

# Molekularna biotehnologija: tržno zanimive molekule

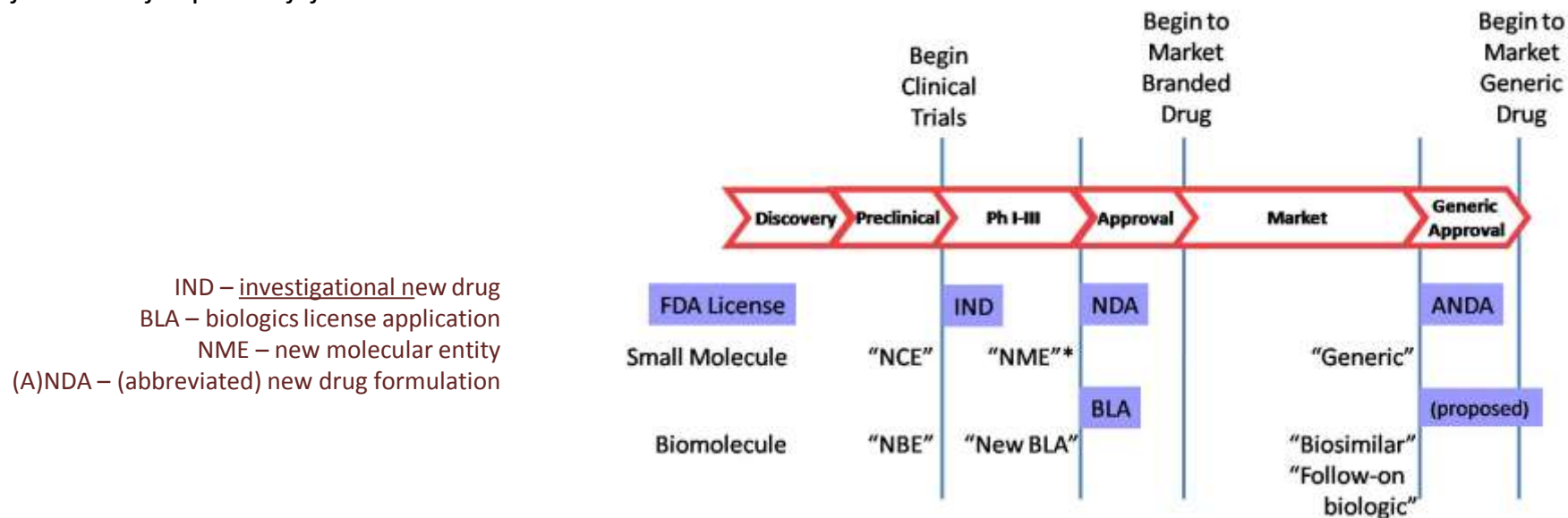
## Male molekule / velike molekule

V farmakologiji imenujejo ‚male molekule‘ organske spojine z  $M < 900$  Da (kar do neke mere omogoča njihovo prehajanje v celice), ki delujejo na biološke procese v nM koncentracijah. Nekateri predlagajo, da naj bi pri razvoju novih zdravil dali prednost molekulam z  $M < 500$  Da. ‚Male molekule‘ praviloma delujejo tako, da se vežejo na neko makromolekulo in z vezavo modulira njeno biološko aktivnost.

Med male molekule prištevamo nizkomolekularna zdravila (npr. antibiotike), v molekularni biologiji ligande za receptorje in mutagena sredstva, v kmetijstvu so to npr. pesticidi. Po izvoru so lahko naravne (npr. sekundarni metaboliti) ali sintetične. Male molekule so tudi prosti nukleotidi in oligonukleotidi, mono- in oligosaharidi in oligopeptidi.

Med biološkimi zdravili so tržno najpomembnejša makromolekulska zdravila (2012: 7 od prvih 10), male molekule pa manj (12/20). Pred ~5 leti je bilo stanje obratno in v ZDA biomolekule še vedno niso na najvišjih mestih po prodaji (stanje 2012).

V stroki makromolekulska zdravila označujejo z NBE (*new biological entities*), nizkomolekularna pa z NCE (*new chemical entities*); oznake se lahko v posameznih fazah testiranja, odobrevanja in trženja spreminjajo.



	Drug	Generic Name	Type	Disease Indications	2012 Sales Est. (1&2)	US Rank (3)
1	Humira	adalimumab	biomolecular drug	rheumatoid arthritis	\$9.27	6
2	Remicade	Infliximab	biomolecular drug	psoriasis, Crohn's disease, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, rheumatoid arthritis, and ulcerative colitis	\$8.22	8
3	Enbrel	Etanercept	biomolecular drug	autoimmune diseases	\$7.96	7
4	Advair/Seretide	Fluticasone/salmeterol	small molecule	asthma and COPD	\$7.90	4
5	Rituxan	Rituximab	biomolecular drug	lymphomas, leukemias, transplant rejection, and autoimmune disorders	\$7.29	11
6	Lantus	Insulin glargine	biomolecular drug	diabetes	\$6.65	19
7	Herceptin	Trastuzumab	biomolecular drug	breast cancer	\$6.40	27
8	Crestor	Rosuvastatin	small molecule	high cholesterol and cardiovascular disease	\$6.25	3
9	Avastin	Bevacizumab	biomolecular drug	various cancers	\$6.26	16
10	Abilify	Aripiprazole	small molecule	antidepressant	\$5.38	2
11	Plavix	Clopidogrel	small molecule	coronary artery disease, peripheral vascular disease, and cerebrovascular disease	\$5.32	17
12	Cymbalta	Duloxetine	small molecule	major depressive disorder and generalized anxiety disorder (GAD)	\$4.99	5
13	Gleevec	Imatinib	small molecule	multiple cancers	\$4.72	28
14	Spiriva	Tiotropium bromide	small molecule	COPD	\$4.49	15
15	Lyrica	pregabalin	small molecule	Pain	\$4.16	25
16	Neulasta	pegfilgrastim	biomolecular drug	neutrophil stimulation after chemotherapy	\$4.09	10
17	Januvia	sitagliptin	small molecule	diabetes	\$4.09	18
18	Lipitor	Atorvastatin	small molecule	high cholesterol and cardiovascular disease	\$3.95	31
19	Nexium	esomeprazole	small molecule	erosive esophagitis	\$3.94	1
20	Singulair	montelukast	small molecule	asthma	\$3.85	12

<http://www.portfoliomanagementsolutions.com/the-organization-of-pharmaceutical-rd/small-molecule-drugs-versus-biomolecular-drugs-biologics/>

Seznam 20 tržno najuspešnejših zdravil na svetovnem in ameriškem tržišču 2012

## „Pravilo pet“ (The Rule of Five)

„Lipinskijevo pravilo pet“ = „Pfizerjevo pravilo pet“ = RO5

Pravilo pet je pravilo za približno oceno verjetnosti, da ima neka učinkovina lastnosti, ki ji omogočajo, da bi jo lahko uporabili kot oralno zdravilo („druglikeness“). Temelji na analizi molekulskih lastnosti, ki prispevajo k farmakokinetiki – ADME (absorpcija, porazdelitev, metabolizem, izločanje).

RO5 uporabimo pri analizi spojin vodnic, ki jim postopno izboljšujemo lastnosti (npr. selektivnost, aktivnost) do potencialno uporabne učinkovine.

Pet se nanaša na:

- Ne več kot 5 donorjev H-vezi.
- Ne več kot 10 (2x5) akceptorjev H-vezi.
- $M < 500$  Da
- Porazdelitveni koeficient (oktanol : voda)  $\log P < 5$ .

Obstaja več izvedenk osnovnega pravila, ki natančneje določajo ugodne lastnosti spojin (število atomov, polarna površina molekule, število rotirajočih vezi. Za spojine vodnice so pravilo predelali v RO3.

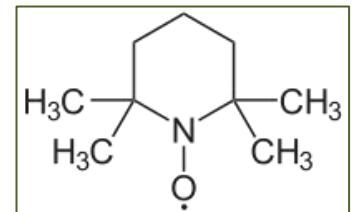
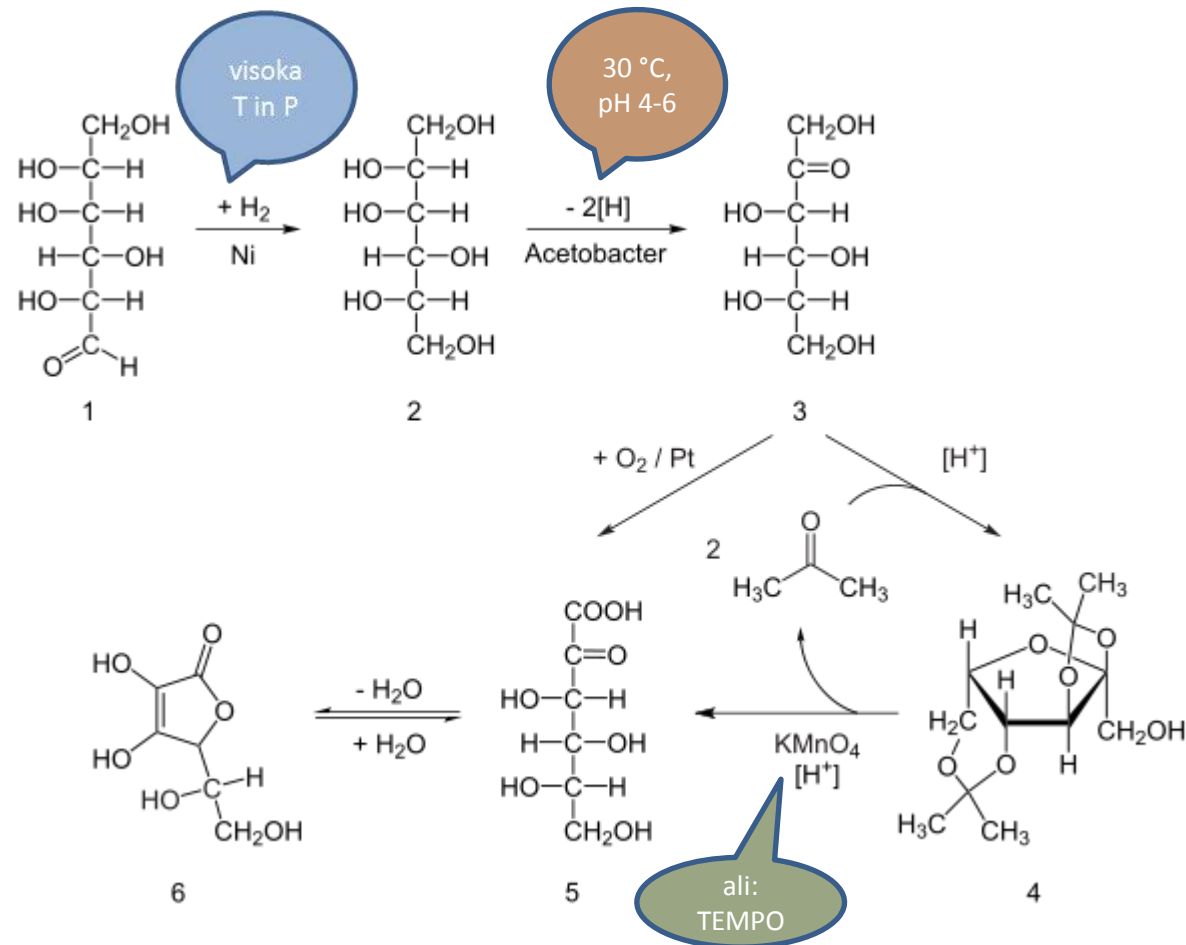
## Komercialno zanimive male molekule

Z uvedbo novih genov ali spremembo obstoječih lahko vplivamo na metabolične poti za pretvorbo substratov v zanimive produkte. Ti načeloma niso novi, pač pa do njih vodijo kombinirani pristopi: fermentacija + kemična pretvorba.

### Vitamin C

Pri sintezi askorbinske kisline obstoječi postopek sinteze uporablja kot substrat glukozo in vključuje mikrobo pretvorbo D-sorbitola v L-sorbozo (*Acetobacter suboxydans* proizvaja sorbitol dehidrogenazo), sledi pa več kemijskih reakcij preko 2-keto-L-gulonata (KLG, spojina 4).

Reichsteinov postopek (1933)



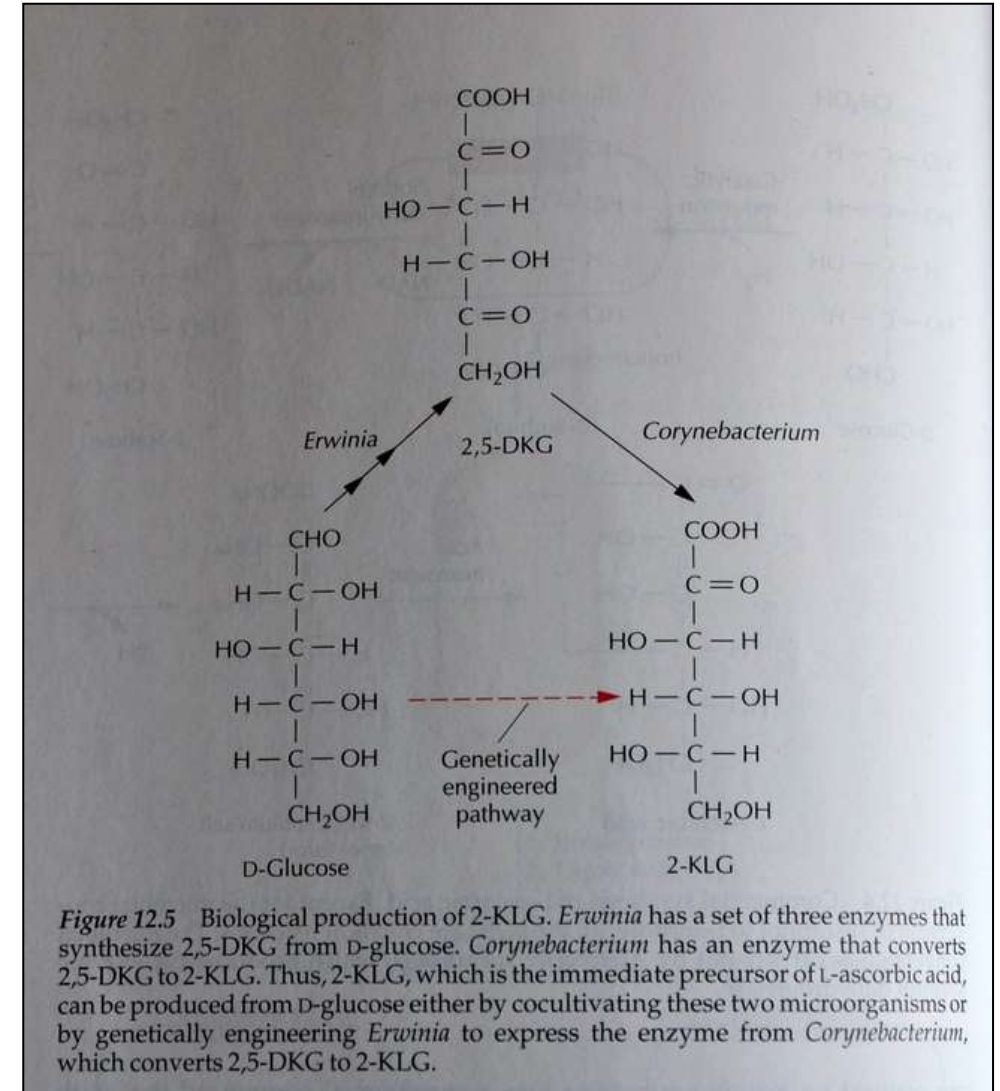
## Možnosti za mikrobnno sintezo prekursorjev vitamina C

Stopnjo sinteze 2-KGL iz glukoze bi bilo mogoče opraviti z uporabo vsaj dveh različnih tipov bakterij preko vmesnega produkta 2,5-diketo-D-glukonata. Bakterije iz rodov *Acetobacter*, *Gluconobacter* in *Erwinia* lahko glukozo pretvorijo v 2,5-DKG, tega pa bakterije iz rodov *Corynebacterium*, *Brevibacterium* in *Arthrobacter* pretvorijo v 2-KGL.

Postopek od glukoze do 2-KGL bi torej lahko teknel s kofermentacijo (hkratno uporabo več različnih mikroorganizmov). Pri tem se pojavi problem različnih optimalnih pogojev za rast (T, pH, sestava gojišča → različna kinetika rasti), kar lahko privede do izgubljanja enega od uporabljenih sevov iz kulture. Možna rešitev je z zaporedno povezanima ločenima fermentacijskima postopkoma, pri čemer pa je lahko hitrost rasti in pretvorbe v enem bioreaktorju še vedno drugačna kot v drugem, kar zaplete proizvodni proces.

Na Kitajskem, kjer proizvedejo 80 % vitamina C, uporabljajo od 90-tih let dalje dvostopenjski postopek, ki vključuje bakteriji *Acetobacter* (do sorboze) in *Erwinia* (do 2-ketoglukonske kisline).

Pretvorba glukoze do 2,5-DKG poteka v *E. herbicola* v več encimskih stopnjah, pretvorba 2,5-DKG v 2-KLG pa v korinebakteriji v eni sami stopnji z encimom 2,5-DKG-reduktazo. Zato so gen za končno pretvorbo prenesli in izrazili v erwiniji. Pretvorba je uspela, a je prepočasna, da bi bila uporaba komercialno zanimiva.

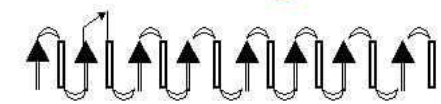
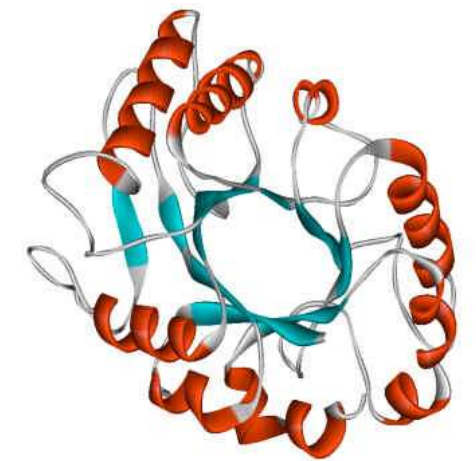
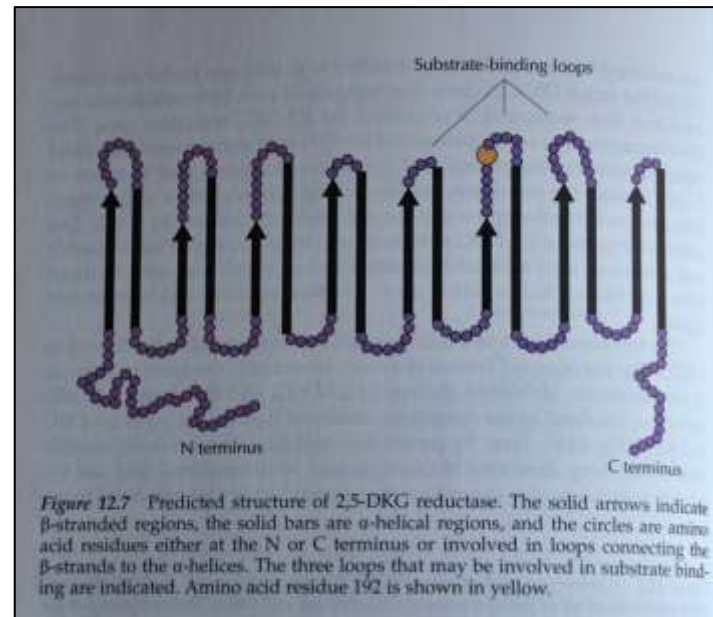
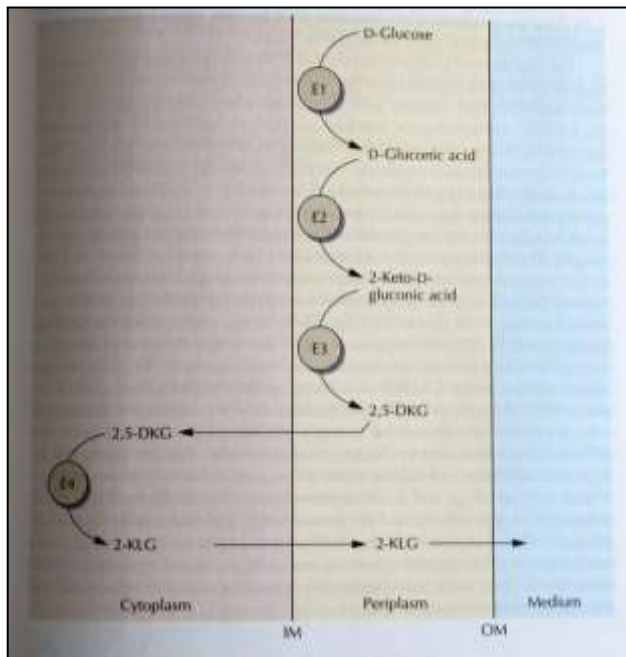


**Figure 12.5** Biological production of 2-KLG. *Erwinia* has a set of three enzymes that synthesize 2,5-DKG from D-glucose. *Corynebacterium* has an enzyme that converts 2,5-DKG to 2-KLG. Thus, 2-KLG, which is the immediate precursor of L-ascorbic acid, can be produced from D-glucose either by cocultivating these two microorganisms or by genetically engineering *Erwinia* to express the enzyme from *Corynebacterium*, which converts 2,5-DKG to 2-KLG.

## Postopek priprave GS spremenjenih ervinij za proizvodnjo prekursorja vitamina C

Najprej so morali identificirati gen za 2,5-DKG reduktazo iz korinebakterije. To so naredili tako, da so izolirali encim, mu določili N-končno ak zaporedje. To je služilo kot osnova za sintezo dveh sond (po 43 nt), pri čemer so kot 3. nukleotid v kodonu izbrali C ali G, ker so vedeli, da je pri tej bakteriji 71 % nukleotidov GC (takrat še niso znali sintetizirati mešanih zaporedij). S sondama so pregledali genomsko knjižnico korinebakterije in izolirali klon, ki se je hibridiziral z obema sondama. Nukleotidno zaporedje je pokazalo prisotnost gena za 2,5-DKG reduktazo. Del pred zapisom za Met(1) so nadomestili z regulatornimi zaporedji za *E. coli* (naravni delujejo v G+ bakterijah, ne pa v G-). V *E. coli* so proizvedli aktiven encim. Nato so gen prenesli v vektor širokega spektra in z njim transformirali ervinijo (regulatorne regije iz *E. coli* so bile funkcionalne).

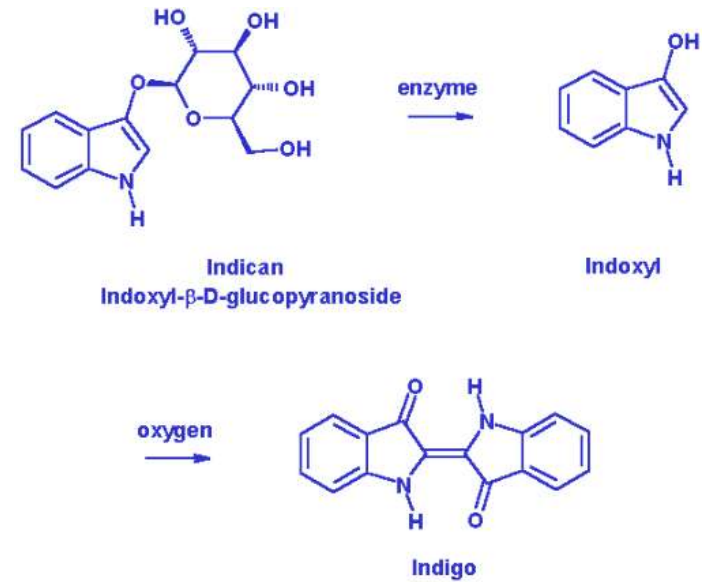
GS ervinije so bile sposobne pretvoriti D-glukozo v 2-KLG. Pri tem so erviniji lastni trije encimi, zasidrani v notranjo celično membrano glukozo pretvorili v 2,5-DKG, klonirana reduktaza pa je v citoplazmi katalizirala končno pretvorbo v 2-KLG. Za komercialno izrabo bi bilo treba učinkovitost pretvorbe še povečati. Tako bi bilo mogoče povečati aktivnost encima in njegovo termično stabilnost. Z molekulskim modeliranjem so na osnovi primarne strukture predvideli prostorsko strukturo alfa/beta sodčka z 8 strukturnimi elementi. Takrat so že bile znane strukture več podobno zviti proteinov, kar jim je omogočalo, da predvidijo tiste zanke, ki najverjetneje sodelujejo pri vezavi substrata. Pripravili so 12 enojnih mutant encima, od katerih je samo ena (Gln192Arg) imela (~2x) večjo specifično aktivnost kot wt. Temperaturno stabilnost so povečali z mutacijo G55A,G57A.



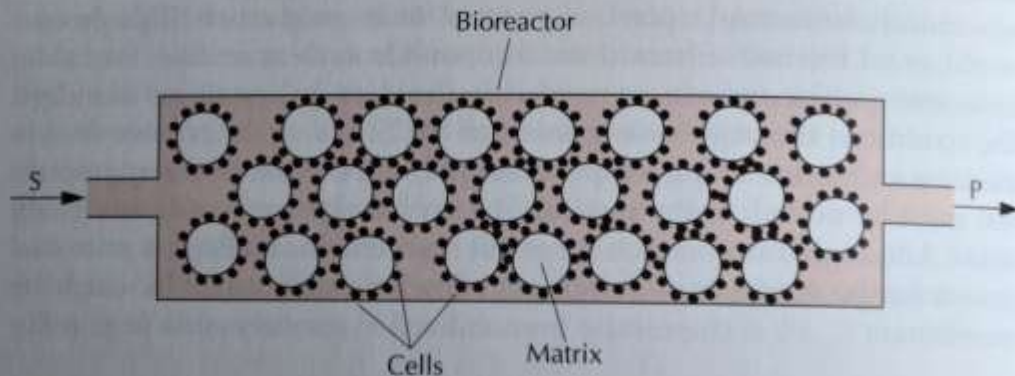
Topology diagram of Hevamine - one of the TIM barrel structures

## Mikrobna sinteza indiga

Indigo je modro barvilo, ki so ga včasih pridobivali iz fermentiranih listov metuljnice indigovca. V fermentacijskem postopku se je glikozid indikan pretvoril v barvilo indigo(tin). Precipitat po fermentaciji so zmešali z NaOH in stisnili, posušili in zdrobili v prah. Danes indigo večinoma proizvajajo sintezno, ob uporabi anilina, formaldehida in cianida. Letna prodaja dosega 13.000 t (200 mio USD) in je s tem najpogosteje uporabljano barvilo sploh, zato bi bilo smiselno pripraviti alternativni biotehnološki postopek za sintezo, ki bi bil bolj prijazen okolju. Pripravili so GS bakterije *E. coli*, ki so sposobne sinteze, a so izpleni nizki, zato so načrtovali proizvodnjo z imobiliziranimi bakterijami (celuloza, silikagel) v pretočnem bioreaktorju, kjer bi kontrolirali vnos triptofana na eni strani in zbirali produkt na drugi strani.



*Figure 12.9* Schematic representation of a bioreactor that might be suitable for the production of indigo from recombinant *E. coli* cells. The cells are immobilized either chemically or physically to particles of a stable matrix. The substrate, tryptophan (S), is added at one end, and the product, indigo (P), is removed continuously from the other end. The rate of flow through the column would be limited by the rate of conversion of substrate into product.





## Priprava rekombinantnih bakterij za proizvodnjo indiga

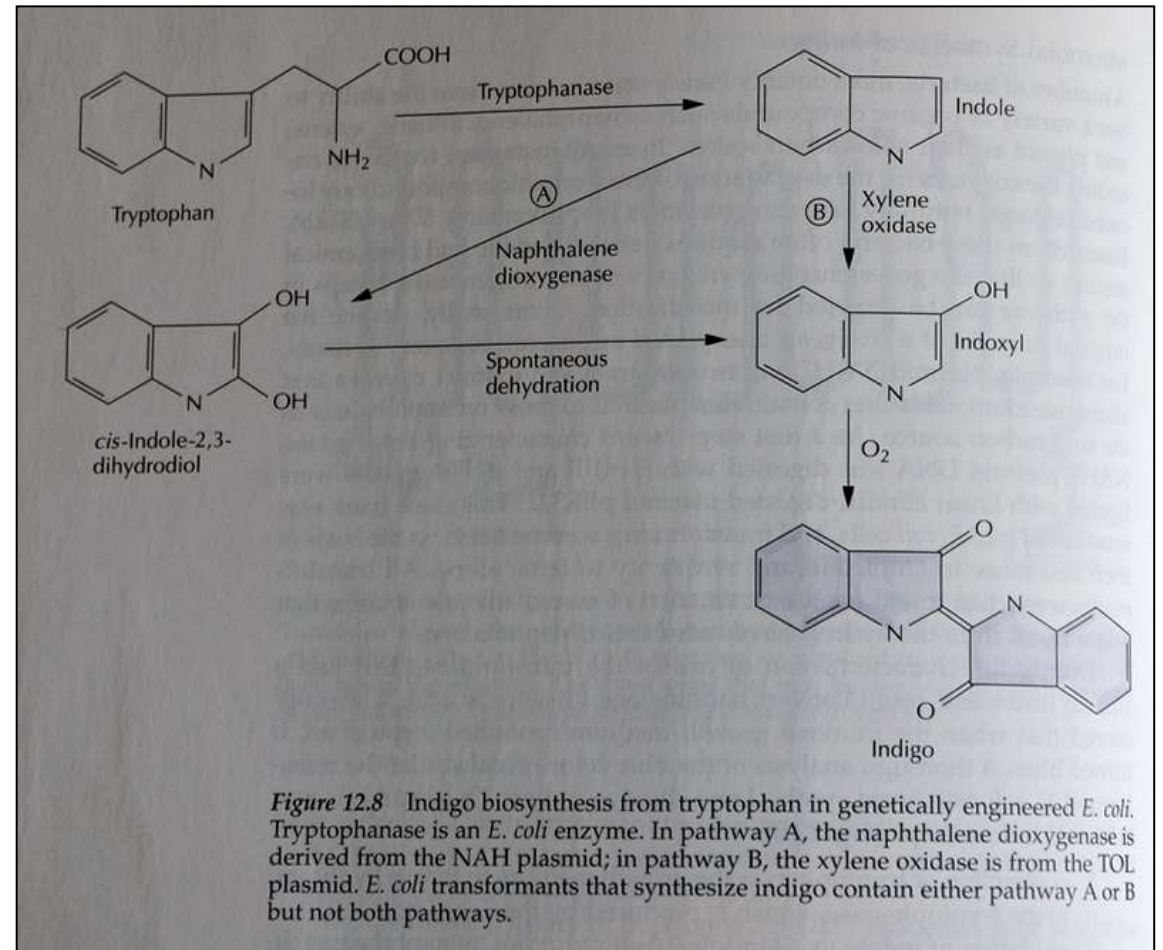
Številne bakterije so sposobne kot edini vir ogljika uporabljati kompleksne organske molekule, kot so naftalen, toluen, ksilen, fenol. Geni za pretvorbo teh spojin so pogosto na velikih naravnih plazmidih, npr. pri psevdomonasu. Z analizo operonov na teh plazmidih so npr. ugotovili, da plazmid NAH7 vsebuje dva operona, ki omogočata rast na naftalenu. Ko so analizirali plazmid, so gensko knjižnico v pBR322 testirali tako, da so preverjali, ali kateri od fragmentov (dobljenih s HindIII) proizvaja nehlapne metabolite kot produkte pretvorbe (radioaktivno označenega) naftalena.

Eden od klonov (vključek 10,5 kb) je omogočal sintezo salicilne kisline.

Če je minimalno gojišče vsebovalo Trp, so se celice obarvale modro.

Kasneje so ugotovili, da sintetizirajo indigo. Pretvorbo omogočata triptofanaza *E. coli* (Trp → indol) in naftalen dioksigenaza (na kloniranem fragmentu) (→ *cis*-indol-2,3-dihidrodiol), sledita spontana emiminacija vode in oksidacija v indigo.

Alternativno pot sinteze omogoča plazmid TOL, ki vsebuje zapis za ksilen oksidazo (Trp → indoksil... spontano oksidira do indiga).



## Biosinteza aminokislin

Aminokislino uporabljajo kot ojačevalce okusa, prehranske dodatke, dodatke krmi, antioksidante, v medicini za infuzijske tekočine in v kemijski industriji kot vhodno surovino. Letno proizvedejo >800.000 t aminokislin v vrednosti >5 mrd USD.

*Table 12.1* Commercial applications of amino acids

Amino acid	Application(s)
Alanine	Flavor enhancer
Arginine	Therapy for liver diseases
Aspartic acid	Flavor enhancer; sweetener synthesis
Asparagine	Diuretic
Cysteine	Bread production; therapy for bronchitis; antioxidant
Glutamic acid	Flavor enhancer
Glutamine	Therapy for ulcers
Glycine	Sweetener synthesis
Histidine	Therapy for ulcers; antioxidant
Isoleucine	Intravenous solutions
Leucine	Intravenous solutions
Lysine	Feed additive; food additive
Methionine	Feed additive
Phenylalanine	Infusions; sweetener synthesis
Proline	Intravenous solutions
Serine	Cosmetics
Threonine	Feed additive
Tryptophan	Intravenous solutions; antioxidant
Tyrosine	Intravenous solutions; precursor for L-DOPA
Valine	Intravenous solutions

## Biosinteza aminokislin

Aminokislina uporabljajo kot ojačevalce okusa, prehranske dodatke, dodatke krmi, antioksidante, v medicini za infuzijske tekočine in v kemijski industriji kot vhodno surovino. Letno proizvedejo >800.000 t aminokislin v vrednosti >5 mrd USD, od tega pol mase predstavlja L-Glu (MSG) kot ojačevalec okusa.

Aminokislina večinoma proizvajajo z ekstrakcijo iz proteinskega hidrolizata ali s fermentacijo ob uporabi grampozitivnih talnih bakterij *Corynebacterium* ali *Brevibacterium*. V osnovi so ravni proizvodnje nizke, so pa jih uspeli izboljšati z mutagenozo in presejanjem, kar je precej zamudno. Zato je bolj smiselno na osnovi znanih reakcijskih poti za sintezo aminokislin gensko spreminjati samo zapise za encime, ki so udeleženi v proizvodnji. Potrebno pa je natančno razumevanje regulacijskih mehanizmov (npr. inhibicija z metaboliti) ter razvoj postopkov za genetsko spreminjanje grampozitivnih bakterij. Predvsem so potrebni ustrezni prenosljivi ekspresijski vektorji (selekcija s Tet, Cm ali Kan deluje tako za G+ kot G-) in boljši protokoli za transformacijo (zaenkrat še najboljše s konjugacijo ali preko protoplastov).

Table 12.1 Commercial applications of amino acids

Amino acid	Application(s)
Alanine	Flavor enhancer
Arginine	Therapy for liver diseases
Aspartic acid	Flavor enhancer; sweetener synthesis
Asparagine	Diuretic
Cysteine	Bread production; therapy for bronchitis; antioxidant
Glutamic acid	Flavor enhancer
Glutamine	Therapy for ulcers
Glycine	Sweetener synthesis
Histidine	Therapy for ulcers; antioxidant
Isoleucine	Intravenous solutions
Leucine	Intravenous solutions
Lysine	Feed additive; food additive
Methionine	Feed additive
Phenylalanine	Infusions; sweetener synthesis
Proline	Intravenous solutions
Serine	Cosmetics
Threonine	Feed additive
Tryptophan	Intravenous solutions; antioxidant
Tyrosine	Intravenous solutions; precursor for L-DOPA
Valine	Intravenous solutions

## Proizvodnja Trp v *Corynebacterium glutamicum*

V wt bakterijo so vstavili dodatno kopijo gena za antranilat sintetazo. Ta encim sicer določa hitrost sinteze Trp v naravni biosintezni poti.

Gen za encim je mogoče izolirati na naslednji način:

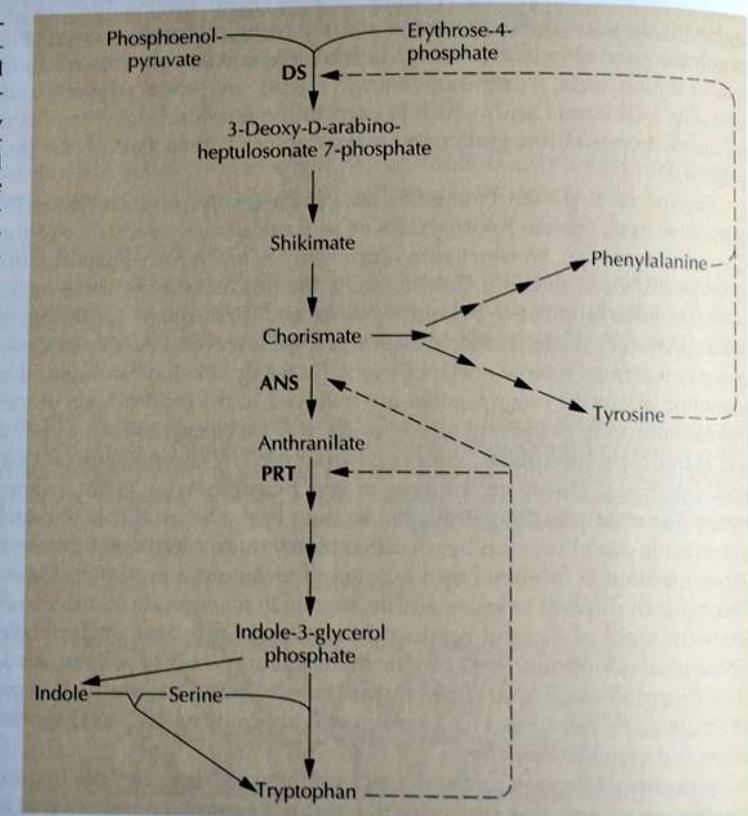
1. Pripravimo genomsko knjižnico *Brevibacterium flavum* v prenosljivem vektorju za *E. coli* / *C. glutamicum*.
2. Vektorje vnesemo v *C. glutamicum*, ki ne proizvaja antranilat sintaze.
3. Izvedemo selekcijo na minimalnem gojišču (izhodiščni sev ne raste).

Vektor, ki komplementira okvarjen gen za antranilat sintazo prenesemo v wt *C. glutamicum* in preverimo ravni sinteze Trp. Ugotovili so, da se je proizvodnja glede na wt povečala za 130 %.

Nadaljnje povečanje proizvodnje so dosegli z uvedbo optimiziranih genov za tri ključne encime (DS, ANS, PRT) v biosintezi Trp. Za vse tri so ukinili negativne povratne zanke (inhibicija s produktom).

Alternativa bi bila, da bi celotno biosintezno pot prenesli v *E. coli*.

**Figure 12.10** Simplified pathway and regulation of tryptophan biosynthesis in *C. glutamicum*. The abbreviations DS, ANS, and PRT represent the enzymes 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase, anthranilate synthase, and anthranilate phosphoribosyltransferase, respectively. The solid lines represent the synthetic pathways. The dashed lines denote feedback inhibition. Indole is produced in a side reaction and is converted into tryptophan by the action of tryptophan synthase  $\beta$ .



**Table 12.2** Production of tryptophan under standard growth conditions by certain strains of *C. glutamicum*

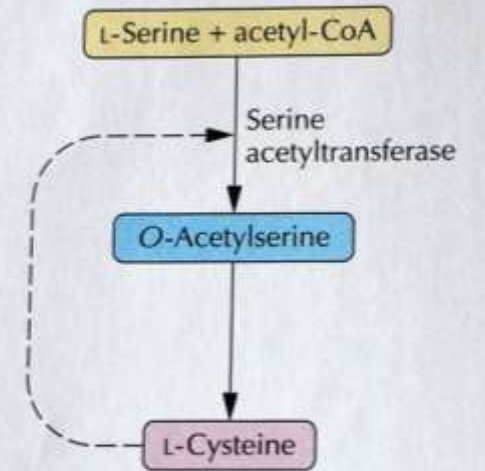
Strain	Tryptophan concentration (mg/mL)
Mutant	0.00
Mutant with vector	0.34
Wild type	0.48
Wild type with vector	1.12

Adapted from Ozaki et al., U.S. patent 4,874,698, 1989.

## Proizvodnja Cys v *E. coli*

Cistein je ena najpomembnejših aminokislin v farmacevtski, živilski in kozmetični industriji. Klasična proizvodnja poteka iz proteinskega hidrolizata iz človeških las in ptičjega perja. Mikroorganizmi sicer proizvajajo Cys, a so ravni nizke, predvsem zaradi povratne zanke, v kateri L-Cys zavre delovanje encima serin acetiltransferaze.

Povratno zanko so ukinili z uvedbo mutacije Met256 v encim iz *E. coli* (*cysE*). Ta ostanek so spremenili v vsako od ostalih aminokislin. Ko so preverjali aktivnost mutiranih encimov, so pri nekaterih klonih ugotovili, da je raven sinteze povečana. Vektor, ki je zagotovil najvišjo raven proizvodnje, so prenesli v sev *E. coli*, ki ni bil sposoben razgradnje Cys. Raven sinteze se je povečala, a malo. Kasneje so uporabili gen za serin acetiltransferazo iz *A. thaliana* (nima povratne zanke) in ga izrazili v *E. coli*, ki ni imela lastnega encima in ni razgrajevala Cys. S tem se je proizvodnja Cys bistveno povečala.



**Figure 12.11** Biosynthesis of L-cysteine from L-serine and acetyl coenzyme A (CoA). The dashed arrow indicates feedback inhibition.

## Antibiotiki

Od odkitja penicilina (1928) so iz različnih mikroorganizmov izolirali >12.000 različnih antibiotikov, ki se med seboj razlikujejo po specifičnosti in načinu delovanja. Najpomembnejše antibiotike so izolirali iz bakterij iz rodu *Streptomyces*, ki so grampozitivne, večinoma talne bakterije. Antibiotike so izolirali tudi iz drugih grampozitivnih ter iz gramnegativnih bakterij in gliv. Letna proizvodnja antibiotikov presega 100.000 t v vrednosti >5 mdr USD, od tega 2 % za povečanje prirasta živali. Vsako leto odkrijejo ~200-300 novih antibiotikov s presejanjem knjižnic več tisoč mikroorganizmov. Od novoodkritih antibiotikov jih je tržno zanimivih le 1-2 %.

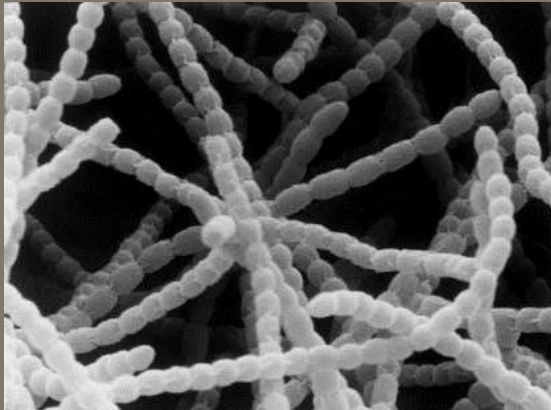
Za genetsko izboljševanje industrijsko pomembnih sevov večinoma uporabljajo klasično mutagenozo in selekcijo. Zgodovinsko gledano je bil največji problem zagotoviti visoke ravni proizvodnje (Fleming: 2 U/ml, danes: 70.000 U/ml). S tehnologijo DNA bi bilo možno pridobiti nove antibiotike z ustrežnejšim spektrom delovanja in manj stranskimi učinki, hkrati pa bi bilo mogoče hitreje doseči višje ravni proizvodnje.

*Table 12.3* Some of the most common microbially synthesized antibiotics

Amikacin sulfate	Cefotaxime	Chlortetracycline	Kanamycin sulfate	Streptomycin sulfate
Amoxicillin	Cefoxitin	Clarithromycin	Lincomycin HCl	Teicoplanin
Ampicillin	Cefpodoxime proxetil	Clindamycin	Methicillin	Tetracycline HCl
Azithromycin	Ceftazidime	Erythromycin A	Oxytetracycline	Vancomycin HCl
Benzylpenicillin	Ceftriaxone	Flomoxef	Phenoxymethylpenicillin	
Cefaclor	Cefuroxime	Gentamicin sulfate	Rifampin	
Cefixime	Cephalexin	Imipenem	Spiramycin	

## Delo s streptomiceti

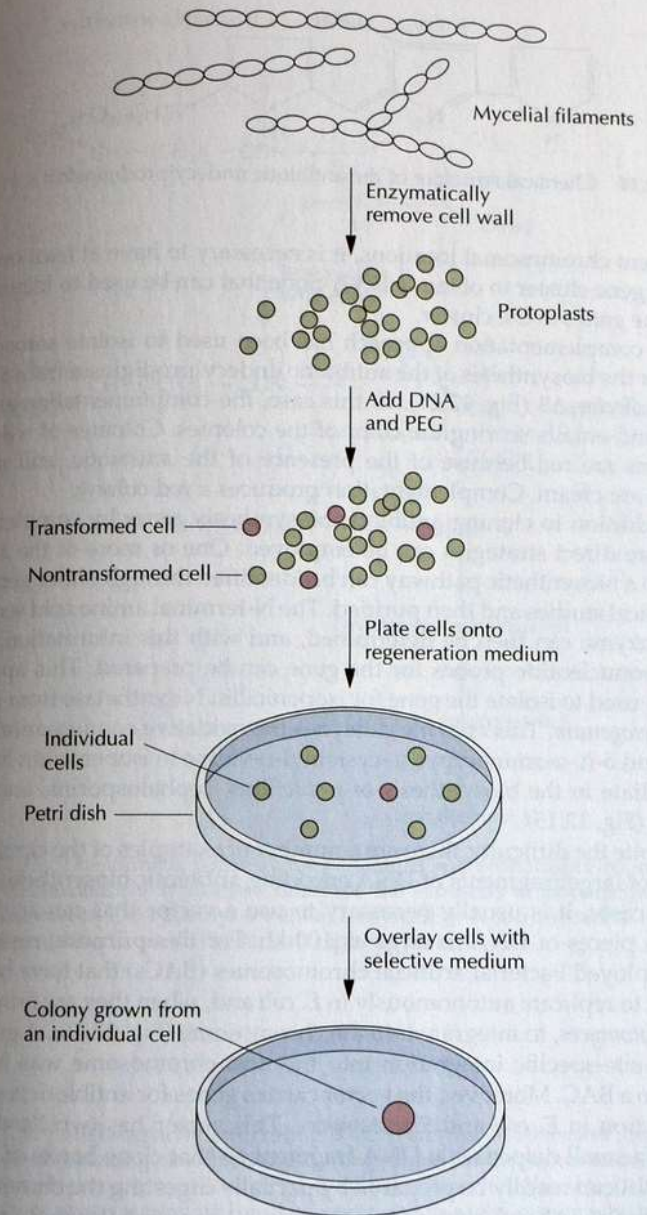
*Streptomyces* raste v obliki micelnih filamentov, kar otežuje delo. Celice je treba protoplastirati (odstraniti celično steno), s čimer dobimo posamezne celice, ki jih je mogoče transformirati (vnos je lažji ob uporabi PEG). Po transformaciji celice regeneriramo na neselektivnem gojišču, ko razvijejo steno, pa jih prekrijemo s selekcijskim gojiščem – to najpogosteje vsebuje neomicin ali tlostrepon.



<http://enfo.agt.bme.hu/drupal/sites/default/files/streptomyces.jpg>



<http://www.bbsrc.ac.uk/research/impact/streptomyces-antibiotics.aspx>



**Figure 12.13** Schematic representation of DNA transformation and selection of transformants of *Streptomyces* strains. The pink circles represent transformed cells, and the green circles represent nontransformed cells. PEG, polyethylene glycol.

## Kloniranje genov za biosintezo antibiotikov

Za sintezo antibiotikov je potrebnih 10 – 30 katalitičnih stopenj. Identifikacija potrebnih genov poteka običajno tako, da pripravijo gensko knjižnico wt bakterije in s posameznimi kloni transformirajo sev, ki ni sposoben biosinteze antibiotika. Če pride do komplementacije okvare, pomeni da klon vsebuje enega od genov, ki so za biosinezo potrebni. Ta klon nato uporabijo kot sondo za preiskovanje knjižnice, pri kateri so genomski fragmenti dolgi ~10 kb. Na ta način ugotovijo, kateri sosednji geni so zapisani v genomu wt bakterije. Če so geni razporejeni po kromosomu v več gručin, je treba uporabiti mutante z okvarjenim vsaj enim genom v vsaki gruči.

Tak pristop iskanja genov so uporabili pri identifikaciji nekaterih genov, potrebnih za biosintezo antibiotika undecylprodigiozina iz bakterije *Streptomyces coelicolor* A3. Pri tem antibiotiku je presejanje klonov preprosto, ker so wt celice obarvane rdeče, mutirane pa so bledorumene.

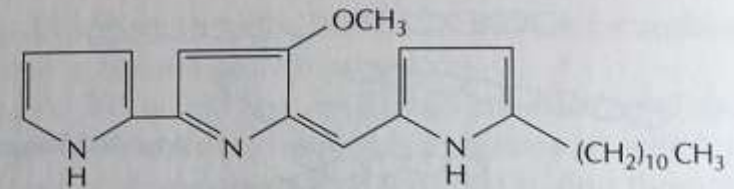
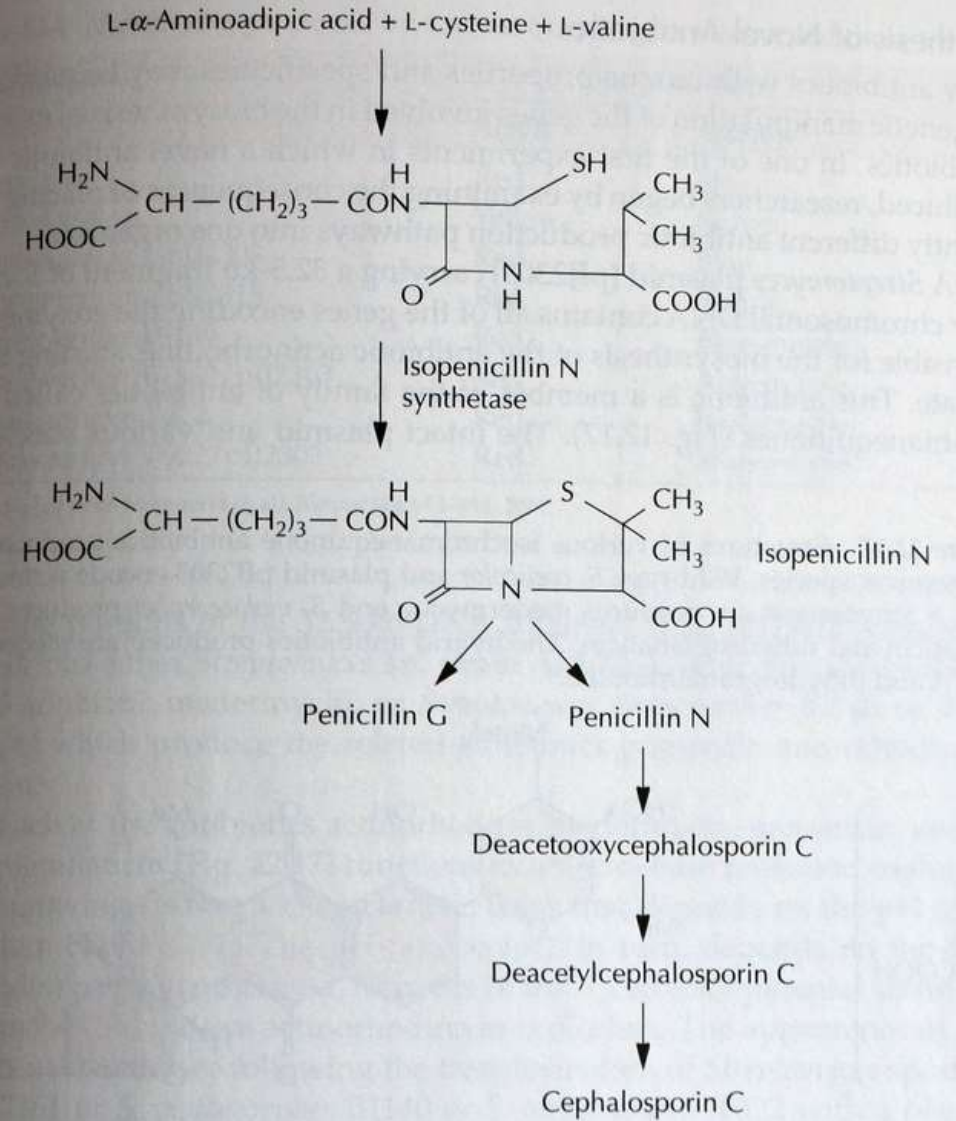


Figure 12.14 Chemical structure of the antibiotic undecylprodigiozin.



## Iskanje zapisov za encime, potrebne za biosintezo antibiotikov

Gene je mogoče poiskati preko poznavanja encimov, ki jih izoliramo z biokemijskimi metodami. Izoliranemu encimu določimo N-končno aminokislinsko zaporedje, nato sintetiziramo oligonukleotid, ki ga uporabimo kot sondo. Tako so npr. Našli gen za izopenicilin-N sintazo iz bakterije *Penicillium chrysogenum*. Encim katalizira oksidativno kondenzacijo prekursorja v izopenicilin N, ključni intermediat biosinteze penicilinov, cefalosporinov in cefamicinov.



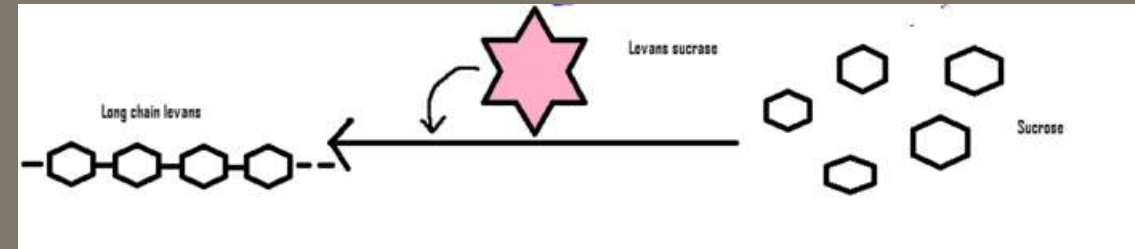
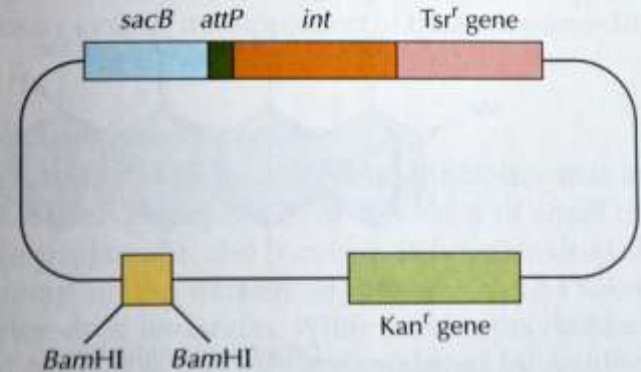
**Figure 12.15** Biosynthetic pathway for penicillins and cephalosporins in *P. chrysogenum*. Isopenicillin N synthetase catalyzes the synthesis of isopenicillin N from D-(L- $\alpha$ -amino adipyl)-L-cysteiny-D-valine. Isopenicillin N is a precursor in the synthesis of penicillin G, penicillin N, and cephalosporin C.

## Kloniranje genov za biosintezo antibiotikov

Celotna gruča genov za sintezo antibiotikov lahko obsega tudi 100 kb, zato je potrebno uporabiti ustrezno zmogljive vektorje, npr. BAC. Pripravili so tak BAC, da je v *E. coli* obstajal kot avtonomen genetski element, v streptomicetih pa je prišlo do integracije v genom. To je bilo mogoče, ker je BAC vseboval integracijsko kaseto. Selekcija je potekala na dva načina: v *E. coli* preko Kan<sup>R</sup>, v *Streptomyces* pa preko Tsr<sup>R</sup> (tiostrepton). Po integraciji inserta v genom je potekla še tretja selekcija, saj so se želeli prepričati, da se je integriral samo vključek (v *Bam*HI), ne pa morda celoten vektor. Gen *sacB* zapisuje za levansaharazo, ta pa povzroči, da celice v prisotnosti saharoze odmrejo – pogojno smrtni gen. Produkt levansaharaze, fruktozni polimeri levani, se akumulira v celicah in je za celico toksičen.

Vnos BAC v *E. coli* poteka z elektroporacijo, v streptomicete pa preko protoplastov.

Figure 12.16 High-capacity integrating BAC vector for *Streptomyces* strains. Kan<sup>r</sup>, kanamycin resistance gene which allows the presence of the vector to be selected in *E. coli*; Tsr<sup>r</sup>, thiostrepton resistance gene which allows for the selection of transformed *Streptomyces* strains; *attP* and *int*, components of the system which facilitates DNA integration into the *Streptomyces* chromosome; and *sacB*, a gene encoding an enzyme that converts sucrose into a product that is toxic to the cell.



## Sinteza novih antibiotikov

Z genskim spreminjanjem lahko pridobimo antibiotike, ki jih v naravi živeči organizmi verjetno niso sposobni sintetizirati. Prvi tak opisan primer so izvabili s kombinacijo dveh biosintezni poti, ki sta se med seboj nekoliko razlikovali.

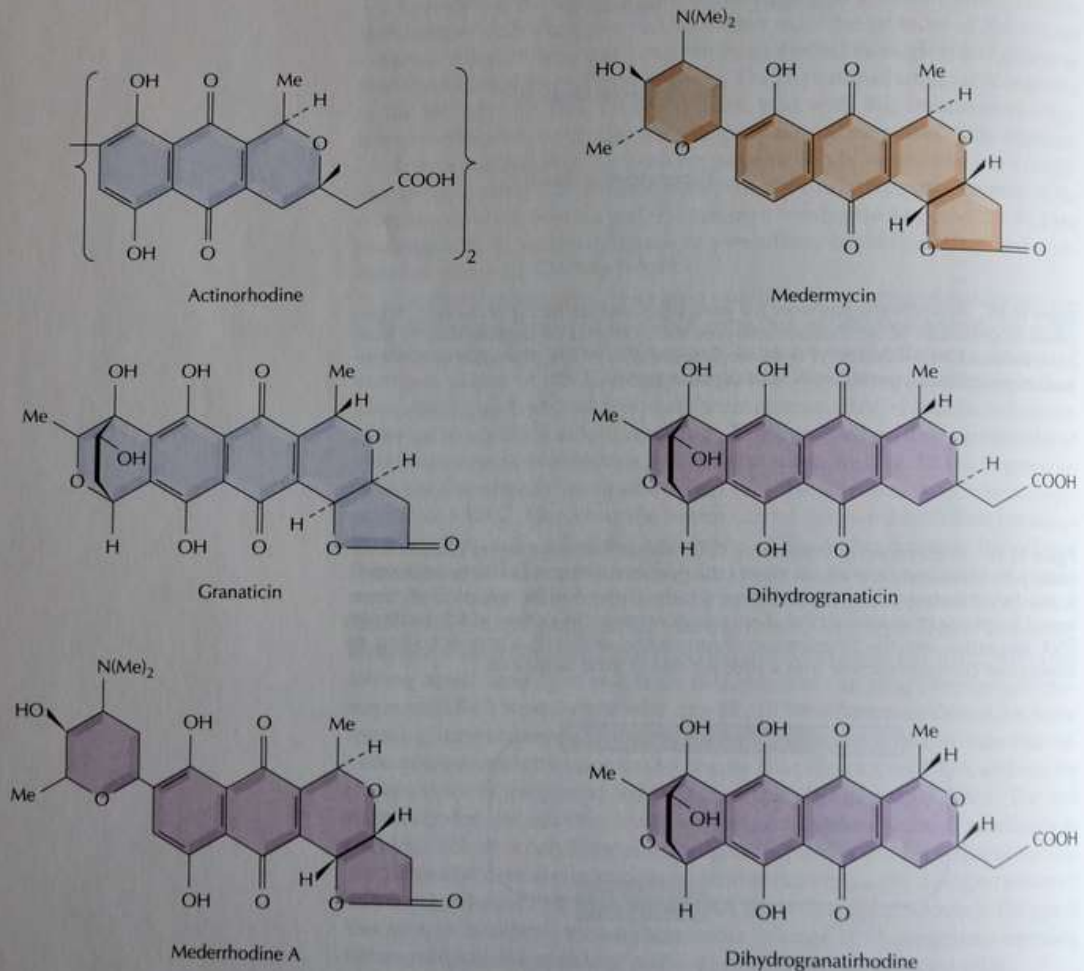
Plazmid pIJ2303 je vseboval 32,5 kb dolgo regijo z vsemi geni za biosintezo aktinorodina (iz acetata) – ta antibiotik prištevamo v skupino izokromankinonov. Nekatere vrste streptomicetov sintetizirajo sorodne antibiotike, npr. medermicin (sev AM-7161), granaticin (B1140), ipd. Za vse je značilno, da delujejo kot indikatorji pH – v kislem oz. alkalnem celice obarvajo na poseben način. Pri transformiranih streptomicetih so opazovali, ali pride do razvoja kakšnih novih barv in preko tega sklepali, ali se je sintetiziral kakšen nov soroden antibiotik (včasih so našli nove antibiotike, čeprav se barva ni spremenila).

Table 12.4 Antibiotics produced by various *Streptomyces* strains and those transformed with plasmids pIJ2303 and pIJ2315

Strain/plasmid	Color of culture		Antibiotic(s)
	Acidic	Alkaline	
<i>S. coelicolor</i>	Red	Blue	Actinorhodine
<i>Streptomyces</i> sp.	Yellow	Brown	Medermicin
<i>Streptomyces</i> sp./pIJ2303	Red	Blue	Medermicin, actinorhodine
<i>Streptomyces</i> sp./pIJ2315	Red	Purple	Mederrhodine A, medermicin
<i>S. violaceoruber</i> B1140	Red	Blue-purple	Granaticin, dihydrogranaticin
<i>S. violaceoruber</i> B1140/pIJ2303	Red	Blue-purple	Granaticin, dihydrogranaticin, actinorhodine
<i>S. violaceoruber</i> Tü22	Red	Blue-purple	Granaticin, dihydrogranaticin
<i>S. violaceoruber</i> Tü22/pIJ2303	Red	Blue-purple	Dihydrogranatirhodine, actinorhodine

Adapted from Hopwood et al., *Nature* 314:642–644, 1985.

Figure 12.17 Structures of various isochromanone antibiotics produced by *Streptomyces* species. Wild-type *S. coelicolor* and plasmid pIJ2303 encode actinorhodine, a *Streptomyces* sp. produces medermicin, and *S. violaceoruber* produces both granaticin and dihydrogranaticin. The hybrid antibiotics produced are mederrhodine A and dihydrogranatirhodine.



## Inženiring biosinteze poliketidnih antibiotikov

Poliketidi nastanejo s koncenzacijo majhnih karboksilnih kislin (acetat, propionat, butirat). Primeri takih molekul so antibiotik eritromicin, imunosupresiv FK506 in zdravilo za zniževanje koncentracije holesterola, lovastatin. Poliketidni antibiotiki se sintetizirajo podobno kot dolge maščobne kisline, v več zaporednih kondenzacijskih ciklih. Sintezo katalizirata dva različna tipa poliketid sintaz. Za aromatske poliketide je encim običajno ena polipeptidna veriga z več aktivnimi mesti (za vsako od zaporednih reakcij), za ostale pa so encimi sestavljeni iz več verig s posameznimi aktivnostmi.

Eritromicin sintetizirajo bakterije *Saccharopolyspora erythraea*. Znano je nukleotidno zaporedje, dolgo 56 kb, ki zapisuje za gene, potrebne za sintezo eritromicina. Gen za eritromicin poliketid sintetazo so spremenili tako, da so deletirali regijo, ki kodira domeno s ketoreduktazno aktivnostjo, ali pa so mutirali reduktazno domeno. S tem so dobili molekule, ki so imele na obroču namesto hidroksilne skupine karbonilno, oz. so v obroč uvedli dvojno vez.

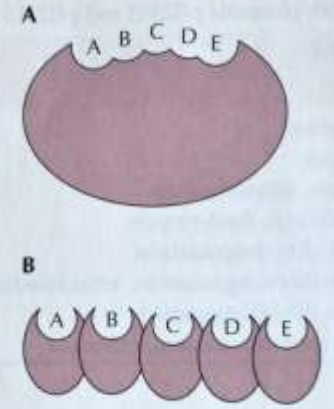
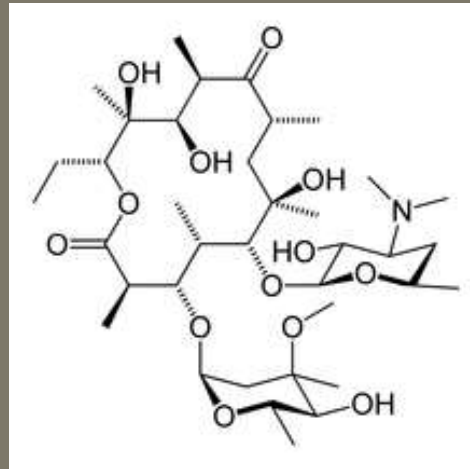


Figure 12.18 Schematic representation of polyketide synthase for aromatic polyketides. **A.** The active site may be on a single polypeptide. **B.** Alternatively, the enzyme can consist of assemblies of polypeptides with separate and distinct active sites. Both types of enzymes have different domains (regions A through E), and each domain has a separate enzymatic activity.

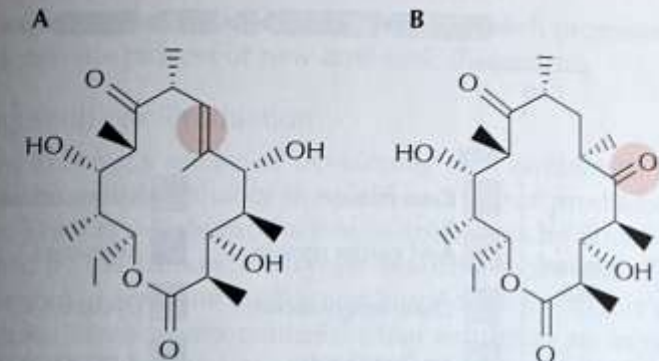
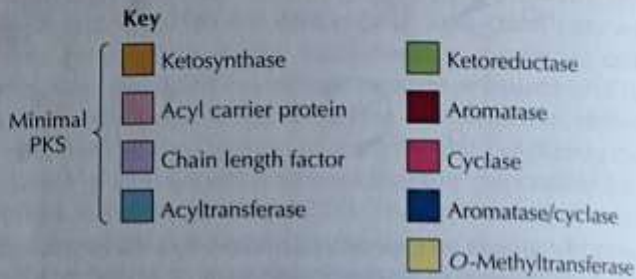
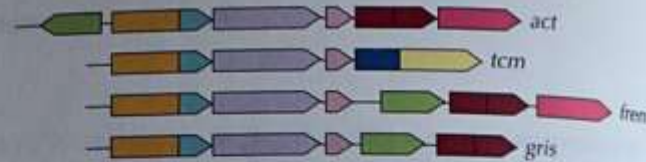


Figure 12.19 Altered erythromycin derivatives produced through genetic manipulation. **A.** A mutation in an enoylreductase gene caused a carbon-carbon double bond to be introduced at positions C-6 and C-7 of the ring (highlighted). **B.** A deletion in a  $\beta$ -ketoreductase gene caused the erythromycin to have a carbonyl moiety rather than a hydroxyl group at the C-5 carbon of the ring (highlighted). Adapted from Katz and Donadio, *Annu. Rev. Microbiol.* 47:875–912, 1993.

## Inženiring biosinteze aromatskih poliketidnih antibiotikov

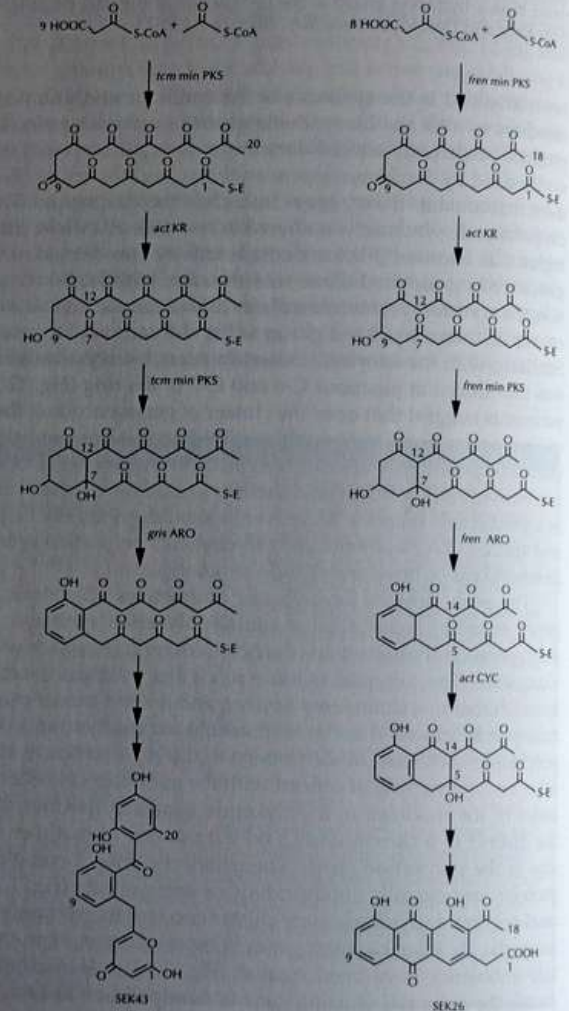
Za aromatske poliketidne antibiotike obstaja minimalni nabor treh genov, ki zapisujejo za ketosintazo + aciltransferazo, dejavnik dolžine verige in acilprenašalni protein. Dodatni geni omogočajo uvedbo dodatnih skupin na osnovno ogrodje. Zaporedje genov in število modulov odločajo o poteku reakcij in dolžini produkta.

Z zamenjavami genov med posameznimi gručkami so ustvarili nove aromatske poliketidne antibiotike.



**Figure 12.20** Gene clusters for the biosynthesis of the aromatic polyketide antibiotics actinorhodine (*act*), tetracenomyacin (*tcm*), frenolicin (*fren*), and griseusin (*gris*). Each cluster contains genes encoding a minimal polyketide synthase (PKS), which is responsible for the synthesis of the polyketide backbone. The enzymes encoded by the other genes act to modify the growing polyketide chain. Each gene is shown pointed in the direction in which it is transcribed.

**Figure 12.21** Theoretical biosynthetic pathway for the production of the rationally designed polyketides SEK43 and SEK26. Abbreviations: *act*, actinorhodine; *tcm*, tetracenomyacin; *fren*, frenolicin; *gris*, griseusin; min PKS, minimal polyketide synthase; KR,  $\beta$ -ketoreductase; ARO, aromatase; CYC, cyclase.



## Izboljšanje proizvodnje antibiotikov

Izboljšati je mogoče hitrost sinteze in izplen sinteze antibiotikov.

Pri proizvodnji z uporabo streptomicetov je pogost problem pomanjkanje kisika v kulturi, saj ta dosega zelo visoke vrednosti biomase, kisik pa ima v gojiščih nizko topnost. Izboljšati je mogoče zasnovo bioreaktorja, hkrati pa izboljšati uporabo obstoječega kisika z uvedbo gena za hemoglobin.

Aerobna bakterija *Vitreoscilla* sintetizira homodimerni hemoglobin. Gen zanj so prenesli v vektor za streptomicete pod kontrolo lastnega promotora. Protein je dosegel 0,1 % vseh proteinov, kar pa je zadoščalo, da so transformirane celice v pogojih 5-odstotne nasičenosti s kisikom zrastle do večjih gostot in sintetizirale 10-krat več aktinorodina kot celice, ki niso bile gensko spremenjene.

Farmacevtska industrija potrebuje 7-aminocefalosporsko kislino (7ACA) za sintezo različnih cefalospirinov. Dobijo jo sicer lahko iz cefalospirina C s kemijsko pretvorbo, organizmi pa je ne sintetizirajo. Zato so pripravili GS glivo *Acremonium chrysogenum*, ki sicer sama sintetizira cefalospirin C. Vstavili so ji dva gena, za oksidazo iz glive *Fusarium solani* in za acilazo iz bakterije *Pseudomonas diminuta*.

Brez oksidaze dobijo samo 5 % produkta. Tudi z obema genoma je produkta premalo, da bi se uporaba GS glive izplačala.

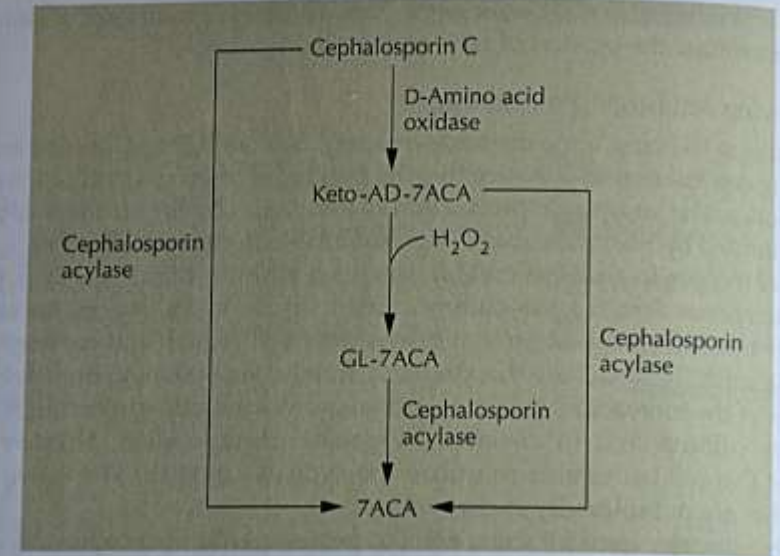


Figure 12.22 Genetically engineered biosynthetic pathway for the synthesis of 7-aminocephalosporanic acid (7ACA) from cephalosporin C. The D-amino acid oxidase gene is from the fungus *F. solani*, and the cephalosporin acylase gene is from the bacterium *P. diminuta*.

## Biosinteza prekurzorjev antibiotikov

Alternativna surovina za sintezo cefalosporinov je 7-aminodeacetocefaloporanska kislina (7ADCA). Ugotovili so, da če glivi *Acremonium chrysogenum* inaktivirajo gen *cefEF*, nastanejo velike količine penicilina N. Če v tak mutiran sev vstavijo gen *cefE* iz bakterije *Streptomyces clavuligerus*, pa nastane najprej deacetoksicefalosporin C (DAOC), ki se nadalje pretvori v 7ADCA.

## Alternativni gostiteljski organizmi

Mikroorganizmi, ki jih uporabljajo za sintezo antibiotikov, pogosto rastejo počasi, zahtevajo posebna gojišča in dosegajo nizke koncentracije. Alternativa bi bila, da bi uporabili kar bakterijo *E. coli*, kar so že izvedli na primeru sinteze poliketidnih antibiotikov, ko so v bakterije vstavili tri gene (po 10-12 kb) za komponente poliketid sintaze iz *S. erythraea*. Dodatno so morali vstaviti še gen iz *B. subtilis* za encim, ki omogoča vezavo kofaktorja na poliketid sintazo, inaktivirati je bilo treba gen za razgradnjo propionil-CoA in dodati gen za propionil-CoA karboksilazo iz *S. coelicolor*.

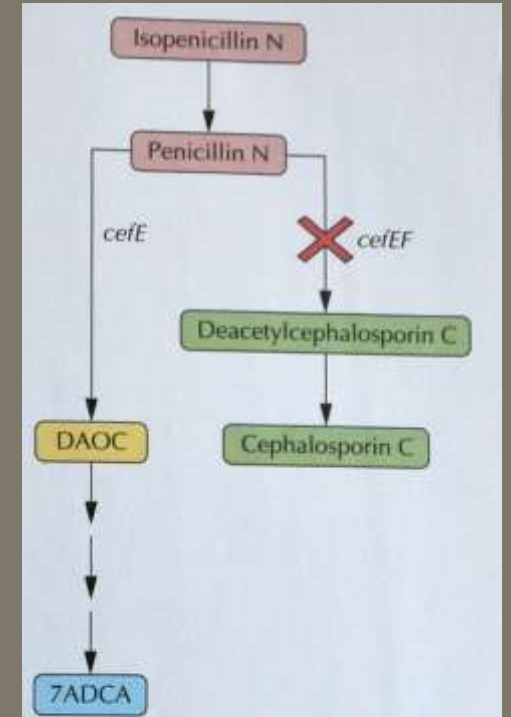


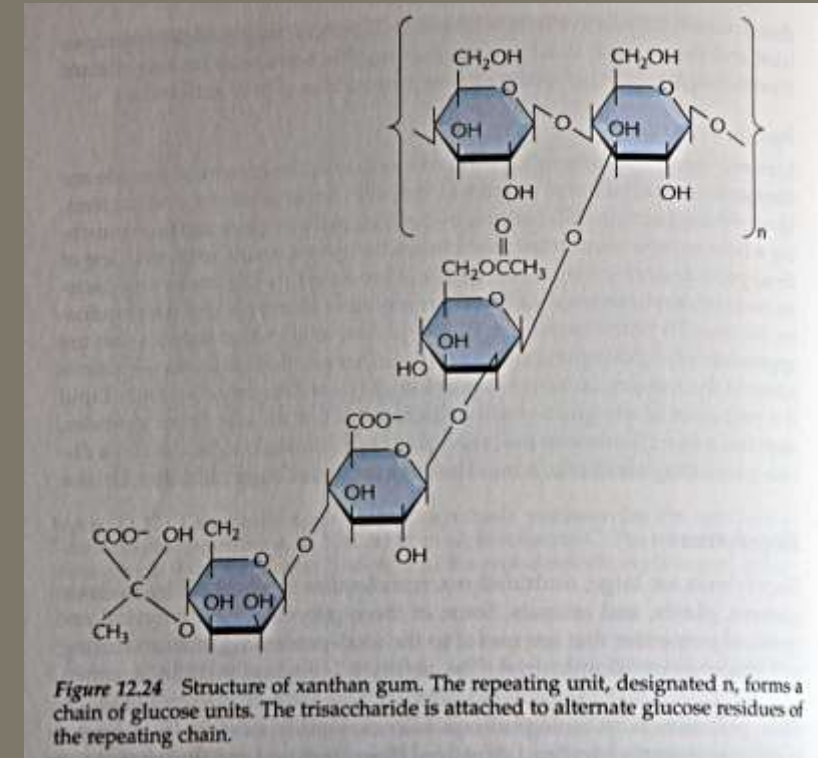
Figure 12.23 Synthesis of the compound 7ADCA (7-aminodeacetoxycephalosporanic acid) in a genetically engineered strain of *A. chrysogenum*. The functioning of the endogenous *A. chrysogenum* *cefEF* gene is disrupted so that penicillin N accumulates. This strain is transformed with a *cefE* gene from *S. clavuligerus*, and the penicillin N is transformed to deacetoxycephalosporin C (DAOC), which is subsequently converted to 7ADCA.

## Biosinteza polimerov

Pristope rekombinantne DNA izkoriščajo tudi pri proizvodnji biopolimerov, npr. ksantanski gumij (*Xanthomonas campestris* genetsko spremenjen, da raste na odpadni sirotki), melaninski derivati v *E. coli*, mikrobnata guma (lateks polimeraza iz kavčukovca *Hevea brasiliensis*) itd. Tako pridobljeni polimeri so pomembni za živilsko in farmacevtsko industrijo ter za proizvodnjo izdelkov. Možno je razviti nove biopolimere, nadomestiti sintezne z biološkimi in obstoječim biopolimerom izboljšati značilnosti, seveda pa tudi povečati izplene in zmanjšati proizvodne stroške.

Ksantanski gumij je eksopolisaharidni polimer, ki ga proizvaja talna gramnegativna aerobna bakterija *Xanthomonas campestris* kot stranski produkt metabolizma. Na celulozni osnovi je na vsakem drugem glukoznem ostanku vezana stranska skupina, ki je trisaharid (2 manozni, 1 glukuronska kislina). Gumij je zelo viskozen in stabilen tudi pri ekstremnih pogojih, podobno kot plastika. Uporabljajo ga za stabilizacijo, emulgiranje, zgoščevanje in suspendiranje drugih snovi. Za rast proizvodnega seva bi sicer lahko uporabili glukozo, saharozo ali škrob, ne pa laktoze, ki je zelo poceni vir ogljika.

Sirotka je odpadki pri proizvodnji sira. Vsebuje ~94 % vode in ~4 % laktoze, sicer pa še nekaj proteinov, rudninskih snovi in malih organskih molekul. Velike volumne odpadkov poskušajo uporabiti, npr. kot dodatek živilom, a problem lahko predstavlja laktozna intoleranca. Sproščanje v okolje ni primerno zaradi velikega vnosa hranil in možne okužbe podtalnice. Eden od možnih načinov uporabe je v biotehnologiji kot substrat za rast mikroorganizmov.

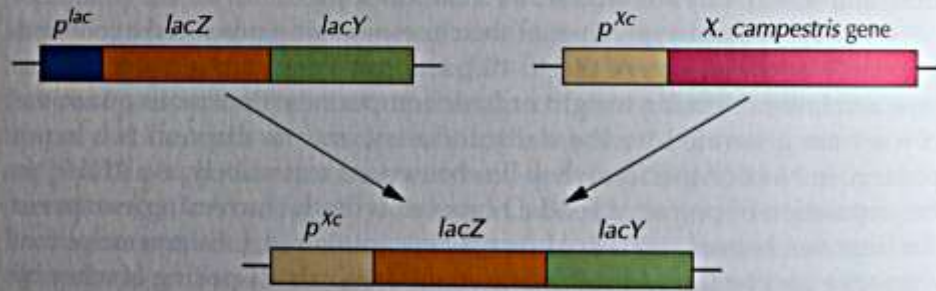




## Biosinteza ksantanskega gumija s pretvorbo sirotke

Laktozo iz sirotke lahko ob delovanju laktoza permeaze in betagalaktozidaze (*E. coli*) pretvorimo v uporabne monosaharide. Zapisa za ta dva proteina so prenesli v vektor širokega spektra in vstavili v *X. campestris*, kjer sta se izražala pod kontrolo fagnega promotorja. Vnos so izvedli s tristarševskim parjenjem.

**Figure 12.25** Engineering *E. coli* *lacZ* (encoding  $\beta$ -galactosidase) and *lacY* (encoding lactose permease) genes for constitutive expression in *X. campestris* (Xc).

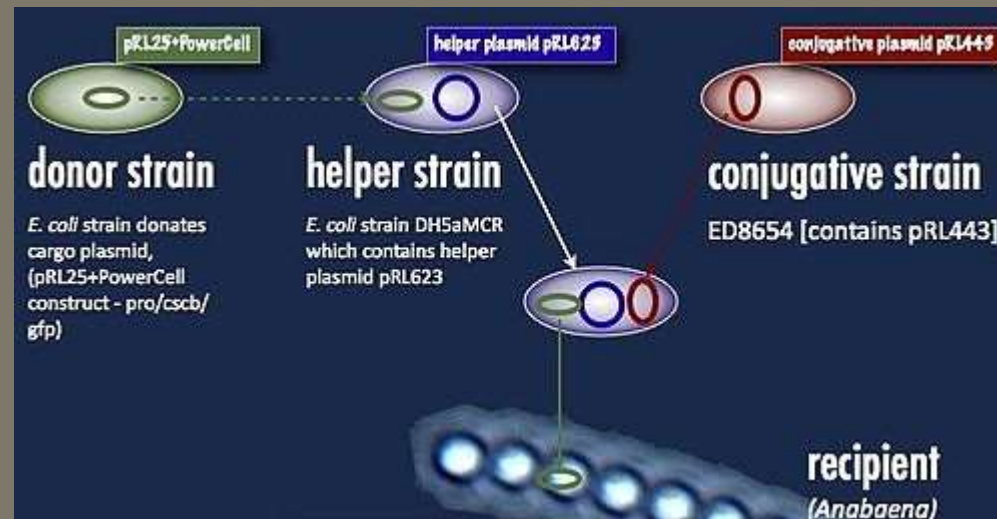


**Table 12.5** Production of xanthan gum by wild-type and transformed *X. campestris*

<i>X. campestris</i>	Amount of xanthan gum produced ( $\mu\text{g/mL}$ ) with:		
	0.4% Glucose	0.4% Lactose	10% Whey
Wild type	3,530	245	224
Transformant	3,711	3,608	4,241

Adapted from Fu and Tseng, *Appl. Environ. Microbiol.* 56:919-923, 1990.

The amount of product is expressed as micrograms per milliliter of culture grown on a minimal medium with either 0.4% glucose or 0.4% lactose added or on diluted whey (10%) which contains approximately 0.4% lactose. The transformant carries the *E. coli* *lacZY* genes on a plasmid.



## Biosinteza melanina

Melanini so družina biopolimerov, ki absorbirajo svetlobo in jih sintetizirajo bakterije, glive, rastline in živali. Uporabiti jih je možno v zaščitnih kremah v kozmetični industriji in v premazih za plastiko. Danes proizvodnja poteka s kemijsko sintezo ali z ekstrakcijo iz naravnih virov. Biotehnologija omogoča ceneno sintezo v velikem merilu.

Kemijsko so melanini heterogeni polimeri iz indolov, benzotiazolov in aminokislin. V biosintezni poti je prva stopnja pretvorba Tyr v dihidroksiPhe-kinon, kar katalizira tirozinaza (monooksigenaza, ki vsebuje Cu). Končne stopnje sinteze so neencimske in odvisne od kemijske narave nekinonskih sestavin, ki se vgradijo v polimer in dajejo barvo.

Bakterija *Streptomyces antibioticus* vsebuje vse potrebne gene za sintezo melanina. Ugotovili so, da zadoščata 2 ORF, en za tirozinazo (30,6 kDa) in en za neznani protein (ORF438, 14,8 kDa). Najprej so preverili, ali sta res potrebna oba gena (izražanje v *E. coli*) in ugotovili, da je. Verjetno je drugi ORF zapisoval za donorja Cu.

Na obarvanost končnega produkta je bilo mogoče do neke mere vplivati preko LMW dodatkov v gojišče.

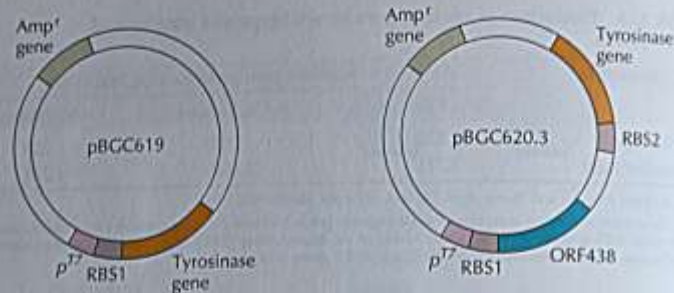
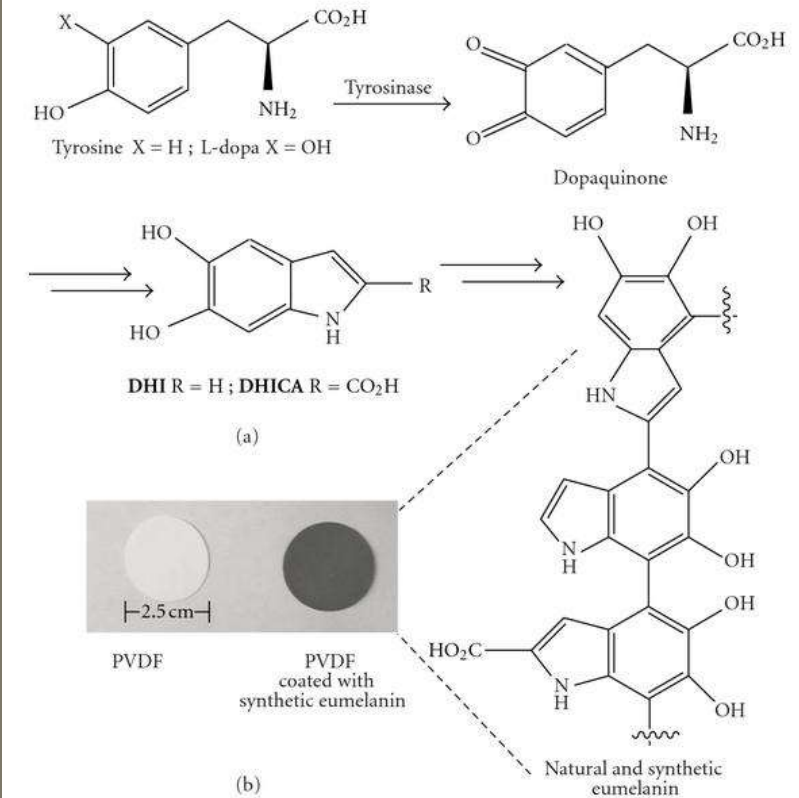


Figure 12.26 *E. coli* expression plasmids carrying melanin biosynthesis genes. Plasmid pBGC619 contains the tyrosinase gene. Plasmid pBGC620.3 contains an ORF (ORF438) for melanin synthesis and the tyrosinase gene. Transcription of the cloned genes is under the control of the *E. coli* bacteriophage T7 promoter ( $p^{T7}$ ). RBS1 and RBS2 denote two different ribosome-binding sites. The plasmids both carry genes that confer resistance to ampicillin (Amp<sup>r</sup>).

## Mikrobna sinteza živalskega adhezivnega polimera

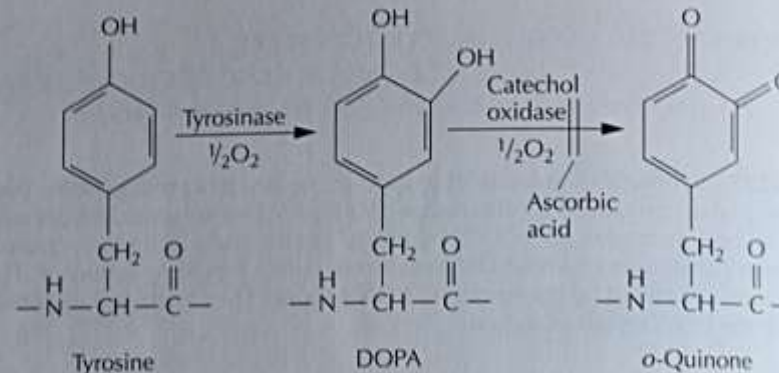
Školjke klapavice *Mytilus edulis* sintetizirajo bisusne nitke, s katerimi se pritrjujejo na podlago. Ta biopolimer, ki je zelo močan in obstojen protein z naključnim prečnim povezovanjem monomerov. Iz polimera je bilo nemogoče ugotoviti aminokislinsko zaporedje, zato so morali najprej izolirati prekursorski protein (130 kDa) iz citoplazme. Prekursor vsebuje veliko Ser, Thr, Lys, Pro (Hyp) in Tyr (večina hidroksiliranega v 3,4-dihidroksiTrp = DOPA). Večino proteina sestavljajo ponovitve dekapeptidnega zaporedja, v katerem je 7 ak hidroksiliranih. Poiskali so cDNA, ki zapisuje za prekursorski protein, in jo izrazili v kvasovkah. Boljše rezultate so dobili v bakterijah s sinteznim genom, ki je bil dolg 600 bp in je zapisoval za produkt velik 25 kDa, raba kodona pa je bila optimizirana za *E. coli*. Problem pa je, da bakterije slabo hidroksilirajo aminokislinske ostanke, zato tudi do močnega prečnega povezovanja ni prišlo. Zato so razvili encimsko kataliziran postopek hidroksilacije *in vitro*. To smemo izvesti šele tik pred uporabo in mora poteci zelo kontrolirano.

Živalsko lepilo se prijema na zelo različne podlage, moč in specifičnost pa določajo še drugi proteini, ki se vključijo v polimer. Taki polimeri bi lahko bili uporabni v medicini in zobozdravstvu.



5' CCA ACC TAC AAA GCT AAG CCG TCT TAT CCG 3'  
3' TTT CGA TTC GGC AGA ATA GGC GGT TGG ATG 5'  
Pro-Thr-Tyr-Lys-Ala-Lys-Pro-Ser-Tyr-Pro-Pro-Thr-Tyr

**Figure 12.27** Synthetic oligonucleotide used in the assembly of a gene for the bioadhesive protein produced by the mussel *M. edulis*. Two oligonucleotides are designed to base pair and form a DNA module with complementary extensions, which base pair to form a linear DNA molecule with a repeating sequence. The repeating units are joined by the enzyme T4 DNA ligase. The amino acid sequence encoded by the DNA repeat is shown.



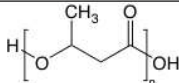
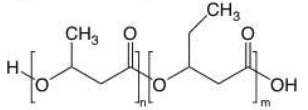
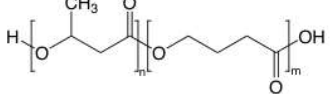
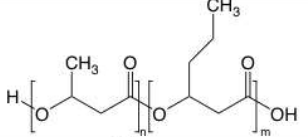
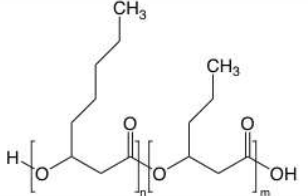
**Figure 12.28** Pathway for *in vitro* posttranslational hydroxylation of some of the tyrosine residues in the *M. edulis* adhesive protein. Tyrosine is converted to DOPA by the action of the enzyme tyrosinase and then can be oxidized to o-quinone by either catechol oxidase or tyrosinase. The oxidation of DOPA to o-quinone can be prevented by the addition of ascorbic acid.

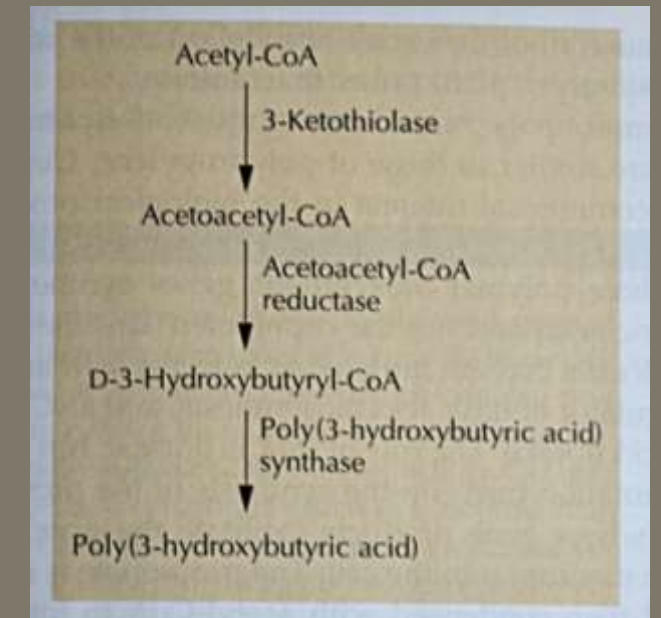
## Mikrobna sinteza polihidroksialkanoatov

PHA so biorazgradljivi polimeri, ki jih sintetizirajo različni organizmi predvsem kot znotrajcelično zalogo ogljika. Mikroorganizem, pri katerem so postopek najboljše raziskali, je *Alcaligenes eutrophus*. PHA imajo lahko različno sestavo in s tem tudi različne fizikalno-kemijske lastnosti. Največjo uporabnost imajo polimeri tega tipa za proizvodnjo pakirnega materiala (ocena trga: 1,5 mdr USD letno).

Izmed različnih PHA najpogosteje uporabljajo PHB (poli-3-hidroksimasleno kislino) z dobro znano biosintezno potjo in geni, ki zapisujejo za potrebne encime. Biotehnološka proizvodnja z *A. eutrophus* (*Cupriavidus metallidurans*) je možna, a te gramnegativne bakterije rastejo počasi in le na izbranih virih ogljika, zato je proizvodnja draga. Zato so biosintezno pot prenesli v *E. coli*. Sinteza poteka v treh stopnjah iz Ac-CoA, geni za tri encime pa so na enem operonu (5,2 kb). Ugotovili so, da je bil vektor v *E. coli* v odsotnosti selekcijskega pritiska nestabilen (pol celic je po 50 generacijah izgubilo plazmid). Zato so v vektor vključili lokus *parB*. Ki zagotavlja postsegregacijsko smrt celic, ki so izgubile vektor.

V *E. coli* se polimer sintetizira konstitutivno in se odlaga v kristalinični obliki, zato je pri ekstrakciji z alkalno raztopino hipoklorita bolj stabilen kot v *A. eutrophus*, kjer se odlaga v amorfni obliki. Problem je, da se Ac-CoA tako močno pretvarja v polimer, da je vsebnost acetata za druge reakcije prenizka, kar se odraža v počasnejši rasti.

Microorganisms	PHA synthesized	PHA chemical structure
<i>Ralstonia eutropha</i>	PHB [poly(3-hydroxybutyrate)]	
	PHBV [poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)]	
	P3HB4HB [poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)]	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	PHBHHx [poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)]	
<i>Pseudomonas putida</i>	PHOHHx [poly(3-hydroxyoctanoate-co-3-hydroxyhexanoate)]	



## Mikrobna sinteza izboljšanih polihidroksialkanoatov

Polipropilen ima nekoliko drugačne lastnosti od PHA, ugotovili pa so, da mu je mešanica PHB in PHV po lastnostih zelo podobna.

Kopolimer so dobili, če so v *E. coli* mutirali dva lokusa, *fadR* (negativni regulator sinteze maščobnih kislin) in *atoC* (pozitivni regulator vnosa maščobnih kislin – pospeši sintezo AtoA in AtoD → povečan vnos propionata v celice). S povečanim vnosom propionata v citoplazmo se poveča tudi sinteza PHV, medtem ko sinteza PHB teče po prej opisanem postopku. Pri polimerizaciji tako lahko nastane kopolimer.

Za lastnosti bioplastike je pomembna tudi dolžina. *R. eutropha* sintetizira predvsem kratke verige (4-5 monomernih enot). Če uporabimo encime iz drugih organizmov, npr. *Pseudomonas oleovorans*, so verige daljše (6-14 enot).

Z mutacijami encimov, ki sodelujejo pri oksidaciji maščobnih kislin, je mogoče dobiti monomerne enote s spremenjeno sestavo, to pa se kasneje odraža v lastnostih polimera.

Figure 12.30 Model of the genetically engineered microbial synthesis of the copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate).

