



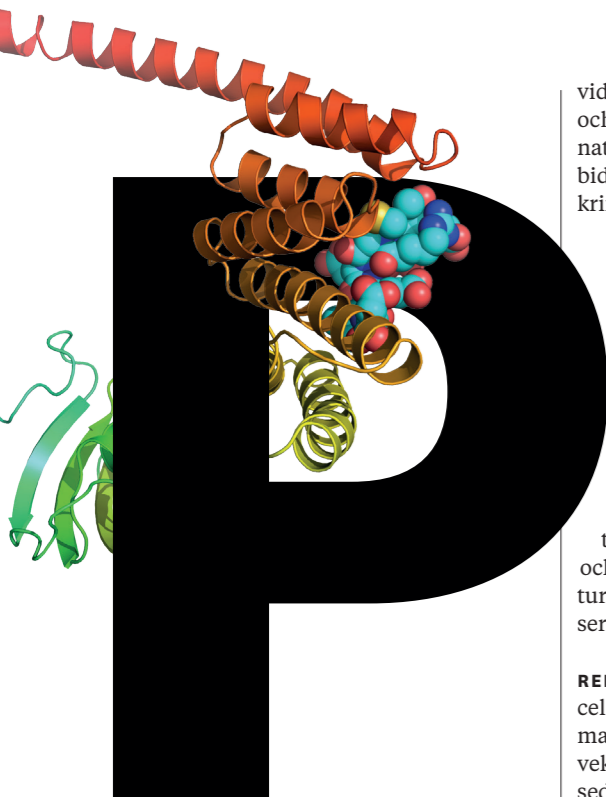
Text Kristina Hedfalk och Malin Bäckström

Illustration Johan Nord

Skördetid i protein- fabriken

Läkemedelsforskare vill ha dem som läkemedel, kemiindustrin för hållbara kemiska processer.
PROTEINER ÄR I FOKUS FÖR MÅNGA OMRÅDEN.
Nu görs en stor svensk satsning på att tillverka dem.





ROTEINER ÄR HÖGINTRESSANTA för medicinsk forskning. De är de vanligaste målmolekylerna för nya läkemedel, och kan även vara läkemedel i sig själva. Proteiner är intressanta också för dem som utvecklar nya energilösningar, hållbara kemiska processer, nya material och motståndskraftiga grödor. Därför vill forskare inom både akademien och industrin öka kunskaperna om proteiners molekylära mekanismer.

Ett av våra mest kraftfulla verktyg för att förstå dessa finns inom strukturbioingenjöringen. Där skapar forskare med avancerade metoder tredimensionella bilder eller filmer av proteiner. Inom strukturbioingenjöringen används till exempel röntgenstrålning som reflekteras från en proteinkristall, avancerade magneter för att identifiera varje ingående atom, eller elektronmikroskop som kan ge bilder med mycket hög upplösning.

Bilderna gör det lättare att förstå hur proteinerna fungerar. Det är viktigt för att kunna påverka deras funktion – vilket är det forskare gör inom läkemedelsutvecklingen.

Området strukturbioingenjöring genomgår just nu sin största utvecklingsfas sedan 1970-talet, då metoder för att bestämma proteiners tredimensionella struktur först började användas. I toppmoderna anläggningar flyttas gränserna för vad som är möjligt – inte minst i Sverige, som gjort enorma investeringar inom dessa områden. Här finns nu exempelvis Max IV i Lund och elektronmikroskopianläggningar vid Scilifelab i Stockholm och Umeå. Anläggningarna för så kallad NMR-teknik

vid svenskt NMR-centrum i Göteborg och Umeå har moderniserats. Dessa stora nationella investeringar kommer att kunna bidra till att lösa viktiga forskningsfrågor kring proteiner.

Såväl forskare som företag behöver alltså tillgång till proteiner. I följande bildades med stöd från Vetenskapsrådet en nationell infrastruktur, som ska hjälpa forskare i hela Sverige att ta fram proteiner till olika projekt. Inom infrastrukturen, som kallas Protein production Sweden, PPS, tillverkas med högkvalitativa processer så kallade rekombinanta proteiner för olika typer av grundforskning, till exempel inom bioteknik, medicinsk forskning, läkemedels- och materialutveckling eller just strukturbioingenjöring. Även företag kan använda den service som finns inom infrastrukturen.

REKOMBINANTA PROTEINER tillverkas i celler. En bit dna, som kodar för det protein man vill tillverka, förs in i en så kallad vektor, som är en cirkulär bit dna. Den förs sedan in i en värdcell som fungerar som en proteinfabrik.

Proteinet produceras av de enzymsystem som redan finns i celler utifrån molekylärbiologins centrala dogm: Den genetiska informationen i dna översätts till rna som i sin tur översätts till protein. Många proteiner modifieras därefter – genom att kemiska grupper fästs på proteinet. Vid så kallad glykosylering binds exempelvis sockermolekyler till proteinets yta. Dessa är viktiga för proteinets stabilitet, funktion och identifiering.

Vägen från dna till slutprodukt är inte given. Det finns alltid risk för att värdcellen känner igen produkterna från de tillsatta molekylerna som främmande och därför

bryter ner dem. Ett särskilt kritiskt steg i processen är när det nybildade proteinet ska veckas till sin stabila, aktiva, tredimensionella form. En generell princip är att ju mer besläktat det rekombinanta proteinet är med värdcellen, desto större är sannolikheten att hela processen fungerar och att korrekt veckat protein når sin slutdestination, det vill säga cytosolen, membranet eller transporteras ut ur cellen. I praktiken innebär detta att komplicerade proteiner från människa kan behöva mer avancerade cellsystem för sin produktion, och då fungerar inte alltid bakteriecellen. Dock tillämpas ofta principen att använda så enkla system som möjligt, dels beroende på tidsåtgången, och dels kopplat till kostnader för odling, där bakterier och jäst växer snabbt på ett billigt medium.

ETT EXEMPEL PÅ rekombinanta proteiner är målinriktade antikroppar, som blir allt mer vanliga som läkemedel. Andra exempel är proteiner som produceras för att ingå i diagnostiska tester eller för att komplettera en förlorad funktion, så som insulinproduktion hos diabetespatienter. Proteiner är också viktiga i olika reaktionskedjor, vilket

”Den kunskap som forskare har inom proteinproduktion är till stor del empirisk”

gör att de kan användas för att studera metabolismen i olika biologiska miljöer, genom att ett protein som märkts med olika isotoper kan följas. Det finns en lång rad exempel på forskning och behandling som är helt beroende av tillförlitlig produktion av rekombinanta proteiner. Det var med den tekniken som både ett nytt vaccin och di-

agnostiska metoder snabbt kunde tas fram under coronapandemin – eller mer specifikt forskningen kring basmodifierat rna, som ger ökad proteinproduktion och tolerans hos den vaccinerade – upptäckten som fick årets Nobelpris i fysiologi eller medicin.

PROTEINPRODUKTIONEN I SIG är kanske mindre glamorös inom vetenskapen än själva karaktäriseringen av proteinet, men även produktionen kräver specifik vetenskaplig och teknisk kompetens. För produktionen finns många olika slags celler att välja mellan: bakterier, jäst, insekts-, växt- och däggdjursceller. Ytterligare en möjlighet är cellfri produktion. Vad som är bäst beror på vilken typ av protein som ska tillverkas samt för vilket ändamål. Det producerade proteinet kan ha olika slutdestinationer. Ett lösligt protein kan vara ämnat för att vara inne i cellen, i cytosolen, eller så ska det transporteras ut genom cellens membran för en funktion på utsidan. Ett membranprotein ska däremot sitta fast i membranet som omger cellen. Där ansvarar det för signalering eller transport in och ut ur cellen.

Det krävs mycket erfarenhet för att göra goda och effektiva val. Den kunskap forskare har inom proteinproduktion är till stor del empirisk, men under senare år har bilden av vad som krävs för att lyckas med produktion blivit tydligare. I den nationella infrastrukturen för proteinproduktion samlas erfarenheter från många olika försök i många olika system. Det gör att forskarna blir allt bättre på att förutsäga hur de ska lyckas med olika nya projekt och att metoderna blir mer och mer generella. ◻

Kristina Hedfalk är föreståndare för Yeast protein production inom PPS, Malin Bäckström är föreståndare för hela PPS. Båda finns vid Göteborgs universitet.

De gör proteiner åt Sveriges alla forskare

Protein production Sweden (PPS) är en så kallad nationell forskningsinfrastruktur som finansieras av Vetenskapsrådet. Uppdraget är att samla expertis för proteinproduktion för att kunna hjälpa alla forskare i Sverige som behöver proteiner för olika tillämpningar – en enskild forskare kan inte hysa alla möjligheter i det egna labbet.

Sju olika laboratorier vid fem universitet och högskolor är med i samarbetet. Där finns nu expertis med lång erfarenhet av proteinproduktion i olika värdceller: bakterie-, jäst-, insekts-, växt- och däggdjursceller samt cellfri produktion. Därutöver finns spetskompetens för att framställa specialreagens, som används i experiment med röntgen- och neutronstrålning.

Samarbetet drog i gång i följande. Startåret ansökte 105 olika gruppledare vid svenska universitet och högskolor om hjälp med proteinproduktion, via en gemensam webbaserad ansökningsportal vid Göteborgs universitet, som är värd för samarbetet. Därefter slussades projekten till ett lämpligt labb utifrån specifika önskemål.

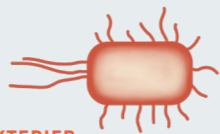
141 projekt initierades och

224 proteiner levererades. Hela 59 vetenskapliga publikationer kunde kopplas till proteiner som producerats av något av laboratorerna som ingår i PPS. Publikationerna vittnar om att det finns en bredd av användningsområden för rekombinanta proteiner – allt från framställning av covidvaccin till stabila proteinprover för analys av struktur och funktion, för vidare förståelse av cellfunktioner och sjukdomsmekanismer. Det kan till exempel vara proteiner som märks med isotoper som behövs för strukturanalys med NMR.

En enhet inom PPS har exempelvis producerat flera virusproteiner som används i virusdiagnostiken vid Sahlgrenska sjukhuset, i samarbete med forskare vid Göteborgs universitet. Ett annat virusprotein som producerats hos PPS har testats som vaccinkandidat mot könsherpes, som det hittills inte finns något vaccin för. Vaccinutvecklingen drivs nu vidare i företaget Simplexia, delvis i samarbete med PPS-labbet vid Göteborgs universitet.

PPS har ett femårigt finansiellt stöd på 42 miljoner kronor från Vetenskapsrådet. Universiteten som är med – KI, KTH, Göteborgs, Lunds och Umeå universitet – samfinansierar.

Cellfabriker för alla proteiner



BAKTERIER

Den enklaste cellen för proteinproduktion är *Escherichia coli* (*E. coli*). Tekniken är väletablerad och det finns ett stort urval av stammar och plasmider som kan användas för produktion av många olika slags proteiner.



CELLFRI PROTEINPRODUKTION

Proteinproduktionen kan också ske utanför cellen, i provrör. Reaktionsmixen består då av hela maskineriet som krävs för proteinproduktion, som isolerats från till exempel kolibakterien. Om det behövs kan tillsatser för specifika proteiner ingå. Produktionen lämpar sig särskilt för proteiner som ska märkas med olika isotoper för vidare analys.



JÄST

Den enklaste eukaryota cellen för proteinproduktion är jäst. Vanlig bagerijäst, *Saccharomyces cerevisiae*, och *Pichia pastoris* är vanligast att använda. Många proteiner, lösliga och membranbundna, går att producera i jäst.



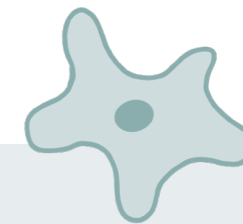
INSEKTSCELLER

En något mer komplicerad värdcell är insektsceller. Den ger större sannolikhet för att få korrekta produkter, exempelvis då komplicerade proteiner som de med kemiska grupper på ytan ska tillverkas. Insektceller har fungerat bra för att producera komplexa membranproteiner, som så kallade G-proteinkopplade receptorer.



VÄXTCELLER

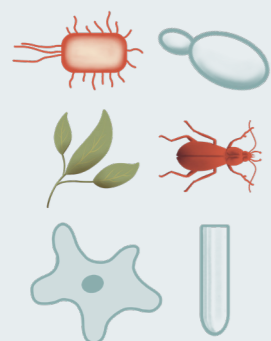
Många olika typer av proteiner och flera olika modifieringar är möjliga i växtceller, som är enkla att använda och odla. Reagens för diagnostik och vaccin har producerats framgångsrikt i växtceller, där storskalig odling är en fördel.



MAMMALIECELLER

Den mest avancerade värdcellen som lämpar sig för komplexa proteiner, exempelvis glykosylerade proteiner (har kolhydrater på ytan) är däggdjursceller. Celler från kinesisk hamster, CHO (på engelska *Chinese hamster ovary cells*) och njurceller, HEK 293 (*human embryonic kidney*) är vanliga för att tillverka exempelvis terapeutiska antikroppar eller membranbundna proteiner.

Så gör man ett rekombinant protein



RÄTT CELLTYP

Cell väljs beroende på vilket protein som ska tillverkas. Bakterier och jäst är enkla system som ofta fungerar för lösliga och membranbundna proteiner från olika organismer. Vektorn förs in i cellen.

Steg 2



Steg 1

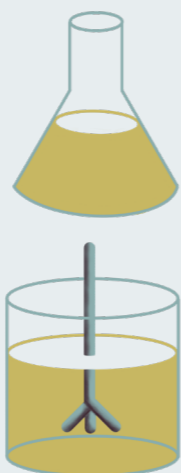
PROTEINETS DNA-SEKvens

Känner man till sekvensen av aminosyror som bygger upp det protein man vill ha, går det att tillverka motsvarande dna. En dna-sekvens för proteinet designas och förs in i en vektor, en cirkulär dna-molekyl.

Steg 3

CELLERNA ODLAS

Cellerna odlas. Om det behövs stora volymer eller finns höga krav på syresättning, brukar bioreaktorer användas. De säkerställer att omrörningen blir effektiv samt möjliggör för direkt tillsats av syrgas om så behövs.



Steg 4

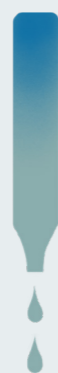
CELLERNA SKÖRDAS

Odlingen centrifugeras och cellerna som samlas på botten slås sönder. Den fraktion som innehåller det önskade proteinet samlas och renas.



Supernatant

pellet



Steg 5

PROTEINET RENAS FRAM

Är det ett lösligt protein som ska renas fram, används vätskan som samlats ovanför cellerna efter centrifugering, supernatanten. Om det är ett membranprotein som ska renas fram måste en membranfraktion samlas genom olika centrifugeringssteg och lösas upp, efter att cellerna slagits sönder. Därefter renas proteinet.

Steg 6

ANALYS OCH KONTROLL

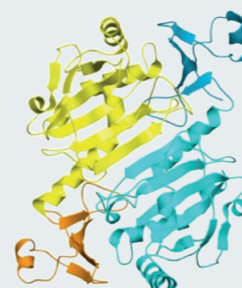
Reningsprocessen följs upp på olika sätt för att säkerställa att det rekombinanta proteinet är rent och finns i tillräcklig mängd.



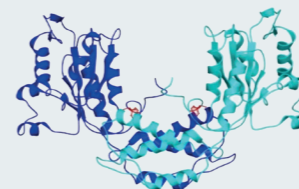
Steg 7

PROTEINET ÄR KLART

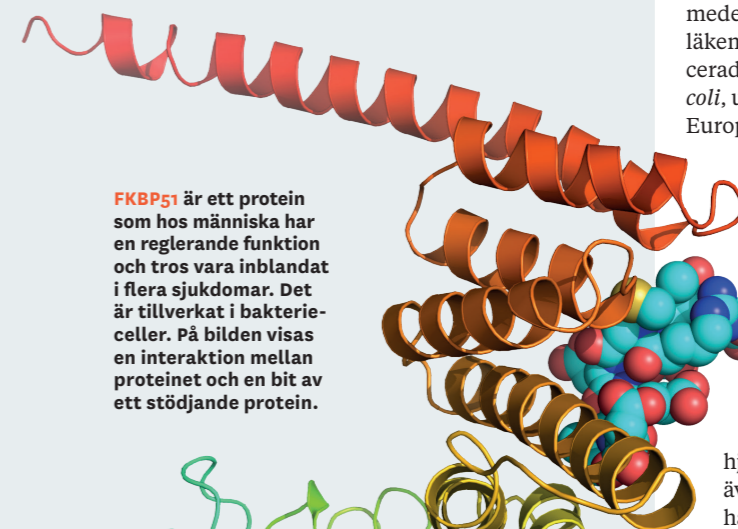
AnPrx6 och DmpR är exempel på humana proteiner. De är tillverkade i bakterieceller och är inte modifierade.



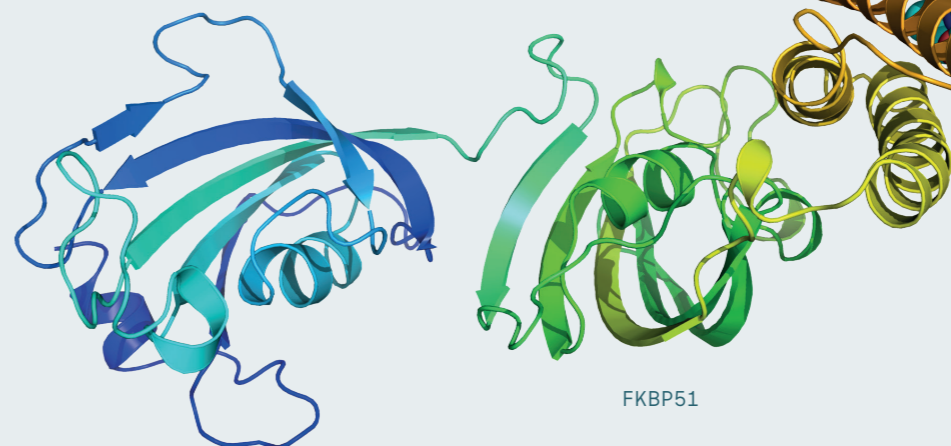
AnPrx6



DmpR



FKBP51 är ett protein som hos människa har en reglerande funktion och tros vara inblandat i flera sjukdomar. Det är tillverkat i bakterieceller. På bilden visas en interaktion mellan proteinet och en bit av ett stödjande protein.



FKBP51

Det första rekombinanta läkemedlet

MÖJLIGHETEN ATT TILLVERKA protein med hjälp av celler har funnits i runt 50 år. Den första produkten som tillverkades på det sättet var rekombinant humant insulin – som har varit avgörande för att kunna behandla diabetes. I dag finns flera sorters insulin på marknaden, som är olika snabb- och långtidsverkande.

Mellan 1922 och 1974 behandlades diabetes med insulin som extraherades från bukspottkörteln hos djur. Därefter lyckades man framställa semisyntetiskt insulin i begränsade mängder genom att modifiera insulin från djur. I takt med att biotekniken och den rekombinanta dna-tekniken utvecklades, lyckades man framställa humant insulin industriellt från både bakterier och jäst. Därmed tillgängliggjordes stora mängder rent insulin för behandling av diabetes. Bioteknikföretaget Genentech lyckades 1978 producera insulin i en bakterie. Produktionen i stor skala utvecklades av läkemedelsbolaget Eli Lilly. 1982 kom läkemedlet Humulin, som producerades från bakterien *Escherichia coli*, ut på marknaden i både USA och Europa. Knappt tio år senare, 1991, marknadsförde danska läkemedelsjätten Novo Nordisk rekombinant humant insulin som tillverkades i jästen *Saccharomyces cerevisiae*. Senare tillverkades humant insulin även i jästen *Pichia pastoris*. Åren runt 2000 utvecklades tekniken och flera varianter av humant insulin har producerats med hjälp av bakterier och jäst, där även läkemedelsbolaget Sanofi har bidragit med flera preparat.

ATT MÄNSKLIGT INSULIN går att producera i enklare celler, så som bakterie- och jästceller, har flera fördelar. Produktionen går snabbare än i till exempel däggdjursceller, eftersom de enklare cellerna har kortare generationstid. Odlingsmediet är dessutom billigare, vilket är extra viktigt när ett protein ska tillverkas i stor skala. ◻