

Opdagere af nyt enzym

Til trods for at der verden over, i tusinder laboratorier, arbejdes med enzymer - er der langt mellem nyopdagelserne. Alligevel er det lykket et forskerhold fra DTU, RUC og KU at isolere et helt nyt enzym, der kan få afgørende betydning for genterapien. Enzymet, der fik IUPACs godkendelse i sidste måned, er allerede i brug hos Roche Diagnostics og afprøves hos NsGene A/S

Af Gitte Ahrenkiel (DJ), ga@sletten.dk

Det bliver stedse vanskeligere at opdage nye arter af forskellige højere organismer. Vi har stort set kortlagt, hvad der er (og har været) af dyr og planter, og det gælder også inden for enzymernes verden.

Så der var virkelig grund til at spærre øjnene op, da forskerne Jure Piskur (DTU), Birgitte Munch-Petersen (RUC) og Leif Søndergaard (KU) fik isoleret, hvad der skulle vise sig at være et helt nyt enzym, fra en bananflue.

Tilfældighedernes spil

- Det hele startede med, at jeg ved en tilfældighed mødte Jure (der dengang var tilknyttet KU) ved en konference i USA i 1994, fortæller Birgitte Munch-Petersen, der på det tidspunkt ikke kendte Jure Piskur og hans biokemiske baggrund fra henholdsvis hjemlandet Slovenien og Sverige, hans ph.d. i Australien og hans ansættelse på først Carlsberg og senere Københavns Universitet.

- Jure spurgte, om jeg kunne hjælpe ham og Leif med at isolere det gen hos bananfluen, der svarer til genet for et af de enzymer, jeg arbejder med i mennesket.

Spørgsmålet forbavtede Birgitte. Hun gik ud fra, at det havde andre da for længe siden isoleret - og når det åbenbart ikke var sket, så hang det nok sammen med, at genet ikke var særlig interessant.

- Et par måneder senere kontaktede jeg igen Birgitte. Jeg kunne nemlig ikke finde et gen i bananfluen, som lignede menneskegenet, forklarer Jure.

Værd at vide om bananfluen (*Drosophila melanogaster*)

Forskere har en særlig forkærlighed for bananfluen. Den er som en af de første komplicerede flercellede organismer totalt sekventeret, dvs. nem at isolere gener fra.

Endvidere er den offentligt tilgængeligt for alle forskere - og koster ikke en krone. Samtlige ca. 13.000 af dens gener kan købes som DNA-chips.

Fluens popularitet skyldes også, at dens gener ligner vores, og at det har hjulpet med til at identificere mange hidtil ukendte gener hos mennesket.

Fluen er let at dyrke i laboratoriet. Den har en generations-tid på 14 dage, og i et lille rør kan man opdyrke flere hundrede fluer. Desuden lever bananfluen af et simpelt og billigt medium, der kun består af agar, sukker, gær og vand.

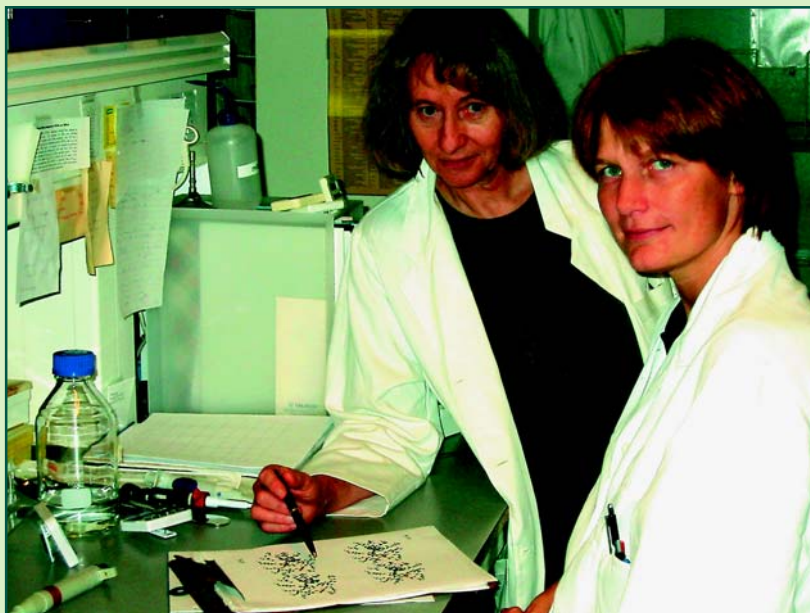
De blev herefter enige om, at Jure og Leif skulle opdyrke celler fra bananfluen. En mulighed var jo, at genet var så anderledes, at vi måtte se på cellens enzymer istedet.

- Cellerne kom til RUC, og min laborant Marianne gik i gang med det træls arbejde at få oprenset enzymerne fra cellerne. Da det ikke indgik i vores hovedprojekt - og vores basismidler er meget begrænsede - gik der meget lang tid med oprensingsprocessen, fortæller Birgitte videre.

- Men så en dag, hvor jeg var til møde, kom Marianne brasende ind med et forfærdet ansigt og sagde, at der var noget



Jure Piskur (tv) og Wolfgang Knecht fotograferet i laboratoriet på Sektion for Molekylær Mikrobiologi, BioCentrum-DTU, hvor bl.a. muterede former af det nye enzym designes.
Foto: gahr/www.polytechphotos.dk



Birgitte Munch-Petersen (tv) og laborant Marianne Lauridsen i laboratoriet på RUC. Foran sig har de et billede af den rumlige struktur af det nye enzym.
Foto: RUC/TA.

helt forkert med prøverne. Og det forkerte var, at der ikke var de enzymer, der plejede at være, når vi arbejdede med menneskeceller, men noget helt andet. Stakkels Marianne, hun troede, hun havde lavet en fejl og fået ødelagt forsøget med de mange celler, Jure og Leif havde lavet. Bagefter klonedes bananfluensgen på DTU, og nye muterede versioner udvikledes.

Præsentation af opdagelsen

Opdagelsen af det unikke enzym var en kendsgerning. Nu skulle der følges op. Opdagelsen skulle præsenteres - og som det er kutyme blandt biofolk - skulle det især ske på konferencer. Her får man feedback på projekter og her etableres kontakter - jævnfør konferencen i USA (1994), hvor Jure opsøgte Birgitte.

Offensiven blev indledt i april 1997 på konferencen i Heman (Sverige). Hernæst i juni i Gmunden (Østrig), hvor biomedicineren Wolfgang Knecht fra Philipps Universität Marburg (Tyskland) sluttede sig til teamet. Og endelig i august samme år på en international biokemi- og molekylær biologikonference i Humlebæk, hvor der for alvor blev sat turbo på bananfluens i forvejen ultrahurtige enzym. For til stede ved konferencen var en repræsentant fra et af de største farmaceutiske og

biotekfirmaer i Europa, Roche Koncernen. Han fattede straks interesse for det nye enzym (der havde fået betegnelsen »multisubstrate deoxyribonucleoside kinase«), og i tiden efter fik det schweizisk-tyske firma licens til at anvende enzymet til syntese af DNA-kemikalier, og det har været i brug her siden 2000.

Året efter fik det danske firma NsGene A/S (som er et spin-off fra NeuroSearch A/S) licens til at bruge det nye enzym til gentterapi og kræftbehandling. Projektet blev ligeledes støttet af bl.a. Statens Teknisk Videnskabelige Forskningsråd.

Og i august i år fulgte den endegyldige blåstempling: IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) har - efter to års dødvande i nyopdagelser i denne klasse enzymer - anerkendt multisubstrate deoxyribonucleoside kinase som et helt nyt enzym og givet det nummeret EC 2.7.1.145.

Ultrahurtigt enzym

Kort fortalt giver det fundne enzym adgang til livets byggestene, som findes i vores arvmasse.

- Vores enzym er centralt for genbrug og recirkulation af DNA-byggestenene og katalyserer første trin i genbruget. På grund af enzymets særlige egenskaber kan det, når det er indført i en celle, omdanne et uskadeligt, DNA-byggestenlignende, stof til et giftigt stof. Med andre ord, en egenskab af stor betydning for gentterapien.

- Enzymet er i sin oprindelig form ultrahurtigt og effektivt. Disse egenskaber har forskerne videreudviklet ved at designe muterede former af enzymet, som i laboratorieforsøg har vist sig endnu mere lovende, siger Jure, der planlægger at studere de muterede enzyms evne til målrettet at destruere kræftceller med forhåbentlig færre og helst ingen af de bivirkninger, bl.a. kemoen har for mange patienter i dag. Enzymets gen kan også integreres i menneskets cellelinier, der bruges som reservedele til at reparere patienternes syge væv.

På RUC er Birgitte i gang med at undersøge enzymets rumlige form, og hvordan det binder og omsætter de normale byggestene og kemostofferne.

- Jeg håber at forstå mekanismerne i disse processer, for senere at bruge denne viden til at udvikle nye kemostoffer og nye muterede enzymer med endnu bedre evner for omsætning af kemostoffer, siger hun.

I samme ærinde men i en anden boldgade har forskningsadjunkt Wolfgang Knecht i laboratoriet på DTU en række



Bananfluer, fotograferet af Jure Piskur.

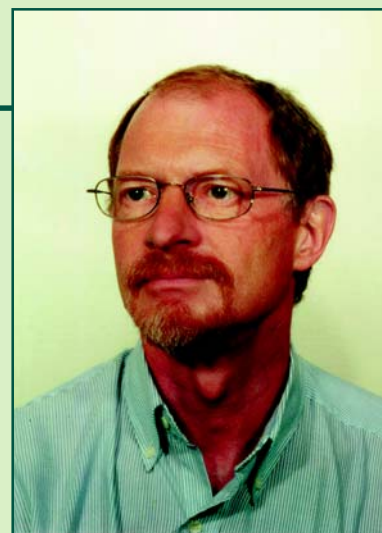
forsøg kørende, der skal vise om enzymet og dets urgamle mekanisme findes hos andre arter end insekterne.

- Lige nu har vi fokus rettet mod havets fauna, foreløbig i et forsøg med rejer. Men vi ved ikke, hvad rejer kan tilbyde os. Pattedyrene, ved vi, har fire forskellige enzymer. Hver af disse kan katalysere aktiveringen af en eller to DNA-byggestene (deoxynucleosider), men hos pattedyr er det nødvendigt med alle fire enzymer for at dække samme område, som vores enzym kan klare alene. Slutresultatet er altså det samme, men i modsætning til bananfluens skal vi bruge flere og helt andre enzymer, siger Wolfgang.

Leif Søndergaard er på KU i gang med at studere, hvordan bananfluegenet for enzymet reguleres, og hvor vigtigt det er for fluens udvikling.

De fire forskere fra de tre universiteter arbejder tæt sammen på kryds og tværs i disse projekter, og netop dette samarbejde har været af stor betydning for projektets hidtidige succes.

Leif Søndergaard,
Københavns Universitet.
Foto: Genetisk Afdeling/KU.



Bananfluens ultrahurtige enzym

DNA opbygges af fire deoxynucleosidtriphosphater, der hver består af en base (A, T, C eller G), der er hængt sammen med en sukker (deoxyribose), hvorpå der sidder tre fosfatgrupper. Base og deoxyribose kaldes deoxyribonucleosid.

En organisme kan lave disse byggestene på to måder. Dels ud fra en meget energikrævende proces, hvor små molekyler som vand, kuldioxid og ammoniak bygges sammen i mange komplicerede trin.

Dels ud fra den energibesparende genbrugsvej, hvor deoxynucleosider, der stammer fra føden eller fra døde cellers DNA, påsættes de tre fosfatgrupper og så er de parat til indbygning i DNA.

Påsætningen af den første fosfatgruppe katalyseres af deoxynucleosid kinaser, den gruppe af enzymer vores enzym tilhører.

I pattedyr er der fire sådanne kinaser, der har hver deres speciale, dvs. de kan kun katalysere omsætningen af et begrænset antal deoxynucleosider. Insekter har derimod kun én deoxynucleosid kinase, dNK - multisubstrat deoxynucleosid kinase (EC 2.7.1.145), men den kinase kan til gengæld katalysere omsætningen af mange flere deoxynucleosider, og med større effektivitet end enzymer fra pattedyr.

Bananfluens enzym og genterapi

Udnyttelsen af deoxynucleosid kinaser i bekæmpelse af sygdomme som HIV, cancer og herpes er meget udbredt.

F.eks. er et af de mest anvendte stoffer i HIV behandling et deoxynucleosidlignende stof - Retrovir - der for at udøve sin hæmmende virkning på væksten af HIV-virus skal aktiveres af en af cellens deoxynucleosid kinaser. Herpesvirus har sin egen kinase, HSV-TK, og den kan aktivere et andet deoxynucleosidlignende stof, Zovir.

Dette stof kan ikke aktiveres af vores enzymer, og derfor er det kun de celler, der har herpesvirus i sig, der aktiverer Zovir og derfor ødelægges. Dette princip bruges til genterapi, hvor der i de syge celler indføres et gen, der producerer det enzym, der kan aktivere et stof, som cellens egne enzymer ikke kan aktivere. Derfor dræbes kun de celler, der har fået det fremmede gen. De raske celler lever videre, og der bliver ingen eller få bivirkninger. Endvidere kan deoxyribonucleosid kinaser bruges som selvmordsgener i kultiverede menneskecellelinjer, der kan transplanteres til patienter.

Publikationer:

Munch-Petersen, B., J. Piskur and L. Søndergaard (1998) J. Biol. Chem. 273: 3926.
Munch-Petersen, B., W. Knecht, C. Lenz, L. Søndergaard and J. Piskur (2000) J. Biol. Chem. 275: 6673.
Knecht, W., B. Munch-Petersen and J. Piskur (2000) J. Mol. Biol. 301: 827.
Johansson, K., S. Ramaswamy, C. Ljungcrantz, W. Knecht, J. Piskur, B. Munch-Petersen, S. Eriksson and H. Eklund (2001) Nature Structural Biology 8:616.

For mere info, se web-site:

www.jubilekinase.com

(Firmaets navn er baseret på de to første bogstaver i Jure, Birgitte og LEif og betegnelsen på deres opdagelse af bananflue deoxyribonucleoside kinase).

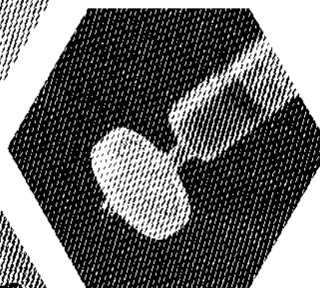
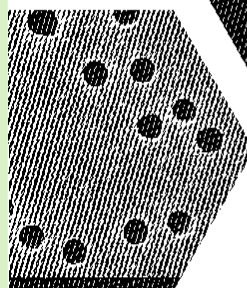
FRISENETTE ApS

Grundlagt 1931 · Kemisk-tekniske filtre · Tekniske papirer

Kæmpeudvalg af membran- og sprøjtefiltre



Hos Frisenette kan du vælge mellem 8 størrelser sprøjtefiltre med en halv snes forskellige membrantyper.



Spørg os også om:

Microplates
Kapselfiltre
Centrifugefiltre
Glasfiberfiltre
Papirfiltre
Blottingmembraner
Filterholdere
Bordpapir
Testpapirer

NYT!

Nu forhandler vi også Nuclepore membranfiltre



Frisenette ApS
Postboks 120
Godthåbsvej 4
8400 Ebeltøft
Tlf.: 86 34 22 44
Fax: 86 34 57 44
www.frisenette.dk