

University of Groningen

Identification, characterisation and expression of early biosynthetic genes from *Artemisia annua*

Rydén, Anna-Margareta

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2010

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Rydén, A.-M. (2010). *Identification, characterisation and expression of early biosynthetic genes from Artemisia annua: for the heterologous biosynthesis of dihydroartemisinic acid as a first step towards artemisinin production.* s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Chapter 8

Nederlandse samenvatting

Samenvatting

Introductie

Artemisia annua (*A. annua*), de eenjarige alsem, is een plant die wereldwijd voorkomt in gematigde en tropische gebieden. *A. annua* behoort tot de plantenfamilie Asteraceae (samengesteldbloemigen, composieten). De plant produceert artemisinine, een antimalariamiddel dat malariaparasieten efficiënt doodt, zonder veel bijwerkingen voor de patiënt. Van nature is het gehalte aan artemisinine in de plant laag en ligt tussen 0,2 en 0,8%, berekend op drooggewicht. Er lopen verschillende veredelingsprogramma's die erop gericht zijn de productie van artemisinine in de plant te verhogen, zonder daarbij gebruik te maken van genetische modificatie. Deze aanpak kan een stap in de goede richting zijn, maar wordt beperkt door weersinvloeden die de groei van de plant en dus de uiteindelijke opbrengst negatief kunnen beïnvloeden. Daarnaast moet vruchtbare grond worden gebruikt voor het kweken van gewassen die niet als voedingsmiddel dienen. Een alternatieve aanpak is het gebruik van micro-organismen om artemisinine te produceren. Het micro-organisme is dan een zogenaamd heteroloog expressiesysteem of heterologe gastheer. Dit is alleen mogelijk als we de genen die betrokken zijn bij de biosynthese van artemisinine in *A. annua* kennen, waarna we deze overzetten in een veilig micro-organisme, zoals de gist *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Hiermee kunnen we het geneesmiddel in principe op een stabiele manier, gecontroleerd en economisch in grotere hoeveelheden produceren. Daarnaast opent kennis van de genen die bij de biosynthese betrokken zijn de mogelijkheid om de plant genetisch te verbeteren om zo tot een hogere productie van artemisinine te komen.

In dit proefschrift beschrijven we de identificatie van genen in *A. annua* die betrokken zijn bij de biosynthese van artemisinine, en de mogelijkheid om deze genen tot heterologe expressie te brengen in *S.*

cerevisiae. Hoofdstuk 1 en 2 geven achtergrondinformatie over de geschiedenis en de chemie van het terpenoïd artemisine. We bespreken de toepassing van *S. cerevisiae* als heteroloog productie-organisme voor artemisinine tegen de achtergrond van andere voorbeelden uit de synthetische biologie.

Isolatie van een reductase uit A. annua met brede substraatspecificiteit en de rol ervan in de biosynthese van artemisinine

In hoofdstuk 3 en 4 beschrijven we de isolatie van een nieuw reductase uit *A. annua*. We hebben voor ons werk aan de isolatie van genen uit de biosyntheseroute van artemisinine een EST-bibliotheek gemaakt en deze vergeleken met andere EST-bibliotheken en databases die op blastX (NCBI) zijn gepubliceerd. De eerste analyse met behulp van blastX leverde 19 kandidaten op uit een totaal van 2180 EST-sequenties, met aminozuurcombinaties die kenmerkend zijn voor de reductase enzymfamilie. Omdat de informatie in de databases erg beperkt is voor reductases uit planten, bleef de identiteit van onze enzymen grotendeels onduidelijk. Om tot een lijstje te komen met de meest veelbelovende kandidaten, vergeleken we onze gegevens met EST-bibliotheken van tomaat, aardappel, rijst, *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*; zandraket), sla en zonnebloem. We wilden onderscheid maken tussen algemeen voorkomende reductases en reductases die waarschijnlijk relevant zijn in de biosynthese van terpenoïden. Reductases die grote overeenkomst vertoonden met sla en zonnebloem (die net als *A. annua* behorenen tot de samangesteldbloemigen), maar minder met de de niet-Asteraceae aardappel (Solanaceae, nachtschadefamilie), tomaat (Solanaceae), rijst (Poaceae, grassen) en *A. thaliana* (Brassicaceae, kruisbloemigen) beschouwden wij als interessante kandidaten. Gebaseerd op een bioinformatica-analyse van één van de kandidaten, selecteerden wij het gen *red1* voor verder onderzoek. We testten diverse substraten, allemaal behorend tot de chemische klasse van terpenoïden, voor bioconversie (omzetting door het enzym) met

NADP(H) als cofactor. De resultaten in hoofdstuk 3 laten zien dat Red1 een oxidoreductase is met brede substraatspecificiteit, die behoort tot de korte-keten dehydrogenase/reductase (SDR) eiwitfamilie. Dit enzym kan op efficiënte wijze (-)-menthon reduceren tot (+)-neomenthol, en (+)-neomenthol oxideren tot (-)-menthol, met (-)-menthon als tussenproduct. De efficiëntie waarmee deze omzettingen plaatsvonden waren vergelijkbaar met die van de industrieel belangrijke plant *Mentha x piperita* (pepermunt). Het menthon:neomentholreductase van *Mentha x piperita* had een k_{cat}/K_m van $89 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$, tot dan toe de hoogste waarde bepaald voor een plantenreductase. Red1 bezat een k_{cat}/K_m van $83620 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$, een 940 keer hogere waarde. Andere substraten, zoals dihydrocarvon en perilaldehyde konden ook door Red1 worden omgezet. Al deze verbindingen behoren tot de groep van sesquiterpenoïden (C_{15}). We testten vervolgens een bredere range van sesquiterpenoïden, maar deze werden niet omgezet door het enzym. Aangezien perilaldehyde chemisch gezien lijkt op artemisinine aldehyde en dihydroartemisinine aldehyde, testten we deze substraten ook op omzetting door Red1 (hoofdstuk 4). Red1 bleek een sterke reductor van dihydroartemisinine aldehyde, waarbij dihydroartemisinine alcohol werd gevormd, maar kon het alcohol niet als substraat gebruiken. Red1 voerde de reductie uit met een k_{cat}/K_m van $4119 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$ en was daarmee vergelijkbaar met een ander reductase in de biosyntheseroute, het Dbr2 dat een dubbele koolstofbinding kan reduceren, met een k_{cat}/K_m van $0,14 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$.

Het belang van Red1 in de vorming van artemisinine in de plant kunnen we beter begrijpen als we denken in termen van netwerken in plaats van simpele, rechttoe rechtaan biosynthesewegen. Red1 verwijdert dihydroartemisinine aldehyde, een belangrijk intermediair in de biosyntheseroute. Op dit moment is slechts één enzym bekend dat in staat is om, in kleine hoeveelheden, het alcohol terug om te zetten in het aldehyde en daarmee beschikbaar te maken voor de productie van artemisinine (hoofdstuk 5). We kunnen speculeren over de rol die Red1 speelt in de biosyntheseroute. Het kan van de

stroom van intermediären in de biosynthese reguleren, maar het kan ook een heel andere taak hebben in de plant, waarbij de reductie van het aldehyde in ons geval een ongewenst bij-effect is. Wel is het waarschijnlijk dat de expressie van Red1 in *A. annua* nadelige gevolgen heeft voor de productie van artemisinine. Momenteel loopt er een project dat la doel heeft een transformatiesysteem voor *A. annua* te ontwikkelen. Naar verwachting kan het systeem in het voorjaar van 2011 worden gebruikt om *A. annua* te transformeren met een siRNA-construct, dat de expressie van *red1* moet terugbrengen (downreguleren). Het effect hiervan moeten hogere concentraties artemisinine in de plant zijn.

Onderzoek naar Saccharomyces cerevisiae als productie-organisme voor artemisinine

De kennis over Red1 en de de functie van dit enzym hebben ons aangezet om de mogelijkheid van een heteroloog expressie-organisme voor artemisinine te onderzoeken. Bij heterologe expressie wordt het gen ingebouwd in een gastorganisme, waarin het niet van nature voorkomt. Het kan ook zo zijn dat het gastorganisme genen bevat die reacties uit de voor dat organisme vreemde, heterologe route kunnen uitvoeren. Als we in staat zijn om deze genen te identificeren, hoeven we minder vreemde genen in het gastorganisme in te bouwen en oefenen we hierop minder stress uit. Dit laatste is van belang om de opbrengst van het gewenste product later te vergroten. *S. cerevisiae*, is een veel gebruikte en goed gekarakteriseerde gastheer, die ook zelf de nodige precursors voor artemisinine maakt. Een manier om het organisme aan te zetten tot artemisinineproductie is simpelweg door het overbrengen van alle genen uit de plant die bij de biosynthese betrokken zijn. Dit veroorzaakt echter grote stress en de gist zal proberen de productie van intermediären uit de vreemde biosynthese te beperken, hetzij door selectief genen uit te schakelen, hetzij door het tot overexpressie brengen van 'stress response'genen waardoor intermediären uit het gastorganisme worden geëlimineerd. Een

manier om de stress door vreemde genen te beperken, is gebruikmaken van genen van het gastorganisme zelf en deze de heterologe intermediairen laten aanmaken. In hoofdstuk 5 beschrijven we hoe een beperking van zuurstof en de keuze van een koolstofbron het genetische expressiepatroon van *S. cerevisiae* zo kunnen veranderen, dat het een vroege intermediair uit de biosynthesroute van artemisinine kan reduceren in een product dat relevant is voor de vorming van het eindproduct.

Betrokkenheid van peroxidase in de artemisinineproductie

In samenwerking met RIKEN en de Oklahoma City University werd te 'protein fishing' als methode gebruikt om enzymen te isoleren (hoofdstuk 6). Het doel was om de procedure van het vinden van eiwitten te versnellen met behulp van 'reverse genetics'. Door bolletjes met substraat voor een onbekend eiwit te coaten en gebruik te maken van ruwe eiwitextracten van planten, is het mogelijk alleen die eiwitten te isoleren die met het substraat op de bolletjes reageren. Artemisininezuur is de laatste precursor in de biosynthese van artemisinine. Met de hierboven geschetste aanpak verkregen wij in een pilotexperiment met een eiwitextract van *A. annua* twee duidelijke banden op een SDS-PAGE gel. Momenteel werken we aan het sequencen van deze eiwitten, waarna we de aminozuurvolgorde zullen gebruiken om kandidaten op te pikken uit de EST-bibliotheek. Tegelijkertijd hebben we biochemisch werk gedaan gericht op het vaststellen van de volgende biosynthesestap, na de vorming van artemisininezuur. We ontwierpen een biochemisch testsysteem om later enzymactiviteit te kunnen bevestigen in gekloonde en tot expressie gebrachte kandidaatgenen.

