

Opdagelse og heterolog produktion af nye bioaktive svampestoffer i skræddersyede mikrobielle cellefabrikker

Mange naturstoffer har farmakologisk aktivitet og er derfor interessante som lægemidler. De seneste års udvikling inden for bioteknologi gør det muligt at benytte mikrobielle cellefabrikker til at producere disse stoffer, der er svære til umulige at fremstille ved traditionel organisk kemisk syntese

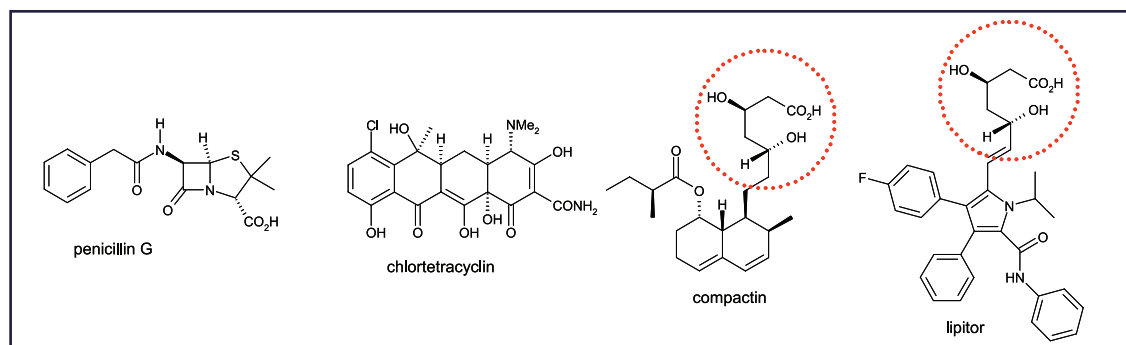
Af Michael Lyngge Nielsen, forskningsadjunkt, Thomas Ostenfeld Larsen, lektor, Center for Mikrobiel Bioteknologi (CMB), BioCentrum-DTU, DTU

Mikroorganismer har været kilden til mange af de mest succesfulde lægemidler, som for alvor startede med opdagelsen af penicillin (figur 1) for næsten 80 år siden [1]. Der er siden blevet opdaget en lang række antibiotika samt andre vigtige lægemidler som tetracykliner og kolesterolsænkende statiner (figur 1). Når mange af naturens små organiske molekyler er så biologisk aktive, hænger det i høj grad sammen med naturens fantastiske evne til at producere forholdsvis komplicerede kemiske strukturer. Til trods for at organismernes udgangspunkt ofte er nogle få relativt simple »byggesten«, indeholder mange naturstoffer adskillige funktionelle grupper, chirale centre og kondenserede ringsystemer. Hemmeligheden bag denne enorme kemiske diversitet er det som regel meget store enzymatiske apparat, som de enkelte organismer har »gemt« i deres arvemateriale, som de er i stand til at udtrykke og anvende under forskellige vækstbetingelser og stimuli.

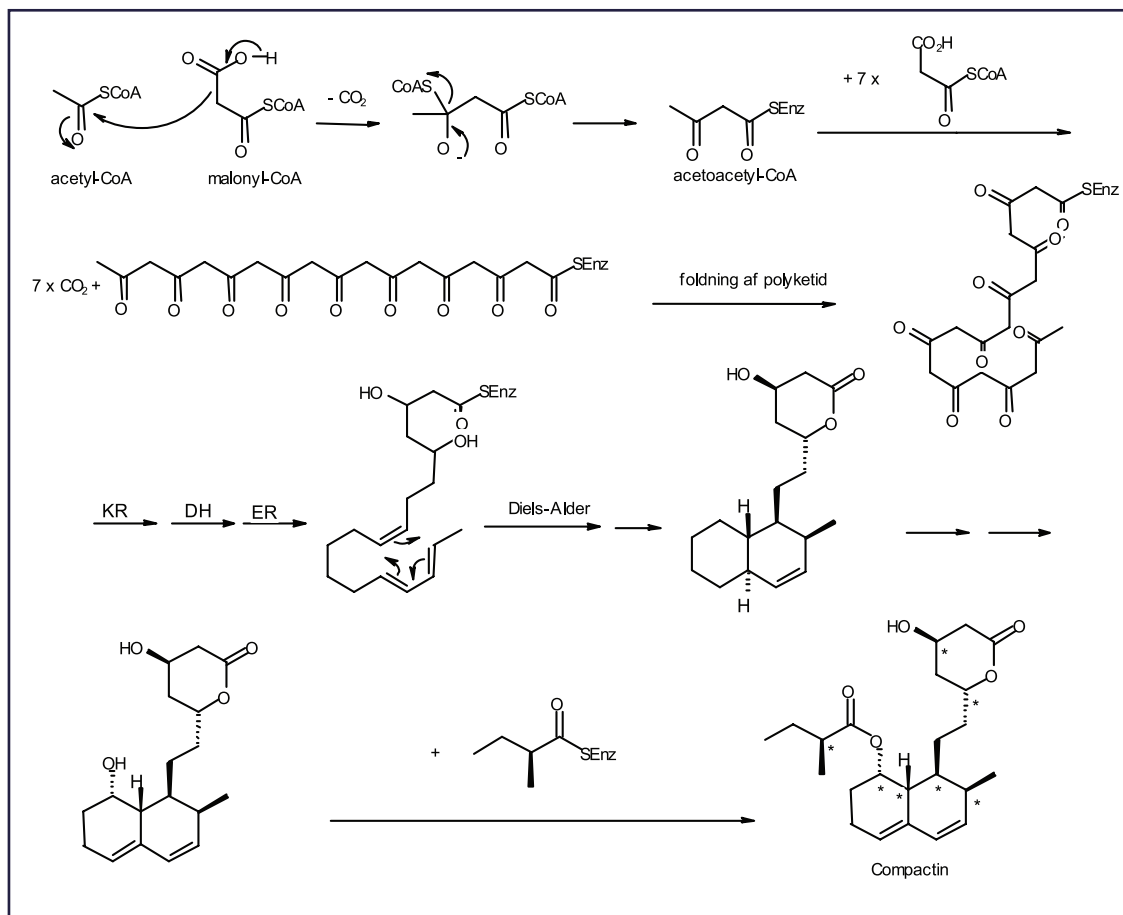
På trods af de mange succeshistorier, hvor naturstoffer som compactin og syntetisk afledte stoffer som lipitor (figur 1) er blevet blockbuster-lægemidler, har mange af de store medicinalvirksomheder inden for de sidste 10-15 år alligevel valgt at nedrosle eller helt at lukke deres naturstofafdelinger. Det skyldes flere forhold, men først og fremmest har mange virksom-

heder oplevet, at de i vid udstrækning isolerede de samme vidt udbredte mikroorganismer og dermed også i stor grad allerede kendte og trivielle stoffer. For det andet har den teknologiske udvikling åbnet nye muligheder for at fremstille et stort antal af syntetisk fremstillede stoffer vha. kombinatorisk kemi. Kort fortalt afviger kombinatorisk kemi fra traditionel organisk syntese ved, at man simultant reagerer et sæt af stoffer med et andet sæt af stoffer, hvorved et kombinatorisk bibliotek af stoffer fremstilles. Et simpelt eksempel er dannelsen af 100 forskellige estere ved at reagere de mulige kombinationer af 10 forskellige alkoholer med 10 forskellige carboxylsyrer. Den kombinatoriske kemi har dog ikke ubetinget kunne levere varen [2].

Hvis man ser på oprindelsen af de mest succesfulde lægemidler i perioden 1981-2002, så viser det sig, at mere end 60% af de nye anticancerstoffer kan ledes tilbage til naturen. Generelt er strukturen af ca. halvdelen af de nye lægemidler enten rene naturstoffer eller syntetisk afledte stoffer som f.eks. lipitor, hvor den aktive del af molekylet (farmakoforen) er »stjålet« fra compactin (figur 1). Faktisk viser oversigten indtil 2003, at ingen kombinatorisk afledte lægemidler havde klareret det helt frem til markedet. Det hænger til dels sammen med, at det nemt kan tage op til 10-15 år at udvikle et lægemiddel, men det afspejler



Figur 1. Naturstofferne penicillin G, chlortetracyclin og compactin samt det syntetisk afledte kolesterolsænkende lægemiddel lipitor. Bemærk at den øverste del af molekylet (i den røde cirkel) i de to sidstnævnte stoffer er identisk. Denne del af molekylet kaldes farmakoforen og er helt afgørende for de to stoffers bioaktivitet.



Figur 2. Forsimplt model for biosyntesen af compactin. Syntaseenzymet, der katalyserer syntesen, indeholder domæner med ketoreduktase- (KR), dehydratase- (DH) og enoylreduktase- (ER)-aktivitet. Det endelige molekyle indeholder hele syv chirale centre angivet med *.

også vanskeligheden i at konkurrere med naturens evne til at generere kemisk diversitet.

Disse erfaringer og de store fremskridt inden for specielt bioinformatik og molekylær biologi har betydet, at naturstofkemi ser ud til at få en renaissance.

Med bioinformatikken har vi lært nødvendigheden af at kunne lagre og håndtere enorme mængder data i databaser samt at udvikle de nødvendige søgeredskaber til at kunne ekstrahere relevant information. Det betyder, at det er blevet nemmere at opdage de nye naturstoffer blandt de mange allerede kendte, ligesom man kan finde de tilhørende gener i arvemassen, som endelig vha. gensejlsningsteknologier kan indsættes til heterolog produktion i en egnet cellefabrik.

Biosyntesen af komplekse naturstoffer ud fra simple byggesten

På trods af den store kemiske diversitet, som de mange naturstoffer repræsenterer, falder de fleste naturstoffer ind under nogle få hovedtyper, der alle biosyntetiseres ud fra mere eller mindre de samme små primære metabolitter, dvs. stoffer der indgår i alle levende cellers stofskifte. Den mest almindelige type sekundær metabolit hos skimmelsvampe er polyketiderne med stoffer som aflatoxin, fusarin og compactin (figur 1), der biosyntetiseres ud fra små kortkædede carboxylsyrer.

Figur 2 viser, hvordan compactin biosyntetiseres. Compactin betegnes som et nonaketid, fordi molekylet er dannet ved at 9 enheder af 2 carbonatomer er koblet sammen via Claisen-lignende reaktioner, hvor CO_2 spaltes fra den nye malonyl-enhed. Samtidig med at polyketidkæden forlænges udføres en række forskellige enzymkatalyserede modifikationer af molekylet. Carbonylgrupper reduceres først til alkoholgrupper af keto-reduktaser (KR), som efterfølgende reduceres til en dobbeltbinding ved vandfraspaltning af en dehydratase (DH) for endelig at blive fuldt reduceret vha. en enoylreduktase (ER). Senere

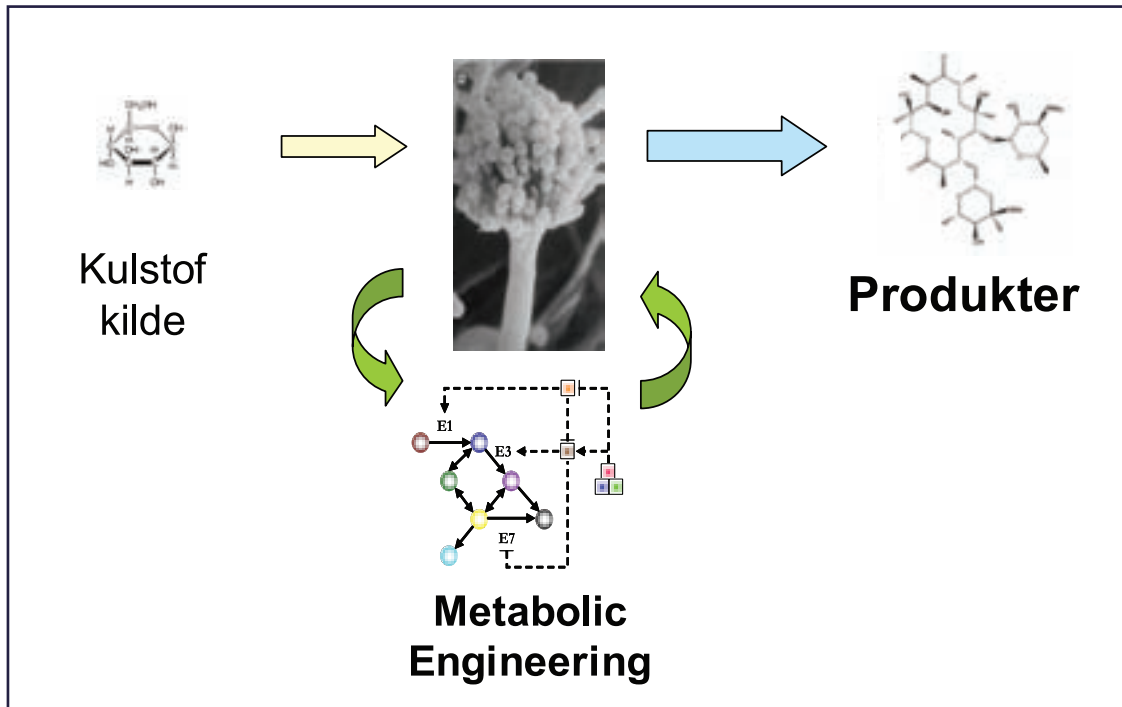
ringslutter molekylet ved en Diels-Alder-lignende reaktion, og endelig kobles en lille polyketidafledt stump på vha. en esterase-katalyseret reaktion. Bemærk at det endelige compactin-molekyle indeholder syv chirale centre (angivet med * i figur 2). Dette gør, at en total syntese af stoffet vil være relativ vanskelig. Af samme grund indeholder det syntetisk afledte stof lipitor (figur 1) kun to chirale centre. Disse sidder i farmakoforen og kan derfor ikke undværes.

Dereplikation - er helt afgørende for hurtigt bestemmelse af allerede kendte stoffer

Som nævnt er en væsentlig grund, til at naturstofkemi er på vej tilbage, at det i dag er blevet meget nemmere hurtigt at afgøre, om et umiddelbart ukendt stof allerede er kendt, og dermed sandsynligvis ikke er interessant, da det ikke kan patenteres. Denne proces, der kaldes dereplikering, er helt afgørende i det samlede screenings-setup [3]. Et vigtigt redskab i dereplikeringprocessen er anvendelse af HPLC koblet til hhv. en diodearray-detektor og et massespektrometer (HPLC-DAD-MS). Instrumentet kan bestemme UV-spektrret og måle massen af et givet relevant naturstof, så man kan bestemme den molekylære sammensætning af stoffet. Det er illustreret i figur 3, side 24, hvor det anticancer-aktive stof fumigallin med stor sandsynlighed påvises i et ekstrakt fra skimmelsvampen *Aspergillus fumigatus*.

UV-spektroskopi kan også bruges som redskab i opdagelsen af spændende nye men lignende stoffer

Hvor massespektrometri er helt afgørende for bestemmelse af et stofs mulige bruttoformel, så giver et UV-spektrum komplementerende strukturel information. Således vil mange stoffer inden for en bestemt stofklasse ofte have stor strukturel lighed, hvilket afspejles i meget ensartede UV-spektra. Og har man et nyt



Figur 5. Den mikrobielle cellefabrik, her illustreret ved en skimmelsvamp. Ved fermentering omdannes simple kulstofforbindelser til f.eks. komplicerede bioaktive naturforbindelser. Større produktudbytte opnås ved metabolic engineering, der benyttes til optimering af cellens metabolisme.

Betegnelsen cellefabrik bruges populært om det at benytte mikroorganismer til at producere et bestemt stof ved en kontrolleret gæring. Således fungerer hver mikroskopisk celle som en kemisk reaktor, der kan konvertere en energi- og kulstofkilde som sukker til et ønsket produkt som f.eks. compactin.

Den komplekse struktur og stereokemi af naturstoffer som f.eks. polyketider begrænser ofte en effektiv syntetisk produktion af stofferne, hvorfor cellefabrikker er den naturlige og mest økonomiske fremstillingsmetode. Det er dog de færreste organismer, der egner sig til produktion i industrielle fermentorer. Det skyldes bl.a., at naturstofferne ofte ikke produceres i nævneværdige mængder under industrielle betingelser. Desuden foretrækker fermenteringsindustrien at operere med kendte »arbejdsheste«, fordi det letter produktionsoptimering, procesfejlfinding og produktgodkendelse.

Bortset fra ændringer i reaktionsbetingelserne foretages alle justeringer af cellefabrikken vha. gensplejsning. Cellens arvmasse indeholder »instruktionerne« til, hvilke enzymer cellen skal producere, og samspillet mellem disse afgør cellens metabolisme (eller stofskifte). Når man har et indgående kendskab til cellens metabolisme, er det muligt at forudsige hvilke »instruktioner«, der skal ændres, så cellens metabolisme drejes i retning af dannelsen af det ønskede produkt. Det gøres i praksis ved at skrue op eller ned for bestemte gener og derved de tilsvarende enzygmængder, eller ved at indsætte enzymgener fra andre organismer så man skaber helt nye reaktionsveje. Denne fremgangsmåde til målrettet at ændre en celled metabolisme betegnes normalt *metabolic engineering*.

Det er afgørende, at man har et indgående kendskab til den organisme, man ønsker at manipulere, hvorfor man oftest benytter ▶

Koncentration og tørstof i væske

In-line refraktometre måler tørstof og °Brix i væsker og blandinger

Sensorer til ethvert formål:

- Aggressive væsker eller ultra rene finkemikalier
- Installation i Ex-områder
- Alle rørstørrelser og tanke
- Sanitær eller industriel udførelse



KPATENTS
PROCESS INSTRUMENTS

Digital transmitter

Digital transmitter med Ethernet, understøtter to sensorer koblet til én og samme enhed, uanset sensortype og applikation.

Alle sensorerne måler ved 589 nm, hvilket giver de sande værdier for væskens refraktive index. Sensorerne er "Plug and Play", og kan udskiftes uden at ændre kalibrering.



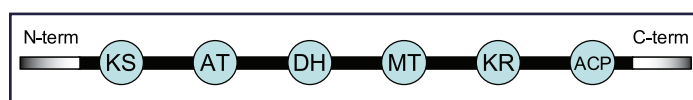
Hans Edvard Teglers Vej 5 | 2920 Charlottenlund
Telefon: +45 39 903 905 | www.contech.dk

CONTECH
INSTRUMENTERING

få udvalgte organismer som udgangspunkt for metabolic engineering. Gæren, *Saccharomyces cerevisiae*, bakterien, *Escherichia coli* og skimmelsvampene, *Aspergillus oryzae* og *Aspergillus niger* er blandt de mest brugte cellefabrikker. Skimmelsvampe er normalt vanskelige at gensplejse men ved CMB, har vi for nylig udviklet en metode til at foretage hurtige og målrettede genetiske ændringer i skimmelsvampe [6].

Identifikation af »kemi-gener«

Gensplejningsteknologien kan altså bruges til at introducere helt nye enzymer i en organisme, men forudsætter at man kan finde og isolere disse gener. De kemisk-analytiske værktøjer kan bruges til at screene hundredvis af organismer for nye »spændende« naturstoffer blandt titusindvis af »trivielle« stoffer. Når man har identificeret en organisme, der producerer et interessant stof, følger den svære bioinformatiske og molekylærbiologiske opgave at finde de gener, der har med produktion af stoffet at gøre.



Figur 6. En polyketid syntase er et multifunktionelt enzym, der katalyserer dannelsen af en polymerkæde ud fra kortkædede carboxylsyrer. Her illustreres peptidet af en type I svampe-PKS med tilhørende katalytiske domæner (blå cirkler). Ketosyntase (KS), acyltransferase (AT), dehydratase (DH), methyltransferase (MT), ketoreduktase (KR) og acyl carrier protein (ACP). Bemærk at enzymet er iterativt, hvilket betyder, at mange af aktiviteterne kan bruges flere gange under den gradvise kædeforlængelse.

Baseret på stoffets strukturformel skal man vha. kendskab til biokemi forsøge at forudsige, hvilke enzymatiske aktiviteter, der skal til for at kunne syntetisere stoffet. I eksemplet med compactin skal der bl.a. bruges KR-, DH- og ER-aktiviteter (figur 2). Derfor søges der nu et gen, der koder for et protein med disse enzymatiske aktiviteter (figur 6). En opgave der er langt mere overkommelig, hvis genomet hos den pågældende organisme er fuldstændigt sekventeret. I dette tilfælde benyttes bioinformatik til at sammenligne genomsekvensen med andre i forvejen kendte polyketiddomæner. Det kan ske, at der findes

flere gener med disse formodede aktiviteter. Hvis søgningen ikke kan afgrænses yderligere, må man benytte flere gener i den efterfølgende kloning. Aktiviteten kan afprøves indirekte ved at slå PKS-genet ud i den oprindelige værtsorganisme, og undersøge om mutanten stadig producerer stoffet.

Hvis organismen ikke er genomsekventeret, skal søgningsarbejdet udføres manuelt vha. besværlige DNA-hybridiseringsteknikker. Kort fortalt prøber man genomet fysisk med en stump DNA af f.eks. en kendt KR. Derefter isoleres og sekventeres det fragment af genomet, der bandt proben, hvorefter det kan konstateres, om man er på rette spor. I dag er prisen på sekventering styrtdykket, hvorfor mange, især større virksomheder, vælger at sekventere hele genomet med det samme, da det letter søgningsarbejdet enormt. En yderligere fordel ved genomsekventering er, at man under den efterfølgende sekvensanalyse kan »opdage« PKS-lignende gener, der »skjuler sig«, fordi de ikke normalt udtrykkes, og derfor ikke kan identificeres ved metabolitprofileringen.

Der er ofte også andre hjælpegener forbundet med biosyntesen. I compactin-biosyntesen er der ni gener, hvoraf kun to er syntaser. Resten koder for forskellige enzymer, der enten modificerer polyketidet yderligere eller er involveret i resistens og udpumpning af det endelige stof [7]. Til alt held findes hjælpegenerne altid i en klynge inden for samme område på kromosomet, og de er derfor relativt lette at identificere, når man først har identificeret en mulig polyketid syntase og overført disse til produktionsorganismen, hvor den heterologe produktion skal optimeres [8].

Fremtidens lægemidler

Forskningen ved CMB tager udgangspunkt i metabolic engineering og et stort organismekendskab. Dette benyttes til at skabe effektive miljøvenlige bioprocesser, hvor mikrobielle cellefabrikker anvendes til at producere både simple »fine chemicals« og mere komplicerede kemiske stoffer. Ved at arbejde tværfagligt med kemien og molekylærbiologien er det vores mål at bidrage til udviklingen af de nødvendige teknologier, både til at identificere nye potentielle lægemidler og til fremstilling af skræddersyede højtydende cellefabrikker.

E-mail-adresser:

Michael Lyng Nielsen, mln@biocentrum.dtu.dk

Thomas Ostenfeld Larsen, tol@biocentrum.dtu.dk

Referencer

1. Butler MS (2005). Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Nat Prod Rep* 22: 162-195
2. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 66: 1022-1037.
3. Larsen TO, Smedsgaard J, Nielsen KF, Hansen ME, Frisvad JC (2005). Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Nat Prod Rep* 22: 672-695.
4. Hansen ME, Smedsgaard J, Larsen TO (2005). X-Hitting: an algorithm for novelty detection and dereplication by UV spectra of complex mixtures of natural products. *Anal Chem* 77: 6805-6817.
5. Larsen TO, Petersen BO, Sørensen D, Duus JØ, Frisvad JC, Hansen ME (2005). Discovery of new natural products by application of X-hitting, a novel algorithm for automated comparison of full UV spectra, combined with structural determination by NMR spectroscopy. *J Nat Prod* 68: 871-874.
6. Nielsen ML, Albertsen L, Lettier G, Nielsen JB, Mortensen UH (2006). Efficient PCR-based gene targeting with a recyclable marker for *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 43: 54-64.
7. Abe Y, Suzuki T, Ono C, Iwamoto K, Hosobuchi M, Yoshikawa H (2002). Molecular cloning and characterization of an ML-236B (compactin) biosynthetic gene cluster in *Penicillium citrinum*. *Mol Genet Genomics* 267: 636-646.
8. Pfeifer BA, Khosla C (2001). Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts. *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 106-118.

Ung kemiker hædret

Den 27-årige ph.d.-studerende Cindie Kehlet fra Aarhus Universitet har modtaget Dansk NMRs Talentpris for sine studier inden for faststof kernemagnetisk resonans (NMR) spektroskopi og optimal kontrolteori. Målet med studierne



er at skaffe præcis information om membranproteiners struktur og funktion. Denne viden er af stor betydning for forståelse og behandling af alvorlige sygdomme. Vigtigheden understreges af, at membranproteiner er målet for hovedparten af de medikamenter, der udvikles på verdensplan. Cindie Kehlet har i forbindelse med sine studier opholdt sig i længere perioder ved det Tekniske Universitet i München.