

I. Rončević<sup>a,b\*</sup> i M. Močibob<sup>a</sup><sup>a</sup> Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilište u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb<sup>b</sup> Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Flemingovo nám. 2 16 610 Prague 6, Czech Republic

## Nobelova nagrada iz kemije za 2018. godinu: revolucija uz pomoć evolucije\*\*

Nobelovu nagradu iz kemije za 2018. godinu podijelilo je troje znanstvenika, što se ustalilo kao uobičajena praksa u posljednjih desetak godina. Polovicu nagrade dobila je **Frances H. Arnold** s *Caltecha* za usmjerenu evoluciju enzima, a drugu polovicu 9 milijuna švedskih kruna podijelili su **George P. Smith** (*University of Missouri Columbia*) i **Sir Gregory P. Winter** (*Cambridge*), za tehniku prikaza peptida na površini faga (*phage display*).

Zajedničko ovogodišnjim dobitnicima je **primjena tehnika koje oponašaju evoluciju** za razvoj proteina koji su rezultirali novim lijekovima, ali industrijski bitnim spojevima kao što su biogoriva.

### Proteinsko inženjerstvo

Proteini su specijalizirani molekularni strojevi koji obavljaju mnoge poslove u organizmima svih živih bića – od transporta molekula u stanicu (proteinske pumpe), prevođenja i replikacije DNA, do katalize raznih kemijskih reakcija (enzimi) te brojnih drugih zadaća. Upute za sastavljanje proteina zavemo genima.<sup>1</sup> Proučavanje i modificiranje (inženjerstvo) proteina vrlo je komplicirano – njihova struktura produkt je milijuna godina evolucije, a gradivni blokovi genskih uputa (parovi dušičnih baza u DNA ili RNA) i samih proteina (aminokiseline) vrlo su različiti. Jedna od glavnih preokupacija proteinske biokemije jest proučavanje rada proteina kroz istraživanje odnosa između njihove strukture i funkcije. Fundamentalno razumijevanje prirodnih sila i zakona koji određuju strukturu proteina i mehanizama enzimske katalize u konačnici bi nam omogućio – ili doživjelo svoju konačnu potvrdu racionalnim (ciljanim) dizajnom bioloških makromolekula željenih svojstava ili katalitičke aktivnosti. I dok područje strukturne biologije i proteinske kristalografije nastavlja strahovit napredak (do danas je poznato preko 150 000 struktura makromolekula,<sup>2</sup> a trenutačno revoluciju predvodi krio-elektronska mikroskopija za koju je 2017. godine dodijeljena Nobelova nagrada za kemiju), a metode računalne kemije omogućavaju *in silico* modeliranje molekulske dinamike proteina i razumijevanje reakcijskih mehanizama enzima, **ciljani dizajn enzima željenih svojstava ili katalitičke aktivnosti još uvijek je izvan našeg domašaja**. Predvidjeti koje aminokiseline zamijeniti u postojećem proteinu da bismo dobili nova, drugačija svojstva najčešće završava neuspjehom, jer je čak i uz današnje računalne resurse nemoguće istražiti sve kombinacije potencijalnih zamjena i predvidjeti složene utjecaje dugog dosegaja koje pojedine zamjene aminokiselina mogu imati na konformaciju proteina.



Slika 1 – Dobitnici Nobelove nagrade za kemiju 2018.: George P. Smith, Frances H. Arnold i Sir Gregory P. Winter

Umjesto racionalnog dizajna biokatalizatora željenih svojstava, ovogodišnja dobitnica Nobelove nagrade Frances H. Arnold odlučila se **na radikalno drugačiji pristup: unošenje slučajnih, nasumičnih mutacija u proteine** te takvo generiranje velikog broja njihovih varijanti sa slučajnim zamjenama aminokiselina, nakon čega slijedi probir onih varijanti koje pokazuju željena svojstva. Nakon probira novih, unaprijeđenih varijanti enzima, cijeli postupak se ponavlja, kroz nekoliko rundi, s ciljem daljnjeg “poboljšanja” ili optimizacije nove varijante proteina. Postupak je nadahnut i oponaša prirodnu evoluciju, ali budući da eksperimentator usmjerava proces prema željenom cilju ili svojstvu, nazivamo ga **usmjerenom evolucijom** proteina. Potvrda koncepta usmjerene evolucije proteina bio je dizajn enzima – proteaze subtilizina koji je bio 256 puta katalitički aktivniji u polarnom organskom otapalu od svoje prirodne varijante.<sup>3</sup>

Na upuštanje u takvo područje, s obećanjima dizajna “proteina boljih od prirode”, u početku se gledalo s podsmijehom. Ovako Frances Arnold, u intervjuu iz 2014., opisuje svoj početak rada u području proteinskog inženjerstva: “Prije dvadeset pet godina, to je bilo na rubu znanosti. Znanstvenici to nisu radili. Gospoda to nisu radila. Ali ja sam inženjerka, i nisam gospodin, pa nisam imala problema s tim.”

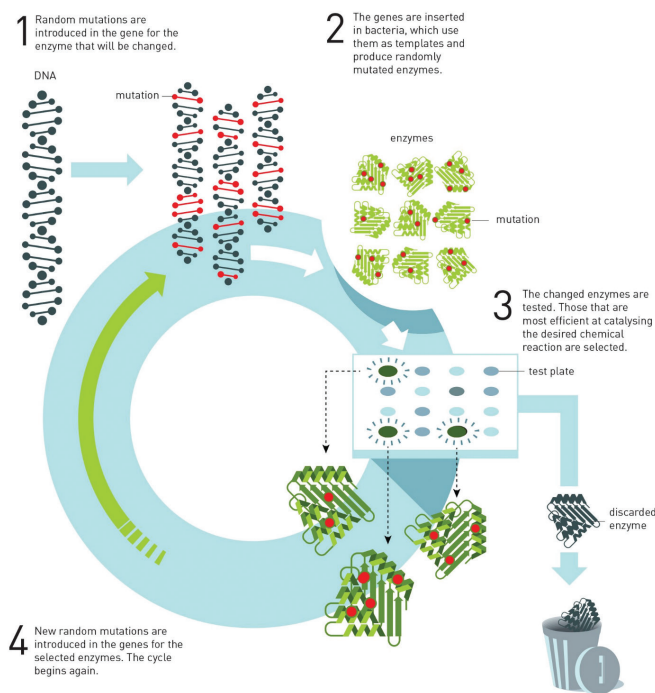
No to ne znači da su dostignuća Frances Arnold i postupak usmjerene evolucije enzima odbacili ili obezvrijedili dotadašnja dostignuća s područja strukturne biologije i biokemije i razumijevanja proteinskih struktura. Upravo suprotno; proces je vođen pažljivim odabirom polaznog enzima, pogodne strukture i svojstva, u svakom svojem segmentu je informiran i vođen dosadašnjim spoznajama u odabirom dijelova enzima koji će biti mutirani i sl., jer je nemoguće pretražiti, odnosno ispermutirati sve moguće položaje i kombinacije aminokiselina. Obje discipline zapravo profitiraju od svojeg međudnosa i informacija o odnosu strukture i svojstava koje dobivaju od druge discipline, te se međusobno nadopunjuju.

\* Autor za dopisivanje: dr. sc. Igor Rončević, e-pošta: [ironcevic@chem.pmf.hr](mailto:ironcevic@chem.pmf.hr)

\*\* Tekst je prethodno objavljen u kraćem obliku na portalu [ideje.hr](http://ideje.hr), gdje je dostupan na poveznici: <http://ideje.hr/oponasanje-evolucije-ja-sam-inzenjerka-nisam-gospodin-i-nisam-imala-problema-s-istrazivanjem-na-rubu-znanosti-rekla-je-arnold/>

Pomoću tehnike usmjerene evolucije enzima čiji je F. Arnold pionir, možemo doći do efikasnijih enzima (koji, na primjer, brže proizvode biogoriva) ili promijeniti njihovu funkciju, čineći ih otpornijima na inhibitore (otrove) ili promijeniti raspon njihovog djelovanja na veći ili mali broj supstrata (smanjujući neželjene nuspojave). Ipak, najfascinantnije dostignuće usmjerene evolucije proteina je dizajn biokatalizatora za enzimske reakcije koje se ne odvijaju u prirodi. Takva je na primjer ciklopropanacija, odnosno adicija karbena na dvostruku vezu uz nastajanje napetog tročlanog ugljikova prstena,<sup>4</sup> pri blagim uvjetima i uz visoku stereo- i enantiomernu specifičnost karakterističnu za biokatalizatore, što ih čini vrlo atraktivnima npr. u farmaceutskoj industriji. Postoje još brojni drugi primjeri kemijskih transformacija koji se u prirodi ne dešavaju, a za koje su usmjerenom evolucijom dobiveni odgovarajući biokatalizatori.<sup>5</sup> Trik u pozadini razvoja tako neobičnih enzima za reakcije koje se ne dešavaju u prirodi, u biološkim sustavima, jest da su prirodni enzimi često promiskuitetni – pored svoje prirodne reakcije, vrlo često posjeduju i slabu, rudimentarnu, gotovo kriptičnu aktivnost koja se mutacijama i selekcijom može poboljšati i razviti u sasvim novi biokatalizator. Tu također vidimo sličnosti s prirodnom evolucijom: evolucija vrlo rijetko inovira sasvim nova rješenja, već mnogo češće postojeće komponente prenamjenjuje i prilagođava novim zadaćama.

Tehnika usmjerene evolucije enzima, prikazana na slici 2, temelji se na (1.) unošenju nasumičnih mutacija na genu koji se želi promijeniti. Zatim se tako mutirani geni ubacuju u "tvornice" (bakterije), koje produciraju velike količine različitih varijanti enzima (2.). Ti enzimi se zatim testiraju (3.) kako bi se ustanovilo koja mutacija rezultira u traženim performansama – većina završava u smeću, a najefikasnije varijante vraćaju se na daljnje usavršavanje (4.).



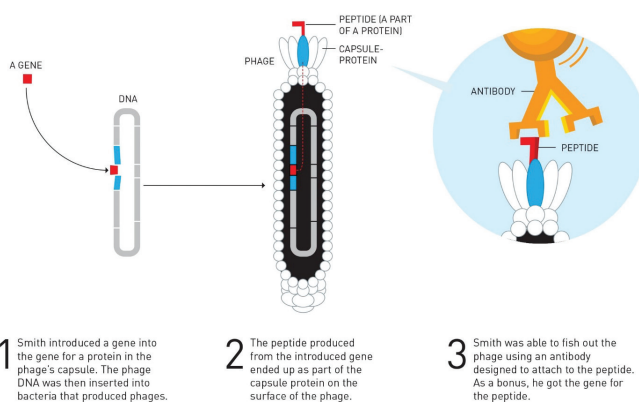
© Johan Jarnestad/The Royal Swedish Academy of Sciences

Slika 2 – Tehnika usmjerene evolucije enzima (Frances Arnold)

## Prikaz na površini faga (*phage display*)

Ono što je Frances Arnold napravila za razvoj novih enzima usmjerenom evolucijom, George P. Smith i Sir Gregory P. Win-

ter napravili su za selekciju proteina s visokim afinitetom vezanja za željenu metu pomoću tehnike prikaza na površini faga (eng. *phage display*). Bakteriofagi su virusi koji napadaju (grč. φαγεῖν, proždirati) bakterije, a tradicionalno su zanimljivi kao alternativa antibioticima. Osnovni dio njihove strukture je proteinska "glava" unutar koje se nalazi njihov relativno skroman genetski materijal. George P. Smith 1985. imao je genijalnu ideju – ubaciti nešto novog genetskog materijala u fag (1.) i vidjeti kako će se to odraziti na strukturu glave. U tome je i uspio: peptid kodiran ubačenim genetskim materijalom fag je ponosno prikazao na svojoj glavi (2.), kao perjanicu na kacigi. Tako je nastala tehnika modifikacije ovojnice faga, odnosno prikaza (peptida) na površini faga. To je omogućilo testiranje velikog broja peptida izloženih na površini faga za vezanje na imobilizirano antitijelo (3.), te povezivanje fenotipa (peptid s visokim afinitetom vezanja) i genotipa (slijed DNA ubačen u genom faga koji taj peptid kodira) – "pecajući" bakteriofage imobiliziranim antitijelom. Time je razvijen sustav koji je omogućio probir peptida koji će se s visokim afinitetom vezati na ciljanog partnera (antitijelo), te analizu i karakterizaciju što je tim peptidima zajedničko, odnosno određivanje determinanti zaslužnih za visoki afinitet vezanja (slika 3).

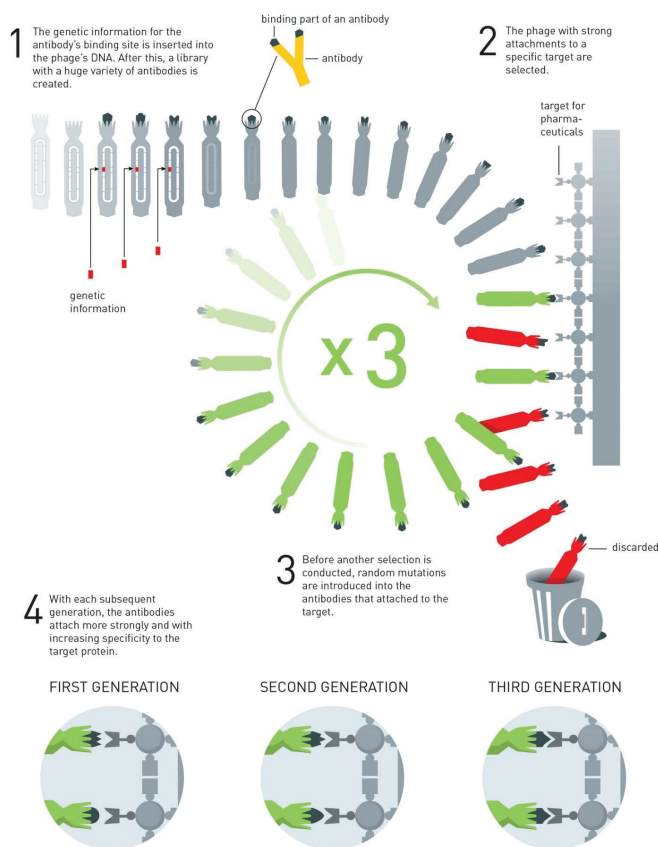


© Johan Jarnestad/The Royal Swedish Academy of Sciences

Slika 3 – Tehnika prikaza peptida na površini faga (George P. Smith)

U raspravama o znanstvenim istraživanjima često se postavlja pitanje konkretne primjene rezultata nekog istraživanja. Istina je da velika većina rezultata nema izravnu (široku) primjenu, već služi tek kao međukorak u idućim istraživanjima. Tako je Sir Gregory Winter iskoristio ova dva prethodno opisana gradivna bloka – usmjerenu evoluciju enzima i modifikaciju ovojnice faga – kako bi dizajnirao nova antitijela.

Tehnika Sir Wintera (slika 4) počinje ubacivanjem gena za antitijelo<sup>6</sup> u DNA faga (1.). Budući da sada fag sastavlja antitijelo prema ubačenoj instrukciji, moguće je isprobati čitav niz različitih antitijela, odnosno sastaviti čitavu zbirku različitih antitijela. Zatim, testira se djelotvornost vezanja antitijela na ciljnu (makro) molekulu vezanu na pogodni nosač (2.), nakon čega slijedi probir onih s najvećim afinitetom vezanja. Visoka specifičnost antitijela prema ciljanoj meti omogućuje "pametno" djelovanje antitijela – na primjer, osigurava njihovo vezanje na tumorske stanice, ali i ignoriranje normalnih stanica. Zatim u priču ulazi usmjerena evolucija (3.) – antitijela se tehnikom Frances Arnold poboljšavaju tako da im se povećava afinitet za ciljanog partnera, ali i specifičnost vezanja (4.). Velika prednost te metode je što omogućuje razvoj novih, terapijskih, antitijela bez imunizacije laboratorijskih životinja i olakšava njihovu daljnju optimizaciju.



**Slika 4** – Primjena usmjerene evolucije u razvoju novih antitijela (Sir Gregory P. Winter)

Primjenom te tehnike u posljednjih petnaestak godina **razvijena su protutijela za borbu protiv artritisa, lupusa i raznih vrsta karcinoma**, koja danas nalaze široku primjenu.<sup>7</sup> Jednu od prvih uspješnih primjena takvih monoklonskih antitijela (nastalih kloniranjem iz najuspješnijeg kandidata) Sir Winter je komentirao ovako: “(razgovor s pacijenticom)... natjerao me na razmišljanje: Ta žena nije mogla učiniti ništa oko svoje bolesti. Međutim, kao znanstvenik, ja jesam mogao učiniti nešto – napraviti razliku.”<sup>8</sup>

George Smith za Associated Press ovako je komentirao vijest da je dobio nagradu: “Vrlo je mali broj velikih znanstvenih otkrića nov. Praktički sva nastaju tek nadgradnjom na prethodna istraživanja. To (dobivanje nagrade, op.a.) je slučajnost (*happenstance*). Tako je bilo i s mojim radom. Moja ideja je pripadala liniji istraživanja koja se gradila vrlo prirodno na drugim, prethodnim istraživanjima.”

Za kraj, važno je istaknuti kako su ta otkrića kulminacija brojnih uspješnih, ali i manje uspješnih znanstvenih projekata i radova u kojima su sudjelovale stotine, ako ne i tisuće znanstvenika i liječnika. Oni su mapirali put, pronašli tjesnace koje valja istraživati i hridine kojih se treba kloniti, te na taj način omogućili tim nobelovcima da uz izvrsne ekipe, mnogo truda i malo sreće pronađu luku sa (švedskim) blagom.

## Literatura

- Ovo je pomalo pojednostavljeno; trenutna definicija gena je “segment DNA koji doprinosi fenotipu/funkciji” ili “osnovna fizička i funkcionalna jedinica nasljeđivanja”. Dakle, neki geni kodiraju proteine, a neki ne.
- <https://www.wwpdb.org/stats/deposition> (28. 10. 2018.).
- K. Chen, F. H. Arnold, Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90** (1993) 5618–5622, doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.90.12.5618>.
- O. F. Brandenburg, R. Fasan, F. H. Arnold, Exploiting and engineering hemoproteins for abiological carbene and nitrene transfer reactions, *Curr. Opin. Biotechnol.* **47** (2017) 102–111, doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.06.005>.
- R. K. Zhang, X. Huang, F. H. Arnold, Selective CH bond functionalization with engineered heme proteins: new tools to generate complexity, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **49** (2019) 67–75, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.10.004>.
- Točnije, ubacuje se samo fragment antitijela koji prepoznaje i veže se na antigen – ciljanu metu.
- Recentan pregled protutijela razvijenih tehnikom *phage display* čitatelj može pronaći u članku *Designing Human Antibodies by Phage Display*, čiji je puni tekst dostupan na poveznici: <https://www.karger.com/Article/FullText/479633>.
- Cijeli intervju dostupan je na poveznici: [https://www.youtube.com/watch?time\\_continue=81&v=QHzN19X5sk4](https://www.youtube.com/watch?time_continue=81&v=QHzN19X5sk4).



## USPJEH STUDENATA FKIT-a NA NATJECANJU PRINTCR3DIT Challenge 2018

**Dorotea Marčec**, preddiplomski studij KIM, **Marko Rukavina**, diplomski studij PK i **Marija Lukić**, asistentica FKIT-a sudjelovali su na natjecanju *PRINTCR3DIT Challenge 2018* u sklopu H2020 projekta *PRINTCR3DIT – Process Intensification through Adaptable Catalytic Reactors made by 3D Printing*.

Osvajali su 1. mjesto za milireaktor s prizmatičnim statičkim miješalima izrađen na 3D

pisaču u kojem je provedena sinteza dibenzilacetona.

Stručni žiri činile su renomirane tvrtke (ACM, Arkema, Biosynthis, Yara...), a kordiniator projekta H2020 je SINTEF, istraživački institut iz Norveške.

Certifikat im je uručen 20. rujna 2018. u Langesundu, Norveška, a kao nagradu osvojili su i 3D pisač.