

(Po)moč evolucije

Nobelova nagrada za kemijo

Miha Pavšič

Nobelovo nagrado za kemijo za leto 2018 so prejeli Frances H. Arnold za usmerjeno evolucijo encimov ter George P. Smith in Gregory P. Winter za predstavitev peptidov in protiteles na fagu, skupni imenovalec njihovega prispevka k dobrobiti človeštva pa je uporaba evolucijskega pristopa za razvoj proteinov z želenimi lastnostmi.

Na Zemlji se je v milijonih letih razvilo pestro življenje, vsak organizem pa vsebuje prav zanj specifično zbirko proteinov, ki z opravljanjem najrazličnejših funkcij omogočajo prenos in izražanje dednih informacij, zapisanih v obliki nukleinskih kislin (najpogostejše DNA). Nukleinske kisline so precej dobra shramba dednih informacij, a te niso večne - prihaja do sprememb v zaporedju nukleotidov (mutacij), od katerih jih večino

popravljalni mehanizmi popravijo, druge pa ostanejo. Od teh so nekatere škodljive (lahko vodijo tudi do razvoja raka), nekatere so nevtralne, spet tretje pa lahko končni proizvod mutiranega gena, na primer protein, popolnoma naključno »izboljšajo«. Tako spremenjeni protein organizmu, ki ga vsebuje, prinaša neko prednost v neprestanem boju za preživetje, mutacija, odgovorna za to, pa se ohrani in se lahko celo razširi v večjem delu populacije. Ta dva vidika, zmožnost spremembe dedne zasnove in izbor zaradi pritiska okolja, sta ključ do evolucije in hkrati ključna vidika raziskav letošnjih Nobelovih nagradencev.

Evolucija je močnejša od človeškega uma

Z razvozlanjem genskega koda (Nirenberg, Khorana, Holley in sodelavci, Nobelova

Z leve: Francis H. Arnold, dobitnica polovice Nobelove nagrade, ter George P. Smith in Gregory P. Winter, ki si delita drugo polovico nagrade. Viri fotografij: CalTech (Arnold), Mizzou (Smith) in Wikipedia (Winter).



nagrada za leto 1968), to je povezave med zaporedjem nukleotidov nekega gena in zaporedjem aminokislinskih ostankov proteina, ki je proizvod tega gena, so raziskovalci dobili (vsaj teoretično) možnost, da proteine spremenijo po svoji želji. Pogosto je namreč dovolj že sprememba enega nukleotida (A, T, G ali C) v drugega in triplet nukleotidov z vnešeno spremembo se izrazi kot zamenjava aminokislinskega ostanka iz nabora dvajsetih. Če v proteinskem genu na primer spremenimo zapis iz AGG v TGG, se na ustreznem mestu v proteinu namesto arginina s pozitivno nabito stransko skupino pojavi triptofan, aminokislina z veliko hidrofobno stransko skupino. Takšna sprememba lahko bistveno vpliva na obstojnost in funkcionalnost proteina, a je dejanski učinek zaradi izredne kompleksnosti proteinskih molekul še danes težko natančno predvideti. Proteini so namreč lahko sestavljeni iz več kot tisoč aminokislinskih ostankov, nanizanih v verigo, ki se zaradi ogromnega števila interakcij med posameznimi gradniki zvije v tridimenzionalno strukturo, ta pa določa funkcijo, obstojnost in ostale lastnosti proteina. Če je vnešenih sprememb več, je naloga napovedati lastnost proteina še težja, sploh težko pa je narediti obratno - zamisliti si protein z želenimi lastnostmi in nato načrtati ustrezno zaporedje aminokislinskih ostankov in s tem določiti tudi zaporedje nukleotidov, ki bo nosilo zapis za tak protein. Velikopotezni pristop k rešitvi tega problema bi bil posnemanje narave - priprava kopice različic nekega proteina, ki se naključno nekoliko razlikujejo v zaporedju aminokislinskih ostankov, in izbor najboljše različice z želeno lastnostjo.

Tukaj bi lahko rekli, da ima narava čas, da s počasnimi spremembami dednega zapisa in izborom preizkusi neznansko število kombinacij aminokislinskih ostankov, ljudem pa se nekoliko bolj mudi. Proces spreminjanja in izbora je tako treba pospešiti in prav to je uspelo **Frances H. Arnold**. Leta 1993 si je zadala nalogo, da spremeni proteolitični

encim subtilizin E tako, da bo deloval v nenaravnih razmerah - namesto v vodni raztopini bo sposoben cepiti druge proteine v šestdesetodstotni raztopini organskega topila dimetilformamida (DMF).

Darwinovi principi v - epruveti!

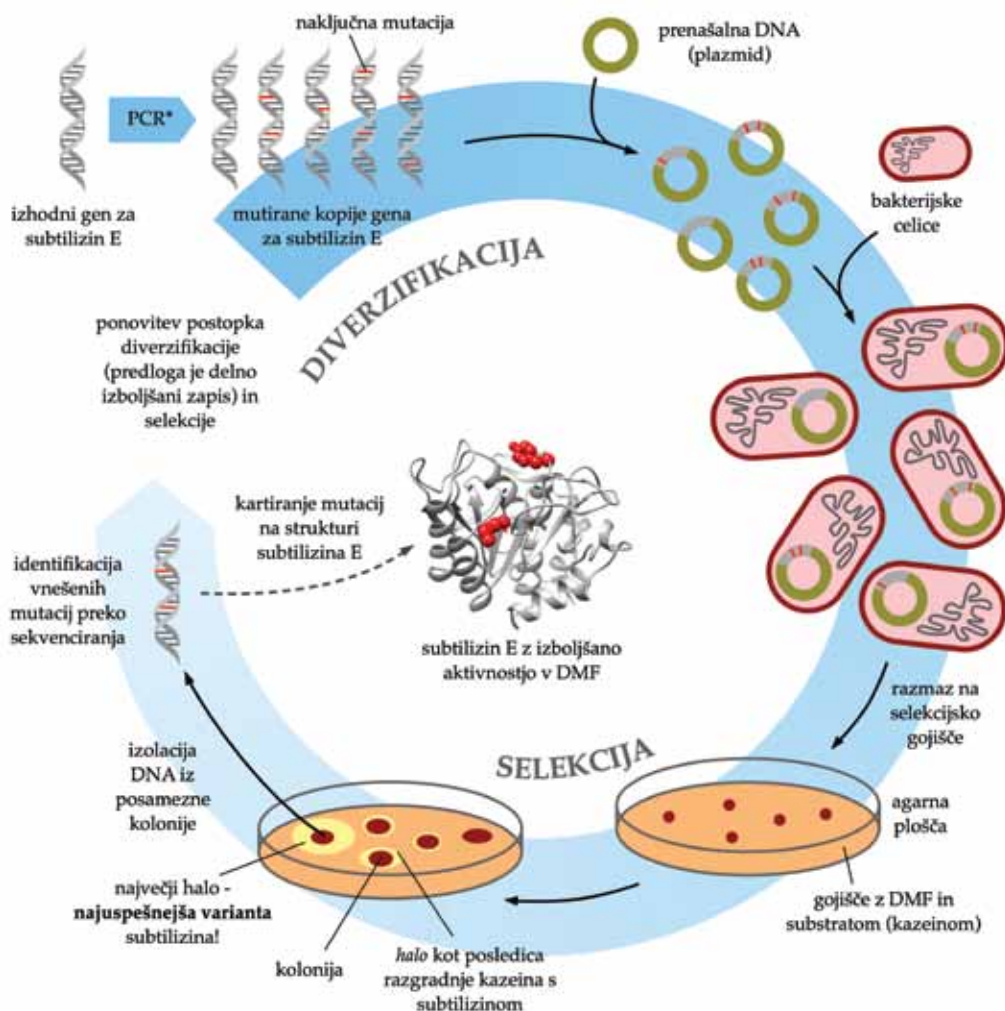
Prva stopnja v procesu evolucije je vnos mutacij oziroma raznolikosti - diverzifikacija. Skupina profesorice Arnold je to storila z verižno reakcijo s polimerazo (PCR), ki omogoča pomnoževanje fragmenta DNA, v njenem primeru gena za subtilizin E (slika 1). PCR sicer omogoča precej natančno pomnoževanje, ob posebej izbranih razmerah pa je stopnja vnosa napak pri pomnoževanju (vključitev nekega nukleotida namesto drugega) nekoliko večja - temu rečemo pomnoževanje, podvrženo napakam. Tako so v epruveti v samo nekaj urah pridobili milijone kopij gena za subtilizin E, ki pa so se med seboj razlikovale v naključno vnešenih mutacijah. A katera izmed teh mutiranih kopij je tista, ki nosi zapis za subtilizin z želeno lastnostjo? To so rešili v drugem koraku, v procesu izbora.

Fragmente DNA - mutirane gene za subtilizin - so vstavili v prenašalno molekulo DNA (plazmid), to pa vnesli v bakterijske celice. Vsaka od teh celic je sprejela samo po en plazmid, ki je vseboval le eno različico gena za subtilizin. Zmes bakterij so dovolj na redko razmazali na agarno ploščo in iz vsake celice, ki je sprejela plazmid, je zrasla kolonija, sestavljena iz genetsko enakih bakterij - klonov. Bakterije so izražale vnešeni gen za subtilizin in slednjega sproščale na agarno ploščo. In tu se je pojavil še selekcijski pritisk - agarne plošče so vsebovale še DMF in mlečni protein kazein, ki je primeren substrat za subtilizin. Okoli bakterijskih kolonij, ki so vsebovale gen za subtilizin, naključno spremenjen tako, da je bil mutirani subtilizin učinkovit v DMF, se je pojavil *halo* - svetla okrogla lisa kot posledica razgradnje kazeina. Večji kot je bil *halo*, bolj učinkovit je bil subtilizin. Na ta

način je profesorica Arnold in njena skupina v samo nekaj dneh po štirih ponovljenih ciklih, vsakič z višjo koncentracijo DMF, dobila subtilizin E, ki je bil 265-krat bolj učinkovit pri razgradnji kazeina v raztopini DMF kot izhodna oblika tega encima. To je ključen dosežek pri uporabi evolucijskega pristopa za razvoj encimov/proteinov z želenimi lastnostmi, hkrati pa ta briljantni pri-

stop vsebuje še nekaj - lastnost je povezana z zapisom zanj! Iz bakterij, ki so izločale najboljšo različico subtilizina, lahko namreč osamimo plazmid in s sekvenciranjem določimo zaporedje nukleotidov v genu zanj ter tako pridemo do mutacij samih. Tako je ekipa profesorice Arnold ugotovila, da je v izboljšani različici subtilizina E v primerjavi z izhodnim encimom prisotnih deset muta-

Slika 1: Pristop skupine profesorice Arnold pri pripravi subtilizina E, ki je bolj učinkovit pri razgradnji kazeinskega substrata v raztopini organskega topila DMF kot izhodni subtilizin. Ključna koraka, ki posnemata proces evolucije v naravi, sta vnos mutacij (diverzifikacija) in izbor najboljše različice mutiranega gena (selekcija oziroma izbor). Zaradi jasnosti prvine slike niso v realnem velikostnem razmerju.



cij, vpliva niti ene od njih pa ni bilo moč predvideti vnaprej.

Proces diverzifikacije je pomembno izboljšala skupina Willema P. C. Stemmerja, ki je vanj vključila preurejanje segmentov DNA, podobno, kot se to zgodi pri spolnem razmnoževanju. S tem so deloma rešili praktični problem kombinatorike, saj je delo z ogromnim številom posameznih različic bilo s takratnimi metodami neobvladljivo. Novi pristop, prvič opisan leta 1994, temelji na naključni fragmentaciji različic gena in ponovnemu združevanju nastalih fragmentov. Omogočil je propagiranje mutacij, povezanih z želeno lastnostjo, ob hkratnem vzdrževanju knjižnice DNA na obvladljivi velikosti.

Zeleno obarvana kemija

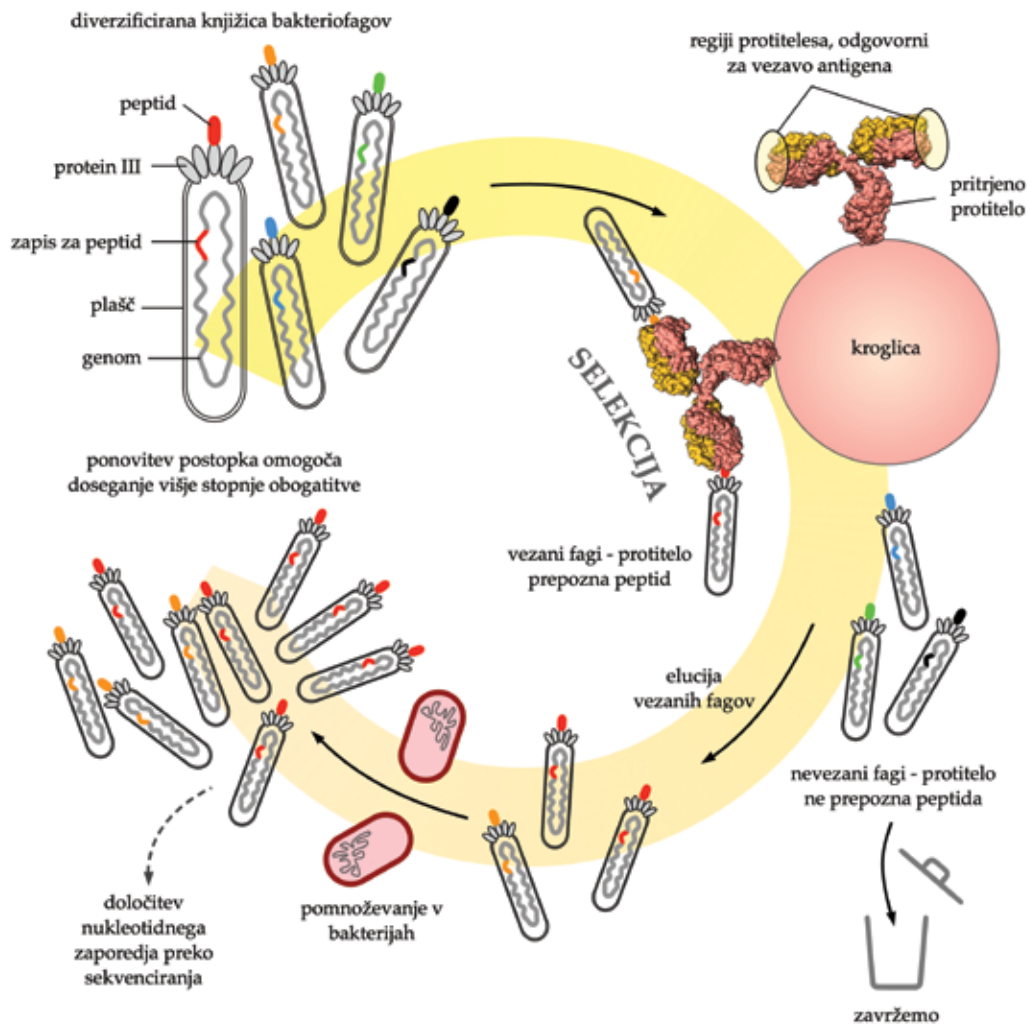
Po dokazu, da osnovni pristop deluje, se je profesorica Arnold s sodelavci na podoben način uspešno lotila sorodnih nalog, prav tako povezanih z izboljšanjem delovanja encimov v želenih razmerah, pa tudi z razvojem encimov, ki katalizirajo popolnoma drugačne reakcije kot izvorni encimi. Razvili so na primer različico citokroma P450, ki katalizira ciklopropanacijo stirena z etil-diazoacetatom, reakcije, ki v naravi z encimsko pomočjo sploh ne poteka, v običajni kemiji pa so zanje potrebne kompleksne spojine kot katalizatorji (primer so rutenijevi kompleksi s fosfinskimi ligandi). Spet drug primer je mutacija dveh bakterijskih encimov in s tem celotne biosintezne poti do te mere, da lahko tako spremenjena črevesna bakterija *Escherichia coli* iz nekaterih organskih odpadkov sintetizira 2-metilpropano-1-ol, ki je eden od kandidatov za biogoriva prihodnosti. Spremenjeni encimi omogočajo tudi učinkovito in okolju prijazno proizvodnjo zdravilnih učinkovin, pri teh procesih pa je pogosto pomembna visoka enantioselektivnost – in encimi so tu vsekakor zmagovalci. Morda velja omeniti še primer iz domačega okolja – veliko praškov, s katerimi peremo oblačila, vsebuje proteolitične enci-

me, ki pomagajo pri odstranjevanju proteinskih madežev, z evolucijskim pristopom pa so bili spremenjeni tako, da dobro delujejo pri višji temperaturi in vrednosti pH – takih, kot so v pralnem stroju.

Virusi kot orodje

Že pristop, ki ga je ubrala profesorica Arnold in njena ekipa, je genotip (zaporedje nukleotidov v genu) enoznačno povezoval s fenotipom (želeno lastnostjo proteina), **George P. Smith** pa je leta 1985 opisal tehnologijo, ki je omogočila izredno poenostavitve postopka izbora in hkrati odprla vrata do razvoja proteinov, ki močno vežejo neki drugi protein ali običajno kemijsko spojino – ta metoda se imenuje predstavitev na bakteriofagu.

Bakteriofagi, kratko fagi, so virusi, ki okužijo bakterije. Njihov dedni material je obdan s plaščem, ki ga sestavlja več proteinov, zakodiranih v virusnem genomu. Profesor Smith in njegova skupina je v gen za enega izmed proteinov plašča (protein III) vstavila zapis za kratek peptidni fragment, kar je omogočilo, da se je ta peptid izrazil na površini faga v obliki zlitega (fuzijskega) proteina s proteinom III. Tako so dosegli novo, enoznačno in izredno funkcionalno obliko povezave med genotipom in fenotipom, saj je fag, ki je na površini izražal neki peptid, vseboval zapis DNA za natančno ta peptid. Idejo so preizkusili na enostavnem primeru (slika 2) – kako iz množice peptidov poiškati tistega, ki ga prepozna neko protitelo? Pripravili so knjižnico fagov, ki so vsebovali zapise za diverzificirane oblike 57 aminokislinskih ostankov dolgega fragmenta proteina, proti kateremu so imeli že pripravljeno protitelo, in zmes fagov pomešali s temi protitelesi, pritrjenimi na drobne kroglice. Fagi s peptidom, pritrjenim na površino, ki ga prepozna protitelo, so se preko peptida vezali na kroglice, ostale pa so sprali in zavrgli. Vezane fage so eluirali s spremembo pH, pomnožili v bakterijah in postopek izbora ponovili. Že v prvem ciklu so dosegli



Slika 2: Osnovni koraki skupine profesorja Smitha od knjižnice raznolikih peptidov, predstavljenih na bakteriofagih, do izbora tistih peptidov, ki jih specifično prepozna neko protitelo. Pri tem bakteriofag predstavlja prenašalno DNA in hkrati neposredno povezavo med genotipom (zaporedjem nukleotidov) in fenotipom (aminokislinskim zaporedjem peptida). Zaradi jasnosti prvine slike niso v realnem velikostnem razmerju.

več kot tisočkratno obogatitev knjižnice fagov s peptidom, ki ga protitelo specifično prepozna, ponovljeni cikli pa so stopnjo obogatitve le še povečali. To je osnovni pristop, ki je kasneje omogočil identifikacijo epitopov, kratkih peptidnih segmentov, ki jih specifično prepoznajo protitelesa, pripravljena z imunizacijo miši.

Do protiteles brez imunizacije

Ekipa, ki jo je vodil **Gregory P. Winter**, je tehnologijo profesorja Smitha že leta 1990 obrnila na glavo. Njihova ideja je bila, da bi peptidni antigen, proti kateremu želijo protitelesa, namesto protiteles pritrtili na kroglice, sama protitelesa pa na površino fagov preko zlitja s proteinom III (slika 3). Pri tem zaradi kompleksne zgradbe niso upora-

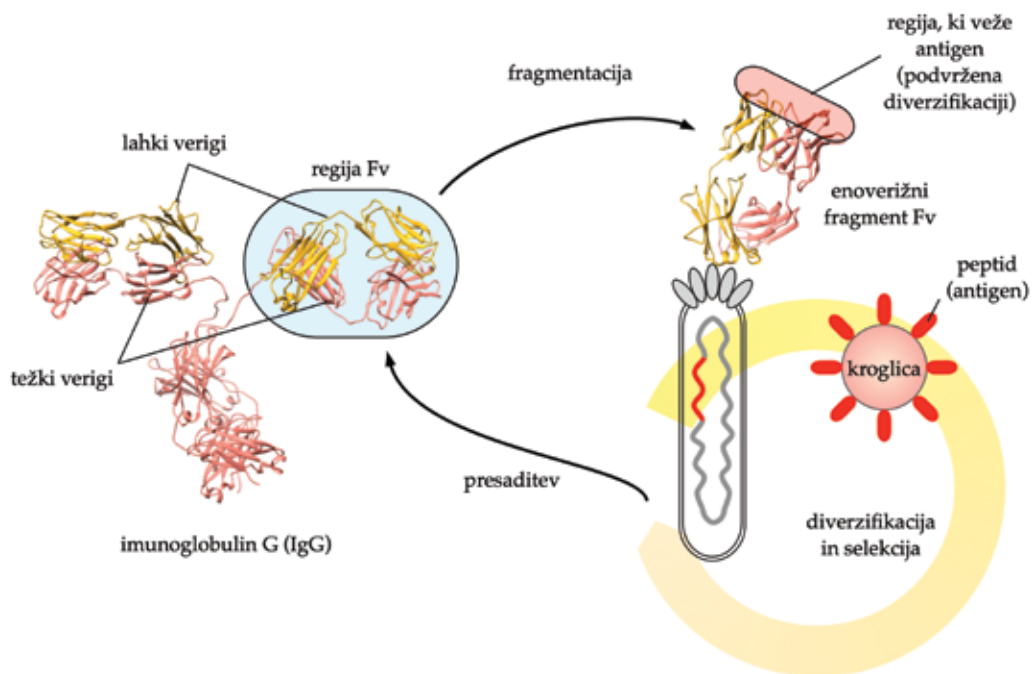
bili celotnih protiteles, ampak zgolj tiste regije, ki so odločilne za vezavo antigena. Na ta način so z uporabo kombinacijske knjižnice z diverzificiranimi zapisi za antigen-vezavne regije protiteles (tudi več kot 10^{14} variant zapisov!) in afinitetnim presejanjem uspeli pripraviti protitelesa, ki so specifično prepoznala HER2 (receptor za človeški rasti faktor 2), ta pa je izrednega kliničnega pomena zaradi vpletenosti v razvoj raka na dojki.

Kasneje so raziskovalne skupine po svetu razvile več različic tega osnovnega postopka, vsem pa je skupno to, da ni potrebe po imunizaciji živali, s tem pa se hkrati izognemo neželeni imunogenosti protiteles, pripravljenih v drugih organizmih - pri razvoju novih protiteles z evolucijskim pristopom namreč uporabljamo kot osnovno ogrodje človeške

imunoglobuline. Še več, zaradi več ciklov diverzifikacije in izbora je možno pripraviti protitelesa, ki antigen vežejo tudi do milijonkrat močnejše kot protitelesa, pripravljena z običajnim postopkom imunizacije, kar posledično omogoča uporabo manjših odmerkov terapevtskih protiteles in njihov enostavnejši vnos v telo.

Prvo uporabno terapevtsko protitelo, pripravljeno s postopkom predstavitve na fagu, je bilo protitelo proti faktorju tumorske nekroze, vpletenemu v razvoj revmatoidnega artritisa in nekaterih drugih (avto)imunskih bolezni. Protitelo veže in s tem nevtralizira omenjeni faktor ter posredno zmanjša imunski/vnetni odziv organizma. To protitelo, Adalimumab, je bilo za uporabo odobreno leta 2002, danes pa je v uporabi že več kot sto na podoben način pripravljenih protiteles

Slika 3: Skupina profesorja Winterja je uporabila obratni pristop kot profesor Smith - iskali so protitelo, ki specifično prepozna neki antigen, na primer peptid. Zaradi lažjega dela so pri diverzifikaciji uporabili le en del protiteles, ki vsebuje antigen-vezavno regijo, in ga po procesu diverzifikacije pripeli na protein virusnega plašča. Po končanem izboru je mogoče s sekvenciranjem določiti nukleotidno zaporedje zapisa za fragment Fv in to uporabiti za rekonstrukcijo zapisa DNA za celotno protitelo. Zaradi jasnosti prvine slike niso v realnem velikostnem razmerju.

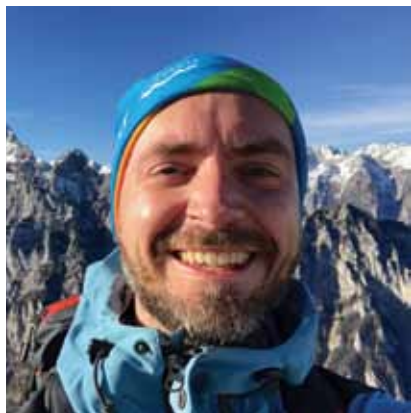


za zdravljenje raka, virusnih okužb in drugih bolezni.

Predstavitev na fagu seveda ni omejena na razvoj protiteles, saj lahko na podlagi tega pristopa pripravimo proteine, ne nujno protitelesa, ki vežejo poljubne druge proteine ali celo majhne kemijske spojine. Hkrati je osnovna ideja povezave genotip-fenotip dobila še več izvedenk, tako da poznamo predstavitev na bakterijah, ribosomu in kvasovkah, prav tako so izpopolnjene tudi metode diverzifikacije knjižnic DNA. S tem je človeštvo dobilo izjemno močno orodje, ki bo nedvomno izredno prispevalo k novim, učinkovitejšim načinom zdravljenja najrazličnejših bolezni in razvoju okolju prijaznejših tehnologij.

Literatura:

- Arnold, F. H., 2018: *Directed Evolution: Bringing New Chemistry to Life*. *Angewandte Chemie*, 57: 4143–4148.
- Chen, K., Arnold, F. H., 1991: *Enzyme engineering for nonaqueous solvents: Random mutagenesis to enhance activity of subtilisin E in polar organic media*. *Bio/Technology*, 9: 1073–1077.
- Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Johnson, K. S., Chiswell, D. J., Hudson, P., Winter, G., 1991: *Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains*. *Nucleic Acids Research*, 19: 4133–4137.
- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G., Chiswell, D. J., 1990: *Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains*. *Nature*, 348: 552–554.
- Scott, J. K., Smith, G. P., 1990: *Searching for peptide ligands with an epitope library*. *Science*, 249: 386–390.
- The Nobel Prize in Chemistry 2018, 2018. Dostopno na: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2018/>. Pridobljeno 7. oktobra 2018.



Miha Pavšič, doktor znanosti s področja biokemije in molekularne biologije, je asistent in predavatelj na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani. Raziskovalno se ukvarja z nekaterimi človeškimi zunajceličnimi in membranskimi proteini, pri tem pa se osredotoča na njihovo funkcijo, medproteinske interakcije in strukturo. V prostem času rad zahaja v gore, tudi kot vodnik Planinske zveze Slovenije, in kolesari.