

# Bæredygtiggørelse af medicinalindustrien

## Introduktion

Vi lever i et globalt samfund, som i løbet af de næste år, årtier og århundrede vil stå overfor en stadigt voksende række af udfordringer. Dette projekt behandler en eventuel løsning på udvalgte problematikker, som i løbet af de næste 100 år vil udvikle sig – og kræve et stadigt øget fokus: Verdenspopulationen, som hastigt nærmer sig 7,5 mia. er estimeret til at nå 8,1 mia. i år 2025, 9,6 mia. i år 2050 og over 10 mia. i år 2100.<sup>1</sup> Yderligere øges både efterspørgslen på mad, som det forudses ikke at være muligt at imødekomme, samt antallet af diabetikere, hvor det estimeres, at antallet vil øges fra de nuværende 415 mio. til 642 mio. i år 2040.<sup>2 3</sup>

For at afhjælpe problemerne, som denne udvikling fører til, skal der både produceres flere fødevarer, samt en større mængde insulin, således, at verdens diabetikere forsat kan blive behandlet.

## Mål

Projektet består i at benytte syntetisk biologi til at gøre medicinalindustrien – med fokus på insulinproduktionen – mere bæredygtig. Dette gøres ved at genmodificere den ukonventionelle gærstamme *Yarrowia lipolytica*, som kan gro på et bredt udvalg af substrater, hvorfor det tillader brugen af industrielle biprodukter fremfor de traditionelle glukosebaserede substrater, som *Saccharomyces cerevisiae* – den dominerende modelorganisme indenfor kommerciel insulinproduktion – gror bedst på. Dette vil ultimativt betyde, at de spiselige afgrøder, som f.eks. majs og kartofler, glukosen tidligere raffineredes fra, kan benyttes som fødevarer. Der fokuseres i projektet på produktionen af proinsulin, men metoden kan potentielt anvendes til kommerciel produktion af lang flere forskellige produkter, der oprindeligt produceres ved brug af de velkendte modelorganismer.

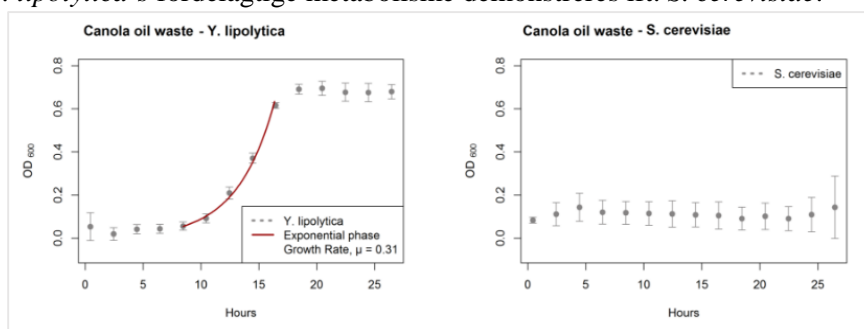
Projektet omhandler valget af *Y. lipolytica*, strategien for genmodificeringen, de opnåede resultater, samt fremtidsperspektivet – og udfordringerne – for en bæredygtig medicinalindustri.

## Hypotese

Hypotesen er, at *Y. lipolytica* kan gro på industrielle restprodukter – og genmodificeres, hvorpå den heterologe proteinekspresion kan detekteres og resultere i en målbar produktion af proinsulin.

## Materialer og metoder

*Y. lipolytica* kan, som nævnt, gro på en bred variation af forskellige substrater, hvilket inkluderer forskellige alkoholer, hexoser, olier og fedtsyrer. Dette skyldes effektive pathways, udgjort af adskillig multigene familier. I projektet undersøges anvendelsen af plausible substrater, ved at udføre simple vækstforsøg. Specielt et restprodukt, som stammer fra sedimenteringen af rapsolie, viste sig at være yderst egnet. Nedenfor ses de opnåede resultater, hvor *Y. lipolytica*'s fordelagtige metabolisme demonstreres ift. *S. cerevisiae*.



<sup>1</sup> United nations, Department of Economic and Social Affairs: "World Population Prospects The 2012 Revision" esa.un.org, 2013

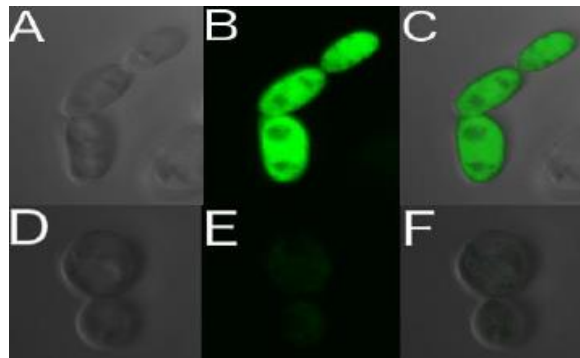
<sup>2</sup> Ray, Deepak K. et al.: "Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050" journals.plos.org, 19. Juni 2013

<sup>3</sup> International Diabetes Federation: "IDF Diabetes Atlas, Seventh Edition" diabetesatlas.org, 2015

Den efterfølgende genmodificering af organismen foregik ved brug af BioBricks – som er DNA sekvenser, som kan være promotorer, eller gener der koder for specifikke proteiner – flankeret af et standardiseret præfiks og suffiks i hhv. 5' og 3' enden af sekvensen. Disse kan samles - og udtrykkes, hvorpå man kan opnå helt nye biologiske kredsløb.

Der etableredes et ekspressionssystem, bestående af en shuttle vektor (*pSB1A8YL*), som både kan propagere i *Escherichia coli*, samt *Y. lipolytica*. Hermed kunne konstruktionerne samles og konfirmeres i *E. coli*, hvorefter de transformeredes ind i *Y. lipolytica*, hvor ekspressionen kunne testes.

For at teste ekspressionssystemet samlede en konstitutiv promotor, TEF1, med et fluorescerende protein, hrGFP, hvorefter insertionen komfirmeredes i *E. coli*, oprensedes og transformeredes ind i *Y. lipolytica*. Her blev ekspressionen af det fluorescerende protein testet, hvilket gav anledning til nedenstående resultater.



Efter det tydelige fluorescenssignal, som indikerede succesfuld heterolog proteinekspression, kombineredes TEF1 med det humane gen for proinsulin, condon-optimeret for ekspression i *Y. lipolytica*. Den korrekte konstruktion konfirmeredes både i *E. coli* og *Y. lipolytica*, men der blev ikke opnået resultater, som indikerede tilstedeværelsen af proinsulin. (se projekt for udførlig gennemgang, samt anvendte protokoller).

## Diskussion

*Y. lipolytica* gror – som antaget – godt på et bredt spektrum af substrater, hvilket var forventet, da adskillige studier understøttede dette. Ud fra de opnåede resultater, ses det yderligere, at *Y. lipolytica* kan gro på substrater, som er industrielle restprodukter, samt at *S. cerevisiae* ikke kan gro på disse.

Ekspressionssystemet bestående af shuttle vektoren, TEF1, samt hrGFP udsendte et klart fluorescenssignal, hvilket understøttede – og demonstrerede brugen af *Y. lipolytica*, som et anvendeligt chassis for heterolog proteinekspression.

Konstruktionen af TEF1 og det humane gen for proinsulin blev konfirmeret, men der var ingen målbar proteinekspression. Dette kan skyldes for lave mængder protein, hurtig degradering, den valgte stammes (*PO1f*) inhabilitet til at udtrykke og folde proteinet, eller en utilstrækkelig detekteringsmetode.

## Konklusion

*Y. lipolytica*'s potentiale, som en alsidig produktionsorganisme, grundet det brede spektrum af substrater, som organismen kan gro på, blev i dette projekt eftervist. Derudover konstrueredes og efterprøvedes et effektivt ekspressionssystem, som dog ikke var i stand til at udtrykke proinsulin i målbare mængder. Brugen af *Y. lipolytica* kan derfor ikke umiddelbart anses som værende en løsning for bæredygtiggørelsen af medicinalindustrien, men syntetisk biologi's anvendelse til at undersøge og opnå dette mål er dog demonstreret, grundet dets alsidighed og forsimplede natur.

**Acknowledgement:** Dette projekt ville ikke have været muligt foruden deltagelsen fra alle de øvrige holdmedlemmer på DTU biobuilders, samt vores vejleder! Tak.