



Immunotechnologia enzymów i przeciwciał

Barbara Wróblewska, Henryk Kostyra

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polska Akademia Nauk, Olsztyn

Immunotechnology of enzymes and antibodies

Summary

In this article, the special catalytic proteins-called abzymes and synzymes are presented. Abzymes are defined as antibodies with catalytic properties. Similarly, synzymes are semisynthetic amino acid copolymers, also having catalytic properties. The production of these two kinds of catalytic proteins is different. Abzymes are made by the immunological methods using specific organic haptens. Synzymes can be the products of, among others, mutagenesis and are produced by genetic engineering. It has been also suggested that the products of synzym hydrolysis could be a source of haptens for the production of abzymes. In conclusion it was stated that a new specialization in biotechnology could emerge. We called it "immunotechnology". To these two groups of immuno-products the plastic antibodies, which are the molecular imprinting of determinants of the natural antibodies on polymer template, can be added. So, they are completely synthetic products. They are characterised by strong chemical and physical stability under drastic environmental conditions.

Key words:

immunotechnology, synzymes, abzymes, plastic antibodies.

Adres do korespondencji

Barbara Wróblewska,
Instytut Rozrodu Zwierząt
i Badań Żywności,
Polska Akademia Nauk,
ul. Tuwima 10,
10-747 Olsztyn;
e-mail:
Barbara.Wroblewska@pan.
olsztyn.pl

1. Wprowadzenie

Przenikanie się świata naturalnych zjawisk biologicznych z syntetycznie skonstruowanymi ich odwzorowaniami prowokuje do zaproponowania nowej terminologii. Do takiej na pewno należy tytuł tego artykułu, chociaż propozycja nie jest pozbawiona niepokoju. Żyjemy w epoce intensywnego rozwoju inżynierii materiałowej i genetycznej oraz technologii sięgającej ma-

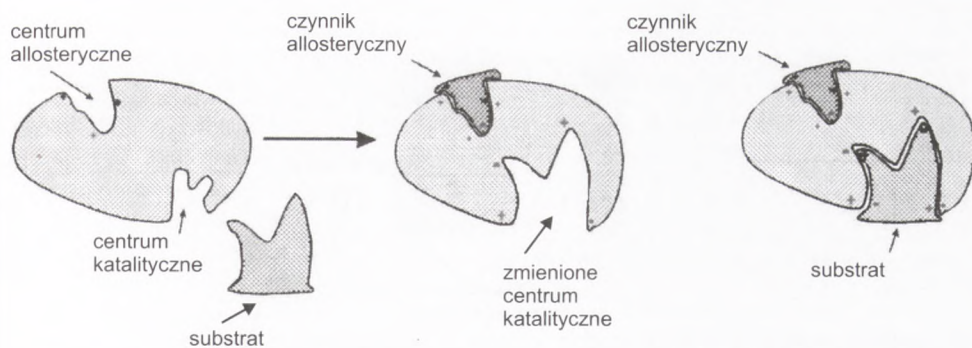
nipulacji atomami (nanotechnologia) (1). Ten postęp jest niezwykle obiecujący dla rozwoju biotechnologii i wybranych działów technologii chemicznej. Efektywność tego postępu jest w głównej mierze determinowana rozwojem enzymologii. Jeszcze do niedawna źródłem enzymów były surowce roślinne i zwierzęce, a wyodrębnione z nich enzymy stosowano wyłącznie w roztworach. W ostatnim dziesięcioleciu dokonął się duży postęp w wykorzystaniu enzymów w produkcji żywności, środków piorących, leków, dzięki opanowaniu techniki unieruchamiania (immobilizacji) enzymów na nośnikach stałych. Dalszy postęp w technologii enzymów zmierzający do stosowania reaktorów enzymatycznych z układami wieloenzymowymi podobnymi do układów występujących w organizmach żywych, skłania do zwrócenia większej uwagi na zjawisko mechanochemii enzymatycznej (2).

Zmiany drugo-, trzecio- i czwartorzędowej struktury cząsteczki enzymu, polegają na przemieszczaniu się w przestrzeni, czyli na ruchu mechanicznym grup atomów, wchodzących w skład tej cząsteczki. Wykonywana jest przy tym praca mechaniczna, źródłem której jest energia swobodna, wydzielana podczas reakcji enzymatycznej, która może być wykorzystana dla chemicznego przekształcania substratu w reakcji enzymatycznej. Takie podejście do przebiegu reakcji enzymatycznej zachodzącej w roztworze nie wnosi nowych danych do głębszego poznania jej mechanizmu. Jednakże, gdy cząsteczki enzymu wchodzą w skład makroskopowej struktury komórki, to może ona wykonywać ruch mechaniczny dzięki swobodnej energii chemicznej uwalnianej podczas reakcji enzymatycznej. Oznacza to, że w strukturach organizmu żywego, w których zachodzą procesy mechanochemiczne muszą być obecne enzymy. Trudno jest przecenić rolę błony biologicznej w funkcji życiowej komórki, dlatego warto się tym przykładem posłużyć dla zilustrowania procesu mechanochemii enzymatycznej. Efektywne funkcjonowanie mitochondriów zależy od przenikalności ich błony, która zależy od jej zdolności kurczenia się i rozciągania. Źródłem energii dla tego procesu jest ATP. Uwolnienie energii z ATP wymaga obecności w błonie mitochondrialnej enzymu, ATP-azy, zdolnego uwolnić z niego energię. Ponieważ wszystkie błony biologiczne ulegają procesom kurczenia się i rozciągania, to powinny one zawierać w swej budowie jednakowy zestaw podstawowych białek, a w szczególności białek kurczliwych. Pełniejsze poznanie struktur i mechanizmów funkcjonowania enzymów błon komórkowych pozwoli na konstrukcję efektywniejszych reaktorów enzymatycznych. Z kolei możliwość zastosowania inżynierii genetycznej do modyfikacji właściwości enzymów daje szansę opracowania nowych niskoenergetycznych technologii produkcji żywności, leków, środków higienicznych i biodegradowalnych opakowań spełniających wymagania bezpieczeństwa ekosystemowego.

2. Abzyny – przeciwciała katalityczne

Abzyny są oryginalnym tworem myśli ludzkiej, do produkcji których wykorzystano reakcję immunologiczną, będącą źródłem immunoglobulin (3,4). Abzyny, podobnie jak enzymy, mają zdolność stabilizacji stanu przejściowego reakcji, obniżają jej energię aktywacji i przyspieszają ją nawet do miliona razy (13). W organizmie żywym zadaniem przeciwciał jest specyficzna neutralizacja antygenów infekcyjnych (bakterii, wirusów, pasożytów) wnikających do wnętrza organizmu zwierzęcia, człowieka. Reakcja przeciwciała-antygen nie należy do reakcji enzymatycznych. Biorą w niej udział siły elektrostatyczne, wiązania wodorowe, oddziaływania hydrofobowe oraz siły van der Waalsa. Wiadomo, że kataliza enzymatyczna opiera się na łączeniu enzymu z substratem, ale jej efektem jest obniżenie energii aktywacji reakcji ułatwiającej powstanie produktu. Różnica pomiędzy enzymem i przeciwciałem polega na tym, że enzym łatwiej wiąże się z substratem, będącym w stanie wysokoenergetycznym, podczas gdy przeciwciało wiąże się z substratami niskoenergetycznymi. Powodem tego jest prawdopodobnie fakt, że w cząsteczkach białek będącymi antygenami można wyróżnić dwa typy determinantów antygenowych: sekwencyjne, tj. określone liniową sekwencją aminokwasową oraz konformacyjne, zależne od struktury przestrzennej białka. Możliwe jest jednak otrzymanie przeciwciała o właściwościach enzymatycznych – abzynu dla każdej reakcji chemicznej, nawet nie zachodzącej w organizmie żywym. Wystarczającym warunkiem jest otrzymanie haptenu o budowie chemicznej zbliżonej do budowy jednego z wysokoenergetycznych stanów przejściowych reakcji. Hapteny są to niepełnowartościowe antygeny, a zatem substancje chemiczne same nie mające właściwości immunogennych, ale używające tę właściwość po związaniu się z cząsteczką nośnikową, np. białkiem czy inną substancją wielkocząsteczkową, np. polisacharydy.

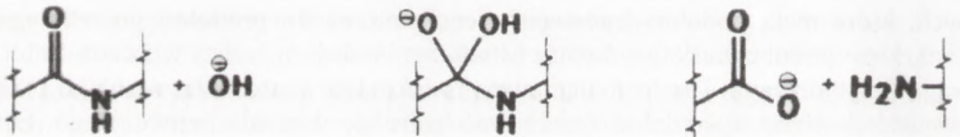
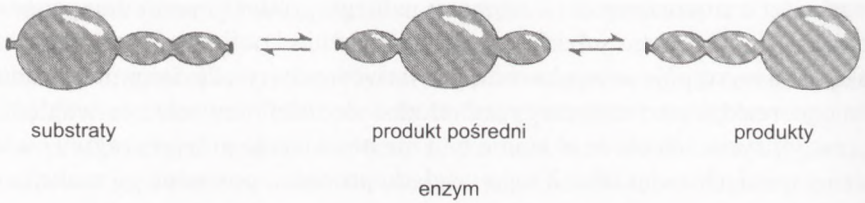
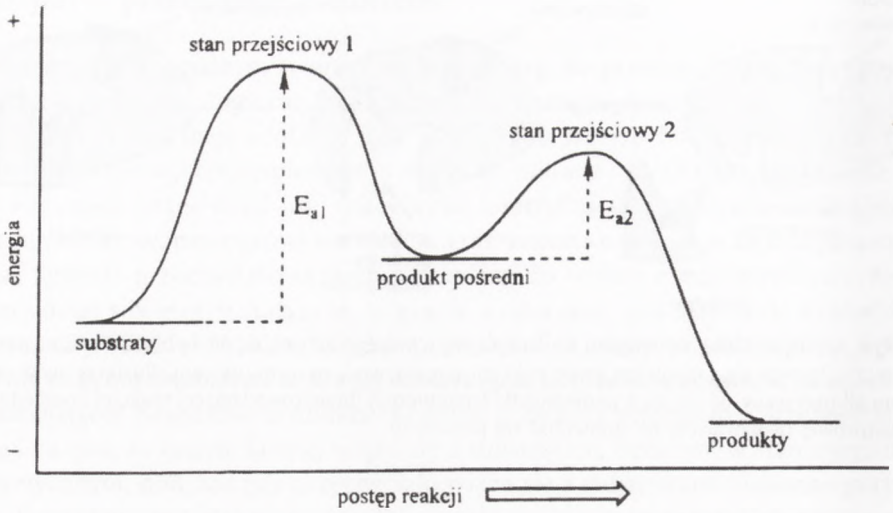
Z badań katalizy enzymatycznej wynika, że najlepszymi katalizatorami są te, których budowa przestrzenna i efektorowa jest komplementarna do stanów przejściowych reakcji. Mówiąc o budowie efektorowej enzymu trzeba pamiętać, że aktywność niektórych enzymów jest modyfikowana przez centra allosteryczne, do których mogą przyłączać się efekторы allosteryczne zmieniając efektywność działania centrum aktywnego. Efektorami allosterycznymi mogą być związki drobnocząsteczkowe, których specyficzne, niekowalencyjne wiązanie z białkiem (enzymem) wywołuje, jak wspomniano, zmianę aktywności tego białka, określaną jako efekt allosteryczny (rys. 1). Tak zatem dobry katalizator stabilizuje wysokoenergetyczne stany reakcji. Wytworzenie przeciwciała zdolnego rozpoznać stan przejściowy wybranej reakcji powinno zatem doprowadzić do otrzymania jej białkowego katalizatora. Dlatego też najtrudniejszym etapem konstrukcji takiego katalizatora jest zdefiniowanie budowy chemicznej cząsteczki w stanie przejściowym reakcji chemicznej.



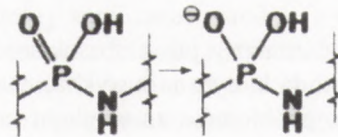
Rys. 1. Schemat budowy enzymu allosterycznego, którego aktywność może być zmieniona poprzez cząsteczkę łączącą się z miejscem innym niż centrum aktywne, zwanym centrum allosterycznym; często enzym allosteryczny składa się z podjednostki katalitycznej (przeprowadzającej reakcję) i podjednostki regulatorowej (wpływającej na sprawność tej pierwszej).

Przykładem ilustrującym relację między enzymem a abzymem może być reakcja hydrolizy wiązania amidowego (peptydowego). Reakcja hydrolizy wiązania amidowego zachodzi z utworzeniem co najmniej jednego produktu pośredniego, w którym atom węgla biorącego udział w reakcji przyjmuje konfigurację tetraedryczną, czyli taką, jaka występuje w węglowodorach nasyconych (rys. 2). Struktura produktu pośredniego reakcji enzymatycznej jest trudna do zdefiniowania, ze względu na krótki czas jej życia i na to, że w stanie tym nie obowiązują przyjęte reguły budowy chemicznej trwałych związków. Z tego względu produktu pośredniego reakcji enzymatycznej nie można wyodrębnić. Można natomiast poszukiwać związków chemicznych, które mają podobną budowę stereochemiczną do produktu pośredniego. Związkiem podobnym do produktu pośredniego reakcji hydrolizy wiązania amidowego (peptydowego) jest fosfonian, a wyprodukowane w stosunku do niego przeciwciało powinno być zdolne katalizować hydrolizę wiązania peptydowego, tzn. mieć właściwości abzymu. Fosfonian może pełnić dwie funkcje. W produkcji przeciwciała katalitycznego – abzymu pełni rolę haptenu, czyli niepełnego antygeny, uzyskującego właściwości immunogenne dopiero po połączeniu z nośnikiem, którym może być, np. cząsteczka białka (rys. 3), także może pełnić rolę inhibitora reakcji enzymatycznej, w której wyprodukowany z jego udziałem abzym katalizuje daną reakcję (5).

Przeciwciała katalityczne znalazły już zastosowanie w badaniach dotyczących oznaczania kokainy (6). Metoda klasyczna z wykorzystaniem reakcji receptor-antagonista sprawiała mnóstwo problemów ze względu na łatwość uzależnienia, czy przedawkowania podczas badań *in vivo* ze zwierzętami. By zapobiec temu zjawisku należało wprowadzić do organizmu substancję zdolną wiązać się z kokainą i ją degradować, by nie dopuścić do przedostawania się jej do centralnego układu nerwowego. W celu otrzymania abzymu o odpowiednich właściwościach wykorzystano



abzym



Rys. 2. Porównanie enzymatycznej hydrolizy wiązania peptydowego za pomocą enzymu i abzymu.

fosfonian + albumina = kompleks immunoreaktywny
(hapten) + (białko)



szczępienie



przeciwciało – abzym

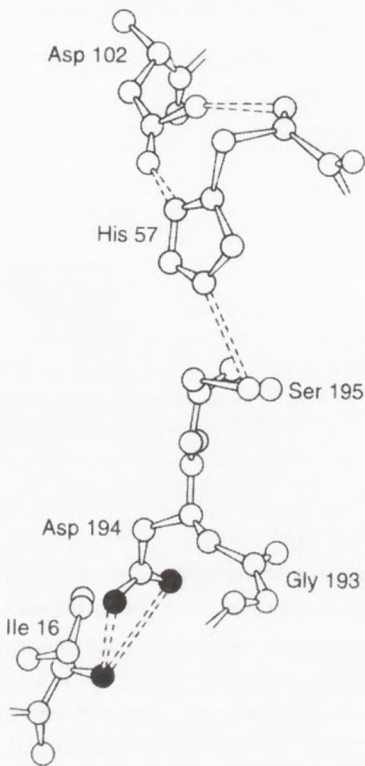
Rys. 3. Schemat postępowania w immunologicznej metodzie otrzymywania abzymu.

technikę produkcji enzymu z wybranych fragmentów łańcucha polipeptydowego przeciwciał, wyprodukowanych wobec różnych antegenów. Najpierw zsyntetyzowano analogii hydrolizatów kokainy oraz ich benzoilowych estrów, którymi zaimmunizowano myszy i uzyskano przeciwciała. Następnie z ich fragmentów skonstruowano abzym posiadający właściwości wiązania się z kokainą i jej degradowania do nietoksycznych produktów. Ten przykład dowodzi, że abzymy będą coraz częściej wykorzystywane w badaniach biologicznych, oceny wartości żywieniowej produktów spożywczych i in.

3. Synzymy – enzymy semisyntetyczne

Już pół wieku temu stwierdzono, że kopolimery aminokwasowe o przypadkowej sekwencji wykazują aktywność katalityczną, a nawet stereospecyficzność w reakcjach hydrolizy estrów i amidów (4,5). Synteza peptydów zawierających leżące blisko siebie aminokwasy, których łańcuchy boczne są istotne dla procesu katalizy, stanowi racjonalne rozwinięcie tej obserwacji. Wiadomo, że wśród enzymów proteolitycznych występuje kilka grup o zróżnicowanej budowie centrum katalitycznego, a zatem i o odmiennym mechanizmie działania. Najbardziej rozpowszechniona jest grupa enzymów serynowych, do których należą m.in. enzymy soku trzustkowego: trypsyna i chymotrypsyna. Enzymy te zawierają w centrum katalitycznym serynę (często zestryfikowaną przez fosforan) oraz histydynę, jako dawcę ładunku dodatniego (rys. 4).

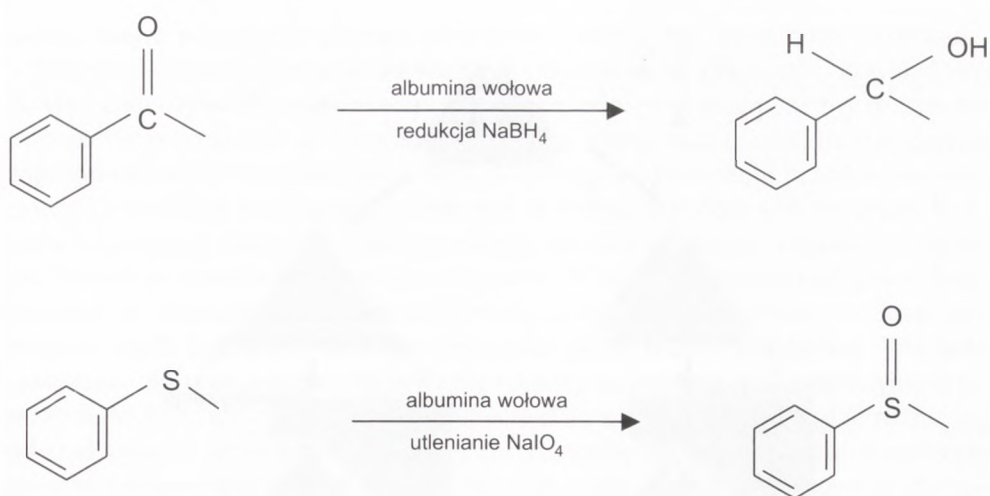
Umieszczając zatem w jednym łańcuchu peptydowym reszty seryny, histydyny i kwasu asparaginowego, można oczekiwać, że otrzymany oligopeptyd zachowa pewne cechy charakterystyczne dla chymotrypsyny i będzie katalizatorem hydrolizy wiązań estrowych i amidowych. W przeprowadzonych badaniach kinetycznych wy-



Rys. 4. Otoczenie asparagianu 194 i izoleucyny 16 w chymotrypsynie (motyw zaczerpnięto z (14)).

kazano, że hydroliza octanu p-nitrofenylowego w obecności pentapeptydu spełniającego te warunki zachodzi 25 razy szybciej niż hydroliza tego estru w obecności imidazolu. Również cząsteczki białek są zdolne katalizować nietypowe reakcje chemiczne. Przykładem mogą być reakcje utleniania i redukcji katalizowane przez albuminę. Rola katalityczna albuminy w tych reakcjach polega na wiązaniu substratów i wytworzeniu chiralnego mikrośrodowiska, co powoduje, że reakcja zachodzi stereospecyficznie. Albumina pełni w tym przypadku rolę chiralnego rozpuszczalnika (rys. 5).

Synzymy można produkować wykorzystując technikę ukierunkowanej mutagenyzy lub chemiczną modyfikację białka. Aby zastosować ukierunkowaną mutagenezę do modyfikacji enzymu, konieczna jest znajomość fragmentu DNA kodującego dany enzym. Następnie wykorzystując techniki inżynierii genetycznej można wymienić aminokwas w centrum aktywnym enzymu. Okazało się, że niewielka zmiana w budowie enzymu powoduje zasadnicze zmiany jego właściwości katalitycznych. Na przykład zastąpienie, znajdującej się w centrum aktywnym nukleazy ze *Staphylococcus*, kwasu glutaminowego kwasem asparaginianowym powoduje 1300-krotny spadek aktywności tego enzymu. Specyficzność substratową enzymu można regulo-

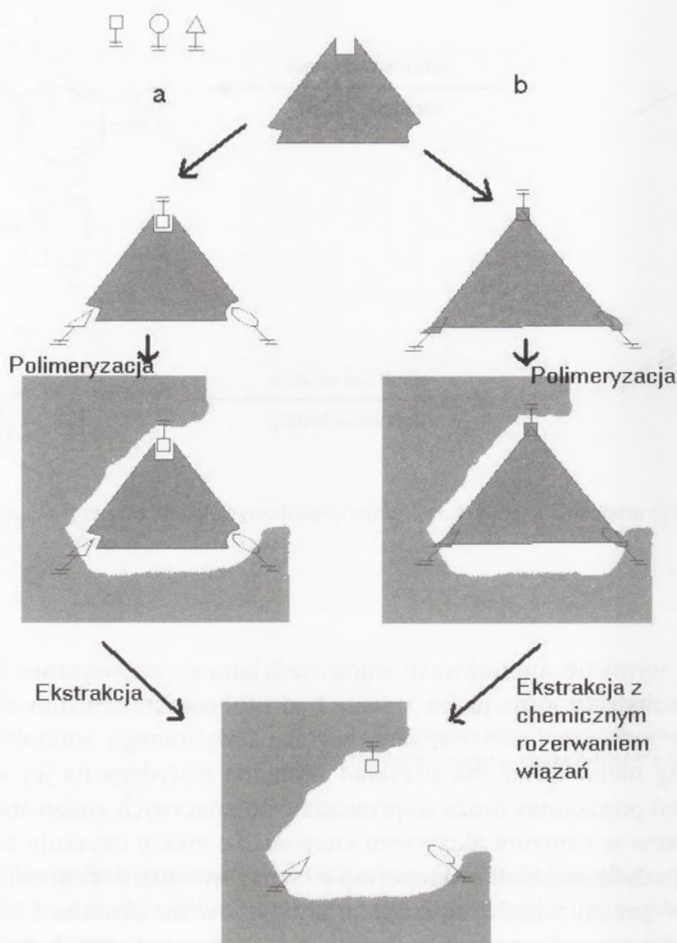


Rys. 5. Reakcja utleniania i redukcji związków organicznych katalizowana przez albuminę wołową za (5).

wać poprzez wymianę aminokwasu odpowiedzialnego za wiązanie bądź katalizę określonego substratu, oraz przez zmianę hydrofobowości centrum aktywnego enzymu. Jeszcze inne możliwości stwarza wymiana wybranego aminokwasu enzymu na jego analog niebiałkowy. Na przykład wymiana histydyny na jej analog zawierający pierścień pirazolowy może doprowadzić do znacznych zmian stałych dysocjacji aminokwasów w centrum aktywnym enzymu. Te efekty uzyskuje się za pomocą chemicznej modyfikacji białka. Prezentując synzymy można postawić pytanie czy mogą one być przypuszczalnym źródłem antygenów do produkcji abzymów? Nie przeprowadzono na razie prac doświadczalnych z tego zakresu. Jednakże z dużym prawdopodobieństwem można założyć, że takie eksperymenty w niedalekiej przyszłości będą przeprowadzane, tym bardziej, że teoretycznie, jak się wydaje, są one bardzo prawdopodobne.

4. Przeciwciała syntetyczne

Ostatnio obserwuje się intensywny rozwój badań mających na celu uzyskanie syntetycznych przeciwciał zwanych *plastic antibodies* (7). W nazwie tej podkreśla się niebiologiczny charakter tych przeciwciał. Zasadą produkcji przeciwciała syntetycznego jest molekularne odwzorowanie determinant naturalnego przeciwciała na matrycy polimerowej (rys. 6). Poszczególne grupy funkcyjne rozmieszczone są dookoła matrycy monomerowej i są z nią związane poprzez wiązania kowalencyjne lub niekowalencyjne. Podczas procesu polimeryzacji odbywa się „zamrożenie” pozycji po-



Rys. 6. Schemat otrzymywania przeciwciała syntetycznego na zasadzie odcisku molekularnego: a) zasada samomontażu (samoorganizacji), b) zasada połączenia kowalencyjnego [idea zaczerpnięta z (7)].

szczególnych determinant poprzez silne wiązania krzyżowe. Późniejsze usunięcie matrycy nośnej z makroporowego polimeru pozostawia puste nisze odpowiadające rozmiarem i kształtem danej matrycy. Wewnątrz tak powstałych przestrzeni pozostają same grupy funkcyjne, gotowe do takich samych specyficznych połączeń jak pierwotne przeciwciało. Efekt ten można osiągnąć dwoma sposobami. W pierwszym z nich zdolne do polimeryzacji pochodne wzorcowej cząsteczki są kopolimeryzowane z poprzecznie sieciującymi monomerami (8). Otrzymane pochodne są stabilizowane wiązaniami kowalencyjnymi pomiędzy matrycą polimerową i odpowiednimi polimeryzującymi monomerami. W celu usunięcia matrycy polimerowej i uwol-

nienia miejsc wiążących, wiązania kowalentne muszą być chemicznie rozerwane, a następnie odtworzone podczas wiązania odpowiedniej cząsteczki. Przykładowo do tego celu używa się estrów kwasu borowego, ponieważ mogą one być rozrywane i ponownie odtwarzane w relatywnie łagodnych warunkach reakcji. Inne podejście zaproponowane przez Mosbacha i wsp. (9) polega na tworzeniu przedpolimeryzacyjnego kompleksu pomiędzy monomerami zawierającymi odpowiednie grupy funkcyjne i matrycą polimerową stabilizowanego niekowalencyjnymi wiązaniami takimi jak: interakcje jonowe lub wiązania wodorowe. W wyniku polimeryzacji grupy funkcjonalne są utrzymywane w stabilnej pozycji przez sieć polimerową, podczas gdy matryca może być łatwo usunięta przez ekstrakcję rozpuszczalnikiem. Wiązanie „antygenu” do tego polimeru odbywa się również za pomocą niekowalencyjnych interakcji. Molekularnie odwzorowane przeciwciała z jednej strony bardzo różnią się od tradycyjnych przeciwciał, z drugiej zaś stanowią ich wierne kopie. Cząsteczki przeciwciał syntetycznych są większe niż cząsteczki przeciwciał tradycyjnych, ponadto charakteryzują się sztywną budową i są nierozpuszczalne w roztworach wodnych. Do głównych ich zalet zalicza się odporność na wysoką temperaturę i działania mechaniczne, a także łatwość wiązania się z rozpuszczalnikami organicznymi. Jednocześnie zachowują najważniejszą cechę, specyficzne wiązanie ściśle określonych cząsteczek. Duża selektywność przeciwciał syntetycznych, uzyskanych w wyniku molekularnego odwzorowania, w stosunku do substratów jest jedną z ich podstawowych cech. Umieszczone w matrycy grupy funkcyjne sprawiają, że uzyskany w ten sposób produkt posiada cechy właściwe dla enzymów. Produkty takie zwane są plastyzmami, czyli syntetycznymi polimerami imitującymi enzym (10).

Przeciwciała syntetyczne nie mogą być stosowane w takich analizach, gdzie używa się roztworu przeciwciał, tak jak np. immunodyfuzja, immunoelektroforeza, immunoblotting czy immunofluorescencja. W analizach zaś bazujących na przeciwciałach immobilizowanych, tak jak ma to miejsce w chromatografii immunopowinowactwa, analizach immunometrycznych, immunosensorach, elektrochromatografii kapilarnej i elektroforezie kapilarnej, przeciwciała syntetyczne są rzeczywistą alternatywą w stosunku do tradycyjnych przeciwciał (11). Przeciwciała syntetyczne znajdują zastosowanie w konstrukcji biosensorów. Wiele aktualnie projektowanych sensorów służących do monitorowania środowiska, analiz prowadzonych w pracowniach biomedycznych i laboratoriach kontroli jakości żywności, wykonuje się w oparciu na reakcji analitu z odpowiednim przeciwciałem lub enzymem jako czujnikiem. System odwzorowania makromolekuł jest w takim przypadku bardzo korzystny ze względu na wysoką specyficzność, stabilność materiału użytego do jego budowy, a także chemiczną i fizyczną stabilność utrzymującą się nawet w bardzo drastycznych warunkach środowiska.

Aktualnie głównym celem nowoczesnej technologii produkcji syntetycznych przeciwciał jest wyprodukowanie przeciwciała o cechach homogennych, podobnego do przeciwciał monoklonalnych. Zainteresowanie produkcją przeciwciał syntetycznych wykazuje przede wszystkim przemysł farmaceutyczny. Mogą one również odegrać

znaczącą rolę w analizie żywności opartej na biosensorach. Badania zatem będą najprawdopodobniej skierowane na uzyskanie komercyjnego produktu w wyniku molekularnego odwzorowania. Przykładem wykorzystania przeciwciał syntetycznych są prace badawcze nad inhibitorami fosfodiesterazy i enzymów syntetyzujących 17- β -estradiol (12).

5. Podsumowanie

Rozwój współczesnej biotechnologii, szczególnie w zakresie enzymologii, doprowadził do powstania nowej specjalności, którą wstępnie można nazwać „immunotechnologią”. Bardzo prawdopodobne jest, jak się wydaje, że niektóre procesy wykorzystywane w produkcji żywności, leków, opakowań i innych produktów będą w niedalekiej przyszłości przeprowadzane z użyciem abzymów i synzymów. Niewątpliwy postęp w tej dziedzinie nauki wskazuje, że warto ten dział wiedzy studiować i tworzyć warunki do wykorzystania jej w praktyce. Do grupy nowych związków należy również dołączyć przeciwciała syntetyczne stanowiące molekularne odwzorowanie determinant naturalnego przeciwciała na matrycy polimerowej, charakteryzujące się dużą chemiczną i fizyczną stabilnością w drastycznych warunkach środowiska.

Literatura

1. Holliger P., Hoogenboom H. R., (1995), *Tibtech.*, 13, 7-9.
2. Pollard T. D., Doberstein S. K., (1991), *Ann. Rev. Physiol.*, 53, 653-681.
3. Bielecki S., (1991), *Biotechnologia*, 1(11), 15-27.
4. Wróblewska B., Kostyra H., (2000), *Przemysł Spożywczy*, 54(5), 8-10.
5. Kafarski P., Lejczak B., (1994), *Chemia bionieorganiczna*, Wyd. PWN, Warszawa, 320-326, 329-336.
6. de Prada P., Winger G., Landry D. W., (2000), *New Medications For Drug Abuse*, 900, 159-169.
7. Haupt K., Mosbach K., (1998), *Tibtech.*, 16, 468-475.
8. Wullf G., Gross T., Schönfeld R., (1997), *Angw. Chem., Int. Ed. Engl.*, 36, 1962-1964.
9. Mosbach K., (1992), US patent US 5110833.
10. Ramstrom O., Mosbach K., (1999), *Current Opinion in Chemical Biology*, 3(6), 759-764.
11. Anderson L., (2000), *J. Chromatogr. B.*, 745(1), 3-13.
12. Weiss L. Ye., Mosbach K., (2000), *Macromolecules*, 33(22), 8239-8245.
13. Jakóbiński M., (1995), *Immunologia*, Wyd. PWN, Warszawa, 66-77.
14. Stryer L., (1997), *Biochemia*, Wyd. PWN, Warszawa.