

ENZYMY – KATALIZATORY ŻYCIA

Maciej Szaleniec, Agnieszka Rugor (Kraków)

Streszczenie

Enzymy to białkowe katalizatory warunkujące zachodzenie niemal wszystkich ważniejszych procesów życiowych. Dzięki ich niesamowitej, wciąż nie do końca wyjaśnionej katalitycznej skuteczności, skomplikowane przemiany chemiczne w naszym organizmie mogą zachodzić w bardzo łagodnych warunkach (niskie temperatury, niewysokie ciśnienia) w porównaniu do tych, jakie stosowane są w procesach przemysłowych. Naukowy dowód, że mogą one działać również poza organizmami żywymi, ostatecznie pogrzebał teorię *panvitalizmu* i zapoczątkował bardzo burzliwy rozwój nowoczesnej enzymologii i biotechnologii. Dzięki zaś rozwojowi technik biologii molekularnej i inżynierii genetycznej enzymy znajdują coraz szersze zastosowanie. Niepostrzeżenie w ciągu ostatnich kilku dekad enzymy stały się niezbędnym narzędziem w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym, skórzanym, tekstylnym, papierniczym, a nawet w proszkach do prania. Ułatwiają pracę naszych komórek, sprawiają, że jemy smaczniejszy chleb i pijemy słodki sok pomarańczowy nawet w środku zimy, a nasze ubrania są czyste już po praniu w 30°C.

Abstract

Enzymes are protein catalysts that enable most of important processes in the living organisms. Thanks to their astonishing and not yet well understood catalytic robustness even the most complicated chemical transformations can proceed under mild conditions (i.e. low temperature and pressure), a feat hardly encountered in the chemical industry. The scientific proof that enzymes can work outside of the living cell turned out to be a final blow to the concept of panvitalism and a cornerstone for development of the modern enzymology and biotechnology. Meanwhile, due to more recent achievements of molecular biology and genetic engineering the enzymes gained wider application in the modern society. Inconspicuously, during the last few decades the enzymes became indispensable in the pharmaceutical, food, leather, textile and paper industries and even found their way into our daily laundry products. They constantly help our cells to live, make our daily bread tastier, deliver a sweet juice in the middle of the winter and make it possible to remove the vilest stains from our cloths after washing in just 30°C.

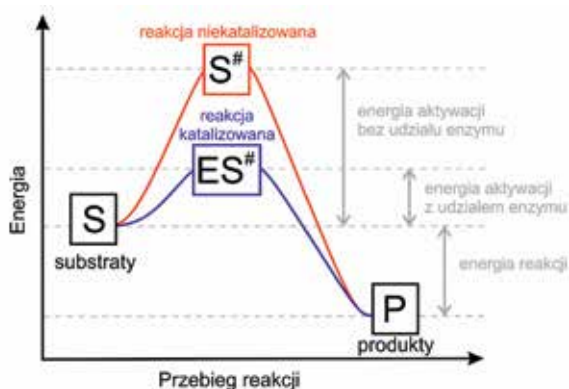
Enzym – biologiczny katalizator

Enzymy należą do substancji, które są przez chemików nazywane katalizatorami. Każdy słyszał o katalizatorach zainstalowanych w samochodach, ale sam termin może czasem wydawać się niejasny. Jeżeli zapytamy chemika czym jest katalizator, odpowie, zgodnie z dość hermetyczną definicją, że jest to substancja, która przyspiesza reakcję chemiczną i skierowuje ją na wybraną ścieżkę, sama nie zużywając się w reakcji. Aby zrozumieć o co w tym wszystkim chodzi wyobraźmy sobie reakcję chemiczną, na przykład zachodzącą w komórkach czy w układzie wydechowym samochodu, jako zatłoczone rondo w środku dużego miasta. Samochody wjeżdżające drogą na rondo to substancje chemiczne, które będą ulegały przekształceniu (tzw. substraty), zaś każda

z dróg opuszczająca rondo to inna ścieżka reakcji. Z kolei samochody opuszczające rondo to produkty, różniące się pod względem budowy cząsteczki chemiczne. Ponieważ rondo jest zakorkowane, wszystkie reakcje postępują dość wolno i każdy samochód wjeżdżający na nie straci sporo czasu zanim je opuści (tj. przemieni się w produkt reakcji). Katalizator możemy wyobrazić sobie jako wielką estakadę przerzuconą nad zatłoczonym rondem, która wiedzie w kierunku najbardziej potrzebnym dla naszej komórki czy środowiska. Teraz samochody bardzo szybko przemykają nad korkiem (przyspieszenie reakcji) i większość z nich wybierze właśnie tę drogę (skierowanie ruchu na wybraną ścieżkę). Dokładnie według tej prostej analogii działa zarówno katalizator w samochodzie, odpowiednio utleniający resztki benzyny i redukujący tlenki azotu w spalinach, jak i enzym

w naszym jelicie ułatwiający trawienie pożywienia.

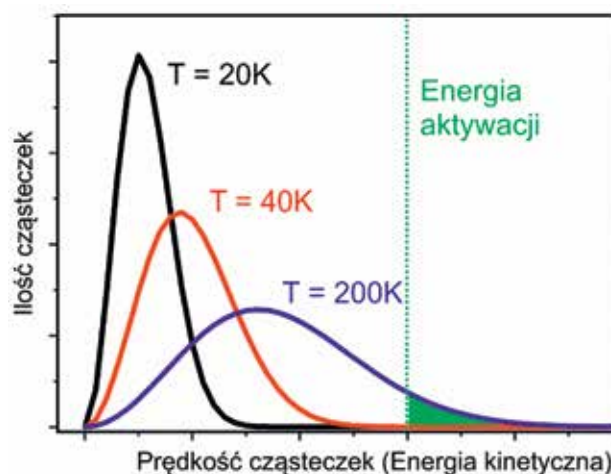
Efekt estakady nad korkiem jest nazywany przez chemików „obniżeniem energii aktywacji” (Ryc. 1).



Ryc. 1. Energia aktywacji (tj. różnica energii stanu przejściowego (S[#]) i energii substratów) ulega zmniejszeniu na skutek katalitycznego działania enzymu (różnica energii ES[#] i substratów). Obniżenie energii aktywacji reakcji katalizowanej w porównaniu do niekatalizowanej odpowiada za przyspieszenie reakcji przez katalizator.

Zgodnie z klasyczną teorią stanu przejściowego, każdą reakcję chemiczną charakteryzuje pewna określona energia aktywacji – im jest ona wyższa, tym dłużej musimy poczekać, aby reakcja miała miejsce. Zastanówmy się skąd bierze się wspomniana wyżej energia aktywacji. Otóż na co dzień w przeważającym stopniu cząsteczki chemiczne pozostają w niskich stanach energetycznych. Aby doszło do reakcji chemicznej pomiędzy cząsteczkami muszą one najpierw zbliżyć się do siebie, pokonując odpychające oddziaływania elektrostatyczne i ulegając przy tym niekorzystnym energetycznie odkształceniom związanym z reakcją chemiczną. Na przykład w czasie przeniesienia atomu z jednej cząsteczki do drugiej w tak zwanym stanie przejściowym następuje rozciągnięcie wiązania, które ulega odkształceniu. Te zmiany geometrii i struktury elektronowej związane są właśnie z podniesieniem energii układu, którą nazywamy energią aktywacji. Jeżeli taka bariera energetyczna jest wysoka, tylko niewielka ilość cząsteczek ma wystarczającą energię, aby ją pokonać. W rezultacie tylko nieliczne molekule z olbrzymiej liczby cząsteczek, które potencjalnie mogłyby zareagować, są zdolne do chemicznej przemiany, a co za tym idzie sama reakcja (z naszego makroskopowego punktu widzenia) postępuje bardzo powoli (tzn. mało produktu powstaje w czasie). Aby wpłynąć na szybkość reakcji możemy zwiększyć energię cząsteczek podnosząc ich temperaturę. Wraz ze wzrostem temperatury coraz więcej cząsteczek, zgodnie z rozkładem Boltzmana (Ryc. 2), osiąga wyższe energie i tym samym będzie zdolnych osiągnąć i skutecznie przekroczyć barierę reakcji. W rezultacie więcej

cząsteczek w danym czasie jest w stanie przemienić się w produkt, co skutkuje eksponencjalnym wzrostem obserwowanej szybkości reakcji [1, 4]. Podgrzewanie reagentów jest jednak procesem bardzo kosztownym, a czasem, gdy mamy do czynienia z wrażliwymi termicznie związkami chemicznymi o skomplikowanej strukturze, nawet zupełnie niewykonalnym. W takiej sytuacji jedynym możliwym sposobem jest zastosowanie katalizatora.



Ryc. 2. Rozkład energii kinetycznej cząsteczek w zależności od temperatury układu wg. rozkładu Boltzmana. W miarę podnoszenia temperatury coraz większa populacja cząsteczek osiąga wymaganą granicę energii aktywacji, co jest warunkiem koniecznym do zajścia reakcji chemicznej. Na zielono zaznaczono część populacji cząsteczek, które w temperaturze 200K osiągnęły przynajmniej energię równą energii aktywacji.

Rolą katalizatora jest tak wpływać na cząsteczki w stanie przejściowym, aby ich energia nie musiała być aż tak wysoka, by reakcja zachodziła (tj. obniżyć energię aktywacji). W rezultacie, podobnie jak w przypadku podniesienia temperatury, większa ilość cząsteczek chemicznych ma szansę pokonać barierę i reakcja przebiega szybciej. Takimi katalizatorami są właśnie enzymy, które do perfekcji realizują to właśnie zadanie. Wiążą one reagenty w swoim wnętrzu w taki sposób, aby maksymalnie obniżyć energię ich aktywacji [15] i przyspieszyć proces tworzenia produktu.

Bariery energetycznej, w metaforycznym sensie, doświadcza każdy z nas po niezbyt dobrze przespanej nocy, gdy stara się rano wstać do pracy – w tym przypadku katalizator, na przykład w postaci zapachu dobrej mocnej kawy, pomaga znacząco obniżyć barierę energii aktywacji i pomóc nam wstać.

Precyzyjna regulacja

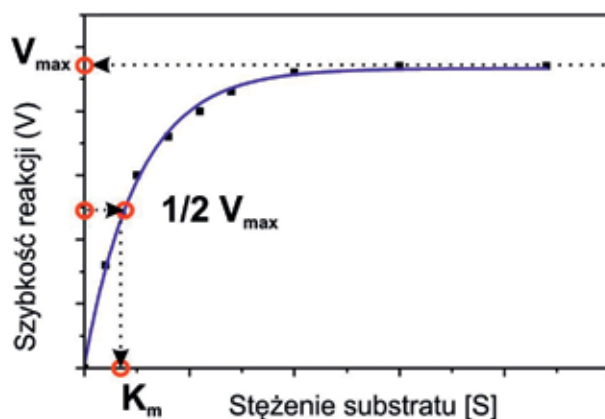
Enzymy są niezwykłymi katalizatorami. Dzięki swojej dość skomplikowanej i wyrafinowanej budowie potrafią działać tylko w określonym miejscu

naszego organizmu i w określonych warunkach temperatury i pH. Są w stanie również rozpoznawać cząsteczki chemiczne i spośród wielu obecnych w naszych komórkach wybierać tylko te, do których modyfikacji zostały przeznaczone. Zjawisko to, nazywane specyficnością enzymów, może powodować, że enzymy wybierają wyłącznie jeden rodzaj cząsteczki (np. absolutna specyficzność enzymu laktazy, który katalizuje rozkład wyłącznie laktozy) bądź też jakąś ich grupę (specyficzność grupowa – np. enzym trawienny tripsyna przecinający łańcuch peptydowy w pobliżu zasadowych aminokwasów) lub ograniczać się wyłącznie do rozpoznawania typu wiązania chemicznego (np. niektóre dehydrogenazy alkoholowe utleniają specyficznie alkohole pierwszorzędowe do aldehydów). Enzymy potrafią również rozpoznawać przestrzenną strukturę cząsteczek chemicznych, dzięki czemu potrafią być specyficzne względem izomerów optycznych (enancjomerów) – czyli cząsteczek niemal identycznych, różniących się tylko przestrzenną organizacją podstawników wokół tzw. centrów stereogenicznych (np. chiralnych atomów węgla - chiralne cząsteczki, tak jak nasze ręce, które wyglądają jak swoje lustrzane odbicia). Dzięki enancjosepecyficzności enzymy są niezwykle przydatne szczególnie w przemyśle farmaceutycznym, gdzie ich zdolność do produkcji chiralnych czystych enancjomerycznych leków może decydować o tym, czy produkt będzie miał zbawienne działanie lecznicze, czy też stanie się zagrażającą życiu trucizną [7, 14]. Co więcej, zastosowanie enancjoselektywnych biokatalizatorów w syntezie ma też duże znaczenie ekonomiczne, gdyż lek jest syntetyzowany tylko w aktywnej formie. Dla każdego centrum stereogenicznego zyskujemy więc dwa razy więcej substancji aktywnej, podczas gdy w przypadku syntezy nie-enancjoselektywnej otrzymujemy tylko połowę możliwej ilości produktu. Mając czysty optycznie lek firma farmaceutyczna nie musi też przeprowadzać kosztownych badań klinicznych skierowanych na wykrycie efektów ubocznych, potencjalnie powodowanych przez nieaktywny klinicznie enancjomer leku. Nie ma też potrzeby przeprowadzenia kosztownego oczyszczenia substancji aktywnej z niepotrzebnego enancjomeru, jeżeli jego podanie powoduje niepożądane skutki.

Bardzo często aktywność katalityczna enzymów podlega ścisłej kontroli i regulacji. Dobrym przykładem takiego zachowania są enzymy trawienne, katalizujące rozkład białek. Enzymy te wytwarzane są m.in. w gruczołach ściany żołądka. Gruczoły ściany żołądka w dużej mierze zbudowane są z białek, więc enzymy trawienne muszą być początkowo nieaktywne (wydzielane w formie tzw. proenzymu

pepsynogenu), żeby nie trawiły własnego macierzystego gruczołu. I dopiero wtedy, gdy już wydzielą się do żołądka, gdzie panuje niskie pH (obecny jest tam kwas żołądkowy), ulegają samoaktywacji (autokatalitycznie same odcinają swój niewielki fragment) i stają się bardzo aktywnymi katalizatorami ułatwiającymi trawienie białek (pepsyna) [5]. Dodatkowo nasz żołądek wyścielony jest specjalnymi komórkami odpornymi na działanie pepsyny – inaczej sami moglibyśmy siebie strawić po dobrym obiedzie! Co ciekawe, inne enzymy trawienne, wytwarzane w trzustce (np. chymotrypsyna), a działające w jelicie cienkim, gdzie panuje pH zasadowe, trawią białka tylko i wyłącznie w warunkach wysokiego pH. Tym samym ich aktywność enzymatyczna jest precyzyjnie przystosowana do miejsca, w którym mają za zadanie działać.

Aktywność enzymatyczna (czyli zdolność do przyspieszenia reakcji) podlega dynamicznej regulacji. Zanim zajdzie reakcja, najpierw musi powstać niekowalencyjne połączenie między enzymem (E) i substratem (S), czyli tzw. kompleks ES. Ponieważ sama reakcja chemiczna jest bardzo często wolniejsza od procesu powstawania i rozpadu kompleksu ES, szybkość katalizowanej przez enzym reakcji zależy nieliniowo od stężenia substratu i ma kształt hiperboli. Oznacza to, że w miarę zwiększania się stężenia substratu szybkość reakcji tylko początkowo gwałtownie rośnie, po czym przyrost szybkości stopniowo zwalnia, aż osiąga wysycenie (Ryc. 3).



Ryc. 3. Wykres zależności szybkości reakcji enzymatycznej V od stężenia substratu $[S]$, gdzie V_{max} – maksymalna szybkość reakcji enzymatycznej, osiągana dla nieskończenie wysokiego stężenia substratu. K_m - stała Michaelisa oznaczająca stężenie substratu, przy jakim szybkość reakcji katalizowanej przez enzym osiąga połowę V_{max} .

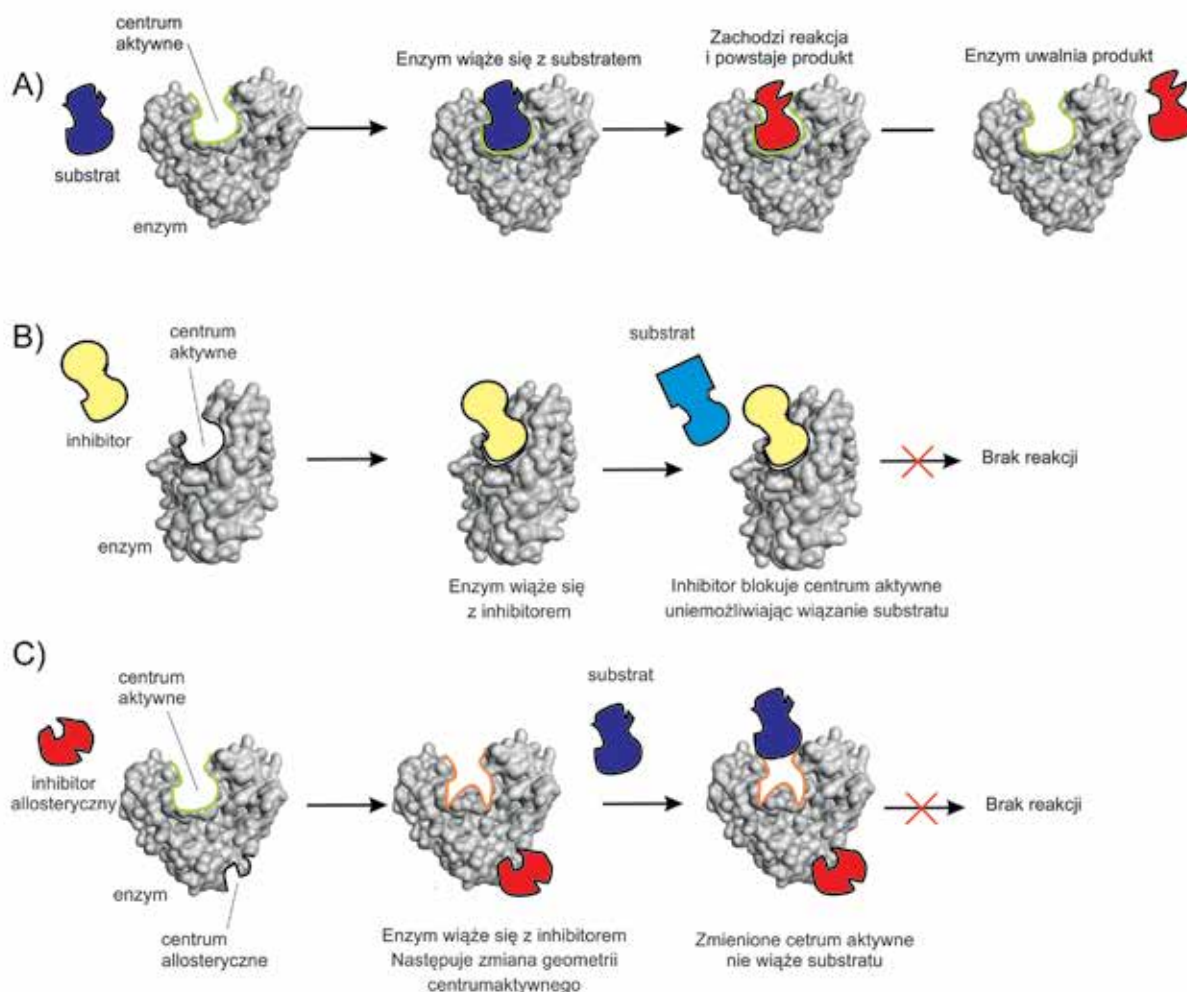
Zrozumienie tego efektu było możliwe dzięki badaniom trójki uczonych: francuskiego chemika Victora Henriego, niemieckiego biochemika Leonora Michaelisa i kanadyjskiej doktor medycyny Maud Menten. To oni sformułowali najsłynniejsze w biochemii

równanie Michaelisa-Menten, będące podstawowym prawem opisującym zachowanie enzymów [8].

Co ciekawe, wiele enzymów zmienia swoją aktywność w zależności od stężenia substratu i innych substancji w sposób jeszcze bardziej złożony. Częstym zjawiskiem jest spowolnienie reakcji, gdy powstaje dużo produktu. W ten sposób organizm zabezpiecza się przed akumulacją zbyt dużej ilości substancji chemicznych, które w wysokim stężeniu mogłyby wywrzeć toksyczny efekt na komórkę. Efekt taki nazywany jest inhibicją produktową, jeżeli produkt wiąże się w centrum aktywnym, lub ujemnym efektem allosterycznym, jeżeli miejsce wiązania się inhibitora-produktu znajduje się w innej części enzymu.

wtedy, że enzym ma budowę multimeryczną (np. jeżeli składa się z czterech identycznych podjednostek, jest homotetramerem – Ryc. 5).

Bardzo często takie enzymy działają kooperatywnie – tzn. związanie w jednej z podjednostek substratu powoduje zmianę geometrii białka. Zmiana kształtu podjednostki zawierającej substrat pociąga za sobą przemieszczenie położenia aminokwasów na styku pomiędzy podjednostkami. W efekcie następuje również zmiana geometrii pozostałych podjednostek (tzw. zmiana konformacji), które niejako „czują”, że ich sąsiad związał pierwszą cząsteczkę substratu. W rezultacie ich zdolność do wiązania cząsteczek substratu w centrach aktywnych (a więc termodyna-



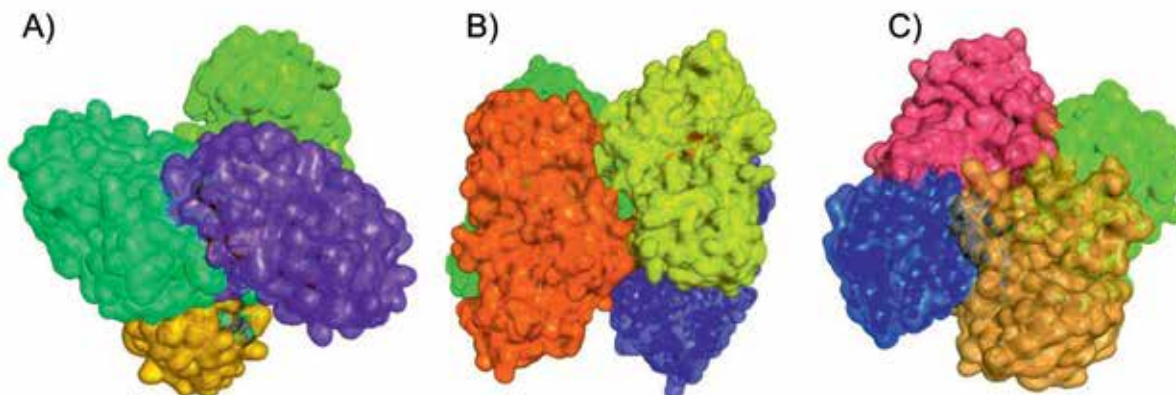
Ryc. 4. Schematyczne przedstawienie różnych sposobów regulacji aktywności enzymatycznej przez inhibitory. A) Normalna reakcja enzymatyczna, w której enzym wiąże substrat i po reakcji uwalnia produkt, B) Inhibitor kompetycyjny wiąże się w centrum aktywnym uniemożliwiając wiązanie substratu i zajście reakcji, C) Związanie się z enzymem czynnika allosterycznego wpływa na zmianę struktury enzymu, co pośrednio oddziałuje na geometrię centrum aktywnego. W rezultacie enzym nie wiąże skutecznie substratu i reakcja nie zachodzi.

Aktywność enzymatyczna może podlegać jeszcze innej regulacji, najczęściej (choć nie jedynie) gdy enzym składa się z kilku jednakowych pod względem składu aminokwasowego podjednostek białkowych, z których każda zawiera centrum aktywne. Mówimy

o kooperatywnym prawdopodobieństwie powstania kompleksu ES) może wzrosnąć (dodatni efekt kooperatywny) lub zmaleć (ujemny efekt kooperatywny) [9, 12]. W ten sposób ewolucyjnie zaprogramowany efekt regulacji pozwala organizmowi dostosować efektywność

katalizatorów do zmieniających się warunków zewnętrznych (np. zmiennego stężenia substancji odżywczych).

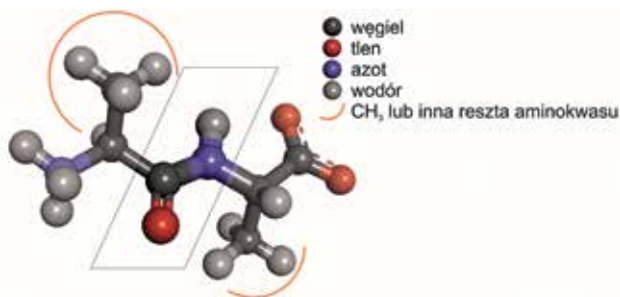
helisą) lub płaszczyzny (zwaną β -kartką) (Ryc. 7A, B). Helisy i β -kartki, będące strukturą II-rzędową białek, tworzą z kolei przestrzenne struktury III-rzęd-



Ryc. 5. Przykłady białek tetramerycznych: A) dehydrogenaza semialdehydu aspartanowego z *Trichophyton rubrum* [10], B) Δ^1 -dehydrogenaza 3-ketosteroidowa z *Rhodococcus erythropolis* [16], C) dehydrogenaza (S)-1-fenylloetanolowa z *Aromatoleum aromaticum* [6].

Białkowa budowa enzymów

Jak już wspomniano, enzymy mają bardzo skomplikowaną budowę. Ponieważ są białkami, zbudowane są z aminokwasów. Większość organizmów wyższych (do których i my się zaliczamy) wykorzystuje tylko 21 różnych aminokwasów, które niczym klocki lego połączone są w długie łańcuchy za pomocą tzw. wiązania peptydowego (Ryc. 6).



Ryc. 6. Struktura wiązania peptydowego (szary romb) pomiędzy dwoma aminokwasami alaniny. Dzięki sprzężeniu elektronowemu wolnej pary elektronowej atomu azotu i układu π elektronów grupy karbonylowej wiązanie peptydowe jest płaskie. Ułożenie aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym to struktura I-rzędowa.

To, w jakiej kolejności poukładane są różne aminokwasy w danym białku jest zapisane w kodzie genetycznym (DNA) i w jeszcze nie do końca zrozumiałym dla nas sposób niesie informację nie tylko o kolejności (tak zwanej sekwencji) aminokwasów w łańcuchu, ale również o całkowitym trójwymiarowym kształcie białka. Okazuje się bowiem, że dojrzałe białko (czyli np. enzym) przypomina bardziej kłębek włóczki, którym bawił się młody kociak, niż prostą wstążkę. Nic aminokwasowa przyjmuje skomplikowaną i uporządkowaną strukturę spirali (zwaną

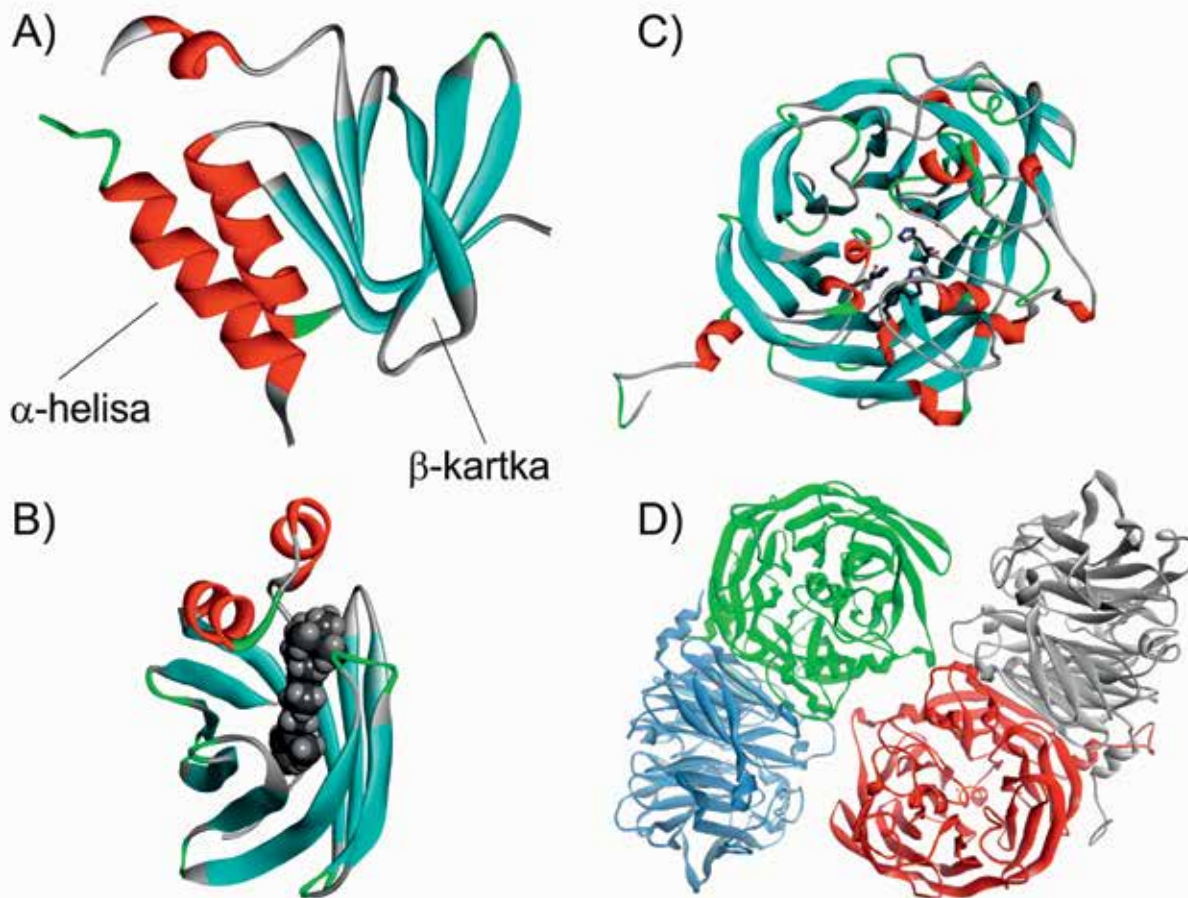
dowę, które w formie przypominają nie tylko kłębek włóczki, lecz także i fantazyjne pierścienie czy też beczki (Ryc. 7B, C).

Niektóre enzymy są naprawdę wielkimi cząsteczkami chemicznymi, składającymi się z wielu splecionych ze sobą łańcuchów i dziesiątków tysięcy atomów. Tym bardziej jest dla nas niezrozumiałe, w jaki sposób białka za każdym razem, zazwyczaj bezbłędnie i w większości wypadków zupełnie samoistnie, związają się w te skomplikowane struktury. Pomimo wielu badań w tej dziedzinie oraz ogromnego postępu metod symulacji komputerowych związania się (tzw. fałdowania) białek wciąż nie jesteśmy w stanie przewidzieć z wystarczającą dokładnością przestrzennej struktury białek bazując wyłącznie na sekwencji aminokwasowej. To właśnie z tego powodu co roku (od 1994) odbywa się swego rodzaju eksperyment: światowe mistrzostwa w przewidywaniu struktur białkowych CASP (Critical Assessment of protein Structure Prediction) [13], w ramach których ponad 100 grup naukowców rywalizuje w przewidywaniu struktury białka o niedawno poznanej, ale wciąż nie opublikowanej strukturze.

Należy sobie jednak postawić pytanie, czemu ma służyć tak skomplikowana budowa białek i enzymów? Enzymolodzy byli bardzo zaskoczeni gdy odkryli, że niejednokrotnie w samym procesie przyspieszania reakcji bierze udział tylko kilka aminokwasów! Sama reakcja chemiczna zachodzi bowiem w tak zwanym „centrum aktywnym”, które jest najczęściej niewielkim wgłębieniem lub niszą w enzymie, do którego wiążą się cząsteczki chemiczne

(substraty) przetwarzane przez enzym. To właśnie w stronę przestrzeni centrum aktywnego zwrócone są w precyzyjnie określonych miejscach aminokwasy

i tak wiele różnych reakcji potrafią przyspieszać, że enzymolodzy mają wiele pracy na kolejne dziesiątki lat badań. W samym ludzkim organizmie ocenia się –



Ryc. 7 Hierarchiczna struktura białek tworzona przez sekwencję aminokwasową łańcucha polipeptydowego (struktura 1^o-rzędowa), gdzie **A**) to sposób zwinięcia (struktura 2^o-rzędowa) w charakterystyczne helisy (czerwone), β -kartki (niebieskie) i spinki (zielone), **B**) i **C**) przestrzenna organizacja struktur 2^o-rzędowych w strukturę 3^o-rzędową, zawierającą charakterystyczne motywy, takie jak pęki helis, zwijająca się β -kartkę, β -baryłkę, których funkcją może być wytworzenie miejsca wiązania cząsteczki (ciemno- i jasnoszara kulkowa struktura substratu w **B**) oraz zapewnienie wyizolowanego środowiska dla aktywnych aminokwasów katalizujących reakcję (aminokwasy w centrum baryłki w **C**). Na panelu **D**) przedstawiono 4^o-rzędową organizację tworzoną przez odrębne łańcuchy polipeptydowe (oznaczone różnymi kolorami); **A**) fragment struktury modelu homologicznego dehydrogenazy Δ^1 -3-ketosteroidowej ze *Sterolibacterium denitrificans* [3], **B**) komórkowe białko wiążące retinol z *Homo sapiens* (kod PDB 5FAZ) **C**) i **D**) dehydrogenaza tiocyjanianowa z *Thioalkalivibrio paradoxus* (kod PDB: 5F75).

zaangażowane w przyspieszenie reakcji chemicznej. Centrum aktywne można więc wyobrazić sobie jak najeżoną wyspecjalizowanymi ramionami robotów taśmę produkcyjną w wielkiej fabryce. Od dziesięcioleci próbujemy zrozumieć, jak enzymy osiągają te fenomenalne rezultaty za pomocą relatywnie niewielkich i uniwersalnych środków. Niestety wciąż poszukujemy pełnej odpowiedzi, bo czynników odpowiedzialnych za katalityczną perfekcję enzymów wydaje się być wiele. Rozumiemy, że kluczem do wszystkiego jest właśnie obniżanie energii aktywacji danej reakcji za pomocą tych kilku odpowiednio ulokowanych aminokwasów lub kofaktorów, czyli niewielkich cząsteczek organicznych lub kompleksów metali, które poszerzają spektrum dostępnych chemicznych procesów. Enzymów jest jednak tak wiele

na podstawie analizy genomu – że biokatalizatorów, katalizujących prawie 900 różnych procesów, może być ponad 2 700 [17]. A większość organizmów żywych naszej planety nie została jeszcze scharakteryzowana genetycznie!

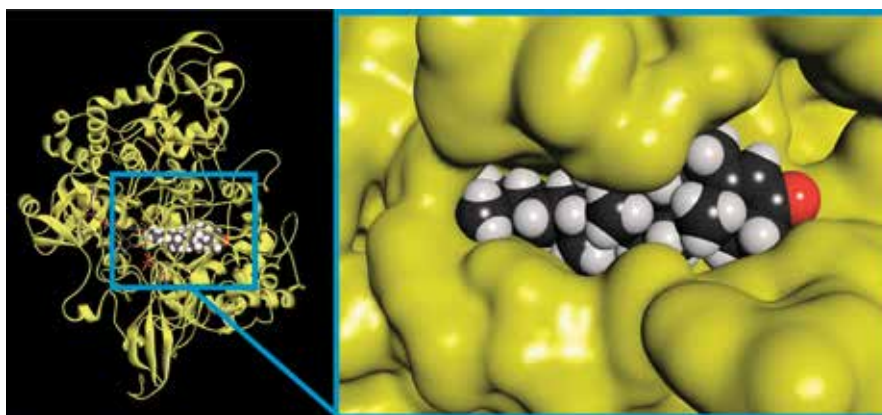
Centrum aktywne

Należy sobie zadać pytanie, dlaczego Natura wytworzyła tak skomplikowane cząsteczki, by ostatecznie zbudować coś tak prostego, jak centrum aktywne? Czy enzymy nie mogłyby składać się właściwie tylko z tych kilku kluczowych aminokwasów, które katalizują reakcję? Przecież tak właśnie budujemy nasze katalizatory my, chemicy – i jako to działa! Powodów, dla których Natura wybrała to pozornie

bardziej skomplikowane rozwiązanie jest kilka. Po pierwsze, jak już wspomniałem, białka, a w szczególności enzymy, produkują się poniekąd same. Po przetłumaczeniu kodu genetycznego na łańcuch białkowy sama struktura polimeru białkowego związa się w docelowy kształt. Ten kształt jest tak zaprojektowany przez ewolucję, aby umieścić katalitycznie aktywne aminokwasy w odpowiedniej, optymalnej pozycji. Pozostałe aminokwasy nie tylko stanowią rusztowanie, na którym katalitycznie aktywne aminokwasy są zamocowane, ale również budują kształt centrum aktywnego, które przypomina formę pod odlew rzeźby dla reagujących w reakcji cząsteczek. Innymi słowy cząsteczki reagentów „pasują” do centrum aktywnego niczym ręka do dobrze dobranej rękawiczki i każdy fragment cząsteczki chemicznej wchodzi do odpowiedniego „palca” tej rękawiczki. Oczywiście dobre „dopasowanie” reagenta do centrum aktywnego wykracza poza czysto makroskopowe mechaniczne dopasowanie kształtu, chociaż jest to również istotny czynnik (są to tak zwane efekty steryczne) (Ryc. 8).

chemiczną „malutką rączkę dziecka” od „wielkiej męskiej graby”, czy „kobiecej rączki o długich palcach i wypielęgnowanych paznokciach”. Innymi słowy enzym wybierze z wielu cząsteczek chemicznych pływających w komórkowej cytoplazmie tylko te związki, do których modyfikacji został zaprojektowany. Dzięki tej niezwyklej zdolności w naszych komórkach potrafią biec obok siebie bardzo różne reakcje chemiczne, podczas gdy my, w chemicznej fabryce, musimy każdy z procesów chemicznych prowadzić w osobnym reaktorze, by nasze katalizatory „nie pomyliły się” i modyfikowały tylko jeden wybrany przez nas związek chemiczny.

Selektywność jest wielką zaletą enzymów i ma bardzo duże znaczenie dla ich zastosowania w przemyśle. Co ciekawe – jest jednocześnie zaletą i wadą biokatalizatorów. Otóż tak długo, jak chcemy odtworzyć w fabryce proces, który występuje w Naturze (na przykład chcemy syntetyzować antybiotyk wykorzystując enzymy z grzybów, które naturalnie go wytwarzają), tak długo ta niezwykle selektywność



Ryc. 8. Katalityczna podjednostka dehydrogenazy C25 steroidowej wraz z substratem w jej centrum aktywnym [18]. Na prawym panelu przedstawiono doskonałe dopasowanie substratu do powierzchni białka. Część aminokwasów przesłaniających substrat od strony czytelnika ukryto w celu lepszej wizualizacji kompleksu enzym-substrat (ES).

Bardzo ważną rolę pełnią też oddziaływania elektrostatyczne – aminokwasy o naładowanych (dodatnio lub ujemnie) łańcuchach bocznych umieszczone są w takich miejscach, aby korzystnie oddziaływać z przeciwnie naładowanymi grupami substratu lub też umożliwić powstanie stabilizujących kompleks enzymu z substratem wiązań wodorowych. To właśnie dzięki tym doskonale zaprojektowanym oddziaływaniom centrum aktywnego z substratem enzymy uzyskują niezwykle przewagę nad naszymi prostymi chemicznymi katalizatorami. Przewagą tą jest wspomniana wcześniej selektywność. Rozpoznając kształty i właściwości cząsteczek chemicznych nasza „enzymatyczna rękawica” dba nie tylko o to aby „kciuk” czy „palec wskazujący” cząsteczki trafił w odpowiednie miejsce rękawicy, ale jest też w stanie rozróżnić

enzymów działa na naszą korzyść. Enzym wytworzy tylko jeden, pożądaný przez nas produkt i kompletnie zignoruje zanieczyszczenia. W przemyśle jednak bardzo często chcemy stworzyć cząsteczki, których Natura nie używa albo które zawierają nietypowe atomy. Wtedy ta wysoka specjalizacja biokatalizatorów działa na naszą niekorzyść, bo enzymy są zbyt wysoce wyspecjalizowane, by dobrze przyspieszać przemianę nietypowych cząsteczek. Nietypowe cząsteczki mające trochę inny chemiczny kształt oraz rozkład ładunków i nie pasują dobrze do centrum aktywnego. Aby poradzić sobie z tym problemem biotechnolodzy „przesiewają” wiele enzymów pochodzących z różnych organizmów, by znaleźć takie, które nie są aż tak bardzo wyspecjalizowane lub posiadają inną, bardziej pasującą do celów danej syntezy, specyficzność

substratową. Czasem udaje się znaleźć enzym, którego ewolucja nie doprowadziła jeszcze do skrajnej specjalizacji. Dzięki temu jest on w stanie rozpoznać i związać w centrum aktywnym szerszą gamę związków chemicznych i może służyć naszym celom. Takie poszukiwania przypominają jednak szukanie igły w stogu siana – nigdy nie mamy pewności, że odnajdziemy enzym o pożądanych cechach. Na szczęście dzięki postępom biologii molekularnej nie jesteśmy zdani tylko na łut częścią i Naturę – możemy liczyć na pomoc ze strony przyspieszonej i ukierunkowanej ewolucji enzymów w laboratorium.

Sztuczna ewolucja enzymów

Proces ewolucji polega na stopniowych, losowych zmianach w kodzie genetycznym kodującym sekwencje białek. Enzymy odpowiedzialne za kopiowanie DNA są zazwyczaj bardzo dokładne i bardzo rzadko popełniają błędy. Czasem jednak pojedyncze pomyłki „umkną ich uwadze” i w ten sposób następuje mutacja punktowa w kodzie DNA. Niekiedy zmiana pojedynczego elementu DNA nie prowadzi do poważnych zmian, czasem zmodyfikowane białko ma własności mniej przydatne niż jego pierwowzór, ale czasem jest ono lepsze. Ponieważ lepsze rozwiązania zwiększają szanse na przeżycie danego organizmu i wydanie na świat potomstwa (a więc przekazanie nowego typu białka swoim dzieciom), dobre rozwiązania się kumulują, a złe eliminują (bo często zmniejszają szansę przeżycia i przekazania gorszego białka potomstwu).

W sztucznie kierowanej ewolucji to my decydujemy, jakie będą warunki „przeżycia” danej losowej mutacji. Są nimi zdolności enzymu do katalizowania wybranej przez nas reakcji chemicznej. Dzięki postępom w dziedzinie biologii molekularnej posiadamy specjalne narzędzia biotechnologiczne umożliwiające częste wprowadzanie losowych, jak i celowych zmian w DNA i następnie produkcji białek kodowanych przez zmienione DNA w bakteriach. Posiadamy też narzędzia umożliwiające mieszanie się kodu genetycznego pomiędzy podobnymi, homologicznymi genami, w podobny sposób jak w procesie płciowego rozmnażania [19]. Powtarzając proces mutacji i selekcji wielokrotnie dla dużej liczby wariantów enzymu (niczym kolejne pokolenia w normalnej ewolucji) jesteśmy w stanie przekształcić enzym, który był słaby, w katalizator, który nie tylko przyspieszy reakcję nawet i 1000-krotnie, ale jeszcze zniesie wysokie stężenie rozpuszczalników organicznych, wysoką temperaturę czy jakże odmienne od przytulnego

wnętrza komórki warunki panujące w reaktorze chemicznym. Dzięki poszerzającej się wiedzy na temat zależności struktury białek i ich właściwości jesteśmy coraz częściej w stanie przewidywać (za pomocą modelowania molekularnego), jakie modyfikacje należy wprowadzać, by skierować ewolucję w danym kierunku, i jakie rejony białka najlepiej jest poddawać mutacjom. Dlatego nie musimy już poruszać się zupełnie na ślepo, co pozwala optymalizować właściwości katalityczne enzymów metodą ewolucji kierowanej dla mniejsze ilości białek [11]. Co więcej, dzięki technikom inżynierii genetycznej i mikrobiologii jesteśmy w stanie wytwarzać te enzymy w sposób tani i bezpieczny dla środowiska. Stało się to możliwe dzięki zrozumieniu kodu genetycznego, stanowiącego instrukcję do produkcji poszczególnych enzymów oraz rozwojowi narzędzi molekularnych pozwalających tę instrukcję kopiować, modyfikować i przenosić do innych organizmów. Za pomocą technik transformacji genetycznych wprowadzamy odpowiednio przygotowaną genetyczną instrukcję do pospolitych mikroorganizmów (np. bakterii *Escherichia coli* czy drożdży *Pichia pastoris*), namnażamy je i wydajemy im „chemiczny rozkaz” nakazujący produkcję pożądanego enzymu w dużej ilości. Ten „chemiczny rozkaz”, nazywany fachowo „indukcją”, wydajemy za pomocą dodatku do hodowli chemicznych związków (takich jak np. laktoza czy ramnoza), które zmieniają właściwości białek regulujących ekspresję genetyczną w mikroorganizmach. W obecności tych substancji białka regulatorowe odcepiają się od DNA mikroorganizmu (w szczególności zaś od DNA sztucznie wprowadzonego przez biologów molekularnych do zmodyfikowanej bakterii) i umożliwiają transkrypcję zakodowanej instrukcji produkcji pożądanego enzymu. Dzięki takim osiągnięciom genetycznie zmodyfikowane organizmy (czyli GMO) dostarczają nam m.in. tak zwanych rekombinowanych enzymów. Jest to sposób produkcji podpuszczki do produkcji serów (nie musimy więc zabijać jagniąt by ekstrahować enzym z ich żołądków), wytwarzania enzymów rozkładających skrobię do syropu glukozowego (soki słodkie nawet w zimie) czy produkujących lipazy usuwające tłuste plamy z pranej odzieży (tanie proszki zawierające enzymy pozwalają na pranie w niskiej temperaturze, co oszczędza prąd i chroni środowisko). Na marginesie należy wspomnieć, że te same metody inżynierii genetycznej służą do produkcji bardzo cennych leków, takich jak insulina ludzka, ludzki hormon wzrostu czy też innowacyjne leki przeciw chorobom autoimmunologicznym, takim jak choroba Leśniowskiego-Crohna, wrzodziejące zapalenie jelita grubego,

łuszczycy czy reumatoidalne zapalenie stawów [2]. Te biologiczne leki również zbudowane są z aminokwasów i wytwarzane są w zmodyfikowanych genetycznie komórkach eukariotycznych (tj. nie bakteryjnych – najczęściej w komórkach jajnika chomika chińskiego – CHO). Przeciwciała wytwarzane w GMO mają również zastosowanie w diagnostyce biomedycznej (jako molekularne czujniki wykrywają np. hCG w teście ciążowym), jak również jako sztuczne biokatalizatory, czyli rodzaj wytworzonych przez chemików enzymów [20]. Jak więc widać nie należy się ślepo obawiać GMO dla samej zasady – to, co modyfikowane genetycznie niejednokrotnie ratuje nasze życie i zdrowie, a przy tym wspiera ochronę środowiska.

Podsumowanie

Otoczający nas świat zmienia się czasem niepostrzeżenie. Jeszcze 20–30 lat temu enzymy wykorzystywali

tylko specjaliści w laboratoriach czy fabrykach farmaceutycznych. Dziś, czasem nieświadomie, wykorzystują je gospodynie domowe (lub samodzielnie robiący pranie mężczyźni) dolewając żelu do prania z formułą enzymatyczną usuwającą plamy z białek, tłuszczu i cukrów. Korzystają z nich piekarze, dodający enzymatycznych polepszaczy, które sprawiają, że chleb jest bardziej sprężysty i aromatyczny, czy kucharze, wykorzystujący enzymatyczne marynaty, by mięso nabrało odpowiedniej miękkości i delikatności. Stosuje się enzymatyczne preparaty proteolityczne, by sklarować piwo produkowane w lokalnym mikro-browarze. No i oczywiście każdy z nas, w każdej sekundzie naszego istnienia, wykorzystuje tysiące enzymów – po to, by po prostu żyć.

Bibliografia

1. Arrhenius, S, Über die Dissociationswärme und den Einfluss der Temperatur auf den Dissociationsgrad der Elektrolyte. In *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 1889; Vol. 4, p 96.
2. Brekke, OH; Sandlie, I. (2003). Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2: 52–62.
3. Chiang, YR; Ismail, W; Gallien, S; Heintz, D; Van Dorsselaer, A; Fuchs, G. (2008). Cholest-4-En-3-one-Delta(1)-dehydrogenase, a flavoprotein catalyzing the second step in anoxic cholesterol metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 107–113.
4. Glasstone, SLKJEH, *The Theory of Rate Processes The Kinetics of Chemical Reactions, Viscosity, Diffusion and Electrochemical Phenomena*. McGraw-Hill Book Company: New York, N.Y., 1941.
5. Herriott, RM. (1938). Kinetics of the Formation of Pepsin from Swine Pepsinogen and Identification of an Intermediate Compound. *J. Gen. Physiol.* 22: 65–78.
6. Hoffken, HW; Duong, M; Friedrich, T; Breuer, M; Hauer, B; Reinhardt, R; Rabus, R; Heider, J. (2006). Crystal structure and enzyme kinetics of the (S)-specific 1-phenylethanol dehydrogenase of the denitrifying bacterium strain EbN1. *Biochemistry* 45: 82–93.
7. Izake, EL. (2007). Chiral discrimination and enantioselective analysis of drugs: an overview. *J. Pharm. Sci.* 96: 1659–76.
8. Johnson, KA; Goody, RS. (2011). The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten Paper. *Biochemistry* 50: 8264–8269.
9. Koshland, DE; Némethy, G; Filmer, D. (1966). Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models in Proteins Containing Subunits*. *Biochemistry* 5: 365–385.
10. Li, Q; Mu, Z; Zhao, R; Dahal, G; Viola, RE; Liu, T; Jin, Q; Cui, S. (2016). Structural Insights into the Tetrameric State of Aspartate-β-semialdehyde Dehydrogenases from Fungal Species. *Scientific Reports* 6: 21067.
11. Lutz, S. (2010). Beyond directed evolution—semi-rational protein engineering and design. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21: 734–743.
12. Monod, J; Wyman, J; Changeux, JP. (1965). On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J. Mol. Biol.* 12: 88–118.
13. Moulton, J; Pedersen, JT; Judson, R; Fidelis, K. (1995). A large-scale experiment to assess protein structure

- prediction methods. *Proteins: Struct. Funct. Bioinform.* 23: ii–v.
14. Nguyen, LA; He, H; Pham-Huy, C. (2006). Chiral drugs: an overview. *Int. J. Biomed. Sci.* 2: 85–100.
 15. Pauling, L. (1948). Chemical achievement and hope for the future. *Am. Sci.* 36: 51–8.
 16. Rohman, A; van Oosterwijk, N; Thunnissen, A-MWH; Dijkstra, BW. (2013). Crystal Structure and Site-directed Mutagenesis of 3-Ketosteroid Δ 1-Dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* SQ1 Explain Its Catalytic Mechanism. *J. Biol. Chem.* 288: 35559–35568.
 17. Romero, P; Wagg, J; Green, ML; Kaiser, D; Krummenacker, M; Karp, PD. (2004). Computational prediction of human metabolic pathways from the complete human genome. *Genome Biology* 6: R2.
 18. Rugor, A; Wójcik-Augustyn, A; Niedzialkowska, E; Mordalski, S; Staroń, J; Bojarski, A; Szaleniec, M. (2017). Reaction mechanism of sterol hydroxylation by steroid C25 dehydrogenase – Homology model, reactivity and isoenzymatic diversity. *J. Inorg. Biochem.* 173 28–43
 19. Stemmer, WPC. (1994). Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370: 389–391.
 20. Wentworth, P; Janda, KD. (2001). Catalytic antibodies. *Cell. Biochem. Biophys.* 35: 63–87.

Maciej Szaleniec, Agnieszka Rugor, Instytut Katalizy Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera, Polskiej Akademii Nauk.
E-mail: ncszalen@cyfronet.pl

KURKUMA – ROŚLINNE PANACEUM

Joanna M. Wierońska (Kraków)

Streszczenie

Kurkuma jest rośliną występującą dziko w krajach tropikalnych. Jest wykorzystywana jako przyprawa oraz jako barwnik spożywczy. Czynniki biologicznie aktywnymi, którym kurkuma zawdzięcza swoje niezwykle właściwości i kolor, są kurkuminoidy. Jest to grupa substancji, do których zaliczamy kurkuminę, demetoksykurkuminę oraz bis-demetoksykurkuminę. Dominującą procentowo jest kurkumina i jest ona też uznana za najcenniejszą spośród wszystkich kurkuminoidów. Substancje te wykazują działanie pleiotropowe, czyli mają zdolność do wielokierunkowego działania na organizm. Do najważniejszych prozdrowotnych działań obserwowanych po podaniach kurkuminoidów zaliczamy działanie przeciwzapalne, przeciwnowotworowe i antyoksydacyjne. Wykazano również skuteczność kurkuminoidów w leczeniu zaburzeń metabolicznych, a także zaburzeń ze strony ośrodkowego układu nerwowego. Pozytywne rezultaty widoczne były zwłaszcza w modelach chorób neurodegeneracyjnych, jak np. choroby Alzheimera lub Parkinsona, jednakże odnotowywano także pozytywne działanie u pacjentów z depresją.

Ograniczeniem w stosowaniu kurkuminy jest przede wszystkim niska biodostępność kurkuminoidów oraz słaba rozpuszczalność w wodzie. Jednakże jest to substancja dość dobrze tolerowana i nie zaobserwowano poważnych skutków niepożądanych po podaniach doustnych.

Abstract

Turmeric is a wild plant found in tropical countries. It is known as popular spice and also as a natural yellow pigment. The biologically active agents that turmeric owes its unusual properties and color are curcuminoids. This is a group of substances that include curcumin, demethoxycurcumin and bis-demethoxycurcumin. Curcumin is the most abundant and is considered to be the most valuable of all curcuminoids. These substances have pleiotropic effects, it means they have the capacity for multidirectional action in the body. The most important health effects observed after administration of curcuminoids are anti-inflammatory, anti-cancer and antioxidant effects. Curcuminoids have also been shown to be effective in the treatment of metabolic disorders as well as disorders of the central nervous system. Positive results were evident especially in models of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's or Parkinson's disease, but positive effects have also been reported for patients with depression. The limitation of the use of curcuminoids is primarily its low bioavailability and water solubility. However, the substances are well tolerated and no serious adverse effects have been observed after their oral administration.