

Rumlig organisering af enzymer øger cellefabrikkers effektivitet

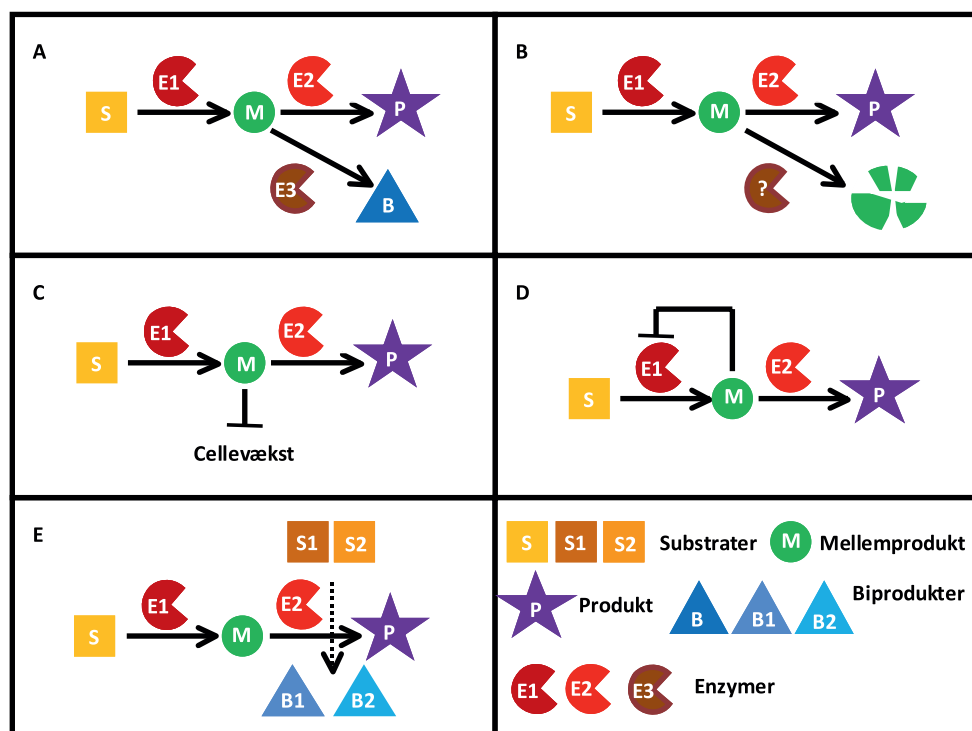
Enzymer, som katalyserer fortløbende trin i en syntesevej, anbringes ofte i nærheden af hinanden inde i cellen. Det regulerer effektivt metabolismen. Alligevel er den rumlige organisering af biosynteseveje et overset område, når man forsøger at optimere nye, ikke naturlige biosynteseveje vha. metabolic engineering. Men hvorfor? Og hvordan kan rumlig organisering øge cellefabrikkers effektivitet?

Af postdoc Line Albertsen og lektor Uffe Mortsen, Center for Mikrobiel Bioteknologi (CMB), Institut for Systembiologi, DTU

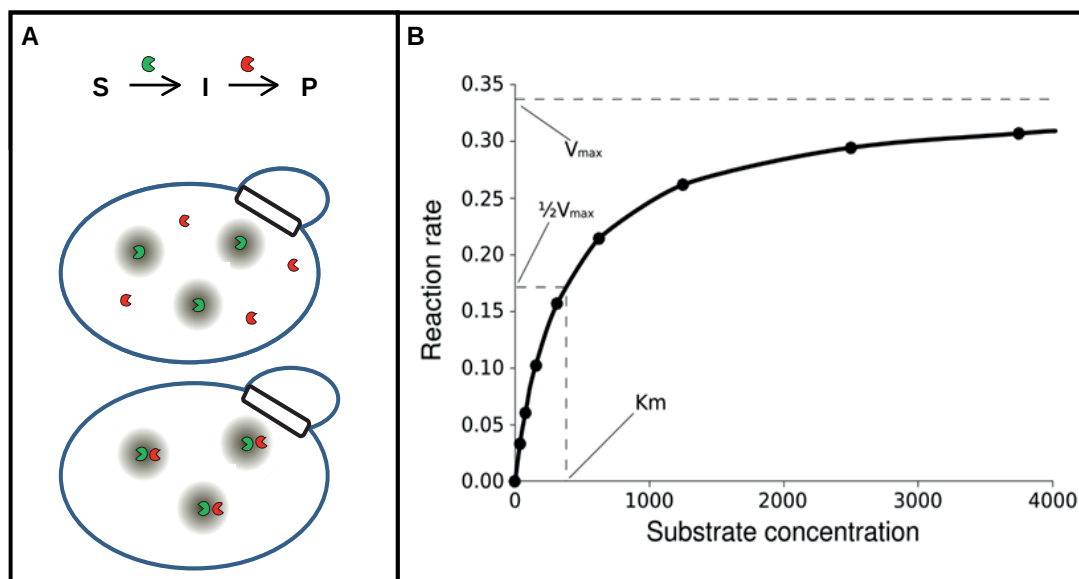
En række værdifulde naturstoffer, som anvendes i fødevarer, kosmetik og medicin, produceres i dag i forskellige mikroorganismer - populært betegnet cellefabrikker. Produktionen i cellefabrikker har mange fordele frem for konventionelle produktionsmetoder som kemisk syntese eller ekstraktion fra den naturlige kilde. Sammenlignet med ekstraktion fra den naturlige kilde er produktionen i cellefabrikker ofte billigere og det er nemmere at opnå et rent produkt. Ift. kemisk

syntese er en af de væsentligste forskelle, at der ved kemisk produktion forbruges mange giftige opløsningsmidler, mens cellefabrikker anvender CO₂-neutrale substrater og kun sjældent resulterer i giftige spildprodukter. Desuden er kompleksiteten af mange naturstoffer så stor, at kemisk syntese ofte er umulig eller meget vanskelig. Det gælder f.eks. anticancerstoffet taxol, der indeholder 11 chirale centre og bl.a. derfor er svært at syntetisere kemisk [1]. Cellefabrikker udgør således et godt og miljørigtigt alternativ til kemisk produktion.

For at gøre cellefabrikker økonomisk rentable er det dog oftest nødvendigt at udføre et udviklingsarbejde. I den



Figur 1. Forskellige scenarier som kan mindske gennemstrømningen i retning af et ønsket produkt i en cellefabrik. Som eksempler er vist generiske biosynteseveje, hvor produktet (P) dannes ud fra substratet (S) via et mellemprodukt (M). A) Mellemproduktet er substrat for andre enzymer som omdanner det til et uønsket biprodukt. B) Mellemproduktet er ustabilt og nedbrydes hurtigt via kemiske eller enzymatiske reaktioner. C) Mellemproduktet er toksisk og inhiberer cellevækst. D) Mellemproduktet inhiberer et enzym, som katalyserer et forudgående trin i biosyntesen. E) Andre substrater konkurrerer med mellemproduktet om at blive substrat for enzymet (E2), som katalyserer dannelsen af det ønskede produkt (P).



Figur 2. Proksimitet af enzymer, som katalyserer på hinanden følgende trin, øger reaktionshastigheden. A) Hvis to enzymer, som katalyserer fortløbende trin i en syntesevej, anbringes i nærheden af hinanden, opstår der en lokalt højere koncentration af substrat omkring det enzym, som katalyserer 2. trin i syntesevejen. B) Ifølge Michaelis-Menten-kinetik stiger reaktionshastigheden med substratkoncentrationen, indtil der opstår mætning af enzymet. Koncentrationen af substrater i celler er generelt i området fra $1/100^{-1}$ af K_m . Dvs. at der sjældent forekommer mættende substratkoncentrationer inde i cellen, og derfor kan en opkoncentrering øge reaktionshastigheden.

forbindelse er man nødt til at gøre sig klart, hvilke udfordringer man står overfor, når man vil øge produktionen i en cellefabrik. Figur 1 viser nogle typiske eksempler på, hvad der begrænser effektiviteten af cellefabrikker.

Optimering af cellefabrikker

Cellens metabolisme består af et stort netværk af biokemiske reaktioner, der sikrer cellen energi samt byggesten til formering og vækst. Bagegæren *Saccharomyces cerevisiae* er en populær ►

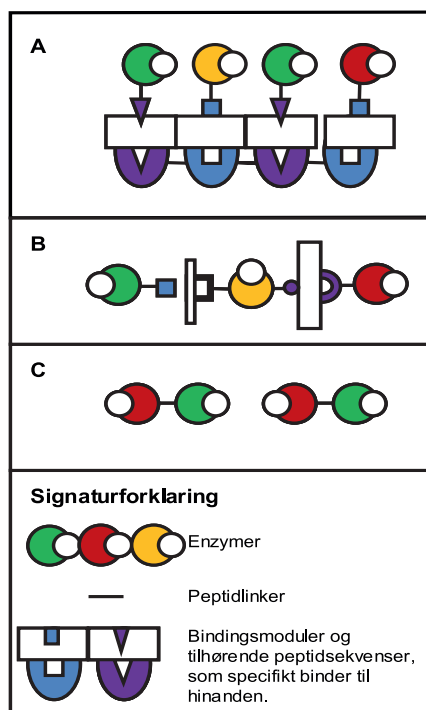


Sidsel Hauge er European Patent Attorney og ekspert inden for life science og kemi.

FREMGANG? DENNE VEJ.

Vi giver ikke op, før vi har fundet den bedste vej fremad for hver eneste kunde. Vi er strategiske rådgivere for nogle af verdens mest fremgangsrige virksomheder. Vi giver klare og tydelige råd, og vi står inde for dem. Vi er 300 medarbejdere, heraf 160 konsulenter inden for immaterialret, fordelt på 13 kontorer i Danmark, Sverige og Tyskland. Kontakt os, hvis vi skal hjælpe dig. www.awapatent.com

AWAPATENT
INTELLECTUAL PROPERTY FOR BETTER BUSINESS

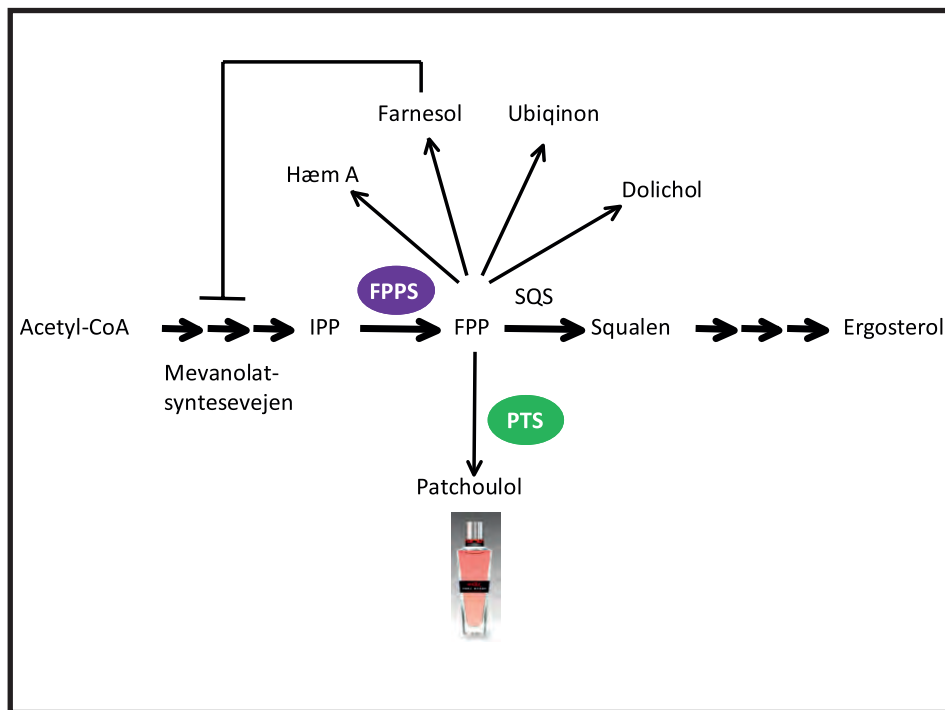


Figur 3. Med moderne genteknologi kan enzymer anbringes i nærheden af hinanden ved A) at samle dem på en platform bestående af bestemte bindingsmoduler, B) at bringe dem til at interagere vha. bindingssekvenser og tilhørende genkendelsessekvenser eller ved C) at de fusioneres via en peptidlinker.

cellefabrik og anvendes bl.a. til produktion af insulin. Blandt gærs naturlige hovedprodukter er CO_2 og ethanol. Hvis man ønsker, at gær skal producere andre stoffer end dets naturlige hovedprodukter i høje koncentrationer, er det nødvendigt at om dirigere metabolismen i retning af det produkt, man ønsker – et forskningsfelt som betegnes metabolic engineering. Det er vigtigt, at denne om dirigering er balanceret, da cellen stadig skal kunne opretholde sin egen produktion af energi og ressourcer, så den kan vokse. Inden for metabolic engineering er det populært at om dirigere metabolismen i retning af et ønsket produkt ved at overudtrykke de enzymer, som er direkte ansvarlige for syntesen af stoffet. Ideen er, at man ved en generel forøgelse af alle synteseenzymernes koncentration kan øge gennemstrømningen i syntesevejen. Denne fremgangsmåde kan dog føre til en unødigt høj belastning af cellens produktionsapparat og resultere i, at cellevæksten hæmmes.

Som et alternativ til overudtrykkelse af enzymer kan man anvende rumlig organisering af enzymer til at øge produktionen af et specifikt produkt. Selvom teknikken bygger på velkendte principper inden for biokemi, har den kun været meget lidt

anvendt inden for metabolic engineering. For nylig er interessen dog steget markant og Jay Keasling, som er en førende forsker inden for feltet har udtalt: "at undlade at tage højde for den rumlige organisering ved optime-



Figur 4. Biosyntesevejen som fører til patchoulolproduktion i *Saccharomyces cerevisiae*. Genet kodende for patchoulolsyntase (PTS) er indsat i gærgenomet for at muliggøre produktionen af patchoulol ud fra farnesyldiphosphat (FPP). FPP er også substrat for en række naturligt forekommende gærenzymer, som katalyserer omdannelsen af FPP til hæm A, farnesol, ubiquinon, dolichol og squalen.

ring af cellefabrikker er som at lægge togs Skinner uden at forbinde dem" [2]. Ifølge ham undlader man således at benytte et af de mest oplagte værktøjer, hvis man ignorerer den rumlige organisering, når man forsøger at forbedre cellefabrikker.

Hvorfor kan rumlig organisering af enzymer forbedre effektiviteten af cellefabrikker?

Ved optimering af den rumlige organisering af enzymer udnytter man, at hastigheden af en enzymatisk katalyseret reaktion afhænger af substratkoncentrationen og at en højere substratkoncentration medfører en øget reaktionshastighed (figur 2B). Ved at anbringe enzymer, som katalyserer fortløbende syntesetrin i nærheden af hinanden, er det muligt at øge substratkoncentrationen lokalt omkring det enzym som katalyserer substratets omdannelse (figur 2A). På den måde kan man øge reaktionshastigheden for en bestemt enzymatisk reaktion, uden at cellens metabolisme belastes unødigt ved en generel overudtrykkelse af enzymet. Det kan være en fordel for alle de scenarier, som er vist i figur 1, fordi en øget reaktionshastighed må forventes at resultere i:

- En kortere levetid af mellemproduktet. Dette er en fordel i situationer, hvor mellemproduktet kan forsvinde ved nedbrydning, enzymatiske omdannelser eller ved diffusion ud af cellen.
- Mindre akkumulering af mellemproduktet. Dette er en fordel, hvis mellemproduktet er toksisk eller medierer produktinhibering af et tidligere trin i syntesevejen.

Desuden er en lokal opkoncentrering af et bestemt substrat omkring et enzym en fordel, hvis enzymet er uspecifikt, og der er konkurrence om at blive substrat for enzymet. En opkoncentrering af et bestemt substrat kan nemlig begrænse andre substraters adgang til enzymets aktive sites og dermed favoriseres omdannelsen af det ønskede substrat.

Nye!

Apparater 2011

www.skanlab.com
retsche@skanlab.com

Hvordan anbringes enzymer i nærheden af hinanden inde i cellen?

I naturen er der en lang række eksempler på, at cellen har anbragt enzymer, som katalyserer fortløbende syntesetrin i umiddelbar nærhed af hinanden. Cellen kan f.eks. fæstne enzymer på intracellulære strukturer, opkoncentrere dem i organeller eller samle dem i komplekser. Mange biosynteseveje af industriel interesse er både afhængige af enzymer, som er overført fra andre organismer (heterologe enzymer), og af enzymer som findes naturligt i værtsorganismen (endogene enzymer). For sådanne biosynteseveje, som er afhængige af enzymer fra forskellige organismer, kan man ikke forvente, at der er en optimal rumlig arrangement af enzymerne. Derfor er det her oplagt at anvende moderne genteknologi til at optimere den rumlige organisering. Vha. genteknologi kan man f.eks. anbringe enzymer i nærheden af hinanden ved at samle dem på en form for platform [3,4], ved at få dem til at interagere vha. specifikke bindingsmoduler og tilhørende genkendelsessekvenser [5] eller ved simpelthen at fusionere de gener som koder for enzymerne, og på den måde få dannet et enzym med flere katalytiske centre (figur 3).

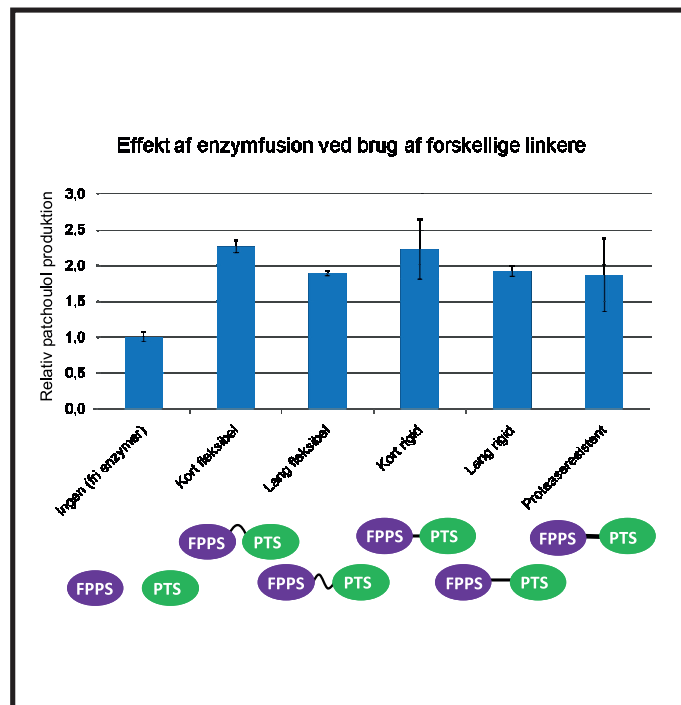
Enzymfusion øger produktionen af parfumestoffet patchoulol

I vores forskning har vi undersøgt om enzymfusion kan anvendes til at øge produktionen af patchoulol i gæren *Saccharomyces cerevisiae*. Patchoulol er et flygtigt stof med kamferlignende duft, som anvendes i over halvdelen af alle mandeparfumer. Det produceres af planten patchouli (*Pogostemon cablin*) fra Læbeblomstfamilien, der ud over patchouli rummer mange andre duftende planter som lavendel, timian og mynte. *S. cerevisiae* producerer ikke patchoulol naturligt, men kan producere det ud fra farnesyldiphosphat (FPP), hvis der introduceres et enkelt gen, der koder for patchoulolsyntase (PTS) [6]. FPP er også substrat for mange andre enzymer i gær, idet det er precursor for ergosterol, farnesol, hæng A, ubiquinon og dolichol (figur 4). FPP er kendt for at mediere produktinhibering af et tidligere trin i syntesevejen [7,8]. Der er således tale om en syntesevej, som af mindst to grunde forventes at kunne drage fordel af enzymproksimitet. For det første er der konkurrence om substratet FPP og for det andet medierer FPP inhibering af et tidligere trin i syntesevejen. For at undersøge effekten af en enzymfusion koblede vi de to enzymer farnesyldiphosphatsyntase (FPPS) og PTS vha. fem forskellige peptidlinkere. Peptidlinkerne varierede i længde og var designet, så de havde en fleksibel eller en rigid sekundær struktur. Sammenlignet med frie enzymer øgede en fusion af FPPS og PTS patchoulolproduktionen med en faktor 1,9-2,3 afhængig af hvilken peptidlinker, der blev benyttet (figur 5) [9].

Perspektiver

I dette studie har vi vist, at det er muligt at øge cellefabrikkers produktion af et kommercielt interessant stof til det dobbelte ved at udnytte fordelene ved enzymproksimitet. Vi benyttede en simpel teknik til at anbringe to enzymer i nærheden af hinanden og alligevel sås relativt store effekter. Hvis konceptet udvides så flere enzymer inddrages vil der formodentlig kunne opnås endnu større effekter. Desuden forventes det, at fremskridt inden for proteinstrukturforudsigelse kan give endnu bedre muligheder for at optimere den rumlige organisering end vi har i dag, og at man derved i endnu højere grad kan udnytte teknologiens potentiale.

Interessererede er velkomne til at kontakte os for yderligere oplysninger.



Figur 5. Effekten af enzymfusion på patchoulolproduktionen når farnesyldiphosphat synthase (FPPS) og patchoulol synthase (PTS) er fusioneret vha. forskellige peptidlinkere.

E-mail-adresser

Line Albertsen: la@bio.dtu.dk

Uffe Mortensen: um@bio.dtu.dk

Referencer:

- Chemler, J., Yan, Y., and Koffas, M. (2006). Biosynthesis of isoprenoids, polyunsaturated fatty acids and flavonoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 5(1):20.
- Keasling, J. (2008). Cheaper medicines. *Engineering and Technology Magazine*, 13(6 Suppl).
- Dueber, J., Wu, G., Malmirchegini, G., Moon, T., Petzold, C., Ullal, A., Prather, K., and Keasling, J. (2009). Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. *Nature Biotechnology*.
- Fierobe, H., Mechaly, A., Tardif, C., Belaich, A., Lamed, R., Shoham, Y., Belaich, J., and Bayer, E. (2001). Design and production of active cellulose chimeras selective incorporation of dockerin-containing enzymes into defined functional complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(24):21257–21261.
- Hahn, M. and Stachelhaus, T. (2006). Harnessing the potential of communication-mediating domains for the biocombinatorial synthesis of nonribosomal peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(2):275–280.
- Asadollahi, M., Maury, J., Möller, K., Nielsen, K., Schalk, M., Clark, A., and Nielsen, J. (2008). Production of plant sesquiterpenes in *Saccharomyces cerevisiae*: Effect of ERG9 repression on sesquiterpene biosynthesis. *Biotechnology and bioengineering*, 99(3):666.
- Gardner, R. and Hampton, R. (1999). A Highly Conserved Signal Controls Degradation of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) Reductase in Eukaryotes. *Journal of Biological Chemistry*, 274(44):31671–31678.
- Shearer, A. and Hampton, R. (2005). Lipid-mediated, reversible misfolding of a sterol-sensing domain protein. *The EMBO Journal*, 24:149–159.
- Albertsen, L. and Chen, Y. and Bach, L. S. and Maury, J. and Ratleff, S. and Brix, S. and Nielsen, J. and Mortensen, U.H. (2011). Diversion of Flux toward Sesquiterpene Production in *Saccharomyces cerevisiae* by Fusion of host and heterologous enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*. Published ahead of print on 10 December 2010.