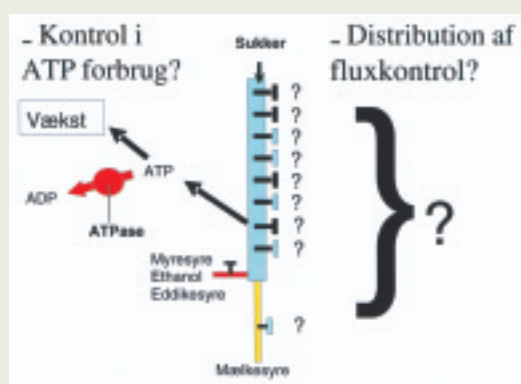


Kontrolanalyse af glykolyesen i mikrobielle systemer

Glykolyesen spiller en central rolle for mange mikroorganismer i omdannelsen af sukker til organiske forbindelser i mikrobielle fermenteringsprocesser. Derfor er det vigtigt at kortlægge, hvad der kontrollerer flowet gennem denne procesvej

Af Brian Koebmann, Christian Solem & Peter Ruhdal Jensen, Biocentrum-DTU, DTU



Figur 1. Simplificeret skema af glykolyesen og dens forbindelse til energimetabolismen i fermenterende organismer. Enzymatiske trin og grupperede reaktioner er indikeret med haner. Glykolyesen genererer fri energi i form af ATP, der primært bruges til cellens anaboliske processer (vækst). I figuren er ligeledes illustreret en ekstra ATP-forbrugende proces (ATPase-aktivitet).

derfor stor industriel og fundamental interesse i at undersøge glykolyesen i detaljer og at forbedre egenskaber og performance af mikroorganismer, der benyttes i industrielle fermenteringer.

Men hvordan er glykolyesen egentlig kontrolleret? Hvad bestemmer den flux, der går gennem glykolyesen og koncentrationerne af de glykolytiske metabolitter i en mikroorgansime under et givet sæt betingelser? Er det et af enzymene i selve glykolyesen, der har kontrol eller måske nogle helt andre enzymer uden for glykolyesen?

De senere årtier har kvantitative metoder som Metabolisk Kontrolanalyse (MCA) vundet stigende indpas i arbejdet med at besvare denne type kvantitative spørgsmål. Her illustreres det, hvordan MCA på glykolyesen kan udføres eksperimentelt. Som eksempel præsenteres eksperimentelle data fra bakterierne *Escherichia coli* og *Lactococcus lactis*.

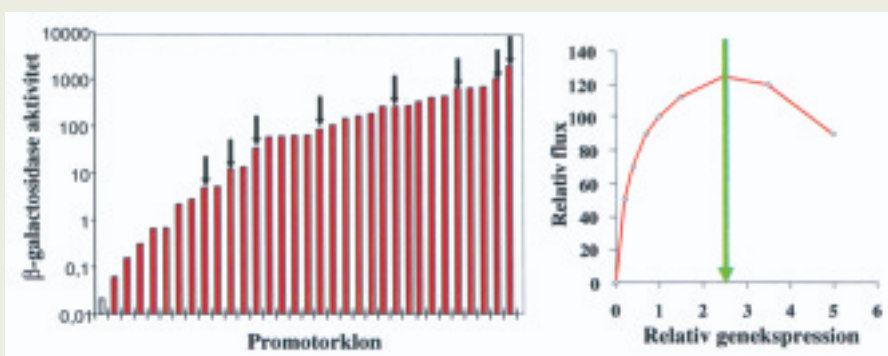
Metabolisk kontrolanalyse – kvantificering af kontrol

Den levende celle er et komplekst netværk

Glykolyesen er den centrale metaboliske rute for produktion af fri energi i de fleste celler. Den har igennem årtusinder været benyttet i fermenteringer, hvor sukker omdannes til især ethanol og mælkesyre (figur 1). Der er

af mange biokemiske processer, der sker samtidig for at opretholde en, fra cellens synspunkt, optimal steady state. Det er umiddelbart en meget uoverskuelig opgave at opnå en kvantitativ forståelse af, hvordan de enkelte processer i cellen er kontrolleret og afstemt ift. hinanden. Metabolisk kontrolanalyse (MCA) er et matematisk redskab, der relaterer kontrol af fluxe og metabolitkoncentrationer til de individuelle enzymkomponenters kinetiske egenskaber [1,2]. Kvantificeringen af enzymernes kontrol over metabolitkoncentrationer og fluxe angives i MCA ved kontrolkoefficienter. Kontrolkoefficienterne kan bestemmes direkte ved at ændre aktiviteten af et givet enzym og efterfølgende observere, hvordan fluxe og metabolitkoncentrationer påvirkes. En fluxkontrolkoefficient på f.eks. 0.6 betyder, at 10% højere enzymaktivitet giver 6% højere flux gennem den metaboliske rute. Da summen af kontrolkoefficienterne for alle enzymer i systemet på en given flux skal være 1, svarer en fluxkontrol på 0.6 til, at enzymet har 60% af den totale kontrol. Tilsvarende defineres elasticitetskoefficienter, der beskriver, hvor følsomme enzymatiske processer er over for ændringer i en metabolisk pool.

Vigtigheden af at benytte MCA til analyse af kontrol i biologiske systemer er understreget af, at »flaskehals«-enzymer sjældent er til stede i biokemiske veje. I stedet er kontrollen ofte distribueret over mange enzymer. Denne distribution af fluxkontrol tillader sandsynligvis cellen at reagere mere konstruktivt på udefrakommende signaler. Fra



Figur 2. Et bibliotek af syntetiske promotorer til gradvis ændring af genskspression i *L. lactis*. Promotorernes styrker er angivet som aktivitetene af β -galactosidase udtrykt fra rapportergen *lacLM*, der sidder umiddelbart efter promotorerne [3]. Et hypotetisk eksempel illustrerer, hvordan en serie af disse promotorer (sorte pile) kan benyttes til modulering af genskspression. En relativ genskspression på 1 svarer til det »normale« niveau. Den grønne pil illustrerer det optimale niveau af genskspression.

Boks 1

Summations- og konnektivitetsteoremet

Summationsteoremet

Ifølge metabolisk kontrolteori kan kontrollen over en givet flux være distribueret over samtlige enzymer (1,2,3 osv.) i det metaboliske netværk. Således giver summen af fluxkontrol for samtlige enzymer fuld fluxkontrol, dvs. 1. Det er beskrevet i summationsteoremet:

$$c_1^J + c_2^J + c_3^J + \dots + c_n^J = \sum_{i=1}^n c_i^J = 1$$

Konnektivitetsteoremet

I metabolisk kontrolanalyse angiver elasticitets-koefficienterne hvor »elastiske« et enzym er i forhold til ændringer i koncentration af en given metabolit. Elasticitetskoefficienterne beskriver de lokale egenskaber for det enkelte enzym, og kontrolkoefficienterne angiver de globale egenskaber for enzymets kontrol på en flux eller koncentration. Sammenhængen mellem elasticiteter og kontrolkoefficienterne er beskrevet i konnektivitetsteoremet, her anført med metabolitten X og fluxkontrol som eksempel:

$$c_1^J \cdot \varepsilon_X^1 + c_2^J \cdot \varepsilon_X^2 + c_3^J \cdot \varepsilon_X^3 + \dots + c_n^J \cdot \varepsilon_X^n = \sum_{i=1}^n c_i^J \cdot \varepsilon_X^i = 0$$

den metaboliske ingeniørs synspunkt giver denne distribution imidlertid ofte anledning til frustration, når forsøg på at fjerne »flaskehalse« i en biologisk proces slår fejl, og der ikke observeres nogen nævneværdig forøgelse af fluxen til et ønsket produkt.

Modulering af genekspression

En forudsætning for eksperimentel metabolisk kontrolanalyse er velegnede værktøjer til i små trin at modulere aktiviteterne af de forskellige enzymatiske reaktioner i cellen. Det kan i princippet gøres ved at indsætte forskellige promotorer med varierende styrker foran det respektive gen.

I 1998 blev der udviklet en metode til modulering af genekspression, som var baseret på konstruktion af biblioteker af randomiserede promotorer. Metodens princip er baseret på at bevare kendte promotorkonsensussekvenser (-10 og -35 regionen i prokaryoter), mens sekvenserne af de mindre konserverede regioner omkring konsensussekvenserne randomiseres [3]. De Syntetiske Promotor Biblioteker (SPL) dækker et bredt spekter af promotoraktiviteter med ændring af styrke i små trin (figur 2) [3]. Metoden er et vigtigt genetisk værktøj til at modulere enzymaktiviteter i næsten alle organismer, og den er velegnet til både metabolisk kontrolanalyse og optimering.

Metoden blev for nylig forbedret ved at kombinere den med en PCR-metode, hvor de randomiserede promotorer indkorporeres i opformeringen af genet. Det gøres ved at indbygge de randomiserede promotorsekvenser i det benyttede primersæt til PCR-amplifikation [4]. Den oprindelige promotorsekvens på PCR-produkterne udskiftes således med randomiserede promotorer, hvorved det i princippet bliver muligt at generere millioner af forskellige DNA-fragmenter med varierende promotorstyrke foran genet. PCR-produktet kan efterfølgende klones i en passende plasmidvektor, så genetets oprindelige promotor kan udskiftes, eller der kan introduceres en ekstra kopi af genet på kromosomet. ►

FOSS

Dedicated Analytical Solutions

Flow injection analyse



FIAStar™ 5000 er et instrument til rutineanalyser af næringsstoffer samt andre parametre i vand, jord og fødevarer.

Lave detektionsgrænser og nøjagtige resultater:

- Detektionsgrænse ned til 0,1 ppb
- QC og GLP rutiner sikrer nøjagtige resultater
- Godkendte og validerede applikationer
- Måleområde fra 5 ppb

Lavere driftsomkostninger:

- Klar til analyse 10 min. efter tilslutning
- 3 parametre kan analyseres samtidigt
- Analysetid på 40-70 sekunder

Betjeningsvenligt:

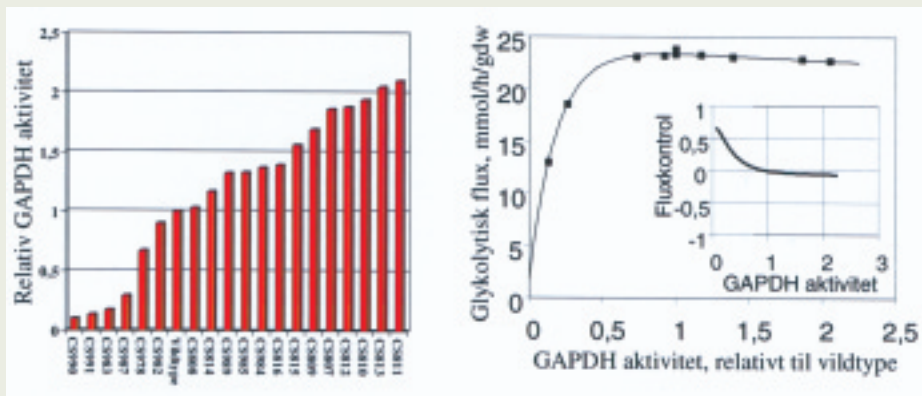
- Fleksible metodekassetter, klar til brug
- Færdige applikationer
– kalibrer og analysér dine prøver.

Dedicated Analytical Solutions

FOSS i Skandinavien
Slangerupgade 69
3400 Hillerød

Tel 70 20 33 80
Fax 70 20 33 81

www.foss.dk



Figur 3. Bestemmelse af glykolytisk fluxkontrol for GAPDH i *L. lactis*. Den venste figur viser et bibliotek af stammer med modulerede GAPDH-aktiviteter over og under det normale niveau. Figuren til højre viser, hvordan den glykolytiske flux afhænger af GAPDH-aktiviteten, og den indsatte figur viser de beregnede fluxkontrollkoefficienter for alle niveauerne af GAPDH-aktiviteter [9].

Eksperimentel metabolisk kontrolanalyse på glykolyesen

De eksperimentelle studier af glykolyesen begyndte for over hundrede år siden. Allerede i 1897 blev der foretaget studier af cellefri fermentering ved at ødelægge gærceller og efterfølgende observere den enzymatiske omdannelse af glucose til ethanol og kuldioxid [5]. Men mere end et århundrede efter er svaret på spørgsmålet, om hvordan glykolyesen er kontrolleret, stadig mangelfuldt.

De glykolytiske enzymer har bl.a. været studeret i gæren *Saccharomyces cerevisiae*, men overraskende har ingen af enzymerne kontrol over glykolyesen i denne organisme [6]. Ligeledes har transporten af glucose ind i cellerne i bakterien *Escherichia coli* kun lille kontrol [7]. En stor udfordring i studierne af metabolisk kontrol har oftest været manglen på ordentlige »værktøjer«. Det har resulteret i langsomme studier med mere eller mindre usikre data. I det følgende gives et par eksempler på styrken ved at modulere genekspression i eksperimentel metabolisk kontrolanalyse.

Bestemmelse af fluxkontrol for glyceraldehyd-3-phosphat dehydrogenase i *Lactococcus lactis*

Glyceraldehyd-3-phosphat dehydrogenase (GAPDH) er et centralt enzym i glykolyesen og blev i mange år anset for at være det »fluxbegrænsende« trin i glykolyesen. I 1987 blev det publiceret, at GAPDH havde næsten total kontrol over den glykolytiske flux i *L. lactis* [8], hvilket betyder, at det skulle være muligt at øge den glykolytiske flux ved at øge GAPDH-aktiviteten. For at undersøge denne hypotese konstruerede vi et bibliotek af mutanter. Det resulterede i ændrede GAPDH-aktiviteter fra 14% til 210% af vildtypeniveau [9] (figur 3).

Udvalgte stammer blev herefter undersøgt for effekten af den modulerede GAPDH-aktivitet på glykolyesen. Af figur 3 fremgår det tydeligt, at det ikke var muligt at øge den glykolytiske flux ved at øge GAPDH-aktiviteten. Ned til 25% af normalaktiviteten viste en sænkning af GAPDH-aktiviteten ikke nogen væsentlig effekt på væksthastighed og den glykolytiske flux. Under denne aktivitet faldt den glykolytiske flux dog drastisk, hvilket bekræfter, at GAPDH er et uundværligt enzym for cellerne. Fra et kvantitativt synspunkt viser resultaterne, at GAPDH ikke har nogen kontrol over den glykolytiske flux (FCC=0.0) ved vildtypeniveau, og at enzymet har et kapacitetsoverskud på 3-4 gange.

Bestemmelse af de ATP-forbrugende processers kontrol over den glykolytiske flux

Ifølge metabolisk kontrolteori kan fluxkontrol befinde sig overalt i det biologiske system, således også i processer uden

for glykolyesen, f.eks. i reaktioner, der forbruger den ATP, der dannes i glykolyesen. Man kan studere i hvor høj grad, de ATP-forbrugende processer har kontrol over den glykolytiske flux. Det gøres ved at introducere en reaktion, der hydrolyserer ATP uden at være koblet til resten af cellens metabolisme (figur 1). Vi har udviklet en teknologi til introduktion af en ukoblet ATPase-aktivitet i bakterier: Ved at overudtrykke F_1F_0 -ATPase introduceres den hydrolyse af cellens ATP. Ved dernæst at udtrykke F_1 -ATPase fra en række syntetiske promotorer var det muligt at modulere graden af ATPase-aktivitet (figur 4). I *Escherichia coli* resulterede introduktionen af ATPase-aktivitet i en voldsom

stimulering af den glykolytiske flux med op til 70% [10]. Biomasseudbyttet blev samtidig reduceret kraftigt, hvilket viste, at biomasseproduktionen var blevet afkoblet fra den glykolytiske flux (figur 5, side 26). Også en mindre nedgang i væksthastigheden blev observeret, hvilket blev tilskrevet en nedgang i cellens energiniveau ved tilstedeværelse af ATPase-aktivitet.

For at kvantificere andelen af kontrol, som de ATP-forbrugende processer har på den glykolytiske flux, blev energimetabolismen simplificeret ved at splitte den op i et modul af enzymatiske reaktioner, der syntetiserer ATP (glykolyesen), og et modul der forbruger ATP (anabolismen), med den fælles intermediære ATP (eller mere korrekt, cellens phosphoryleringspotential, ΔG_p) [11]. Ved at plote de eksperimentelle data for den glykolytiske flux og cellernes væksthastighed mod energiniveauet ($[ATP]/[ADP]$ ratio), var det muligt at kvantificere, hvor »elastiske« fluxene var ift. ændringer i energipotentialet (figur 5).

Ifølge metabolisk kontrolteori er sammenhængen mellem elasticiteter og fluxkontrol beskrevet i summations- og

Boks 2

Kontrolanalyse på glykolyesen

Kontrolanalyse på glykolyesen

$$S \xrightarrow{e_1} \Delta G_p \xrightarrow{e_2} \text{vækst}$$

Summationsteorem, fluxkontrol $C_{\Delta G_p}^J + C_{\text{vækst}}^J = 1$ (1)

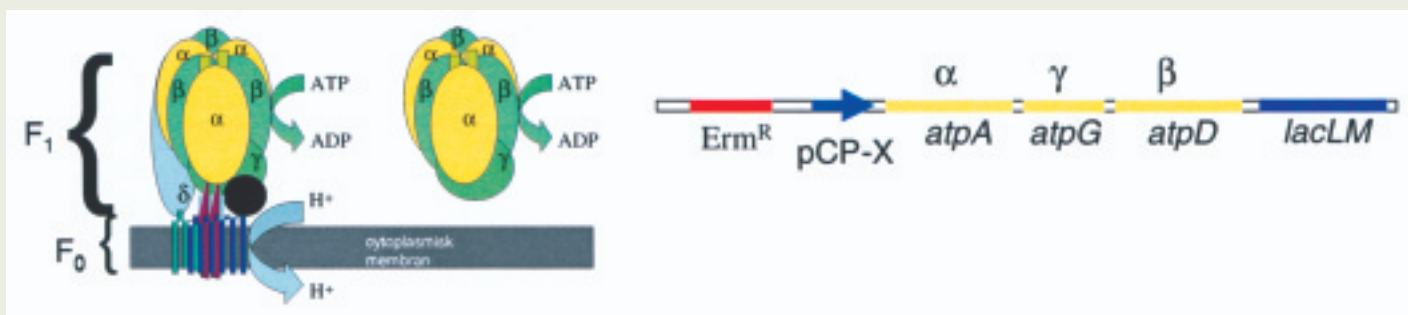
Konnektivitetsteorem, fluxkontrol $C_{\Delta G_p}^J + C_{\text{vækst}}^J = 0$ (2)

$$C_{\Delta G_p}^J = \frac{-e_1}{e_1 - e_2} = \frac{-\frac{\partial \ln J}{\partial \ln \Delta G_p}}{\frac{\partial \ln J}{\partial \ln \Delta G_p} - \frac{\partial \ln J}{\partial \ln \Delta G_p}} = \frac{-\frac{\partial \ln J}{\partial \ln \Delta G_p}}{\frac{\partial \ln J}{\partial \ln \Delta G_p} - \frac{\partial \ln J}{\partial \ln \Delta G_p}} \quad (3)$$

Begge elasticiteter bliver målt i samme eksperiment hvor ΔG_p er perturberet

$$C_{\Delta G_p}^J = \frac{-\frac{\partial \ln J}{\partial \ln \Delta G_p}}{\frac{\partial \ln J}{\partial \ln \Delta G_p} - \frac{\partial \ln J}{\partial \ln \Delta G_p}} = \frac{1}{1 - \frac{\partial \ln J}{\partial \ln \Delta G_p}} \approx \frac{1}{1 - \frac{\partial \ln J}{\partial \ln \Delta G_p}}$$

Beregning af fluxkontrol i de ATP-forbrugende processer. Energimetabolismen er opdelt i to moduler med energipotential som den fælles intermediære. Fluxkontrollkoefficienterne kan da beregnes ved kombination af summations- og konnektivitetsteoremerne. Bemærk hvordan ændringer i energipotential i dette tilfælde udgår af beregningerne af fluxkontrol, som herefter beregnes ud fra ændringer af fluxene. $C_{\Delta G_p}^J$ = fluxkontrollkoefficienter, ϵ^i = elasticitetskoefficient over for energipotential, J = flux, ΔG_p = energipotential.



Figur 4. Komplekser af de tre F_1 -subunits α , β og γ fra F_1F_0 -ATPasen kan benyttes til at øge ATP-omsætningen i celler. I bakterier sidder de tre relevante gener sammen i en operon, der letter en koordineret ekspresion fra syntetiske promotorer. ATP-generne er indsat foran rapportergen $lacLM$, der koder for β -galactosidase.

konnektivitetsteoremerne (Boks 1). Vha. disse teoremer var det muligt at opstille en formel til beregning af fluxkontrollen af de ATP-forbrugende processer på den glykolytiske flux (formel 3, Boks 2). Det overraskende resultat var, at den glykolytiske flux i *E. coli* primært kontrolleres af ATP-forbruget (figur 5) [10,12].

En introduktion af ATPase-aktivitet blev på samme måde foretaget i *L. lactis* og viste også en signifikant reduktion af biomasseudbyttet [13]. Men i modsætning til *E. coli* resulterede introduktionen af ATPase-aktivitet ikke i nogen stigning af den glykolytiske flux i hurtigt voksende celler, hvilket viste, at fluxkontrollen af de ATP-forbrugende processer var tæt på nul. Derimod var effekten af ukoblet ATPase-aktivitet stærkt afhængig af vækstbetingelserne. Således blev den glykolytiske flux stimuleret kraftigt i langsomt eller ikke-voksende celler. Disse resultater indikerer, at glykolysen i

voksende *L. lactis*-celler er tæt på den maksimale kapacitet, og at kontrollen af glykolysen under disse betingelser måske befinder sig i de glykolytiske reaktioner eller i cellens transportsystemer.

Konklusion

Ved at benytte molekylærbiologiske værktøjer til modulering af enzymaktiviteter i små trin er det blevet muligt at lave gode kvantitative studier over metaboliske ruter i mikroorganismer. I kombination med metabolisk kontrolanalyse skaber det en stabil platform for en bedre kvantitativ forståelse af metabolismer i mikroorganismer. Det faktum, at glykolysen i *E. coli* er kontrolleret af ATP-forbrugende processer udenfor selve glykolysen, viser vigtigheden af, at betragte alle cellens biokemiske processer som et globalt netværk. Tidligere har forskere ofte været tilbøjelige til at betragte enzymatiske trin i ►

Science Imaging
SCANDINAVIA AB

Scandinavian reseller of FUJIFILM SCIENCE IMAGING SYSTEMS

FUJIFILM
I&I - Imaging & Information

Nothing can hide.

THE LAS-3000 IMAGING SYSTEM CAN SEE IT.

Discovering the most subtle images in the world of bio-analysis can be a bit like trying to see a chameleon in full camouflage. But, with Fujifilm's new LAS-3000 imaging system featuring Super CCD technology, you'll have the advantage of more pixels of information and faint-light image definition. You'll have the advantage of discovery ... at its finest.

Intersecting pixel layout of new Super CCD.

New Super CCD
More pixels. Better resolution.

New Binning Mode
Unprecedented faint-image sensitivity. Improved resolution.

New Filter Options and Light Sources
Allows even more applications.

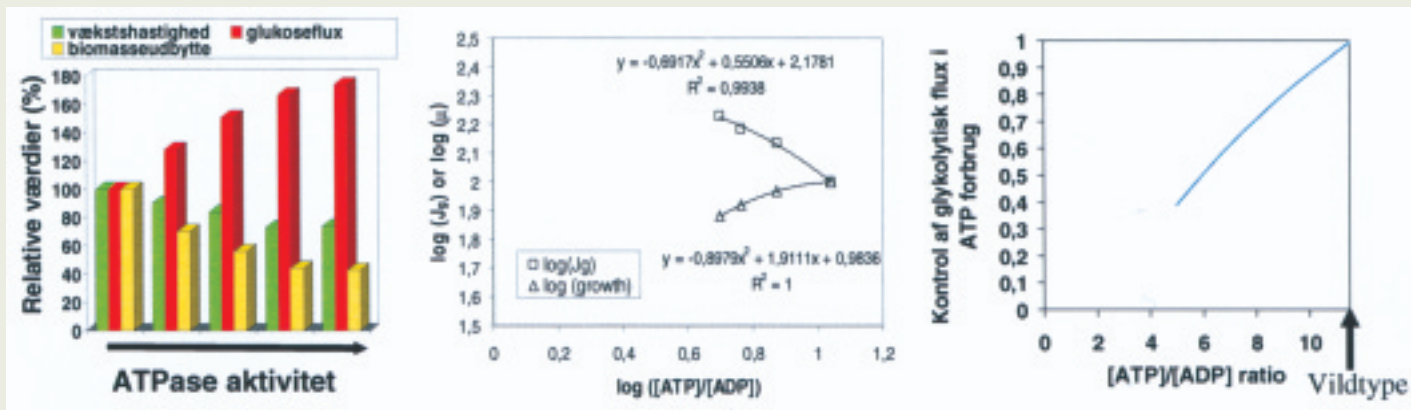
New User-friendly Operation
All configuration and imaging functions are controlled remotely through an easy-to-use Mac™ or Windows® interface.

email: info@scienceimaging.se

web: www.scienceimaging.se

phone: +46 8 55 60 40 70

fax: +46 8 55 60 40 77



Figur 5. Analyse af kontrol for ATP-forbruget på den glykolytiske flux i *E. coli*. Ekspressionen af ukoblet F_1 -ATPase øgede omsætningen af ATP i cellen og stimulerede den glykolytiske flux i *E. coli* (venstre figur). Ved at plote væksthastighed og glykolytisk flux mod energipotentialet, var det muligt at fitte kurver til bestemmelse af elasticiteterne (midterste figur). Næsten al kontrol af glykolyse sidder i de ATP-forbrugende processer i voksende vildtype *E. coli* celler (højre figur) [10].

en lokal sammenhæng. En anden vigtig observation er, at kontrollen af metaboliske fluxe også afhænger af vækstbetingelserne. Det er specielt vigtigt, når eksperimentelle data skal overføres til industrielle fermenteringer.

Arbejdet beskrevet i denne artikel er blevet finansieret af Forskningsstyrelsen, Mejeribrugets Forskningsfond, ATV, Chr. Hansen A/S og Levnedsmiddelcentret.

E-mail adresser:

Brian Koebmann: brk@biocentrum.dtu.dk

Christian Solem: cso@biocentrum.dtu.dk

Peter Ruhdal Jensen: prj@biocentrum.dtu.dk

Referencer:

1. Kacser, H. & J.Burns, J.A. 1973. Rate control of biological processes. *Cambridge Symp. Soc. Exp. Biol.* 27:65-104.
2. Heinrich, R. & Rapoport, T.A. 1974. A linear steady-state treatment of enzymatic chains. General properties, control and effector strength. *Eur. J. Biochem.* 42:89-95.
3. Jensen, P. R. & Hammer, K. 1998. The sequence between the consensus sequences modulates the strength of prokaryotic promoters. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:82-87.
4. Solem, C. & Jensen, P.R. 2002. Modulation of gene expression made easy. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2397-2403.
5. Büchner, E. 1897. Alkoholische gährung ohne hefezellen. *Ber. Dt. Chem. Ges.* 30:117-124.
6. Schaaff, I., Heinisch, J. & Zimmermann, F. K. 1989. Overproduction of glycolytic enzymes in yeast. *Yeast* 5:285-290.
7. Ruyter, G. J. G., Postma, P. W. & van Dam, K. 1991. Control of glucose metabolism by Enzyme II^{Glc} of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173:6184-6191.
8. Poolman, B., Bosman, B., Kiers, J. & Konings, W.N. 1987. Control of glycolysis by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Streptococcus cremoris* and *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 169:5887-5890.
9. Solem, C., Koebmann, B.J. & Jensen, P.R. 2003. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase has no control over glycolytic flux in *Lactococcus lactis* MG1363. *J. Bacteriol.* 185:1564-1571.
10. Koebmann, B. J., Westerhoff, H.V. Snoep, J.L., Nilsson, D. & Jensen, P.R.. 2002a. The glycolytic flux in *Escherichia coli* is controlled by the demand for ATP. *J. Bacteriol.* 184:3909-3916.
11. Westerhoff, H.V. & van Dam, K. 1987. Thermodynamics and control of biological free energy transduction. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
12. Oliver, S. 2002. Metabolism: demand management in cells. *Nature* July 4, 418:33-34.
13. Koebmann, B. J., Solem, C., Pedersen, M.B., Nilsson, D. & Jensen, P.R. 2002b. Expression of genes encoding F_1 -ATPase results in uncoupling of glycolysis from biomass production in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4274-4282.

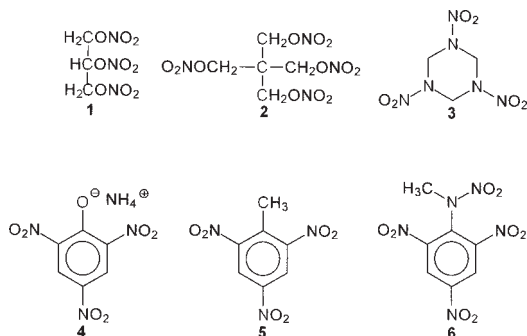
Nyt om...

Nyt om C4 – et sprængstof brugt på Bali

Bag navnet C4 gemmer sig sprængstoffet pentaerythritol tetranitrat PETN plus et væld af andre navne. Sprængstoffer er stoffer eller blandinger, som producerer store mæng-

der gasser, når de sønderdeles. Typisk består de af noget, der kan reduceres, og noget der kan oxideres. I almindelig sortkrudt er kaliumnitrat oxidator og S og C oxideres. Moderne sprængstoffer har ofte oxidator og reduktor bygget sammen, ofte er de nitroforbindelser eller organiske nitrater. Nedenfor er vist en række eksempler. 1. Nitroglycerin, 2. PETN, 3. Cyclomethylen trinitramin RDX, 4. Ammonium pikrat AP, 5. TNT, trotyl, 6. Trinitrophenylmethyl nitramin, tetryl. Disse navne er ikke systematiske navne.

Carl Th.



Explosives and Propellants, *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, Vol. 10, side 1