Gen za pospeševanje primarnega metabolizma / Kemijski inštitut, Ljubljana

Avtorji

Matic Legiša, Mojca Benčina, Gregor Tevž, Maja Capuder, Mlakar Tina, Darija Oven

Bistvo ideje

Z vnosom mt-*pfk*A gena v komercialne mikroorganizme povečamo metabolni pretok preko glikolize in dvignemo nivo intermediatov cikla trikarboksilnih kislin, ki predstavlja povezavo med katabolnimi in anabolnimi reakcijami v celicah. Mikroorganizmi z vgrajenim mt-*pfk*A genom hitreje sintetizirajo določen biotehnološki produkt.

Opis problema oziroma ideje

Predmet izuma je mutirani skrajšani gen mt-*pfk*A, ki kodira sintezo aktivnega krajšega fragmenta 6-fosfofrukto-1-kinaze (PFK1), ki za indukcijo aktivnosti ne potrebuje posttranslacijske modifikacije, ter uporaba mutiranega krajšega gena in njegovega proteinskega produkta za povečanje hitrosti sinteze celične biomase, ekstracelularnih encimov ter primarnih in sekundarnih metabolitov. Izum spada na področje mikrobne biotehnologije in biokemije. Pri biotehnoloških procesih ima odločilni vpliv za končno ceno produkta hitrost sinteze produkta. Pri izboljšavah biotehnoloških procesov vedno stremijo k izboljšavi, tako mikroorganizma, kot pogojev gojenja, kjer bi se v čim krajšem času predelalo čim več substrata v končni produkt. Pri industrijskih mikroorganizmih, ki so sposobni izločati določene biotehnološke produkte s povečano produktivnostjo in visokimi dobitki, so izrednega pomena anaplerotske reakcije, ki vodijo do povečane koncentracije intermediatov cikla trikarboksilnih kislin. Citronski cikel ali cikel trikarboksilnih kislin predstavlja osrednje mesto metabolizma,

kamor se steka večina produktov oksidacije ogljikovih hidratov, maščobnih kislin in amino kislin, iz njega pa izvira tudi cela vrsta prekurzorjev za različne biosintetske poti. Cikel tako predstavlja kritično povezavo med katabolnimi in anabolnimi procesi v celici. Z dvigom nivoja intermediatov cikla trikarboksilnih kislin, s pospeševanjem t.i. anaplerotskih reakcij, se poveča sinteza ključnih celičnih gradbenih elementov, kot so na primer lipidi, amino kisline in porforini, s tem pa posredno hitrost rasti celic ter sinteza primarnih in sekundarnih metabolitov, ki imajo pogosto biotehnološko vrednost. Več specifičnih metabolnih reakcij prištevamo k anaplerotskim reakcijam, vendar pa je neomejen pretok metabolitov preko glikolitične poti razgradnje glukoze najbolj pomemben. Pri tem igra pomembno vlogo encim 6-fosfofrukto-1-kinaza (PFK1), ki predstavlja ključno regulatorno točko. Pri evkariontskih organizmih je encim preko inhibicije povratne zveze reguliran s citratom in ATP, kar pomeni, da njegova aktivnost pade, ko se v celici prekomerno dvigne nivo citronske kisline kot intermediata cikla trikarboksilnih kislin in ATP, kot končnim produktom oksidativne fosforilacije (Voet in Voet, 1995). Tako dejansko negativna regulacija encimske aktivnosti zmanjšuje učinkovitost anaplerotskih reakcij in s tem posredno hitrost sinteze končnih produktov. Izredno povečanje hitrosti tvorjenja bioproduktov bi dosegli, če bi imeli nemoten pretok preko glikolize, to pa bi bilo mogoče, če bi bil na voljo aktiven encim 6-fosfofrukto-1-kinaza, ki bi ohranil pozitivne lastnosti regulacije, izgubil pa bi negativno regulacijo. V preteklosti je bilo opisanih več primerov, ko so poskušali pospešiti metabolni pretok preko glikolize, s ciljem da bi povečali dobitke ali hitrost sinteze končnih produktov, vendar so se takšni projekti slabo končali. Da bi dvignili metabolni pretok preko glikolize so iz glive *A. niger* sistematično izolirali tri gene, ki kodirajo regulatorne encime te poti, med drugim tudi gen za 6-fosfofrukto-1-kinazo (PFK1). Gene so vrnili v celice istega seva v povečanem številu kopij, s ciljem, da bi dobili večjo koncentracijo omenjenih encimov in posredno hitrejšo pretvorbo metabolitov preko glikolize, vendar natančna analiza transformant ni potrdila pričakovanih rezultatov. Pričakovana pospešitev metabolnega pretoka pridobljena z gensko manipulacijo je bila izničena s spremenjenimi regulatornimi mehanizmi (Ruijter et al., 1996). Pri istem mikroorganizmu so enak efekt želeli doseči z naključnimi mutacijami, kjer so želeli spremeniti PFK1 tako, da ne bi bila več občutljiva na inhibicijo s citratom. Uspeli so izolirati mutanto, ki je

dejansko imela nekoliko zmanjšano občutljivost na citat, vendar pa je encim pri nekoliko povečani koncentraciji inhibitorja (10mM) deloval le z 20% maksimalne aktivnosti. Delno povečana odpornost na inhibitorno delovanje citrata tudi ni bistveno pripomogla h končnemu cilju, to je dvigu hitrosti sinteze končnega produkta (Schreferl et al., 1986). Encim z nekoliko znižano občutljivostjo na inhibicijo s citratom so uspeli dokazati s proteolitičnim odcepom 8 aminokislinskih ostankov na C terminalnem delu PFK1 izolirane iz zajčje mišice. Modificiran encim je popolnoma izgubil aktivnost šele ob prisotnosti 10 mM citrata, medtem ko je bil izhodni encim neaktiven že pri 2,5 mM inhibitorja (Valaitis et al., 1987). V primerjavi s PFK1 opisanimi pri drugih organizmih ima nativni encim pri glivi *A. niger* nekoliko večjo rezistenco na inhibicijo s citratom, kljub temu pa 10 mM koncentracija citrata skoraj popolnoma zavre njegovo delovanje. Poleg tega na encim inhibitorno delujejo koncentracije ATP večje od 1 mM. Encim PFK1 so pri glivi *A. niger* že večkrat poskusili natančno opisati (Habison et al., 1979; Habison et al., 1983; Schreferel et al. 1986; Arst et al., 1987), izolirali pa so tudi gen, ki kodira omenjeni encim in določili njegovo nukleotidno zaporedje. Analiza gena je pokazala, da gre za 85 kDa velik protein (EMBL accession number *pfk*A Z79690), medtem ko je študij kinetike na delno prečiščenem encimu, ki pa mu niso določili molske mase (!), pokazal, da encim aktivirajo AMP, fruktoza-2,6-bifosfat in amonijevi ioni, medtem ko ga citrat in ATP inhibirata (Habison et al., 1983; Mesojednik in Legiša, 2005). Ugotovljeno je bilo, da prisotnost amonijevih ionov inhibicijo encimske aktivnosti s citratom le nekoliko omili, ne pa prepreči (Habison et al., 1983, Arst et al., 1987). V literaturi smo opisali primer, ko smo pri glivi *A. niger* odkrili nekoliko krajši protein, z molsko maso 48 kDa, ki pa prvotno ni bil aktiven in se je ponovno aktiviral šele po fosforilaciji proteinske molekule (Legiša in Benčina 1994a). C.P. Kubicek, ki je vodil raziskave merjenja encimske kinetike pri istem encimu (Habison et al., 1979; Habison et al., 1983; Scheferel et al. 1986; Arst et al., 1987), je kategorično zavrnil, da bi v njegovem laboratoriju našli protein z 48 kDa, ki bi kazal znake aktivnosti PFK1 (Legiša in Benčina, 1994b). V dveh diplomskih delih (Smerkolj, 2000) je bil opisan tudi postopek za izolacijo 48 kDa fragmenta PFK1 in proces po katerem 48 kDa fragment v celicah glive *A. niger* verjetno nastane s posttranslacijsko modifikacijo (Mesojednik, 2003). Nedavno smo ugotovili, da gre v primeru izolata iz glive *A. niger* za protein katerega podenota ima

molsko težo 49 kDa in ne 48 kDa, bolj natačno pa smo opisali tudi posttranslacijsko modifikacijo in osnovno encimsko kinetiko (Mesojednik in Legiša, 2005). Z in vitro eksperimentom smo dokazali, da fragment takoj po proteolitični razgradnji ni aktiven in se ponovno aktivira šele po fosforilaciji proteinske molekule s cAMP-odvisno proteinsko kinazo. Študij kinetike krajšega fragmenta PFK1 izoliranega iz celic glive *A. niger* je pokazal, da je encim rezistenten na inhibicijo s citratom (Mlakar, diplomsko delo), negativno delovanje molekul ATP pa uspešno prepreči prisotnost fruktoze-2,6-difosfata (Mesojednok in Legiša, 2005). V literaturi ni zaslediti opisa, da bi se PFK1 katerega koli eukarionstkega organizma lahko in vivo posttranslacijsko modificirala ter tako ohranila pozitivno in izgubila negativno regulacijo. Izgleda, da je krajši fragment PFK1 pri glivi *A. niger*, glede na svoje kinetične lastnosti najbolj učinkovita do sedaj opisana oblika PFK1 encima. Da bi se izognili zapleteni posttranslacijski modifikaciji, smo poskušali krajši fragment PFK1 pripraviti iz skrajšanega gena *pfk*A. Po preizkusu serije različno dolgih genov, skrajšanih na 3' koncu kodirajoče verige, smo po transformaciji skrajšanega t-*pfk*A gena v celice glive *A. niger* in po inducirani fosforilaciji, uspeli v homogenatu detektirati aktivnost PFK1, ki je karakteristična za PFK1 fragment (M. Capuder, 2004). V celicah smo fosforilacijo izzvali z dodatkom Na-azida, ki je znan inhibitor toka elektronov preko citohromske verige. Rezultat te inhibicije je prekinjena sinteza molekul ATP, kar ima za posledico zmanjšano aktivnost transmembranskih protonskih črpalk (H+ATPaz), zastajanje protonov v celicah pa povzroči padec intracelularne pH vrednosti. Znano je, da glive na kopičenje protonov v celicah pogosto odgovorijo s sintezo signalne molekule cAMP, kar inducira fosforilacijo PFK1 fragmenta s cAMP-odvisno proteinsko kinazo, to pa končno povzroči aktivacijo encima. Čeprav krajši fragment PFK1 lahko celice in vivo sintetizirajo iz skrajšanega gena, pa encim prvotno ni aktiven. Aktivira se šele po fosforilaciji proteinske molekule, ki jo katalizira predhodno aktivirana cAMP-odvisna proteinska kinaza, kar je pogojeno z dvigom koncentracije cAMP v celicah. Za dvig nivoja cikličnega AMP, kot sekundarnega prenašalva signalov, so potrebne določene stresne spremembe v okolju/gojišču, ali pa moramo dvig cAMP inducirati umetno, z dodatkom specifičnih molekul v gojišče, ki aktivirajo adenilat ciklazo. Kot nam je znano pride do spontanega padca intracelularne pH vrednosti le pri enem od sevov glive *A. niger* (A60), kjer se krajši fragment

lahko tudi spontano aktivira. Pri drugem sevu (A158) iste vrste pa kljub enakim pogojem rasti do indukcije ne pride, saj so tu prisotne močnejše H+-ATPaze, ki preprečijo padec pH vrednosti v celicah, s tem pa tudi sintezo signalne molekule cAMP (Jernejc in Legiša, 2004). Pri nekaterih drugih mikroorganizmih poznamo mehanizme, ki sprožijo spontano sintezo cAMP ter aktivacijo proteinskih kinaz, ki bi lahko aktivirale krajši fragment PFK1, vendar pa takšni pogoji velikokrat niso združljivi z optimalnimi pogoji za sintezo biotehnoloških produktov in zato v praksi neuporabni. Potrebi po fosforilaciji proteinske molekule za aktivacijo encima bi se lahko ognili z vnosom specifičnih mutacij. V literaturi je zaslediti nekaj člankov, ki opisujejo spremenjene kinetične lastnosti PFK1 encima po induciranih spremembah v zaporedju nukeotidnih baz – mutacijah. Vendar pa so avtorji uporabljali tehniko ciljanih mutacij prvenstveno pri študiju določevanja alosteričnih mest predvsem pri vezavi različnih efektorjev. Najlepši prikaz takšnega študija je zaobjet v članku Li et al., 1999, kjer opisujejo določitev vezalnih mest za citrat kot inhibitor zajčje fosfofrukto-1-kinaze in pregledni članek Kemp in Gunasekera, 2002, ki govori o evoluciji alosteričnih ligandskih mestih na sesalčjih fosfofrukto-1-kinazah. Z mutacijami so tudi preučevali delovanje prokarijontskih PFK1 encimov, in sicer pri bakteriji *E. coli* (Wang in Kemp, 2001). Vendar pa z mutacijami do sedaj še niso poizkušali spreminjati fosforilacijskih mest na proteinu PFK1, kar bi pripeljalo do rezistence encima na kovalentno regulacijo s kinazami. Regulacijo encimske molekule s fosforilacijo in vpliv mutacij v fosforilacijski regiji na spremembo regulatornih lastnosti pa so bolj temeljito študirali pri PFK1 sorodnem encimu, to je 6-fosfofrukto-2-kinaza/fruktoza-2,6-bifosfataza (Kurland et al., 1992; Kurland in Pilkis, 1995), vendar pa je ta encim le posredno udeležen pri glikolizi. Tudi ob pregledu patentnih prijav in podeljenih patentnih zahtevkov ni bilo zaslediti dokumentov, ki bi se nanašali na PFK1 encim s spremenjenimi kinetičnimi lastnostmi in, ki bi mu neposredno aktivnost takoj po sintezi encimske molekule omogočale šele mutacije v fosforilacijski regiji. Glede na znano stanje tehnike, predstavljen problem sinteze aktivnega fragmenta PFK1, ki ima boljše encimske karakteristike, ni zadovoljivo rešen. Naloga in cilj izuma je rešiti predstavljen problem s postopkom, ki zaobide potrebo po fosforilaciji proteinske molekule za njeno aktivacijo in omogoča in vivo sintezo aktivnega proteina neposredno iz modificiranega mt-*pfk*A gena.

LITERATURA

Arts, E. in ostali. Gen. Microbiol., 133 (1987), s. 1195-1199.

Capuder M. Diplomska naloga. Ljubljana. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerzitetni študijski program biokemija, (2004), 77.

Habison, A. in ostali. M. FEMS Microbiol. Lett. 5 (1979): 39-42.

Habison, A. in ostali. Biochem. J. 209 (1983): 669-676.

Jernejc, K./Legiša M. J. Biotechnol. 112 (2004): 289-297.

Kemp, R. G./ Gunasekera, D. Biochem. 41 (2002): 9426-9430. Kurland, I.J. in ostali J. Biol. Chem. 267 (1992) 7: 4416-4423.

Kurland, I.J./Pilkis, S. Protein Science 4 (1995): 1023-1037.

Legiša, M./ Mattey M. Enzyme Microbiol. Technol. 10 (1988): 33-36. Legiša, M./ Benčina, M. FEMS Microbiol. Lett. 188 (1994a): 327-334.

Mesojednik, S. Diplomska naloga. Ljubljana. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, (2003), 46.

Mesojednik, S./ Legiša, M. Appl. Environment. Microbiol. 71, 3, 1425-1432.

Mlakar, T. Diplomska naloga, Ljubljana. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Oddelek za biokemijo, (2003), 56.

Poorman, R.A. in ostali. Nature 309 (1984): 467-469.

Ruijter, G.J.G. in ostali. Biochim. Biophys.Acta 1334 (1997): 317-326.

Schreferl, G. in ostali. J. Bacteriol. 165, 3 (1986), s. 1019-102.

Smerkolj, S. Diplomska naloga. Ljubljana. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, (2000), 32.

Valaitis, A.P. in ostali. J. Biol. Chem. 262, 11 (1987): 5044-5048.

Voet, D./ Voet, J. G. Biochemistry. Second edition. New York. Wiley & Sons inc., 1995, 1361.

Wang, X./Kemp, R.G. Biochemistry, 40 (2001): 3938-3942.

Glavna dodana vrednost

Dokazali smo, da z vnosom mt-*pfk*A gena v različne komercialne mikroorganizme, povečamo njihovo produktivnost in dobitke. S tem se poveča izkoristek gojišča in skrajša čas bioprocesa, kar pomeni velik finančni prihranek pri določenem biotehnološkem procesu.

Kupci ideje

Trenutno idejo testirata dve multinacionalni družbi: Novozyme iz Danske in Jungbunzlauer s sedežem v Švici. pričakujemo, da bodo dogovori o licenciranju stekli naslednje leto.

Kdo so konkurenti

Glede na to, da smo proces posttranslacijske modifikacije 6-fosfofruktokinaze opisali prvi in prvi dokazali, da s pripravo mt-*pfk*A gena lahko pospešimo metabolni pretok preko glikolize ter uporabo gena tudi patentno zaščitili, konkurence nimamo.

Patentna zaščita

Slovenski patent št. 22256, Mutirani skrajšani gen mt-*pfk*A za sintezo aktivnega krajšega fragmenta 6-fosfofrukto-1-kinaze. Vloga 26. 4. 2006;
Mednarodna patentna prijava št. PCT/SI2007/000007. Vloga 27. 2. 2007

Možen bodoči razvoj ideje

Razvoj ideje poteka na različnih nivojih. Na raziskovalnem nivoju poskušamo gen vnesti v nove komecialne mikroorganizme in opisati vpliv gena na njihovo produktivnost. Trenutno gen poskušamo pri bakterijah in pri kvasovki *S. cerevisiae* za produkcijo bioetanola. Na znanstvenih srečanjih in z bilateralnimi sestanki idejo predstavljamo različnim industrijskim partnerjem, ki bi bili eventuelni uporabniki. Trenutno idejo testirajo v danski firmi Novozyme, švicarska družba Jungbunzlauer pa je s Kemijskim inštitutom podpisala pogodbo za vnos mt-

*pfk*A gena v njihov produkcijski sev, ki ga bodo nato preiskusili v njihovem biotehnološkem postopku.

Kdo bil lahko idejo/izum/rešitev odkupil?

Biotehnološke družbe

Javna predstavitev ideje

Do sedaj smo idejo smo predstavili nekaterim tujim biotehnološkim družbam in na strokovnem srečanju RAFT (Recent Advances in Fermentation Technology) v novenmbu na Floridi, ZDA.