



Medicijn uit **kikkerslijm**

Verschillende diersoorten produceren opvallend **krachtige peptiden**, die uitgangspunten kunnen zijn voor nieuwe generaties medicijnen en bestrijdingsmiddelen. Het vinden van dergelijke stoffes vraagt veel analytisch vernuft.

ARNO VAN 'T HOOG

“**W**e leven in een evolutieve wereld, waarin natuurlijke selectie de werking van veel stoffen heeft geoptimaliseerd. Als we dat beter begrijpen, kunnen daar mooie resultaten uitkomen”, zegt Jan Tytgat, hoogleraar toxicologie aan de KU Leuven.

Hij is geïnteresseerd in organismen met gifklieren, zoals spinnen, slangen, schorpioenen en zeeanemonen. “Die zijn door de natuur voorzien van genetische wapens om een prooi te bemachtigen of om zich te verdedigen. Veel van die soorten zijn levende fossielen met een verdediging die in de loop van miljoenen jaren steeds unieker en gevaarlijker is geworden.”

ZIEKTESYMPTOMEN

De ernst van ziektesymptomen bij de mens na een beet of steek vormt een van de criteria om een organisme te selecteren voor nader onderzoek, vertelt Tytgat. Hoe ernstiger de effecten, hoe krachtiger de aanwezige stoffen. Gifklieren produceren een mengsel van enzymen en peptiden, met uiteenlopende effecten. Een flink deel zijn peptide-toxines van tien tot vijftig aminozuren. Sommige blokkeren ionkanalen en zorgen voor

pijn, spierverlamming van spieren of een hartstilstand.

Voor Tytgat zijn deze peptiden een instrument om de werking van menselijke ionkanalen te bestuderen. Maar *drug discovery* is minstens zo belangrijk. Wie de werking van een specifiek type ionkanaal kan beïnvloeden, heeft mogelijk een nieuwe pijnstillert, spierverslapper of hartritmemedicijn in handen. Sterker: er zijn al zulke peptiden al op de markt (zie kader).

‘Die organismen zijn voorzien van genetische wapens’

Door toeval stuit men soms echter ook op verrassende ontdekkingen. De groep van Tytgat isoleerde een aantal peptiden uit de tentakels van een tropische zeeanemoon. Een van die peptiden, APETx₃, blijkt in insecten de werking van ionkanalen plat te leggen. Daarmee is het in potentie een zeer effectief insecticide. Tytgats groep isoleerde peptiden met soortgelijke insecticidewerking ook uit de gifklieren van spinnen.

Het vinden van nieuwe peptiden begint uiteraard bij de bron: slangengif, schorpi-

oengif, tentakels van een anemoon, de klieren van een gifslak of slijm van een kikker. De klassieke analysemethode draait om fractioneren, meestal met kolomchromatografie, gekoppeld aan een activiteits-assay (zoals remming van ionkanalen). De meest actieve fracties worden vervolgens net zolang opgezuiverd tot er slechts een peptide in zit. Daarvan kan de activiteit en de aminozuurvolgorde worden bepaald of met NMR de driedimensionale structuur.

PEPTIDOOM

Die aanpak werkt op zich goed, maar levert het risico dat veel interessante peptiden worden gemist, zegt de zoöloog en Delftse hoogleraar analytische biotechnologie Peter Verhaert. Een onderzoeker ‘ziet’ namelijk alleen de peptiden die de activiteits-assay meet. De rest blijft onopgemerkt.

LC gekoppeld aan tandem MS kan in principe alle eiwitten en peptiden in een mengsel in kaart brengen, zonder selectie op activiteit. Peptiden worden echter met de standaard proteomicsaanpak vaak volledig over het hoofd gezien, zegt Verhaert. “Het is namelijk veel ingewikkelder om ze met massaspectrometrie netjes aan te tonen in een complex biologisch monster dat vol met eiwitten zit. Je

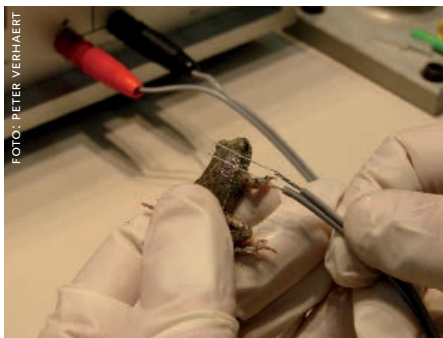
moet dieper graven en je echt specifiek richten het peptidoom.”

Traditioneel streeft proteomics ernaar een eiwit zo eenduidig mogelijk aan te tonen, vertelt Verhaert. De frequentie waarmee een eiwit(stuk) door een massaspectrometer wordt gedetecteerd, is daarbij een maat voor de zekerheid van identificatie. Maar bioactieve peptiden zijn vaak in zeer lage concentraties aanwezig. Ze voldoen dus niet aan die standaard analysecriteria.

NUMMERBORDEN

Verhaert: “Ik vergelijk in colleges de detectie van zeldzame peptiden met het noteren van nummerborden, terwijl je op een brug boven een snelweg staat. Als er weinig verkeer is, merk je een sporadisch buitenlands nummerbord wel op. Als het heel druk wordt, ga je ze missen, laat staan dat je ze kan lezen.” Zo is het ook in een MS: de bulk van de grotere eiwitten in een monster ontleemt tijdens de detectie het zicht op de veel kleinere peptiden.

Multidimensionale chromatografie, gecombineerd met langere meettijden, biedt volgens Verhaert een uitweg. “Dan heb ik het over een totale nano-LC-MS/MS-meettijd van soms wel meer dan 14



Een vroedmeesterpad, *Alytes obstetricans*, wordt gemolken door hem met een kort stroompje te stimuleren.

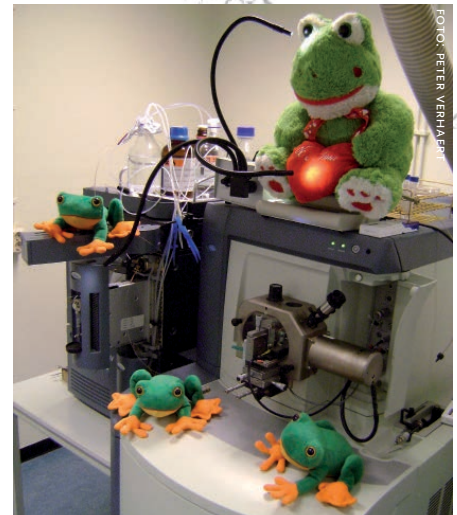
uur voor gefractioneerde, zeer complexe mengsels. Dat levert dan meer dan 95 procent aan irrelevante eiwitdata, die je met bio-informatica moet opschonen.” Verhaert en zijn team hebben op die manier met hun Delft Analytical Hotel van het Netherlands Proteomics Centre nooit eerder opgemerkte signaalpeptiden aangetoond in zeer uiteenlopende biologische monsters, van gistculturen tot menselijke afweercellen.

Daarnaast richt Verhaert zijn peptidomics-pijlen op het slijm van tropische en inheemse amfibieën. Kikkers kun je ‘melken’, door de klieren in de huid kort te stimuleren met stroompje uit een batterij. Het slijm wordt vervolgens afgespoeld en gevriesdroogd, de kikker blijft daarbij ongedeerd. Zo’n slijmmonster kan tientallen, zo niet honderden

Kikkers kun je melken

potentieel interessante peptiden bevatten. De onderzoekers moeten dus inzoomen, bijvoorbeeld door in de MS-screening te selecteren op bepaalde kenmerkende peptide-eigenschappen, zoals gemodificeerde aminozuren of zwavelbruggen. Uiteindelijk wordt met een gedeeltelijke aminozuurvolgorde het overeenkomstige mRNA opgevist uit een cDNA-bank. Het unieke aan het kikkerslijm-model is namelijk dat het mogelijk is om zo’n DNA-bibliotheek te maken op basis van intacte mRNA’s in het slijm.

“Eigenlijk combineer je altijd verschillende strategieën”, zegt Tytgat. Oftewel klassiek opzuiveren en de activiteit bepalen, samen met moleculaire genetica. Maar soms is het organisme gewoon te klein om voldoende uitgangsmateriaal in handen te krijgen. Dan begint het met



In Verhaerts lab staan kikkers overal centraal.

genetica. “Van een spinnetje van 5 millimeter wordt eerst een DNA-bank gemaakt van de gifklieren. Door overexpressie kun je vervolgens de aanwezige peptiden gaan onderzoeken.”

BIBLIOTHEEK

Beide onderzoekers zien nog eindeloze mogelijkheden voor het verder onderzoeken van de biodiversiteit op interessante peptiden. “Alleen al iedere kikkersoort bevat een volledige bibliotheek met bioactieve stoffen”, zegt Verhaert. Volgens Tytgat is er vooral op het gebied van nieuwe antibiotica nog veel te ontdekken. De literatuur over antimicrobiële peptiden groeit gestaag: ze zijn beschreven in kevers, wormen en een hele lijst is inmiddels geïsoleerd uit het huidslijm van vissen en amfibieën.

De route van ontdekking naar toepassing is niet helemaal zonder obstakels. “Afbraak van peptide-medicijnen in het maagdarmkanaal is bijvoorbeeld een vraagstuk”, zegt Tytgat, “maar met de juiste modificaties van de peptiden en verpakking moet daar een oplossing voor gevonden kunnen worden.”

Hoewel de farmaceutische industrie nog altijd de neiging heeft voorkeur te geven aan de ontwikkeling van kleine organische moleculen, merkt Verhaert dat het klimaat voor op peptiden gebaseerde geneesmiddelen langzaam gunstiger wordt. De voordelen zijn groot, zowel voor mens als milieu. “Wat is er mooier dan een peptide dat nadat het z’n werking heeft gedaan door het lichaam wordt afgebroken tot aminozuren. Er ontstaan geen giftige medicijnresten, die via het riool in het oppervlaktewater terecht komen. Duurzaam en zonder afval, dat is pas *biobased economy*.”

GIF OP RECEPT

Het ontwikkelen van peptiden van natuurlijke oorsprong tot een concreet medicijn is geen toekomstdroom meer. Een aantal peptiden van natuurlijke oorsprong heeft al nieuwe typen medicijnen opgeleverd:

- exenatide: voor de behandeling van diabetes, afkomstig uit gifklieren in de bek van het gilamonster (*Heloderma suspectum*), een hagedis uit het Zuiden van de VS.
- captopril: hoge bloeddruk uit het gif van de Zuid-Amerikaanse adder *Bothrops jararaca*.
- eptifibatide: een cyclisch heptapeptide gebruikt bij ischemische beroerte, afkomstig uit het gif van de dwerggratelslang *Sistrurus miliarius* uit het Zuid-Oosten van de VS.
- ziconotide: voor de behandeling van ernstige, chronische pijn bij patiënten die geen baat hebben bij morfine. Afgeleid van een toxine uit de zeeslak *Conus magus*.