

En (r)evolution inom kemien

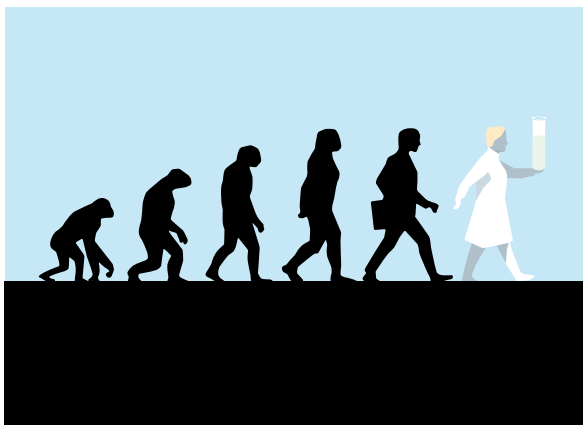
*Evolutionens styrka syns i livets mångfald. 2018 års Nobelpris i kemi tilldelas **Frances H. Arnold**, **George P. Smith** och **Sir Gregory P. Winter** för att de har tagit kontroll över evolutionen och nyttjat den för ändamål som gör största nytta för mänskligheten. Enzymer framtagna genom riktad evolution används för att tillverka bland annat biobränslen och läkemedel. Antikroppar utvecklade med en metod kallad fagdisplay motverkar autoimmuna sjukdomar och kan i vissa fall bota spridd cancer.*

Vi lever på en planet där en mäktig kraft har fått fäste: evolutionen. Efter att det första fröet till liv uppstod för runt 3,7 miljarder år sedan har nästan varje skrymsle av jorden fyllts av organismer anpassade till sin miljö: lavar som kan sätta bo på kala berg, arkéer som trivs i heta källor, självlysande varelser i havsdjupens mörker och fjälliga reptiler rustade mot öknens torka.

I skolan lär vi oss om alla dessa organismer i biologin, men låt oss byta perspektiv och ta på oss kemistens glasögon. Livet på jorden finns eftersom evolutionen har löst en mängd komplexa kemiska problem. Alla organismer klarar att utvinna material och energi från sin speciella nisch i tillvaron och bygga den unika kemiska skapelse som de utgör. Fiskar kan simma i ishaven tack vare antifrysproteiner i blodet och musslor kan sitta fast på klippor eftersom de har utvecklat ett molekyllärt undervattensklister, för att nämna några av oräkneliga exempel.

Det geniala med livets kemi är att den finns inprogrammerad i våra gener. På så vis kan kemien gå i arv och utvecklas. Små slumpmässiga förändringar i generna förändrar kemien. Ibland leder det till en

svagare organism, ibland en mer livskraftig. Stegvis har ny kemi utvecklats och livet på jorden har blivit allt mer komplext.



Nu har processen gått så långt att den har gett upphov till tre individer så komplexa att de själva har lyckats bemästra evolutionen. 2018 års Nobelpris i kemi tilldelas Frances H. Arnold, George P. Smith och Sir Gregory P. Winter för att de genom riktad evolution har revolutionerat såväl kemien som utvecklingen av nya läkemedel. Låt oss börja med enzymformgivningens lysande stjärna: Frances Arnold.

Bild 1. Nobelpristagarna i kemi 2018 har bemästrat evolutionen och drivit den vidare på sina laboratorier.

Enzymer – livets vassaste kemiska verktyg

Redan som nyutbildad maskin- och flygingenjör 1979 hade Frances Arnold en tydlig vision: att bidra till mänsklighetens bästa genom att utveckla ny teknik. USA:s mål var att 20 procent av landets energibehov skulle komma från förnybara källor år 2000, och hon arbetade med solenergi. Framtidsutsikterna i branschen förändrades dock drastiskt efter presidentvalet 1981, och hon fick i stället upp ögonen för den nya DNA-tekniken. Som hon själv har uttryckt det:

”Det var tydligt att möjligheterna att skriva om livets kod skulle ge oss helt nya förutsättningar att göra de material och kemikalier som vi behöver i våra vardagsliv.”

Istället för att tillverka läkemedel, plaster och andra kemikalier med traditionell kemi, som ofta kräver starka lösningsmedel, tungmetaller och frätande syror, var hennes idé att ta hjälp av livets kemiska verktyg: enzymer. De katalyserar de kemiska reaktioner som sker i jordens alla organismer, och om hon lärde sig formge nya enzymer skulle hon kunna förändra kemien i grunden.

Människans tankekraft är begränsad

Till en början försökte Frances Arnold, liksom flera andra forskare mot 1980-talets slut, att på rationell väg tänka ut hur enzymer skulle byggas om för att få nya egenskaper, men enzymer är extremt komplexa molekyler. De byggs av 20 olika slags byggstenar – aminosyror – som kan kombineras i det oändliga. Ett enda enzym kan bestå av flera tusen aminosyror. De länkas samman i långa kedjor som veckas till en tredimensionell struktur. I det inre av denna struktur skapas den miljö som krävs för att katalysera en viss kemisk reaktion.

Att på logisk väg försöka räkna ut hur denna invecklade arkitektur ska göras om för att ett enzym ska få nya egenskaper är svårt även med dagens kunskap och datorkraft. Ödmjuk inför naturens överlägsenhet beslöt sig Arnold i början av 1990-talet för att överge denna, med hennes egna ord, ”något förmättna väg” och istället låta sig inspireras av naturens egen metod för att optimera kemi: evolutionen.

Arnold börjar leka med evolutionen

Under flera år hade hon försökt förändra ett enzym kallat subtilisin så att det i stället för att katalysera kemiska reaktioner i en vattenlösning skulle fungera i ett organiskt lösningsmedel, dimetylformamid (DMF). Nu skapade hon slumpmässiga förändringar – mutationer – i den genetiska koden för enzymet. Sedan förde hon in dessa förändrade gener i bakterier som tillverkade tusentals olika varianter av subtilisin.

Därefter var utmaningen att ta reda på vilken av alla dessa varianter som fungerade bäst i lösningsmedlet. Inom evolutionen pratar man om *survival-of-the-fittest*, inom den riktade evolutionen kallar man detta steg för *selektion*.

Frances Arnold utnyttjade att subtilisin bryter ner mjölkprotein kasein. Den variant av subtilisin som effektivast bröt ner kasein i en lösning med 35 procent DMF valde hon ut. I detta subtilisin införde hon sedan en ny omgång slumpvisa förändringar, och fick då fram en variant som fungerade ännu bättre i DMF.

I den tredje generationen av subtilisin hittade hon en variant som fungerade 256 gånger bättre i DMF än ursprungsenzymet. Enzymet innehöll en kombination av tio olika förändringar som ingen på förhand hade kunnat räkna ut skulle behövas.

I och med detta visade Frances Arnold vilken kraft det finns i att låta slumpen och riktad selektion, istället för enbart mänsklig rationalitet, styra över utvecklingen av nya enzymer. Det var det första och avgörande steget mot den revolution vi ser i dag.

Ett andra viktigt steg tog Willem P. C. Stemmer, en holländsk forskare och entreprenör som gick bort 2013, när han införde ännu en dimension i den riktade evolutionen av enzymer: parning i provrör.

1 Slumpmässiga förändringar görs i genen för det enzym som ska förändras.

2 Generna förs in i bakterier, som använder dem som mall och tillverkar slumpmässigt förändrade enzymer.

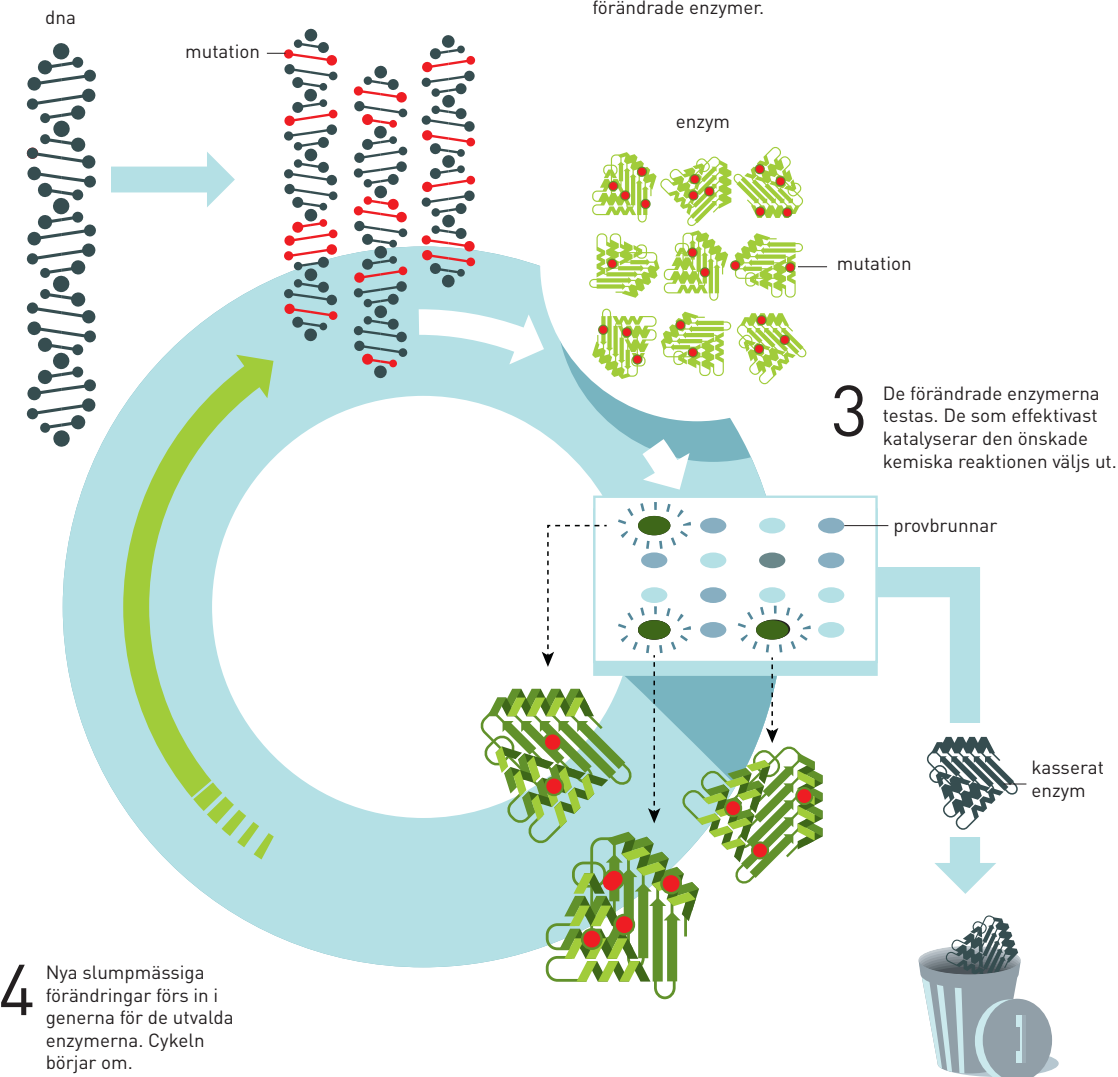


Bild 2. Principen för riktad evolution av enzymer. Efter några rundor av riktad evolution kan ett enzym ha förbättrats flera tusen gånger.

Parning – för en stabilare evolution

En förutsättning för den naturliga evolutionen är att gener från olika individer blandas med varandra genom till exempel parning eller pollinering. Fordelaktiga egenskaper kan då kombineras och ge upphov till en än mer livskraftig organism. Samtidigt kan mindre funktionella förändringar i arvs-massan försvinna från en generation till en annan.

Willem Stemmer utnyttjade provrörets motsvarighet till parning: DNA-shuffling. År 1994 visade han hur man kan klippa olika versioner av en gen i smådelar och sedan, med hjälp av DNA-teknikens verktyg, pussla ihop delarna till en fullständig gen, som blir en mosaik av de ursprungliga versionerna.

Genom flera cykler av DNA-shuffling förändrade Willem Stemmer ett enzym så att det blev väldigt många gånger effektivare än ursprungsenzymet. Det visade att parning av gener – forskare kallar det för *rekombination* – kan ge en ännu effektivare evolution av enzymer.

Nya enzymer ger hållbart biobränsle

Sedan det tidiga 1990-talet har DNA-teknikens verktyg finslipats och metoderna för riktad evolution blivit många fler. I spetsen för denna kreativa utveckling har Frances Arnold gått. De enzymer som numera tas fram i hennes laboratorium kan katalysera kemi som inte ens finns i naturen och ge helt nya material. Hennes specialframställda enzymer har också blivit viktiga verktyg för tillverkning av olika kemiska substanser, exempelvis läkemedel. De kemiska reaktionerna går snabbare, ger mindre biprodukter och i vissa fall kan man även slippa de tungmetaller som den traditionella kemin kräver, vilket minskar miljöbelastningen avsevärt.

Cirkeln har också slutits: Frances Arnold arbetar åter med att ta fram förnybar energi. Hennes forskargrupp har utvecklat enzymer som omvandlar enkla sockerarter till isobutanol, ett energirikt ämne från vilket det går att tillverka både biobränsle och miljövänligare plast. Ett långsiktigt mål är att ta fram drivmedel för en grönare transportsektor. Alternativa bränslen – producerade med hjälp av Arnolds proteiner – fungerar både i bilar och flygplan. På detta vis bidrar hennes enzymer till en grönare värld.

Nu till den andra halvan av årets Nobelpris i kemi där riktad evolution istället har lett till läkemedel som kan neutralisera gifter, motverka autoimmuna sjukdomar och i vissa fall till och med bota spridd cancer. Här spelas en nyckelroll av ett litet bakterievirus och den metod som kallas fagdisplay.

Smith tar hjälp av bakteriofager

Som så ofta tar vetenskapen outgrundliga vägar. När George Smith under 1980-talets första hälft började använda bakteriofager – virus som infekterar bakterier – var det främst med hopp om att de skulle kunna nyttjas för att klonera gener. DNA-tekniken var ännu i sin linda och människans gigantiska arvs massa som en oupptäckt kontinent. Forskare visste att arvs massan innehöll alla de gener som krävs för att producera kroppens proteiner, men att identifiera den specifika genen för ett speciellt protein var värre än att leta efter en nål i en höstack.

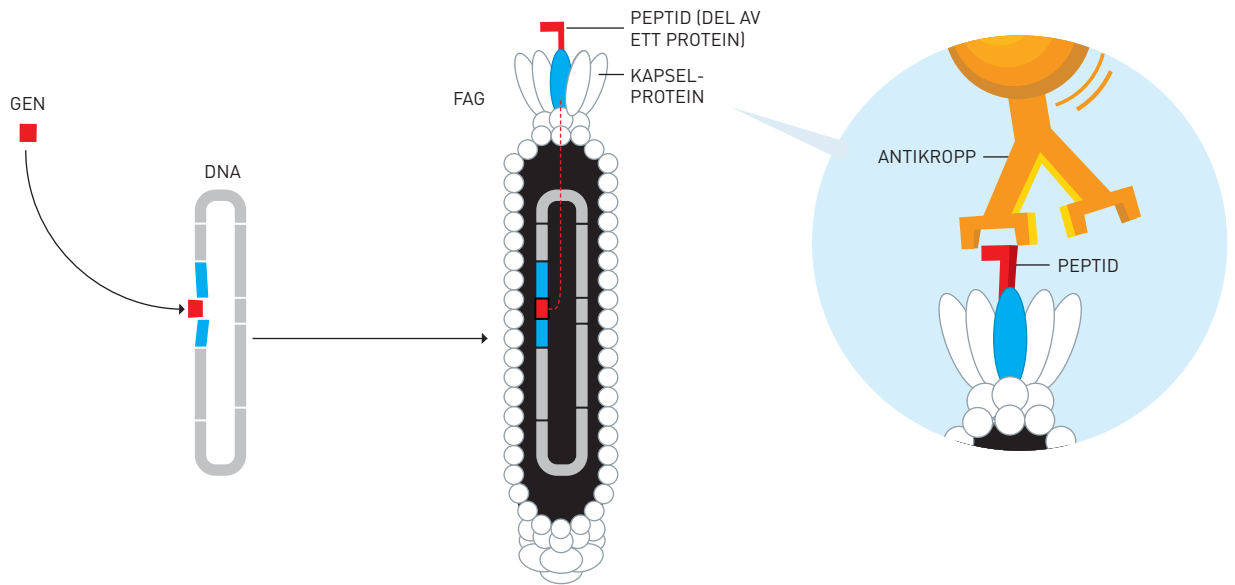
För den som lyckades hitta rätt gen var dock mycket vunnet. Med hjälp av de då nya gentekniska verktygen kunde man stoppa in genen i bakterier som – om man hade tur – kunde massproducera det protein man ville studera.

Hela processen kallades för att klonera en gen och George Smiths tanke var att forskare i sitt sökande efter gener på ett snillrikt vis skulle kunna ta hjälp av små fager.

Bakteriofager – en länk mellan ett protein och dess okända gen

Fager är enkla till sin natur. De består av en liten bit arvs massa som är inkapslad i ett hölje av skyddande proteiner. När de ska föröka sig sprutar de in sin arvs massa i bakterier och kapar deras ämnesomsättning. Bakterierna producerar då både nya kopior av fagens arvs massa och de proteiner som formar kapseln. Så bildas nya fager.

George Smiths idé var att forskare skulle kunna utnyttja fagernas enkla konstruktion för att hitta en okänd gen för ett känt protein. Under den här tiden hade man tillgång till stora molekylära bibliotek som innehöll mängder av fragment av olika okända gener. Hans tanke var att man skulle slå ihop dessa okända genfragment med genen för ett av proteinerna i viruskapseln. När nya virus tillverkades skulle de okända genernas proteiner hamna på virusets yta eftersom de var sammanfogade med ett kapselprotein (bild 3).



- 1 Smith infogade en gen i genen för ett protein i fagens kapsel. Fagens arvs massa fördes sedan in i bakterier som tillverkade fager.
- 2 I fagerna som bildades hamnade peptiden från den infogade genen tillsammans med kapselproteinet på fagens yta.
- 3 Smith kunde fiska upp fagen med hjälp av en antikropp som var utformad för att binda till peptiden. På köpet fick han med genen för peptiden.

Bild 3. Fagdisplay – George Smith utvecklade metoden för att kunna hitta okända gener till ett känt protein.

Antikroppar kan fiska upp rätt protein

På detta vis skulle det bildas en blandning av fager som på ytan bar mängder av olika proteiner. I nästa steg – tänkte George Smith – skulle forskare kunna använda antikroppar för att, ur denna soppa, fiska upp fager som bar på olika kända proteiner. Antikroppar är proteiner som fungerar som målsökande robotar. Med extrem precision kan de skilja ut och binda till ett enda protein bland tiotusentals andra. Om forskare fick napp i fagsoppan med en antikropp som de visste fäste vid ett känt protein, skulle de som bifångst få med den därtills okända genen för proteinet.

Det var en elegant idé och år 1985 visade George Smith att den skulle kunna fungera. Han framställde en fag som på ytan bar en del av ett protein, en så kallad peptid. Ur en soppa av olika fager kunde han sedan med hjälp av en antikropp fiska upp just den fag som han själv hade konstruerat.

Med detta experiment lade George Smith grunden för det som har kommit att kallas fagdisplay. Metoden är genial i sin enkelhet. Styrkan sitter i att fagen fungerar som en länk mellan ett protein och dess gen. Men det var inte inom kloningen av gener som metoden fick sitt stora genomslag, istället började flera forskargrupper runt 1990 nyttja fagdisplay för att utveckla nya biomolekyler. En av dem som anammade tekniken var Gregory (Greg) Winter och det är genom hans forskning som fagdisplay nu gör mänskligheten största nytta. För att förstå varför behöver vi titta lite närmare på antikroppar.

Antikroppar kan blockera sjukdomsprocesser

I vårt lymfsystem finns celler som kan producera hundratusentals olika slags antikroppar. Genom ett välutvecklat system har alla dessa celler testats så att ingen antikropp fäster till någon av alla de olika molekyler som finns i den egna kroppen. Däremot säkerställer den enorma variationen att det alltid finns någon antikropp som fastnar på de virus eller bakterier som infekterar oss. När antikroppen fäster skickas en signal till aggressiva immunceller som förgör inkräktarna.

Eftersom antikroppar med stor urskiljning kan fästa sig vid en enda molekyl bland tiotusentals andra, har forskare under lång tid haft stort hopp om att kunna utforma antikroppar som blockerar olika sjukdomsprocesser i kroppen och fungerar som läkemedel. För att få fram sådana terapeutiska antikroppar injicerade man till en början möss med olika mål för läkemedel, till exempel proteiner från cancerceller. De antikroppar som mössen bildade försökte man sedan använda som läkemedel. Men under 1980-talet blev det allt tydligare att denna metod hade sina begränsningar. Vissa ämnen var för giftiga för mössen och andra gav ingen antikroppsproduktion. De antikroppar man verkligen testade som läkemedel, upptäcktes dessutom av patienternas immunförsvar som attackerade dem. Det ledde till att musantikropparna förstördes och patienterna riskerade olika biverkningar.

Dessa motgångar fick Greg Winter att börja utforska möjligheterna med George Smiths fagdisplay. Dels ville han komma bort från behovet av möss, dels ville han kunna basera läkemedlen på mänskliga antikroppar eftersom de tolereras av vårt immunförsvar.

Winter sätter antikroppar på fagers yta

Antikroppar är Y-formade molekyler och det är den yttre änden av varje arm som binder till främmande ämnen. Greg Winter fogade samman den genetiska informationen för denna del av antikroppen med genen för ett av fagens kapselproteiner. År 1990 visade han att detta ledde till att den bindande delen av antikroppen hamnade på fagens yta. Antikroppen han nyttjade i sitt experiment var utformad för att binda till en molekyl kallad phOx. När Greg Winter använde phOx som ett slags molekylär metkrok, lyckades han fiska upp antikropps-fagen ur en soppa med fyra miljoner andra fager.

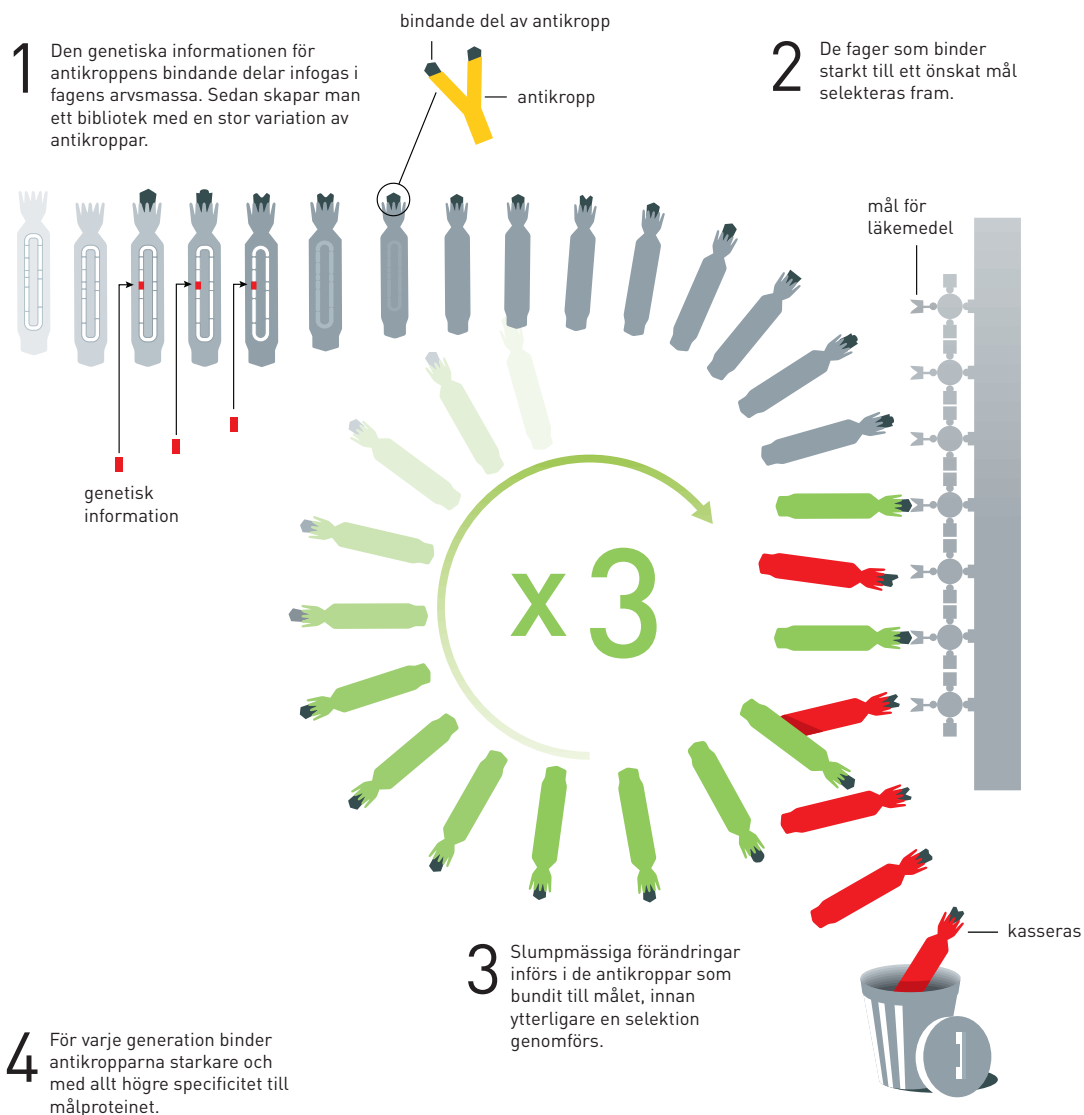
Efter detta visade Greg Winter att han kunde använda fagdisplay för riktad evolution av antikroppar (bild 4). Han skapade ett bibliotek av fager med miljardtals olika varianter av antikroppar på ytan. Ur detta bibliotek fiskade han upp antikroppar som band till olika målproteiner. Denna första generationens antikroppar förändrade han sedan slumpmässigt och skapade ett nytt bibliotek där han hittade antikroppar som band ännu starkare till målet. På detta vis utvecklade han 1994 till exempel antikroppar som med stor precision kopplade till cancerceller.

Världens första läkemedel baserat på en mänsklig antikropp

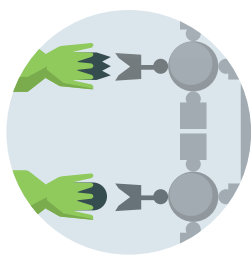
Kring fagdisplay av antikroppar grundade Greg Winter och hans medarbetare ett företag som under 1990-talet tog fram ett läkemedel helt baserat på en mänsklig antikropp: adalimumab. Antikroppen neutraliserar ett protein, TNF-alfa, som driver inflammation vid många autoimmuna sjukdomar. År 2002 godkändes läkemedlet för behandling av ledgångsreumatism och det används numera även mot olika former av psoriasis och inflammatoriska tarmsjukdomar.

Framgången med adalimumab har sporrat en enorm utveckling inom läkemedelsbranschen och fagdisplay har bland annat använts för att ta fram antikroppar mot cancer. En av dessa lättar på bromsen till immunförsvarets mördarceller, som släpps fria och kan attackera tumörceller. Tumörtillväxten bromsas och i vissa fall botas till och med patienter som har spridd cancer, vilket är ett historiskt genombrott för cancervården.

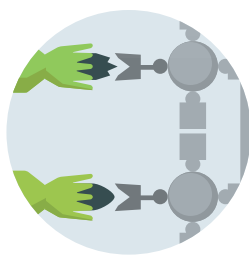
Ett annat nu godkänt antikropps-läkemedel neutraliserar det bakteriegift som orsakar mjältbrand, ytterligare ett bromsar den autoimmuna sjukdomen SLE och många fler antikroppar testas just nu i kliniska prövningar, till exempel mot Alzheimers sjukdom.



FÖRSTA GENERATIONEN



ANDRA GENERATIONEN



TREDJE GENERATIONEN

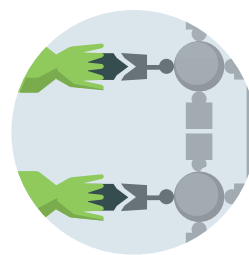


Bild 4. Principen för riktad evolution av antikroppar med hjälp av fagdisplay. Metoden används för att ta fram nya läkemedel.

Början på en ny era inom kemien

De metoder som 2018 års Nobelpristagare i kemi har utvecklat används numera världen över för att få en grönare kemisk industri, ta fram nya material, tillverka hållbara biobränslen, mildra sjukdom och rädda liv. Genom den riktade evolutionen av enzymer och fagdisplay av antikroppar har Frances Arnold, George Smith och Greg Winter gjort mänskligheten den största nytta och lagt grunden för en revolution inom kemien.

LÄNKAR OCH LÄSTIPS

Mer information om årets priser, bland annat en vetenskaplig bakgrundsartikel på engelska, finns på Kungl. Vetenskapsakademiens webbplats, www.kva.se, och <http://nobelprize.org>. Där kan man också titta på presskonferenser, Nobelföreläsningar och annat videomaterial. Mer information om utställningar och aktiviteter kring Nobelpriset och Ekonomipriset finns på www.nobelcenter.se.

Artiklar

Arnold, F. & Macuare, K. A. (2016) The NAI Fellow Profile: An Interview with Dr. Frances Arnold. *Technology and Innovation*, 18, 79-82

Harding, A. (2006) Profile Sir Greg Winter—humaniser of antibodies. *Lancet*, 368, S50

Nightingale, K. (2013) Greg Winter: Pioneering antibody drugs. *Insight*, www.insight.mrc.ac.uk/2013/02/27/greg-winter-pioneering-antibody-drugs/

Trager, R. (2018) In situ with Frances Arnold. *Chemistry World*, www.chemistryworld.com/culture/in-situ-with-frances-arnold/3008732.article

Videoklipp

MoleCluesTV (4 juni 2017) *Frances Arnold: New enzymes by evolution*
www.youtube.com/watch?v=05r-FLGtsEQ

SlidesLive (23 nov 2015) *Therapeutics Antibodies: A Revolution in Pharmaceuticals*
<https://slideslive.com/38895318/therapeutics-antibodies-a-revolution-in-pharmaceuticals>

Kungl. Vetenskapsakademien har beslutat utdela Nobelpriset i kemi 2018

med ena hälften till

och med andra hälften gemensamt till

FRANCES H. ARNOLD

Född 1956 (62 år) i Pittsburgh, USA. Fil.dr 1985 vid University of California, Berkeley, USA. Linus Pauling Professor of Chemical Engineering, Bioengineering and Biochemistry vid California Institute of Technology, Pasadena, USA.
<http://fhalab.caltech.edu>

”för riktad evolution
av enzymer”

GEORGE P. SMITH

Född 1941 (77 år) i Norwalk, USA. Fil.dr 1970 vid Harvard University, Cambridge, USA. Curators' Distinguished Professor Emeritus of Biological Sciences vid University of Missouri, Columbia, USA.
<http://biology.missouri.edu/people/?person=94>

”för sagdisplay av peptider och antikroppar”

SIR GREGORY P. WINTER

Född 1951 (67 år) i Leicester, Storbritannien. Fil.dr 1976 vid University of Cambridge, Storbritannien. Research Leader Emeritus vid MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, Storbritannien.
www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/group-leaders/emeritus/greg-winter/