

# Umjetni enzimi

---

Eldić, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:782129>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Ana Eldić

## **Umjetni enzimi**

Završni rad

Mentor: izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Osijek, 2023.

## Sažetak

Pod pojmom „enzim“ podrazumijevamo specifične organske spojeve, čija je uloga ubrzavanje kemijskih reakcija u organizmu. Svi enzimi, osim ribozima su proteini. Svi metabolički procesi imaju svoje specifične enzime, zahvaljujući kojima organizam može normalno funkcionirati. Od tisuće i tisuće enzima u organizmu čovjeka, odsustvo samo jednog enzima može predstavljati veliki problem za cjelokupno zdravlje i čitav život. Kada bi se uspjela razviti metoda za sintezu enzima riješili bi veliki broj najvećih i najkompleksnijih zdravstvenih problema. Upravo neke od najtežih bolesti ljudi su uzrokovane nedostatkom određenih enzima. Proteinsko inženjerstvo i svijet znanosti nastoje zaobići problem nedostatka prirodnih enzima dizajnirajući umjetne enzime. Umjetno dobiveni enzimi predstavljaju budućnost u svijetu znanosti i medicine. Katalitička aktivnost, specifičnost i kompleksnost strukture prirodnih enzima predstavljaju veliki izazov u sintezi umjetnih enzima. Cilj je dizajnirati i sintetizirati enzime koji će imati jednaka ili čak bolja svojstva od prirodnih enzima. Prostor za rast i razvoj, u svijetu umjetnih enzima, je pronašla i nanotehnologija sa svojim nanoenzimima. Nanoenzimi bi mogli ubrzo postati dio svakodnevne medicine i znanosti. Budućnost umjetnih enzima je svijetla i prostor za razvoj je jako veliki. Buduća istraživanja imaju zadatak poboljšati već sintetizirane umjetne enzime, ali i dizajnirati i sintetizirati nove.

**Ključne riječi:** umjetni enzimi, kataliza, proteinsko inženjerstvo, nanotehnologija, efikasnost

## **Abstract**

By the term "enzyme" we mean specific organic compounds whose role is to accelerate chemical reactions in the body. All enzymes except ribozymes are proteins. All metabolic processes have their own specific enzymes, thanks to which the body can function normally. Out of thousands and thousands of enzymes in the human body, the absence of just one enzyme can represent a big problem for the whole health and the whole life. If a method for enzyme synthesis could be developed, a large number of the biggest and most complex health problems would be solved. Some of the most serious human diseases are caused by a lack of certain enzymes. Protein engineering and the world of science are trying to circumvent the problem of lack of natural enzymes by designing artificial enzymes. Artificially obtained enzymes represent the future in the world of science and medicine. Catalytic activity, specificity and complexity of the structure of natural enzymes are a great challenge in the synthesis of artificial enzymes. The goal is to design and synthesize an enzyme that will have the same or even better properties than natural enzymes. Space for growth and development, in the world of artificial enzymes, has also been found by nanotechnology with its nanoenzymes. Nanoenzymes could soon become part of everyday medicine and science. The future of artificial enzymes is bright and the room for development is very large. Future research has the task of improving already synthesized artificial enzymes, but also designing and synthesizing new ones.

**Key words:** artificial enzymes, catalysis, protein engineering, nanotechnology, efficiency

## SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. ENZIMI – KATALIZATORI U ŽIVIM ORGANIZMIMA	2
2.1. Građa enzima	2
2.1.1. Primarna struktura enzima	2
2.1.2. Sekundarna struktura enzima	3
2.1.3. Tercijarna struktura enzima	4
2.1.4. Kvaterna struktura enzima	4
2.2. Michaelis -Menten kinetika	4
2.3. Katalitičke strategije enzima	6
2.3.1. Kovalentna kataliza	6
2.3.2. Opća kiselo-bazna kataliza	6
2.3.3. Kataliza približavanjem	6
2.3.4. Kataliza ionom metala	7
2.4. Regulacijske strategije enzima	7
2.4.1. Alosterička kontrola	7
2.4.2. Višestruki oblici enzima	7
2.4.3. Reverzibilna kovalentna modifikacija	8
2.4.4. Aktivacija proteolizom	8
2.4.5. Kontrola količine prisutnih enzima	8
2.5. Obitelji enzima	8
Enzimi se dijele na 6 obitelji enzima.	8
2.5.1. Oksidoreduktaze	8
2.5.2. Transferaze	8
2.5.3. Hidrolaze	8
2.5.4. Liaze	8
2.5.5. Izomeraze	9
2.5.6. Ligaze	9
3. Proteinsko inženjerstvo	9
3.1. Racionalni dizajn	9
3.1.1. Overlap extension	9
3.1.2. Kružna mutagenaza (eng. whole plasmid single round PCR)	10
3.2. Usmjerenja evolucija – „in vitro“	10
3.3. Ugradnja nestandardnih aminokiselina u proteine	11
3.3.1. Metoda supresije stop kodona	11

3.3.2. Ugradnja pod pritiskom	12
3.3.3. Promjena značenja kodirajućeg kodona	12
4. Umjetni enzimi – konstitucija, katalitičke funkcije	12
4.1. Računalni dizajn enzima	13
4.2. Usmjerena evolucija enzima	13
4.3. Kempova reakcija eliminacije katalizirana električnim poljima	13
4.4. Retro-aldolne reakcije	14
4.5. Diels-Alder reakcija	15
4.6. Umjetni hidrolitički metaloenzimi	15
4.6.1. Aktivacija Lewisove kiseline	16
4.6.2. Aktivacija nukleofila	17
4.6.3. Aktivacija odlazećih skupina	17
4.7. Kimotripsin	17
4.7.1. Sinteza umjetnog kimotripsina	17
4.8. Ribonukleaze	18
4.8.1. Umjetne ribonukleaze	18
4.9. Prvi umjetno dobiveni enzim – Syn-F4	19
5. Nanoenzimi	20
5.1. Nanotehnologija	20
5.2. Nanoenzimi	20
5.3.1. Nanoenzimi tipa I	21
5.3.2. Nanoenzimi tipa II	21
5.3.3. Nanoenzimi tipa III	22
5.3.4. Nemetalni nanoenzimi	22
5.3.5. Metal-ugljik nanoenzimi	22
5.3.6. Jednoatomni nanoenzimi	23
5.4. Ograničenja nanoenzima	23
6. Primjena i budućnost umjetnih enzima	24
6.1. Primjena umjetnih enzima u industriji	24
6.2. Zaštita okoliša	24
6.3. Biomedicina	24
6.4. Biologija	24
6.5. Istraživanje prirodnih enzima	24
6.6. Budućnost umjetno dobivenih enzima	25
7. Zaključak	26
8. Literatura	27

## 1. UVOD

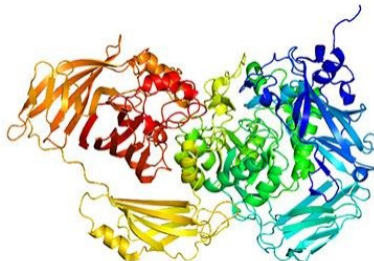
Enzimi, proteini po svojoj strukturi, jedni su od nužnih spojeva u ne samo u organizmu čovjeka, već u svim živim bićima. Bez enzima, metabolički putovi za mnoge spojeve ne bi bili mogući. Nedostatak samo jednog enzima, za organizam može predstavljati vrlo veliki problem. U cilju rješavanja takvih problema razvila se i razvija se industrija umjetno dobivenih enzima.

Cilj ovog rada je pobliže upoznati se sa samim enzimima. Poznavanje njihove strukture, katalitičke aktivnosti i katalitičkih strategija je nužan uvjet za razumijevanje, dizajn i sintezu umjetnih enzima. Podjela enzima po obiteljima nam govori o specifičnosti samih enzima. Nisu svi enzimi odgovorni za katalizu svih reakcija u organizmu.

Proteinsko inženjerstvo je svoju primjenu pronašlo u svijetu umjetnih enzima. Metode dizajna i sinteze proteinskog inženjerstva omogućile su nastanak umjetnih enzima. Nano svijet se također uključio u svijet umjetnih enzima te pružio još veće područje za rad. Cilj proteinskog inženjerstva je stvoriti umjetne enzime ili spojeve koji imitiraju enzimske karakteristike. Replikacija katalitičkih aktivnosti, specifičnosti i struktura prirodnih enzima su problematika proteinskog inženjerstva. Za sintezu funkcionalnog umjetnog enzima važni su prvo dobar računalni dizajn enzima, a zatim i sama sinteza.

## 2. ENZIMI – KATALIZATORI U ŽIVIM ORGANIZMIMA

Enzimi (en- + grč. ζύμη: kvasac) su biološki katalizatori koju sudjeluju u biokemijskim procesima u živim organizmima (slika 1.). Po strukturi svi enzimi pripadaju u skupinu proteina, osim ribozima, koji su po strukturi katalitičke ribonukleinske kiseline.

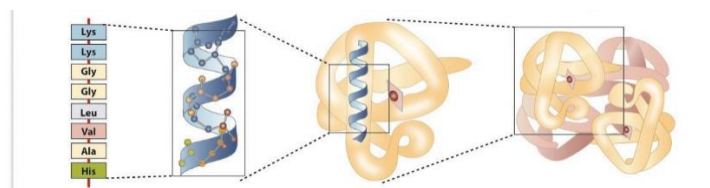


Slika 1. Izgled enzima [1].

Enzimi iz reakcije izlaze nepromijenjeni. Enzimi kataliziraju reakcije tako što stabiliziraju prijelazno stanje, najviše energijsko stanje na reakcijskom putu. Selektivnom stabilizacijom prijelaznog stanja, enzim određuje koja će se od nekoliko mogućih kemijskih reakcija stvarno dogoditi [2].

### 2.1. Građa enzima

Za specifičnost i funkcionalnost enzima odgovorna je njihova građa. Čak i minimalna promjena u građi enzima može značajno izmijeniti njegovu aktivnost i funkciju. Razumijevanje građe enzima od iznimne je važnosti u biokemijskom inženjerstvu. Ako su građa i svojstva dobro poznati moguće je manipulirati svojstvima enzima i tako dobiti neke nove enzime koji bi bili rješenje za neke od bolesti. Enzimi su po svojoj strukturi proteini, građeni od 20 aminokiselina. Proteini sadržavaju samo L-aminokiseline. Struktura enzima može se podijeliti na 4 razine: primarna, sekundarna, tercijarna i kvaterna struktura (slika 2.).

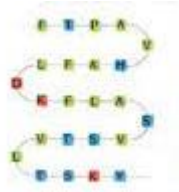


Slika 2. Četiri strukture enzima [3].

#### 2.1.1. Primarna struktura enzima

Primarna struktura enzima predstavlja slijed aminokiselina u polipeptidnom lancu (slika 3.). Redoslijed aminokiselina u proteinima određen je redoslijedom nukleotida u genima. Slijed nukleotida u deoksiribonukleinskoj kiselini (DNA) određuje komplementarni slijed nukleotida u ribonukleinskoj kiselini (RNA), koji pak određuje slijed aminokiselina u proteinu [2]. Poznavanje aminokiselinskih sljedova u proteinu važno je za shvaćanje mehanizma njegova djelovanja [2], a u slučaju enzima ključno je za razumijevanje njegovog katalitičkog djelovanja.



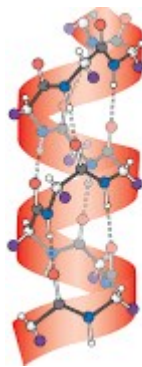


Slika 3. Primarna struktura enzima [4].

### 2.1.2. Sekundarna struktura enzima

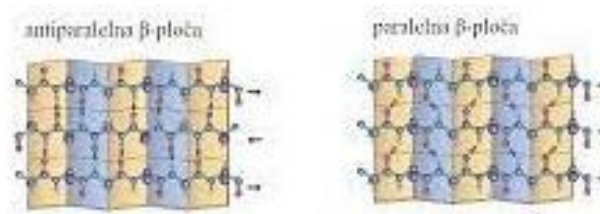
Godine 1951. Linus Paulin i Robert Corey predložili su dvije periodične strukture nazvane alfa-uzvojnica ( $\alpha$ -heliks) i beta-nabrani list ( $\beta$ -ploča). Nakon toga su identificirane i druge strukture kao što su  $\beta$ -okret i omega ( $\Omega$ -omča) [2].

Sekundarna struktura enzima predstavlja nabiranje kratkih susjednih dijelova polipeptida u geometrijski uređene jedinice. Alfa uzvojnica (slika 4.) je nabrana struktura koju stabiliziraju vodikove veze unutar lanca [6].



Slika 4.  $\alpha$ -uzvojnica [5].

Beta-nabrani list je sekundarna struktura polipeptidnih lanaca ili bjelančevina nastala međusobnim povezivanjem vodikovim vezama dvaju ili više istegnutih lanaca preko karbonilnih i amidnih skupina [7]. Susjedne  $\beta$ -ploče mogu biti posložene tako da čine paralelnu nabranu ploču ili anti paralelnu nabranu ploču (slika 5.).

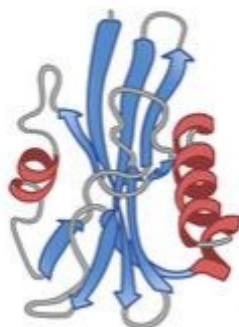


Slika 5. Anti paralelna i paralelna  $\beta$ -ploča [8].

Petlje i omče predstavljaju kratke sljedove aminokiselina koji povezuju dvije podjedinice sekundarne strukture.

### 2.1.3. Tercijarna struktura enzima

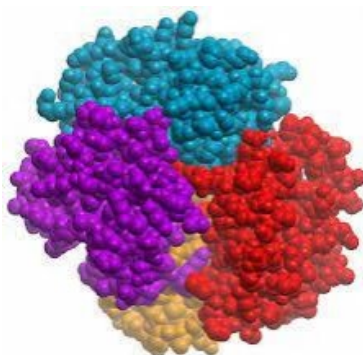
Pojam tercijarne strukture enzima (slika 6.) predstavlja cjelokupnu trodimenzionalnu konformaciju nekog polipeptida. Tercijarna struktura enzima proizlazi iz međusobne interakcije bočnih ogranaka aminokiselina u polipeptidnom lancu. Polipeptidni lanac tercijarne strukture se savija i uvija postičući najniže energetske stanje visoke stabilnosti.



Slika 6. Tercijarna struktura enzima [9].

### 2.1.4. Kvaterna struktura enzima

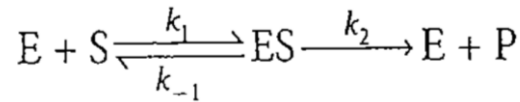
Kvaternu strukturu oligomernih enzima (slika 7.) određuju prostorni odnosi između protomera ili podjedinica. Kvaterna struktura može biti jednostavna, kao npr. protein izgrađen od dvije identične podjedinice ili kompleksna kad je protein izgrađen od mnogo različitih podjedinica [6].



Slika 7. Kvaterna struktura enzima [10].

## 2.2. Michaelis -Menten kinetika

Koncept koji opisuje brzinu enzimski kataliziranih reakcija poznat je pod nazivom Michaelis-Menten kinetika (MM kinetika). Koncept su 1913. godine razvili Leonor Michaelis i Maud Menten. Ključan pojam za razumijevanje MM kinetike je supstrat, koji se definira kao reaktant enzima. Supstrat se veže u aktivnom mjestu, točnije enzimi dovode supstrate u orijentaciju koja olakšava nastanak prijelaznog stanja. U enzimski kataliziranoj reakciji prvo nastaje enzim-supstrat kompleks (ES) (slika 8.). Enzimski katalizirana reakcija ima sniženu energiju aktivacije (energetska barijera) u odnosu na neenzimatsku reakciju jer se enzim-supstrat kompleks nalazi na višoj energetskoj razini od slobodnog supstrata [12].



Slika 8. Jednadžba enzimski katalizirane reakcije [11].

Enzimski reakcija se može odvijati prema sljedećim koracima:

1. Iz enzima i supstrata može nastati enzim-supstrat kompleks, reakcija se odvija brzinom  $k_1$ .
2. Iz enzim-supstrat kompleksa možemo dobiti ponovno enzim i supstrat, brzina reakcije je  $k_{-1}$ .
3. Iz enzim-supstrat kompleksa možemo dobiti produkt i enzim, brzina reakcije je  $k_2$ .

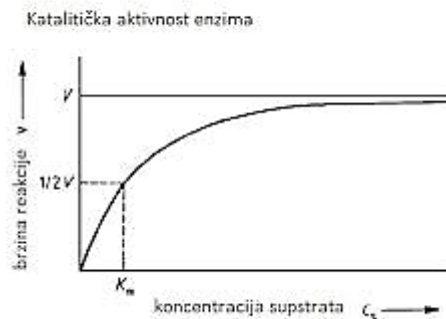
U uvjetima kada se može zanemariti povratna reakcija, početna brzina nastajanja produkta proporcionalna je koncentraciji ES kompleksa:  $v_0 = k_2 [ES]$  [12].

Najveća brzina reakcije bit će ostvarena kada sve molekule enzima budu u obliku ES kompleksa. Tu brzinu definiramo kao maksimalnu brzinu enzimski katalizirane reakcije, a određujemo je kao:  $V_m = k_2 [E_0]$  [12].

Michaelisova konstanta ( $K_m$ ) je mjera katalitičke moći enzima, povezana i s afinitetom prema supstratu. Predstavlja koncentraciju supstrata pri kojoj je brzina enzimski katalizirane reakcije jednaka polovici granične (maksimalne) brzine [13]. Michaelisova konstanta se može eksperimentalno odrediti mjerenjem početne brzine reakcije ( $v_0$ ) pri različitim koncentracijama supstrata. Konstanta je računski definirana kao:  $K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1$

*Konačni oblik Michaelis-Menten jednadžbe je:  $v_0 = V_m[S] / (K_m + [S])$*

Maksimalna brzina ( $V_m$ ) i Michaelis-ov konstanta ( $K_m$ ) kinetički su parametri koji definiraju oblik krivulje na grafu (slika 9.), koji opisuje katalitičku aktivnost enzima pri određenim koncentracijama supstrata.



Slika 9. Michaelis-Menten krivulja [14].

Iz grafa je vidljivo da pri koncentraciji supstrata jednakoj  $K_m$ ,  $[S]=[K_m]$ , početna brzina je jednaka polovici maksimalne brzine  $v_0=V_m/2$ . Iz toga slijedi da je  $K_m$  jednak koncentraciji supstrata koja je potrebna da bi se postigla polovica maksimalne brzine. Što enzim jače veže svoj supstrat manja je vrijednost  $K_m$  [12].

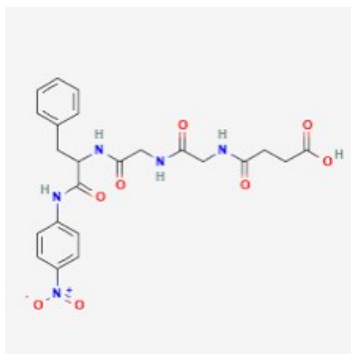
### 2.3. Katalitičke strategije enzima

Različiti mehanizmi kojima enzimi ubrzavaju kemijske reakcije opisuju se katalitičkim strategijama enzima. Vežanje supstrata na enzim je ključni korak za početak enzimske katalize. Kada dođe do interakcije supstrata i enzima oslobodi se energija vežanja. Energija vežanja predstavlja jakost veze enzima i supstrata, određuje njegovu sposobnost da veže supstrat i katalizira kemijsku reakciju. Što je veća energija vežanja, to je veći afinitet enzima prema supstratu, što rezultira boljom učinkovitosti samog enzima.

Neke od strategija kojima se koriste za katalizu specifičnih reakcija su: kovalentna kataliza, opća kiselo-bazna kataliza, kataliza približavanjem i kataliza ionom metala.

#### 2.3.1. Kovalentna kataliza

U kovalentnoj katalizi aktivno mjesto sadržava reaktivne skupine, često jake nukleofile, koji se tijekom katalize privremeno kovalentno vežu s dijelom supstrata [2]. Kovalentnom katalizom se koristi enzim kimotripsin (slika 10.), jedan od probavnih enzima gušterače. Kimotripsin je zadužen za razgradnju proteina u crijevima.



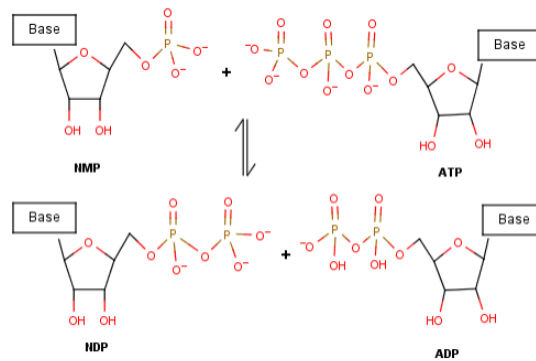
Slika 10. Struktura kimotripsina [15].

#### 2.3.2. Opća kiselo-bazna kataliza

Energija prijelaznog stanja smanjuje se prijenosom protona s donora ili na akceptor. Ulogu primatelja i davatelja protona imaju druge molekule, a ne voda. Primjer enzima koji se koristi općom kiselo-baznom katalizom je ugljična anhidraza. Ugljične anhidraze dehidriraju  $\text{HCO}_3^-$  u krvi, pri čemu nastaje  $\text{CO}_2$  koji se izdiše kada krv prolazi kroz pluća [2]. U ljudskom organizmu prisutno je najmanje sedam ugljičnih anhidraza, a ugljična anhidraza II je glavna proteinska komponenta crvenih krvnih stanica.

#### 2.3.3. Kataliza približavanjem

Reakcije koje uključuju dva različita supstrata koriste se katalizom približavanjem, na način da se dva supstrata približavaju na veznoj površini enzima. Nukleozid-monofosfat-kinaze (NMP-kinaze), su vrsta adenilat-kinaza koje kataliziraju prijenos fosforilnih skupina pri čemu ne potiču hidrolizu (slika 11.).



Slika 11. Prijenos fosforilne skupine pomoću nukleozid-monofosfat-kinaze [16].

#### 2.3.4. Kataliza ionom metala

Ioni metala mogu imati različito katalitičko djelovanje. Cinkov(II) ion u katalizi ugljičnom anhidrazom izravnom koordinacijom olakšava stvaranje nukleofila. U enzimu EcoRv, magnezijev ion služi kao elektrofil i stabilizira negativni naboj. Energija vezanja se povećava i na taj način se olakšava kataliza.

#### 2.4. Regulacijske strategije enzima

Regulacija enzima osigurava djelovanje enzima na pravom mjestu u pravo vrijeme. Koordinacija svih biokemijskih procesa u organizmu bila bi znatno teža kada se aktivnost enzima ne bi regulirala. Postoji više načina regulacije aktivnosti enzima, a neki od osnovnih su: alosterička kontrola, višestruki oblici enzima, reverzibilna kovalentna modifikacija, aktivacija proteolizom i kontrola količine prisutnih enzima.

##### 2.4.1. Alosterička kontrola

Alosterički proteini sastavljeni su od više podjedinica i sadrže katalitička i regulacijska mjesta. Važan način kontrole aktivnosti tih enzima jest vezanje malih signalnih molekula na regulacijska mjesta [2]. Jako važno svojstvo alosteričkih proteina je i kooperativnost, koja govori o međusobnom utjecaju vezanja liganda, vezanje na jednom mjestu proteina ima utjecaj na vezanje liganda na drugom različitom mjestu. Aspartat-transkarbamoilaza (ATC-aza) je jedan od najbolje istraženih alosteričkih proteina. Riječ je o enzimu koji katalizira prvi korak u biosintezi pirimidina.

##### 2.4.2. Višestruki oblici enzima

Izozimi ili izoenzimi su homologni enzimi unutar istog organizma. Struktura je donekle različita. Glavna razlika je u regulacijskim svojstvima i vrijednostima  $K_m$  i  $V_{max}$ . Primjer dva izozima su heksokinaza i glukokinaza. Glukokinaza je poseban izozim heksokinaze u jetri. Nije inhibirana glukoza-6-fosfatom, kao što je to slučaj kog heksokinaze u mišićima i pomoću nje se odvija regulacija glikolize u jetri.

### 2.4.3. Reverzibilna kovalentna modifikacija

Protein-kinaze su enzimi koji kataliziraju reakciju doniranja fosforilne skupine, a protein-fosfataze kataliziraju odstranjenje fosforilne skupine. Novalentnim dodatkom neke skupine svojstva enzima se mogu znatno promijeniti. Jedna od najčešće doniranih skupina je fosforilna skupina donirana od strane adenzin-trifosfata (ATP).

### 2.4.4. Aktivacija proteolizom

Proteoliza je proces spontanog ili enzimski kataliziranog cijepanja proteina na manje proteine ili polipeptide [17]. Neenzimsko cijepanje peptidnih veza vrlo je sporo te se u stanicama događa katalizirano enzimima koje zovemo proteaze. Proteaze su grupirane u pet skupina enzima s obzirom na aminokiselinu ili metal koji se nalazi u aktivnom mjestu. Stoga imamo serinske, treoninske, cisteinske, aspartanske i metaloproteaze [18]. Kimotripsin, tripsin i pepsin nastaju regulacijskim mehanizmom aktivacije proteolizom.

### 2.4.5. Kontrola količine prisutnih enzima

Enzimsku se aktivnost može regulirati i prilagodbom količine prisutnih enzima. Taj važni način regulacije provodi se na razini transkripcije [2].

## 2.5. Obitelji enzima

Enzimi se dijele na 6 obitelji enzima.

### 2.5.1. Oksidoreduktaze

Oksidoreduktaze su skupina enzima koji kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije uz primanje ili otpuštanje vodikovih atoma ili elektrona. Najčešće kataliziraju redoks reakcije u metaboličkim procesima, ali moguća je i njihova primjena u brojnim redoks reakcijama koje su od velike važnosti za industriju. Oksidoreduktaze se dijele na dehidrogenaze, oksidaze, oksigenaze i peroksidaze [19].

### 2.5.2. Transferaze

Transferaze kataliziraju prijenos funkcionalnih skupina poput metilne, hidroksimetilne, glikozilne, acilne, alkilne, fosfatne i sulfatne skupine mehanizmom nukleofine supstitucije [20].

### 2.5.3. Hidrolaze

Hidrolaze su obitelj hidrolitičkih enzima koji se obično koriste kao biokemijski katalizatori koji koriste vodu za cijepanje kemijske veze kako bi se velika molekula podijelila na dvije manje. Hidrolaze su ključne za tijelo budući da probavljaju velike molekule u fragmente za sintezu, izlučujući otpadne tvari i osiguravaju izvore ugljika za proizvodnju energije, pri čemu se mnogi biopolimeri pretvaraju u monomere [21].

### 2.5.4. Liaze

Liaze su vrsta enzima koji kataliziraju reakcije eliminacije uz stvaranje dvostruke veze ili adiciju na dvostruku vezu.

### 2.5.5. Izomeraze

Proces izomerizacije molekula kataliziran je izomerazama. Izomeri su molekule identične kemijske formule, ali različite konfiguracije atoma. Enzimi izomeraze kataliziraju procese kojima se funkcionalne skupine prenose unutar molekule. Izomeraze kataliziraju reakcije izomerizacije kao što su racemizacija i epimerizacija [20].

### 2.5.6. Ligaze

Ligaze su obitelj enzima koji kataliziraju povezivanje dvije molekule uz nastanak nove kemijske veze i istodobno cijepanje ATP-a.

## 3. Proteinsko inženjerstvo

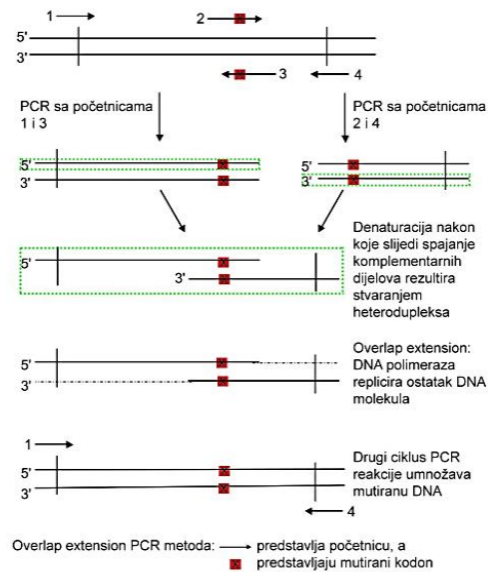
Proteinski inženjering uključuje sintezu novih proteina ili izmjene postojeće sekvence/strukture proteina kako bi se postigle željene funkcije [22]. Riječ je o grani biotehnologije koja za cilj ima promijeniti ili unaprijediti prirodne proteine. Proteinsko inženjerstvo se koristi kako bi se zadovoljile specifične potrebe organizma. Rekombinantni proteini su proteini koji su drugačiji od proteina koje nalazimo u prirodi jer je neki njihov dio ljudskim djelovanjem izmijenjen [23]. U proteinskom inženjerstvu postoje dvije osnovne metode dobivanja proteina: racionalni dizajn i usmjerena evolucija „*in vitro*“ .

### 3.1. Racionalni dizajn

Racionalni dizajn predstavlja metodu proteinskog inženjerstva koja se temelji na razumijevanju strukture i funkcije proteina, te ciljano modificira ili stvara nove proteine sa željenim svojstvima. Racionalni dizajn se primjenjuje u različitim područjima, za razvoj novih lijekova, enzima, katalizatora, materijala s posebnim svojstvima. Sve veći razvoj računalnog modeliranja i eksperimentalnih tehnika omogućuje usmjerene pristupe dizajnu molekula. Racionalni dizajn ima dvije najčešće metode koje se primjenjuju:

#### 3.1.1 Overlap extension

Overlap extension (produljenje preklopa) (slika 12.) metoda se bazira na uvođenju mutacija u gen pomoću mutagenih početnica koristeći umnožavanje DNA pomoću lančane reakcije polimeraze (PCR, eng. polymerase chain reaction)[23].



Slika 12. Shema metode produljenje preklopa [23].

PCR s proširenjem preklapanja vrijedna je tehnika koja se obično koristi za kloniranje velikih složenih fragmenata, uređivanje kloniranih gena ili spajanje dva genska elementa zajedno [24].

### 3.1.2. Kružna mutagenaza (eng. whole plasmid single round PCR)

Metoda kružne mutagenaze je jednostavnija metoda koja pripada skupini metoda racionalnog dizajna. Za kružnu mutagenazu potrebno je manje početnica i manje ciklusa PCR. Problem ove metode je neučinkovitost kada su u pitanju veći plazmidi [23].

### 3.2. Usmjereni evolucija – „in vitro“

Usmjereni evolucija je metoda kojom se oponašanjem prirodnog procesa evolucije mogu poboljšati svojstva nekog proteina. Uvođenjem nasumičnih mutacija u gen koji kodira ciljani protein, u više ciklusa se stvara veliki broj (knjižnica) varijantnih proteina koji u sebi nose nasumične mutacije [25].

Usmjereni evolucija se može generalno podijeliti na dva glavna koraka:

1. diverzifikaciju gena općom mutagenozom, rekombinacijom gena ili nekom drugom metodom kako bi se stvorila raznolika biblioteka proteinskih sekvenci [26]
2. ispitivanje i probir dobivenih mutanti na željena svojstva [26].

Do danas, većina istraživanja povezana s usmjerenom evolucijom provedena su na bakteriji *E. coli* i *Saccharomyces cerevisiae*, međutim, uspješno su korištene i druge vrste bakterija i kvasaca kao i stanične linije sisavaca i kukaca [27].



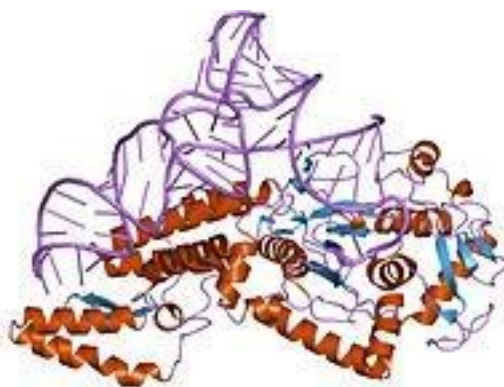
### 3.3. Ugradnja nestandardnih aminokiselina u proteine

Proteini su izgrađeni od 20 esencijalnih aminokiselina, kako bi se proširila funkcionalnost proteina upotrebljavaju se nove metode koje omogućuju uporabu neproteinogenih aminokiselina. Izvor nekih neproteinogenih aminokiselina su druga živa bića, različiti eukarioti i prokarioti, ali mogu biti i umjetno dobivene metodama organske sinteze. Većina proteina sadrži dvadeset različitih aminokiselina, koje su određene šezdeset i jednim kodonom genetskog koda. Otkriće selenocisteina i nedavno pirolizina (4-metil-pirolin-5-karboksilat) dovelo je do proširenja genetskog koda na dvadeset i dvije aminokiseline. Selenocistein pronađen u prokariotskim i eukariotskim organizmima kodiran je STOP kodonom UGA, dok je pirolizin nedavno otkriven u nekim metanogenim arhejama kodiran STOP kodonom UAG [28].

#### 3.3.1. Metoda supresije STOP kodona

Supresija stop kodona predstavlja metodu kod koje ribosom ne uspijeva prekinuti sintezu proteina na stop kodonu. Glavni uvjet za uspjeh metode supresije stop kodona jest ortogonalnost, koja se očituje u specifičnosti odnosa transportne RNA (tRNA) i aminoacil-tRNA sintetaze (aaRS).

U procesu translacije, svaka aminokiselina ima svoj odgovarajući par tRNA/aaRS-tRNA, stoga je potrebno pronaći odgovarajući par tRNA/aaRS-tRNA, koji će omogućiti ugradnju nestandardne aminokiseline tijekom čitanja STOP kodona. Aminoacil-tRNA-sintetaze (slika 13.) su enzimi prijeko potrebni za vjernu translaciju genetskoga koda [29]. Riječ je o enzimima koji povezuju molekulu tRNA s njihovim aminokiselinama. Potrebno je dizajnirati aaRS-tRNA koja će prepoznavati nestandardnu aminokiselinu i povezati je s tRNA koja prepoznaje STOP kodon – ovako dizajniran par tRNA/aaRS-tRNA ubacuje se u stanicu domaćina. Način koji to omogućuje naziva se ortogonalnim zato što tRNA i aaRS-tRNA ne dolaze iz istog organizma nego iz evolucijski divergentnog s obzirom na domaćina. Do unakrsnih reakcija između domaćinske aaRS-tRNA i strane aaRS-tRNA ne dolazi zbog drugačije razvijenih sekvenci koje su posljedica divergentne evolucije [23].



Slika 13. aminoacil-tRNA- sintetaza [30].

Ortogonalne nestandardne aminokiseline ugrađuju se na točno određeno mjesto pomoću ortogonalnog para aaRS-tRNA, metodom supresije stop kodona. Za ugradnju nestandardne aminokiseline potreban je kodon koji ne kodira niti jednu od 20 standardnih

aminokiselina, a tome mogu poslužiti STOP kodoni ili kvadrupletni kodoni. Željeni kodon može se ugraditi na bilo koje mjesto u primarnoj strukturi, što omogućuje ugradnju nestandardne aminokiseline na točno određeno mjesto u proteinu [31].

### 3.3.2. Ugradnja pod pritiskom

Druga metoda jest „ugradnja pod pritiskom“ (engl. selective pressure incorporation, SPI). SPI metoda bazira se na uzgajanju bakterijske kulture na podlozi koja je auksotrof za neku određenu aminokiselinu. Prvo se podloga obogati s ograničenim količinama aminokiseline za koju je određeni soj bakterije auksotrof (tj. bakterija ne može rasti bez te aminokiseline), a kada se ta zaliha potroši podloga se obogati s nestandardnom aminokiselinom koju želimo ugraditi u protein. Osim te aminokiseline na podlogu se doda i induktor koji je zaslužan za prekomjernu ekspresiju gena koji kodira protein u koji želimo ugraditi nestandardnu aminokiselinu. Na ovaj način moguće je ugraditi aminokiseline slične tj. analogne originalnoj proteinogenoj aminokiselini [23]. Ova metoda omogućava ugradnju više neproteinogenih aminokiselina.

### 3.3.3. Promjena značenja kodirajućeg kodona

Promjena značenja kodirajućeg kodona (engl. sense codon reassignment, SCR) usmjerena je na prekidanje degeneracije genetskog koda radi uvođenja neproteinskih aminokiselina (engl. non-canonical amino acids, ncAA). Među 61 kodirajućim kodonom koji se pojavljuje u prirodi, postoji velika količina redundantnosti, jer grupe od dva, tri, četiri pa čak i šest kodona istovremeno čitaju obitelji izoakceptora tRNA. Takve degenerirane kodonske strukture mogu se ponovno preraspodijeliti, zadržavajući jedan kodon za prirodno kodiranu aminokiselinu, a druge dodijeliti ncAA. SCR je vrlo obećavajuća metoda proteinskog inženjerstva, posebno u području *in vitro* translacije bez stanica gdje se komponente translacije mogu lako zamijeniti ili izostaviti [32]. Razlika metode supresije i metode promjene značenja kodona je u tome što kod promjene značenja dolazi do potpunog uklanjanja funkcije i značenja određenog kodona, dok kod supresije postoji mogućnost kompeticije s originalnim značenjem kodona.

## 4. Umjetni enzimi – konstitucija, katalitičke funkcije

Razvoj računalnih metoda i metoda za uređivanje DNA potaknulo je stvaranje umjetnih enzima (*de novo* enzima) – sintetskih ili organskih molekula stvorenih da obavljaju abiološke katalitičke funkcije. Ovi novi katalizatori nastoje proširiti katalitičku snagu koju nudi priroda kroz nove funkcije i svojstva [33]. Umjetni enzimi mogu oponašati katalitičku sposobnost i specifičnost dobro karakteriziranog enzima ili katalizirati kemijske reakcije koje se ne odvijaju u prirodi koristeći poznate mehanizme enzimske katalize [34]. Tehnologija umjetnih enzima ne podrazumijeva samo stvaranje novih enzima, nego je moguće poboljšati svojstva već postojećih enzima. Termostabilnost, tolerancija na organska otapala, specifičnost prema supstratu i katalitička aktivnost samo su neka od svojstava koji se mogu poboljšati.

Glavno sredstvo u proteinskom inženjerstvu jest genetski kod. U sintezi umjetnih enzima koriste se prirodne, ali i umjetno dobivene aminokiseline, koje proširuju područje

djelovanja enzima. Za kreiranje umjetnog enzima mogu se upotrebljavati nebiološki dijelovi, organske grupe. Za umjetno dobivene metaloenzime koriste se metalni centri. Redoks-aktivni centri i RNA se koriste za sintezu ribozima. Posebna skupina enzima jesu nanozimi, nanomaterijali koji imaju karakteristike slične enzimskim karakteristikama [33].

Prvi prijavljeni pristupi za razvoj umjetnih enzima slijedili su ili računalni dizajn enzima ili strategije usmjerene evolucije, neovisno [33]. No obje metode samostalno nisu bile dostatne za sintezu funkcionalnog enzima. Iz tog razloga bitno je kombinirati dvije metode, kako bi nastali enzim ostvario svoju funkciju i postao koristan.

#### 4.1. Računalni dizajn enzima

Računalni dizajn enzima fokusiran je na traženje optimalne proteinske okosnice koja obuhvaća katalitičke ostatke u povoljnoj orijentaciji. Za svaku poziciju aminokiselinskog ostatka na definiranoj okosnici proteina, procjenjuju se različite konformacije bočnog lanca sve dok se ne postigne presavijanje s najnižom energijom [33].

Računalni dizajn enzima počinje dizajniranjem enzima koji je optimiziran za stabilizaciju prijelaznog stanja, tzv. teozim. Enzimi su izuzetno složene biomolekule koje se sastoje od specifične sekvence aminokiselina s preciznim presavijanjem. Protein s 300 aminokiselina može imati 20 300 mogućih sekvenci i svaki aminokiselina može poprimiti tri različite konformacije ovisno o tome diedarskim kutovima [35]. Veliki broj mogućih kombinacija znatno otežava posao, jer potrebno je naći točno određenu kombinaciju, u točno određenoj konformaciji kako bi se ostvarila primarna ideja o umjetno dobivenom enzimu.

#### 4.2. Usmjerena evolucija enzima

Strategija usmjerene evolucije enzima inspirirana je konceptom „prirodne selekcije“ kojeg je predložio Charles Darwin, koji kaže kako raznolikost vrsta proizlazi uglavnom iz slučajnih mutacija u genomu [36].

Usmjerena evolucija enzima jest strategija koja se temelji na mutaciji već postojećih enzima, enzimi evoluiraju u *in vitro* uvjetima. Metode kojima se koristi ova strategija su mutageneza, rekombinacija gena ili kombinacija različitih funkcionalnih domena.

Zamjena prirodnih aminokiselina za umjetno dobivene aminokiseline je veoma korisna metoda za poboljšanje i proširenje genetskog koda. Ova zamjena zahtjeva posebne kombinacije aminoacil-tRNA sintetaze (aaRS)/tRNA.

Usmjerena evolucija također kao samostalna metoda ima određena ograničenja i nije u mogućnosti proizvesti funkcionalan enzim. Iz tog razloga najbolji način za dobivanje umjetnih enzima jest kombinacija računalnog dizajna i usmjerene evolucije.

#### 4.3. Kempova reakcija eliminacije katalizirana električnim poljima

Kempova eliminacijska reakcija je reakcija koja se najčešće koristi za *de novo* računalni dizajn novih enzima. Ova reakcija predstavlja bazno kataliziranu razgradnju benzoksazola kako bi se dobili 2-cijanofenoli, prijenos protona i kidanje veze odvijaju se istovremeno kroz delokalizirano prijelazno stanje. Elektrostatička predorganizacija je odlučujući faktor za katalitičku učinkovitost novih enzima [37]. Riječ je o reakciji koja uključuje otvaranje prstena benzoksazola i njegovih derivata djelovanjem prirodnih enzima

ili kemijskih katalizatora. Računalni dizajn Kempove eliminacije jako je važan jer je riječ o reakciji koja nije uključena u poznate metaboličke reakcije [38]. Zbog četiri glavna čimbenika: jednostavnost jednostupanjskog E2 mehanizma, odsutnost katalize prirodnim enzimima, jednostavna sinteza reaktanata i lako praćena kinetika, Kempova reakcija je često korištena pri testiranju različitih strategija sinteze enzima [37].

Prvi primjer dizajna umjetnog enzima za Kempovu reakciju bio je objavljen 2008., slijedeći protokol softvera Rosetta. Tri od ovih enzima (KE07, KE70 i KE59) su naknadno optimizirani računalnim dizajnom i usmjerenom evolucijom [37].

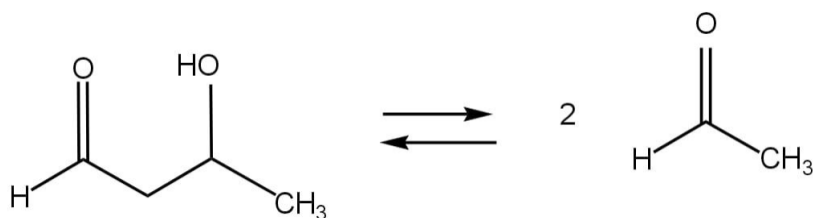
Na Kempovu reakciju eliminacije učinak imaju dva različita električna polja, reakcijsko polje otapala, koje je ovisno o raspodjeli naboja kemijskog sustava i usmjerenom vanjsko polje, potpuno neovisno o distribuciji naboja. Negativna električna polja orijentirana na z os dovode do povećane energetske barijere s obzirom na kompleks reaktanata. Do iste pojave dolazi i u slučaju reakcijskih polja otapala, gdje je dielektrična konstanta otapala povećana. Za protonska otapala poput vode, a posebno za negativno nabijene vrste poput acetata dolazi do povećanja energetske barijere u odnosu na kompleks reaktanata [37].

Električna polja mogu imati i orijentacijski učinak na reaktante i njihova prijelazna stanja, što može dovesti do različitih mehanizama. Konformacijske promjene enzima, u slučaju povezanosti njihovog katalitičkog učinka s dinamičkim ponašanjem, blisko su povezane sa promjenama električnog polja [37].

Kada se kao baza koristi acetat, koji odvlači protone sa ugljikovog atoma supstrata, bilo koje otapalo će uzrokovati inhibiciju. Voda ima veliku moć inhibicije jer stvara snažne vodikove veze s negativnim kisikovim atomom supstrata, ove vodikove veze pokazuju značajan elektrostatički karakter. Kada se voda zamjeni s nekim aprotoskim organskim otapalom dolazi do velikog povećanja brzine reakcije. Brzina reakcije može se povećati dodatkom akceptorske nitro skupine (-NO<sub>2</sub>), dolazi do smanjena energijske barijere [37].

#### 4.4. Retro-aldolne reakcije

Kao što ime sugerira, retro-aldolna reakcija je upravo obrnuto od aldolne reakcije. Ovdje se veza ugljik-ugljik prekida i formira dva fragmenta [38]. Retro-aldolne reakcije (slika 14.) su reverzibilne reakcije, stoga su i aldolaze u mogućnosti katalizirati ih. Primjer takve aldolaze je fruktoza-1,6-bisfosfat aldolaza, koja može sudjelovati i u aldolnim reakcijama, ali i u retro-aldolnim reakcijama.



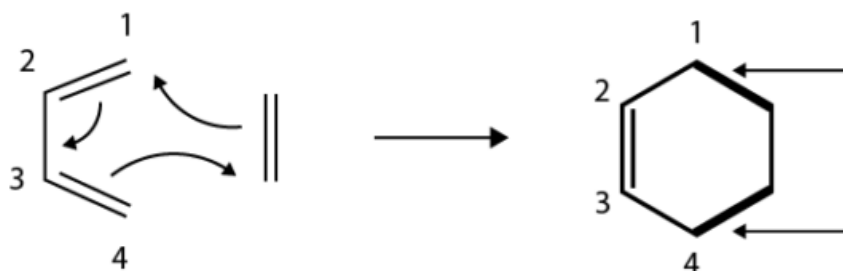
Slika 14. Retro-aldolna reakcija (preuzeto i prilagođeno iz [38].)

Godine 2008. Jiang i sur. izvijestili su o prvim koracima prema razvoju novog enzima retro-aldolaze koji cijepa ugljik-ugljik veze u neprirodnom supstratu (4-hidroksi-4-(6-metoksi-2-naftil)-2-butanon), obično poznat kao “*methodol*”, korištenjem softvera Rosetta [33]. Između novonastalog enzimskog modela i prirodnog enzima postojalo je neslaganje u katalitičkim stopama što je zahtijevalo daljnje istraživanje enzima.

#### 4.5. Diels-Alder reakcija

Diels-Alder reakcija smatra se jednom od najkorisnijih reakcija organske sinteze, čija primjena ne samo da dovodi do snažnog povećanja molekularne složenost (veličina molekule, topologija, stereokemija, funkcionalnost i dodaci), već može rezultirati strukturama kojima se može dodatno povećati složenost korištenjem drugih snažnih sintetičkih reakcija [39].

Diels-Alderova reakcija je najpoznatija vrsta cikloadicijskih reakcija, podskupina pericikličke reakcije. Reakcije se odvijaju usklađeno preko jednog prijelaznog stanja. U Diels-Alder reakciji (slika 15.) dvostruka C=C veza dienofila se adira na prvi i četvrti C-atom u konjugiranom dienu. Rezultat reakcije je šesteročlani prsten.



Slika 15. Diels-Alder reakcija [40].

Godine 2010. grupa Baker provela je in-silico razvoj enzimskih modela za Diels–Alderovu reakciju, izvanredna reakcija stvaranja veze u organskoj sintezi s obzirom na njegovu svestranost i značajnu stereoselektivnost. Prvi koraci uključivali su zamjenu svih katalitičkih ostataka ili ostataka za koje se predviđa interakcija sa supstratom [33]. Dalje je uslijedio niz lančanih reakcija polimeraze sklonih greškama, epPCR eksperimenata (eng. error-prone polymerase chain reaction, epPCR) i osam krugova evolucije. Iz ovog istraživanja proizašli su i zaključci o strukturnim interakcijama i o načinu maksimizacije katalitičke aktivnosti. Sva poboljšanja bi bila moguća ukoliko bi se u istraživanju kombinirali računalni dizajn i usmjerena evolucija.

#### 4.6. Umjetni hidrolitički metaloenzimi

Hidrolitički metaloenzimi imaju mnoge važne uloge u životu. Proteaze, fosfolipaze i nukleaze koje hidroliziraju proteine, lipide i nukleinske kiseline često zahtijevaju jedan ili više metalnih iona. Metaloenzimi koji hidroliziraju fosfoproteine važni su za prijenosu signala. Enzimi koji kataliziraju sintezu DNA transesterifikacijom, kao što su polimeraze i reverzne transkriptaze, aktiviraju se pomoću dva metalna iona. Osim toga, mnogi RNA enzimi koji kataliziraju transesterifikaciju i reakcije hidrolize aktiviraju više od jednog metalnog iona [41].

Umjetni hidrolitički metaloenzimi inspirirani su prirodnim metaloenzimima, koji koriste metalne centre za katalizu. Metalni centri mogu biti metalni ioni cinka ( $Zn^{2+}$ ), željeza ( $Fe^{2+} / Fe^{3+}$ ), nikla ( $Ni^{2+}$ ), kobalta ( $Co^{2+}$ ). Proučavanje umjetno dobivenih hidrolitičkih metaloenzima dovelo je do zaključka kako je riječ o enzimima koji značajno ubrzavaju reakcije hidrolize, ali i neke druge organske reakcije.

Postoje tri izravna načina aktivacije tih metalnih iona kojima se mogu omogućiti reakcije hidrolize, tj. Lewisovom kiselinom, aktivacijom nukleofila i odlazećim skupinama. Osim toga, metalno koordinirane molekule vode mogu djelovati kao opći kiselinski katalizatori i metalno koordinirani hidroksidi mogu djelovati kao opći bazni katalizatori [41].

#### 4.6.1. Aktivacija Lewisove kiseline

Izravna koordinacija supstrata metalnim ionom povećava elektrofilnost supstrata. Aktivacija Lewisove kiseline jako je važna za veliki broj reakcije. Hidroliza estera, nitrila, amida, fosfata i još mnoge druge reakcije zahtijevaju aktivaciju Lewisovih kiselina.

Kiselina je svaka vrsta koja se ponaša kao akceptor elektronskog para pri formiranju veze, što znači da mora imati praznu orbitalu u koju može prihvatiti spomenute elektrone. Time je znatno proširio što se smatra kiselinom. Tako su Lewisove kiseline npr.  $CO_2$  i ioni bakra koji ne sadrže vodik u svojoj formuli, čak je i sam proton Lewisova kiselina [42].

Kiralne Lewisove kiseline korištene su kao katalizatori u mnogobrojnim stereoselektivnim transformacijama. Metalni ion je potreban za stabilizaciju negativnog naboja, koji se nalazi na koordiniranom atomu. Kada je koordinirani atom kisik, metalni ion služi za stabilizaciju okisaniona. Jedan od načina za procjenu relativne Lewisove kiselosti metalnih iona je razmatranje Brønstedove kiselosti metalom koordiniranih molekula vode. Metalni kationi povećavaju kiselost vezane molekule vode stabiliziranjem metalno vezanog hidroksidnog aniona. Vezani metali mogu pružiti značajniju aktivaciju Lewisove kiseline. [41].

Aktivno mjesto goveđe karboanhidraze sastoji se od tetraedarski koordiniranog cinkovog iona s koordiniranom molekulom vode čiji je pKa (7,5) znatno niži od pKa vode vezane na slobodni cinkov ion (8,96). Bilo je mnogo zanimanja za razvoj jednostavnih kompleksa cink hidrata s neutralnom vrijednosti pKa. Woolley izvijestio je o pet koordiniranom kompleksu cink hidrata s pKa od 8,7. Ovaj kompleks se pokazao aktivnim za kataliziranje hidratacije ugljikovog dioksida [44]. Kimura i sur. objavili su tetraedarski kompleks cink hidrata s pKa (7,3) koji skoro odgovara onom cink hidrata na aktivnom mjestu karboanhidraze. Kimura kompleks je bio dobar katalizator za hidrolizu estera s dobrim ili lošim izlaznim skupinama [41,44].

Na kiselost metalnog središta može se utjecati na više načina. Oni metali koji imaju više koordiniranih liganada bi trebali biti manje kiseli, od onih koji imaju manje koordiniranih liganada. Kiselost metalnog središta se povećava smanjenjem bazičnosti liganda. Pozitivan učinak na povećanje Lewisove kiselosti ima i slaba veza između liganda i metala.

Važnost umjetno dobivenih hidrolitičkih metaloenzima jest u njihovoj sposobnosti da ubrzaju hidrolize za jako širok spektar supstrata.

#### 4.6.2. Aktivacija nukleofila

Molekule ili ioni koji na sebi imaju nepodijeljene elektrone i imaju sklonost da ih doniraju drugom atomu su nukleofili. Svi nukleofili pripadaju skupini baza.

Smatra se da su metalni hidroksidi uključeni u razne hidrolitičke metaloenzime, uključujući karboanhidrazu, karboksipeptidazu i nukleaze [43]. Jednostavni metalni hidroksidi su aktivni kao nukleofilni katalizatori za hidrataciju ugljikovog dioksida i hidroliza anhidrida octene kiseline i p-nitrofenil acetata [44]. Povećanjem bazičnosti metalnog hidroksida dolazi do povećanja brzine katalize prethodno spomenutih reakcija. Dobro pozicioniran, aktivan metalni hidroksid ima sposobnost ogromnog ubrzanja brzina reakcije hidrolize i može osigurati katalitičku reakciju jednaku onoj koju omogućava prirodni enzim.

#### 4.6.3. Aktivacija odlazećih skupina

Aktivacija odlazećih skupina može se smatrati reverznom reakcijom aktivacije nukleofila. U hidrolizi estera, metalni ioni mogu aktivirati izlaznu skupinu koordinacijom na izlaznu skupinu kisika i smanjenje bazičnosti alkoksida [45].

Kada se jaki nukleofili (npr. hidroksid ili alkoksid) koriste za cijepanje estera s dobrim odlazećim skupinama (npr. p-nitrofenol ili acetat), reakcija se odvija brzo [46]. Snižavanje bazičnosti odlazeće skupine kroz metalnu koordinaciju će rezultirati s oko tisuću puta većim povećanjem brzine reakcije cijepanja. Kada se slabi nukleofili (npr. acetat ili fenoksid) koriste za cijepanje estera sa slabim izlaznim skupinama (npr. alkoksid), reakcija je spora [46]. U ovom slučaju deseterostruko smanjenje bazičnost odlazeće skupine rezultat će odgovarajućim povećanjem brzine hidrolize.

Aktivacija grupe koja odlazi, metalnom koordinacijom, nije važna za hidrolizu amida jer su protonirani amini jače kiseline (i bolje odlazeće skupine) od metalno koordiniranih amina. Općenito, skupine koje se lako protoniraju neće biti aktivirane metalnim ionima [41].

### 4.7. Kimotripsin

$\alpha$ -Kimotripsin je "hidrolitički enzim" član super-obitelji serinskih proteaza, enzima koji hidrolitički cijepaju peptidne veze koristeći serin hidroksilnu skupinu kao nukleofil na aktivnom mjestu. Najopsežnije je proučavan kimotripsin goveđe gušterače [47]. Područje umjetnih enzima uvelike se bavilo oponašanjem hidrolitičkih enzima. Budući da je enzim kimotripsin bio jedan od prvih koji je opsežno proučavan zaključeno je kako su mnogi laboratoriji stvorili umjetne peptidaze i esteraze, uključujući one koji koriste nukleofilni mehanizam poput onog u kimotripsinu.

Kritični zahtjev je bifunkcionalna kataliza, koja u kimotripsinu uključuje imidazol koji prvo djeluje kao opća baza, zatim kao opća kiselina i serinska hidroksilna skupina koja služi kao nukleofil [41]. Posebna učinkovitost kimotripsina vidljiva je ako se kimotripsin sagleda kao metaloenzim. Za takav hidrolitički enzim posebno je važan ion cinka ( $Zn^{2+}$ ).

#### 4.7.1. Sinteza umjetnog kimotripsina

Prvi korak u sintezi umjetnog kimotripsina je dizajn molekula koje oponašaju aktivno mjesto i katalitički mehanizam kimotripsina. To mogu biti male molekule ili peptidi. Nakon računalnog dizajna slijedi kemijska sinteza. Za kemijsku sintezu se koriste organske kemikalije i metode sinteze. Sinteza nekada uključuje izgradnju specifičnih peptidnih sekvenci, nekada se uključuju specifične katalitičke skupine. Jako važan uvjet pri sintezi jest ispravna konformacija nastalog produkta.

Sintezu slijede istraživanja, točnije karakterizacija novonastalog enzima. Provjerava se njegova struktura, enzimska aktivnost, specifičnost prema supstratu, stabilnost. Ove značajke se ispituju korištenjem spektroskopskih analiza i kinetičkih mjerenja.

Po dobitku rezultata provedenih istraživanja provode se dodatna poboljšanja, ukoliko su ista potrebna. Najčešće je riječ o modifikacijama aktivnog mjesta ili o proširenju specifičnosti na supstrat.

#### 4.8. Ribonukleaze

Ribonukleaze (RNaze) čine skupinu nukleaza, enzima koji kataliziraju hidrolizu 3',5'-fosfodieterskih veza u RNA. Za većinu RNaza, kataliza uključuje stvaranje nukleozidnih 2',3'-cikličkih fosfatnih intermedijera i stvaranje produkta s 3'-fosfatnom skupinom. RNaze su prisutne u svim organizmima, uključujući bakterije, kvasce, biljke i životinje, te u gotovo svim tkivima i tjelesnim tekućinama sisavaca. Neke RNaze se izlučuju (izvanstanično), što vjerojatno ukazuje na njihovu glavnu ulogu u probavi [48].

##### 4.8.1. Umjetne ribonukleaze

Ako se samo jedna RNA može odabrati između mnogih drugih i cijepati na željenom mjestu, otvara se put do nove znanosti o RNA (regulacija ekspresije specifičnog gena u stanicama, napredna terapija, manipulacija RNA i drugo). Cilj znanstvenika je stvoriti umjetni enzim za selektivno cijepanje RNA sekvenci, koji će imati znatno veću selektivnost nego sve prirodne ribonukleaze. Potpuno umjetne ribonukleaze su dizajnirane i sintetizirane prema funkcijama i svojstvima potrebnima organizmu [49].

Postoje dvije strategije za selektivno cijepanje RNA sekvenci. Prva strategija uključuje katalizatore za hidrolizu RNA, kovalentno vezane na molekule, koje vežu RNA supstrat blizu ciljanog mjesta cijepanja. Za prepoznavanje sekvenci koriste se DNA oligomeri, koji su komplementarni sa RNA supstratom. Ukoliko je potrebno, moguće ih je kemijski modificirati kako bi se postigla željena svojstva [49].

Druga strategija aktivira ciljanu fosfodietersku vezu na RNA supstratu, koristeći nekovalentne interakcije. Konformacija ostatka riboze na ciljnom mjestu je promijenjena tako da se olakša intramolekularni napad 2'-OH prema atomu fosfora. Kada se su sustav dodaju katalizatori za hidrolizu RNA, aktivirana fosfodieterska veza se cijepa preferencijalno u odnosu na ostale veze. Kao katalizatori za hidrolizu RNA koriste se metalni ioni i njihovi kompleksi. Serija lantanoida, posebice ioni tulija (Tm III), iterbija (Yb III) i lutecija (Lu III), su jako značajni katalizatori. Lantanoid(III) kloridi su najčešće korišteni za katalizu, jer je riječ o iznimno prikladnim i povoljnim katalizatorima [49].



Razni umjetni enzimi dobivaju se povezivanjem molekularnih škara sa dijelovima koji prepoznaju sekvencu, najčešće su to DNA oligomeri. Za postizanje velike selektivnosti i učinkovitosti važan je dizajn dijela koji povezuje molekularne škaru i diju koji prepoznaje sekvencu. Prvo, DNA oligomer, koji je komplementaran sa supstratom RNA, priprema se na automatiziranom sintesajzeru. U finalnom stupnju sinteze dolazi do povezivanja amino poveziča sa 5' - krajem DNA korištenjem fosforamidatnog monomera. Ova modificirana DNA reagira s p-nitrofenil esterom N,N-bis (etoksikarbonilmetil)glicin, a zatim se etil esteri hidroliziraju u alkalnim uvjetima. Ovim se postupcima iminodiacetna skupina veže na DNA putem amidne veze. Umjetni enzimi pripremaju se *in situ* pomoću spajanjem nastalih molekula s lantanid(III) kloridom u vodi. Prema elektroforezi u poliakrilamidnom gelu, cijepanje RNA događa se selektivno na ciljnom mjestu gdje se nalazi kompleks lantanoida [49].

#### 4.9. Prvi umjetno dobiveni enzim – Syn-F4

Proizvodnja novih enzima koji su katalitički aktivni *in vitro*, a biološki funkcionalni *in vivo* ključni je cilj industrije umjetnih enzima. Syn-F4, prvi je *de novo* protein, koji ispunjava oba kriterija. Pročišćeni Syn-F4 hidrolizira siderofor željeza enterobaktina, a njegova ekspresija Syn-F4 omogućuje rast soja *Escherichie coli* u mediju s ograničenim sadržajem željeza. Otkriće ovog proteina pokazuje da potpuno nove sekvence mogu pružiti enzimsku funkciju u živućem organizmu [50].

Kako bi se utvrdilo je li pročišćeni protein Syn-F4 sposoban za enzimsku hidrolizu, *de novo* protein je eksprimiran i pročišćen pomoću kromatografije s ionskom izmjenom i gel filtracije, a zatim se pratila sposobnost Syn-F4 za razgradnju enterobaktina sa željezom (FeEnt ) pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnute sa spektrometrijom masa [50].

Molekulske mase produkata razgradnje ukazale su na to da hidroliza FeEnt-a putem Syn-F4 proizvodi iste produkte kao i nativni enzim *E. coli*. Štoviše, vremenski tijek promatran pomoću LC-MS korelirao je s vizualnim gubitkom crvene boje povezanim s degradacijom FeEnt-a [50].

Jedno od obilježja prirodnih enzima je njihova enantioselektivnost. Kako bi se utvrdilo je li *de novo* dizajnirani enzim također enantioselektivan, testirana je sposobnost Syn-F4 da hidrolizira željezo D-enterobaktin, sintetski enantiomer prirodnog enantiomera siderofora. Syn-F4 nije razgradio D-enterobaktin sa željezom, što je ukazalo na to da *de novo* dizajnirani enzim slični prirodnom enzimu u svojoj specifičnosti za prirodno nastali kiralni supstrat [50].

## 5. Nanoenzimi

### 5.1. Nanotehnologija

Stroža definicija pojma nanotehnologija govori o proučavanju i kontroli pojava i materije na prostornoj skali manjoj od 100 nanometara (odnosno,  $10^{-7}$  m) [51]. Pojam nanotehnologija prvi je upotrijebio 1974. godine pokojni Norio Taniguchi (Sveučilište u Tokio) koji se odnosi na sposobnost inženjeringa materijala na razini nanometara. Nanotehnologija se stoga definira kao projektiranje i izrada materijala, uređaja i sustava s kontrolom u nanometarskim dimenzijama. Bit nanotehnologije je u veličini i kontroli. Zbog raznolikosti primjene, neki preferiraju izraz u množini „nanotehnologije”; ipak, svi oni dijele zajedničku značajku kontrole na nanometarskoj skali [52].

Nanotehnologija je svoju primjenu našla u raznim sferama svakodnevnog života. Skoro sva polja ljudskog života obogaćena su pogodnostima nanotehnologije. Arhitektura, prijevoz, odjeća, električni uređaji, medicina, farmacija i nama zanimljiva primjena u kemiji.



Slika 15. Područja primjene nanotehnologije [53].

### 5.2. Nanoenzimi

Nanoenzimi predstavljaju niz nanomaterijala koji mogu oponašati djelovanje enzima. U području biomedicine nanoenzimi zaokupljaju ogromnu pozornost zbog svoje visoke stabilnosti i niske cijene. Enzimski slične aktivnosti nanoenzima mogu se regulirati s više čimbenika, kao što su oksidacijsko stanje metalnih iona, pH, razina vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) i glutationa (GSH), što predstavlja veliko obećanje za biomedicinske primjene. Tijekom prošlog desetljeća razvijeni su višenamjenski nanoenzimi za razne biomedicinske primjene [54].

Trenutno se nanoenzimi uglavnom sastoje od metala i metalnih oksida, budući da metalni aktivni centar može učinkovito oponašati katalitički elektronski redoks proces omogućen prirodnim enzimima. Konkretno, na aktivnosti oponašanja enzima utječu različiti čimbenici, kao što su oksidacijska stanja metalnog centra, redukcijski agens, temperatura i pH u okolnom prostoru [55]. Značajan utjecaj na nanoenzime ima i patološko mikrookruženje. U prisutnosti tumorskih stanica mogu se katalizirati nanoenzimske aktivnosti slične onim aktivnostima koje imaju prirodni enzimi.

Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća, objavljeno je da različite vrste nanomaterijala imaju intrinzične aktivnosti slične enzimima. Prirodni enzimi pokazuju intrinzičnu katalitičku sposobnost obično na jednom aktivnom mjestu gdje dolazi do katalizacija točno određene kemijske reakcije. Budući da nanoenzimima nedostaje takvo aktivno mjesto, osmišljene su različite strategije za poboljšanje katalitičkih svojstava ovih nanomaterijala, omogućujući im da selektivno i učinkovito reagiraju s ciljnim molekulama [55].

### 5.3.1. Nanoenzimi tipa I

Jedna strategija koristi konstruirana metalna mjesta, potrebna metalnim oksidima ili metalnim sulfidima za oponašanje metalnog katalitičkog aktivnog mjesta koje se nalazi u metaloenzimima [56]. Rani primjer takvih nanoenzima su nanočestice željezovog oksida ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), koje pokazuju djelovanje slično peroksidazi. Peroksidaze kataliziraju oksidaciju kromogenog supstrata, kao što su 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS), o- fenilendiamin dihidroklorid (OPD), u prisutnosti  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Utvrđeno je da najmanje nanočestice  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (od 30, 150 i 300 nm) imaju najveću katalitičku aktivnost, što je pokazalo da je velika površina nanočestica  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  odgovorna za aktivnost sličnu peroksidazi. Pretpostavili su da su aktivni površinski željezni i feri ioni u nanočesticama ključne komponente koje su omogućile ovu katalitičku aktivnost, oponašajući mjesto vezanja željeza i hema u peroksidazi [57].

Nanočestice cerijevog oksida ( $\text{CeO}_2$ ) također koriste svoj metal kao nanozim zbog njegove sličnosti u strukturi i biokemiji s ionom željeza, osobito u vezivanju s proteinima [58]. Nanočestice  $\text{CeO}_2$  imaju višenamjensku ulogu kao katalizatori. Pokazuju djelovanje slično djelovanju katalaze i superoksidazi. Višestruko djelovanje proizlazi iz više oksidacijskih stanja cerija, Ce(III) i Ce(IV). Prebacivanje između III/IV valencije nalikuje mehanizmu redoks enzima, koji koriste metale kao kofaktore za kataliziranje niza reverzibilnih redoks reakcija [59]. Važna karakteristika je i veličina čestica, naime manje čestice imaju bolju katalitičku aktivnost u odnosu na veće.

Metalni centar	Enzimi
Cink	Ugljična anhidraza, alkoholdehidrogenaza, organofosfat hidrolaza
Željezo	Katalaza, peroksidaza, citokrom oksidaza
Mangan	Enolaze, heksokinaza
Bakar	Tirozinaza, lizil oksidaza, lakaza
Kobalt	Dipeptidaze

Tablica 1. Metalni centri u određenim enzimima (preuzeto i prilagođeno iz [55].)

### 5.3.2. Nanoenzimi tipa II

Dok nanočestice metalnih spojeva tipa I oponašaju metal-hem redoks centar metaloenzima, ostale metalne nanočestice koje kataliziraju iste reakcije kao prirodni enzimi klasificiraju se kao nanozimi tipa II [55]. U ovu skupinu nanoenzima pripadaju metali: zlato (Au), srebro (Ag), platinu (Pt), paladij (Pd) i iridij (Ir).

Nanočestice zlata, u kontroliranim uvjetima (nezaštićene "gole" nanočestice, promjera 3,6 nm, u prisutnosti viška glukoze) mogu inicijalno katalizirati reakcije slične glukoza oksidazi i tako poslužiti za oponašanje glukoza oksidaze [60]. Čestice zlata također su pokazale aktivnost sličnu peroksidazi. Čestice zlata imaju značajno katalitičko djelovanje prema supstratima peroksidaze. Nanomaterijali zlata, srebra, platine i paladija pokazuju aktivnosti slične peroksidazi pri kiselom pH i aktivnosti slične katalazi pri bazičnom pH [61].

Platina ima različit katalitički mehanizam pri različitim vrijednostima pH. U kiselim uvjetima platina je imala aktivnost sličnu peroksidazi, a u bazičnim uvjetima se ponaša kao katalaza.

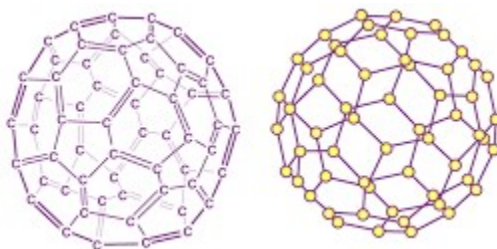
### 5.3.3. Nanoenzimi tipa III

Nanoenzimi na bazi metala mogu stvarati legure, to su nanoenzimi tipa III. Dva metala, kombinirano, pokazuju sinergistički učinak. Prilagođavanjem sastava legura mogu se prilagoditi i aktivnosti oponašanja enzima. Pokazano je da se za Ag-M (M = Au, Pd, Pt) nanoenzime peroksidaze na bazi bimetalnih legura, učinkovitost katalitičke aktivnosti može prilagoditi postupnim mijenjanjem omjera dvaju metala [62].

Povećana aktivnost Ir-Pd nanokocki slična peroksidazi dobivena je taloženjem atomskog sloja Ir na površinu Pd nanokocki [63]. Pretpostavlja se da je adsorpcijska energija površine Ir-Pd(100) veća od one Pd(100), što čini energetski učinkovitijom disocijaciju vodikovih peroksida u hidroksilne radikale [55].

### 5.3.4. Nemetalni nanoenzimi

Nanomaterijali na bazi ugljika, fuleren (Slika 16.) i derivati fulerena, ugljkove nanocijevi i grafen oksid su spojevi koji pokazuju enzimski slično djelovanje. Aktivnosti navedenih materijala slične su aktivnostima peroksidaze, katalaze i oksidaze. Pokazano je da karboksilno modificirani grafen oksid pokazuje aktivnost sličnu peroksidazi, s prijenosom elektrona koji se odvija s vrha valentnog pojasa grafena na najnižu nezauzetu molekularnu orbitalu vodikovog peroksida [65]. Grafen obogaćen dušikom (N) i borom (B) pokazao je još bolje djelovanje.



Slika 16. struktura fulerena [64]

### 5.3.5. Metal-ugljik nanoenzimi

Spojevi metal-ugljik jedna su od skupina nanoenzima. Dokazano je kako spojevi metal-ugljik imaju dobru katalitičku aktivnost. Ugljik obogaćen česticama željeza pokazao je oksidacijsko-redukcijsko djelovanje slično oksidazi. Mjesta na koja je vezano željezo ponašala su se kao vezna mjesta za molekulu kisika O<sub>2</sub>. U drugom primjeru, integrirane su

kvantne točke grafena s nanočesticama Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> i pokazali su superiorne aktivnosti slične peroksidazi u usporedbi s pojedinačnim kvantnim točkama grafena i nanočesticama Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [66].

Svi nanoenzimi na bazi metala, metalnih spojeva i ugljika oslanjaju se na veliku površinu, omogućenu ili malom veličinom čestica (reda desetina nanometara za nanoenzime na bazi metala ili metalnih spojeva) ili poroznom strukturom (ugljik nanoenzimima) kako bi se maksimizirala izloženost katalitički aktivnih atoma [55].

Metalno-organski okviri (MOF) koji se sastoje od metalnih iona kao čvorova i organskih liganda kao poveziča također imaju visoko porozne strukture koje se mogu koristiti kao nanoenzimi. U ovom konstruktivnom okviru čvorovi prijelaznog metala koji sadrže same MOF-ove mogu djelovati kao biomimetički katalizatori, dok struktura visoke poroznosti koju stvaraju metalno-organski poveznici mogu poslužiti kao mjesta vezivanja za supstrate. Njihove podesive veličine pora, visoko specifične površine i izložena aktivna mjesta daju MOF-ima visoku katalitičku učinkovitost [67].

Nanočestice Prussian Blue analogne su MOF-ima koje se istovremeno mogu ponašati kao oponašatelji multienzima (peroksidaza, superoksid dismutaza i aktivnosti slične katalazi) te su se učinkovito koristile kao čistači reaktivnih kisikovih vrsta [66].

#### 5.3.6. Jednoatomni nanoenzimi

Nanozimi s jednim atomom nalikuju prostornim strukturama kako bi oponašali elektroničku, geometrijsku i kemijsku strukturu već postojećeg središta za vezanje metala metaloenzima [55]. Gusto izolirani jednoatomni nanoenzimi FeN<sub>4</sub> pokazali izvanredne aktivnosti slične peroksidazi. Dodatno, drugi metali poput kobalta i cinka također se mogu koristiti za stvaranje jednoatomnih nanozima CoN<sub>4</sub> i ZnN<sub>4</sub> koji pokazuju aktivnosti slične peroksidazi [69].

#### 5.4. Ograničenja nanoenzima

Iako prethodno spomenuti nanomaterijali na bazi metalnih spojeva, metala, ugljika, nanokompozita i MOF-a pokazuju obećavajuće sposobnosti oponašanja enzima, postizanje iste razine afiniteta vezanja i specifičnosti kao prirodni enzimi ostaje izazov [70].

Ograničavajući čimbenici:

1. gustoća katalitički aktivnih površinskih iona (kao što su metalni ioni) i funkcionalnih skupina (kao što je karboksilna skupina u ugljikovim nanomaterijalima)
2. učinkovitost katalitičkog mehanizma

Ograničenja onemogućavaju širu primjenu ovih nanoenzima. Znanstvenici nastoje poboljšati već postojeće strukture, ali i kreirati nove. Cilj sinteze novih struktura i poboljšanja je smanjiti postojeća ograničenja i proširiti uporabu nanoenzima.

Brojna istraživanja i sinteze nanoenzima jako su važna, jer je riječ o području koje predstavlja budućnost znanosti. Jako je važno uvidjeti koliki je stvarni značaj povezane enzimske i nanotehnologije. Biokemija, medicina, industrija, kemija, samo su neka od područja koja će profitirati novim, poboljšanim enzimima i to na nano skali.

## 6. Primjena i budućnost umjetnih enzima

Umjetni enzimi su svoje mjesto pronašli u mnogim sferama svakodnevnog života. Uvelike su promijenili svijet znanosti i istraživanja.

### 6.1. Primjena umjetnih enzima u industriji

Industrijska primjena umjetno dobivenih enzima je višestruka. Proizvodnja lijekova i kemikalija predstavljaju najrašireniju industrijsku primjenu umjetnih enzima, ali njihova uporaba ne staje tu. Tehnologija umjetnih enzima je često korištena u industriji biogoriva, prehrambenoj industriji, industriji piva, bioloških detergenata. Prednost koju imaju u usporedbi s klasičnim kemijskim katalizatorima su veća specifičnost i selektivnost, ali i bolja učinkovitost [71].

### 6.2. Zaštita okoliša

Jako popularna tema današnjice je upravo zaštita okoliša i smanjenje onečišćenosti planeta. Umjetno dobiveni enzimi koriste se u svijetu zaštite okoliša kao ekološki prihvatljiva rješenja za probleme onečišćenja. Razgradnja specifičnih zagađivača, boja, pesticida ili otrovnih kemikalija, jedna je od zadaća umjetno dobivenih enzima. Primijenjeni su i za pročišćavanje zagađenih voda. Istraživači iz laboratorija u Kopenhagenu prvi su razvili enzim koji je sposoban ubrzati procese oksidacije, koristeći jednostavni i jeftini vodikov peroksid. Oksidacijski procesi smatraju se jednim od temelja cjelokupne kemijske proizvodnje, od boja do lijekova. Ali tradicionalni oksidansi imaju reputaciju opasno nerafiniranih. Zato su enzimi poželjni, a posebno oni koji mogu imati veliki stupanj specifičnosti. Jako je važna i njihova sposobnost rada u humanim uvjetima, za razliku od njihovih tradicionalnih kemijskih pandana, koji često trebaju visoke temperature, ekstremni pritisak i korozivno okruženje [72].

### 6.3. Biomedicina

Dijagnostika, bioimaging i terapija su samo neka od područja biomedicine koja koriste umjetno dobivene enzime. Umjetni enzimi se dizajniraju za ciljanje specifičnih biomolekula i stanica. Kontrola i isporuka lijekova također upotrebljavaju umjetno dobivene enzime. Budućnost umjetnih enzima obećava jako veliki napredak u svijetu biomedicine [73].

### 6.4. Biologija

Biolozi neprestano rade na istraživanjima umjetno dobivenih enzima kako bi dobili biološke sustave s novim funkcijama. Integracija umjetnih enzima u sintetske metaboličke putove ili u umjetne stanice su neke od zamisli biologa za uporabu umjetnih enzima. Tijekom posljednjih četrdeset godina, biosenzori na bazi enzima imali su veliki uspjeh u detekciji i kvantifikaciji raznih biološki relevantnih molekula. Međutim, prirodni enzimi ponekad mogu biti skupi, delikatni za manipulaciju ili jednostavno odsutni za određeni analit. Stoga bi umjetni ili sintetski enzimi mogli biti korisna alternativa prirodnim proteinima za koncepciju novih biosenzora, budući da mogu biti dizajnirani u cijelosti, kao i robusniji, dostupniji, kemijski savitljiviji i jeftiniji, u usporedbi s njihovim prirodnim analogima [74].

### 6.5. Istraživanje prirodnih enzima

Sasvim je razumljivo kako se sve ideje znanstvenika ne mogu provesti u živim organizmima. Umjetni enzimi tu nastupaju i omogućavaju znanstvenicima uvid u rad, funkciju i mehanizam prirodnih enzima. Umjetno dobiveni enzimi su stvorili potpuno novi svijet i mogućnosti u svijetu znanosti. Prirodni enzimi često imaju određene nedostatke i nisu u mogućnosti funkcionirati pravilno izvan organizma. Dolazi do brze denaturacije uzrokovane promjenom pH vrijednosti, temperature ili okruženja. Zbog tih nepogodnosti i otežanih uvjeta rada sa prirodnim enzimima razvio se interes za umjetno dobivene enzime [75].

#### 6.6. Budućnost umjetno dobivenih enzima

Tehnologija umjetno dobivenih enzima je tako reći tek u svojim počecima. Za svijet umjetnih enzima tek predstoji veliki uspjeh i mnogobrojna istraživanja. Razvitkom novih tehnologija i metoda napredovat će i sinteza umjetnih enzima. Očekuje se svijetla perspektiva o budućem razvoju učinkovitih umjetnih enzima, što će dovesti do uspostave revolucionarnog koncepta u katalizi [70].

Iako se predviđa sjajna budućnost za umjetno dobivene enzime, postoje još uvijek određene prepreke koje se moraju preći. Glavni cilj je postići istu razinu učinkovitosti i složenosti koju imaju prirodni enzimi. Unatoč problemima i preprekama, umjetni enzimi i njihova primjena imaju veliki potencijal.

## 7. Zaključak

Budućnost medicine, kemije, biologije, industrije i mnogih drugih ogranaka ljudske djelatnosti je u rukama proteinski inženjera. Odgovor na brojna problemska pitanja u znanosti i industriji su upravo umjetno dobiveni enzimi. Enzimi su spojevi nužni za normalan i funkcionalan život. Nedostatak ili nepravilno funkcioniranje enzima često predstavlja jako veliki problem i dovodi do pojave raznih bolesti. Prirodni enzimi često znaju biti nefunkcionalni ili čak odsutni iz organizma. Sve veća i popularnija industrija enzima pružila je rješenje za enzimski uzrokovane bolesti.

Iako postoje određene prepreke, umjetno dobivenim enzimima se predviđa sjajna budućnost. Napretkom tehnologije i metoda istraživanja, očekuje se i napredak u dizajnu i sintezi umjetnih enzima.

Svijet enzima u nano veličini omogućava još veći prostor za istraživanja i poboljšanja svakodnevnog života. Enzimi u nano veličini svoju primjenu pronalaze ne samo u medicini, već i u svijetu farmacije, biologije, kemije, prehrambene industrije, kozmetičke industrije i zaštiti okoliša.



## 8. Literatura

- [1] [https://www.therascience.com/en\\_int/our-active-ingredients/enzymes/enzymes](https://www.therascience.com/en_int/our-active-ingredients/enzymes/enzymes) (5.7.2023.)
- [2] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013.
- [3] [https://www.pmf.unizg.hr/\\_download/repository/proteini\\_2017.pdf](https://www.pmf.unizg.hr/_download/repository/proteini_2017.pdf) (5.7.2023.)
- [4] <http://polj.uns.ac.rs/wp-content/uploads/2014/04/24.-Hemija-Proteini.pdf> (5.7.2023.)
- [5] Sinković, Paola, Stanični mehanizmi održavanja homeostaze proteina kod bakterija, 2018, završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 10
- [6] [https://www.pmf.unizg.hr/\\_download/repository/14obk-p5-strukture\\_proteina.pdf](https://www.pmf.unizg.hr/_download/repository/14obk-p5-strukture_proteina.pdf) (5.7.2023.)
- [7] <http://struna.ihjj.hr/naziv/beta-ploca/34598/> (5.7.2023.)
- [8] Škibola, Zara, Računalno ispitivanje svojstava neproteinogene aminokiseline norvalina u sklopu elemenata sekundarnih struktura proteina, 2020., Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb, 7
- [9] <https://theory.labster.com/protein-structure/> (5.7.2023.)
- [10] [http://www.chem.bg.ac.rs/~vniketic/pnk/11\\_kvrat.pdf](http://www.chem.bg.ac.rs/~vniketic/pnk/11_kvrat.pdf) (5.7.2023.)
- [11] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013.
- [12] <https://www2.irb.hr/korisnici/batel/Organska%20kemija%20i%20biokemija/Biokemija%20II%20vje%C5%BEba.doc> (5.7.2023.)
- [13] <http://eskola.chem.pmf.hr/odgovori/odgovor.php3?sif=798> (5.7.2023.)
- [14] Knapić, Dominik, Aktivnost halohidrin-dehalogenaze u reakciji nastajanja epoksida, 2016, završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 6
- [15] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chymotrypsin> (5.7.2023.)
- [16] [https://en.wikibooks.org/wiki/Structural\\_Biochemistry/Enzyme\\_Catalytic\\_Mechanism/Nucleoside\\_Monophosphate\\_Kinase](https://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Enzyme_Catalytic_Mechanism/Nucleoside_Monophosphate_Kinase) (5.7.2023.)
- [17] M. Ehrmann, T. Clausen, *Annual Review of Genetics* **38** (2004), 709-720
- [18] Valla, Robert, Posttranslacijske modifikacije proteina, 2018., završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 28-29
- [19] Jelačić, Jelena, Oksidacija diola u prisustvu oksidoreduktaza, 2018., završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 5-6
- [20] E.V.P. Pandeeti i sur., *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, Academic Press, New York, 2019.
- [21] [https://www.creative-enzymes.com/resource/hydrolase-introduction\\_21.html](https://www.creative-enzymes.com/resource/hydrolase-introduction_21.html) (5.7.2023.)
- [22] J.K. Dhanjal et al., *Computational Protein Engineering Approaches for Effective Design of New Molecules*. 2019
- [23] Hanić, Maja, Dizajnerski proteini, 2017, završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 7-9
- [24] R. S. Hilgarth, T. M. Lanigan, *MethodsX*, **7** (2020).

- [25] Buljan, Iva, Usmjerenja evolucija triptofan-sintaze, 2019, završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb
- [26] Y. Wang, P. Xue, M. Cao, T. Yu, S.T. Lane, & H. Zhao, *Chem.Rev* (2021a).
- [27] A. Pourmir & T.W. Johannes, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, **2(3)** (2012).
- [28] C. Kohrer, U.L. RajBhandary, *Proteins Carrying One or More Unnatural Amino Acids*, Madame Curie Bioscience Database, Landes Bioscience, 2000-2013.
- [29] D. Korenčić, *Food Technology and Biotechnology*, **40** (2002).
- [30] [https://en.wikipedia.org/wiki/Aminoacyl\\_tRNA\\_synthetase](https://en.wikipedia.org/wiki/Aminoacyl_tRNA_synthetase)
- [31] Šimunić, Ena, Ugradnja nestandardnih aminokiselina u proteine, 2017., završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb
- [32] C.A.L. McFeely i sur., *Nucleic Acids Research*, **50** (2022), 11374–11386
- [33] B. de P. Mariz, S. Carvalho, I.L. Batalha & A.S. Pina, *Organic & Biomolecular Chemistry*, **19(9)** (2021), 1915–1925.
- [34] <https://conductscience.com/artificial-enzymes/> (13.5.2023.)
- [35] R. Chowdhury and C. D. Maranas, *AIChE J.* **66** (2020), 1–17.
- [36] C. Díaz Arenas and N. Lehman, *Int. J. Biochem. Cell Biol* **41** (2009), 266–273.
- [37] J. Bertran, C. Acosta-Silva, V. Branchadell & A. Oliva, *ChemPhysChem* **21** (2019), 295-306.
- [38] <https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/chemical-processes/alpha-carbon-chemistry/a/aldol-reactions-in-metabolism> (9.7.2023.)
- [39] E. J. Corey *Angew. Chem. Int. Ed.* **41** (2002), 1650
- [40] <https://byjus.com/chemistry/diels-alder-reaction-mechanism/> (9.7.2023.)
- [41] R. Breslow, *Artificial Enzymes*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005.
- [42] Medved, Marijana, Razvoj i kritički pristup pearsonovom konceptu kiselina i baza- HSAB teorija, 2021., završni rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split
- [43] N. Strāter, W. N. Lipscomb, T. Klabunde, B. Krebs, *Angew. Chem. Int. Ed.* **35** (1996), 2024–2055
- [44] P. Woolley, *J. Chem. Soc.* **2** (1977), 318
- [45] J. Chin, X. Zou, *J. Am. Chem. Soc.* **106** (1984), 3687–3688.
- [46] W. P. Jencks, M. Gilchrist, *J. Am. Chem. Soc.* **90** (1967), 2622–2637
- [47] H. Morrison, *Enzyme Active Sites and their Reaction Mechanisms*, Academic Press, New York 2021.
- [48] H.-M. Eun, *Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology*, Academic Press, New York, 1996.
- [49] M. Komiyama, J. Sumaoka, A. Kuzuya, & Y. Yamamoto, *Sequence-Selective Artificial Ribonucleases. Methods in Enzymology (S.P. Colowick, N.O. Kaplan)*, Academic Press, New York, 2001 455–468.
- [50] A.E. Donnelly, G.S. Murphy, K.M. Digianantonio & M.H. Hecht, *Nature Chemical Biology*, **14(3)** (2018), 253–255.
- [51] Bilušić, Ante „Što je nanotehnologija?“, *Matematičko fizički list*, 226 (2006), 2; 145-146

- [52] J.J. Ramsden, What is nanotechnology?, Department of Advanced Materials, Cranfield University, Bedfordshire, UK.
- [53] M.Oruč, R. Sunulahpašić, A. Gigović-Gekić, Nanomaterijali - svojstva i primjene, 2018, Metalurško-tehnološki fakultet, Univerzitet u Zenici, Zenica, 5
- [54] X. Ren, D. Chen, Y. Wang et al., *J Nanobiotechnol* **20** (2022), 92
- [55] E. Wong, "Nanozymes" Encyclopedia, (10.7. 2023).
- [56] R.H. Holm, P. Kennepohl, E.I. Solomon, *Chem. Rev.* **96** (1996), 2239–2314
- [57] L. Gao, J. Zhuang, L. Nie, J. Zhang, Y. Zhang, N. Gu, T. Wang, J. Feng, D. Yang, S. Perrett, *Nat. Nanotechnol* **2** (2007), 577–583
- [58] A.A. Palizban, H. Sadeghi-Aliabadi, F. Abdollahpour, *Res. Pharm. Sci.* **5** (2010), 119–125
- [59] H. Wei, E.K. Wang, *Chem. Soc. Rev.* **42** (2013), 6060–6093,
- [60] M. Comotti, C. Della Pina, R. Matarrese, M. Rossi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **43** (2004), 5812–5815
- [61] J.N. Li, W.Q. Liu, X.C. Wu, X.F. Gao, *Biomaterials* **48** (2015), 37–44
- [62] W.W. He, X.C. Wu, J.B. Liu, X.N. Hu, K. Zhang, S.A. Hou, W.Y. Zhou, S.S. Xie, *Chem. Mater.* **22** (2010), 2988–2994
- [63] X.H. Xia, J.T. Zhang et al., *ACS Nano* **9** (2015), 9994–10004
- [64] <https://byjus.com/chemistry/buckminsterfullerene/> (10.7.2023.)
- [65] Y.J. Song, K.G. Qu, C. Zhao, J.S. Ren, X.G. Qu, *Adv. Mater.* **22** (2010), 2206–2210
- [66] X.C. Wu, Y. Zhang, T. Han, H.X. Wu, S.W. Guo, J.Y. Zhang, *RSC Adv.* **4** (2014), 3299–3305
- [67] O.K. Farha, A.M. Shultz, A.A Sarjeant, S.T. Nguyen, J.T. Hupp, *J. Am. Chem. Soc.* **133** (2011), 5652–5655
- [68] W. Zhang, S.L. Hu, J.J. Yin, W.W. He, W. Lu, M. Ma, N. Gu, Y. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **138** (2016), 5860–5865
- [69] L. Jiao, J.B. Wu, H. Zhong, Y. Zhang, W.Q. Xu, Y. Wu, Y.F. Chen, H.Y. Yan, Q.H. Zhang, W.L. Gu et al., *ACS Catal.* **10** (2020), 6422–6429
- [70] Y. Murakami, J. Kikuchi, Y. Hisaeda & O. Hayashida, *Chem. Rev.* **96(2)** (1996), 721–758.
- [71] R. Singh, M. Kumar, A. Mittal, P.K. Mehta, *3 Biotech.* **6(2)** (2016), 174
- [72] T.H. Fenger, J. Bjerre, M. Bols, *ChemBioChem* **10**, 2494-250
- [73] D.P. Cormode i sur., *Trends Biotechnol.* **36(1)** (2018), 15–29.
- [74] L. Vial, P. Dumy, *New J. Chem.* **33** (2009), 939-946
- [75] A. J. Kirby, F. Hollfelder, *From enzyme models to model enzymes*, Royal Society of Chemistry, London, 2009.