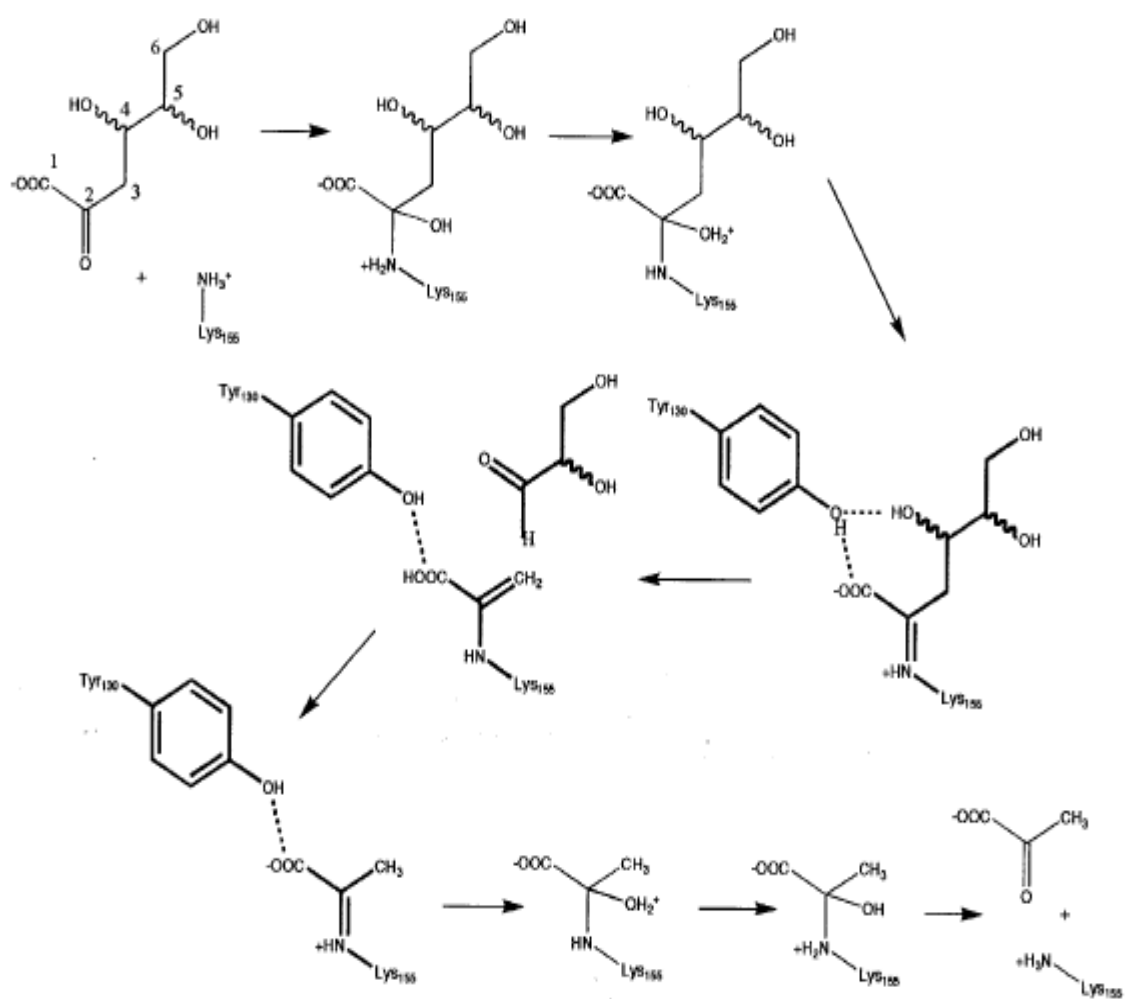
S druge strane mnoge promiskuitetne aktivnosti dijele istu konfiguraciju aktivnog mjesta s nativnom aktivnošću, kao i karakteristike odgovorne za katalizu poput oksianionske šupljine

ili katalitičke trijade. Tako je kod arheje *Sulfolobus solfataricus*, termofilnog organizma koji metabolizira glukozu Entner-Doudoroff putem, otkriveno da enzimi u tom metaboličkom putu pokazuju promiskuitetne aktivnosti, točnije promiskuitetnim aktivnostima enzima ovog metaboličkog puta organizam može metabolizirati galaktozu. Glukoza-dehidrogenaza je enzim koji katalizira oksidaciju glukoze u glukonat, a zatim se glukonat dehidrira i nastaje D-2-keto-3-deoksiglukonat (KDG). Nadalje, enzim KDG-aldolaza katalizira cijepanje KDG na D-gliceraldehid i piruvat. Glukoza-dehidrogenaza promiskuitetno djeluje na galaktozu i pritom nastaje D-2-keto-3-deoksigalaktonat (KDGal), dok reakcija KDGal i aldolaze daje isto D-gliceraldehid i piruvat. Reakcije kojima aldolaza katalizira ove dvije reakcije razlikuju se u vodikovim vezama koje se stvaraju između supstrata i aktivnog mjesta kao što je prikazano na slici 2.



Slika 2. Prikaz interakcija supstrata s aktivnim mjestom enzima. (preuzeto iz ref. 5)

U oba slučaja kataliza se odvija preko nastanka Schiffove baze između karbonilnog ugljika supstrata (C2) i Lys155, zatim uz pomoć Tyr130 dolazi do cijepanja veze između trećeg i četvrtog ugljikovog atoma pri čemu se oslobađa D-gliceraldehid. Na slici 3. prikazan je pretpostavljeni mehanizam promiskuitetne reakcije. Pretpostavka je bazirana na poznavanju struktura enzima, kompleksa enzim supstrat i svih međuprodukata.<sup>8</sup>



Slika 3. Pretpostavljeni mehanizam kojim aldolaza cijepa KDGal na D-gliceraldehid i piruvat. (preuzeto iz ref. 8)

Također, određeni su i kinetički parametri za native i promiskuitetne reakcije enzima glukoza-dehidrogenaza i enzima KDG-aldolaza.

Tablica 2. Kinetički parametri za reakciju enzima glukoza-dehidrogenaza s nativnim (glukoza) i promiskuitetnim (galaktoza) supstratom pri pH 7,5 i  $t=75^{\circ}\text{C}$ . Jedna jedinica odgovara nastanku 1  $\mu\text{mol}$  NAD(P)H u minuti. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 9)

Supstrat	Kofaktor	$K_m/\text{mmol dm}^{-3}$	$K_{cat}/\text{s}^{-1}$	$k_{cat}K_m^{-1}/\text{dm}^3\text{ s}^{-1}\text{ mmol}^{-1}$
D-Glukoza	NAD <sup>+</sup>	1,50 ( $\pm 0,05$ )	74,9	49,9
	NAPD <sup>+</sup>	1,30 ( $\pm 0,05$ )	47,7	36,7
D-Galaktoza	NAD <sup>+</sup>	0,57 ( $\pm 0,01$ )	61,3	107,5
	NAPD <sup>+</sup>	0,44 ( $\pm 0,01$ )	37,4	85,1

Tablica 3. Kinetički parametri za reakciju enzima KDG-aldolaza s nativnim (KDG) i promiskuitetnim (KDGal) supstratom pri pH 6 i  $t=60^{\circ}\text{C}$ . Jedna jedinica odgovara nastanku 1  $\mu\text{mol}$  NADH u minuti. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 9)

Supstrat	$K_m/\text{mmol dm}^{-3}$	$K_{cat}/\text{s}^{-1}$	$k_{cat}K_m^{-1}/\text{dm}^3\text{ s}^{-1}\text{ mmol}^{-1}$
D-KDG	25,7 ( $\pm 1,2$ )	28,2	1,1
D-KDGal	9,9 ( $\pm 0,4$ )	6,8	0,7

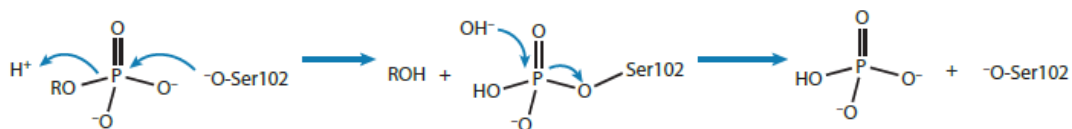
Iz navedenih podataka vidimo da su u oba slučaja kinetički parametri za nativnu funkciju veći. Konstanta specifičnosti  $k_{cat}/K_m$  glukoza-dehidrogenaze je veća za promiskuitetni supstrat što je zapravo vrlo rijetko jer nativne reakcije uglavnom imaju veću konstantu specifičnosti kao što je to slučaj kod KDG-aldolaze. Također, za enzim glukoza-dehidrogenaza pokazano je da je nije izrazito stereospecifična i može reagirati s mnogim epimerima glukoze. Točnije, enzim pokazuje stereoselektivnost prema C2 i C3 atomima, dok konfiguracija C4 manje utječe.

Tablica 4. Usporedba reakcija raznih šećera s enzimom glukoza-dehidrogenaza u odnosu na nativnu reakciju oksidacije D-glukoze. Reakcije su provedene pri pH 7.5 i  $t=70^{\circ}\text{C}$ . (preuzeto iz ref. 9)

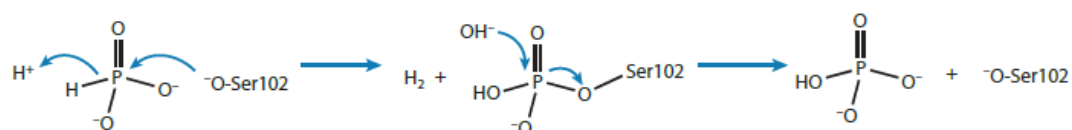
Substrate	Relative rate %	
	NAD <sup>+</sup>	NADP <sup>+</sup>
D-Glucose	83	100
D-Galactose	53	12
D-Allose	0	0
D-Mannose	0	0
D-Idose	3	1
D-Xylose	72	8
L-Arabinose	95	99
D-Ribose	<1	<1
D-Lyxose	6	5
D-Arabinose	0	0
L-Xylose	0	0
L-Threose	0	0
D-Glucosamine	9	2
2-Deoxy-D-glucose	2	<1
6-Deoxy-D-glucose	49	57
D-Fucose	51	10
Maltose	1	<1
Lactose	<1	1
Sucrose	1	1

Još jedan primjer u kojemu promiskuitetna i nativna reakcija dijele istu konfiguraciju aktivnog mjesta su alkalne fosfataze, točnije fosfatna monoesteraza koja može promiskuitetno katalizirati fosfodiesterne, fosfoamide, sulfatne estere i fosfite. Pretpostavlja se da je za sve ove reakcije sličan katalitički mehanizam koji uključuje nukleofilni napad Ser102 i stabilizaciju negativno nabijenog intermedijera pomoću iona  $\text{Zn}^{2+}$  i Arg166.

Hidroliza fosfatnih monoestera



Hidroliza fosfita



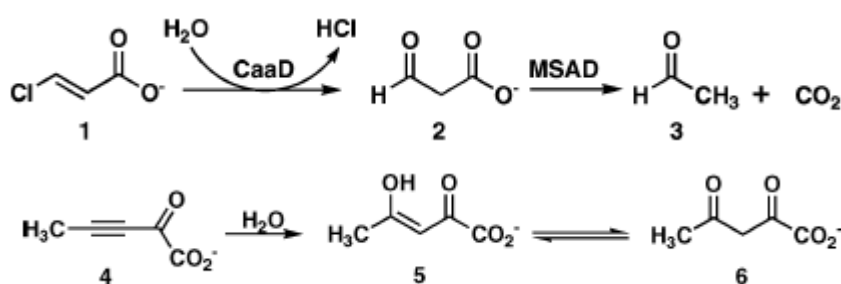
Slika 4. Prikaz reakcija hidroliza fosfatnih monoestera i fosfita u alkalnim fosfatazama. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 5)



Iako se sam mehanizam odvija na vrlo sličan način, interakcije enzima i nativnog supstrata u ovom slučaju su znatno povoljnije od interakcija enzima i promiskuitetnog supstrata kao i kod ostalih promiskuitetnih aktivnosti ovog enzima.

Iz ovih nekoliko primjera možemo zaključiti da iako se nativne i promiskuitetne reakcije odvijaju u istom aktivnom mjestu, interakcije koje se ostvaruju između enzima i nativnog, odnosno promiskuitetnog supstrata su raznolike i utječu na učinkovitost enzima.

Ponekad u istom aktivnom mjestu katalitički aktivan bočni ogranak može imati različite funkcije ovisno o protonacijskom stanju. Tako primjerice u tautomeraznoj superobitelji enzimi posjeduju katalitički aktivan prolin na amino kraju enzima, ali mehanizam katalize ovisi o njegovom  $pK_a$ . Kod 4-oksaloakrobonat tautomeraze  $pK_a$  Pro1 iznosi 6,4 te se ponaša kao baza, ali dio je protoniran te se može ponašati kao kiselina i pokazuje slabu promiskuitetnu hidrataznu aktivnost. S druge strane, malonat-polualdehid-dekarboksilaza (MSAD) pokazuje značajnu promiskuitetnu hidrataznu aktivnost, ponajviše iz razloga što je Pro u protoniranom obliku. Ovaj enzim katalizira dekarboksilaciju 3-oksopropoata uz  $NAD(P)^+$  pri čemu nastaje malonat,  $NAD(P)H$  i  $H^+$ .

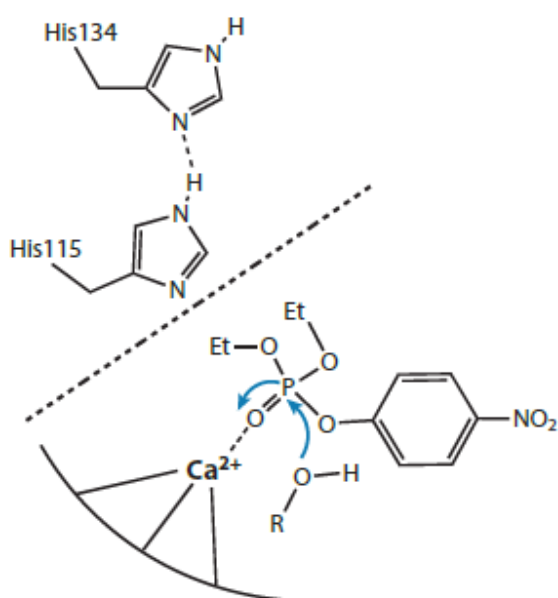


Slika 5. Gornja reakcija prikazuje nativnu aktivnost MSAD enzima, dok donja reakcije prikazuje promiskuitetnu hidrataznu aktivnost. (preuzeto iz ref. 10)

Mehanizam katalize nativne reakcije ovog enzima nije poznat, ali usprkos tome određeni su kinetički parametri nativne i promiskuitetne aktivnosti. Za nativnu reakciju  $k_{cat}/K_m$  iznosi  $2,2 \times 10^7 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , dok za promiskuitetnu aktivnost iznosi  $6,0 \times 10^2 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Iz ovog vidimo da nativna reakcija je oko četiri reda veličine učinkovitija od promiskuitetne

aktivnosti. Nadalje, pokazano je da micanjem ili Pro1 ili Arg75 enzim gubi hidrataznu aktivnost što upućuje da su oni ključni u katalizi te aktivnosti.<sup>10</sup>

Postoje slučajevi u kojima nativna i promiskuitetna aktivnost koriste istu glavnu značajku aktivnog mjesta, ali se kataliza razlikuje u ostatku katalitičke mašinerije. Jedan od bolje istraženih primjera je serumska paraoksonaza (PON1), laktonaza koja posjeduje promiskuitetne esterazne i fosfotriesterazne aktivnosti. Glavna značajka PON1 enzima je katalitički aktivan  $\text{Ca}^{2+}$  ion koji leži na dnu hidrofobnog džepa. Hidroliza laktona odvija se pomoću His115-His134 katalitičke dijade koja služi za aktivaciju vode, stvarajući snažniji nukleofil ( $\text{OH}^-$ ). Promiskuitetna fosfotriesterazna aktivnost ne koristi tu katalitičku dijadu za samu katalizu, već ovisi o drugim aminokiselinskim bočnim ograncima koji će djelovati kao baze ili nukleofili.<sup>5</sup>



Slika 7. Prikaz interakcije promiskuitetnog supstrata paraoksona i aktivnog mjesta enzima PON1. (preuzeto iz ref. 5).

Micanjem histidinskih bočnih ogranka pokazano je da enzim gubi laktonaznu aktivnost, ali i da se povećava učinkovitost fosfotriesterazne aktivnosti oko 300 puta za određene organofosfatne supstrate.<sup>5</sup>

Osim konfiguracije aktivnog mjesta, protonacijskih stanja aminokiselina i funkcija aminokiselina, voda isto može utjecati na pojavljivanje promiskuitetnih aktivnosti. Postoji

moгуćnost stvaranja vodikovih veza posredovanih vodom između supstrata i bočnih ogranaka enzima. Voda može djelovati kao nukleofil, baza, kiselina ili čak pufer u katalizi. Za sada se još ne zna puno o katalizi promiskuitetnih reakcija potpomognutih vodom. Promiskuitetne aktivnosti mogu se pojaviti i kao posljedica promjene afiniteta enzima prema kofaktoru ili zamjenom metalnog centra unutar enzima.<sup>5</sup>

Nativna i promiskuitetna aktivnost razlikuju se po učinkovitosti, a to se očituje po razlikama u vrijednostima  $K_m$  i  $k_{cat}$ . Reakcije enzima i promiskuitetnih supstrata često imaju visoku vrijednost  $K_m$ , ali jednako tako je vrijednost  $k_{cat}$  niža što rezultira nižim  $k_{cat}/K_m$  vrijednostima. Manja katalitička učinkovitost može biti posljedica manje povoljnih interakcija između enzima i promiskuitetnog supstrata, ali i vrste interakcija. Nativni supstrati češće stupaju u interakcije koje su entalpijski povoljnije poput stvaranja kovalentnih intermedijera ili vodikovih veza, dok interakcije s promiskuitetnim supstratima se temelje na hidrofobnim i sličnim interakcijama koje imaju temeljno entropijski doprinos.<sup>5</sup>

Kao što je već navedeno, enzimске superobitelji obuhvaćaju enzime koji, iako kataliziraju potpuno drugačije reakcije s različitim supstratima, imaju zajedničke elemente katalitičke strategije. Analizom dostupnih podataka sumiranih u ref (5) o nativnim i promiskuitetnim reakcijama koje kataliziraju enzimi unutar istih (super)obitelji dovela su do nekoliko zaključaka koji nam govore više o samom promiskuitetu, ali i o utjecaju promiskuiteta na evoluciju enzimskih aktivnosti:

1. Nativna funkcija jednog člana obitelji može biti promiskuitetna funkcija drugog
2. Ista promiskuitetna funkcija pojavljuje se kod više članova obitelji
3. Magnituda promiskuiteta varira od člana do člana
4. Laboratorijska evolucija jedne promiskuitetne aktivnosti često dovodi do pojavljivanja druge, to jest otkriveno je da u reakcijama enzima unutar istih (super)obitelji sa nativnim i promiskuitetnim supstratima se pojavljuje evolucijski intermedijer. Aktivnosti koje su nađene kod evolucijskog intermedijera se često pojavljuju i kod drugih članova (super)obitelji, ili kao native ili kao promiskuitetne funkcije.<sup>5</sup>

### 2.3. Evolucijski aspekt promiskuiteta enzima

Enzimi kakve danas poznajemo su vrlo specifični i efikasni, ali postoje pretpostavke da to nije uvijek tako bilo. R. A. Jensen je još 1974. predložio hipotezu po kojoj su enzimi nekada bili multispecifični, odnosno jedan enzim je katalizirao cijeli niz reakcija, te da su s vremenom enzimi postali specifični. On je također pretpostavio poveznicu između promiskuiteta enzima i evolucije proteina. Pretpostavlja se da su prve stanice imale male genome i da enzimi koje su posjedovale su morali katalizirati cijeli niz reakcija kako bi život uopće mogao opstati. Isto tako regulacijski mehanizmi su vrlo vjerojatno bili nerazvijeni. Na taj način bila je moguća maksimalna biokemijska fleksibilnost uz minimalnu količinu genetičkog materijala. Duplikacije gena, odnosno povećanje količine genetičkog materijala omogućile su divergenciju u evoluciji enzima, a razvitak regulacijskih mehanizama omogućio je povećanje specifičnosti.<sup>11</sup>

Daljnja istraživanja divergencije unutar enzimskih (super)obitelji podržavaju hipotezu da su promiskuitetne aktivnosti bile polazne točke za evoluciju novih funkcija, ali ti dokazi nisu čvrsti i ne pružaju uvid u mehanizme niti u mutacije koje su dovele do razvitka novih funkcija. Prvi problem je opis tih mutacija koje su nastupile jer današnji enzimi, čak i unutar istih (super)obitelji, međusobno se razlikuju u 30% do 80% aminokiselinskog slijeda. Također, promjene u sekvencama mogu biti posljedica genetičkog "drifta", odnosno mogu biti posljedica promjene u učestalosti postojećih varijanata gena (alela) . Pretpostavlja se da su mutacije koje dovode do razvitka novih funkcija postepene (jedna po jedna mutacija) i neometajuće (svakom mutacijom nastajao je novi enzim koji je na nekoj razini bio funkcionalan).<sup>5</sup>

Unatoč svim navedenim problemima provedena su mnoga istraživanja koja otkrivaju više informacija o ulozi promiskuiteta u evoluciji enzima. U jednom od takvih istraživanja ispitivane su laboratorijski usmjerene evolucije serumske paraoksonaze (PON1), bakterijske fosfotriesteraze (PTE) i ugljične anhidraze (CAII) u laboratoriju. Pomoću PCR-a sklonom pogreškama generirani su enzimi koji posjeduju slučajne mutacije, a mutanti su selektirani pomoću primjene selekcijskog stresa na način da se poveća samo jedna promiskuitetna aktivnost. Fokus je bio na ranim novim enzimima kod kojih su mutacije izazvale povećanje promiskuitetne aktivnosti. Opaženo je da povećanje efikasnosti promiskuitetne aktivnosti

pomoću mutacija se ne utječe znatno na efikasnost nativnih funkcija. Također, činjenica da multispecifični enzimi, poput PON1, mogu brzo poprimiti novu funkciju i divergirati prema stanju gdje je ta nova funkcija primarna podržava hipotezu da je promiskuitet ključan u evoluciji. Nadalje, PTE i CAII, koji su inače veoma specifični enzimi, laboratorijskom evolucijom poprimaju nove funkcije te postaju multispecifični jer nema velikog utjecaja na učinkovitost nativne funkcije. Iz toga proizlazi pretpostavka da enzimi u evoluciji novih funkcija prelaze iz specijalista u multispecifične enzime kako bi se na kraju dobili novi, prenamijenjeni enzimi.<sup>12</sup>

Kako bi promiskuitetna aktivnost enzima postala nativna funkcija novog enzima moraju biti ispunjena tri osnovna uvjeta:

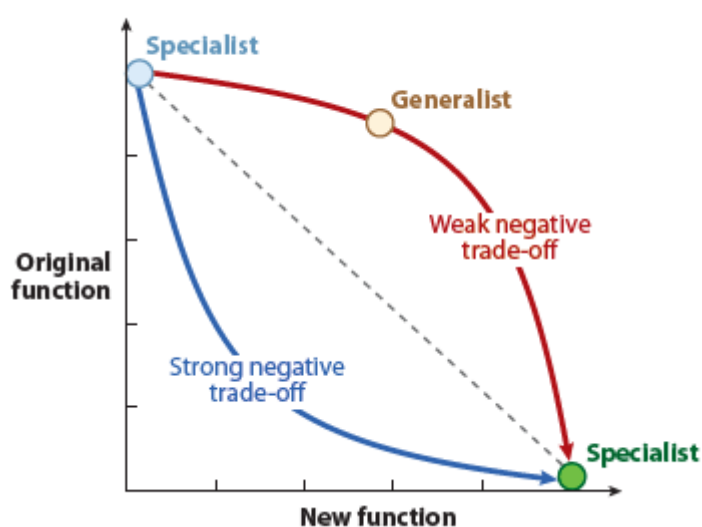
1. Promiskuitetna aktivnost pruža fiziološku prednost i zato može biti odabrana.
2. Jednom kada promiskuitetna aktivnost postane fiziološki relevantna može se poboljšati kroz jednu (ili nekoliko) mutacija, a da ne nestane nativna funkcija tog enzima.
3. Divergencijski put je završen kada se dobije novi specijalizirani enzim čija promiskuitetna funkcija postaje nativna.<sup>5</sup>

Postoje mnogi dokazi da pojava slabih promiskuitetnih aktivnosti može pružiti selekcijsku prednost organizmu, najčešće kao posljedica nekog nedostatka stvorenog u laboratorijskim uvjetima. Jedan od primjera uključuje već spomenutu, mogućnost preživljavanja *E.coli* na hranjivoj podlozi gdje je jedini izbor fosfora fosfit ( $\text{HPO}_3^{2-}$ ) nakon uklanjanja operona *phn*. U tom slučaju došlo je do povećane ekspresije alkalnih fosfataza.<sup>6</sup> I kod drugih enzima primijećeno je da organizmi kompenziraju manju efikasnost promiskuitetnih aktivnosti povećanom ekspresijom enzima koji ju posjeduju te na taj način promiskuitetne reakcije mogu postati fiziološki relevantne.<sup>5</sup>

Evolucijska adaptabilnost je kapacitet biološkog sustava (bilo enzima ili organizma općenito) da evoluiru, a opisuju je dvije značajke - plastičnost i robusnost. Plastičnost se odnosi na pojavu novih fenotipskih značajki uz relativno mali broj mutacija, a robusnost se odnosi na to da organizmi posjeduju mehanizme pomoću kojih smanjuju letalnost mutacija jer

većina mutacija vodi k ozbiljnom narušavanju strukture i/ili aktivnosti. Iako naizgled ove dvije značajke su kontradiktorne, prema informacijama kojima se za sada raspolaže, one zajedno omogućuju razvoj novih korisnih funkcija ukoliko mutacije ne utječu na nativnu funkciju.<sup>12</sup> Zanimljivo je da većina opaženih mutacija kod pojava promiskuitetnih aktivnosti su upravo bile na području aktivnog mjesta enzima, a utjecaj na efikasnost nativnih funkcija nije bio velik. Na primjer, kod  $\alpha$ -litične proteaze, zbog strukturne fleksibilnosti, zamjenom samo jedne aminokiseline učinkovitost promiskuitetne aktivnosti se povećava za  $10^5$ , dok se učinkovitost nativne aktivnosti samo dva puta smanji.<sup>5,12</sup>

Iako prema drugom postulatu evolucija nove aktivnosti ne bi smjela jako utjecati na nativnu, krajnji rezultat je gubitak te funkcije u svrhu dobivanja nove, ali ne smije se zanemariti put kojim se taj proces odvija. Postoje tri načina na koja se divergencija može odviti, a koji su prikazani na slici 8. U prvom slučaju nativna funkcija enzima se brzo gubi u korist nove funkcije te takav proces često zahtjeva puno generacija mutacija i selekcije kako bi došlo do potpune divergencije; prikazano plavom linijom. Isprekidanom linijom prikazan je slučaj kada se gubitak nativne i poprimanje nove funkcije odvijaju linearno. Crvenom linijom opisana je evolucija nove funkcije putem evolucijskog intermedijera (generalist) gdje je gubitak nativne funkcije puno sporiji. Također, u ovom slučaju je moguća spontana evolucija specijalista jer nativna funkcija postaje sve manje značajna.<sup>5,13</sup>



Slika 8. Prikaz mogućih načina divergencije promiskuitetne i nativne funkcije. (preuzeto iz ref. 5)

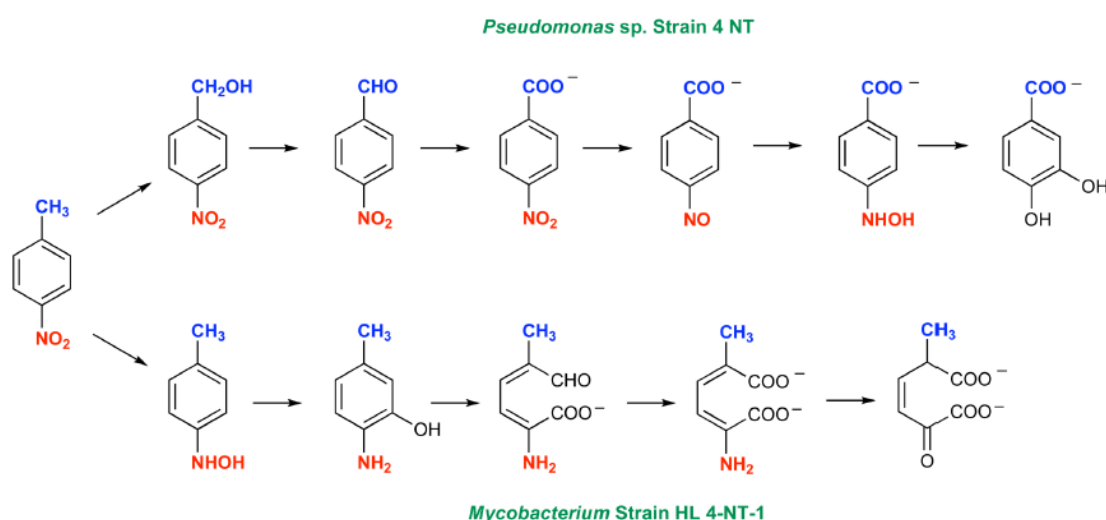
Važno je napomenuti da iako mutacije na enzimima mogu dovesti do nastajanja novog enzima one puno češće dovode do smanjenja stabilnosti samog enzima. Većina mutaciju su destabilizirajuće i dovode do smanjenja količine enzima u stanici. Količina enzima se smanjuje jer mutacije uzrokuju pogrešno smatanje i agregaciju enzima te ih čine podložnima za proteolitičku razgradnju. Gotovo trećina mutacija koje se pojavljuju su delecijske, dok svega mali dio čine mutacije koje rezultiraju pojavom novih aktivnosti.

Mehanizmi koji dovode do divergencije i stvaranja novih gena za sada još nisu poznati, ali postoji nekoliko modela koji pokušavaju objasniti tu pojavu. Prvi, i najpoznatiji model, je Ohnov model, koji pretpostavlja da je duplikacija gena čest događaj u stanici i da je podložan mutacijama. Model pretpostavlja da duplikacija nema ni pozitivne ni negativne učinke, niti da prolazi kroz ikakvu selekciju. Tek u trenutku kada je organizmu potrebno, pod utjecajem pozitivne selekcije, dolazi do pojavljivanja novih funkcija. Problem kod ovoga je taj da većina dupliciranih gena koji su nađeni u postojećim genomima ipak prolazi kroz selekciju koja miče delecijske mutacije. Također, mRNA koja nosi nepotrebne informacije je veoma energetski skupa i onda prolazi kroz selekciju. Alternativni modeli koji su predloženi također pretpostavljaju da je duplikacija gena ključna za divergenciju novih funkcija, ali pretpostavljaju da duplikaciji prethodi određena selekcija.<sup>5</sup>

## **2.4. Primjena promiskuiteta enzima i evolucijske adaptabilnosti enzima**

Pojava promiskuitetnih aktivnosti kod enzima vrlo je zanimljiva pojava sama po sebi, ali može biti i vrlo korisna i primjenjiva. Mogućnost enzima da evoluiraju i adaptiraju se može biti izvrsno rješenje za razgradnju antropogenih tvari. Kemikalije koje se koriste u poljoprivredi, industriji, ali i u svakodnevnom životu često nisu biorazgradive i mogu biti štetne za okoliš. Primjerice, za razgradnju jedne plastične boce potrebno je gotovo 500 godina. Suprotno tome, antrazin, jedan od najčešće korištenih pesticida se vrlo brzo razgrađuje. Na područjima koja su bila kontaminirana antrazinom pronađeni su organizmi koji ga mogu metabolizirati. Pretpostavlja se da su enzimi koje posjeduju takvi organizmi zapravo evoluirali iz enzima koji su imali promiskuitetne aktivnosti koje su mogle metabolizirati antrazin.<sup>14</sup>

Kako bi uopće bilo moguće razviti efikasne metode za iskorištavanje promiskuitetnih aktivnosti u svrhu razgradnje antropogenih tvari potrebno je prvo razmotriti nekoliko bitnih faktora koji mogu utjecati na efikasnost potencijalne biorazgradnje. Prvo, različiti organizmi će razviti potpuno različite strategije, ovisno o skupu enzima koje već posjeduju. Primjerice, Gram-pozitivna bakterija *Mycobacterium* soj HL 4-NT i Gram-negativna bakterija *Pseudomonas sp.* soj 4NT razgrađuju 4-nitrotoulen na potpuno različite načine, prikazano na slici 9.



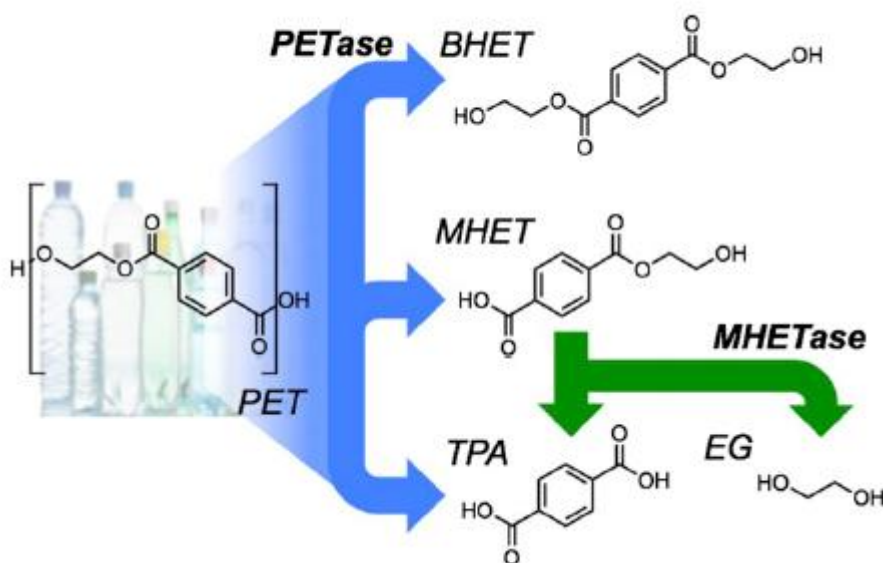
Slika 9. Put razgradnje 4-nitrotoulena u dva različita organizma. (preuzeto iz ref. 14)

Nadalje, razina promiskuitetnih aktivnosti varira među ortolognim enzimima u različitim organizmima, odnosno u nekim organizmima promiskuitetna aktivnost neće biti dovoljno učinkovita kako bi postala fiziološki relevantna. Treći faktor koji utječe na potencijal iskorištavanja promiskuitetnih aktivnosti je dostupnost enzima koji sadrži traženu promiskuitetnu aktivnost. To znači da enzim kojeg organizam ima u izobilju će možda biti bolji odabir iako može postojati efikasniji katalizator koji je pod strožom kontrolom. Također, kako bi organizmi mogli preživjeti potrebno je da enzimi čija se promiskuitetna aktivnost želi iskoristiti ne utječe na nativnu aktivnost.<sup>14</sup>

Za sada ne postoje učinkovite metode kojima možemo kvalitetno sustavno pretraživati potencijalne promiskuitetne aktivnosti niti ih evoluirati u laboratorijskim uvjetima, ali postoje



metode pomoću kojih možemo povećati učinkovitost onih koje su nađene u prirodi. Jedan od primjera je nedavno otkrivena bakterija *Ideonella sakaiensis* 201-F6 koja može razgraditi plastiku, točnije polietilen tereftalat (PET). Otkriveno je da organizam sadrži enzim PET-azu koji razgrađuje PET na mono(2-hidroksietil)tereftaltnu kiselinu (MHET) i enzim MHET-azu koji razgrađuje MHET na tereftaltnu kiselinu (TPA) i etilenglikol.<sup>15</sup>



Slika 10. Shematski prikaz razgradnje PET na MHET, a zatim na TPA i etilenglikol. (preuzeto iz ref. 15)

Proučavanjem strukture enzima PET-aza otkriveno je da sadrži strukturni motiv  $\alpha/\beta$ -hidrolazni preklop (eng.  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold) koji se sastoji od osam  $\beta$  ploča i šest  $\alpha$ -zavojnica. Također, otkriveno je da u mehanizmu sudjeluje katalitička trijada koju čine Ser160, Asp206 i His237. Takva struktura je slična bakterijskim kutinazama i lipazama. Kako bi se bolje istražila PET-azna aktivnost PET je inkubiran u tri različite otopine od kojih je jedna sadržavala samo pufer, drugo divlji tip PET-aze, a treća dvostruko mutirani oblik PET-aze kod kojeg je aktivno mjesto bilo sličnije kutinazama, za koje se pretpostavlja da su prethodnice PET-aze. Mutirani oblik PET-aze se pokazao učinkovitijim što upućuje na to da daljnjim istraživanjima postoji mogućnost optimizacije ovog enzima, ali i mnogih drugih.



## § 3. LITERATURNI IZVORI

1. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, četvrto izdanje, W.H. Freeman and Company, New York, 2005., str. 191-223
2. [www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/](http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/) (datum pristupa 28. lipnja 2018.)
3. <http://genomebiology.com/2006/7/1/R8> (datum pristupa: 2.srpnja 2018.)
4. Nath A, Atkins WM. *Biochemistry*, **47**, (2008) 157–166.
5. O. Khersonsky, D. S. Tawfik, *Annu. Rev. Biochem.* **79** (2010) 11.1–11.35.
6. K. Yang, W. W. Metcalf, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101** (2004) 7919–7924.
7. A. Macchiarulo, I. Nobeli, J. M. Thornton, *Nat. Biotechnol.* **22**, (2004) 1039–1045.
8. A. Theodossis, H. Walden, E.J. Westwick, H. Connaris, H.J. Lambale, et al. *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 43886–43892.
9. H.J. Lambale, N.I. Heyer, S.D. Bull, D.W. Hough, M.J. Danson., *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 34066–34072.
10. G.J. Poelarends, H. Serrano, W.H.Jr. Johnson, D.W. Hoffman, C.P. Whitman, *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004) 15658–15659.
11. R.A. Jensen. *Annu. Rev. Microbiol.* **30**, (1974) 409–425.
12. A. Aharoni, L. Gaidukov, O. Khersonsky, G.S. McQ, C. Roodveldt, D.S. Tawfik, *Nat. Genet.* **37**, (2005) 73-76.
13. O. Khersonsky, C. Roodveldt, D.S. Tawfik, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10** (2006) 498–508.
14. S.D. Copley, *Nat. Chem. Biol.* **5** (2009) 559–566.
15. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1718804115](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1718804115) Austin et (datum pristupa : 17.4.2018.)
16. RCSB Protein Data Bank, <https://www.rcsb.org/structure/2F9Y>, (Datum pristupa:23.8.2018.)