



Giftige dyr

– ven eller fjende?

Mange dyr bruger gift som forsvar eller til at nedlægge bytte. Ved millioner af års evolution er disse gifte udviklet til at virke mest muligt effektivt, og derfor er de et oplagt sted at lede efter stoffer, der kan blive til nye lægemidler.

Forfatterne



Thiago Verano-Braga er post.doc.
tvbraga@bmb.sdu.dk



Peter Roepstorff er professor
roe@bmb.sdu.dk

Begge ved Institut for
Biokemi og Molekylær
Biologi
Syddansk Universitet

Brasilien anses for at være det land i verden, der huser den største bidiversitet – ikke mindst på grund af Amazon-regnskoven, der dækker omkring 50 % af Brasiliens samlede areal.

I Brasilien findes der tusinder af giftige dyr som klapperslanger, skorpioner, edderkopper, frøer. Historisk er disse dyr blevet associeret med mytologiske figurer, der udgjorde en trussel for mennesket. Denne tro er da også delvist velbegrundet, da sådanne dyr producerer kraftfulde toksiner, som bruges til forsvar eller til at nedlægge bytte. Vi kan dog også lære en masse ved at studere toksinerne hos disse dyr, da de kan repræsentere potentielle nye lægemidler. Toksinerne hos giftige dyr er udviklet ved millioner af års evolution, så hvorfor skulle vi forsøge at opfinde nye lægemidler fra bunden af – sandsynligvis med en ekstremt lav succesrate – hvis vi i stedet kan lære af, hvad naturen har udviklet?

På Syddansk Universitet har vi gennem nogle år haft samarbejde med forskere ved brasilianske universiteter om at studere toksiner fra brasilianske dyr, der kan være potentielle kandidater til lægemidler. At der er perspektiver i at studere toksiner fra giftige

dyr, vil vi give nogle eksempler på i det følgende.

Antibiotika fra frøer og edderkopper

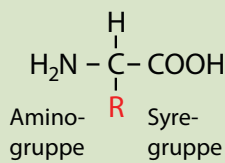
Over hele verden er resistens hos bakterier overfor antibiotika et voksende problem. Det har stimuleret jagten på nye stoffer, der kan bekæmpe mikroorganismer – og her kan frøer hjælpe.

Mange frøer lever i varme, fugtige miljøer, som også er perfekte omgivelser for bakterie- og svampvækst. Men frøernes hud er ikke modtagelige for bakterielle infektioner, fordi frøerne udskiller peptider på deres hud, som fungerer som kraftfulde antibiotika. Forskere har interesseret sig en del for denne type peptider, som også er fundet i gifte fra edderkopper og skorpioner. Spektret af mikroorganismer, som disse peptider virker på, er meget stort og dækker bakterier, svampe og vira.

Peptiderne er meget variable og kan bestå af alt fra 7 til 55 aminosyrerester. De er oftest positivt ladede ved pH-værdier, der findes i levende organismer, hvilket har betydning for deres funktion, fordi det får dem til at bindes til de negativt ladede fosfolipider i cellemembranen.

Proteiner og peptider

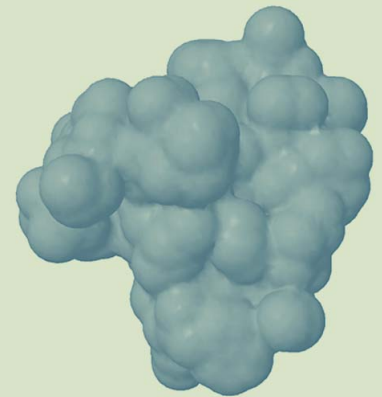
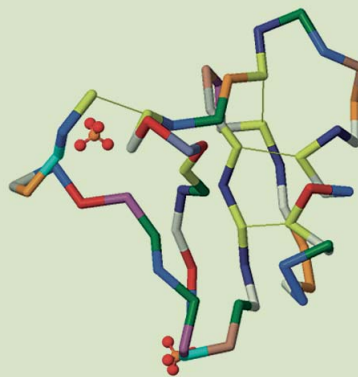
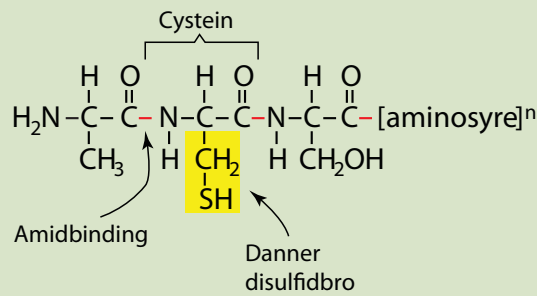
Aminosyre



Proteiner er opbygget som lange kæder af aminosyrer ved dannelse af en amidbinding (også kaldet peptidbinding) mellem en syregruppe og en aminogruppe på aminosyrerne. De 20 forskellige aminosyrer, som indgår i proteiner, adskiller sig ved den kemiske sammensætning af deres sidekæder (R). Proteinernes aminosyre-sekvens kodes fra den genomiske information. De kan være opbygget af 50 til mange hundrede aminosyrer. Proteiner, der består af mindre end 50 aminosyrer, kaldes peptider. Disse kan enten være opstået ved spaltning af større proteiner eller være direkte kodet fra genomet.

Figuren th viser et eksempel på strukturen af et toksin fra den brasilianske gule skorpien *Tityus serrulatus*. Den kompakte rumlige struktur af dette toksin opretholdes af disulfidbroer mellem sidekæderne af aminosyren cystein.

Struktur af protein



Typisk virker peptiderne gennem selektiv nedbrydning af cellemembraner eller ved direkte at gribe ind i signaleringsmekanismerne i cellerne – fx ved at påvirke cellens DNA-maskineri og dermed produktionen af vigtige proteiner eller ved at aktivere eller hæmme enzymer. I alle tilfælde leder det til, at cellen dør.

Medicin mod forhøjet blodtryk

Hjerte-kar-sygdomme er den hyppigste årsag til dødsfald i vores del af verden. Forhøjet blodtryk er en af synderne i den forbindelse, da det øger risikoen for hjerteanfald. Der findes mange forskellige lægemidler mod forhøjet blodtryk. I de fleste tilfælde må patienterne indtage en kombination af to eller flere præparater for at kontrollere blodtrykket og for at undgå for kraftige bivirkninger. Der er stor interesse for at udvikle nye, moderne lægemidler til at behandle forhøjet blodtryk, og gift fra slanger og skorpioner kan muligvis lede os til netop dette.

I forbindelse med slangebid og skorpionestik får nogle patienter lavt blodtryk, og man kender da også et antal toksiner, som påvirker hjerte-karsy-

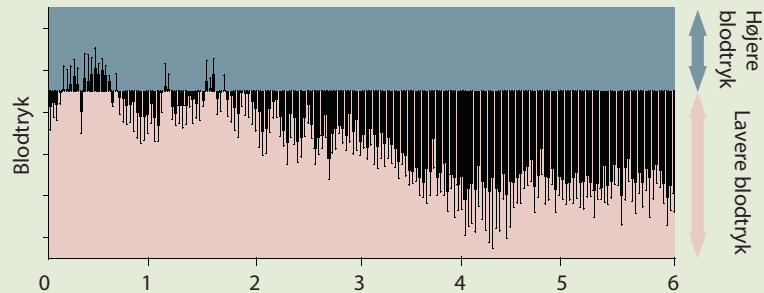
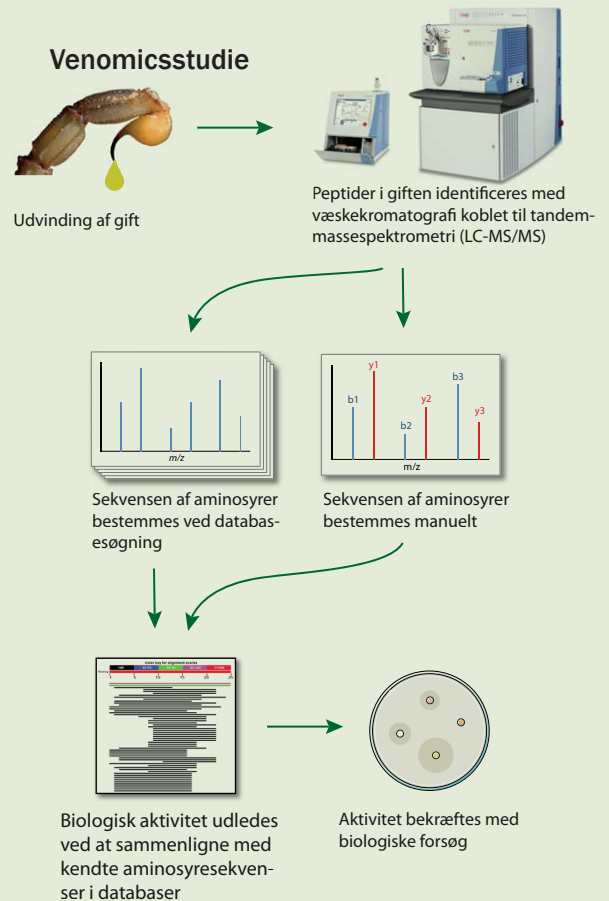


Brasilien er med sine 8,515,767 km² (ca. 200 gange større end Danmark) det største land i Sydamerika og dækker flere klimatiske zoner og biotoper rækkende fra tropisk regnskov til halvørken. Det betyder, at der i Brasilien er en meget stor biodiversitet – også af giftige dyr, som bl.a. tæller mange arter af edderkopper, skorpioner, slanger og frøer.



Det første kommercielle lægemiddel mod for lavt blodtryk blev udviklet fra et toksin fra den brasilianske klapperslange *Bothrops jararaca*.

→ Figuren viser de forskellige trin i et venomicsstudie, som anvendes til "struktur-til-funktion-søgning" efter medicinsk relevante giftkomponenter.



Eksempel på et forsøg til at påvise, at en komponent af giften fra en skorpion kan reducere blodtrykket på forsøgsrotte-stamme med højt blodtryk. Rotten gives skorpionpeptidet gennem munden ved hjælp af en pipette. Ca. 2 timer efter at rotten har indtaget peptidet, falder blodtrykket.

stemet og reducerer blodtrykket. Interessant nok var det første kommercielle lægemiddel på markedet beregnet mod lavt blodtryk (udviklet tidligt i 1970'erne) lavet på baggrund af et toksin fra en brasiliansk klapperslange (*Bothrops jararaca*). I dag er hundreder af toksiner med en tilsvarende aktivitet blevet isoleret og identificeret fra slangegift.

Denne klasse af toksiner består af små peptider (normalt mindre end 10 aminosyrerester), og de virker blodtryksænkende ved at stimulere aktiviteten af hormonet bradykinin. Sammen med hormonet angiotensin II regulerer bradykinin blodtrykket: Angiotensin II øger blodtrykket, mens bradykinin modvirker denne effekt. En nøglespiller i dette system er et enzym kaldet ACE (som står for Angiotensin Converting Enzyme), fordi det producerer angiotensin II og nedbryder bradykinin. De nævnte

toksiner sænker blodtrykket ved at blokere for enzymet ACE og dermed forskubbe balancen mellem de to hormoner over mod bradykinin.

En klasse af giftstoffer kaldet "hypotensiner" (lavt blodtryk kaldes også "hypotension") blev for nylig opdaget i den brasilianske gule skorpion *Tityus serrulatus*. Der er tale om peptider af længder varierende mellem 7 og 25 aminosyrerester med en stærk og langvarende aktivitet mod højt blodtryk. Forsøg har vist, at laboratorierotter med spontant højt blodtryk får sænket deres blodtryk i mere end 6 timer ved at injektion af hypotensiner. Der er også set en lignende effekt, når man indgiver hypotensin gennem munden, hvilket viser at det måske kan optages via tarmsystemet. Det gør denne klasse af giftstoffer særlig interessante som kandidater til fremtidige lægemidler mod forhøjet blodtryk.

Foto: Centro de Informação Toxicológica



Den brasilianske gule skorpion *Tityus serrulatus*, hvis gift bl.a. indeholder komponenter, der er yderst interessante som muligt lægemiddel mod for højt blodtryk.

I forhold til de klassiske toksiner fra slanger brugt til blodtryks-sænkende lægemidler er hypotensivernes mekanisme en lidt anden. De virker ved at binde sig til og aktivere bradykinin-receptoren (kaldet B2R), som findes i membranen på endothelceller i blodkarrene. Det får blodkarrene til at udvide sig, hvorved blodtrykket falder.

Skorpiongift mod autoimmune sygdomme

Den molekylære palet af skorpiongifte omfatter bl.a. en familie af gifte, der er karakteriseret af peptider, som er meget stabile, fordi de udover selve peptidbindingerne er krydsbundet med adskillige disulfidbroer mellem sidekæderne på den aminosyre, som hedder cystein. Herved bliver de utilgængelige for de enzymer, som ellers ville nedbryde dem. Sådanne stabile peptidstrukturer kaldes knudestrukturer, fordi de fremstår som en stram knude. De er primært aktive på kalium-ionkanaler – dvs. specialiserede proteiner i celledmembranen, der sørger for specifik transport af kalium-ioner gennem membranen.

Blandt de kaliumkanal-blokerende toksiner i giften fra skorpionen *Tityus serrulatus* er det værd at nævne Ts7, som blokerer en bestemt underfamilie af kaliumkanaler kaldet Kv1,3, som sidder i celler som neuroner og muskler, der aktiveres ved ændringer i det elektriske potentiale. Det interessante er, at disse Kv1,3-kanaler har vist sig at være potentielle mål for lægemidler, der er beregnet til at undertrykke immunforsvaret (og dermed til at behandle autoimmune sygdomme). Det ideelle immunundertrykkende stof vil specifikt forhindre dannelsen af de immunceller (T-celler), der er involveret i den autoimmune sygdom uden at påvirke andre immunreaktioner. I flere autoimmune sygdomme som multipel sklerose, leddegigt og type 1 diabetes er det den kroniske aktivering af bestemte typer T-celler (T_{EM}), der er ansvarlig for skaderne



Foto: Wikimedia Commons

Edderkoppen *Phoneutria nigriventer* synes i sig selv næppe særligt seksuelt stimulerende, men den indeholder toksiner, der virker lovende som middel mod potensproblemer.

på vævet. Selektiv blokering af Kv1,3-kanaler vil fuldstændigt og varigt kunne forhindre dannelsen af disse celler. Derfor har specifikke Kv1,3-blokkere som fx Ts7 et stort potentiale for behandling af autoimmune sygdomme.

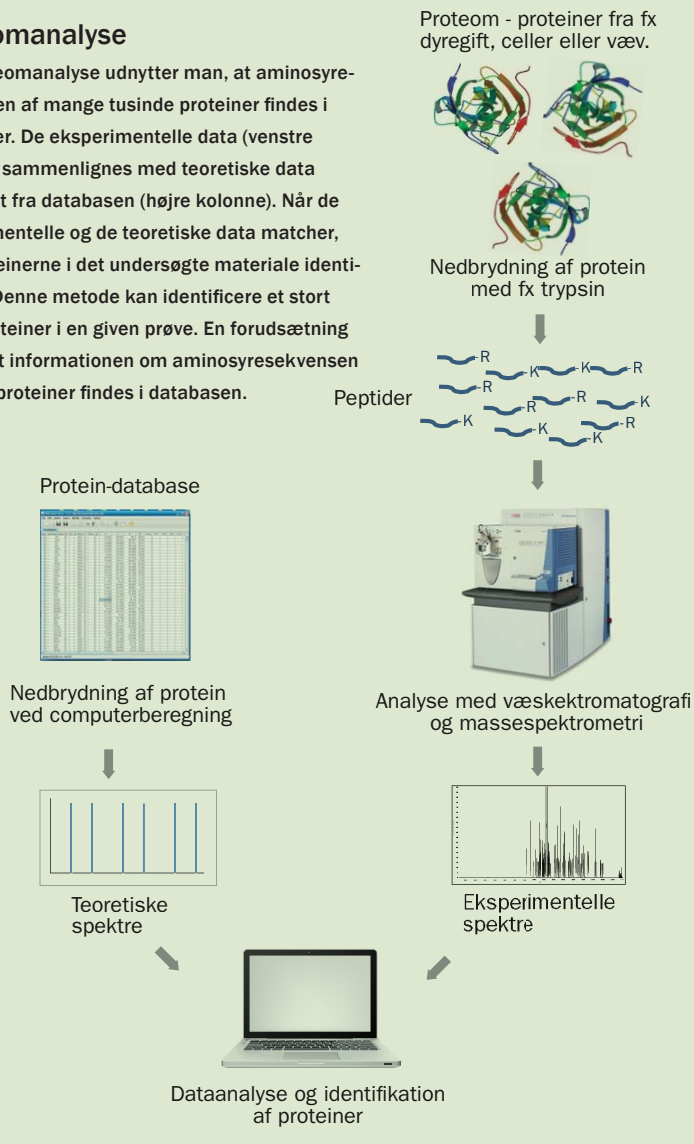
Naturlig viagra fra edderkopper

Den mandlige erektion er en mekanisme, der starter med en lokal frigivelse af signalstoffer (neurotransmittere), som får blodkar og den glatte muskulatur i svulmelegemerne i penis til at afslappes, hvilket øger blodtilstrømningen. Erektionen er som funktion afhængig af en perfekt balance mellem de signalstoffer, der fremmer hhv. afslapning og sammentrækning af blodkar. Hvis denne balance forstyrres medfører det problemer med potensen. Selvom lægemiddelstoffer som sildenafil (Viagra) og andre har revolutioneret behandlingen af potensproblemer, er der en relativt stor gruppe (30-35 %) af patienterne, som ikke reagerer på disse lægemiddelstoffer. Og det understreger behovet for andre behandlingsmuligheder.

Nogle mænd oplever en ufrivillig, smertefuld og langvarig erektion (en tilstand kaldet priapisme) efter at være blevet stukket af skorpioner eller edderkopper. Og det har fået forskernes øjne op for den mulighed, at giftstofferne fra disse dyr kan indeholde interessante molekyler, der kan bruges som modeller for en bedre forståelse af mekanismerne i den mandlige erektion – og som kan være potentielle kandidater for lægemiddelstoffer til behandling af impotens. Det bedste eksempel på sådanne molekyler er stoffet Pn Tx2-6, der er isoleret fra giften fra den brasilianske edderkop *Phoneutria nigriventer*. Dette toksin har vist sig at kunne afhjælpe erektionsproblemer hos diabetiske rotter med for højt blodtryk. Stoffet øger produktionen af nitrogenoxid (NO), som spiller en nøglerolle i for-

Proteomanalyse

Ved proteomanalyse udnyttes man, at aminosyresekvensen af mange tusinde proteiner findes i databaser. De eksperimentelle data (venstre kolonne) sammenlignes med teoretiske data genereret fra databasen (højre kolonne). Når de eksperimentelle og de teoretiske data matcher, kan proteinerne i det undersøgte materiale identificeres. Denne metode kan identificere et stort antal proteiner i en given prøve. En forudsætning er dog, at informationen om aminosyresekvensen af disse proteiner findes i databasen.



peptiderne). Disse sekvenser undersøges så efterfølgende ved at søge i databaser efter tilsvarende sekvenser af toksiner med kendt aktivitet fra andre dyr, og derudfra slutte sig til den mulige biologiske aktivitet af det pågældende stof.

En ret ny metode til at analysere proteiner i en organisme kaldet proteomanalyse (proteomics) er i dag den foretrukne metode blandt forskere til at studere disse gifte (ofte betegnet med venomics, når den anvendes på de komplekse giftblandinger). En alvorlig begrænsning ved denne tilgang er dog, at proteomanalyse er afhængig af, at information om den studerede organismes genomsekvens er tilgængelig i databaser. Desværre er disse databaser endnu ufuldstændige, så den relevante information enten på genom- eller proteinsekvensniveau ikke er tilgængelig for de fleste giftige dyr.

En måde at overkomme denne begrænsning er ved i forbindelse med venomicsstudier at bestemme aminosyresekvensen af alle de observerede peptider enten ved automatisk eller manuel tyding af massespektre opnået ved analyse af giftene. Efterfølgende kan de bestemte aminosyresekvenser sammenlignes med alle gifte, som man kender aktiviteten af. Herved er det muligt at reducere mængden af forsøg og målrette disse bedre. Metoden kaldes databaseafhængig, fordi den kan udføres, uden at peptidets aminosyresekvens findes i databaserne.

Den lange rejse mod nye lægemidler

For nylig har vores forskningsgruppe ved Syddansk Universitet udført et omfattende studie af giften fra den brasilianske skorpion *Tityus serrulatus*. Her kombinerede vi massespektrometrisk sekvensanalyse af de enkelte peptider i et venomics-eksperiment og søgning i databaser for peptider med lignende, men oftest ikke identisk, sekvens. Vi identificerede hundreder af toksiner, hvoraf de fleste indtil da havde været ukendte. Udover toksiner, som repræsenterede allerede kendte biologiske aktiviteter i skorpionens gift som nervegifte, blodtrykssænkende stoffer og antimikrobielle stoffer, fandt vi nye klasser af toksiner som fx vanddrivende toksiner, der repræsenterer et stort bioteknologisk potentiale til fx behandling af forhøjet blodtryk.

Det er dog vigtigt at understrege, at vejen fra opdagelsen af et potentielt interessant toksin til det findes på apotekets hylder som lægemiddel er lang og slidsom. Det kræver flere års undersøgelser at teste stoffets effektivitet og sikkerhed, og fremfor alt kræver det mange penge at betale for disse undersøgelser og patentansøgninger. Derudover har flere lande – bl.a. Brasilien – en skrap lovgivning beregnet på at beskytte biodiversiteten i landet. Det nødvendige bureaukrati er derfor endnu en faktor i processen, der er med til at gøre udvikling af lægemidler baseret på giften fra dyr til en lang og besværlig rejse. ■

Videre læsning

Nunes KP, Torres FS, Borges MH, Matavel A, Pimenta AM, De Lima ME. 2013. New insights on arthropod toxins that potentiate erectile function. *Toxicon*; 69: 152-159.

Rates B, Verano-Braga T, Santos DM, Nunes KP, Pimenta AM, De Lima ME. 2011. From the stretcher to the pharmacy's shelf: drug leads from medically important brazilian venomous arachnid species. *Inflamm Allergy Drug Targets*; 10: 411-419.

Verano-Braga T, Dutra AA, León IR, Melo-Braga MN, Roepstorff P, Pimenta AM, Kjeldsen F. 2013. Moving pieces in a venom puzzle: unveiling post-translationally modified toxins from *Tityus serrulatus*. *J Proteome Res*; 12: 3460-3470.

bindelse med erektion, da det inducerer udvidelse af blodkarrene i svulmelegemerne.

Hvordan kan vi studere molekylerne?

I de klassiske studier af skorpiongifte brugte man en "funktion-til-struktur" tilgang, som tager udgangspunkt i, at man har konstateret en relevant farmakologisk effekt af giften. I denne tilgang adskilles komponenterne i giften ved hjælp af væskechromatografiske metoder, og de opsamlende fraktioner testes for en foruddefineret biologisk aktivitet, fx at det virker som antibiotika. Denne metode kan i sagens natur ikke bruges til at opdage toksiner, der ikke har en åbenbar effekt.

Først for omkring 10 år siden begyndte man at anvende mere følsomme bioinformatiske metoder, som i samspil med spektrometri-baserede teknikker kunne anvendes til at identificere potentielt interessante giftstoffer. Denne moderne "struktur-til-funktion" tilgang er baseret på eksperimentel bestemmelse af toksinernes aminosyresekvenser (dvs. rækkefølgen af aminosyrerester, der opbygger