

Enzymer udnytter kaos til grundig afsøgning af overflader

Enzymer er langt mere effektive til at finde substratmolekyler end forventet ud fra en model af Brownske bevægelser

Af Rasmus Hansen¹, Thomas H. Callisen² & Ole Hassager¹

¹Institut for Kemiteknik, Dansk Polymer Center, DTU. ²Novozymes R&D

Enzymer er naturens molekylære katalysatorer. I biologiske organismer forøger enzymer hastighederne, hvormed kemiske reaktioner foregår. Uden enzymer ville liv, som vi kender det, ikke kunne eksistere. Enzymer er udviklet på den evolutionære tidsskala til at katalysere specifikke kemiske reaktioner. Mennesker har siden bioteknologiens begyndelse været interesseret i at benytte naturens udviklede molekyler i en teknologisk sammenhæng. Således afhænger mange teknologiske processer af mobilitet af enzymer på substratoverflader*, herunder kan nævnes biologiske vaskemidler, fødevarerproduktion samt anvendelser af mikro- og nanochips i sygdomsdiagnose. Vores viden om de underliggende mekanismer for enzyms virke er endnu mangelfuld. Reduktionistisk tankegang i forskning, såvel som nye avancerede eksperimentelle teknikker, har ført til en dybere forståelse af enzyms dynamik på *mikroskopisk* skala¹. Men hvordan opfører enzymer sig på den større *mesoskopiske* skala?

Et interessant og påtrængende spørgsmål i moderne biofysisk forskning er, om enzymer, ud over at være evolutionært udviklet til substratspecificitet, desuden er optimeret til andre formål på en større tidsskala. Ved at anvende nye avancerede eksperimentelle teknikker har forskere fra Novozymes A/S nu optaget bevægelsen af et enkelt enzymmolekyle på en substratoverflade. De specielle bevægelsesmønstre afslører, at enzymer udnytter kaos til at udføre en grundigere afsøgning af en overflade end tidligere antaget.

Tekniske termer (*)

Substrat: Det molekyle enzymet virker på. Enzymer katalyserer omdannelsen af substrat til produkt ved en kemisk reaktion.

Lipase: Enzym der katalyserer spaltningen af fedtstoffer (lipider) i vand.

Diffusion: Transport af stof eller energi på basis af molekylers kaotiske bevægelser.

Mærkning: For at kunne spore enzymet anvendes fluoroforer og "kvanteprikker".

Enzyms kaotiske kravlen trodser klassisk forståelse

I det tidlige 19. århundrede opdagede Robert Brown pollenpartiklers kaotiske bevægelser i vand (se boks: Deterministisk kaos), nu almen kendt under benævnelsen Brownske bevægelser. En partikel, der undergår Brownske bevægelser (Brownsk partikel), bliver bombarderet med vandmolekyler fra alle sider. Statistisk set forøges afstanden x partiklen har bevæget sig proportionalt med kvadratroden af tiden t ; $x \sim t^{1/2}$. Denne lov, som Albert Einstein beviste i sin forklaring af Brownske bevægelser i 1905, har lige siden skabt grundlag for analyser af små partiklers kaotiske bevægelser i opløsning. Denne teori var derved også udgangspunktet, da eksperimenter med lipases* bevægelser på substratoverflader, foretaget af en gruppe forskere på Novozymes A/S

[1], påviste, at enzymet flytter sig som funktion af tiden ifølge relation; $x \sim t^{0.26}$. Altså med en eksponent 0.26 omtrent halvt så stor som for Brownske partikler. Denne langsommere type bevægelse står derved i kontrast til Brownske bevægelser og klassisk diffusionsteori*, og kaldes *anormal subdiffusion*.

Tiltrækningsenergien mellem enzymet og overfladen forklarer anomali

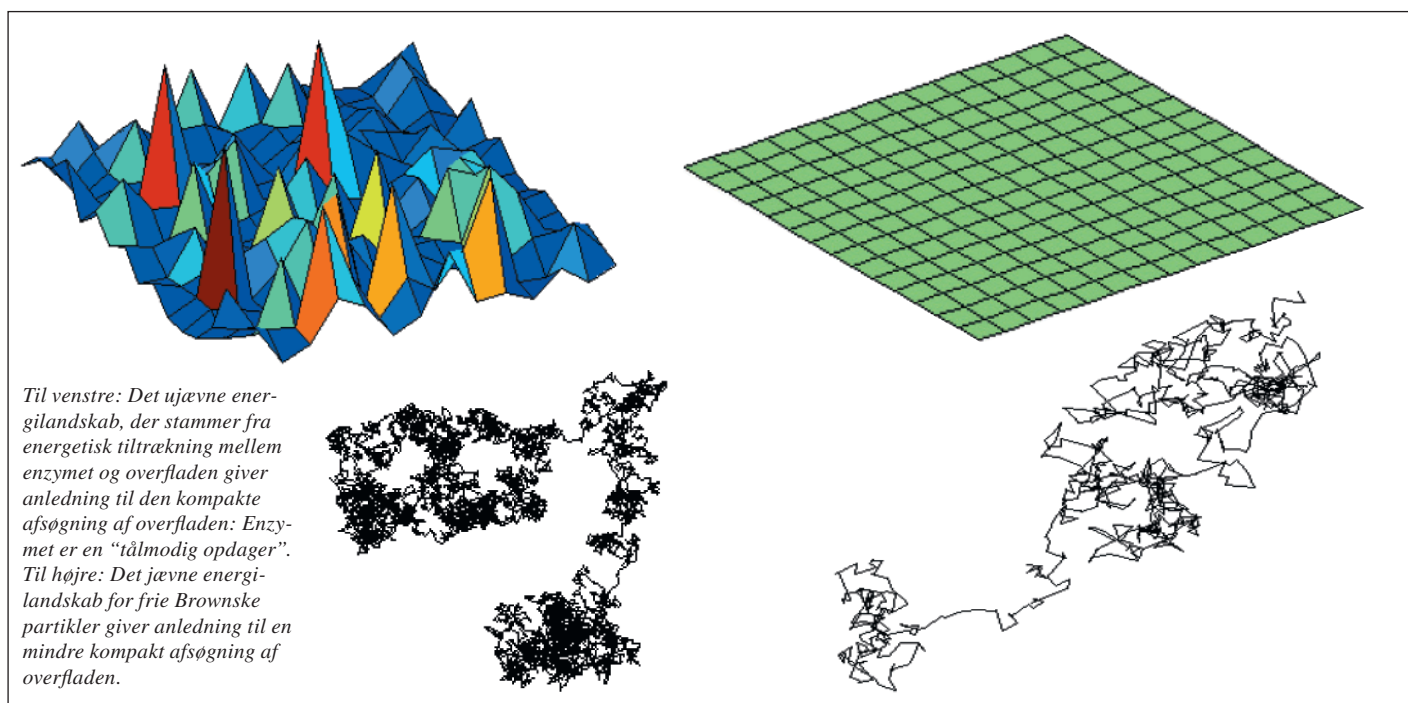
Det viste sig, at eksponenten 0.26 er uafhængig af graden af enzymets katalytiske aktivitet samt de eksperimentelle mærkningsprocedurer*. Eksponenten viste såkaldt *universalitet*. Ved anvendelse af den eksperimentelt opdagede universalitet, i en teoretisk model for anormal subdiffusion, antydes, at det er den strukturelle kompleksitet af enzymet, der bestemmer overflademobiliteten. Enzymets komplicerede struktur kan give anledning til et bredt spektrum af tiltrækningsenergi mellem enzymet og overfladen. Det følgende ujævne energilandskab kan give anledning til den observerede anormale subdiffusion. Denne opdagelse bidrager med dybere forståelse af enzyms dynamik på substratoverflader og danner grundlag for en konsistent fremtidig ramme til eksperimentel karakterisering af enzyms mobilitet. Men er der nogle fordele ved den langsommere bevægelse?

Enzymet er en tålmodig opdager

Fra et molekylært evolutionsmæssigt perspektiv lader det til, at naturen har udviklet kemiske katalysatorer, der udnytter molekylært kaos til fordelagtig dækning af overflader. Det er på basis af teorien for tilfældige bevægelser (stokastisk dynamik) muligt at udregne kompakheden C af lipasens bane; $C \sim 1/(\alpha \ln t)$, hvor α er den ovenfor omtalte eksponent. Vi bemærker to ting fra dette udtryk: 1) Kompakheden ses at aftage som funktion af tiden. 2) Under sammenligning med Brownske bevægelser ($\alpha = 0,5$) ses, at den langsommere dynamik af anormal subdiffusion, grundet

Deterministisk kaos

Determinisme betyder lovmæssighed. Betegnelsen anvendes i naturvidenskaben om systemer, der er underlagt eksakte love uden tilfældige påvirkninger (støj). Eksempler på deterministiske systemer er Newtons love fra den klassiske mekanik og Maxwells love for elektrodynamikken. *Deterministisk kaos* er dynamik, der forekommer tilfældig på trods af, at det observerede system er deterministisk og derved ikke underlagt tilfældige påvirkninger. Deterministisk kaotiske systemer forekommer regelmæssige på korte tidsskalaer, men med tiden bliver regelmæssighed udvisket, og systemets kaotiske natur medfører tilsyneladende tilfældighed. Tænk f.eks. på en terning der forlader din hånd på vej imod spillebordet. Først forudsigelighed – dernæst tilfældighed - klart deterministisk (Newtons 2. lov).



Til venstre: Det ujævne energilandskab, der stammer fra energetisk tiltrækning mellem enzymet og overfladen giver anledning til den kompakte afsøgning af overfladen: Enzymet er en "tålmodig opdager". Til højre: Det jævne energilandskab for frie Brownske partikler giver anledning til en mindre kompakt afsøgning af overfladen.

Brownske bevægelser kontra anormal subdiffusion

Albert Einstein forklarede, i en af sine berømte artikler fra 1905, hvorfor Brownske partikler følger relationen; $x \sim t^{1/2}$. Einstein havde indsigt i universets - og derved også vandets - opdeling i molekyler, der kolliderer med partiklen. Hans forklaring af Browns forsøg er baseret på antagelsen om eksistens af en mikroskopisk tidsskala τ , der refererer til den tid, der typisk går imellem kollisioner mellem partiklen og vandmolekyler. Grundet molekylært kaos vil partiklens bevægelse forekomme uregelmæssig og tilfældig. Hvis man venter lang tid nok ($T = \text{stort tal} \times \tau$) vil partiklen typisk have bevæget sig en givet afstand λ i en tilfældig retning. Tiden T siges at *separere* mikro- og makroskopisk skala, regelmæssighed og tilfældighed. Man kan nu forestille sig at betragte bevægelsen af partiklen som skridt af afstanden λ i tilfældige retninger, hvert T 'ende sekund. I teoretisk fysik kaldes dette en *renormalisering* af tid og rum. Det er vigtigt at understrege, at vores eneste antagelse er eksistens af en tidsskala τ for molekylære kollisioner samt en tilhørende længdeskala λ , hvorpå molekylært kaos har udvisket forudsigeligheden af partiklens retning. På basis af disse antagelser kan man ved brug af simpel sandsynlighedsregning beregne Browns observerede lov, $x \sim t^{1/2}$. For at enhederne stemmer kræves, at proportionalitetskonstanten har størrelsesorden $\lambda T^{1/2}$. Den fundamentale forskel på Brownske bevægelser og anormal subdiffusion er, at der for anormal subdiffusion ikke eksisterer nogen mikroskopisk tidsskala, hvilket resulterer i at det mikroskopiske og det makroskopiske ikke kan separeres. Fraværet af denne mikroskopiske tidsskala skyldes, at den begrænsende faktor for dynamikken ikke længere er kollisioner mellem vandmolekylerne og partiklen. Dynamikken er nu styret af et ujævnt energilandskab, der stammer fra tiltrækning mellem partiklen og overfladen. Energien spænder over så bredt et spektrum, at der ikke eksisterer en typisk tidsskala - partiklen kan ved den rette orientering og konfiguration sidde fast et bestemt sted på overfladen på ubestemt tid. Sammenlignet med Brownske bevægelser medfører dette en langsommere dynamik bestemt ved $x \sim t^\alpha$, hvor eksponenten $\alpha < 0.5$. Partiklen bremses, så at sige, mens den bumper gennem et ujævnt energilandskab.

den lavere eksponent $\alpha = 0,26$, er assisteret af en mere kompakt dækning af overflader (se også figuren). Af denne grund kan lipase med rette kaldes en "tålmodig opdager". Hvis vi forestiller os en substratoverflade, hvor der placeres lipaser, kan man tilsvarende beregne sandsynligheden for at et bestemt område på overfladen besøges af et lipase molekyle. Resultatet, som dog er en anelse mere matematisk kompliceret, viser at denne sandsynlighed forøges med aftagende eksponent. Altså vil den anormale subdiffusion, ved sammenligning med Brownske bevægelser, medføre at substratmolekyler oftere møder et enzym. Vi siger, at substratets *overlevelsessandsynlighed* aftager. Enzymet udnytter derved det kaotiske miljø i vandet samt tiltrækning til overfladen, til at afsøge overfladen på en grundigere måde end først antaget på basis af teorien for Brownske bevægelser.

Fremtiden

Resultaterne har givet fornyet indsigt i enzyms dynamik på makroskopiske tidsskalaer og antages på sigt at assistere optimeret design af bioteknologiske processer. Resultaterne giver desuden anledning til flere lovende veje for fremtidige eksperimentelle og teoretiske studier af mobilitet af komplekse biologiske makromolekyler på overflader. Det er sandsynligt at enzymforskning i det 21. århundrede vil klarlægge yderligere detaljer af de molekylære mekanismer der ligger bag disse kompakte bevægelsesmønstre.

Rasmus Hansen takker Novozymes A/S for økonomisk support.

E-mail-adresser

Thomas H. Callisen: CALL@novozymes.com

Rasmus Hansen: rah@kt.dtu.dk

Ole Hasager: OH@kt.dtu.dk

¹⁾ Nye udviklinger flytter konstant grænsen for definitionen af mikroskopisk skala. I dag er 10^{-15} s og 10^{-10} m passende tids- og rumskala. Mesoskopisk skala er betegnelsen for en mellemliggende tids- og rumskala, hvor atomare detaljer er underordnede, mens statistisk midlede størrelser såsom diffusionsflux og koncentration kan defineres.

Referencer

I. A. W. Sonesson, U. M. Elofsson, T. H. Callisen & H. Brismar, *Tracking Single Lipase Molecules on a Trimyristin Substrate Surface Using Quantum Dots*, *Langmuir* **2007**, 23, 8352-8356.