



## Hydrataza nitrylowa – aktywowany światłem enzym przemysłowy

Łukasz Peplowski, Karina Kubiak, Wiesław Nowak  
Zespół Teoretycznej Biofizyki Molekularnej, Instytut Fizyki,  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

### Nitrile hydratase – Light activated industrial enzyme

#### Summary

Since 1985, nitrile hydratases, metallo-enzymes present in bacteria from genus *Rhodococcus*, have been used for industrial production of acrylamide and related chemicals. The unique active site of both Fe- and Co-nitrile hydratases contains oxidized cysteines. Despite many efforts, details of the catalytic mechanism of activity and high selectivity remain unknown. Molecular structures, possible routes of hydration and prospects for applications of these photoactive enzymes in nanotechnology are discussed in this review.

#### Key words:

nitrile hydratase, biocatalysis, production of amides, photoactive enzymes.

### 1. Wstęp

Wpływ biotechnologii na przemysł stale rośnie. Wzrost cen surowców wymusza poszukiwanie nowych metod produkcji powszechnie stosowanych związków chemicznych. Biokatalizatory naturalne, bądź ulepszone metodami inżynierii genetycznej, są w centrum uwagi wielu grup badawczych. Szczególne zainteresowanie, m.in. ze względu na potencjalne zastosowania w nanotechnologii, budzą białka, których aktywność można łatwo regulować, np. za pomocą światła. W pracy przedstawimy zastosowanie, budowę i proponowane mechanizmy działania niezwykle użytecznego enzymu – hydratazy nitrylowej. Z pewnością mutanty tego białka znajdą zastosowanie do produkcji wielu cennych związków, w tym farmaceutyków.

#### Adres do korespondencji

Wiesław Nowak,  
Zespół Teoretycznej  
Biofizyki Molekularnej,  
Instytut Fizyki,  
Uniwersytet Mikołaja  
Kopernika,  
ul. Grudziądzka 5,  
87-100 Toruń;  
e-mail:  
wiesiek@fizyka.umk.pl

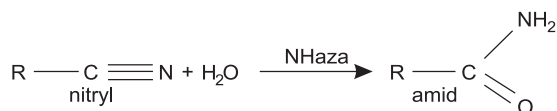
## 2. Znaczenie hydratazy nitrylowej

Hydrataza nitrylowa (NHase, ang. *Nitrile Hydratase*, EC. 4.2.1.84, masa cząsteczkowa heterodimeru ok. 48 kDa, numer CAS 82391-37-5) jest białkiem wykorzystywanym na dużą skalę w przemyśle biotechnologicznym. Enzym ten katalizuje hydratację nitryli do amidów (1,2), przebieg tej reakcji schematycznie przedstawiono na rysunku 1. NHaza została odkryta w Kyoto przez Asano i in. w 1980 r. (3) niejako przypadkiem, podczas badań dotyczących mikrobiologicznej degradacji toksycznych składników zawierających grupy cyjanowe. Pięć lat po tym odkryciu, japońska firma Nitto Chemical Industry (obecnie Dia-Nitrix Co. Ltd., część Mitsubishi Rayon Co.) używając NHazy pochodzącej z *Rhodococcus* sp. N-774 z jonem żelaza w centrum aktywnym rozpoczęła przemysłową produkcję akryloamidu (4). Obecnie do produkcji akryloamidu używa się enzymu otrzymanego z *Rhodococcus rhodochrous* J1, z jonem kobaltu w centrum aktywnym (1,5). Enzym ten wykorzystywany jest również do produkcji amidu kwasu nikotynowego (witamina PP) (6,7); Lonza Gungzhou Fine Chemicals (Chiny) może wyprodukować 3400 ton tego związku rocznie (6). Głównym pod względem produkcji akryloamidu przedsiębiorstwem europejskim jest SNF Floeger (Saint-Etienne, Francja), którego możliwości sięgają 100 tys. ton akryloamidu rocznie (6). Jest to imponujący rezultat – w 2001 r. globalna produkcja akryloamidu wyniosła 200 tys. ton (7).

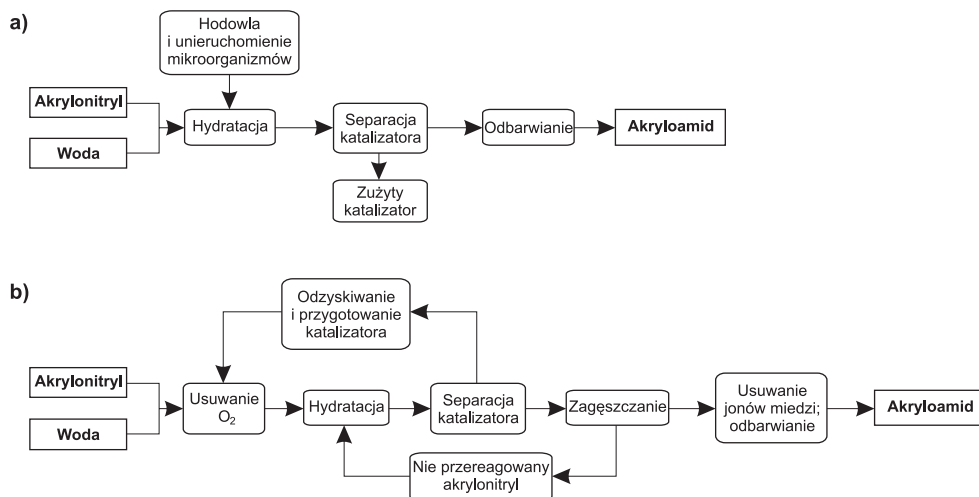
Pomimo swej toksyczności nitryle są używane w gospodarce, np. jako rozpuszczalniki (acetonitryl). Akryloamid jest wykorzystywany głównie do produkcji polimerów i kopolimerów. Najważniejsze zastosowania poliakrylamidu to uzdatnianie wody i oczyszczanie ścieków. Produkty hydratacji nitryli mogą pełnić funkcje koagulatorów, flokulantów, mogą być używane w produkcji papieru, farb, pieluszek czy do polepszania gleby (1). Żele poliakryloamidowe są powszechnie wykorzystywane do elektroforezy w chemii, biologii molekularnej czy w biotechnologii.

Warto zauważyć, że akryloamid występujący np. w żywności poddawanej obróbce termicznej od roku 2002 uważany jest za związek potencjalnie rakotwórczy (8). Polskie normy budowlane dopuszczają maksymalne stężenie akryloamidu w powietrzu na poziomie 1 mg/m<sup>3</sup>.

Konwencjonalna synteza chemiczna amidów wymaga hydratacji nitryli katalizowanej solami miedzi w temp. 80-140°C. Z uwagi na to, że: 1) szybkość powstawania kwasów karboksylowych jest większa niż szybkość powstawania amidów, 2) powstają toksyczne produkty uboczne, takie jak nitrylotrispropionamidy i etylenocyjanowodór oraz 3) polimeryzacja dotyczy zarówno substratów, jak i produktów (5,7),



Rys. 1. Reakcja katalizowana przez hydratazę nitrylową.



Rys. 2. Schemat produkcji akryloamidu metodą biotechnologiczną (a) i za pomocą konwencjonalnej syntezy chemicznej (b), rys. wg (2).

metoda chemiczna jest niepraktyczna. W przeciwieństwie do tego metoda enzymatyczna, wykorzystująca NHazy, charakteryzuje się niskimi kosztami, wydajnością dochodzącą do 99,99%, prostym procesem technologicznym i brakiem toksycznych produktów ubocznych (5). Na rysunku 2 przedstawiono schematy blokowe produkcji akryloamidu metodami biotechnologiczną i chemiczną, jak widać, ta druga jest znacznie bardziej skomplikowana.

Enzymy z rodziny NHazy mogą być także stosowane do utylizacji odpadów powstających w trakcie produkcji lateksu (5), degradacji akrylonitryli i innych pochodnych nitryli w środowisku, np. herbicydów nitrylowych używanych w rolnictwie (9,10), czy leków przeciwgruźliczych (pirazynoamid) (7).

Z uwagi na różnice w powinowactwie NHazy do określonych substratów (nitryle aromatyczne, alifatyczne lub aryloacetonitryle), w chwili obecnej, na skalę przemysłową wykorzystuje się białka pochodzące z kilku szczepów bakterii, głównie z rodzaju gramdodatnich *Rhodococcus* (11). Można tu wymienić: *Rhodococcus* sp. N-774, *Rhodococcus* R312, *Rhodococcus* sp. N-771, *Rhodococcus rhodochrous* J1, *Rhodococcus rhodochrous* K22, *Rhodococcus pyridinovorans* MW3 czy *Alcaligenes faecalis* (7,11). Na całym świecie przyznano już ponad 100 patentów, w których podstawową rolę odgrywają bakterie z tego właśnie rodzaju (11).

Zastosowanie mikroorganizmów do produkcji amidów pozwoliło na uniknięcie wielu problemów związanych z ich syntezą chemiczną (koszty i komplikacja procesu technologicznego, konieczność utylizacji toksycznych produktów ubocznych itp.). Jednak w pierwszych latach stosowania metody biotechnologicznej borykano się z problemem konkurencyjnej produkcji kwasu akrylowego przez amidazy także

obecne w bakteriach. Na drodze mutacji genetycznych udało się stworzyć szczep *Pseudomonas chlororaphis* B23; bakterie te nie syntetyzowały amidazy, dzięki czemu można było zrezygnować ze stosowania jej inhibitorów (2). Bakterie *Pseudomonas chlororaphis* B23 inkubowane w temperaturze 10°C przetwarzają ponad 99% akrylonitrylu (7). Kolejnym problemem związanym z wykorzystaniem przemysłowym szczepu *Rhodococcus* sp. N-774 do produkcji akryloamidu była konieczność ciągłego naświetlania stosowanych bioreaktorów. W ciemności enzym tracił zdolności katalityczne. W szczegółowych badaniach wykazano, że jego centrum aktywne było blokowane przez endogenną cząsteczkę tlenu azotu (12,13). Absorpcja promieniowania widzialnego powodowała fotodysocjację cząsteczki NO i całkowite odzyskanie aktywności (7). Koszty produkcji udało się zmniejszyć (rezygnacja z naświetlania) po tym, jak odkryto szczep *R. rhodochrous* J1, który produkował NHazę zawierającą w centrum aktywnym jon kobaltu zamiast żelaza. Ten typ NHazy nie wykazywał się fotoaktywnością – enzym działał tak samo wydajnie w ciemności, jak i przy silnym oświetleniu (7). W badaniach *R. rhodochrous* J1 ujawniono, że w zależności od warunków hodowli, powstają dwa rodzaje NHazy: H-NHaza o masie cząsteczkowej 520 kDa i L-NHaza o masie cząsteczkowej 130 kDa. Bakteria może produkować albo tylko jeden typ NHazy, albo oba jednocześnie; H-NHaza katalizuje powstawanie amidów alifatycznych, a L-NHaza aromatycznych (7).

Podstawowe dane dotyczące NHaz pochodzących z kilku powszechnie używanych szczepów bakterii przedstawiono w tabeli 1.

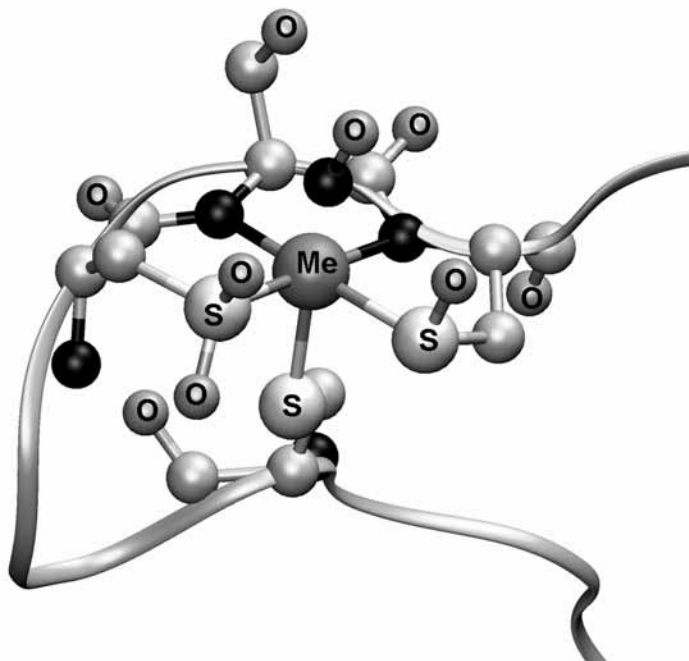
Tabela 1

Wybrane właściwości NHaz pochodzących z różnych szczepów bakterii. Dane wg (1)

Właściwości NHaz	Szczepy bakterii		
	<i>Rhodococcus</i> sp. N-774	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> B23	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1
Tolerancja akryloamidu (%)	27	40	50
Czas hodowli (godz)	27	40	72
Aktywność szczepu (jednostki/ml)	900	1400	2100
Produkcja akryloamidu (g/g komórek)	500	850	>7000
Całkowita roczna produkcja (tony)	4000	6000	>30 000
Końcowe stężenie akryloamidu (%)	20	27	40
Rok wprowadzenia do produkcji	1985	1988	1991

### 3. Budowa hydratazy nitrylowej

Wyróżnia się NHazy typu Fe, zawierające „niehemowe” żelazowe centrum katalityczne (14) oraz NHazy typu Co, zawierające w centrum aktywnym jon kobaltu (2,15). Centrum aktywne, niezależnie od typu, ma tę samą architekturę (rys. 3).



Rys. 3. Budowa przestrzenna centrum aktywnego NHazy z tlenkiem azotu w szóstej pozycji koordynacyjnej i zaznaczonym przebiegiem fragmentu łańcucha głównego białka. Ponadto do jonu centralnego Me ( $\text{Fe}^{3+}$  lub  $\text{Co}^{3+}$ ) koordynują trzy atomy siarki i dwa atomy azotu; (obowiązują następujące oznaczenia: szary – C, czarny – N. Rysunek przygotowany za pomocą programu VMD (48).

Pierwsze struktury przestrzenne NHazy poznano, stosując metody rentgenowskie, dopiero w późnych latach dziewięćdziesiątych XX w. (13,16). Wszystkie poznane dotąd struktury przedstawiono w tabeli 2 (stan na marzec 2006).

**Tabela 2**

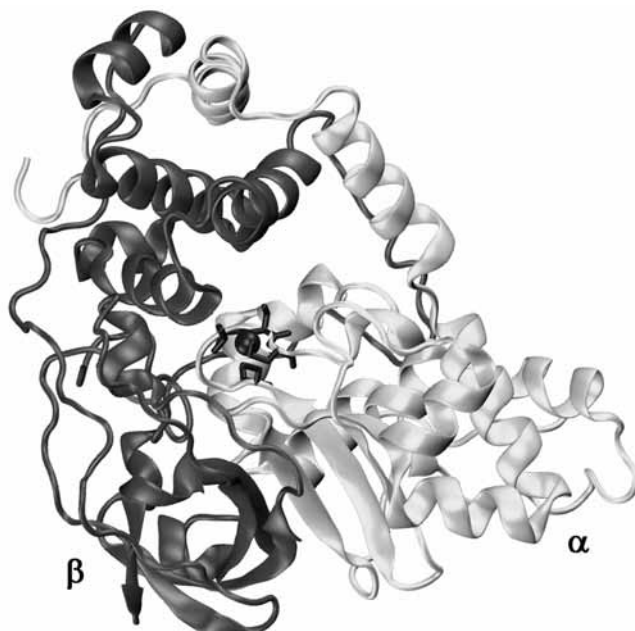
**Struktury przestrzenne NHaz (poznane do marca 2006 r.)**

Kod PDB	Typ	Organizm	Ligand/uwagi	Rozdzielczość [Å]	Rok	Literatura
1	2	3	4	5	6	7
1AHJ	Fe	A	- / forma aktywna	2,65	1997	(16)
2AHJ	Fe	B	NO / forma nieaktywna	1,7	1998	(13)
1IRE	Co	C	-/-	1,8	2001	(20)
1V29	Co	D	-/-	2,6	2003	(21)
1UGP	Co	C	kompleks 1IRE z kwasem <i>n</i> -masłowym	1,63	2004	(22)
1UGQ	Co	C	apoenzym 1IRE	2	2004	(22)
1UGR	Co	C	mutant $\alpha$ T109S 1IRE	1,8	2004	(22)

1	2	3	4	5	6	7
1UGS	Co	C	mutant $\alpha$ Y114T HIRE	2	2004	(22)
2CYZ	Fe	B	forma aktywna w warunkach beztlenowych	1,55	2006	(23)
2CZ0	Fe	B	forma aktywna w warunkach tlenowych	1,5	2006	(23)
2CZ1	Fe	B	kompleks 2CYZ z kwasem <i>n</i> -masłowym	1,39	2006	(23)
2CZ6	Fe	B	kompleks formy nieaktywnej 2CYZ z izocyjanidem cykloheksylu	1,5	2006	(23)
2D0Q	Fe	B	kompleks 2CYZ z izocyjanidem cykloheksylu, fotoaktywowany w temp. 277K	1,65	2006	(23)
2CZ7	Fe	B	2CYZ fotoaktywowana w temp. 105K	1,8	2006	(23)

A – *Rhodococcus* sp. R312; B – *Rhodococcus erythropolis*; C – *Pseudonocardia thermophila*; D – *Bacillus smithii*.

NHazy składają się z dwóch podjednostek (rys. 4), na jeden dimer  $\alpha\beta$  przypada jeden jon metalu:  $\text{Fe}^{3+}$  lub  $\text{Co}^{3+}$  (rys. 3) koordynowany przez aminokwasy należące do podjednostki  $\alpha$  (17). Na podstawie wyników badań prowadzonych metodami EPR (14,18) oraz spektroskopii absorpcyjnej promieniowania X (15,19) przypuszcza się, że pole ligandów, tj. symetria oraz wpływ otoczenia białkowego na stan spinowy i strukturę elektronową jonu centralnego, w obu typach hydratazy nitrylowej są po-



Rys. 4. Budowa heterodimeru hydratazy nitrylowej. Na granicy podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  zaznaczono położenie centrum aktywnego. Rysunek przygotowany za pomocą programu VMD (48).

dobne. Budowa przestrzenna hydratazy nitrylowej typu Co poznana metodą dyfrakcji promieni rentgenowskich (20-23) jest bardzo podobna do budowy Fe-NHazy (13,16). Pole ligandów, budowa centrum aktywnego i posttranslacyjne modyfikacje polegające na utlenieniu dwóch cystein z centrum aktywnego w obu tych białkach są niemal identyczne (20). Podobieństwa dotyczą również obecności cząsteczek wody w okolicy centrum aktywnego. Uważa się, że ze względu na identyczną sekwencję, Fe-NHazy pochodzące z *Rhodococcus* sp. N-771, *Rhodococcus* sp. N-774 oraz *Brevibacterium* sp. R312 są prawdopodobnie takie same (24-26).

Pomimo że obecnie na skalę przemysłową jest wykorzystywana głównie NHaza typu Co (1,2,5), w literaturze dużo lepiej opisana jest NHaza typu Fe, charakteryzująca się niespotykaną fotoaktywnością (27). Endogenna cząsteczka NO zajmuje szóstą pozycję koordynacyjną jonu żelaza – w takiej formie enzym jest nieaktywny. Absorpcja fotonu powoduje dysocjację cząsteczki NO i odzyskanie aktywności enzymatycznej białka.

Wspomniano, że hydratazy nitrylowe powstają dzięki połączeniu się podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$ , tworzących heterodimer (rys. 4). Tworzenie dimeru, jak się wydaje, jest konieczne ze względu na stabilizację struktury obu podjednostek – w dimerze domeny i pętle jednej podjednostki silnie oddziałują z drugą podjednostką, podczas gdy pomiędzy domenami każdej z podjednostek występuje tylko kilka oddziaływań scalających domeny (28). Na podstawie skomplikowanej struktury heterodimeru przypuszcza się, że tworzenie się enzymu nie jest po prostu dokowaniem się dwóch podjednostek; w oddziaływaniach pomiędzy nimi pośredniczą ważne strukturalnie cząsteczki wody (28).

Na styku podjednostek znajduje się duża, otwarta przestrzeń, w której ulokowane jest centrum aktywne z jonem metalu  $Fe^{+3}$  (lub  $Co^{+3}$ ). Organiczne ligandy jonu centralnego pochodzą wyłącznie z podjednostki  $\alpha$  (16). Najbliższym aminokwasem należącym do podjednostki  $\beta$  jest  $\beta$ Arg56 (numeracja aminokwasów zgodna z 1AHJ, 2AHJ, 2CYZ), w pobliżu znajduje się też  $\beta$ Arg141 (13). Wiązania koordynacyjne do metalu tworzą trzy atomy siarki pochodzące z  $\alpha$ Cys109,  $\alpha$ Cys112 i  $\alpha$ Cys114 oraz dwa azoty amidowe pochodzące z łańcucha głównego  $\alpha$ Ser113 i  $\alpha$ Cys114 (13,16). W skład centrum aktywnego zaliczyć można także  $\alpha$ Ser110 i  $\alpha$ Leu111, chociaż nie uczestniczą one bezpośrednio w koordynacji jonu metalu. Dwa atomy siarki  $S_{\gamma}$  z  $\alpha$ Cys112 i  $\alpha$ Cys114 oraz dwa azoty aminowe wyznaczają płaszczyznę zawierającą także jon metalu (13,16). Konformacja  $\alpha$ Cys112 i  $\alpha$ Cys114 jest stabilizowana poprzez wiązania wodorowe tworzone z grupami guanidynowymi zachowywanych we wszystkich hydratazach nitrylowych arginin, odpowiednio  $\beta$ Arg56 oraz  $\beta$ Arg141 (13, 16,29). W strukturze nieaktywnej NHazy typu Fe szosta pozycja liganda jest zajęta przez cząsteczkę NO (13), zaś w formie aktywnej enzymu pozycja ta może być wolna (16), albo zajęta przez jon hydroksylowy lub cząsteczkę wody (14). To ostatnie przypuszczenie potwierdza struktura NHazy typu Co (1IRE) i Fe (2CYZ), gdzie nad jonem metalu, w odległości odpowiednio 2,58 Å i 2,1 Å znaleziono atom tlenu. Do tej pory nie rozstrzygnięto jednak, czy znajduje się tam jon hydroksylowy czy woda.

Struktury przestrzenne NHaz typu Fe (13,16) oraz struktura NHazy typu Co (20-23) o dużej rozdzielczości potwierdziły ważną hipotezę, że dwie cysteiny ligandów ulegają posttranslacyjnej modyfikacji (30):  $\alpha$ Cys112 ulega utlenieniu do kwasu sulfinowego cysteiny (Cys-SO<sub>2</sub>H, ang. *cysteine sulfinic acid*), a  $\alpha$ Cys114 utlenia się do kwasu sulfenowego cysteiny (Cys-SOH, ang. *cysteine sulfenic acid*) (13). Wyniki badań metodą FT-ICR MS też świadczą o tym, że wymienione cysteiny ulegają utlenieniu (13). Wykazano, że ta bardzo rzadko spotykana modyfikacja  $\alpha$ Cys112 i  $\alpha$ Cys114 jest konieczna dla osiągnięcia aktywności katalitycznej enzymu (31). Co więcej, forma Cys-SOH pojawia się samorzutnie po utlenieniu  $\alpha$ Cys112 do  $\alpha$ Cys-SO<sub>2</sub>H. Te odkrycia w połączeniu z obserwacją, że aktywność NHazy jest proporcjonalna do ilości  $\alpha$ Cys112-SO<sub>2</sub>H prowadzą do wniosku, że za aktywność katalityczną odpowiedzialna może być  $\alpha$ Cys112-SO<sub>2</sub>H (sama lub w kombinacji z  $\alpha$ Cys114-SOH) (31). Opisaną budowę centrum aktywnego potwierdzono też w niedawnych badaniach przeprowadzonych metodą Sulfur K-edge XAS oraz w obliczeniach kwantowochemicznych metodą DFT (32). W 2004 r. Harrop i Mascharak wykazali, że obecność donorów tiolowych jest wymagana w hydrolizie nitryli, a utlenione reszty cysteiny powodują zwiększenie zasadowości wody związanej z centrum aktywnym (33). Natomiast kombinacja azotów amidowych oraz utlenionych reszt tiolowych w polu ligandów stabilizuje stan Fe(III) (34).

Architektura centrum aktywnego NHaz ma jeszcze jedną, nietypową cechę. Trzy atomy tlenu: O $\delta$ 1 z  $\alpha$ Cys112-SO<sub>2</sub>H, O $\delta$  z  $\alpha$ Cys114-SOH oraz O $\gamma$  z  $\alpha$ Ser113 wystają nad płaszczyznę tworzoną przez dwa atomy azotu i dwa atomy siarki (NNSS) i tworzą charakterystyczne trójkątne „kleszcze” osłaniające centrum aktywne (13). Wydaje się, że te trzy atomy tlenu oddalone od płaszczyzny żelaza o 1,5 Å są położone na tyle blisko inaktywującej cząsteczki NO, że być może ją stabilizują. Nie spotykana trwałość wiązania Fe-N(NO), które w ciemności w warunkach beztlenowych nie dysocjuje przez ponad rok, jest prawdopodobnie spowodowana obecnością tych „kleszczy” tlenowych (17). Spekuluje się, że „kleszcze” tlenowe mogą odgrywać rolę w reakcji katalitycznej (35-37).

Duże znaczenie dla struktury centrum aktywnego (a zatem i dla reakcji katalizy) mają dwie argininy:  $\beta$ Arg56 i  $\beta$ Arg141. W kryształach  $\beta$ Arg56 tworzy wiązanie wodorowe z tlenem O $\delta$ 1 z  $\alpha$ Cys112-SO<sub>2</sub>H, natomiast  $\beta$ Arg141 tworzy wiązanie wodorowe stabilizujące położenie tlenu O $\delta$  z łańcucha bocznego  $\alpha$ Cys114-SOH (13). Stwierdzono, że utrata nawet jednego z trzech wiązań wodorowych tworzonych pomiędzy  $\beta$ Arg56 a  $\alpha$ Cys112-SO<sub>2</sub>H i/lub  $\alpha$ Cys114-SOH silnie wpływa na stan elektronowy centrum żelazowego. Mutacja na pozycji  $\beta$ Arg56 powoduje spadek aktywności katalitycznej nawet o 99% (29). Do uzyskania aktywności katalitycznej NHazy konieczne jest zatem nie tylko posttranslacyjne utlenienie  $\alpha$ Cys112 i  $\alpha$ Cys114, ale także obecność  $\beta$ Arg56 i być może  $\beta$ Arg141.

#### 4. Kontrowersje dotyczące protonowania centrum aktywnego NHazy

Utlenione reszty cysteiny, istotne dla aktywności katalitycznej NHazy, wpływają nie tylko na stan elektronowy centralnego jonu metalu, strukturę centrum aktywnego czy oddziaływania z substratami i wodą reakcyjną, ale także uczestniczą w tworzeniu warunków reakcji. Ważnym zagadnieniem jest zatem stan protonacji tych reszt. Odpowiedzi na to pytanie niestety nie są w stanie dostarczyć dostępne struktury rentgenowskie NHazy, stąd zainteresowanie badaniami spektroskopowymi i obliczeniami teoretycznymi. Problem protonacji, zauważony przez nas już w 2002 r. (35) był wstępnie badany metodami kwantowochemicznymi DFT i INDO/S przez Greene i in. (38). Rok później Noguchi i in. zaprezentowali wyniki obliczeń DFT dla uproszczonych modeli centrum aktywnego (36). Obliczone teoretyczne częstości drgań oscylacyjnych deprotonowanych cystein dobrze zgadzają się z widmem w FTIR NHazy (36). W dalszych badaniach przeprowadzonych przez tych autorów potwierdzono możliwość deprotonacji w centrum aktywnym (37). W systematycznych badaniach modeli centrum aktywnego NHazy typu Fe i Co, przeprowadzonych przez nas metodą DFT, dowiedziono, że deprotonacji najpierw ulega  $\alpha\text{Cys112-SO}_2\text{H}$ , a potem  $\alpha\text{Cys114-SOH}$  (dane nie publikowane). Na podstawie porównania teoretycznie otrzymanych częstości drgań oscylacyjnych jonowych modeli centrum aktywnego z widmem IR NHazy typu Fe (37,38) sugeruje się, że enzym występuje w formie deprotonowanej, przy czym część cząsteczek białka uległa jednokrotnej deprotonacji (na  $\alpha\text{Cys112-SO}_2\text{H}$ ), a część pełnej deprotonacji (na  $\alpha\text{Cys112-SO}_2\text{H}$  i  $\alpha\text{Cys114-SOH}$ ). Wydaje się, że pomiędzy enzymem w tych dwóch stanach protonowania występuje równowaga dynamiczna. Przechodzenie enzymu ze stanu podwójnie deprotonowanego do stanu pojedynczo deprotonowanego prawdopodobnie ma związek z przebiegiem samej reakcji hydratacji.

W teoretycznych badaniach związków modelowych NHaz wnoszone są nowe informacje, przydatne do poznania mechanizmu działania enzymu. W pierwszej pracy teoretycznej dotyczącej realistycznego modelu centrum aktywnego NHazy, obliczono zmiany konformacyjne zachodzące w centrum katalitycznym na skutek fotoaktywacji enzymu: fotodysocjacja cząsteczki NO powoduje przesunięcie się jonu żelaza „pod płaszczyznę” NNSS. Zmiana położenia  $\text{Fe}^{3+}$  wynosi około 0,5 Å. W obliczeniach brano pod uwagę strukturę całkowicie protonowaną (35). Na podstawie wyników tych badań dostarczono pierwszych kompletnych danych dotyczących geometrii i rozkładu ładunków w centrum katalitycznym NHazy typu Fe. Zauważono także silną polaryzację grup S-O; sprawia ona, że atomy tlenu chętnie uczestniczą w wiązaniach wodorowych (np. z  $\beta\text{Arg56}$  i  $\beta\text{Arg141}$ ). Praca Changa i in. dotyczyła stanu spinowego jonu żelaza (39). Ustalono, że obliczenia DFT/B3LYP są w stanie poprawnie odtworzyć obserwowany eksperymentalnie stan podstawowy centrum aktywnego.

W 2006 r. Greene i in. przeprowadzili obszerne badania metodą DFT/B3LYP dużego modelu centrum aktywnego, składającego się z wszystkich aminokwasów od

$\alpha$ Cys109 do  $\alpha$ Cys114 oraz grup guanidynowych modelujących argininy  $\beta$ Arg56 i  $\beta$ Arg141. Posttranslacyjnie zmodyfikowane cysteiny były deprotonowane. Autorzy zauważyli transfer protonu z grupy guanidynowej  $\beta$ Arg56 na tlen z  $\alpha$ Cys114-SO<sup>-</sup> (40). Wynik ten jest zgodny z naszymi badaniami DFT, w których ujawniono możliwość transferu protonu z grupy bocznej  $\alpha$ Cys112-SO<sub>2</sub>H na resztę  $\alpha$ Cys114-SO<sup>-</sup> (dane nie publikowane). Greene i in., śledząc zmiany konformacji i struktury elektronowej wywoływane pojawieniem się w centrum enzymu cząsteczki wody, jonu hydroksylogowego oraz acetonitrylu stwierdzili, że pod nieobecność substratu do jonu żelaza chętniej koordynuje cząsteczka wody niż jon hydroksylogowy (40). Na podstawie analizy termodynamicznej i monitorowania energii swobodnej Gibbsa stwierdzono również, że cząsteczka wody może być łatwiej wyparta przez nityl niż jon hydroksylogowy znajdujący się w szóstej pozycji koordynacyjnej (40). Podajemy te wyniki jako przykład możliwości wykorzystania obliczeń teoretycznych do wyjaśnienia podstawowych zjawisk fizykochemicznych zachodzących w biokatalizatorach.

## 5. Proponowane mechanizmy reakcji enzymatycznej

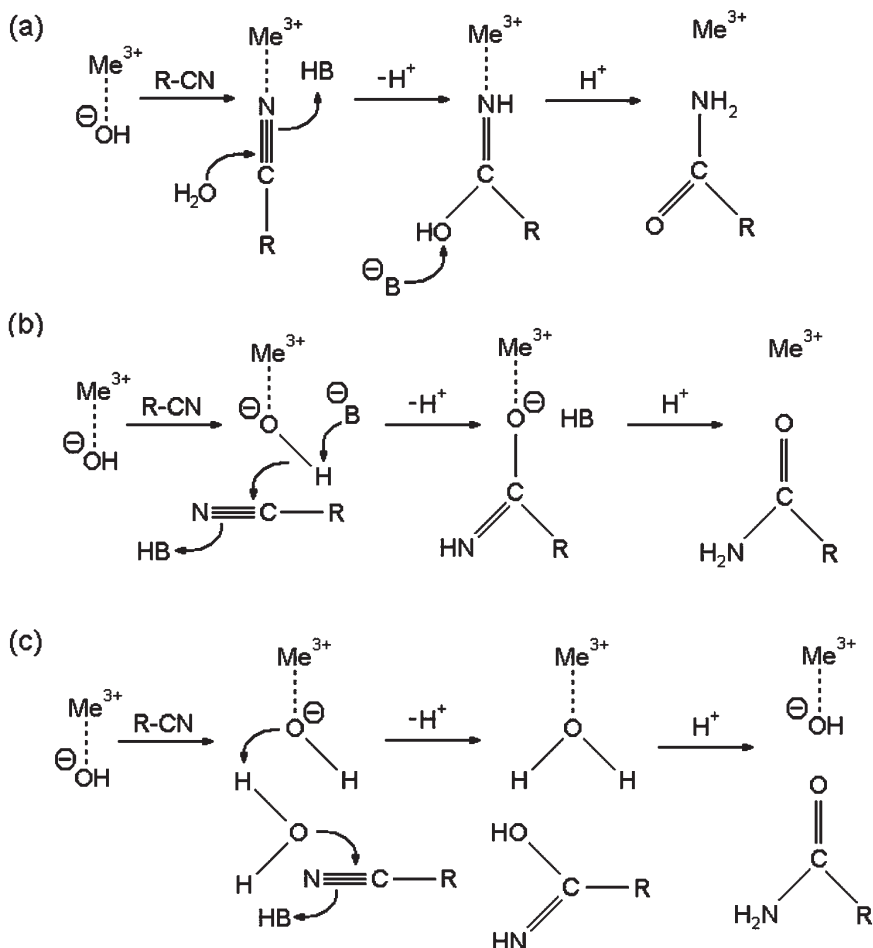
Dokładny przebieg reakcji enzymatycznej katalizowanej przez hydratazę nitylową nie jest znany, jednak budowa centrum aktywnego NHazy (16) oraz obliczony rozkład ładunków (35) sugerują, że jon metalu pełni rolę kwasu Lewisa. Dotychczas zaproponowano trzy mechanizmy katalityczne (16) przedstawione schematycznie na rysunku 5:

a) Kwas Lewisa aktywuje wiążący się z nim nityl, po czym cząsteczka wody, ustawiana w odpowiednim położeniu przez jeden z aminokwasów znajdujących się w bezpośrednim sąsiedztwie jonu żelaza, atakuje nukleofilowo węgiel z cząsteczki nitylu; atomy wodoru z cząsteczki wody są przenoszone na azot (z cząsteczki nitylu). Powstały amid opuszcza centrum aktywne (rys. 5 a) (16).

b) Z jonem metalu wiąże się jon hydroksylogowy, który atakuje nukleofilowo zbliżający się nityl. Brakujący proton pobierany jest z otoczenia (np. z  $\alpha$ Cys112-SO<sub>2</sub>H) i powstały amid opuszcza centrum aktywne (rys. 5 b) (12,16).

c) Związany z metalem jon hydroksylogowy aktywuje cząsteczkę wody znajdującą się w pobliżu centrum aktywnego (pobiera od niej proton). Powstały jon hydroksylogowy atakuje azot z cząsteczki nitylu i hydrolizuje substrat (rys. 5 c) (12,16,40).

Wydaje się, że nie ma powodu, aby mechanizm katalityczny w NHazach typu Co i Fe był inny (41). Świadczy o tym chociażby identyczna (poza jonem centralnym) budowa centrum aktywnego. Próby wyjaśnienia mechanizmu reakcji katalitycznej na drodze obliczeń kwantowochemicznych, podjęte w 2005 r. przez Silaghi-Dumitrescu, nie dostarczyły jeszcze przekonujących dowodów pozwalających na wskazanie najbardziej prawdopodobnego schematu (42). Kwestia określenia mechanizmu tej tak ważnej reakcji katalizowanej przez NHazę pozostaje nadal otwarta.



Rys. 5. Proponowane mechanizmy reakcji katalizowanej przez NHazę. Schemat wg (16).

## 6. Możliwości wykorzystania NHazy w nanotechnologii

Tlenek azotu, pomimo swojej prostej budowy, jest niezmiernie ważnym czynnikiem regulującym aktywność organizmów żywych (43). Opanowanie manipulowania strukturą czy aktywnością molekuł za pomocą światła należy do standardowych celów przyszłej nanotechnologii. Jeżeli fotoaktywacji podwójnego heterodimeru Fe-NHazy, zachodzącej w wyniku naświetlania światłem widzialnym, towarzyszą większe zmiany strukturalne, a nie tylko uwalnianie szóstej pozycji koordynacyjnej żelaza, to przypuszczalnie efekty takie można by wykorzystać do transdukcji sygnałów. Przykładem podobnej nanomaszyny jest kooperatywna hemoglobina, gdzie informacja o dysocjacji liganda indukowanej czynnikami zewnętrznymi, poprzez

efekt allosteryczny przesyłana jest na znaczną odległość, przez co zmniejsza się powinowactwo innej grupy hemowej do tlenu (44). W przypadku NHazy ze wstępnych obliczeń kwantowochemicznych DFT sugeruje się możliwość występowania silnego efektu „trans” tlenu azotu (35). Statyczne struktury rentgenowskie form aktywnych i nieaktywnych NHaz, co prawda nie wykazują dużych zmian w budowie (23), jednak możliwej kooperatywności fotodysocjacji NO w NHazach nie badano jeszcze żadnymi technikami dynamicznymi. Na podstawie obliczeń modelowych dotyczących kinetyki rekombinacji NO do centrum NHazy po fotoodłączeniu, przeprowadzonych metodą Landaua-Zenera wskazuje się (45,46), że skala czasowa tego procesu jest bardzo szybka, rzędu pikosekund, zatem poznanie szczegółowe dynamiki tego biokatalizatora będzie wymagało zastosowania ultraszybkiej spektroskopii femtosekundowej.

Przed inżynierią białek stoi też inne wyzwanie: jak zmodyfikować budowę kanału prowadzącego do centrum aktywnego NHaz, aby poddać selektywnej przemianie dowolny nityl do odpowiedniego amidu? Jeżeli lepiej poznamy architekturę i rolę tego „zamka”, to wydaje się, że białka z tej rodziny znajdą szybkie zastosowanie w biotechnologicznej produkcji szerszej gamy użytecznych związków chemicznych.

## 7. Podsumowanie

Mimo że znamy budowę przestrzenną i wiele właściwości hydratyzacji nitylowych, mimo iż produkują one codziennie setki ton użytecznego akryloamidu przyczyniając się do rozpowszechnienia białej biotechnologii, nie znamy jeszcze mechanizmu chemicznego tego podstawowego cyklu katalitycznego. Nie wiemy w jakiej kolejności pojawia się woda i substrat w kanale NHaz, jaka jest struktura stanu przejściowego, którędy produkt opuszcza miejsce reakcji, co decyduje o większej wydajności katalizy związków alifatycznych u jednych bakterii, a aromatycznych u innych (7). Nie wiemy, jakie trzeba wprowadzić mutacje do struktury białka bakterii rodzaju *Rhodococcus*, aby produkowały one wydajnie związki wyjściowe do syntezy nowych leków. Mamy nadzieję, że nie tylko doświadczenia, ale i badania teoretyczne metodami chemii kwantowej i klasycznych symulacji dynamiki hydratyzacji nitylowych, prowadzone m.in. w naszym zespole (35,46,47) pomogą rozwiązać te zagadki.

Historia odkrycia pożytecznej funkcji hydratyzacji nitylowych uczy nas tego, że w badaniach biotechnologicznych warto być czujnym – poszukując jednej funkcji bakterii nie można ignorować żadnej nowo odkrytej specyficznej aktywności katalitycznej. Czujność ta jest możliwa tylko, wtedy gdy badacze mają szeroką wiedzę ogólną pozwalającą kojarzyć odległe fakty. Szczęśliwe przypadki naprawdę przydarzają się tylko przygotowanym umysłom.

Praca finansowana ze środków na naukę w latach 2005-2007 jako projekt badawczy (2P04A07229).

## Objaśnienia skrótów

$\alpha$ Cys112-SO<sub>2</sub>H – cysteina  $\alpha$ 112 posttranslacyjnie utleniona do kwasu sulfinowego cysteiny  
 $\alpha$ Cys114-SOH – cysteina  $\alpha$ 114 posttranslacyjnie utleniona do kwasu sulfenowego cysteiny  
 Co-NHaza – hydrataza nitrylowa z jonem kobaltu w centrum aktywnym  
 Cys-SO<sub>2</sub>H – kwas sulfinowy cysteiny  
 Cys-SOH – kwas sulfenowy cysteiny  
 DFT – *Density Functional Theory*, teoria funkcjonałów gęstości  
 DFT/B3LYP – DFT z funkcjonałem B3LYP (Becke, Lee, Young, Parr)  
 EPR – *Electron Paramagnetic Resonance*, paramagnetyczny rezonans elektronowy  
 Fe-NHaza – hydrataza nitrylowa z jonem żelaza w centrum aktywnym  
 FT-ICR MS – *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*  
 FTIR – transformata Fouriera widma w podczerwieni  
 H-NHaza – hydrataza nitrylowa o dużej masie cząsteczkowej (520 kDa)  
 INDO/S – *Intermediate Neglect of Differential Overlap*, nazwa obliczeniowej metody kwantowochemicznej  
 IR (widmo) – widmo w podczerwieni (*Infra Red*)  
 L-NHaza – hydrataza nitrylowa o małej masie cząsteczkowej (130 kDa)  
 NHaza – hydrataza nitrylowa  
 NO – tlenek azotu  
 VMD – *Visual Molecular Dynamics*, nazwa programu do obrazowania biocząsteczek  
 XAS – *X-ray Absorption Spectroscopy*, spektroskopia absorpcyjna promieni Rentgena

## Literatura

1. Kobayashi M., Nagasawa T., Yamada H., (1992), *Tibtech*, 10, 402-408.
2. Kobayashi M., Shimizu S., (2000), *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4, 95-102.
3. Asano Y., Tani Y., Yamada H., (1980), *Agric. Biol. Chem.*, 44, 2251-2252.
4. Ashina Y., Suto M., (1993), *Bioprocess Technol.*, 16, 91-107.
5. Yamada H., Kobayashi M., (1996), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 1391-1400.
6. Thomas S. M., DiCosmo R., Nagarajan V., (2002) *Trends Biotechnol.*, 20, 238-242.
7. Yamada H., Shimizu S., Kobayashi M., (2001), *Chem. Rec.*, 1, 152-161.
8. Szczerbina T., (2005), *Kosmos*, 54, 367-372.
9. Battistel E., Bernardi A., Maestri P., (1997), *Biotechnol. Lett.*, 19, 131-134.
10. Wyatt J. M., Knowles C., (1995), *J. Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 35, 227-248.
11. Bell K. S., Philip J. C., Aw A. W. J., Christofi N., (1998), 85, 195-210.
12. Kobayashi M., Shimizu S., (1998), *Nat. Biotechnol.*, 16, 733-736.
13. Nagashima S., Nakasako M., Dohmae N., Tsujimura M., Takio K., Odaka M., Yohda M., Kamiya M., Endo I., (1998), *Nat. Struct. Biol.*, 5, 347-351.
14. Sugiura Y., Kuwahara J., (1987), *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 5848-5850.
15. Brennan B. A., Alms G., Nelson M. J., Durney L. T., Scarrow R. C., (1996), *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 9194-9195.
16. Huang W., Jia J., Cummings J., Nelson M., Schneider G., Lindqvist Y., (1997), *Structure*, 5, 691-699.
17. Odaka M., Noguchi T., Nagashima S., Yohda M., Yabuki S., Hoshino M., Inoue Y., Endo I., (1996), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 221, 146-150.
18. Payne M. S., Wu S., Fallon D. R., Tudor G., Stieglitz B., Turner I. M., Nelson M. J., (1997), *Biochemistry*, 36, 5447-5454.
19. Scarrow R. C., Brennan B. A., Cummings J. G., Jin H., Duong D., Kindt J. T., Nelson M. J., (1996), *Biochemistry*, 35, 10078-10088.

20. Miyanağa A., Fushinobu S., Ito K., Wakagi T., (2001), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 288, 1169-1174.
21. Hourai S., Miki M., Takashima Y., Mitsuda S., Yanagi K., (2003), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 312, 340-345.
22. Myianağa A., Fuhinobu S., Ito K., Shoun H., Wakagi T., (2004), *Eur. J. Biochem.*, 271, 429-438.
23. <http://www.rcsb.org/pdb/>
24. Honda J., Teratani Y., Kobayashi Y., Nagamune T., Sasabe H., Hirata A., Ambe F., Endo I., (1992), *FEBS*, 301, 177-180.
25. Ikehata O., Nishiyama M., Horinouchi S., Beppu T., (1989), *Eur. J. Biochem.*, 181, 563-570.
26. Mayaux J., Cerbelaud E., Soubrier F., Faucher D., Pétré D., (1990), *J. Bacteriol.*, 172, 6764-6773.
27. Endo I., Nojiri M., Tsujimura M., Nakasako M., Nagashima S., Yohda M., Odaka M., (2001), *J. Inorg. Biochem.*, 83, 247-253.
28. Nakasako M., Odaka M., Yohda M., Dohmae N., Takio K., Kamiya N., Endo I., (1999), *Biochemistry*, 38, 9887-9898.
29. Piersma S. R., Nojiri M., Tsujimura M., Noguchi T., Odaka M., Yohda M., Inoue Y., Endo I., (2000), *J. Inorg. Biochem.*, 80, 283-288.
30. Tsujimura M., Dohmae N., Odaka M., Chijimatsu M., Takio K., Yohda M., Hoshino M., Nagashima S., Endo I., (1997), *J. Biol. Chem.*, 272, 29454-29459.
31. Murakami T., Nojiri M., Nakayama H., Odaka M., Yohda M., Dohmae N., Takio K., Nagamune T., (2000), *Protein Sci.*, 9, 1024-1030.
32. Dey A., Chow M., Taniguchi K., Lugo-Mas P., Davin S., Maeda M., Kovacs J. A., Odaka M., Hodgson K. O., Hedman B., Solomon E., (2006), *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 533-541.
33. Harrop T. C., Mascharak P. K., (2004), *Acc. Chem. Res.*, 34, 253-260.
34. Jackson H. L., Shoner S.C., Rittenberg D., Cowen J. C., Lovell S., Barnhart D., Kovacs J., (2001), *Inorg. Chem.*, 40, 1646-1653.
35. Nowak W., Ohtsuka Y., Hasegawa J., Nakatsuji H., (2002), *Int. J. Quant. Chem.*, 90, 1174-1187.
36. Noguchi T., Nojiri M., Takei K., Odaka M., Kamiya N., (2003), *Biochemistry*, 42, 11642-11650.
37. Suzuki H., Nojiri M., Kamiya N., Noguchi T., (2004), *J. Biochem.*, 136, 115-121.
38. Greene N. S., Chang C. H., Richards N. G. J., (2002), *Chem. Commun.*, 20, 2386-2387.
39. Chang Ch., Boone A. J., Bartlett R. J., Richards N. G. J., (2004), *Inorg. Chem.*, 43, 458-472.
40. Greene S. N., Richards N. G. J., (2006), *Inorg. Chem.*, 45, 17-36.
41. Mascharak P. K., (2002), *Coord. Chem. Rev.*, 25, 201-214.
42. Silaghi-Dumitrescu R., (2005), *Rev. Chim.*, 56, 359-362.
43. Murad F., (2004), *Bioscience Reports*, 24, 453-474.
44. L. Stryer, (1997), *Biochemia*, PWN, Warszawa, wyd. 4, s.163-169.
45. Kubiak K., Nowak W., (2006), praca w przygotowaniu (do *Biophys. J.* ).
46. Kubiak K., (2006), *Dynamiczne skutki oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego z białkami – modelowanie teoretyczne*, praca doktorska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej.
47. Kubiak K., Dobrzelecki B., Nowak W., (2003), The 9<sup>th</sup> Electronic Computational Chemistry Conference, <http://www.phys.uni.torun.pl/~wiesiek/ECCC9/Paper23.html>
48. Humphrey W., Dalke A., Schulten K., (1996), *J. Mol. Graph.*, 14, 33-38.