

Optimering af proteiners funktion

Ved at ændre mikroorganismer genetisk kan man optimere enzymer til at være endnu mere effektive og miljørigtige alternativer til kemikalier. Her gennemgås de molekylærbiologiske, proteinkemiske og screeningsmæssige teknikker, der bruges til proteinoptimering i industriel sammenhæng

Af Mads Bjørnvad, Torben Vedel Borchert og Steffen Ernst, Novozymes

Mads Bjørnvad (Science Manager for Protein Screening) har arbejdet hos Novozymes i 11 år og er cand.polyt. (kemi).
E-mail-adresse: maeb@novozymes.com

Torben V. Borchert (Director for Protein Design) har arbejdet hos Novozymes i 10 år og er cand.polyt. (kemi) og Ph.D. Steffen Ernst har arbejdet hos Novozymes i 6 år og er Senior Manager for Protein Screening og er uddannet som akademiingeniør (kemi) og Ph.D.

Novozymes A/S er verdens førende producent af enzymer og mikroorganismer til industriel anvendelse og anvender desuden sine kernekompetencer inden for udvalgte farmaceutiske områder. Virksomheden har hovedsæde i Danmark og godt 3.700 medarbejdere. Læs mere på www.novozymes.com.

Enzymer er proteiner, som er livsnødvendige for alle levende organismer. Her fungerer de som katalysatorer for processerne, der opbygger organismen og omdanner næring til energi. Derudover har enzymer fra bakterier, svampe og dyr været anvendt i de tusind år gamle bioteknologiske metoder, som mennesker har anvendt til fremstilling af bl.a. vin og ost. Industrielt produceres enzymer ved at gære mikroorganismer i lukkede gæringstanke. Når man skal producere enzymer, bruger man mikroorganismens egen evne til at producere specielle enzymer - eller man ændrer mikroorganismen genetisk, så den kan producere et nyt enzym.

Den Hvide Bioteknologi

Det at producere via dyrkning af levende celler som gær, bakterier og mikrosvampe såvel som produktion via enzymer kaldes for Hvid Bioteknologi. Det er naturens eget koncept, og med Hvid Bioteknologi kan enzymer til industrielt brug produceres i en proces, hvor både hovedproduktet og spildprodukterne er miljørigtige. Hvid Bioteknologi kan også bruges til produktion af så forskellige produkter som: vitaminer, naturlige farve- og aromastoffer, medicinske proteiner, vacciner og antibiotika.

Naturens værktøj

De svampe og bakterier vi anvender til enzymproduktion, finder vi i naturen. Der indsamles og isoleres mange svampe og bakterier for at undersøge, om de producerer de ønskede enzymaktiviteter til brug f.eks. i vaskemidler og dyrefoder samt i brød, vin og juice. Nogle gange har enzymet præcis de egenskaber, der er nødvendige i en given industriel proces eller produkt. Oftest er det dog nødvendigt at optimere et kendt enzym til at fungere ved bestemte industrielle forhold, hvor f.eks. pH og temperatur kan ligge langt fra enzymernes naturligt foretrukne betingelser.

Enzymer skaber en række fordele for forbrugere og miljø. Især skal nævnes, at enzymer – f.eks. proteaser og cellulaser – har gjort det muligt at vaske tøj rent allerede ved 30-40°C. Derudover skånes miljøet, og der spares energi ved at bruge enzymer i f.eks. tekstilindustrien, hvor amylaser og pektinaser kan erstatte store mængder natriumhydroxid, vand og varme.

Fra teknik til produkt

Her gennemgås de molekylærbiologiske, proteinkemiske og screeningsmæssige teknikker, der ligger til grund for optimering af proteiner i industriel sammenhæng. Der vises eksempler på, hvordan Novozymes bruger teknikkerne til at udvikle nye effektive enzymer til eksisterende eller helt nye anvendelser i husholdningen og i miljørigtige industrielle processer.

Den universelle genetiske kode

Da James Watson og Francis Crick for 50 år siden opdagede den dobbeltstrengede DNA-helix, var det starten på en ny forståelse af molekylærbiologi. Således ved vi i dag, at en celleds instruktioner, om hvordan et protein skal sættes sammen, sidder i DNA-sekvensen. Vejen fra DNA til protein kan beskrives som: i cellen aflæses DNA'et og via RNA og ribosomer (cellens »proteinfabrikker«) oversættes den genetiske kode til protein. Denne afkodning af DNA til protein er ens for alt liv på jorden. Alt arbejde med proteinoptimering bygger på denne direkte sammenhæng mellem DNA og protein. Fordi sammenhængen er ens for alle organismer, kan man overføre gener fra en organisme til en anden (værtorganisme) og få værts-

organismen til at aflæse det nye gen og derved producere proteinet. Dette kan gøres med alle typer af organismer; men mikroorganismer (bakterier, gær og filamentøse svampe) er specielt gode til at overproducere proteiner. Det er muligt at designe og konstruere specifikke ændringer i et gen og derved specifikt ændre proteinet. Via en værtsorganisme kan man således i laboratoriet lave proteinvarianter med ændrede egenskaber. Om muligt vælges værtsorganismer, der er nemme at arbejde med og som ligner dem, der i sidste ende skal bruges til produktion, f.eks. *E.coli*, *Bacillus subtilis*, *S.cerevisiae* (bagegær) og *Aspergillus oryzae*.

Rationel proteinoptimering

I begyndelsen var arbejdet med proteinoptimering fuldstændigt styret af forståelsen af proteinets tredimensionelle struktur. En specialist i dette felt kan, baseret på sit kendskab til sammenhængen mellem et proteins struktur og funktion, foreslå at ændre en eller flere aminosyrer. Variantgenet konstrueres og overføres til en værtsorganisme, der herefter producerer det nye variantprotein. Det producerede protein oprenses, dets egenskaber undersøges, og resultaterne sammenlignes med det, man forventede. Det kaldes »rationel protein-engineering«, og er en »prøv-sig-frem« proces, hvor chancen for succes afhænger meget af de egenskaber, der ønskes forbedret. Drejer det sig om stabilitet ved høje temperaturer eller ekstrem pH, er det sædvanligvis overkommeligt at forudsige forbedringer, hvorimod forbedring af aktivitet ofte er mere kompliceret. Eksempel 1 viser dog et eksempel på

rationel proteinoptimering rettet mod ændring af aktiviteten af et enzym.

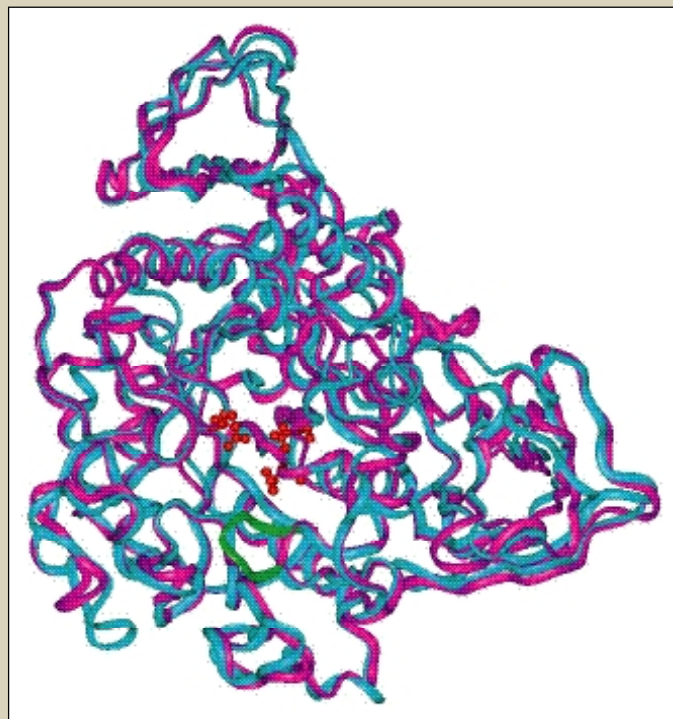
Evolution – i laboratoriet

Vi har erfaret, at rationel proteinoptimering har begrænsninger. Der har derfor været forsket intensivt i at optimere proteiner på en anden måde. Det har resulteret i et sæt af nye teknikker til proteinoptimering, som samlet kaldes for »Directed Evolution«.

Det generelle princip er baseret på tilfældig mutagenese - tilfældig introduktion af mutationer i et kodende gen samt etablering af disse variantgener i en værtsorganisme. De tilfældige ændringer kan indføres spredt over hele genet eller i begrænsede områder, f.eks. udvalgt vha. rationelle metoder. Der findes mange forskellige metoder til at skabe tilfældige mutationer: f.eks. kan en kunstig opformering af DNA justeres til at give et bestemt niveau af tilfældige mutationer. Når en værtsorganisme har modtaget nyt DNA med nye tilfældige mutationer, begynder hver enkelt celle at producere lige netop det variantprotein, dens variantgen koder for. For at finde de nye variantproteiner, der har den ønskede egenskab, skal alle de nye proteiner gennem en udvælgelsesprocedure, hvor de bedste proteiner identificeres – en såkaldt screening. Efter en screening vælges typisk det gen, der koder for det mest funktionelle protein, og dette bruges som udgangspunkt for en ny runde, hvor man - i det nu ændrede gen - indfører endnu flere tilfældige mutationer efterfulgt af endnu en screening. Disse runder kan man gentage, indtil proteinet har opnået den ønskede egenskab. Metoden in-

Eksempel 1

Rationel proteinoptimering af maltogen α -amylase



Panel A.

Cyclodextriner er ringsluttende maltodextriner med typisk 6, 7 eller 8 glucoseenheder. Disse molekyler dannes fra stivelse af enzymet cyclodextrin glucosyl transferase (CGT'ase). Strukturen af flere CGT'aser er kendt fra røntgenkrystallografi, og figuren i panel A illustrerer, hvor strukturelt ens CGT'aserne

α -amylase	KNFTDPAGFSLADL
CGTase fra <i>B. circulans</i>	KNLYD.....LADL
CGTase fra <i>B. licheniformis</i>	KNLYD.....LADL
CGTase fra <i>B. species</i> (1011)	KNLYD.....LADL
CGTase fra <i>B. species</i> (38-2)	KNLYD.....LADL

Panel B.

(blå) er ift. en maltogen α -amylase (lilla), til trods for at proteinernes sekvenser kun er ca. 65% ensartede. Den maltogene α -amylase nedbryder også stivelse; men er ikke i stand til at ringslutte maltodextriner til cykliske molekyler.

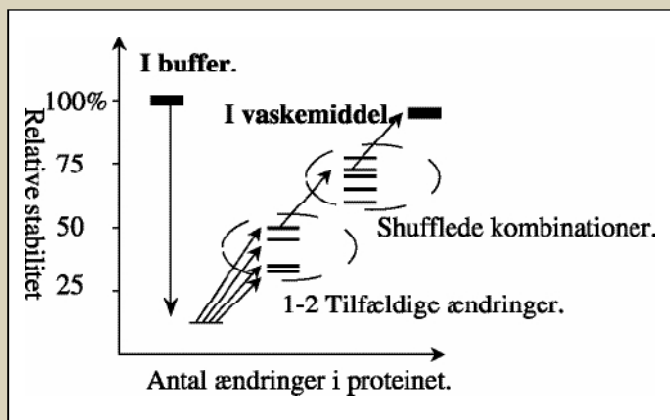
En visuel inspektion af disse enzymeres proteinstrukturer identificerede et specielt loop (grøn) i nærheden af det aktive site (røde aminosyrer), der kunne forventes at være fysisk i vejen for en ringslutning af substratet.

I panel B ses en sammenligning af proteinsekvensen for loop-regionen i α -amylasen og den tilsvarende region i CGT'aser fra forskellige organismer: α -amylasens loop er 5 aminosyrer længere og indeholder yderligere to ændrede aminosyrer. Specielt mangler tyrosinen, Y, der er kendt for at være vigtig for den ringsluttende evne i CGT'aserne.

Ud fra disse betragtninger blev det besluttet at ændre α -amylasen ved at gøre loopet 5 aminosyrer kortere samt at udskifte de to ændrede aminosyrer. Disse 7 ændringer resulterede i at variantenzymet, ud over sin sædvanlige egenskab relateret til stivelseshydrolyse, var i stand til nu at producere cyclodextriner med primært 7 glucoseenheder (Beier et al., 2000; vi takker Dr. Lars Beier for denne illustration).

Eksempel 2

Vaskemiddelenzym – peroxidase - mod misfarvning af vasketøj



Dramatisk effekt ved at kombinere shuffling med rationel og tilfældig proteinoptimering.

Et vigtigt eksempel på anvendt forskning inden for proteinoptimering er Novozymes' optimering af den naturligt forekommende peroxidase (CiP) fra svampen blækhat (*Coprinus cinereus*) til brug i vaskemiddel (Joel R Cherry et al., 1999). Enzymet har høj blegeaktivitet over for farvestoffer anvendt i

farvede tekstiler og kan ved sin tilstedeværelse under tøjvask forhindre, at farvestof fra f.eks. en rød sok overføres til hvidt vasketøj. Desværre var den oprindelige vildtype CiP ikke modstandsdygtig over for de ekstreme betingelser i den almindelige tøjvaskeproces.

CiP-varianter med forbedrede egenskaber blev fundet gennem en intensiv proteinoptimering, hvor målet var at forbedre både enzymets stabilitet og aktivitet. I første fase af proteinoptimeringen blev CiP optimeret ved en kombination af rationel og tilfældig mutagenese, og de dannede varianter blev testet i et stress assay (pH 10,5; 50°C og 0,2 mM H₂O₂). De nye varianter, som alle havde bedre stabilitet ved højere temperatur og højere peroxidkoncentration, blev i sidste fase af proteinoptimeringen kombineret via to omgange af in vivo DNA-shuffling i gær og efterfølgende fundet forbedret ved test i et mere selektivt stress assay (pH 10,5; 50°C og 2-5 mM H₂O₂).

Resultatet af det omfattende arbejde var CiP-varianter, som viste sig at være 50-100 gange mere peroxidstabile end vildtype CiP. De positive effekter, der var opnået på stabilitetssiden, var opstået på bekostning af varianternes specifikke aktivitet, der viste sig at være 5-6% af vildtype CiP. På trods af de lave aktiviteter virkede varianterne signifikant bedre end vildtype CiP under vaskeprocessen med almindeligt vaskemiddel.

debærer dog den risiko, at man kommer til at fokusere for snævert på de enkelte mutationer, der i første runde gav en forbedring. Derved fravælges en stor mængde brugbar diversitet, som måske kunne give forbedring, hvis flere af disse mutationer blev kombineret. En effektiv løsning på dette problem er DNA-shuffling.

DNA-shuffling

I begyndelsen af 1990'erne udviklede Pim Stemmer i Californien en revolutionerende ny teknologi: DNA-shuffling. Det basale princip er, at generne, som koder for alle forbedrede variantproteiner, sættes sammen til nye hybridgener. Herved blandes de introducerede mutationer til nye kombinationer. Denne simple rekombinationsproces har den store fordel, at skadelige mutationer let fjernes, mens de nyttige mutationer bevares. Shuffling, som kan foretages med gener direkte fra naturen eller med gener optimeret i laboratoriet, gentages efter hver runde af en screening. En sådan cyklisk proces har ofte vist sig at kunne frembringe proteiner med endnu bedre egenskaber. Princippet bag DNA-shuffling er illustreret i figur 1 (side 18) og en kombineret rationel og tilfældig tilgang til proteinoptimering er beskrevet i eksempel 2.

Screeningsteknologier

For at få den bedst mulige udvælgelse af varianter fra de ofte meget store variantsamlinger skal testsystemerne opfylde tre krav:

1. Realistisk: Betingelserne skal så vidt muligt minde om virkelighedens brug af enzymet (rent protein, rigtigt substrat, temperatur, pH, reaktionstid og enzymdosis).
2. Reproducerbart: Gentagne gæringer af kloner, som udtrykker det samme gen, skal gerne give samme resultat i assayet.
3. Højt throughput: Systemet skal være hurtigt og gerne automatiseret.

In Vitro as Introducerer...

Elektronisk pipette. Enkelt- og 8-kanals, til overkommelig pris



Præcision:

20-200 µl

Rel CV% (-) 1-0,2

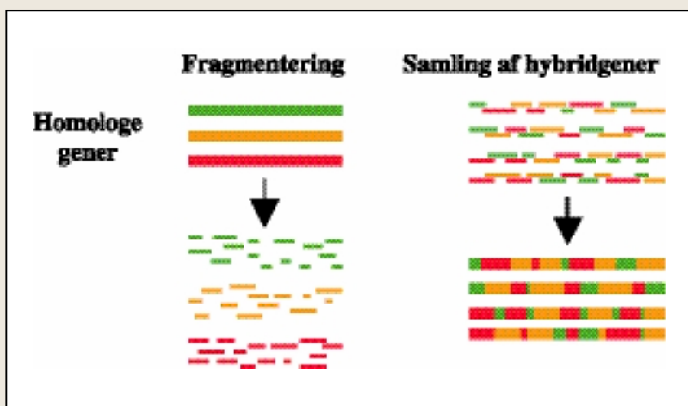
200-1000 µl

Rel CV% (-) 0,6-0,18

Kontakt os på 4847 5070

Besøg os også på

www.in-vitro.dk



Figur 1. DNA-shuffling.

Princippet i DNA-shuffling er her illustreret ved en tegning. De forskellige gener fragmenteres, dvs. splittes i mindre stykker. Denne fragmentering kan gøres enzymatisk, kemisk eller mekanisk.

Efter fragmentering vil de mindre DNA-stykker kunne samles til hele gener igen. Det sker via stumpernes ender, som er komplementære til enderne på andre stumper og således vil klistre til hinanden. Vha. enzymet DNA-polymerase kan man derefter samle stumperne, så de huller, der er i de nye hybridgener, udfyldes, og hele hybridgener dannes. Resultatet er en række nye gener, som har egenskaber fra alle de oprindelige gener, men hvori egenskaberne er blandet sammen på kryds og tværs.

I variantsamlinger lavet ved tilfældig mutagenese vil der være en høj frekvens (f.eks. 50-90%) af variantproteinerne, der ikke er aktive. Derfor kan det betale sig at fjerne de inaktive varianter. Dette gøres typisk med de hurtige »koloniplukker«-maskiner, der selektivt overfører aktive kolonier af mikroorganismer fra agarplader til vækstmedie i mikrobæringsplader. Aktive kolonier kan f.eks. vælges ud fra en visuel reaktion med substrater, der er indstøbt i agaren. Samtidig med overførsel af aktive kloner opnås en omplacering fra agarplader til mikrobæringsformat, klar til fortsat automatiseret screening.

Applikationsassay

Der lægges stor vægt på det første egentlige applikationsassay. I et typisk forløb er det her, at den hårdeste udvælgelse af variantproteiner finder sted. Det er selvsagt uhyre vanskeligt at designe sådanne assaysystemer, der i assayvolumen på kun 100 µl imiterer komplicerede processer, som f.eks. vaskemaskiner, bagedej eller kyllingers fordøjelsessystemer.

Derfor har vi i Novozymes arbejdet meget med at lave automatiserbare assays baseret på sådanne behov. En vigtig udvikling har f.eks. været at bruge bomuldstekstil behandlet med forskellige »besmudsninger« for at efterligne beskidt vasketøj.

Hos Novozymes vil vi i automatiserede assays typisk teste 5.000-20.000 forskellige varianter pr. dag. Mens koloniplukkeren kan håndtere at sende op til 10-50% af varianterne videre til efterfølgende test, vil det typisk kun være 1% eller mindre fra det primære applikationsassay, som testes videre i yderligere en serie forskellige assays med stigende kvalitet og dalende throughput. De bedste varianter bruges som udgangspunkt for yderligere runder af optimering. Sådanne cykliske proteinoptimeringsprocesser (figur 2) har ført til udvikling af en række nye produkter.

Erfaringer og fremtidsperspektiver

Vi har i Novozymes sendt over 20 proteinoptimerede enzymprodukter på markedet. Vores erfaring har været, at succesfulde udviklingsprojekter ikke er baseret på enten rationel eller tilfældig proteinoptimering. Men at de forskellige teknologier til proteinoptimering komplementerer hinanden i så høj grad, at det er forskernes evne til at arbejde sammen og opsamle erfaring løbende, der er afgørende for succes. Sammenlignet med de biofarmaceutiske produkter er der for enzymer til industrielt brug en forholdsvis kort produktudviklingstid. Det er sandsynligvis denne forskel, der har betydet, at teknologierne til proteinoptimering i den grad er blevet implementeret til udvikling af industrielle bioteknologiprodukter.

Selv om mange af de nye biofarmaceutiske produkter afviger fra de oprindelige proteiner, er det først i de seneste år, at der er kommet fart over de målrettede og stort anlagte proteinoptimeringsprogrammer inden for biofarmaceutika. Det bliver spændende at se, hvordan man fremover kan kombinere erfaringen fra optimering af enzymer med den biofarmaceutiske viden om medicinudvikling og farmakologiske high-throughput screening assays.

Kilder:

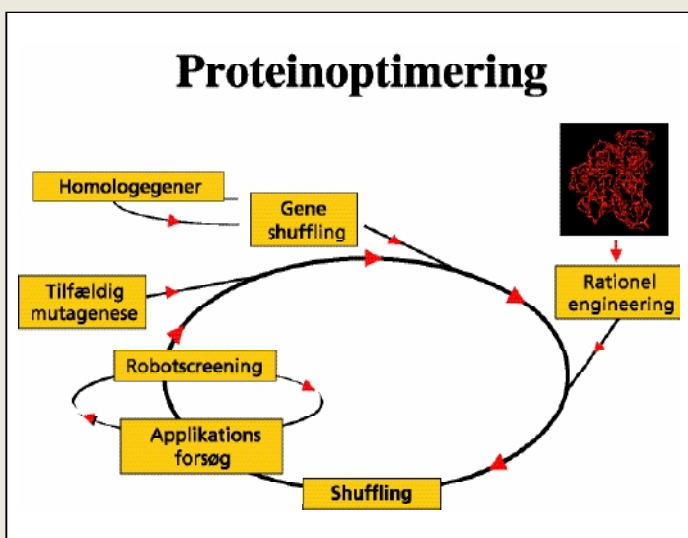
Lars Beier, Allan Svendsen, Carsten Andersen, Torben P. Frandsen, Torben V. Borchert and Joel R. Cherry (2000) Conversion of the maltogenic α -amylase into a CGT'ase. *Protein Engineering* 13: 509-513.

Joel R. Cherry, Michael H. Lamsa, Palle Schneider, Jesper Vind, Allan Svendsen, Aubrey Jones and Anders H. Pedersen. (1999) Directed Evolution of a Fungal Peroxidase. *Nature Biotechnology* 17:379-384.

Willem PC Stemmer (1994) Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*, Vol. 370: 389-391.

Hvid Bioteknologi:

http://www.europabio.org/pages/module_17.asp



Figur 2. Illustration af processen for proteinoptimering.

Teknikker til rationel og tilfældig proteinoptimering samt DNA-shuffling bruges i fællesskab til at skabe nye proteinmolekyler, der herefter i applikationslignende assays testes for forbedrede egenskaber.

Disse nye forbedrede proteiner bruges i en ny runde af optimering. Denne proces gentages igen og igen, indtil et protein har opnået de ønskede egenskaber.

