

# Promiskuitet enzima:

---

**Prpić, Mateja**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

*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:217:786331>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-14**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijски odsjek

Mateja Prpić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **PROMISKUITET ENZIMA: EVOLUCIJSKI I MEHANISTIČKI ASPEKTI**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Zagreb, 2019. godina.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

28. kolovoza 2019.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

20. rujna 2019.

Mentor rada: doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Potpis:



## Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Enzimi .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Građa enzima.....	1
1.1.2. Nomenklatura.....	2
<b>1.2. Enzimski kataliza .....</b>	<b>3</b>
1.2.1. Kinetika enzimski kataliziranih reakcija.....	3
1.2.2. Michaelis – Menten model za enzimski katalizirane reakcije .....	5
1.2.3. Mehanizmi enzimski katalize .....	7
1.2.4. Načini regulacije enzimski aktivnosti.....	8
<b>§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1. Promiskuitet enzima .....</b>	<b>10</b>
<b>2.2. Evolucijski aspekti promiskuiteta enzima .....</b>	<b>12</b>
<b>2.3. Mehanistički aspekti promiskuiteta enzima .....</b>	<b>15</b>
<b>2.4. Primjena enzimskog promiskuiteta.....</b>	<b>20</b>
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XXIII</b>



## § Sažetak

Enzimi su biološki katalizatori. Oni ubrzavaju kemijske reakcije ne mijenjajući konstantu ravnoteže već smanjujući energiju aktivacije. Po svom sastavu su proteini, s tim što postoje i katalitički aktivne ribonukleinske kiseline koje se nazivaju ribozimi. Imenuju se prema specifičnim pravilima koja jasno opisuju reakcije koje određeni enzimi kataliziraju. Izrazito su specifični što znači da svaki enzim katalizira točno određenu reakciju, odnosno ima aktivno mjesto prilagođeno za određeni supstrat. Aktivno mjesto je ono u kojem se odvija pretvorba supstrata u produkt preko nastanka enzim – supstrat kompleksa. Enzimski katalizirane reakcije opisuju se Michaelis – Menten modelom iz kojeg se izvodi izraz koji povezuje početnu brzinu reakcije s koncentracijom supstrata te se iz njega mogu dobiti sve informacije o promatranoj reakciji. Isto tako postoje različiti mehanizmi enzimski kataliziranih reakcija kao i načini regulacije enzimske aktivnosti.

Specifičnost enzima dovedena je u pitanje nakon što je definiran pojam koji se naziva promiskuitet enzima. To je svojstvo enzima da katalizira dodatne reakcije pored glavne reakcije koju katalizira. Ove dodatne reakcije su uglavnom mnogo sporije od glavne reakcije koju katalizira promiskuitetni enzim. Iako su dodatne reakcije fiziološki irelevantne, promiskuitet enzima s evolucijskog stajališta može se reći da služi kao početna točka za razvoj novih funkcija enzima kroz mutacije ili usmjerenu laboratorijsku evoluciju. Mehanistički aspekt nastoji objasniti zašto dolazi do promiskuiteta enzima.

Zaključak je da promiskuitetne aktivnosti enzima nisu loše već su vrlo korisne te, između ostalog, pomažu razvoju biotehnoloških sustava.



## § 1. UVOD

### 1.1. Enzimi

Enzimi su biološki katalizatori. Oni su važan dio bioloških sustava jer je većina reakcija u njima prespora pri standardnim uvjetima koji postoje u stanici kao što su pH, temperatura i sl.

U odnosu na kemijske katalizatore ili nekatalizirane reakcije biološki katalizatori imaju znatne prednosti. Neke od njih su: efikasnost što znači da je faktor ubrzanja veći ( $10^6 - 10^{12}$  u odnosu na nekataliziranu reakciju te nekoliko redova veličine u odnosu na kemijski kataliziranu), blaži reakcijski uvjeti kao što je aktivnost pri fiziološki relevantnim temperaturama ili neutralan pH za razliku od visokih temperatura i velikih tlakova kod kemijski kataliziranih reakcija, specifičnost prema supstratima i produktima pri čemu nema nusprodukata, te regulacija aktivnosti kao što su alosterička kontrola ili kontrola reverzibilnim kovalentnim modifikacijama.

Enzimi kataliziraju reakciju snižavanjem energije aktivacije odnosno energije koju je potrebno dovesti sustavu kako bi ušao u reakciju. Nadalje, oni ne mijenjaju konstantu ravnoteže nego povećavaju brzinu kojom sustav dolazi u ravnotežu pri čemu reakcijski mehanizam može biti isti ili različit od kemijski katalizirane ili nekatalizirane reakcije.<sup>1</sup>

#### 1.1.1. Građa enzima

Svi enzimi, osim male skupine katalitičkih RNA, su po svojoj građi proteini. Katalitička aktivnost ovisi o integritetu njihove native konformacije što znači ako je enzim denaturiran, disociran na svoje podjedinice ili pak reguliran negativnim alosteričkim modulatorom, njegova katalitička aktivnost je izgubljena.

Isto tako, neki enzimi su svojom strukturom dostatni kako bi katalizirali kemijsku reakciju dok drugi zahtijevaju pomoć u vidu kofaktora (anorganskih iona kao što su  $\text{Fe}^{2+}$  ili  $\text{Mg}^{2+}$ ) i organskih ili metaloorganskih molekula koje se nazivaju koenzimi. Navedene kemijske komponente, koje su čvrsto vezane za enzim najčešće kovalentnom vezom, nazivaju se prostetičke skupine. Enzim sa svojom prostetičkom skupinom naziva se holoenzim dok se proteinski dio takvog enzima naziva apoenzim.<sup>1</sup>

### 1.1.2. Nomenklatura

Nomenklatura enzima sastoji se od dodatka sufiksa „-aza“ imenu supstrata za određeni enzim ili je to riječ koja opisuje samo aktivnost enzima. Tako npr. ureaza katalizira hidrolizu ureje, dok DNA polimeraza katalizira polimerizaciju nukleotida kako bi formirali DNA.

Međutim, postoje i enzimi koje su imenovali njihovi otkrivači za funkciju koju obavljaju dok još specifične reakcije katalize nisu bile poznate. Npr. enzim za koji se znalo da sudjeluje u probavi hrane nazvan je pepsin od grčke riječi „pepsis“ što znači „probava“.

Nadalje, postoje enzimi koji imaju dva ili više imena i postoje dva ili više enzima koji imaju isto ime. Zbog takve dvosmislenosti i konstantnog porasta broja novootkrivenih enzima usvojen je sustav imenovanja i klasifikacije enzima. On dijeli enzime u šest skupina s određenim podskupinama koje se odnose na reakcije koje enzimi kataliziraju. Svakom enzimu je dodijeljeno ime koje se sastoji od četiri broja koja se nazivaju engl. *Enzyme commission number* (E.C.) i sistematskog imena, koje govori o kataliziranoj reakciji.<sup>1</sup>

Tablica 1. Osnovna nomenklatura enzima (preuzeto iz ref. 1)

Broj	Skupina	Vrsta katalizirane reakcije
1	Oksidoreduktaze	Prijenos elektrona
2	Transferaze	Prijenos pojedinih skupina
3	Hidrolaze	Reakcije hidrolize
4	Liaze	Adicija pojedinih skupina na dvostruku vezu ili nastajanje iste eliminacijom pojedinih skupina
5	Izomeraze	Prijenos pojedinih skupina unutar molekule kako bi se formirale izomerne forme
6	Ligaze	Nastajanje C-C, C-S, C-O te C-N veza reakcijama kondenzacije spregnutim s cijepanjem ATP-a

Npr. enzim ATP:glukoza fosfotransferaza je enzim koji katalizira prijenos fosforilne skupine s ATP-a na molekulu glukoze pri čemu nastaju ADP i glukoza – 6 – fosfat. E.C. broj ovog enzima je 2.7.1.2. pri čemu se 2 odnosi na ime skupine – transferaza, 7 se odnosi na ime podskupine –

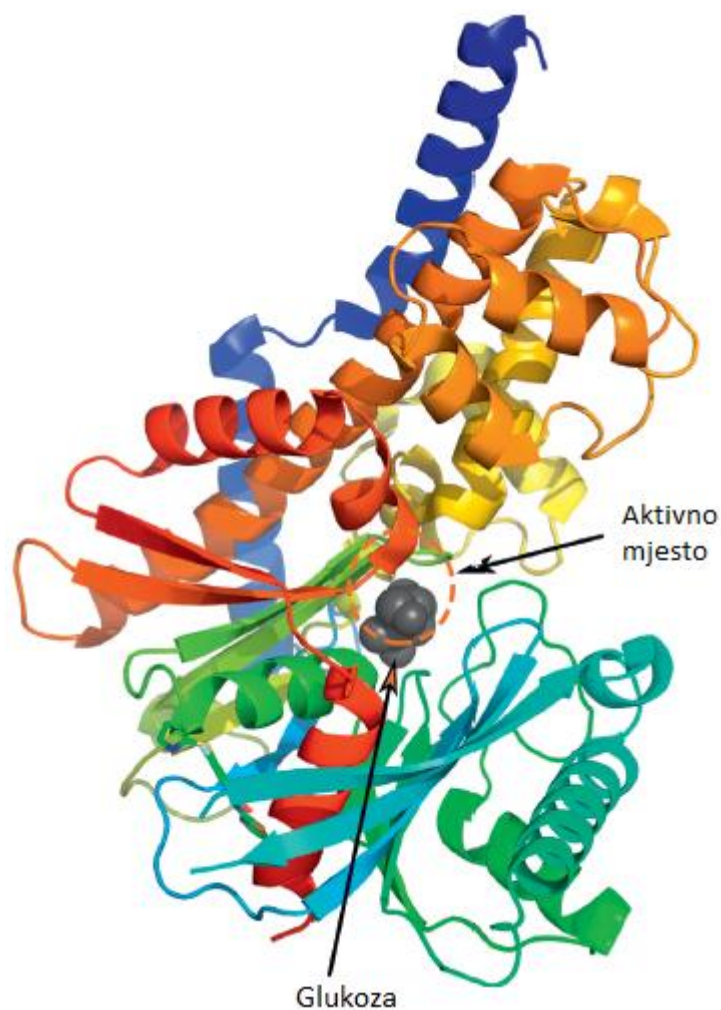
fosfotransferaza, 1 na trećoj poziciji se odnosi na fosfotransferazu s hidroksilnom skupinom kao akceptorom, dok se 2 na četvrtoj poziciji odnosi na glukozu s fosforilnom skupinom kao akceptorom.<sup>2</sup>

## 1.2. Enzimska kataliza

### 1.2.1. Kinetika enzimski kataliziranih reakcija

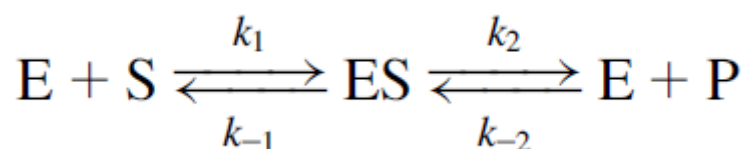
Enzimi su izrazito specifični i obično kataliziraju samo jednu vrstu reakcije. Npr. piruvat-kinaza katalizira prijenos fosfatne skupine samo s fosfoenolpiruvata (PEP) na adenzin difosfat (ADP) tijekom glikolize. Enzimi pokazuju i stereoizomernu specifičnost. Npr. ljudska  $\alpha$ -amilaza katalizira hidrolizu glukoze iz škroba ali ne i iz celuloze. Razlika je u tome što, iako i škrob i celuloza predstavljaju skladište glukoze, u škrobu su molekule glukoze povezane  $\alpha(1-4)$  a u celulozi  $\beta(1-4)$ -glikozidnom vezom.

Kataliza reakcije započinje kada se enzim veže za supstrat kako bi stvorio enzim – supstrat (ES) kompleks. U pravilu, molekule enzima su puno veće od molekula supstrata. Iznimka su proteinaze, nukleaze i amilaze koje se ponašaju kao makromolekulski supstrati. Međutim, bez obzira na veličinu, vezanje enzima na supstrat na koji on djeluje, odvija se u specifičnom području koje se naziva aktivno mjesto. Ono se uglavnom nalazi blizu površine enzima. Kataliza reakcije se odvija upravo na tom mjestu jer se različite aktivne skupine supstrata, koje su važne u reakciji katalize, na taj način mogu naći na jednom mjestu kako bi se olakšala reakcija. Jedinstvena katalitička svojstva enzima posljedica su njegove trodimenzionalne strukture i aktivnog mjesta u kojem se nalaze sve njegove aktivne skupine raspoređene duž polipeptidnog lanca. Specifičnost enzima prema supstratu može se opisati „ključ – brava“ mehanizmom, odnosno da samo jedan enzim savršeno pristaje samo jednom supstratu.



Slika 1. Prikaz aktivnog mjesta enzima glukokinaze i vezanog supstrata unutar njega. (Preuzeto i prilagođeno prema ref. 3)

Reakcija uključuje pretvorbu supstrata [S] u produkt [P] s nastankom prethodno spomenutog kompleksa ES te se može opisati jednačbom:



Slika 2. Jednačba koja prikazuje pretvorbu supstrata u produkt preko nastanka enzim – supstrat kompleksa. (Preuzeto iz ref. 3)

U navedenoj jednačbi  $k$  predstavlja konstantu brzine reakcije, pozitivni indeksi označavaju reakciju koja vodi prema nastanku produkta a negativni onu koja vodi prema nastanku

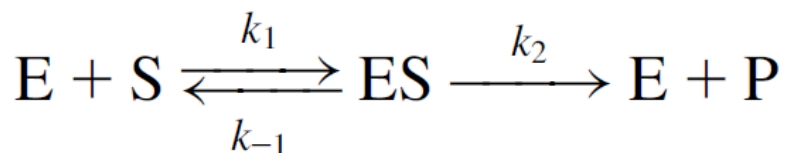
reaktanta, odnosno u suprotnom smjeru. Budući enzimi povećavaju stupanj pojedinih reakcija, snižavajući energiju aktivacije, enzimski katalizirane reakcije su puno brže od nekataliziranih reakcija. Isto tako, budući enzimi ubrzavaju reakciju bez da sami tijekom nje budu promijenjeni ili uništeni, mali broj enzima može katalizirati iznimno velik broj reakcija.

Brzina gotovo svih kemijskih reakcija povećava se s povišenjem temperature. Ono utječe na povećanje prosječne kinetičke energije molekula te rezultira većom frekvencijom sudara unutar molekule i većom mogućnošću prelaska barijere koju predstavlja energija aktivacije. Međutim, pri visokim temperaturama može doći do denaturacije enzima. Stoga za svaki enzim postoji određena temperatura pri kojoj on optimalno djeluje. Ta temperatura je u većini organizama ona pri kojoj se kataliza odvija. Kod ljudi je to uglavnom temperatura od 37° C.

Aktivnost enzima također ovisi o pH zbog toga što većina enzima posjeduje aminokiseline s ionizirajućim bočnim ograncima. Enzimsku aktivnost ovisnu o pH najbolje ocrta zvonolika krivulja koja prikazuje koji je pH optimalan za funkcioniranje određenog enzima. Uglavnom je taj pH isti kao i onaj tekućine u kojoj enzim funkcionira te se kreće između 6 i 8 pri čemu valja napomenuti da je pH ljudske krvi 7,4. Promjene u pH utječu na katalizu ovisno o tome da li su protoni u reaktivnim skupinama aminokiselina koje čine enzim disocirajući ili nedisocirajući. Ionizacija tih skupina ovisi o njihovim  $pK_a$  vrijednostima odnosno kemijskim svojstvima određenih skupina te o pH medija koji taj enzim okružuje. Budući promjene u pH utječu na vezanje supstrata u vezno mjesto enzima kao i na brzinu raspada ES kompleksa moguće je zaključiti da svojstva ionizacijskih skupina, koje se nalaze u aktivnom mjestu enzima, određuju pH pri kojem će taj enzim optimalno funkcionirati.<sup>3-5</sup>

### *1.2.2. Michaelis – Menten model za enzimski katalizirane reakcije*

Mnoge enzimski katalizirane reakcije mogu se opisati pojednostavljenom kemijskom jednačbom u kojoj se drugi korak smatra ireverzibilnim. Takav mehanizam predložili su 1913. godine Michaelis i Menten.

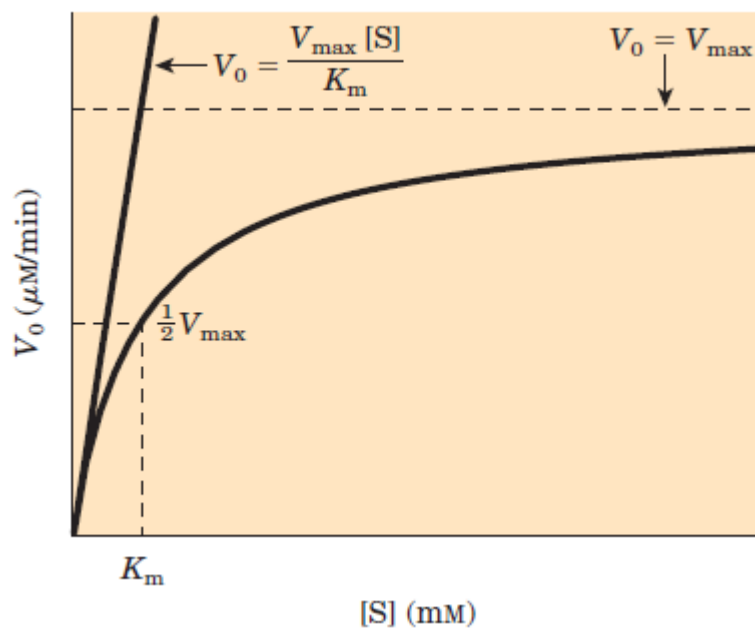


Slika 3. Pojednostavljena jednačba enzimski katalizirane reakcije prema Michaelis – Menten modelu. (Preuzeto iz ref. 3)

Iz ove jednačbe izveden je izraz kojim se opisuju sve enzimski katalizirane reakcije:

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

Ovaj izraz povezuje početnu brzinu enzimski katalizirane reakcije s koncentracijom supstrata konstantom  $K_m$  koje se naziva Michaelisova konstanta te maksimalnom brzinom reakcije  $V_{max}$ .<sup>3</sup>



Slika 4. Prikaz ovisnosti početne brzine reakcije o koncentraciji supstrata. (Preuzeto iz ref.

1)

Za sve enzime kod kojih početna brzina pokazuje hiperbolnu ovisnost o koncentraciji supstrata (slika 4.) kaže se da slijede Michaelis – Menten kinetiku. Isto tako, slijedi da je, kada

koncentracija supstrata odgovara Michaelisovoj konstanti, početna brzina jednaka polovini maksimalne brzine.

Međutim, Michaelis – Menten jednadžba se uglavnom ne odnosi na mehanizam s dva jednostavna koraka koja su navedena. Mnogi enzimi koji prate Michaelis – Menten kinetiku imaju potpuno drugačije mehanizme i kataliziraju reakciju u šest ili osam koraka. U skladu s tim, vrijednosti  $K_m$  ili  $V_{max}$  nisu jednake za sve enzime te one mogu biti eksperimentalno izračunate.

Postoji još jedna konstanta vezana za ovaj model koja se naziva konstanta specifičnosti,  $k_{cat}$ . Ona određuje limitirajući korak, odnosno najsporiji korak u reakciji koja ima više koraka. Još se naziva i obrtni broj, a ekvivalentan je broju molekula supstrata koje su prevedene u molekule produkta u jedinici vremena po jednoj molekuli enzima pri potpunoj zasićenosti enzima supstratom.

Navedena dva kinetička parametra, Michaelisova konstanta i obrtni broj, su izrazito korisna za usporedbu kod različitih enzima bilo da su njihovi reakcijski kompleksi jednostavni ili komplicirani. Svaki enzim ima određene vrijednosti ovih konstanti koje reflektiraju njihovu staničnu okolinu, koncentraciju supstrata koju enzim troši u uvjetima *in vivo*, te svojstva reakcije koja se katalizira. Isto tako, ovi parametri omogućuju vrednovanje učinkovitosti enzima iako sami za sebe nisu dovoljni. To znači da dva enzima koja kataliziraju različite reakcije mogu imati istu vrijednost konstante  $k_{cat}$  ali je brzina tih reakcija dok su nekatalizirane drugačija pa se povećanje brzine djelovanjem enzima razlikuje. Najbolji način za usporedbu katalitičke učinkovitosti enzima pri katalizi dvaju ili više različitih supstrata je računanje konstante specifičnosti. Ona se definira kao omjer  $k_{cat}/K_m$ . Što je iznos ove konstante veći enzim je efikasniji prema danom supstratu. Enzimi čija je konstanta specifičnosti približno jednaka konstanti difuzije nazivaju se kinetički savršenim enzimima a vrijednost te konstante iznosi  $10^8 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .<sup>1</sup>

### 1.2.3. Mehanizmi enzimske katalize

Postoje različiti mehanizmi kojima se odvijaju enzimski katalizirane reakcije. Potpuno razumijevanje takvih mehanizama zahtijeva znanje i razumijevanje svih sudionika reakcije: od supstrata preko kofaktora, regulatora do produkata. Još važnije, zahtijeva se znanje vremenskog slijeda u kojem su reakcijski međuprodukti vezani za enzim, poznavanje strukture svakog

međuprodukta i prijelaznog stanja, brzina prijelaza međuprodukata, strukturni odnos enzima prema svakom međuprojektu te energija koja je uložena u cijeli reakcijski mehanizam.

U navedenom reakcijskom mehanizmu, enzim i supstrat mogu interagirati na različite načine. Jedan od načina je nastajanje kovalentne veze među njima, pri čemu dolazi do snižavanja energije aktivacije odnosno katalize same reakcije. Do nastanka kovalentne veze dolazi nukleofilnim napadom pojedinog bočnog ogranka ili kofaktora unutar enzima na supstrat.

Drugi način je protoniranje i deprotoniranje bočnih ogranka enzima pri različitim vrijednostima pH pri čemu oni mogu poslužiti kao proton – donori ili proton – akceptori u kiselinsko – baznim reakcijama.

I posljednje, ukoliko enzimi sadrže metalne ione, oni elektrostatskim interakcijama mogu stabilizirati prijelazno stanje te na taj način dolazi do snižavanja energije aktivacije odnosno katalize same reakcije. Prijelazno stanje se može stabilizirati i elektrostatskim interakcijama između nabijenih bočnih ogranka enzima i supstrata.<sup>1</sup>

#### *1.2.4. Načini regulacije enzimske aktivnosti*

U staničnom metabolizmu, skupina enzima radi zajedno kako bi se različiti metabolički putevi mogli uspješno odvijati. To znači da produkt jedne enzimski katalizirane reakcije postaje reaktant za iduću reakciju koju katalizira drugi enzim. Svaki metabolički put uključuje jedan ili više enzima koji imaju veći utjecaj od ostalih. Takvi enzimi nazivaju se regulatornim enzimima i oni povećavaju odnosno smanjuju katalitičku aktivnost kao odgovor na pojedine signale. U mnogim multienzimskim putevima, enzim koji katalizira prvu reakciju je ujedno i regulatorni enzim. Aktivnosti pojedinih enzima modulirane su na različite načine. Najčešće su to alosterička regulacija ili regulacija reverzibilnom kovalentnom modifikacijom.

Alosterička regulacija enzima odvija se kroz reverzibilno nekovalentno vezanje regulatornih komponenti koje se nazivaju alosterički modulatori pri čemu treba naglasiti da se regulatorno i aktivno mjesto enzima nalaze u različitim domenama enzima. Vezanje modulatora dovodi do konformacijske promjene enzima pri čemu on prelazi u svoju manje ili više aktivnu formu. To dovodi do zaključka da oni mogu biti stimulatori ili inhibitori enzima. Najčešće je



modulator enzima upravo njegov supstrat te se takvi spojevi nazivaju homotropni. Ukoliko se modulator i supstrat razlikuju, onda se govori o heterotropnim modulatorima. Alosterički enzimi su uglavnom veći i strukturno kompleksniji od neregulatornih enzima te imaju najmanje dvije podjedinice.

Drugi način regulacije enzima je regulacija kovalentnom modifikacijom pojedine aminokiseline unutar enzima. Njih se može regulirati pojedinom modificirajućom skupinom poput hidroksilne ili cijelim proteinom kao što je ubikvitin. Kad je pojedina aminokiselina u enzimu modificirana ona postaje nova aminokiselina s promijenjenim svojstvima. Npr. uvođenje naboja može dovesti do promjene lokalnih svojstava enzima te njegove konformacijske promjene. Te promjene su uglavnom značajne i mogu biti kritične za izvornu funkciju enzima.

Postoje još enzimi koji su regulirani proteolitičkim cijepanjem svojih enzimskih prekursora. Naime, neki enzimi se sintetiziraju u svom neaktivnom, odnosno zimogenom obliku te se aktiviraju tek nakon što se pocijepaju. Primjer takvih enzima su proteaze - tripsin i kimotripsin koji se sintetiziraju kao tripsinogen i kimotripsinogen. Njihovim cijepanjem dolazi do konformacijske promjene kojom nastaje aktivno mjesto sada aktivnog oblika enzima. Budući je ovakva promjena ireverzibilna, potrebni su drugi mehanizmi kako bi ponovno inaktivirali ove enzime. Inhibicija se odvija vezanjem inhibirajućih proteina za aktivno mjesto enzima.

Prednosti regulatornih enzima i kompletnog regulacijskog enzimskog mehanizma su ušteda energije te kontrolirano korištenje supstrata. Na ovaj način stanice kataliziraju samo one reakcije koje su im potrebne u tom trenutku. Kad određenog izvora energije ima dovoljno, stanice prestaju sa sintezom i skladište ga u nekom drugom obliku, npr. pohrana glukoze u glikogen, a kad ga nedostaje stanice ga ubrzano proizvode ili razgrađuju prethodno spremljene izvore. Na ovaj način štedi se energija, ona se raspoređuje na različite metaboličke puteve ovisno o potrebi za njom. Bez ovakve regulacije ne bi bio moguć život.<sup>1</sup>

## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. Promiskuitet enzima

Promiskuitet enzima odnosi se na aktivnosti enzima za koje on nije evoluirao ili nisu dio fiziologije organizma npr. mogućnost kataliziranja dodatnih reakcija u odnosu na glavnu reakciju danog enzima. Budući su enzimi poznati po svojoj izrazitoj specifičnosti ovakve iznimke su izrazito zanimljive te su predmet istraživanja posljednjih dvadeset godina.<sup>5</sup> Neki enzimi, za koje bi se smatralo da su promiskuitetni, poput glutation S-transferaze ili citokroma P450, to nisu jer su oni multispecifični, odnosno evoluirani da transformiraju niz supstrata i imaju široku primjenjivost.

U prirodi, enzimi se razvijaju do one točke kada se smatra da su „dovoljno dobri“ za obavljanje njihova zadatka, što znači da su se supstrat i katalitička specifičnost razvili dovoljno da zadovolje potrebe stanice. Međutim, tu postoje bitne iznimke kao što je ribuloza-1,5-bisfosfatkarboksilaza/oksidaza (Rubisco). Ovaj je enzim evoluirao u uvjetima gdje je bila mala koncentracija kisika te kao takav ne može biti kao opisan da mu je supstrat samo ugljikov dioksid ili samo kisik. U međuvremenu, koncentracija kisika u atmosferi je porasla te je posljedica takve evolucije oksigenazna aktivnost ovog enzima pri kojoj nastaju nusprodukti koji su nekorisni za stanicu te samo troše energiju. Ovo je primjer prirodnog promiskuiteta. Isto tako, do promiskuiteta može doći kao do posljedica razvoje nove funkcije enzima. Istraživanja su pokazala da neki enzimi koji imaju slične međuprodukte kataliziranih reakcija, mogu katalizirati reakciju jedan drugome ponekad s izrazito visokom učinkovitošću. Za njih se smatra da potječu od istog gena. Na temelju navedenog došlo je do podjele na slijedeće tipove promiskuiteta:<sup>6</sup>

- Promiskuitet stanja enzima – pokazuju ga enzimi čija je katalitička aktivnost pri različitim reakcijskim uvjetima drukčija nego pri standardnim uvjetima. Pri tome se misli na bezvodni medij te ekstremne vrijednosti temperature ili pH.
- Supstratni promiskuitet enzima – odnosi se na to da li enzimi pokazuju specifičnost prema određenom supstratu ili su multispecifični.

- Promiskuitet katalitičke aktivnosti enzima – pokazuju ga enzimi koji mogu katalizirati kemijske reakcije koristeći se različitim mehanističkim putevima koji idu preko različitih prijelaznih stanja.

Postoje različiti načini za opisivanje promiskuitetnih aktivnosti enzima od kojih su neke efikasnije od drugih:

- Stupanj promiskuiteta odnosi se na razinu specifičnosti, odnosno koliko su međusobno različite promiskuitetne aktivnosti pojedinog enzima te koliko se razlikuju od nativnih funkcija. On se može odrediti promatrajući veze koje se kidaju ili nastaju tijekom reakcije te promatrajući mehanizam promiskuitetnih i nativnih reakcija.
- Indeks promiskuiteta računa stupanj promjenjivosti između različitih supstrata. Međutim, ova metoda nije dobra jer pretpostavlja da se iste kemijske transformacije događaju na svim supstratima.
- Usporedba E.C. brojeva. Naime, kod multispecifičnosti enzima, E.C. broj za različite supstrate razlikuje se samo u četvrtoj znamenici, dok se kod promiskuitetnih enzima razlikuje već u drugoj ili trećoj što upućuje na različite skupine supstrata ili u prvoj znamenici što govori o različitoj vrsti reakcije.
- Magnituda promiskuiteta promatra kinetičke parametre prilikom promiskuitetnih aktivnosti i uspoređuje ih s parametrima prilikom nativnih. Npr. vrijednost  $k_{cat} / K_M$  za nativne reakcije kreće se između  $10^5 - 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  dok za promiskuitetne varira za nekoliko redova veličine.

Fiziološki nevažne promiskuitetne funkcije enzima su hipotetski postale početak istraživanja novih funkcija enzima. Ta hipoteza je dokazana nizom izvrsno izvedenih laboratorijskih eksperimenata u kojima se primjenjivala usmjerena laboratorijska evolucija na metama kao što je enzim paraoksonaza iz seruma. Posljedično, i mnogi

drugi promiskuitetni enzimi su bili proučavani kako bi se istražila evolucija novih enzima kao i mehanistički i evolucijski aspekt. Prijašnji radovi bazirali su se na istraživanju samog promiskuiteta enzima i njegovog mehanizma, dok se današnji radovi okreću praktičnoj primjeni promiskuiteta u razvijanju biokatalizatora koji bi sudjelovali u organskoj sintezi ili imali primjenu u industrijskim postupcima.<sup>7</sup>

## 2.2. Evolucijski aspekti promiskuiteta enzima

Prirodna evolucija enzima postoji otkad i život na Zemlji. Geni su mutirali, a proteini se razvili kako bi poboljšali pripadnost organizma i njegovu prilagodbu novim uvjetima života. Kroz tisuće godina, ljudi su uzgajali biljke i životinje s određenim svojstvima kroz selekciju organizma. Većinu tog vremena, ljudi su zapravo evoluirali i optimizirali enzime i vezne proteine kroz mnoge generacije.<sup>8</sup>

Dokazi za evolucijsku prilagodljivost proteina su uvjerljivi. Jedan dokaz je da postoji širok raspon proteina koji su se razvili iz tek nekoliko zajedničkih predaka, a drugi je da se uzimaju u obzir nedavni evolucijski događaji kao što su razvijanje otpornosti na droge te enzimi koji razgrađuju kemikalije koje su se pojavile na planetu Zemlji tek prije nekoliko desetljeća. Međutim, postavlja se pitanje koja su to svojstva koja omogućuju proteinima da evoluiraju. Evolucija funkcionira tako što obogaćuje prethodno postojeće različitosti. Proteini koji su u skladu s tradicionalnim pogledom na funkcionalnu specifičnost i svojom, samo jednom definicijom strukture, teško će se prilagoditi novim svojstvima koja evolucija nameće. Zato sada prevladava novi pogled na proteine kao cjelinu alternativnih podjedinica ili konformera u ravnoteži s njihovim nativnim stanjem. Takav novi pogled, kao i strukturna te funkcionalna različitost, temelj su evolucibilnosti proteina.<sup>9</sup>

Usmjerena evolucija enzima i veznih proteina postala je široko primjenjiva u akademskom istraživanju te kemijskoj i farmaceutskoj industriji. Ona ih prilagođava djelovanju u novim reakcijskim uvjetima, optimizira njihovu katalitičku aktivnost prema novim supstratima te omogućuje kataliziranje novih kemijskih reakcija. Usmjerena evolucija enzima također je proširila repertoar korisnih biokatalizatora. Evoluirani enzimi nude učinkovitu zamjenu metalnim i organskim katalizatorima u kemijskoj i biokemijskoj industriji koja nije štetna za okoliš.<sup>8</sup>

Studije različitih evolucija unutar enzimskih obitelji i superobitelji podupiru hipotezu da je evolucija promiskuitetnih aktivnosti poslužila kao početak razvoja novih funkcija, a multispecifični enzimi poslužili su kao preci današnjim specijaliziranim enzimima. Dokazi ove teorije daju mali uvid u mehanizme i mutacijske puteve koji podupiru ove procese različitosti. Opisivanje mutacijskih puteva je svojevrstan izazov jer kod današnjih enzima, čak unutar iste superobitelji, različite funkcije podrazumijevaju razlike u sekvencama između 30% i 80%.

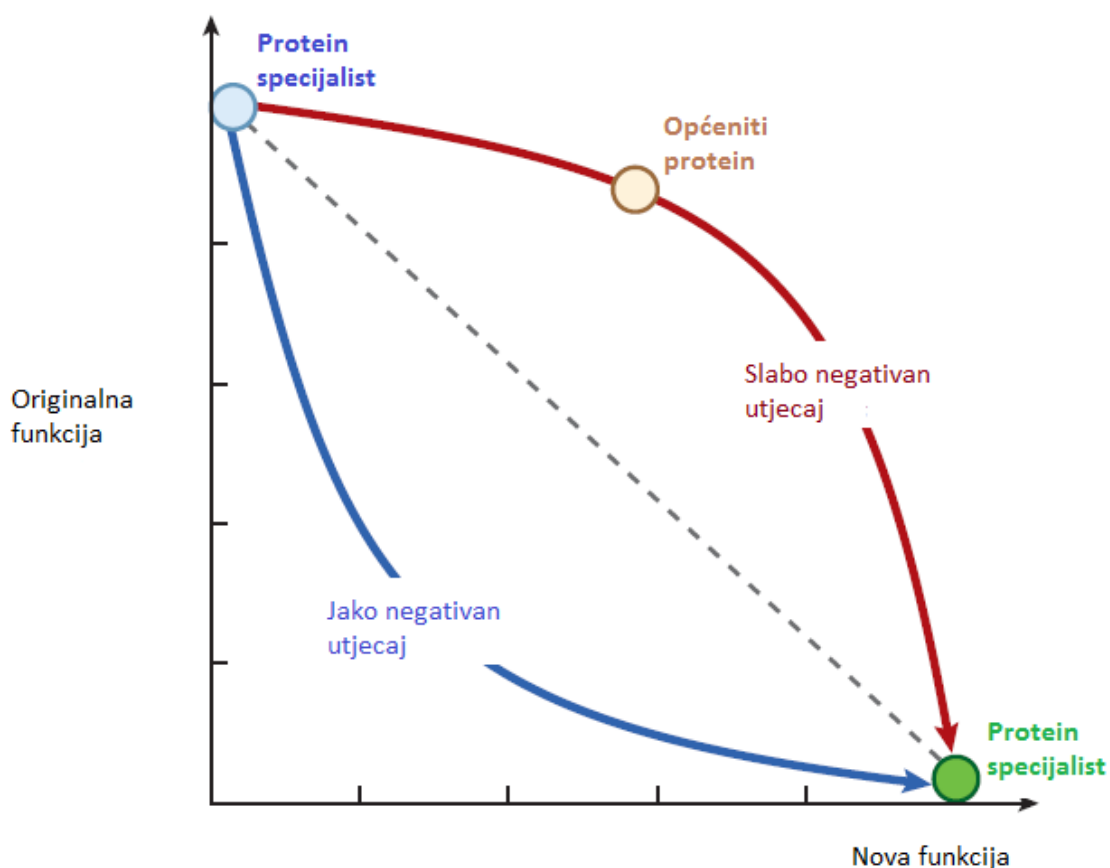
Vjerojatno je da prirodna evolucija ima prednost pred promiskuitetnim aktivnostima kao početnim točkama za evoluciju novog enzima. Međutim, promiskuitet vodi do razvoja novih funkcija unutar enzima vodeći se trima osnovnim preduvjetima:

1. Promiskuitetne aktivnosti mogu imati fiziološku prednost i kao takve mogu biti izabrane.
2. Jednom kad promiskuitetna aktivnost postane fiziološki važna, može se poboljšati kroz jednu ili nekoliko mutacija bez ukidanja primarne, nativne funkcije enzima.
3. Razvojni put može dovesti do razvoja potpuno novog enzima za kojeg će promiskuitetna aktivnost postati njegova nativna.

Mnogi izvještaji upućuju na to da slabe promiskuitetne aktivnosti mogu omogućiti selektivnu prednost organizmu obično slijedeći nedostatak nastao genetskom manipulacijom u laboratoriju. Npr. kod dizajniranog soja *E. coli* koji nema enzim glukokinazu uočeno je da kinaze različitih monosaharida mogu fosforilirati i glukozu jer iskazuju supstratni promiskuitet.  $k_{cat}/K_M$  vrijednost za glukozu promiskuitetne kinaze monosaharida je 4 reda veličine ( $\sim 10^4$ ) manja u odnosu na  $k_{cat}/K_M$  vrijednost za glukozu originalne glukokinaze *E. coli*. Zbog toga je bilo neophodno nadeksprimirati promiskuitetnu kinazu monosaharida kako bi se većom količinom enzima kompenzirala njegova niska katalitička učinkovitost.

Evolucijska prilagodljivost, dakle, je sposobnost biološkog sustava, bio on organizam, stanica ili protein da evoluira.

Konačno, stjecanje nove vještine mora doći na štetu jedne stare. Relativna brzina kojom se nova funkcija dobiva, a stara gubi je važna. Postoje različiti putevi razvoja nove funkcije (slika 5) Npr. slaba promiskuitetna aktivnost proteina s njegovom primarnom funkcijom postepeno evoluirala (plavi krug). Na kraju tog procesa, koji uglavnom zahtijeva mnogo generacija mutacija i selekcija, nastaje novi protein s novom funkcijom koja je zamijenila staru (zeleni krug). Dinamika ovakvog procesa može varirati. Dobitak u odnosu na gubitak nove prema staroj funkciji i pretvorba jednog proteina u drugi može se dogoditi linearno (isprekidana linija) ili prateći konkavni odnosno konveksni put. Konveksni put, odnosno onaj s negativnim utjecajem, podupire činjenica da veliko povećanje promiskuitetne aktivnosti pri njezinom prelasku u novu funkciju je često popraćeno malim smanjenjem originalne funkcije. Zahvaljujući stjecanju nove funkcije bez gubitka originalne, i čestim poprimanjem funkcija koje nisu odabrane, intermedijeri ovog puta su općeniti i njihova evolucija može poslužiti duplikaciji gena. Nasuprot ovom putu, konkavni put podrazumijeva da je duplikacija gena nužan preduvjet jer je čak malen razvitak novih funkcija popraćen velikim gubitkom izvornih.<sup>7</sup>



Slika 5. Prikaz mogućih puteva do razvoja nove funkcije proteina. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 7)

### 2.3. Mehanistički aspekti promiskuiteta enzima

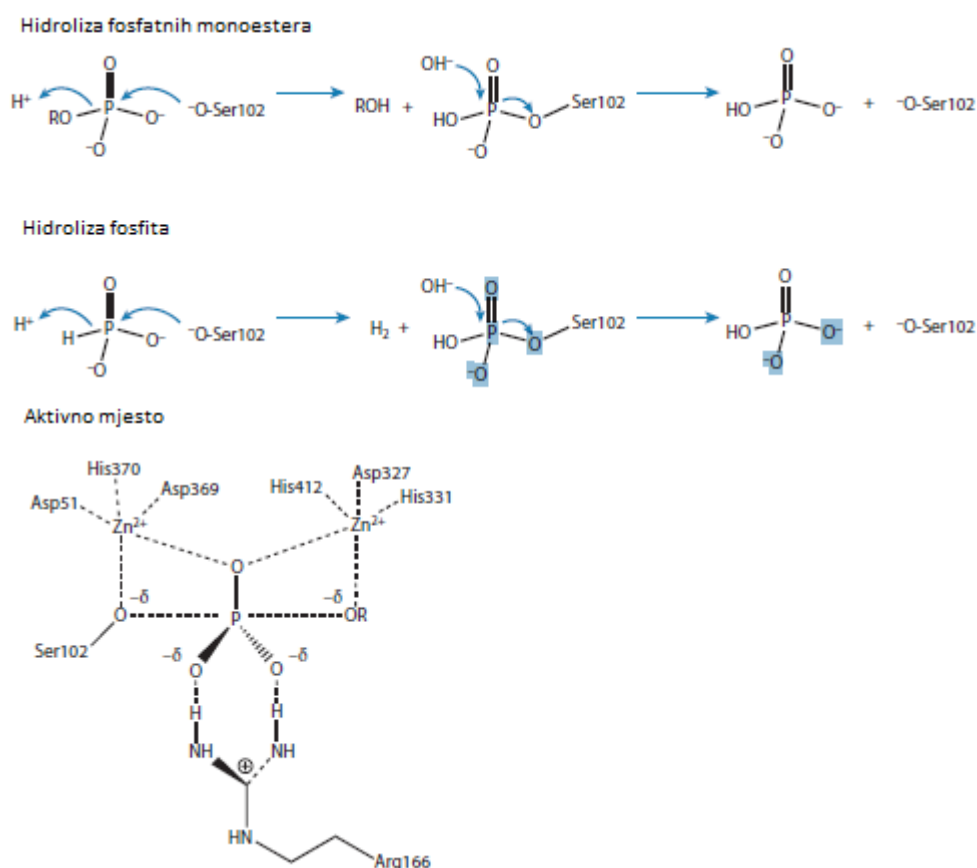
Budući se enzimi definiraju kao izrazito specifični katalizatori, odnosno imaju aktivno mjesto specifično za određenu reakciju, u ovom se dijelu nastoji objasniti kako je moguće da se u istom aktivnom mjestu odvija pretvorba supstrata u produkt katalitičkim mehanizmom koji je svojstven nativnim aktivnostima enzima, a opet dolazi do promiskuitetne aktivnosti. Postoji više mogućih objašnjenja i mehanizama, a svima je poveznica da se nativna i promiskuitetna aktivnost odvijaju u istom aktivnom mjestu.

Prvo objašnjenje je konformacijska raznolikost aktivnog mjesta. Naime, uloga plastičnosti, tj. mogućnosti poprimanja različitih konformacija enzima, koje su vezane uz enzimski nativne i promiskuitetne aktivnosti obrađena je u nekolicini radova. U njima se

navodi da je promiskuitet enzima povezan upravo s tim da aktivno mjesto može poprimiti različite konformacije. Dakle uslijed suptilno različitih konformacija aktivnog mjesta, moguće je odvijanje native odnosno promiskuitetne aktivnosti enzima. Npr. izopropilmalat-izomeraza je enzim s dvosupstratnom specifičnošću gdje oblik aktivnog mjesta ovisi o tome koji je supstrat prisutan. Također, sulfotransferaza (SULT1A1) je enzim kojem konformacijske promjene pomažu da prihvati niz različitih supstrata.

U konformacijsku raznolikost pripada i prihvaćanje različitih supstrata u aktivno mjesto. Tu se misli na to da promiskuitetna aktivnost dijeli istu konfiguraciju aktivnog mjesta i njegove glavne karakteristike s native aktivnošću. Ovaj primjer podupiru enzimi koji primjenjuju nukleofilnu katalizu, poput alkalne fosfataze, visoko učinkovite fosfat-monoester-fosfohidrolaze koja promiskuitetno hidrolizira fosfodiestere, fosfoamide i sulfatne estere kao i fosfite. Smatra se da je katalitički mehanizam isti za sve navedene reakcije i da uključuje nukleofilni napad Ser102 i elektrostatsku stabilizaciju negativno nabijenog međuprodukta  $Zn^{2+}$  ionom i bočnim ogrankom Arg166. Dakle, isto aktivno mjesto nudi različite mogućnosti interakcija te dolazi do promiskuitetnih aktivnosti.





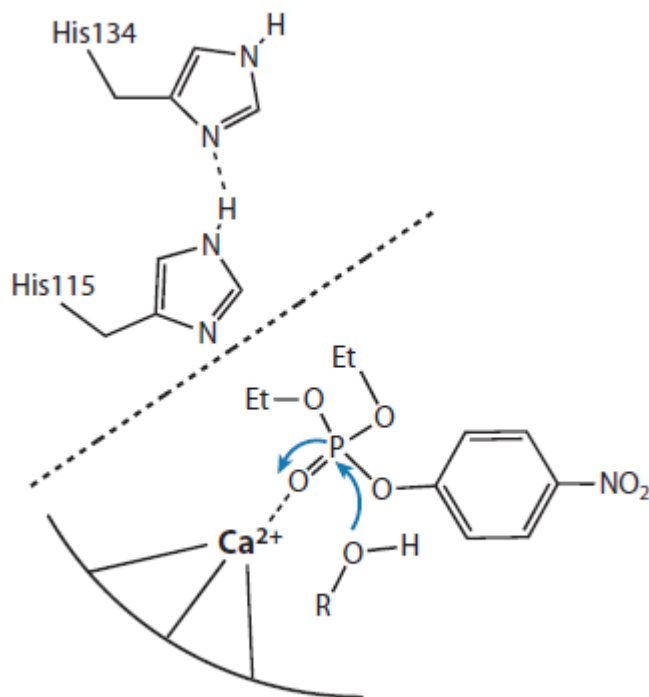
Slika 6. Prikaz reakcija hidrolize kod alkalnih fosfataza te njihovo aktivno mjesto. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 7)

Također, utjecaj na aktivnost enzima imaju i različita protonacijska stanja. Ista katalitička aminokiselina može djelovati nativno ili promiskuitetno ovisno o protonacijskom stanju. U superobitelji tautomeraza, različiti enzimi dijele aminokiselinu prolin na amino kraju enzima, te mehanizam katalize ovisi o  $pK_a$  ovog prolina. Npr. kod 4-oksalokrotonat tautomeraze (4-OT)  $pK_a$  vrijednost aminokiseline na N kraju enzima, Pro1 je oko 6,4 te se ona ponaša kao baza. Kod dehalogenaze *trans*-3-kloroakrilne kiseline (CaaD), koja katalizira hidrolitičku halogenaciju haloakrilata, Pro1 je protoniran, a  $pK_a$  iznosi oko 9,2 te se u tom slučaju prolin ponaša kao kiselina. Budući je kod 4-OT samo mala frakcija protonirana pri fiziološkom pH, ovaj enzim pokazuje izrazito slabu promiskuitetnu aktivnost u kojoj prolin sudjeluje kao kiselina kada je riječ o hidrataznoj aktivnosti. Međutim, enzim malonat-semialdehid-dekarboksilaza (MSAD) pokazuje značajnu promiskuitetnu hidrataznu aktivnost upravo zato što je Pro1 protoniran te se ponaša kao kiselina u reakciji koja je nativna za taj enzim.<sup>7</sup>

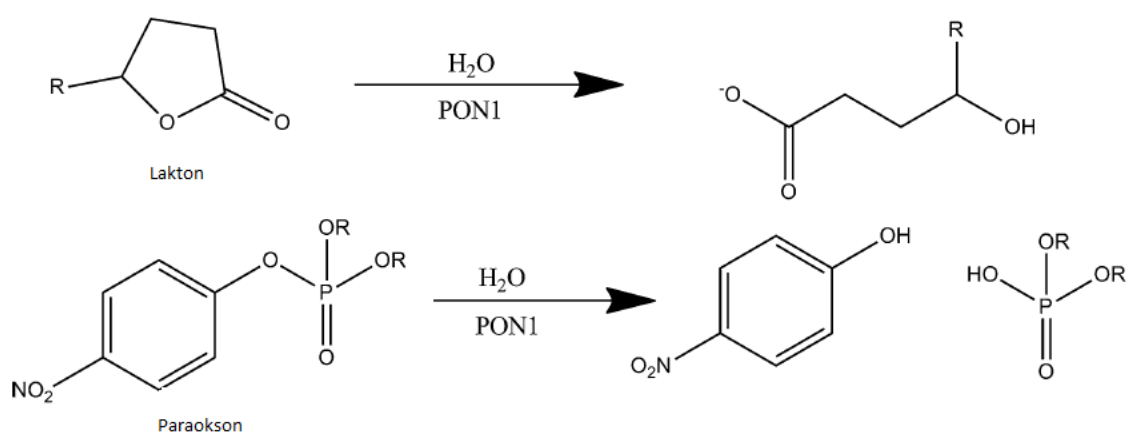
Idući primjer su različita podmjesta unutar istog aktivnog mjesta. U mnogim slučajevima, iako se originalna i promiskuitetna aktivnost nalaze unutar istog aktivnog mjesta te se oslanjaju na njegove glavne karakteristike (npr. oksianionska šupljina – jedan od stabilizirajućih elemenata aktivnog mjesta), neki ključni dijelovi katalitičkog mehanizma mogu se razlikovati. Paraoksonaza iz seruma (PON1) je jedan od takvih enzima. To je laktonaza prisutna kod sisavaca s promiskuitetnim esteraznim i fosfotriesteraznim aktivnostima.<sup>7</sup> Postoji način na koji su utvrđene nativna i promiskuitetna aktivnost ovog enzima te koja je aktivnost u kojem slučaju izraženija. Naime, knjižnica gena rePON1 pripremljena je nasumičnom mutagenezom, a zatim je klonirana u bakterijskim kolonijama. Kolonije su postavljene na agarne ploče te je testirana aktivnost prema nekoliko različitih supstrata, od kojih svaki predstavlja supstrat za jednu od nekoliko reakcija koje ovaj enzim katalizira, odnosno za njegove različite aktivnosti: fosfotriesteraznu, esteraznu i laktonaznu. Nadalje, korišteni su acetatni i oktanoatni esteri. Acetatni ester predstavlja kratkolančani ester prema kojem enzim PON1 uobičajeno pokazuje visoku aktivnost, a oktanoatni ester predstavlja dugolančani ester prema kojem je aktivnost enzima PON1 inače smanjena. Najbolji klonovi izabrani između  $10^3$ - $10^4$  klonova, koliko je bilo prisutno, podvrgnuti su još jednom krugu mutageneze, a aktivnost dobivenih testirana je na isti način. Novoevoluirane varijante jasno pokazuju skup aminokiselina čijom promjenom se utjecalo na aktivnost enzima PON1 i njegovu selektivnost prema određenim supstratima (navedeno dalje u tekstu). Ovakve promjene ne uključuju samo povećanje aktivnosti enzima prema supstratu za koji je evoluirao, nego se i smanjuje aktivnost prema supstratima za koje enzim nije odabran. Sveukupno, zabilježeni su pomaci u selektivnosti enzima prema supstratu za 4600 puta. Pozicije svih aminokiselina koje su određene ovom usmjerenom evolucijom se uglavnom nalaze na istom mjestu te na taj način jasno ocrtavaju granice aktivnog mjesta enzima PON1.<sup>11</sup>

Kod ovog enzima koordinacija fosforilnog odnosno karbonilnog kisika s ionom kalcija unutar aktivnog mjesta karakteristika je koja je prisutna u svim mehanizmima. Kalcijev ion nalazi se na dnu hidrofobnog aktivnog mjesta. Nativna funkcija posredovana je His115 – His134 dijadom koja deprotonira molekulu vode kako bi stvorila hidroksid spreman za napad na karbonilni ugljik estera pri čemu nastaje oksoanionski tetraedarski međuprodukt koji se u idućem koraku cijepa na produkte. Ova dijada posreduje i promiskuitetnoj esteraznoj aktivnosti, ali promiskuitetna fosfodiesterazna aktivnost je neovisna i posredovana je drugim aminokiselinama koje djeluju kao baza ili nukleofil, to je Asp269 koja tvori dijadu s His285.

Uz tu dijadu važan je Cys284 koji se najviše veže uz razvoj novih promiskuitetnih aktivnosti. On je okružen aminokiselinama Leu267, Val268, Glu303 i Leu305. Njegova mutacija narušava strukturu srži aktivnog mjesta i na taj način direktno utječe na razvoj novih aktivnosti.<sup>7,11</sup>



Slika 7. Prikaz aktivnog mjesta paraoksonaze iz seruma. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 7)



Slika 8. Lakton kao supstrat native laktonazne, a paraokson kao supstrat promiskuitetne fosfotriesterazne aktivnosti enzima PON1. (Preuzeto i prilagođeno prema ref. 12)

Nadalje, promiskuitetna aktivnost može biti potpomognuta molekulama vode. To znači da, iako supstrat može djelovati direktno s katalitičkim aminokiselinama unutar aktivnog mjesta, dodatne vodikove veze s molekulama vode mogu imati važnu ulogu u promiskuitetnim interakcijama. Molekule vode mogu djelovati kao pufer suprotstavljajući se dipolima ili naboju između supstrata i aktivnog mjesta ili mogu djelovati kao kiselina, baza ili nukleofil u katalizi promiskuitetnih reakcija.

Razlike u učinkovitosti nativnih i promiskuitetnih aktivnosti mogu se prikazati razlikom u vrijednostima  $K_m$  i  $k_{cat}$ . Iako je za očekivati da će promiskuitetni supstrati, koji se slabo vežu u aktivno mjesto, pokazivati visoku vrijednost  $K_m$  to nije tako, već mnoge enzime karakterizira niska  $k_{cat}$  vrijednost što dovodi do manje vrijednosti prethodno spomenutog omjera  $k_{cat}/K_m$ , odnosno do manje učinkovitosti. Ona može bit rezultat nepovoljnih interakcija između enzima i promiskuitetnog supstrata. Kod nativnih supstrata dolazi do nastajanja kovalentnih intermedijera ili vodikovih veza, što je energetski povoljno, dok se između promiskuitetnog supstrata i enzima divljeg tipa javljaju uglavnom hidrofobne interakcije koje su nepovoljne.<sup>7</sup>

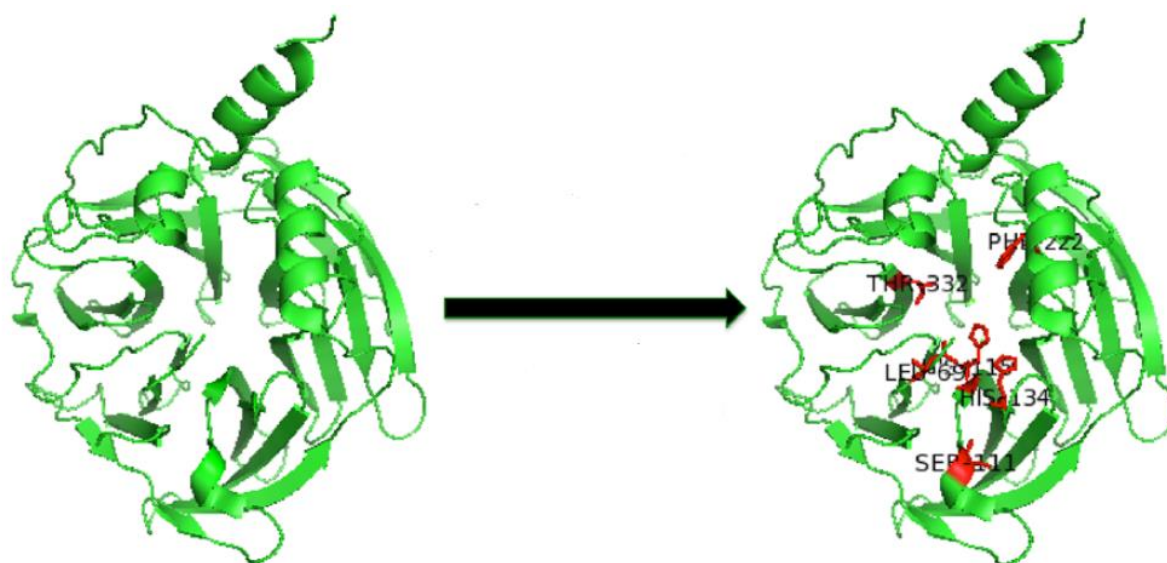
## 2.4. Primjena enzimskog promiskuiteta

Kao što je prethodno opisano, promiskuitet enzima može biti dobra polazna točka za novi usmjereni razvoj enzima i njihovih funkcija. Niska promiskuitetna aktivnost prema fiziološki nevažnom supstratu bi mogla pretvoriti enzim u veoma koristan katalizator što je moguće akumulacijom jedne ili više mutacija, pružajući na taj način organizmu bolje uvjete za život. Nadalje, promiskuitetna aktivnost može biti početna točka za razvoj nove funkcije enzima primjenjujući racionalnu ili poluracionalnu metodologiju laboratorijskog inženjerstva ili primjenjujući usmjerenu laboratorijsku evoluciju. Nedavni izvještaji govore da su utvrđena znatna poboljšanja u istraživanju i objašnjenju promiskuitetnih aktivnosti.

Npr. trovanje organofosfatima predstavlja veliku opasnost kako vojnom tako i civilnom stanovništvu. Pravovremena i učinkovita intervencija s farmakološkim sredstvima može minimizirati štetu. Brzo, *in vivo* uklanjanje organofosfata, zahtjeva enzim za razgradnju bioloških tvari s izrazito velikom konstantom specifičnosti ( $k_{cat}/K_m$ ), većom od  $10^7 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Tako je, recimo, hidroliza organofosfata bila izazov enzimima koji se nalaze kod sisavaca, a imaju izrazito visoku učinkovitost, posebice hidroliza još toksičnijih Sp stereoizomera ciklosarina. Iako je enzim PON1 bio najbolji kandidat za to on je hidrolizirao Sp

stereoizomer jako sporo. Međutim, nakon tri kruga usmjerene evolucije enzima PON1, novi mutant za Sp stereoizomer imao je konstantu specifičnosti  $10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$  što je 86000 puta više od početnog oblika navedenog enzima.<sup>12</sup>

Radi se o tome da je uzeta rekombinantna varijacija enzima PON1, rePON. Njegov aminokiselinski slijed odgovara slijedu ljudskog enzima u iznosu od 85% identičnosti u primarnom aminokiselinskom slijedu. Na njega su primijenjene slučajna (nasumična) i usmjerena mutagenaza te su izabrani mutanti za organofosfatnu hidrolizu. Za odabir je korištena metoda sortiranja stanica s visoko propusnim tokom fluorescencije. Za sigurnost i lakšu detekciju korišteni su fluorirani analozi kumarina. Na ovaj način povećana je aktivnost PON1 enzima prema kumarinskom analogu ciklosarina  $10^5$  puta. Kako bi se povećala specifičnost varijanti prema samom ciklosarinu, razvijen je neopasan postupak za *in situ* generiranje ciklosarina koji je korišten tijekom idućih ciklusa odabira. Na ovaj način dobivene su varijante koje mogu hidrolizirati kumarinski analog ciklosarina, kao i sam ciklosarin s konstantom specifičnosti od  $10^7 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ .<sup>13</sup>



Slika 9. Prikaz enzima PON1 nakon tri kruga primjene usmjerene evolucije s poboljšanom katalitičkom aktivnošću za katalizu toksičnog Sp stereoizomera organofosfata. (Preuzeto i prilagođeno prema ref. 12)

Na temelju mutacija koje su se pojavile unutar organizama podvrgnutih usmjerenj evolucionj i unutar aktivnog mjesta enzima PON1 dizajnirana je knjižnica koja sadrži sintetičke oligonukleotide nastale ponovnim spajanjem gena. Ove *in vivo* profilaktičke aktivnosti

evoluiranih varijanti enzima i novo dizajniranih vrsta predstavljaju temelj za dizajniranje PON1 i ostalih enzima za razgradnju organofosfata s još većom učinkovitosti.

Prethodna opažanja podupiru hipotezu da promiskuitetne aktivnosti enzima nisu iznimke već svojstvene značajke proteina općenito. Međutim, mehanizmi razvijanja promiskuitetnih aktivnosti su različiti kod različitih proteina, posebice kod enzima. Ukoliko neki enzim ima slabu promiskuitetnu aktivnost u usporedbi s nativnom, ona bi mogla biti polazište za razvoj nove funkcije enzima. Tu se također pruža i prednost pri odabiru gena koji će kodirati za enzim s novom dominantnom aktivnošću. Svakako, važnost promiskuitetnih aktivnosti, posebno s fiziološkog stajališta, tek treba razumjeti i još bolje istražiti. I na kraju, najvažnije svojstvo promiskuitetnih aktivnosti je da se mogu koristiti kao početne točke pri razvoju novih proteina u laboratorijskim uvjetima gdje će kao takvi naći primjenu u nekim većim biotehnološkim sustavima.<sup>12</sup>

### § 3. LITERATURNI IZVORI

1. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, peto izdanje, W. H. Freeman, New York, 2008., 183–234
2. <https://en.m.wikipedia.org/wiki/Glucokinase> (datum pristupa: 2.9.2019.)
3. N. V. Bhagavan, C.E. Ha, *Essentials of Medical Biochemistry*, drugo izdanje, Elsevier, 2015., 63-84
4. N. N. Ulusu, *Evolution of Enzyme Kinetic Mechanism*, Istanbul, 2015., 251-257
5. F. A. Lee, *Basic Food Chemistry*, The AVI Publishing Company, 1983., 177-198
6. K. Hult, P. Berglund, *Enzyme Promiscuity: mechanism and applications*, TRENDS in Biotechnology, vol 25, Stockholm, 2007., 231-238
7. O. Khersonsky, D. S. Tawfik, *Enzyme Promiscuity: A Mechanistic and Evolutionary Perspective*, 79 (2010) 471-505
8. Znanstveno izvješće objavljeno povodom dodijeljene Nobelove nagrade za kemiju za 2018. godinu, <https://www.nobelprize.org/uploads/2018/10/advanced-chemistryprize-2018.pdf> (datum pristupa: 5.9.2019.)
9. N. Tokuriki, D. S. Tawfik, *Protein Dynamism and Evolvability*, SCIENCE, vol 324, Rehovot, 2009., 203-207
10. S. D. Copley, *An Evolutionary Perspective on Protein Moonlighting*, Biochem. Soc. Trans 42, 2014., 1684-1691
11. M. Harel, A. Aharoni, L. Gaidukov, B. Brumshtein, O. Khersonsky, R. Meged, H. Dvir, R. B. G. Ravelli, A. McCharty, L. Toker, I. Silman, J. L. Sussman, D. S. Tawfik, *Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes*, NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY, vol 11, 2004., 412-419
12. R. D. Gupta, *Recent Advances In Enzyme Promiscuity*, Sustainable Chemical Processes, New Delhi, 2016., 1-7
13. R. D. Gupta, M. Goldsmith, Y. Ashani, Y. Simo, G. Mullokandov, H. Bar, M. Ben-David, H. Leader, R. Margalit, I. Silman, J. L. Sussman, D. S. Tawfik, *Directed evolution of hydrolases for prevention of G-type nerve intoxication*, Nat Chem Biol 7 (2), 120-125