

Andrzej M. Brzozowski

Zakład Krystalografii, Instytut Chemii  
Uniwersytet Łódzki

## Krystalografia strukturalna w projektowaniu i ulepszaniu bioproduktów

Rentgenowska analiza strukturalna (RAS) – podstawowa gałąź współczesnej krystalografii, jest w tej chwili jednym z najważniejszych narzędzi badawczych biologii molekularnej. Stosuje się ją obok innych technik, jak np. różnych rodzajów mikroskopii elektronowej, NMR – do oznaczania trójwymiarowej struktury cząstek i makrocząsteczek; jednak ona tylko umożliwia całkowite poznanie struktury molekuł z rozdzielczością atomową, z największą, jak dotąd dokładnością. Trójwymiarowy NMR (stosowany raczej do małych białek o masie cząsteczkowej rzędu 10 000), mikroskopia tunelowa i skaningowa, znakomicie uzupełniają dostarczane przez RAS wyniki o nowe informacje, dotyczące zwłaszcza konformacji cząsteczek w roztworze, ich dynamiki, sposobu agregacji supermolekularnych struktur, itd.

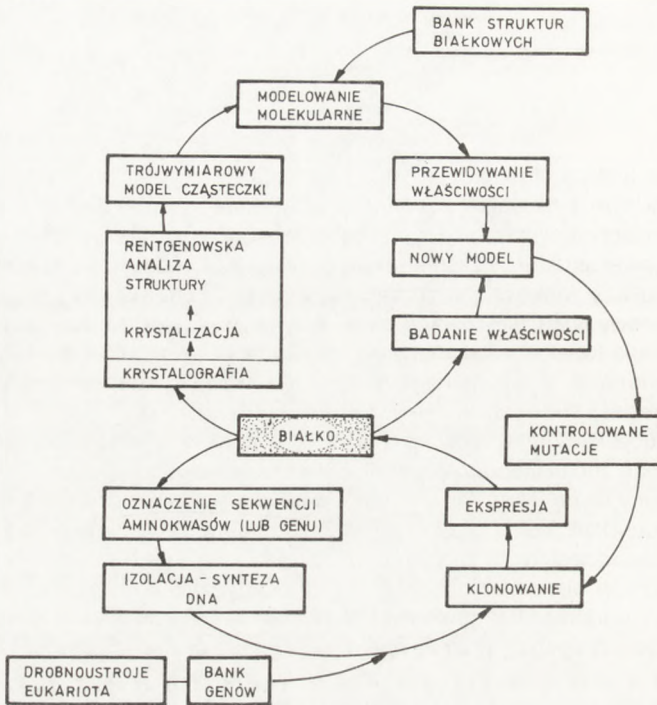
Rozwój i ewolucja RAS kryształów białek i kwasów nukleinowych są nierozdzielnie związane z rozwojem biologii molekularnej. W 1928 r. wykryto ureazę (Sumner), pepsynę, trypsynę i chymotrypsynę (Northrop, Herriott), w 1935 r. – wirus mozaiki tytoniowej, w 1953 r. – oznaczono strukturę DNA, zaś w latach 1956–1959 strukturę pierwszego białka – mioglobiny. Na początku lat siedemdziesiątych zbadano już około trzydziestu struktur białkowych. Jedną z pierwszych ważnych obserwacji, mającą dalsze praktyczno–teoretyczne zastosowania, było odkrycie istotnych podobieństw struktury trzeciorzędowej wśród białek homologicznych (np. hemoproteidów, dehydrogenaz, proteaz serynowych), jak również dużej powtarzalności konformacji pewnych elementów struktury drugorzędowej (heliksy,  $\beta$ -struktury), bez względu na strukturę pierwszorzędową (możliwy jest podobny typ struktury przy zaledwie 20% homologii sekwencji). Odkrycia te znalazły praktyczne zastosowanie w RAS innych białek, np. w metodzie podstawienia cząsteczkowego (używanie modelu oznaczonego białka do rozwiązania nowej struktury), a także pozwoliły na opracowanie teoretycznych metod przewidywania struktur. Koniec lat siedemdziesiątych i początek osiemdziesiątych, to dalszy gwałtowny rozwój krystalografii białek i DNA, spowodowany m.in. wprowadzeniem szybkich komputerów (z grafiką wysokorozdzielczą) oraz nowych, supersilnych źródeł promieniowania rentgenowskiego (synchrotron). Dynamiczny charakter tego rozwoju ilustruje ok. czterysta nowych struktur makrocząsteczek. Gwałtowny rozwój inżynierii genetycznej umożliwił pozyskanie nowych białek, które do tej pory były przyczyn preparatywnych, były dla krystalografii praktycznie niedostępne (np. ekspresja białek eukariotycznych w *E. coli* i innych systemach), jak również powtórna analiza białek już zbadanych, ale otrzymanych w formie zmodyfikowanej przez kontrolowaną, punktową mutagenezę (*site directed mutagenesis*).

W tym momencie można mówić o końcu krystalografii jako dziedzinie wyłącznie nauk podstawowych i o narodzinach krystalografii jako ważnego i wiarygodnego partnera przemysłu – biotechnologii. Mariaz krystalografii i biotechnologii sporadyczny na początku lat osiemdziesiątych, jest dzisiaj właściwie przymusowym dla obu stron. Niniejszy tekst jest próbą zasygnalizowania wzajemnych korzyści tego związku.

Miejsce krystalografii w badaniach i procesie biotechnologicznym przedstawia w dużym uproszczeniu rys. 1.

Pominięto na nim celowo cały dział, będący *stricte* domeną technologii, tj. przenoszenie wyników badań ze skali laboratoryjnej do technologicznej, oraz optymalizację procesu wytwarzania produktu końcowego.





Rys.1. Cykl badawczy kontrolowanej modyfikacji cząsteczki białka.

Tak jak wspomniano, w latach sześćdziesiątych i siedemdziesiątych nastąpił rozwój krystalografii białek głównie jako nauki podstawowej. Każda nowo rozwiązana struktura dostarczała oryginalnych informacji o budowie i organizacji makrocząsteczek. Z opublikowanych do dzisiaj około czterystu struktur białek, DNA, tRNA, najlepiej oznaczone zebrane są w ogólnie dostępnym *Brookhaven Protein Data Bank* (USA), będącym źródłem informacji dla ośrodków akademickich i przemysłowych.

Rozwój inżynierii genetycznej i RAS spowodował, że praktycznie każda rozwiązana struktura białka może stać się punktem wyjścia dla potencjalnych biotechnologicznych zastosowań. Dobrym przykładem wzajemnego przenikania się różnych zagadnień naukowo-aplikacyjnych mogą być badania struktur lipaz. Budowa i mechanizm ich działania były do niedawna właściwie nieznane, stąd każda informacja strukturalna dotycząca tych enzymów ma znaczenie podstawowe. Informacji takich dostarczyły ostatnio opublikowane prace (1,2), mające również duże znaczenie biotechnologiczne, np. ze względu na szerokie zastosowanie lipaz w przemyśle środków piorących (zwłaszcza Lipolase<sup>TM</sup> NOVO), dzięki czemu badania te finansuje przemysł (Hoffmann-La Roche, NOVO). Poznanie struktury tych enzymów, w połączeniu ze sklonowaniem i ekspresją ich genów, pozwala na zaplanowanie konkretnych, kontrolowanych mutacji, prowadzących do zwiększenia ich aktywności oraz optymalizacji parametrów fizykochemicznych,



w szczególności istotnych ze względu na działanie lipaz w środowisku dwufazowym. Prace w tym kierunku nie są jednak kresem zainteresowań tymi enzymami. Badania struktur kompleksów lipaz z ich inhibitorami, modelowanie molekularne i badania struktur samych inhibitorów, mogą doprowadzić do syntezy i produkcji uniwersalnego inhibitora lipaz gastrycznych i jelitowych. Inhibitor ten przyjmowany przed posiłkami, blokowałby wchłanianie tłuszczów do organizmu (przed wchłonięciem z jelita przynajmniej jedno wiązanie estrowe w cząsteczce tłuszczu musi być zhydrolizowane przez lipazę). Jest to niewątpliwie kusząca perspektywa drastycznego obniżenia zagrożenia miażdżycą oraz rewolucji w kulturze żywienia: wysokotłuszczowe potrawy byłoby absolutnie lekkostrawnymi, niskokalorycznymi posiłkami.

Innym przykładem trudnych do wykluczenia związków między podstawowymi badaniami krysztalograficznymi, a wynikającymi z nich potencjalnymi zastosowaniami biotechnologicznymi, są badania nad permeazami bakteryjnymi. Krysztalograficzne badania jednej z permeaz – OppA (3), transportującej 3-, 4-, i 5-peptydy przez membrany komórek bakteryjnych, podjęto początkowo tylko w celu wyjaśnienia budowy tego enzymu i mechanizmu transportu peptydów przez membrany. Rozwiązanie tych problemów, z naukowego punktu widzenia zgoła podstawowych, znajduje jednak natychmiast zastosowanie praktyczne. Gwałtowny wzrost odporności patogenicznych bakterii na stosowane antybiotyki, stwarza potrzebę syntezy nowych leków, które powinny spełniać dwa oczywiste warunki:

- a) muszą być specyficzne względem konkretnych bakterii,
- b) połączenia te, w przeważającej większości hydrofilowe, muszą być wchłaniane przez hydrofobowe membrany do cytoplazmy.

Okazuje się (4,5), że cele te można osiągnąć stosując peptyd z dołączoną do niego toksyczną dla drobnoustroju grupą antybiotyczną. Taki „koń trojański”, będący substratem dla permeazy, może wprowadzić do bakterii antybiotyk w oryginalnej formie, nie przenikającej przez membranę, dla niej nietoksyczny. Technikę tę zastosowano z powodzeniem dla nowej grupy antybiotyków, hamujących syntezę lipopolisacharydu zewnętrznej ściany komórkowej u bakterii Gram-ujemnych (4). Ponieważ podobny mechanizm transportu obserwuje się u roślin, jak i w wielu narządach i tkankach ssaków, zastosowanie zbliżonej techniki dla wchłaniania herbicydów oraz leków, optymalizowane m.in. w oparciu o RAS wielu różnych permeaz, ma przed sobą olbrzymią przyszłość. Ponieważ można przytaczać wiele przykładów tego typu, zasygnalizujemy zatem tylko najistotniejsze, współczesne kierunki współpracy krysztalografii i biotechnologii ilustrując je konkretnymi badaniami.

## 1. Badania strukturalne białek bez zastosowania inżynierii genetycznej

Prace tego rodzaju stanowią bardzo ograniczoną grupę, ponieważ w wielu firmach biotechnologicznych, produkcję np. enzymu realizuje się poprzez analizę i sklonowanie jego genu, a następnie ekspresję w specyficznym, efektywnym układzie biologicznym. W najczęściej spotykanym typie badań z tego zakresu, struktura białka jest traktowana jako cel-receptor dla mniejszych cząsteczek, które poddawane są modyfikacji i modelowaniu molekularnemu. Dotyczy to np. reniny, której strukturę bada się m.in. w celu zaprojektowania inhibitora pozwalającego na regulację ciśnienia krwi u człowieka. Również aktualne badania nad acylazą penicylinową nie wymagają stosowania inżynierii genetycznej; ich celem jest głównie poznanie mechanizmu działania tego enzymu w celu optymalizacji parametrów fizykochemicznych technologii syntezy kwasu 5-amino-penicylinowego z penicyliny V, w kolumnach reakcyjnych z udziałem Semacylase<sup>R</sup> NOVO. Enzym ten pełni też kluczową rolę w projektowanej przez NOVO na dużą skalę produkcji cefalosporyn z penicyliny V w jednym etapie, bez użycia fazy organicznej, co powinno znacznie obniżyć koszty produkcji.



## 2. Badania strukturalne białek z zastosowaniem inżynierii genetycznej

Jest to najobszerniejsze pole styku między krystalografią a biotechnologią, obejmujące niezwykle zróżnicowane kierunki badań. Wymieńmy kilka najważniejszych przykładów:

### 2.1. Optymalizacja struktury i funkcji enzymów

#### a. Proteazy serynowe

Proteazy serynowe były jednymi z najwcześniej i najlepiej poznanych strukturalnie białek (7); struktura centrum aktywnego i mechanizm katalizy tych enzymów są opracowane z największą obecnie możliwą dokładnością. Ze względu na zastosowanie w przemyśle, najczęściej modyfikowaną („mutowaną”) proteazą była, i jest nadal, subtilizyna (Carlsberg). Na jej przykładzie potwierdzono, m.in. istotność triady aminokwasów –Asp..His..Ser– w centrum aktywnym proteaz serynowych. Układ przestrzenny tego ugrupowania jest identyczny we wszystkich tych enzymach, nawet mimo braku jakiegokolwiek homologii, z wyjątkiem triady, w strukturze pierwszorzędowej (np. subtilizyna i chymotrypsyna). Mutacje w subtilizynie: Ser221Ala (zamiast Ser jest Ala), His41Ala, obniżyły aktywność enzymu  $2 \times 10^4$  razy (8), zaś mutacja Asp32Ala  $10^4$  razy. Podwójna, jednoczesna mutacja Ser221 i His64 na dwie alaniny, nie spowodowała już większego spadku aktywności, wskazując na nukleofilowy atak cząsteczki  $H_2O$  lub  $OH^-$  na substrat w jednoetapowej reakcji bez intermediatu acyl–enzym. Dzięki uważnej analizie struktury subtilizyny, dostarczonej przez krystalografię, poprawiono m.in. jej stabilność i aktywność, usuwając z powierzchni cząsteczki, blisko His64, dwie ujemnie naładowane reszty boczne, stabilizując ten aminokwas w formie nieprotonowanej, niezbędnej dla aktywności (9).

#### b. Acetylotransferaza chloramfenikolu (CAT)

CAT jest enzymem bakteryjnym, odpowiedzialnym za odporność bakterii na chloramfenikol (Ch) (chloramfenikol blokuje biosyntezę białek poprzez inhibicję etapu elongacji łańcucha peptydowego). Wcześniejsze badania biochemiczne wskazywały na kluczową rolę His195 tego enzymu w procesie katalizy (10). Krystalograficzne oznaczenie struktury kompleksu CAT–Ch (11) potwierdziło tę hipotezę, jak również wskazało na istotną rolę Asp199 w stabilizacji centrum aktywnego. Struktura mutantu Asp199Asn, z dużymi zmianami w konformacji His195, była jednym z dowodów na ważne znaczenie oddziaływań dalszego zasięgu w centrum aktywnym. Oznaczenie struktur kompleksu CAT–CoA oraz mutantów enzymu natywnego (12,13), pozwoliło na dokładne określenie rodzaju i roli wszystkich aminokwasów centrum aktywnego. Badania te są przykładem intensywnego wykorzystania informacji strukturalnych w wyjaśnianiu budowy enzymu i planowaniu jej zmian.

#### c. Syntetaza tyrozylo–tRNA (TRS)

TRS z *Bacillus subtilis* była jednym z pierwszych enzymów badanych z wykorzystaniem kontrolowanych mutacji (14) i jest do tej pory obiektem dla modelowych badań tego typu. Oznaczone krystalograficznie struktury enzymu oraz kompleksów TRS–tyrozyna, TRS–tyrozyloadenylation (15), wykazały m.in. wiele wiązań wodorowych istotnych dla wiązania substratu i katalizy. Wiele z tych interakcji zmieniono lub zaburzono kontrolowanymi mutacjami (Tyr169, Tyr34, Cys35, His48, Tre51, Tre40, etc.), wyjaśniając dokładnie ich rolę w funkcjonowaniu enzymu. Jedną z mutacji Tre51 zwiększono aż 25–krotnie aktywność TRS, wskazując drogę dla podobnych prób z możliwością wykorzystania w biotechnologii.

#### d. Reduktaza dwuhydrofolianu (DFR)

DFR katalizuje reakcję redukcji dwuhydrofolianu do czterohydrofolianu, będącą ważnym etapem w biosyntezie DNA. Z tego też powodu, enzym ten jest obiektem intensywnych badań krystalograficznych, biochemicznych i farmakologicznych (projektowanie i synteza leków przeciw-



nowotworowych) (16–18). Badania te dotyczą zarówno struktury samego enzymu (protonacja substratu, stabilność kompleksu przejściowego, termostabilność – wprowadzono mostek S–S), jak i wykorzystania tych rezultatów w molekularnym modelowaniu optymalnego, specyficznego inhibitora.

Zacytowane przykłady, wybrane z licznych tego typu badań, stanowią ilustrację wspólnych wysiłków inżynierii genetycznej i krytalografii, w kierunku projektowania nowych enzymów, oraz kontrolowanej zmiany pewnych ich parametrów, takich jak:

**i) efektywność katalityczna wyrażona stosunkiem  $k_{kat}/K_m$**  ( $k_{kat}$  równa się liczbie cząstek substratu przemienionych w produkt przez każde centrum aktywne, przy wysycającym enzym stężeniu substratu;  $K_m$  oznacza stężenie substratu, przy którym początkowa szybkość reakcji jest równa połowie maksymalnej początkowej szybkości reakcji). Zmiana jednego tylko aminokwasu biorącego udział w wiązaniu substratu, na inny, może wpłynąć na wzrost energii wiązania z 0,1 kcal/mol do 6 kcal/mol, co np. w przypadku TRS prowadzi do zwiększenia katalitycznej efektywności od wartości 2 do 25 000. Poprzez zmianę poszczególnych aminokwasów, w oparciu o badania strukturalne, można planowo zmieniać wartości  $k_{kat}$  i  $K_m$  enzymu, produkując nowe rodziny enzymów, maksymalnie aktywnych przy zaplanowanych początkowych stężeniach substratu i warunkach reakcji (19).

#### **ii) specyficzność enzymu względem substratu**

Na drodze kontrolowanej mutagenyzy zmieniono m.in. specyficzność trypsyny względem Liz- i Arg- substratów (20), specyficzność TRS z Tyr na Fen (21),  $\beta$ -laktamazy z nitrocefiny na penicylinę i ampicylinę (zmiana Ser na Cys w centrum aktywnym) (22), specyficzność  $\alpha_1$ -antytropsyny z elastazy na trombinę (23).

**iii) właściwości fizykochemiczne, takie jak: optimum pH (np. subtilizyna) wielkość i kształt cząsteczki, odporność na detergenty i czynniki denaturujące, itd.**

**iv) stabilność:** jednym z podstawowych celów inżynierii białkowej jest otrzymanie zmutowanych enzymów o zwiększonej termostabilności. Podstawową strategią jest tutaj wprowadzenie do cząsteczki dodatkowych mostków dwusiarczkowych (lizozym T4 (24), subtilizyna (25), DFR (18)). Stabilność enzymu poprawia się również przez zastąpienie Met (zwłaszcza w pobliżu centrum aktywnego) – łatwo ulegającej utlenieniu – bardziej stabilnym aminokwasem (np. usunięcie Met w antytropsynie (26) oraz w subtilizynie (27)).

**v) skład podjednostek:** oddziaływania między podjednostkami są najczęściej niezbędne dla prawidłowej funkcji enzymu oligomerycznego. Zmiana aminokwasów, wywołująca zmianę ładunku elektrycznego, wiązań wodorowych, oddziaływań hydrofobowych na powierzchni kontaktu, może powodować dysocjację lub asocjację podjednostek. Na przykład wprowadzenie w TRS ujemnie naładowanej reszty Asp lub dodatniej Liz, na hydrofobową powierzchnię kontaktu, powoduje dysocjację tego enzymu do monomerów (28). Ponowna asocjacja „zmutowanych” monomerów może prowadzić do powstania heterodimerów, w których tylko jedna podjednostka jest aktywna. Takie heterodimery służą często do wyjaśniania roli poszczególnych podjednostek w procesie katalizy, – np. dla syntetazy arginylo-tRNA (29); w przypadku TRS stwierdzono w ten sposób, że jedna podjednostka transportuje Tyr, a druga wiąże tRNA.

**vi) kompartmentacja:** wiele białek magazynowanych jest po biosyntezie, na podstawie pewnych, sygnalnych sekwencji aminokwasowych, w ściśle określonych miejscach komórki. Zmiana tych sekwencji może prowadzić do korzystnej biotechnologicznie zmiany miejsca nagromadzenia białka (30).

## **2.2. Optymalizacja funkcji białek nieenzymatycznych**

Wzrost liczby badań krytalograficzno-biotechnologicznych w ostatnich 3–4 latach, wywołany jest głównie przez:



- a) rozwój inżynierii genetycznej, związany z opanowaniem nowych systemów ekspresji, zwłaszcza dla białek membranowych i ich rozpuszczalnych domen,
- b) opracowanie nowych technik krystalizacji (wprowadzenie detergentów),
- c) zastosowanie supersilnych źródeł promieniowania rentgenowskiego (synchrotron),
- d) rozwój nowych typów aparatury rejestrującej promieniowanie ugięte na kryształach (np. detektory powierzchniowe).

Głównym problemem, leżącym u podstaw prawie każdego tematu badawczego tej grupy, jest mechanizm wzajemnego rozpoznawania cząsteczek *molecular recognition*. Spróbujmy podać najciekawsze przykłady badań, prowadzących do rozwiązania wielu aspektów tego problemu, mających olbrzymie możliwości zastosowania we współczesnej biofarmako-technologii.

#### a. Optymalizacja struktury insuliny

Insulina, kontrolująca poziom cukru we krwi, leży w centrum zainteresowania przemysłu biotechnologicznego (NOVO-NORDISK, Lilly) – liczbę osób chorych na cukrzycę szacuje się obecnie na około 60–80 mln. Do niedawna izolowano ją głównie z trzustek zwierzęcych, obecnie insulinę ludzką otrzymuje się w dużych ilościach poprzez ekspresję jej genu w komórkach bakteryjnych i grzybowych. Mimo intensywnych badań nad biochemią insuliny prowadzonych od początku tego stulecia, pozostaje wiele nie rozwiązanych, istotnych klinicznie, problemów. Pierwszy z nich, to powolne wchłanianie insuliny z mięśni do krwioobiegu (insulina nie może być podana dożylnie – wywołałaby bowiem silną hypoglikemię). Drugi, to szybka oligomeryzacja cząsteczek hormonu w dimery, trimery i heksamery, przy pożądanej aktywności jedynie w formie monomeru, który w organizmie stanowi jedynie około 0,1% podanej dawki. Specjalna kompozycja adjuwantu, w którym wstrzykiwana jest insulina, nie poprawia znacząco tej proporcji. Inżynieria genetyczna wraz z krystalografią dążą obecnie do wyjaśnienia mechanizmu agregacji insuliny i otrzymania mutantów hormonu w formie stabilnego, aktywnego monomeru (31,32). Na podstawie struktury heksameru, oznaczonej z wysoką rozdzielczością (31), zaplanowano i otrzymano szereg mutantów, które poddano następnie analizie strukturalnej. Mutacje te dotyczyły wprowadzenia zaburzeń na powierzchni asocjacji monomerów, a zwłaszcza ValB12, którą zastąpiono m.in. Ile i Glu, oraz ProB28 (na Asp) i SerB9 (na Asp). Niespodziewanie, mutacje ValB12 zahamowały oligomeryzację tylko o około 30%; badania krystalograficzne tych mutantów wykazały adaptację dużego obszaru białka do wprowadzonych zawał przestrzennych, poprzez szereg drobnych zmian w konformacjach aminokwasów rzędu 0,5 Å. Dwa z mutantów AspB28 i AspB9, okazały się jednak stabilnymi monomerami, nawet w milimolowych stężeniach, zachowując pełną aktywność natywnego monomeru i wykazując dodatkowo dwukrotnie szybszą absorpcję do krwi. W wielu laboratoriach prowadzone są również intensywne prace nad ekspresją i krystalizacją receptora insuliny oraz jego kompleksu z hormonem. Badania te mogą wyjaśnić sposób działania insuliny, formę jej interakcji z receptorem oraz zachodzące w ich trakcie zmiany strukturalne w obu białkach.

#### b. Przeciwciała

Przeciwciała, a zwłaszcza przeciwciała monoklonalne, mają obecnie wielorakie możliwości zastosowań. Jedno z głównych to użycie ich w terapii osób z upośledzonym układem immunologicznym przeciw komórkom nowotworowym, lub też w przypadku chorób (infekcji), gdy odpowiedź własna organizmu jest zbyt wolna w stosunku do stopnia jego zagrożenia. Ze względów biochemiczno-technologicznych oraz etycznych, używa się w terapii głównie przeciwciał otrzymywanych w hodowlach myszy lub szczura. Ponieważ byłyby one w organizmie człowieka mało skuteczne, dokonuje się ich „humanizacji” i „chimeryzacji” zarazem, łącząc gen części stałej przeciwciała człowieka z genem regionu zmiennego przeciwciała szczurzego (33–35). Prace genetyczne i biochemiczne nad przeciwciałami mają od swego początku silne zaplecze w badaniach krystalograficznych. Opublikowano do tej pory 6 struktur kompleksów



fragmentów Fab przeciwciał z odpowiadającymi im antygenami białkowymi (36–41). Szczególnie istotna jest jedna z ostatnich publikacji dotyczących tej tematyki (40), ponieważ jest pierwszą pracą strukturalną, porównującą strukturę fragmentu Fab ze strukturą jego kompleksu z antygenem (peptyd); dostarcza ona informacji o rodzaju zmian strukturalnych, zachodzących podczas tworzenia kompleksu.

Przeciwciała są również interesującą alternatywą, jako nowa grupa białek katalitycznych\*. Projekt ten opiera się na danych eksperymentalnych (krystalografia białek, NMR), oraz przesłankach teoretycznych, według których ewolucja enzymów, ich centrum aktywnego, postępowała w kierunku struktury dopasowanej możliwie ściśle do konformacji substratu w stanie przejściowym. Jeżeli zatem przeciwciało będzie mogło wiązać taki substrat, to może wykazywać właściwości katalityczne. Zaletą tego nowego „enzymu” jest praktyczna obojętność jego konformacji oraz niezwiązanie z konkretnym procesem biochemicznym. Pierwsze prace tego typu, projektowane w oparciu o zbadane struktury, przynoszą pozytywne rezultaty (42); jest to jednak dopiero początek tej zupełnie nowej dziedziny biotechnologii.

### c. AIDS

Receptor wirusa HIV, występujący na powierzchni limfocytów T, oznaczany jako CD4, jest jednym z głównych celów strategii terapeutycznych, skierowanych przeciw infekcji i rozpowszechnianiu się tego wirusa. Otrzymana na drodze inżynierii genetycznej, zewnątrzkomórkowa, rozpuszczalna forma tego receptora – sCD4, blokuje infekcję wirusem HIV *in vitro*. Potencjalne możliwości klinicznego zastosowania tego białka wzrosły dzięki otrzymaniu mutanta sCD4, tzw. sCD4-KDEL, z doczepioną do C-końca sekwencją sygnałową: Liz-Asp-Glu-Leu, która powoduje, że białko to nie jest transportowane na zewnątrz komórki, ale magazynowane w reticulum endoplazmatycznym, zwiększając skuteczność wiązania białka gp120 z powierzchni wirusa (43). Badania nad zwiększeniem stabilności i efektywności sCD4, doprowadziły m.in. do syntezy chimerycznych przeciwciał anti-sCD4, oraz skoniugowanych białek sCD4-cytotoksyna. Jednym z głównych celów omawianych badań jest zastąpienie tych dużych, superkosztownych, terapeutycznych białek małymi peptydami lub ich małocząsteczkowymi analogami, blokującymi wiązanie CD4 z białkiem gp120. Poznanie struktury sCD4 i gp120 pozwoliłoby na zaprojektowanie i syntezę leku imitującego natywny CD4 w reakcji z wirusem. Podstawą rozpoczęcia badań strukturalnych było uzyskanie wysokiej ekspresji genu sCD4. Prace tego typu, sponsorowane m.in. przez Celltech Ltd., doprowadziły do otrzymania ludzkiego i szczurzego sCD4 w systemie ekspresji baculo-virus i CHO (Chinese Hamster Ovary Cells), w ilościach umożliwiających badania krystalograficzne. Otrzymano już kryształy ludzkiego sCD4 o niezadowolających jednak właściwościach. Podjęto zatem próby krystalizacji sCD4 z przeciwciałami monoklonalnymi, uzyskując kryształy kompleksu szczurzego sCD4-Fab, pozwalające na kontynuowanie badań krystalograficznych (44).

Jedną z podstawowych trudności w otrzymaniu dobrych monokryształów wymienionych białek jest bardzo wysoki stopień glikozylacji, sięgający w przypadku gp120 50% masy cząsteczkowej. Prowadzone są prace nad optymalizacją ekspresji tych białek w celu:

- a) zapewnienia największej homogenności glikozylacji,
- b) zaburzenia mechanizmu glikozylacji w procesie ekspresji,
- c) enzymatycznego usuwania cukrów z powierzchni białek.

Innym kierunkiem badań anti-AIDS z udziałem krystalografii, są prace nad białkami wirusa HIV, syntetyzowanymi w jego procesie życiowym w oparciu o gen *pol*, tj. odwrotną transkryptazą, proteazą, endonukleazą, rybonukleazą H. Wszystkie te białka są celami ewentualnych leków anti-AIDS. Dużym zatem sukcesem było otrzymanie syntetycznej i rekombinowanej (45)

\* Por. również S. Bielecki „Katalityczne przeciwciała monoklonalne” w niniejszym zeszycie „Biotechnologii – P.I”.



proteazy HIV oraz wykrywanie i oznaczenie krystalograficzne obu struktur (46,47), będących podstawą do analiz i porównań ze znanymi już strukturami innych proteaz retrowirusowych oraz pepsyny.

### 2.3. Biotransformacje

Badania krystalograficzne i inne prace strukturalno-chemiczne nad budową i funkcją enzymów, wywołały w ostatnich latach wzrost zainteresowania zastosowaniem tych cząsteczek w syntezie organicznej. Enzymy zapewniają korzystne biotechnologiczno-chemiczne warunki reakcji (niska temperatura i ciśnienie, neutralne, bądź łatwe do kontrolowania pH), oraz, jako makrocząsteczki chiralne, katalizują wiele reakcji w sposób wysoce stereospecyficzny. Wykorzystanie enzymów obniżyło np. bardzo znacznie koszty otrzymania pochodnych steroidów z grupą -OH w pozycji 11 (środki przeciwzapalne - brak alternatywnej syntezy chemicznej) oraz produkcji semisyntetycznych penicylin (zastosowanie acylazy penicylinowej). Zwraca się ostatnio uwagę na przystosowanie i modelowanie strukturalne enzymów w celu akceptowania przez nie nienaturalnych substratów i zastosowanie ich np. w:

**a) chiralnej syntezie i rozdziale mieszanin racemicznych:** dehydrogenazy katalizują np. reakcje przemiany ketonów w alkohole drugorzędowe z dużą enancjosepecyficznością, a esterazy hydrolizują prochiralne dwuistry do chiralnych, kwaśnych monoestrów. Wykorzystanie reakcji tego typu prowadzi do syntezy ważnych chiralnych, związków przejściowych i chiralnych farmaceutyków,

**b) stereospecyficznej syntezie wiązań typu  $\overset{|}{\text{C}}-\overset{|}{\text{C}}$ :** możliwość stereospecyficznej syntezy takich wiązań stwarzają np. aldolazy; enzymy tego typu mają wysoką specyficzność względem nukleofilu, akceptując wiele różnych aldehydów jako kosubstraty elektrofilowe,

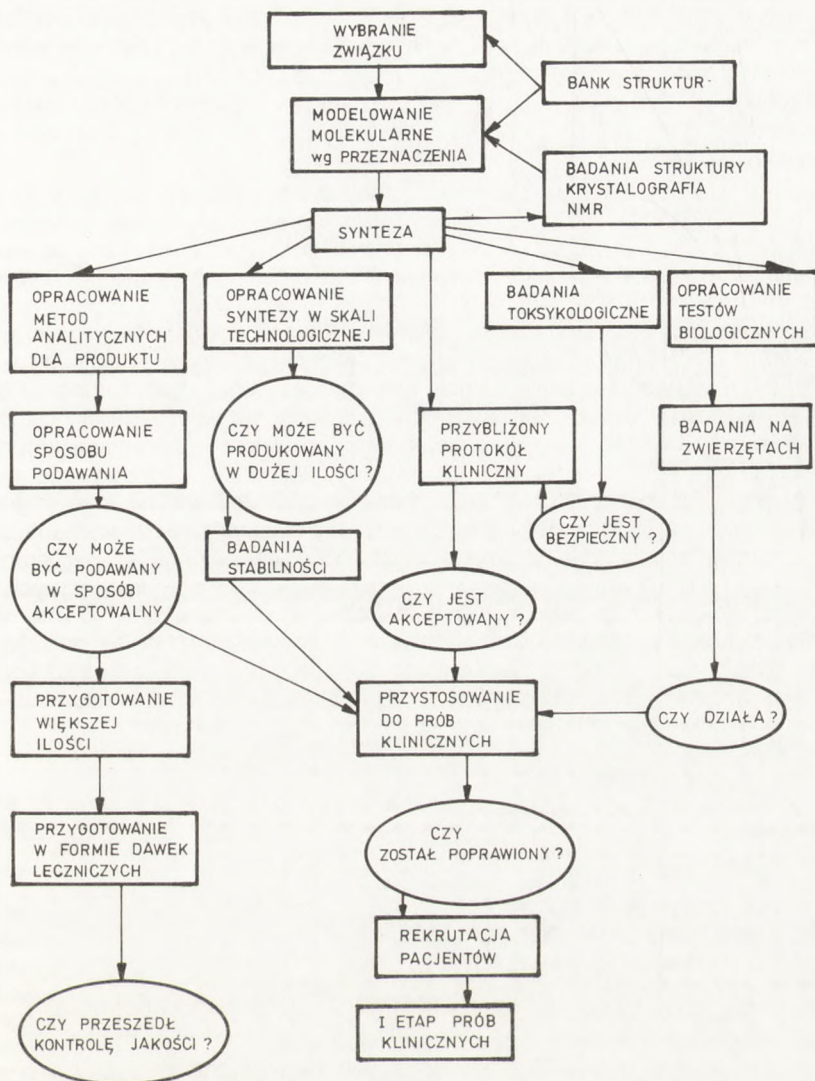
**c) funkcjonalizacji pozycji mało- i nieaktywnych** reakcje z wykorzystaniem grup:  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-$ ,  $=\text{CH}-$ , są często bardzo trudne w normalnej syntezie organicznej; metaloenzymy takie jak: mono- i dwuoksygenazy stwarzają możliwość nowego, łatwiejszego wykorzystania tego typu reakcji.

### 3. Racjonalna synteza leków, pestycydów i herbicydów

Początek współpracy krystalografii z farmakologią sięga również początków samej krystalografii strukturalnej (lata czterdzieste - oznaczenie struktury penicyliny). Wraz z rozwojem metod rentgenowskiej analizy strukturalnej, technik komputerowych, wysokorozdzielczej grafiki, udział krystalografii w badaniach leków ulegał istotnej ewolucji. Z metody dostarczającej coraz większej ilości wiarygodnych danych strukturalnych (koniecznym było stworzenie Cambridge Data Bank dla struktur organicznych i nieorganicznych), stała się aktywnym uczestnikiem w modelowaniu i projektowaniu nowych związków, skracając znacznie czas drogi: związek wyjściowy - optymalny lek, przyczyniając się do znacznego obniżenia kosztów jego wytwarzania. Miejsce krystalografii w tych badaniach przedstawia schematycznie rys. 2 według tzw. *Pert-Programme Evaluation and Review Technique* - procedury mającej zastosowanie we wszystkich współczesnych biofarmaceutycznych instytucjach. Badania krystalograficzne potencjalnych leków i ich pochodnych obejmują właściwie wszystkie ich rodzaje i kierunki poszukiwań od leków anty-AIDS do aspiryny i witamin.

Równie ważny, choć w Polsce niedoceniany, jest udział badań strukturalnych w projektowaniu oraz syntezie herbicydów i pestycydów. Przy przewidywanym dwukrotnym wzroście ludności w następnym stuleciu, nie rozwiązany problemem głodu, 15% stratach plonów z powodu inwazji owadów, problem opracowania nowych, bardziej aktywnych, a jednocześnie mniej dla nas szkodliwych związków tego typu jest niezwykle istotny. Spektakularnym osiągnięciem w tej dziedzinie było ostatnio oznaczenie struktury azadirachtyny - naturalnego, powszechnie





Rys.2. Schemat badań w projektowaniu i optymalizacji nowego leku (wg Pert Programme).

stosowanego związku antyinsektowego – kończące 18-letnie kontrowersje wokół budowy tej złożonej cząsteczki. Związek ten jest mało stabilny, co było przyczyną braku jego efektywnej i taniej syntezy organicznej. Ustalenie jego struktury, a następnie znalezienie fragmentu cząsteczki odpowiedzialnego za jej aktywność, pozwoliło na zaprojektowanie i syntezę prostych, małych cząsteczek, wysoce aktywnych przeciw niektórym owadom (1g nowej pochodnej wystarcza na ochronę przeszło 10 tys. m<sup>2</sup> upraw) (47,48). Podobny sukces zanotowano przy analizie struktu-



ry i syntezie jodrellin B, pochodnej naturalnych, otrzymywanych z drzew afrykańskich, antyzaradczych związków: ajugardin-1 i ajuganin-1, o wiele jednak od nich aktywniejszej. Badania te są również przykładem nowego „boomu” w farmakochemii – odkrywania nieprzebranych zasobów aktywnych farmakologicznie związków występujących w roślinach i drzewach lasów tropikalnych. Wielkie ogrody botaniczne, jak np. Kew Gardens w Londynie, stały się nagle nowymi, niezwykle ważnymi ośrodkami badań tego typu, dostarczając wielu nowych połączeń chemicznych, będąc często ostatnim, możliwym ich źródłem (wiele gatunków roślin, zwłaszcza endemicznych zostało już wytrzebionych w przyrodzie w wyniku rabunkowej działalności człowieka – *casus Amazonii*).

Powyższe przykłady miały za zadanie zilustrować wszechstronny udział oraz potencjalne możliwości krystalografii białek i związków organicznych we współczesnej biofarmako-technologii. W krajach Europy Zachodniej i USA, praktycznie każdy krystalograficzny projekt badawczy finansowany jest bezpośrednio przez firmy chemiczno-biotechnologiczne (ICI, Glaxo, Celltech, Genentech, NOVO, Sturge/RTZ, Hoffmann-La Roche, Pfizer) lub też przez państwowe ciała naukowe, jak np. *Medical Research Council* w Wielkiej Brytanii, w którym stworzono *Protein Engineering Group* z udziałem przedstawicieli sponsorów przemysłowych. Wiele firm, jak np. Glaxo, Roche, ma swoje własne pracownie krystalografii i modelowania molekularnego. Ponieważ badania strukturalne makrocząsteczek biologicznych sytuują się najczęściej na przednich granicach nauk i są doskonałym testem dla prototypowych rozwiązań programowo-komputerowych, znajdują dodatkowe źródło finansowania u producentów sprzętu obliczeniowego, jak ALLIANT, SUN, CONVEX, DEC, SILICONGRAPHICS, IBM. Wysokie nakłady na krystalografię są niezbędne ze względu na konieczność używania przez nią niezwykle kosztownej aparatury: superszybkich komputerów, interaktywnej, wysokorozdzielczej grafiki komputerowej, promieniowania rentgenowskiego otrzymywanego w synchrotronach, detektorów powierzchniowych, itp. Inwestowane w nią środki zwracają się jednak szybko. Pozwala ona bowiem na otrzymanie i wykorzystanie najbardziej wiarygodnych obecnie danych strukturalnych, o coraz bardziej złożonych układach biologicznych (obiektem tzw. krystalografii czasowo-rozdzielczej są już kompleksy enzym-substrat, badane w czasie rzeczywistym). Najciekawsze badania strukturalne – receptory, membrany, kompleksy wieloenzymatyczne – są jednak ciągle przed nami.

## Literatura

1. Winkler F. K., D'Arcy A., Hunziker W., (1990), *Nature*, 343, 771.
2. Brady L., et al, (1990), *Nature*, 343, 767.
3. Tolley S. P., et al, (1988), *J. Mol. Biol.*, 204, 493.
4. Hammond S. M., et al, (1987), *Nature*, 327, 730.
5. Ames B. N., et al, (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 70, 456.
6. Tolley S. P., et al, (1988), *J. Mol. Biol.*, 203, 217.
7. Blow D. M., Birktoft J. J., Hartley B. S., (1969), *Nature*, 221, 337.
8. Craik C. S., Roczniak S., Largman C., Rutter W. J., (1987), *Science*, 237, 909.
9. Thomas P. G., Russell A. J., Fersht A. R., (1985), *Nature*, 316, 375.
10. Kleanthous C., Shaw W. V., (1984), *Biochem. J.*, 150, 211.
11. Leslie A. G. W., Moody P. C. E., Shaw W. V., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 4133.
12. Lewendon A., et al, (1990), *Biochem.*, 29, 2075.
13. Lewendon A., et al, (1989), *Biochem.*, 27, 7385.
14. Winter G., et al., (1982), *Nature*, 299, 756.
15. Fersht A. R., Leatherbarrow R. J., Wells T. N. C., (1986a), *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, A317, 305.
16. Bolin J. T., et al, (1982), *J. Biol. Chem.*, 257, 13650.
17. Kraut J., Matthews D. A., (1986), *Biological Macromolecules and Assemblies*, ed. Journak F., McPherson A, V, 3.
18. Villafranca J. E., et al, (1986), *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, A317, 405.



19. Fersht A. R., Wilkinson A. J., Carter P., Winter G., (1985b), *Biochem.*, 24, 5858.
20. Craik C. S., et al, (1985), *Science*, 228, 291.
21. Fersht A. R., et al, (1985a), *Nature*, 314, 235.
22. Sigal I. S., Harwood B. G., Arentzen R., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7157.
23. Courtney M., et al, (1986), *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, A317, 381.
24. Perry L. J., Wetzel R., (1984), *Science*, 226, 555.
25. Wells J. A., Powers D. B., (1986), *J. Biol. Chem.*, 261, 6564.
26. Rosenberg S., Barr P. J., Najarian R. C., Hallewell R. A., (1984), *Nature*, 312, 77.
27. Estell D. A., Graycar T. P., Wells J. A., (1986), *J. Biol. Chem.*, 260, 6518.
28. Jones D. M., McMillan A. J., Feraht A. R., Winter G., (1985), *Biochem.*, 24, 5852.
29. Carter P., Bedouelle H., Winter G., (1985), *Nucleic Acid Res.*, 13, 4431.
30. Moore H. P. H., Kelly R. B., (1986), *Nature*, 321, 443.
31. Baker E. N., et al, (1988), *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, B319, 369.
32. Derewenda U., et al, (1987), *Prot. Engineering*, 1, 338.
33. Morrison S. L., Johnson M. J., Herzenberg L. A., Oi V. Y., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81, 6581.
34. Reichmann L., Clark M., Waldmann H., Winter G., (1988), *Nature*, 332, 323.
35. Verhoeyen M., Milstein C., Winter G., (1988), *Science*, 239, 1534.
36. Amit A. G., et al, (1986), *Science*, 233, 747.
37. Colman P. M., et al, (1987), *Nature*, 336, 358.
38. Colman P. M., et al, (1987), *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, B323, 511.
39. Sheriff S., et al, (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84, 8075.
40. Padlan E. A., et al, (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86, 5938.
41. Stanfield R. L., et al, (1990), *Science*, 248, 712.
42. Powell M. J., Hansen D. E., (1989), *Prot. Engineering*, 3, 69.
43. Buonocore L., Rose K. J., (1990), *Nature*, 345, 625.
44. Davis S. J., et al, (1990), *J. Mol. Biol.*, 213, 7.
45. Danley D., et al, (1989), *Biophys. Biochem. Res. Comm.*, 165, 1043.
46. Wlodawer A., et al, (1989), *Science*, 246, 616.
47. Lapatto R., et al, (1989), *Nature*, 342, 299.
48. Davis R., (1990), *Serc Bulletin*, 4, 7.

## The use of X-ray crystallography in the designing and optimisation of the bioproducts

### Summary

The role of protein and organic crystallography was discussed. X-ray analysis is an important tool in the investigations of macromolecular structures. It can be used in evaluations of the structures (with the highest accuracy at the moment) and mechanisms of enzymes, enzymes-inhibitors (substrates analogs) complexes, hormones, antibodies – practically all kinds of macromolecules. X-ray analysis is particularly useful in co-operation with protein engineering. Site directed mutagenesis can supply mutants, helping in structure – function, molecular recognition investigations, and optimizing the enzyme function. New enzymes and other proteins, with new, strictly required properties can be quickly obtained. X-ray analysis can also be helpful in biotransformation research, drugs, pesticides, herbicides synthesis, and in the lowering the costs of production. The results of protein and organic crystallography are stored in Data Banks, which can be used (in to the predict and to model of) new molecules.

### *Adres dla korespondencji:*

Andrzej M. Brzozowski, Zakład Krystalografii, Instytut Chemii, Uniwersytet Łódzki,  
ul. Pomorska 18, 91-416 Łódź.