

Kasulikud valgud tõid Nobeli keemiapreemia

Toivo Maimets – Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituut

BAKTERID LEIUTAVAD UUSI VALKE

Valgud on elusrakkude kõige tähtsamad töömolekulid. Valkudest koosnevad pea kõik ensüümid, mis viivad läbi elutähtsaid biokeemilisi reaktsioone. Valkudest koosnevad antikehad, mis on immuunsüsteemi kesksed molekulid, ja valkudest koosnevad ka mitmesugused katte- ja kaitsestruktuurid. Raku signalisatsiooni- ja transporditegevusteski on keskne koht ikka valkudel.

Valgud on polümeersed molekulid, mis koosnevad aminohapetest. Erinevaid aminohappeid on 20 ja nad seotakse valgusünteesi käigus üksteisega kokku peptiidsideme abil. Aminohappeline järjestus valgus on geneetilise koodi kaudu seotud tema geenis – DNAs – sisalduva infoga nii, et igale aminohapele vastab DNAs kindel kolmest nukleotiidist koosnev järjestus (triplett). Erinevaid nukleotiide on 4 (tähistatakse A, T, G ja C) ning näiteks järjestusele TTT vastab aminohape fenüülalaniin, aga järjestusele GAA hoopis glutamiinhape.

Pärast seda kui Marshall Nirenberg, Heinrich J. Matthaei ja Har Gobind Khorana 1960. aastatel geneetilise koodi avastasid, usuti tõsimeeli, et kui me saame teada valgus geeni nukleotiidses järjestuses, siis suudame selle alusel ka ära arvata kodeeritava valgus omadused. Inimese genoomi järjestuse teadasaamine umbes 40 aastat hiljem näitas, et asjad ei ole nii lihtsad, nagu nad esmapilgul paistavad. Kui valke kodeerivad DNAs järjestusi on umbes 20 000, siis erinevate valkude hulk on umbes pool miljonit. DNAs järjestus on vaid üks, ehkki oluline info, mis on vajalik funktsioneeriva valgus loomiseks rakus. Lisaks sellele töötavad erinevad mehhanismid valguahela õigeks kokkupakkimiseks, erinevate keemiliste modifikatsioonide lisamiseks ning lõpuks ka õigesse kohta transportimiseks. Samuti rekombineeritakse geneetilist infot enne valgusjärjestuseks kujunemist tihti kõige fantaasiarikkamatel viisidel. Seega, DNAs

järjestus ütleb meile küll, millised on võimalikud aminohapped valgumolekulis, aga kas ja kuidas need võimalused ka tegelikult realiseeruvad ning milliseks kujuneb valgus lõplik funktsioon, on paljude teiste regulatsioonitasemetega korraldada.

1980. aastatel oli moeväljendiks „adreseeritud mutagenees“, mille eesmärk oli suunatult muuta geenijärjestusi, et saada näiteks aktiivsem ensüüm või tugevamalt seonduv antikeha. Põhiline lootus oli koostada arvutiprogrammid, mis pelgalt valgus geenijärjestusest tuletaksid tema struktuuri ja funktsiooni ning näitaksid, milliseid aminohappeid oleks vaja vahetada uute või paremate funktsioonide loomiseks. Paraku ei jõutud nende katsetega eriti kaugele. DNAs järjestuse muutmine oli lihtne, aga selle alusel valminud valgumolekul oli määratult keerulisem kui aluseks olev DNAs järjestus ning tegureid, mis määrasid ära valgus ruumilise struktuuri ja tema spetsiifilised omadused, kaugelt liiga palju, et neid mõne arvutiprogrammiga piisava täpsusega ennustada.

Kuidas siis ikkagi muuta looduslikke valke niiviisi, et neil tekiks meid huvitavad omadused, millel looduslikku vastet ei ole? Näiteks luua ensüüme, mis suudavad oma tööd teha kõrgel temperatuuril või veest erinevates keskkondades. Või töötaksid lihtsalt oluliselt efektiivsemalt.

Neile küsimustele alustas 1990. aastate alguses vastuse otsimist **Frances H. Arnold**, kelle tööd pärjati 2018. aastal poole Nobeli-preemiaga keemia alal. Idee oli lihtne: kui me ise ei suuda ennustada, milliseid aminohappeid tuleb vahetada, selleks et valgus tekiks meie soovitud omadused, siis laseme seda teha loodusel endal. Tekitades valgus geenis erinevaid juhuslikke muudatusi ning lastes rakkude kasvukeskkonnal valida välja enda jaoks sobivad (ellujäävad) rakud. Teatud (aga ainult teatud) lähenduses on protsess sarnane sellega, mida kasutab



Toivo Maimets

evolutsioon, luues mingile keskkonnale kohandunud organismitüüpe.

Arnold võttis aluseks bakteri *Bacillus subtilis* ensüümi subtilisiin E, mis on proteaas (lagundab valke, näiteks kaseiini), ja proovis sellest saada ensüümi, mis töötaks väga denatureerivates tingimustes (orgaanilises lahustis dimetüülformamiidis, DMF). Selleks võttis ta subtilisiini geeni, viis sinna sisse juhuslikud mutatsioonid ning sisestas selle bakterisse, mida kasvatas DMF keskkonnas. Ellujääjatest eraldati geen uuesti, muteeriti ning kasvatati jälle DMFis üles. Pärast nelja seeriat juhuslikku mutageneesi ja valikut DMF-keskkonnas õnnestuski eraldada ensüüm, mis oli orgaanilises lahustis 256 korda aktiivsem kui algne looduslik variant. Tuli välja, et uus ensüüm sisaldas algsuga võrreldes 10 mutatsiooni, mille asukohta ei oleks saanud arvutiprogrammid ennustada.

See töö, mis ilmus 25 aastat tagasi, pani aluse hulgaliselt uutele biotehnoloogilistele lahendustele. Nüüdseks on loodud ensüümid, mis suudavad luua uudseid materjale, mis põhinevad näiteks süsiniku-räni või süsiniku-boori sidemel. Tänu taolisele suunatud muutmisele on loodud ka mitmeid ravimeid, sealhulgas vere lipiidide sisalduse alandajaid, diabeediravimeid ja verenaastude vähendajaid. Sel moel sünteesitud ensüümid toodavad ka biokütuseid ja biolagunevaid plaste, konverteerides lihtsamaid suhkruid isobutanoliks.

BAKTERIOFAAGID LOOVAD RAVIMEID

Nagu öeldud, on inimesel umbes 20 000 erinevat geeni, mis sisaldavad infot valkude tegemiseks. Kuidas aga teada saada, milline geen konkreetsele valgule vastab? Appi tuleb meetod *phage display*, mille võiks eesti keelde tõlkida kui faagide kuvamise.

Faagid (ehk bakteriofaagid) on viirused, mis ründavad bakterirakke. Nad on ülesehituselt üsna lihtsalt, sisaldades nukleiinhapet (genoomi) ning seda katvaid valke. Kui nad tungivad raku, siis kasutatakse ära raku sünteesimehhanisme nii uue genoomi kui ka faagivalkude sünteesiks.

George P. Smith, kes koos **Gregory P. Winteriga** jagas ülejäänud poolt tänavusest Nobeli preemiast, tuli mõttele, et kui n-õ sokutada faagi suhteliselt lihtsa genoomi sisse mingeid võõraid DNA lõike, siis võiksid ka need saada bakteris transleeritud vasta-

vateks peptiidideks ehk valgulõikudeks, mis uute faagiosakeste pinnal eksponeeritud (ehk kuvatud) oleksid. Kui taolisi DNA lõike on palju erinevaid (nn raamatukogu), siis oleks tulemuseks faagiosakeste segu, mis oma pinnal sisaldab kõige erinevamaid peptiide, mis vastavad erinevatele DNA järjestustele.

Kui meil on nüüd olemas antikeha, mis tunneb ära just meid huvitava peptiidi/valgu, siis saame sellega faagide segust „kinni püüda” just seda peptiidi kandva faagi, mis sisaldab ka meid huvitavat DNA lõiku ehk valgu geeni. Geeni väljapuhastamine ülejäänud faagi DNAST ei ole enam eriti keeruline ülesanne.

1985. aastal tõestas Smith eksperimentaalselt, et see mõttekäik klappib. Peptiid, mida ta kasutas, oli 57 aminohappe pikkune lõik ensüümi restriktaasi (see lõikab DNA ahelaid spetsiifiliste järjestuste juurest). Õigete faagiosakeste n-õ väljapüüdmiseks erinevate DNA-lõikudega faagisegust kasutas ta restriktaasi äratundvat antiseerumit ning sellega oli võimalik tõepoolest otsitav restriktaasi geen üles leida. Sama meetodiga eraldas ta veel mitmete valkude geene, sealhulgas malaariaparasiidi omi, mida sai kasutada vaktsiinide arenduses.

Faagide kuvamise meetodi suurim läbimurre aga toimus uute biomolekulide tootmises, mille teerajajaks sai Gregory P. Winter. Winter hakkas selle meetodiga looma antikehi, mis hiljem said ravimiteks hulga haiguste vastu.

Inimese immuunsüsteem on võimeline tootma sadu tuhandeid erinevaid antikehasid – valke, mis tunnevad ära spetsiifilisi peptiidjärjestusi märklaudvalkudel (antigeenidel). Täpsete kontrollimehhanismidega on tagatud see, et organismi loodud antikehad ei seondu tema enda rakkudega. Mingi viiruse või bakteri sissetungi järel tekib aga antikeha, mis nendega seonduv ning sellega vallandatakse signaal agressiivsetele immuunrakkudele, kes sissetungija hävitavad.

Kuna antikehad on ääretult spetsiifilised ja leiavad oma märklauda üles kümnete tuhandete teiste hulgast, oli juba ammu otsitud selliseid antikehasid, mis tunneksid ära haiguslikes protsessides osalevaid valke. Nende abil loodeti parandada haiguste varajast diagnoosimist ja ravi.

Tavaliselt immuniseeriti katseloomi (näiteks hiiri) vastavate valkude või haigus-

like kudede lüsaatidega ning mingi aja jooksul arenesidki neis välja spetsiifilised antikehad. Kuna kasutada tuli katseloomi, olid praktilised tulemused nõrgavõitu – tihti ei toimunud loomades antikehade tootmist või kutsusid need antikehad inimeses hoopistükkis ise immuunreaktsioone esile.

1990. aastal näitas G. Winter, et on võimalik panna faage kuvama miljoneid erinevaid antikehasid (nende peptiide) ning püüda sellisest segust sobiliku n-ö konksu abil välja just õige faag. Sel moel saab keskenduda just inimese DNA järjestusele, mis välistab mitmed probleemid, mis kaasnevad antikehade tootmisega katseloomades. Seejärel on võimalik aga sellist antikeha toota suures koguses. Esimeseks katseks oli väike molekul phOx, mille vastased antikehad ta meetodi kontrollimiseks 1991. aastal eraldas.

Edaspidi aga ühendas ta faagide kuvamise meetodi Frances Arnoldi ideega valkude suunatud evolutsioonist. Kõigepealt tegi ta faagide nn raamatukogu, mis sisaldas

eri faagide pinnal tohutut hulka erinevaid inimese antikehalõike. Seejärel valis ta erinevate märklaudvalkude sidumise järgi välja sobilikud faagid, viis neisse sisse hulga juhuslikke mutatsioone ning n-ö püüdis nende hulgast taas välja faagid, mis kõige paremini märklaudadega seonduvad. Nii õnnestus tal näiteks luua antikehad, mis tunnevad ära teatud vähirakke.

Greg Winteri ja tema kolleegide loodud firma asus ka välja töötama inimesele omaseid raviotstarbelisi antikehasid. Esimene neist oli adalimumab (Humira), mis seondub põletikes ja mitmetes autoimmuunhaigustes osaleva valguga TNF-alfa. Praegu ravitakse sellega reumatoidartriiti, erinevaid psoriaasi ja soolepõletiku vorme. Eelmise aastal oli see maailma müüduim ravim, tuues sisse 18,4 miljardit dollarit.

Viimased aastad on kaasa toonud inimesele omastel antikehadel põhinevate ravimite plahvatusliku arengu, mis on suunatud näiteks Alzheimeri tõve, luupuse ja erinevate vähivormide vastu.