

Mikrosvampe leverer ny kemi

Skimmelsvampene *Penicillium* og *Aspergillus* har vist sig at kunne producere et stort antal sekundære metabolitter. Nye metoder til udvælgelse af forskellige organismer kan have store perspektiver for den farmaceutiske industris arbejde med at finde nye biologisk aktive stoffer

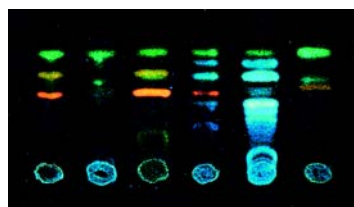
Af Kristian Fog Nielsen¹, kfn@biocentrum.dtu.dk; Michael E. Hansen^{1,2}, meh@imm.dtu.dk; Thomas O. Larsen¹, tol@biocentrum.dtu.dk; Jørn Smedsgaard¹, js@biocentrum.dtu.dk og Jens C. Frisvad¹, jcf@biocentrum.dtu.dk

¹Mykologigruppen, BioCentrum-DTU

²Billedanalyse og computergrafik gruppen, Informatik og Matematisk Modellering (IMM), DTU

Arbejdet med skimmelsvampeslægterne *Aspergillus* og *Penicillium* udføres i PPB-regi (Program for Prediktiv Bioteknologi). Skimmelsvampene har vist sig at kunne producere et meget stort antal sekundære metabolitter (små organiske molekyler typisk < 1000 dalton). I begge slægter er der en klar sammenhæng mellem den enkelte art, og de oftest 30-150 forskellige metabolitter den producerer (hvoraf 20-50% normalt er unikke). Derfor er disse to slægter perfekte til projektet.

Under arbejdet med metabolit-profiler fra svampekulturer dyrket på agarplader har det vist sig, at profilerne kan bruges til arts-identifikation. I første omgang via tyndtlagschromatografi (figur 1) og dernæst væskechromatografi (HPLC), senere er flow-injection-massespektrometri (FI-MS), gaschromatografi-MS og HPLC-MS kommet til.



Figur 1. TLC-plade af 6 *Alternaria*-isolater (belyst ved 254 nm). En 3 mm agarplug fra en koloni af mediet DRYES er påsat nederst i hver bane. Bane 1 og 3 er *A. infectoria*, 4 og 5 er *A. tenuissima*, endelig er 2 og 6 fra *A. arborescens*-komplekset.

PPB sigter på at komme med nye input til den farmaceutiske industri, som til trods for en stadig mere effektiv *High Throughput Screening* (HTS) har haft store problemer med at opdage tilstrækkeligt med nye lægemiddelkandidater (lead compounds). Derfor har nogle af de største firmaer nedlagt deres naturstofafdelinger, selv om > 50% af verdens medicin-produkter er naturstoffer eller kemisk afledte heraf [1,6].

Hovedproblemet er, at man har screenet et meget stort antal næsten ens organismer, typisk mange isolater fra samme art. Da de har en næsten ens metabolitprofil, giver det et lavt antal forskellige testede stoffer, fordi man ikke har optimeret forskelligheden (diversiteten) af det biologiske kildemateriale. Desuden har der været brugt alt for mange ressourcer på at oprense og strukturoplære allerede kendte biologisk aktive stoffer og mykotoxiner.

Et andet problem er, at industrien ikke har formået at få skimmelsvampene til at udtrykke deres fulde kemiske potentiale, idet man typisk har brugt flydende kulturer, der oftest er meget dårlige til produktion af sekundære metabolitter.

Allerede nu kan en del af disse problemer afhjælpes, og i løbet af få år kan der tilbydes en række databaseværktøjer, der kan identificere enkelt isolater og arter og samtidig optimere forskelligheden af nye og spændende skimmelsvampeisolater, og dermed undgå identifikation af allerede kendte stoffer.

Vi er netop i gang med at finde potentielle forskningsinstitutioner og virksomheder til screeningsprojekter for nye biologisk aktive stoffer, for at teste denne nye fremgangsmåde.

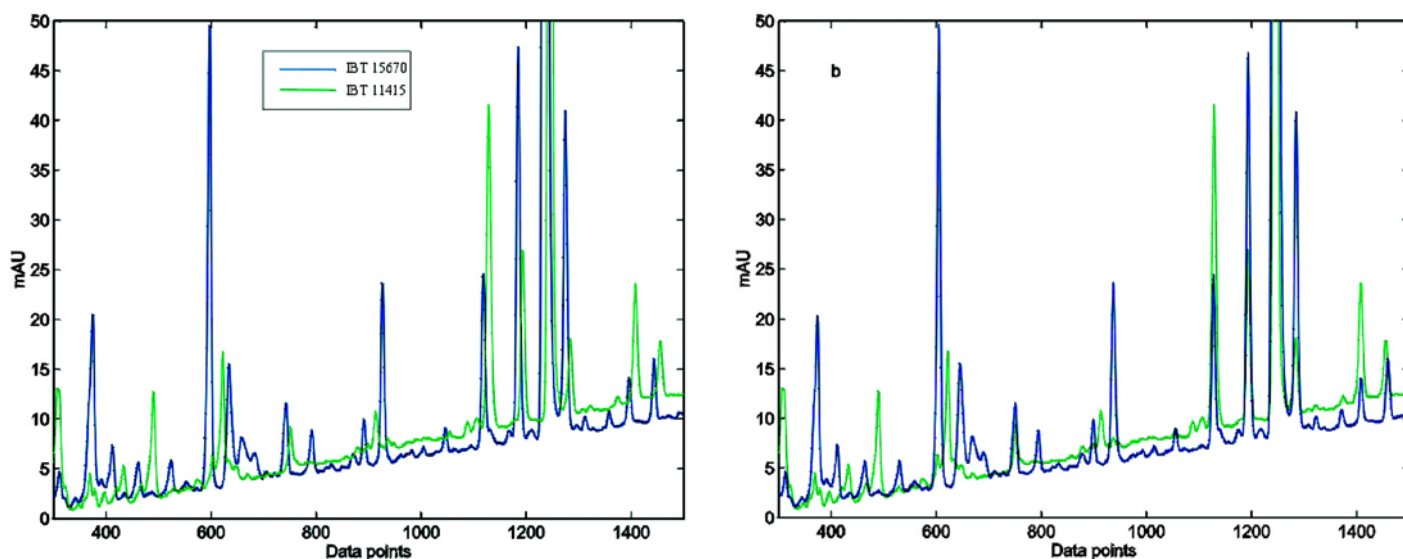
COWTool

En anden hjørnesteen er videreudviklingen af metoder til hurtig håndtering af mange datafiler fra specielt chromatografiske analyser kombineret med multikanal-detektionsprincipper (diodearray og massespektrometri). Her benyttes teknikker fra matematisk/statistisk billedanalyse uden brug af *data-reducing* metoder, som f.eks. at plote enkeltioner (MS) eller UV-max. efter HPLC-analyser.

Under analysen af de chromatografiske data er et af hovedproblemerne, hvordan der korrigeres for »fra-kørsel-til-kørsel«-variationen. Som eksempler på de væsentligste faktorer, der bidrager til denne variation, kan nævnes niveauforskelle (i baseline) og forskydning af retentionstiderne. Alle udviklede metoder implementeres i et Windows-baseret program kaldet COWTool.

En tidlig version af COWTool kan frit downloades fra www.ibt.dtu.dk/mycology/cow/cow.htm. Programmet er en af-lægger af et tidligere samarbejde mellem IMM og Mykologigruppen [4,5] og kan på nuværende tidspunkt håndtere Agilent (HP) HPLC-DAD-filer samt ASCII-filer (HPLC-DAD, LC-MS og GC-MS) fra andre producenter. Programmet indeholder forskellige skalerings- og filtreringsfunktioner samt metoder til aligning (figur 2) af chromatogrammer og har på nuværende tidspunkt været brugt til identifikation af forskellige arter i *Penicillium* [4] og *Trichoderma* [8].

En ny og forbedret version af COWTool er under udvikling med forbedrede metoder til håndtering af baseline-drift, negative peaks, og aligning. Endvidere vil det blive muligt at evaluere similariteten mellem data baseret på baggrund af den globale såvel som den lokale kemiske information (identifikation af enkelt stoffer og analoger). På sigt vil programmet inkludere en database over enkeltstoffer, der kan søges i.



Figur 2. Eksempel på alignment LC-DAD-profiler (40 min. lange) fra ekstrakter af to *Penicillium cyclopium*-isolater. Venstre plot viser de rå profiler og højre resultatet efter en alignment.

Ny kemi og CROSS-hitting

I de seneste år har specielt organismer fra ekstreme miljøer (ekstremofiler) være målet for en række bioteknologiske firmaer, og PPB har startet et ph.d.-projekt inden for svampe fra en række ekstreme miljøer, hvor der synes at være gode muligheder for at finde nye arter og nye kemiske forbindelser, og hvor man ikke har arbejdet systematisk med de naturlige arts-serier, der normalt findes i alle miljøer.

Den nyeste trend inden for screening er endofytter (organismer der vokser inde i planter og træer). Det har vist sig, at de fleste planter har en eller flere associerede svampearter. I ph.d.-projektet er der fokus på de interessante biokonsortiumkomplekser, hvor værternes interaktion og metabolitters indflydelse på svampenes metabolisme skal undersøges.

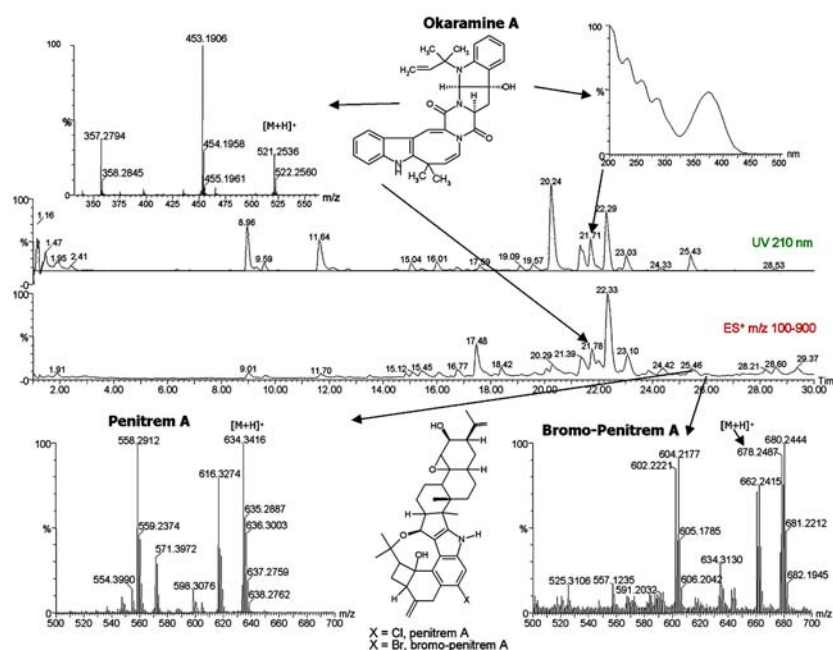
Andre projekter vil gå på »X-hitting«, hvor vi vil vise, hvordan en række velegnede arter kan bruges til produktion af en række spændende metabolitfamilier, som er fundet i giftige el-

ler patogene arter. Metoden kan være med til at pege på en række arter, der kan producere analoger af en række interessante allerede kendte metabolitter og naturlige farvestoffer. Målet med disse projekter er at finde et eller flere *lead compounds*, i samarbejde med en eller flere partnere.

For at sikre et godt samarbejde med universitetskolleger og industrien er vi ved at skaffe mikrofraktioneringsudstyr til fraktionering af skimmelsvampeekstrakter, så vi kan levere færdige mikrotiterplader eller biokombinatoriske biblioteker til HTS-screening.

Det er målet at bruge vores viden og databaser til at forudsige, hvorvidt en detekteret sekundær metabolit er ny eller allerede kendt. Samtidig sættes der på at opnå en meget høj hit-rate mht. helt nye forbindelser (pt. > 50%).

På figur 3 ses et eksempel på anvendelse af vores viden til at karakterisere kendte metabolitter i *Penicillium ochrochloron*. En art, der er i stand til at vokse i koncentreret kobbersulphat-



Figur 3. HPLC-UV-electrospray-MS-profil af *Penicillium ochrochloron* dyrket på ALK-agar. Øverste spor er UV og nederste MS. Sidstnævnte er lavet på et Time of flight instrument, hvor der normalt opnås en massepræcision bedre end 5 mDa.

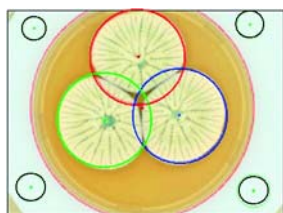
opløsninger, og derfor er en særdeles spændende ekstremofil. Vi har ved analyser af denne svamp fundet en række meget spændende metabolitter: penicillinsyre (et polyketid, produceres kun på YES-agar), penitrem A og bromo-penitrem A, okaraminer [7], og en række aktive cycliske peptider. En del af disse metabolitter blev opdaget via en re-identifikation af en *P. simplicissimum* til *P. ochrochloron*.

Et andet vigtigt eksempel er *Aspergillus niger*-komplekset (de sorte aspergiller). *A. niger* er en af biotekindustriens arbejdsheste og bruges til produktion af en række organiske syrer og til ekspression af en række proteiner med post-translatoriske modifikationer. Desværre producerer enkelte isolater af *A. niger* og de fleste isolater af den nærtbeslægtede *A. carbonarius* det nyre-kræftfremkaldende stof ochratoxin A. Et alternativ er at bruge en anden art fra komplekset, der vokser lige så godt – f.eks. *A. tubingensis*, der aldrig producerer ochratoxin A.

Automatisk billedanalyse af skimmelkulturer til identifikation og descreening

Det har vist sig, at denne teknik kan bruges til arts-identifikation med mere end 95% sikkerhed inden for de terverticillate *Penicillier* (en speciel gruppe inden for slægten, der indeholder de fleste levnedsmiddelbårne *Penicillier*) [2], den sværeste gruppe inden for denne slægt.

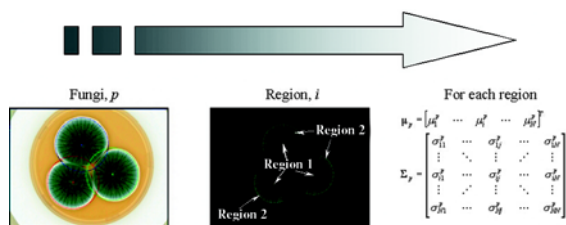
Billederne optages med VideometerLab (www.videometer.com), et kamerasystem der består af et 3-element RGB-CCD kamera (billede opløst som Rød-Grøn-Blå) og en Ulbricht-sfære som belysningskilde.



Figur 4. Petriskål med svampekolonier, der segmenteres ud sammen med fire områder, der anvendes ved den interne farvekalibrering (shading).

Første trin i processen er en meget præcis farvekalibrering baseret på NCS-farvesystemet. Efterfølgende optages billederne og lagres i 32-bit RGB (dvs. $2^{32} = 4.294.967.296$ kombinationer pr. kanal). Herefter starter selve billedanalysen (figur 4), hvor der først foretages en intern kalibrering via de fire cirkler uden for petriskålen, og kolonierne automatisk segmenteres ud.

Hver af de tre kolonier inddeles i et antal af koncentriske regioner (figur 5b), hvor der måles forskellige lokale karakteristika, bl.a. farve og tekstur.



Figur 5. Feature-ekstraktionen i tre skridt. Først (venstre) identificeres alle regioner i billedet herunder svampekolonierne. Herefter udrækkes et antal regioner fra kolonierne (midten), fra hvilke en feature-fordeling estimeres (højre).

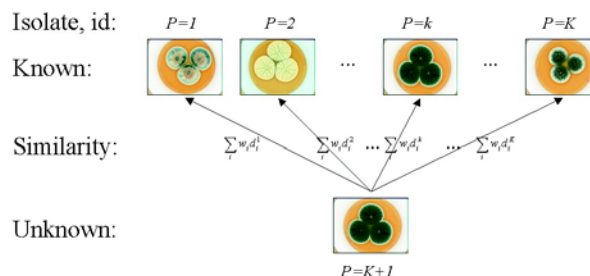
Efter segmenteringen udrækkes en række features (figur 5), hvis egenskaber beskrives ved en parameterisering.

$$d^2 = \frac{1}{8} (\mu_2 - \mu_1)^T \Sigma^{-1} (\mu_2 - \mu_1) + \frac{1}{2} \ln \left(\frac{|\Sigma|}{\sqrt{|\Sigma_1| |\Sigma_2|}} \right)$$

$$\text{and } \Sigma = \frac{1}{2} (\Sigma_1 + \Sigma_2)$$

Figur 6. Isolater sammenlignes på baggrund af deres estimerede feature-fordelinger (venstre). Afstanden estimeres med Bhattacharyya-afstanden (højre).

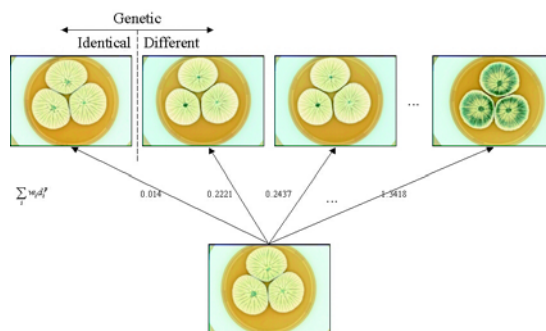
Efterfølgende beregnes en similaritet (figur 6) mellem hvert sæt af features i hver af regionerne, og sammenlignes mellem det antal isolater der er inddraget i analysen (figur 7).



Figur 7. Afstanden mellem en ukendt og kendte isolater estimeres for alle regioner. Disse afstande vægtes sammen til en samlet afstand, der beskriver den samlede similaritet mellem to isolater.

Disse kan bruges som identifikationsparametre til den endelige identifikation (figur 8).

Der er adskillige (lineære og ikke-lineære) måder at kombinere identifikationsparametrene på, og i det følgende eksempel bruges en lineær kombination kun baseret på farve, og for hver sammenligning, p , mellem to isolater fås similariteten, S^p .



Figur 8. På baggrund af den samlede similaritet er det nu muligt at udvælge et eller flere isolater.

Bedre ekspression af metabolitter

Mykologigruppen har en komplet samling af samtlige kendte arter i de to slægter *Penicillium* og *Aspergillus* og ofte mange (> 100) isolater fra flere habitater. Dermed haves et stort kendskab til *intra-art-variationer*. Dette er nøglen til at finde optimale produktionsisolater, men også til at teste de relative forskelle inden for en art mod andre arter (f.eks. væksthastighed, farver og sekundær metabolitprofil).

Faste substrater er de flydende totalt overlegne både hvad angår den kemiske forskellighed og kvantiteter af metabolitter. Vedrørende faste substrater har det længe været den almindelige anskuelse, at forhold der stimulerer dannelsen af sporer giver optimal metabolitproduktion, frem for når svampene vokser som et tyndt mycelium (det netværk af hy-

fer som skimmelsvampe består af) uden at danne sporer. Tilsyneladende er der et »tredje niveau«, hvor skimmelsvampenes metabolisme er »kortslettet«, sporulationen ophører og der produceres meget store mængder metabolitter og meget tykke myceliemåtter (figur 9). Det gøres med store mængder kulhydrat og enten nitrat, ammonium eller komplekse naturlige nitrogenkilder. På disse næringsrige medier har skimmelsvampene et meget forskelligartet udseende og sekundær metabolisme fra medium til medium. Automatisk billedanalyse af kolonierne på agarsubstrater kan derfor bidrage til at forudsige på hvilke medier, der er produceret flest og mest forskellige sekundære metabolitter.



Figur 9. *Aspergillus versicolor* IBT 23088 på CYA-agar, bemærk de grønlige sporer på den nedre koloni.

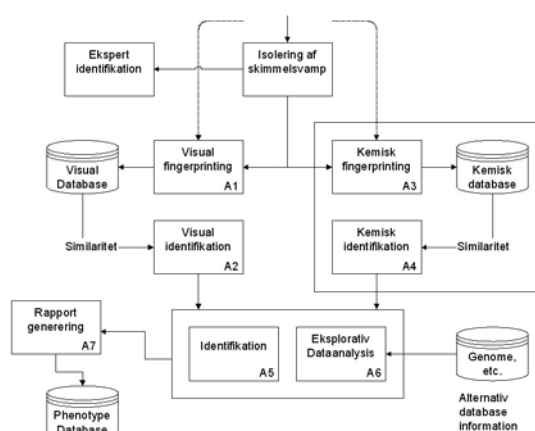
Et andet projekt bliver at forbedre opskaleringmulighederne for de faste substrater, der er hovedårsagen til at industrien arbejder med væskefermenteringer til produktion af sekundære metabolitter. Her arbejdes der på et nyt koncept, hvor vækstsubstratet opsuges i en porøs matrix. Metoden giver mulighed for at pakke større fermentorer, hvis indhold nemt kan ekstraheres og samtidig give en god substratudnyttelse.

Databaser

Der findes talrige databaser, der indeholder gensekvenser. Desværre siger disse DNA-sekvensdatabaser mest om arternes evolutionære historie og ikke noget om deres egenskaber. I praksis er der endnu ingen fænotypiske databaser, der indeholder data, der beskriver, hvordan mikroorganismene ser ud, hvor og under hvilke temperaturer og fugtforhold de vokser, samt hvilke kulhydratkilder de kan nedbryde. Desuden mangler et overblik over, hvordan organismene isoleres (eksempelvis via selektive medier) og præcist identificeres, hvor der er gode typekulturisolater, og hvilke sekundære metabolitter og mykotoksiner de kan producere. PPB vil foreslå en prototype på en sådan database indeholdende disse informationer (som set i figur 10). Det er også målet at se på, hvordan data kan integreres med andre forskningsgruppers data.

PPB-konsortiet

PPB er et rammeprojekt finansieret af STVF. Det består af: Mykologigruppen, BioCentrum-DTU, DTU Billedanalyse og computergrafik gruppen, IMM, DTU og Marinkemisk gruppe på Københavns Universitet
Læs mere på: www.ibt.dtu.dk/mycology/ppb/



Figur 10. Opsætning af screeningsstrategi.

I første omgang vil arbejdet være koncentreret om de sekundære metabolitter og vækstforhold for alle beskrevne arter i *Penicillium* og *Aspergillus*. Samtidig vil der blive arbejdet på at inkorporere litteratur-data fra disse to slægter. Databaseprojektet skal koordineres med den nye internationale biodiversitetssekretariat, GBIF, som Danmark er blevet vært for. Vi mener, at vi kan bidrage væsentligt til *biodiversitetsinformatik*, der netop adskiller sig fra traditionel *bioinformatik* ved at lægge vægt på den funktionelle fænotype, økologi og klassifikation frem for evolutionær historie.

Arrangementer

Det bliver forsøgt at danne et dansk selskab for naturstofkemi. I den forbindelse vil PPB sponser et møde inden for kemisk diversitet. Yderligere information findes på vores website.

I efteråret 2002 holder PPB en præsentationsdag på BioCentrum, hvor man kan se flere af de nye apparater i brug, bl.a. *accurat mass* LC-MS og LC-MS/MS, præparativ HPLC-DAD og CCC (Counter Current Chromatography) samt det nye billedanalyseudstyr.

Referencer

1. Bull, A.T., Ward, A.C. and Goodfellow, M. 2000. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 573-606.
2. Dörge, Carstensen & Frisvad, J.C. 2000. Direct identification of pure *Penicillium* species using image analysis. *J. Microbiol. Meth.* 41: 212-133.
3. Frisvad J.C. 2001. Biodiversitet og meget udpræget kemisk diversitet i skimmelsvampe. *Svampe* 44: 16-20.
4. Nielsen N.-P. V., J. Smedsgaard and J. C. Frisvad. 1999. Using full Second-Order Chromatographic/Spectrometric Data Matrices for Automated Sample Identification and Component Analysis by Non Data Reducing Image Analysis. *Anal. Chem.* 71: 727-735.
5. Nielsen, N.-P.V., J.M. Carstensen, and J. Smedsgaard. 1998. Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimised warping. *Journal of Chromatography A* 805:17-35.
6. Pointing, S.B. and Hyde, K.D. 2001. *Bio-exploitation of filamentous fungi*. Fungal Diversity Press, Hong Kong.
7. Shiono, Y., Akiyama, K. & Hayashi, H. 2000. Okaramins N, O, P, Q and R, new okaramin congeners, from *Penicillium simplicissimum* ATCC 90288. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 64: 103-110.
8. Thrane, U., S. B. Poulsen, H. I. Nirenberg, and E. Lieckfeldt. 2001. Identification of *Trichoderma* strains by image analysis of HPLC chromatograms. *FEMS Microbiol. Lett.* 203:249-255.