



Fotos: My Thi Thao Huynh

Giftsnegle som medicinskabe

Forfatterne



Helena Safavi-Hemami er post.doc
University of Utah, USA
og Biologisk Institut,
Københavns Universitet,
safavihelena@gmail.com



Katrine Mølgaard Andersen er freelance videnskabsjournalist og ph.d.
i biokemi,
kakasoos@hotmail.com



Lars Ellgaard er lektor
Biologisk Institut, Københavns Universitet,
lellgaard@bio.ku.dk

Dødbringende giftstoffer fra de smukke keglesnegle har et stort potentiale for udvikling af lægemidler, men også som redskaber til biologisk forskning. Det er dog en stor udfordring at producere disse giftstoffer syntetisk – en udfordring forskerne arbejder på at overkomme.

De marine keglesnegle lever i tropiske og subtropiske områder, og deres skaller har længe været værdsat for deres smukke facon og dekorative mønstre. Men skallet kan bedrage: Folk, der har samlet levende keglesnegle op fra stranden, har hurtigt opdaget, at det er en utrolig ubehagelig oplevelse at blive stukket af dem. Sådant et stik kan medføre hævelse, opkastning, lammelse og i alvorlige tilfælde endda døden. Disse effekter opstår, fordi keglesnegle (*genus Conus*) producerer en potent gift, som de bruger til at fange deres bytte og forsvare sig med.

Keglesnegle inddeles i 3 klasser afhængigt af deres præference for byttedyr: orme-, snegle- og fiskejægere. Ormejægere kan være meget specialiserede i den type byttedyr, de spiser. Der findes fx nogle keglesnegle, der udelukkende lever af *Hermodice carunculata*, en havbørsteorm, der er dækket af børstehår indeholdende en potent nervegift. Sneglejægere kan leve af porcelænssnegle, konkylier eller endda andre keglesnegle. Den bedst undersøgte af

snegleklasserne er fiskejægerne, som også er dem, der er ansvarlige for de omkring 35 kendte menneskelige dødsfald. Størstedelen af disse er forårsaget af *Conus geographus*, der har øgenavnet "cigarettsneglen", fordi den person, der stikkes, knap nok har tid til at ryge en cigaret, før døden indtræffer.

Keglesneglenes gift: Conotoksiner

Keglesnegle fremstiller deres gift i en lang rørformet giftkirtel, som er forbundet til en harpunlignende hul tand, en såkaldt radula. Når sneglene opdager et bytte, fremstrækker de et udkrængeligt svælg, hvorigennem de hurtigt kan affyre radula og derigennem injicere giften i byttet.

Giften fra en enkelt keglesnegl kan indeholde helt op til 200 bioaktive kemiske forbindelser. Disse molekyler (kaldet conotoksiner) er små peptider ("mini-proteiner"), der som regel består af 10-35 aminosyrerester. Conotoksiner er væsentligt mindre end de aktive komponenter, der findes i andre dyregifte, herunder skorpioners, slangers og edderkop-

← Sneglehuse fra fiskejagende keglesnegle. Fra venstre mod højre: *Conus fischoderi*, *Conus barthelemyi*, *Conus floccatus*, *Conus fulmen*, *Conus achatinus* og *Conus purpurascens*.

Sekvens af billeder, der viser hvordan *Conus consors* harpunerer og spiser en fisk. Øverst: Sneglen detekterer sit bytte med øjnene og ånderøret. Derefter strækker den et udkrængeligt svælg, en muskulær forlængelse af sneglens mund, ud indtil den rører ved fisken.

Midt: Ved hjælp af en hydraulisk mekanisme kombineret med en kraftfuld muskelsammentrækning affyres harpunen (radula) ud gennem det udkrængelige svælg med en sådan kraft, at den gennemtrænger fiskens skel. Giften injiceres derefter hurtigt gennem radula, som er hul. Ét sæt af gifte er målrettet fiskens nervesystem og medfører en effekt, der kan sammenlignes med et elektrochok, hvorved fisken bliver immobiliseret.

Næst nederst: Som en fiskers harpun forbliver radula forbundet med det udkrængelige svælg og bruges til at trække fisken ind i sneglens store mund. Et andet giftsæt lammer fisken, hvilket gør det lettere for sneglen at fordøje sit bytte, en proces der kan tage adskillige timer.

Se også videoer på: <http://aktuelnaturvidenskab.dk/nyestenumre/2-2014/>

Nederst: Her ses en anden *Conus* i færd med at spise en fisk. Tragten / munden er meget synlig her.

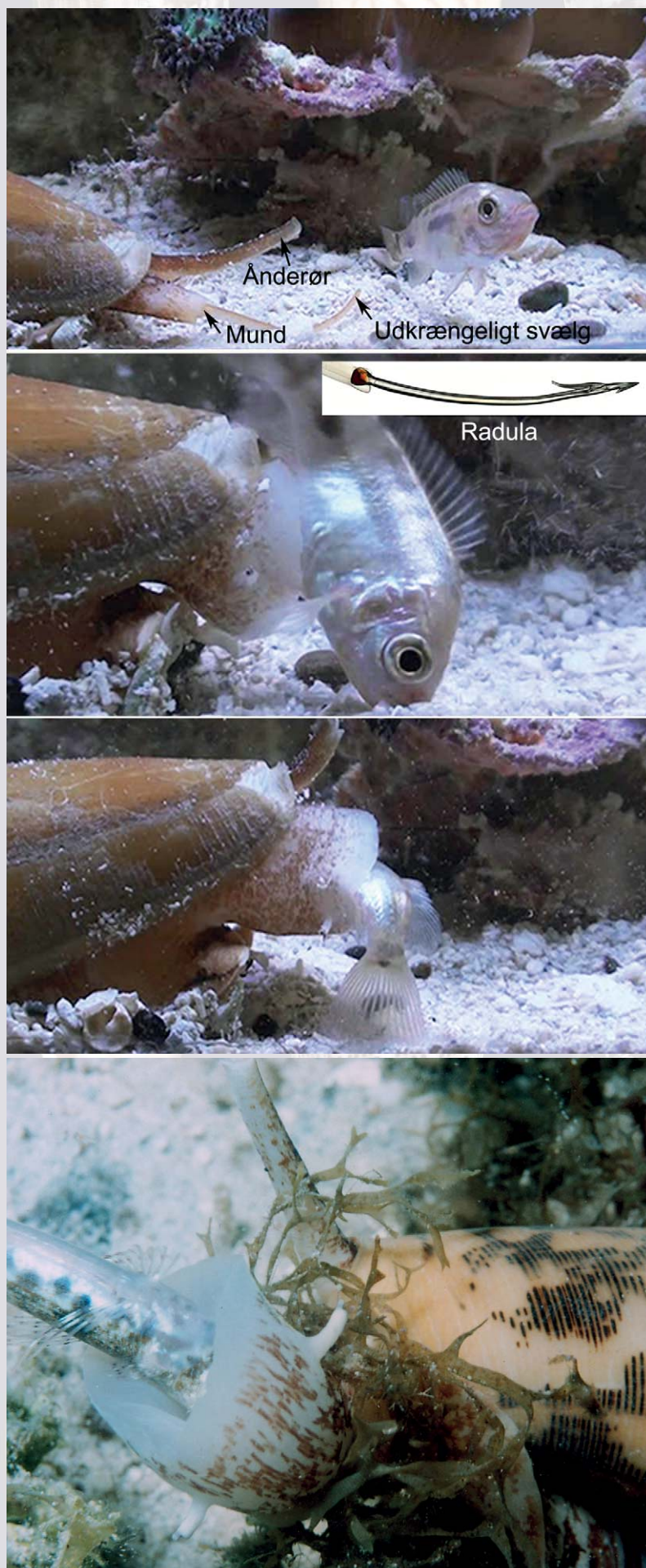
Foto: Wikipedia

pers gifte. En interessant ting ved conotoksiner er, at de i høj grad er kemisk modificerede. Den mest almindelige modifikation er dannelsen af en binding mellem to cysteinrester. Disse disulfidbindinger, også kaldet svovlbroer, har stor betydning for conotoksinernes tredimensionelle struktur og dermed deres biologiske aktivitet.

Et andet (usædvanligt) særpræg er den store mængde giftvarianter, der findes i keglesnegle: Hver af de 500-700 anslåede arter laver deres egen cocktail af omkring 200 bioaktive peptider, som er direkte rettet mod byttets nervesystem.

Giftvarianter i massevis

Conotoksinerne er inddelt i en række overordnede familier (superfamilier), hver indeholdende forskellige underfamilier grupperet ud fra peptidsekvens og bioaktivitet. For eksempel er underfamilierne af δ - og μ O-conotoksiner målrettet proteinkanaler for transport af natrium-ioner over biologiske membraner og tilhører O superfamilien. Varianterne er så



Samspelet mellem mennesker og keglesnegle



↑ Smykker lavet af skaller fra keglesnegle. (A) *Conus* halskæde fra Bontoc-folket i Philippinerne. (B) Halskæde med *Conus litteratus* skal. Udskaarne skiver af denne skal bliver brugt som betalingsmiddel af visse stammer i Ny Guinea. (C) Udskaarne skaller fra keglesnegle sat på en lædersnor af berbere bosat i Atlasbjergene. (D) Armbånd lavet af *Conus litteratus* og *Conus leopardus* skaller udgravet fra filippinske grave stammende fra det 10.-16. århundrede.

Udskaarne skaller fra keglesnegle brugt som betalingsmiddel i Mauritanien i det 14.-17. århundrede, sandsynligvis udskaaret fra skallen af *Conus pulcher byssinus* (vist til højre). →

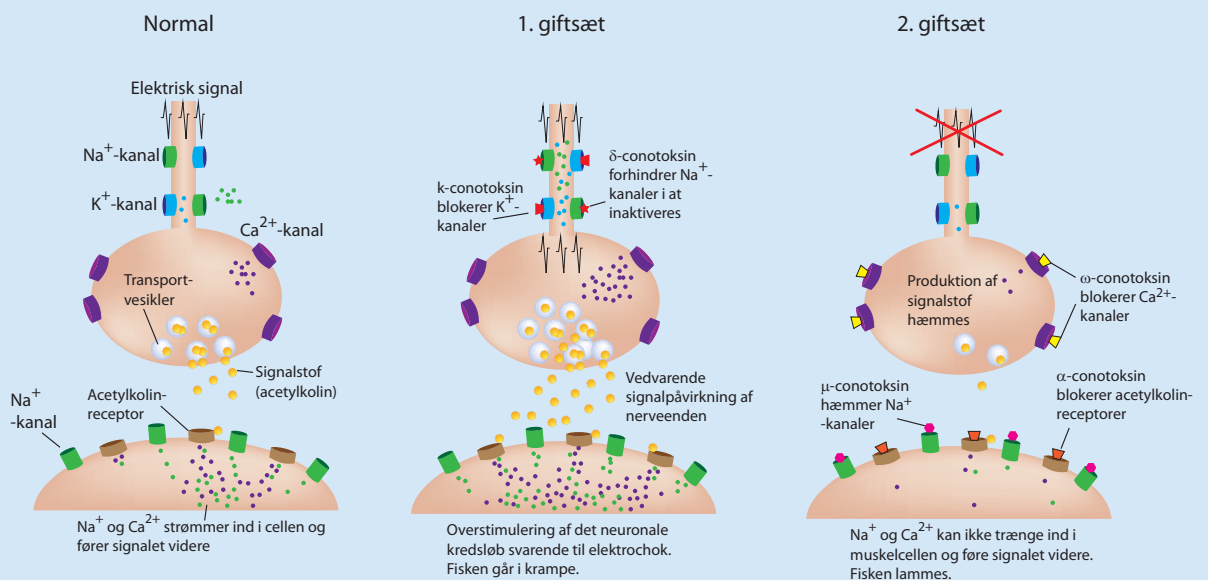
Fotos: My Thi Thao Huynh

Man antager, at mennesker har brugt keglesneglenes skaller til smykker i helt op mod 100.000 år. Nu om dage bruges skallerne i halssmykker, armbånd, og dekorative ornamenter forskellige steder i verden, fx af stammekulturer i Filippinerne bjergregioner samt flere steder i Afrika. Udskaarne skaller fra keglesnegle bruges desuden som betalingsmiddel af visse stammer i Ny Guinea og blev brugt som sådan i Mauritanien indtil det 17. århundrede.

På trods af deres giftighed spises visse keglesnegle også. I Filippinerne kan man købe keglesnegle på markeder i kystlandsbyer, hvor de tilberedes i kokosmælk og med krydderier til en kraftig suppe. Med opdagelsen af de fascinerende egenskaber af sneglenes gift i 1960'erne blev også forskningsverdenen opmærksomme på keglesneglene.



Conotoksiner virkemåde



Figuren til venstre viser to nerveceller under normale betingelser. Et elektrisk signal ankommer til den øverste nervecelle, hvilket påvirker Na^+ - og K^+ -kanaler på cellens overflade og ændrer deres transport af disse ioner. Samtidig inaktiveres Na^+ -kanalerne lynhurtigt. I nerveenden strømmer Ca^{2+} -ioner ind, hvilket udløser frigivelsen af transportvesikler med signalstoffer (fx acetylcholin) til nabo-cellen. Når acetylcholin binder sig til dets receptor på nabo-cellen, strømmer positivt

ladede ioner (Na^+ , Ca^{2+}) ind i cellen, hvorved signalet videreføres. Det ene giftset, der injicerer af keglesnegle (figuren i midten), indeholder conotoksiner, der påvirker Na^+ - og K^+ -kanalerne. Effekten er en overstimulering af det neuronale kredsløb. Det andet giftset indeholder peptider, som påvirker de neuromuskulære endeplader (kontaktfladerne mellem nerver og muskler). Effekten er her, at fisken lammes.

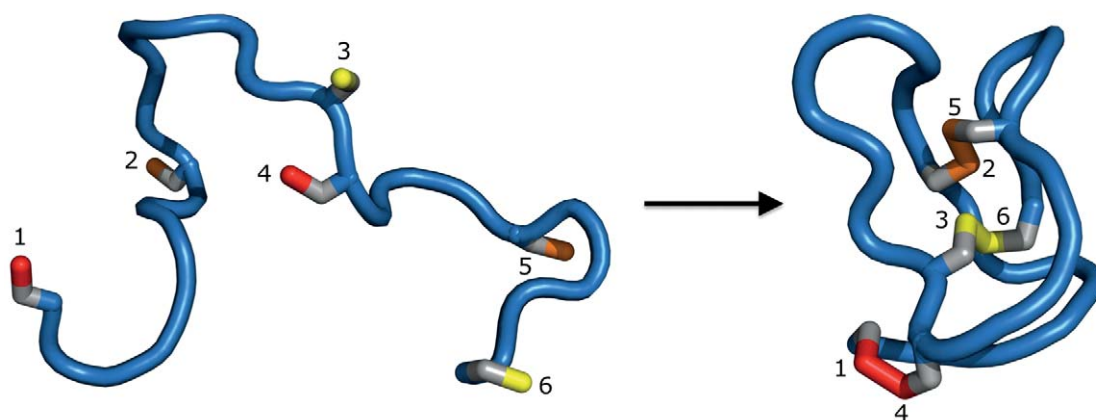


Illustration af foldningsprocessen for ω -MVIA (Prialt), et conotoksin fra *Conus magus* udviklet som et medikament til smertebehandling. Til venstre ses én af mange mulige konformationer af den udfoldede peptidkæde med de seks cysteinrester nummereret. Til højre ses den korrekte rumlige struktur, hvor peptidet har dannet de tre disulfidbindinger, der forbinder cysteinresterne 1 og 4 (rød), 2 og 5 (orange), og 3 og 6 (gul).

talrige, at der sidste år (2013) ikke var flere bogstaver til rådighed i det latinske alfabet til at navngive nye superfamilier. Med de fremskridt, der gøres indenfor proteinsekventering, identificeres hele tiden nye conotoksin-superfamilier, og uden yderligere bogstaver til rådighed vil man snart blive nødt til at finde på et nyt navngivningssystem.

En tredje unik egenskab ved keglesneglenes gift er, at conotoksinerne binder yderst specifikt til receptorer og ionkanaler i byttets nervesystem. Fiskejagende keglesnegle injicerer fx to sæt gifte, som er meget specifikke for receptorer, der sidder i nerveender – en mekanisme, der oprindeligt blev beskrevet af grundlæggeren af hele forskningsfeltet omhandlende conotoksiner, Baldomero Olivera (se boks). De to giftsæt injiceres enten samtidig eller umiddelbart efter hinanden og udløser forskellige effekter.

En farlig cocktail

Under normale omstændigheder bliver signaler overført fra enden af én nervecelle til en anden eller til en muskelcelle. Det ene giftsæt, der injiceres, indeholder δ - og κ -conotoksiner, der hver især specifikt påvirker forskellige ion-kanaler for transport af Na^+ - og K^+ -ioner. Dette medfører, at de påvirkede nerveceller kommer ud af kontrol og bliver hyperaktive. Det overstimulerede nervesystem svarer til at give fisken elektrisk stød, så den går i kramper og bliver ude af stand til at flygte.

Det andet giftsæt indeholder peptider, der virker på kontaktfladerne mellem nerve- og muskelceller (de neuromuskulære endoplader). Her vil ω -conotoksiner blokere Ca^{2+} -kanaler og reducere mængden af signalstof (neurotransmitter), der frigives fra nervecellen, μ -conotoksiner vil hæmme Na^+ -kanaler og α -conotoksiner vil blokere receptorer på muskelcellen for neurotransmitteren acetylkolin. Effekten af de to sidstnævnte conotoksiner

vil være, at positivt ladede ioner ikke kan trænge ind i muskelcellen, som herved ikke kan trække sig sammen. Fisken bliver altså slap og kan fordøjes hel. Ved at anvende denne kombination af to forskellige giftsæt indeholdende en bred vifte af conotoksiner kan keglesnegle effektivt sætte et bytte ud af spillet, som ellers ville være for hurtigt og for stærkt for en snegl.

Conotoksiner som lægemidler og laboratorieredskaber

Conotoksiner har et stort terapeutisk potentiale. Et ω -conotoksin fra *Conus magus* er blevet udviklet til et lægemiddel til smertebehandling, da det blokerer Ca^{2+} -kanaler og "slukker" for smerte-signalvejene i rygmarven. Lægemidlet kaldes Prialt (for **P**rimært **A**lternativ til morfin) og anvendes af mennesker, der lider af kroniske smerter, som ikke kan behandles med morfin.

Det tog mere end 15 år fra en ung bachelorstuderende i Baldomera Oliveras laboratorium opdagede dette conotoksin til dets endelige godkendelse som kommercielt lægemiddel.

På grund af deres høje specificitet er en række andre conotoksiner under udvikling som lægemidler til behandling af forskellige neurologiske sygdomme, herunder kronisk smerte og epilepsi.

Et andet område, hvor conotoksiner kan anvendes, er indenfor den neurovidenskabelige forskning, hvor de kan udnyttes som et laboratorieredskab. For eksempel kan μ -conotoksiner skelne mellem adskillige af de 8 forskellige subtyper af humane spændingsafhængige Na^+ -kanaler. Derfor er de i vid udstrækning blevet anvendt til at kortlægge fordelingen af disse kanalers subtyper i forskellige celler og vævstyper samt til at belyse struktur-funktions-aspekter af disse kanaler.



Et af omkring 100 frimærker, der viser skallen fra en keglesnegl. Dette frimærke er fra Vietnam og viser en "soldatersnegl", *Conus miles*.

Conotoksin-pioneren



Foto: Tom Vickers

Professor Baldomero ("Toto") Olivera er grundlæggeren af conotoksin forskningsområdet. Han blev født i Filippinerne i 1941 og opnåede sin ph.d.-grad fra Californian Institute of Technology i USA. Hans første store videnskabelige gennembrud var opdagelsen og karakteriseringen af det bakterielle enzym DNA-ligase, en opdagelse der muliggjorde rekombinant

DNA-teknologi. Da han i 1960'erne vendte tilbage til Filippinerne manglede hans laboratorium både udstyr og ressourcer til at videreføre hans molekylærbiologiske forskning. I stedet iværksatte han et projekt, der var affødt af hans interesse for keglesneglene, hvis skaller han som dreng havde indsamlet. Han satte sig for at identificere de kemiske forbindelser, der resulterede i dødsfald, når mennesker blev stukket af giftige marine keglesnegle. Dette arbejde grundlagde forskningen i conotoksiner og førte siden til opdagelsen af det peptid, der nu bruges som et lægemiddel i behandlingen af stærke kroniske smerter (Prialt). Olivera arbejder nu som professor ved University of Utah, USA, hvor han fortsætter sit arbejde med conotoksiner.

Foldningens kunst

På grund af deres store potentiale vil forskere gerne kunne fremstille rene conotoksiner i (meget) større mængder, end det er muligt at isolere fra sneglenes gift. For tiden foregår denne fremstilling ved kemisk peptidsyntese, hvor de enkelte aminosyrer reagerer med hinanden i et reagensglas for at danne peptider med den rigtige rækkefølge af aminosyrer svarende til specifikke conotoksiner. Keglesneglenes celler har specialiseret sig i fremstillingen af disse små modificerede peptider, og det er en meget stor udfordring for proteinkemikerne at gøre dem kunsten efter.

Det er specielt foldningsprocessen, som giver problemer – altså den proces, hvorved kæden af aminosyrer (peptidet) skal danne den korrekte rumlige struktur. Det er nemlig kun denne struktur, der er biologisk aktiv og i stand til at binde specifikke kanaler eller receptorer. Foldningsprocessen udgør ofte et problem for proteiner/peptider, og specielt for dem, der indeholder disulfidbindinger, går det ofte galt (man siger, at proteinet misfolder). For kemisk fremstillede peptider har dannelsen af de korrekte disulfidbindinger mellem cysteinrester vist sig at være en vanskelig opgave, der endnu ikke mestres til fulde. For eksempel indeholder Prialt 6 cysteinrester, som er forbundet med 3 disulfidbindinger. Med 6 cysteinrester i peptidet opstår der 15 muligheder for disulfiddannelse, som alle vil resultere i forskellige peptidstrukturer, hvoraf kun én vil være biologisk aktiv.

Noget tilsvarende gælder stort set alle conotoksiner undersøgt til dato, og situationen bliver endnu mere kompliceret, når antallet af cysteinrester øges (fx kan et peptid med 4 disulfidbindinger teoretisk set forbinde de 8 cysteinrester på 105 forskellige måder). Det betyder, at adskillige conotoksiner

med interessante biologiske aktiviteter aldrig er blevet udviklet til farmakologiske redskaber eller lægemiddelkandidater, fordi deres kemiske syntese simpelthen er for svær.

Sneglenes egne enzymer hjælper på vej

I vores laboratorium vil vi overvinde denne forhindring og i sidste instans udvikle nye fremstillingsmetoder. Overordnet fokuserer vi i vores forskning på at opnå en bedre forståelse af de mekanismer, keglesneglene har udviklet gennem de sidste 50 millioner år for dannelsen af korrekte disulfidbindinger. Specifikt vil vi bruge sneglenes egne enzymer (altså proteiner, der øger hastigheden af kemiske reaktioner) til at fremstille interessante conotoksiner.

I sneglenes celler hjælper enzymer med dannelsen af de korrekte disulfidbindinger i conotoksinerne, hvorved processen gøres særdeles effektiv. Vi har for nylig identificeret adskillige enzymer, som vi mener er af afgørende betydning for dannelsen af de rigtige disulfidbindinger under foldningsprocessen, som den foregår i cellerne i keglesneglens giftkirtel.

I ét sæt eksperimenter vil vi nu tilsætte forskellige kombinationer af disse enzymer til de syntetiserede conotoksiner for at øge effektiviteten af deres foldningsproces. Desuden vil vi lave udvalgte conotoksiner i menneskeceller dyrket i kultur i tilstedeværelsen af snegleenzymmerne – igen med det formål at producere conotoksiner, som hidtil har været umulige at fremstille.

Dette arbejde vil forhåbentlig muliggøre produktion af disse yderst strukturerede molekyler og derved bidrage til fremstillingen af nye conotoksiner, der kan anvendes som farmakologiske redskaber og/eller lægemidler i fremtiden. ■

Videre læsning:

Olivera BM (1997) Conus Venom Peptides, Receptor and Ion Channel Targets, and Drug Design: 50 Million Years of Neuropharmacology. Molecular Biology of the Cell 8:2101-2109.

Terlau H, Olivera BM (2004) Conus Venoms: A Rich Source of Novel Ion Channel-Targeted Peptides. Physiology Reviews 84:41-68.

Halai R, Craik DJ (2009) Conotoxins: natural product drug leads. Natural Product Report 26:526-536.

Links til websites og forelæsninger for gymnasie-elever:

Nyttige websites om keglesnegle:
www.theconesnail.com/explore-cone-snails/venom
<http://grimwade.biochem.unimelb.edu.au/cone/about.html>

Online forelæsninger med Toto Olivera:
<http://media.hhmi.org/hl/09Lect1.html>
<http://media.hhmi.org/hl/09Lect3.html>