

Rationelt design af enzymer

– fremtidens mikroskopiske industrirobotter

I en tid hvor klimaforandringer og forsyningssikkerhed dikterer et brud med fossil olie, er jagten gået ind på alternativer. Der er et enormt potentiale i at anvende cellulose som et sådan alternativ. Ved at udvikle nye og effektive enzymer kan nedbrydningen af cellulose gøres mere effektiv og cellulosens potentiale som råstof kan for alvor realiseres.

Af Johan Pelck Olsen og Jeppe Kari,
ph.d.-studerende ved Roskilde Universitet

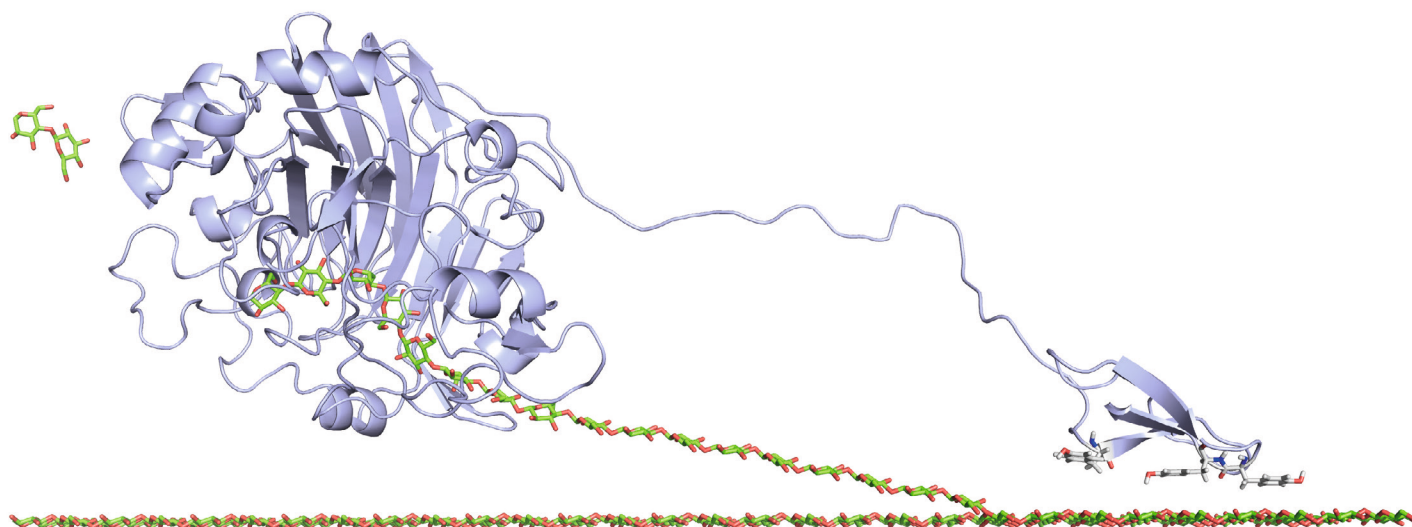
Enzymer er en gruppe af proteiner, der katalyserer forskellige kemiske reaktioner. Allerede i dag spiller enzymteknologi en stor rolle i fødevarer- og tekstilindustrien, ligesom enzymer findes i mange forbrugsprodukter lige fra vaskemiddel til kontaktlinserens.

I nogle tilfælde erstatter enzymerne kemikalier, der er dyre eller skadelige for miljøet, og i andre tilfælde bruges de til at katalysere processer, der slet ikke eksisterede tidligere. En af de store fordele ved enzymer er, at de er enormt specifikke. F.eks. kan vaskepulver indeholde lipaser, der nedbryder fedtpletter

bruger dem i hjemmet eller industrien, opstår der ofte problemer, fordi de nu skal operere under andre betingelser, end de er optimeret til.

Det rette enzym til opgaven

Langt størstedelen af de enzymer, der anvendes i dag, er fundet i naturen. Gennem adskillige årtier har man arbejdet med at screene forskellige mikroorganismer for specifikke enzymaktiviteter under relevante betingelser, for så at oprense de mest lovende organismer og isolere enzymerne herfra. Ved at lede i varme kilder er det f.eks. lykkedes at isolere enzymer, der er stabile ved op imod 100°C. Det kan være en fordel i fødevarerindustrien, hvor bakterievækst udgør et problem, eller industrier



Figur 1. 3D-struktur af en cellulase (*TrCel7A*). Enzymet består af to domæner forbundet af et fleksibelt led. Længst til venstre ses det katalytiske domæne med et tunnel-formet aktivt site, hvor selve hydrolysen finder sted. Til højre er et "anker", der hjælper enzymet med at holde sig fast til cellulosen.

uden at have nogen effekt på tekstilerne. Derudover er enzymer biologisk nedbrydelige, så modsat mange husholdningskemikalier udgør de ingen belastning af vores spildevand. Desværre er enzymernes fordele også en ulempe. Den nøje tilpassede aktivitet, som enzymet gennem mange tusinde års evolution har optimeret til et bestemt biologisk system, er sårbar overfor ændringer. Når vi tager dem ud af deres vante omgivelser og

hvor tilstødende processer foregår ved høje temperaturer, og man dermed kan mindske kølebehovet. Der er dog stadig langt fra de forhold, der hersker i den fri natur til forholdene i en typisk industriel proces, og derfor går man langt for at lave nye, optimerede enzymer, der virker bedst i lige præcis den sammenhæng, hvor man ønsker at bruge dem. Med et engelsk udtryk kaldes dette for "protein engineering", altså udvikling

eller konstruktion af proteiner. Begrebet dækker typisk over to tilgange, nemlig dirigeret evolution og rationelt design. Dirigeret evolution går ud på at påføre et enzym en stor mængde tilfældige ændringer og efterfølgende undersøge om disse ændringer måtte være gunstige. Rationelt design, som vi her vil beskæftige os nærmere med, er derimod ikke spor tilfældigt, men styret helt ned i detaljen. Som navnet antyder, starter rationelt design med et rationale, altså en idé om hvordan et givet enzym virker, og hvad man måtte ønske at ændre ved det. Derefter kommer designfasen, hvor rationale oversættes til konkrete ændringer i enzymets struktur, og forhåbentlig derved opnås de ønskede ændringer i enzymets egenskaber.

Industrielt design på nanoskala

Som alle andre proteiner er enzymer opbygget som en lang kæde af aminosyrer, der er rullet op til en kompakt struktur. Aminosyrerne bindes sammen af peptidbindinger, der tilsammen udgør en "rygrad" i kæden. De forskellige aminosyrer har forskellige funktionelle grupper, der stikker ud fra denne rygrad og giver enzymet dets funktion. Den rationelle del af rationelt design beror i høj grad på et grundlæggende kendskab til enzymets funktion. Gennem grundig karakterisering af enzymets aktivitet kan man gøre sig klart, hvad der måtte være udfordringen for et givent enzym under de relevante betingelser. Ved at kigge på enzymets 3D-struktur kan man gøre sig idéer om, hvilke aminosyrer der kan tænkes at spille en rolle for de egenskaber, man ønsker at forbedre. Disse aminosyrer kan man så ændre, se faktaboks 1, og efterfølgende udføre eksperimenter for at be- eller afkræfte sine antagelser. Processen har været kendt og anvendt i 30-40 år, primært i grundforskningen. Man har f.eks. fjernet et enzyms katalytiske aktivitet og dermed op-

nået klarhed om den specifikke kemiske reaktionsvej. Dette har bidraget enormt til vores viden om enzymer, men er i sig selv ikke noget, der i sig selv fører til bedre enzymer. Det er først i løbet af de seneste år, at forskere og virksomheder er begyndt at bruge teknikken til at forbedre egenskaber som stabilitet og specificitet, med henblik på enzymernes anvendelse.

2. generations bioethanol

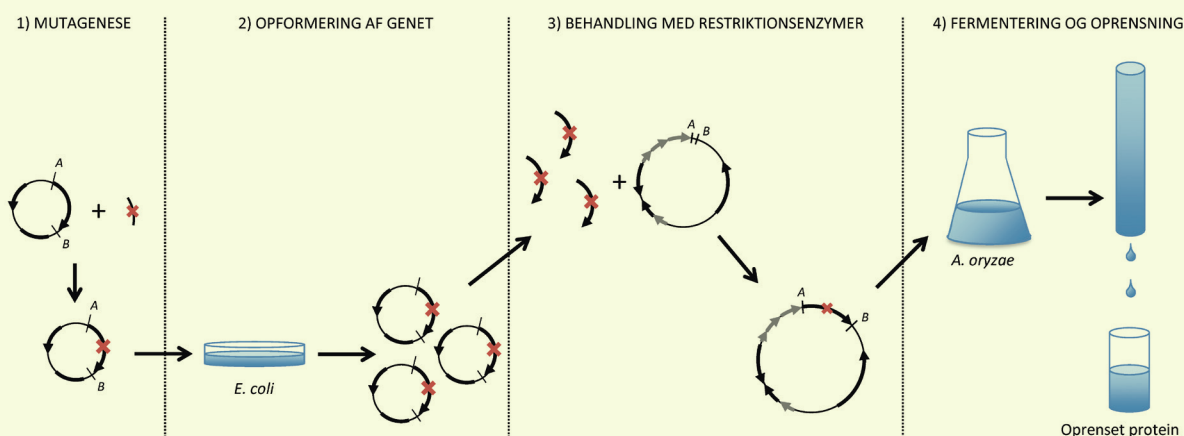
På Roskilde Universitet har vi i samarbejde med Novozymes brugt rationelt design til at udvikle nye enzymer, der katalyserer nedbrydningen af cellulose – såkaldte cellulaser. Cellulose er det hyppigst forekommende biologiske materiale på jorden og udgør den største bestanddel af plantemateriale som f.eks. blade og stængler. Cellulose består af lange kæder af glukose, der som bekendt er en fremragende kilde til energi. Derfor er der også et kæmpe potentiale i at nedbryde cellulose fra planteffald til glukose, og derefter gære glukosen til sprit, der kan bruges som brændstof. Dette brændstof kaldes 2. generations bioethanol, fordi der – i modsætning til 1. generation – ikke anvendes fødevarer i produktionen.

Desværre er cellulose utrolig stabilt; halveringstiden for den spontane hydrolyse er fem millioner år. I den industrielle produktion af bioethanol er man derfor afhængig af cellulaser, der øger nedbrydningshastigheden. De nuværende cellulaser kan øge nedbrydningen af cellulose omkring 10^{15} gange. Selvom det lyder som en helt utrolig forbedring, er cellulaser stadig relativt langsomme med omkring 1 klip i sekundet og i den nuværende produktion er den enzymatiske nedbrydning også den dyreste og mest tidskrævende proces. Der er derfor et stigende behov for mere effektive cellulaser til at omdanne biomasse til sukker. ►

■ Faktaboks 1 Produktion af enzym-varianter

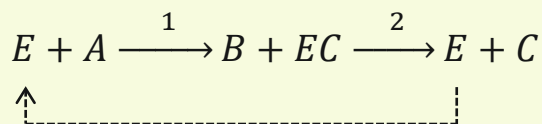
Når man ønsker at introducere en ændring i et protein, starter man med at lave ændringen i det DNA, der koder for proteinet. Et cirkulært stykke DNA kaldes et plasmid.

- 1) Først kopieres et plasmid med et gen, der koder for proteinet vha. en proces kaldet PCR (polymerase chain reaction). Som skabelon bruges en lille stump syntetisk DNA, der indeholder den ønskede ændring i koden. Fordi der er en "fejl" i skabelonen, vil alle de nye kopier have den samme ændring.
- 2) Bakterien *E.coli* optager det muterede DNA og opformerer det yderligere.
- 3) Genet klippes ud af det opformede DNA ved hjælp af restriktions-enzymmer, der klipper i DNA på meget specifikke steder (hhv. A og B). Svampeplasmidet har de samme to steder og klippes tilsvarende op. Når DNA'et er klippet, danner det "klistrede ender", der passer sammen i stil med velcro. Derfor sætter genet sig den rigtige vej på det rigtige sted i svampe-plasmidet.
- 4) En mug-svamp (*A.oryzae*) optager plasmidet og begynder at producere det muterede protein. Til sidst oprenses proteinet ved kromatografi.



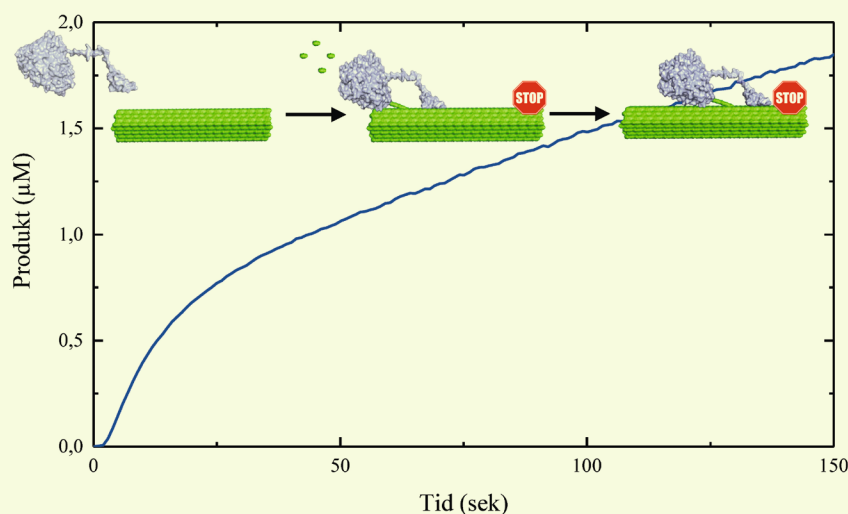
Faktaboks 2 Burst-teori for cellulaser

Nogle enzymer udviser et såkaldt "burst" i deres aktivitet. Det vil sige, at aktiviteten starter med at være høj, men efter kort tid falder til et langt lavere niveau. Et sådan forløb kan forklares ud fra en model, hvor enzymet frigiver sit produkt i to sekventielle skridt, som i nedenstående skema.



Hvis skridt 1 er meget hurtigere end skridt 2, vil man se en hurtig produktion af B (burst) i starten af reaktionen. Efter kort tid vil det langsomme skridt 2 føre til, at størstedelen af enzymet sidder inaktivt bundet til C, og derfor vil produktionen af B også falde. Ønsker man at forstå den overordnede reaktion, er det nødvendigt at karakterisere reaktionen med en tidsopløsning, som er hurtigere end det første skridt. Måler man efter step 1 er indtruffet, vil signalet være domineret af den langsomme reaktion. Det svarer til, at man ønsker at måle sin topfart på vej til arbejde og kun ser på den tid, det har taget at tilbagelægge strækningen. Sidder man eksempelvis i kø eller holder for rødt lys, vil det dominere ens måling.

Cellulaser udviser et tydeligt burst i deres aktivitet. I nedenstående graf kan man følge produktionen af sukker efter tilsættelse af et cellulase-enzym til en suspension af cellulose-partikler. Den høje tidsopløsning gør det muligt at følge forskellige faser af reaktionen. Den hurtige reaktion i starten er den uhindrede frigivelse af sukker og kan sammenlignes med skridt 1 i ovenstående reaktion. Hvis enzymerne møder en forhindring, sidder de fast, og da frigivelsen af enzymet er langsom, kan den sammenlignes med reaktion 2.



Hvad er flaskehalsen?

For at kunne optimere de nuværende cellulaser vha. rationel design har vi studeret kendte cellulaser med det formål at finde deres stærke og svage sider. Under dette arbejde opdagede vi et interessant fænomen: Efter blot 50 sekunder har cellulaserne tabt 1/6 af starthastigheden, se faktaboks 2. Med andre ord havde enzymerne et langt større potentiale for at nedbryde biomasse end først antaget. Årsagen til dette pludselige tab i aktivitet viste sig at være direkte relateret til cellulaserne struktur.

De fleste cellulaser er opbygget på en speciel måde, der hjælper dem til at nedbryde det ellers genstridige cellulose. Enzymet har to funktionelle dele, som er forbundet med et fleksibelt forbindingsled, se figur 1. Den forreste del har en flad side, der kan sidde fast på cellulosen og på den måde forankre enzymet. Den bagerste del har til gengæld en tunnel, som lige passer til

en cellulosekæde. På den måde holder enzymet sig fast til den samme kæde og rykker fremad i takt med, at cellulosen nedbrydes én sukkerenhed ad gangen. Det er selvfølgelig en praktisk struktur, men den medfører et problem for enzymet: Hvis det støder på en forhindring på sin vej, sidder det så godt fast til cellulosen, at det bliver siddende foran forhindringen og dermed ikke kan gøre sit arbejde. Hvis et træ vælter over togs Skinnerne, kan toget ikke køre og på samme måde med dette enzym. Derfor er frigivelsen af sukker inddelt i to faser: Til at starte med finder alle enzymer et frit stykke cellulose og kører derudad med fuld hastighed. Efter få sekunder begynder de første enzymer dog at støde på forhindringer, hvor de sidder fast og ikke laver sukker. Først når de tilfældigvis falder af, kan de finde en ny, fri strækning og begynde at køre igen. Resultatet bliver, at efter et minuts tid sidder størstedelen af enzymerne uproduktivt fast foran en forhindring, hvor de bare venter på at falde af [1].

Løser greb giver hurtigere enzym

Konsekvensen af den ovenstående forklaring må nødvendigvis være, at man kan forbedre enzymet ved at slække bindingen til cellulosen. Ved at kigge på en 3D computermodel af enzymet og sammenligne med lignende enzymer kan man få en fornemmelse for, hvilke aminosyrer der ligger tæt på cellulosekæden og sandsynligvis har en indflydelse på bindingen. På Roskilde Universitet og Novozymes har vi på den måde identificeret flere aminosyrer, som vi har udskiftet med andre, som beskrevet i faktaboks 1. side 17. Vores opfølgende undersøgelser har vist, at det både er lykkedes at svække bindingen som ønsket, men derud-

over at den svækkede binding rent faktisk har ført til en forøget hastighed [2]. Nu ligger der så en række grundigere undersøgelser forude, der skal klarlægge, hvorvidt forbedringerne også slår igennem udenfor laboratoriet. Hvis det viser sig at være tilfældet, er vi måske et skridt nærmere et samfund, hvor CO₂-udslip og olieafhængighed hører fortiden til.

E-mail:

Johan Pelck Olsen: jool@ruc.dk

Jeppe Kari: jkari@ruc.dk

Referencer

1. Praestgaard, E., et al., A kinetic model for the burst phase of processive cellulases. FEBS Journal, 2011. **278**(9): p. 1.547-1.560.
2. Kari, J., et al., Kinetics of cellobiohydrolase (Cel7A) variants with lowered substrate affinity. J Biol Chem, 2014. **89**(47): p. 32.459-68.