

Misbrugsstof eller lægemiddel? Vores hjernes kemi reagerer på den mindste stimulans og små variationer i mængden af et stof kan have enorm betydning. Petrine Wellendorph er lektor ved Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi ved Københavns Universitet og forsker i hjernens kemi.

FRA FORÆLDRELØS LIGAND TIL RECEPTOR KERNEFAMILIE

AF LEKTOR
PETRINE WELLENDORPH
OG
PH.D.-STUDERENDE
INGE STENGAARD
VILLUMSEN

INSTITUT FOR LÆGEMIDDELDESIGN OG FARMAKOLOGI,
KØBENHAVNS UNIVERSITET

Inden for molekylærfarmakologien taler man om forældreløse ligander og forældreløse receptorer som henholdsvis naturligt forekommende kemiske substanser (signalstoffer) og membranbundne proteiner (signalmodtagere), der endnu ikke er matchet med deres naturlige partner. I nogle tilfælde kender man liganden og ved måske endda, at den har en spændende biologisk funktion, uden at man kender den tilhørende signalmodtager. I andre tilfælde kender man receptoren og ved at den foranlediger farmakologisk interessante cellulære effekter men man kender ikke ligandens natur. Det er først når man har identificeret makkerparret, at de molekylære mekanismer rigtigt kan studeres, at forbedrede ligander kan designes, og at fysiologien bag med sikkerhed kan afdækkes.

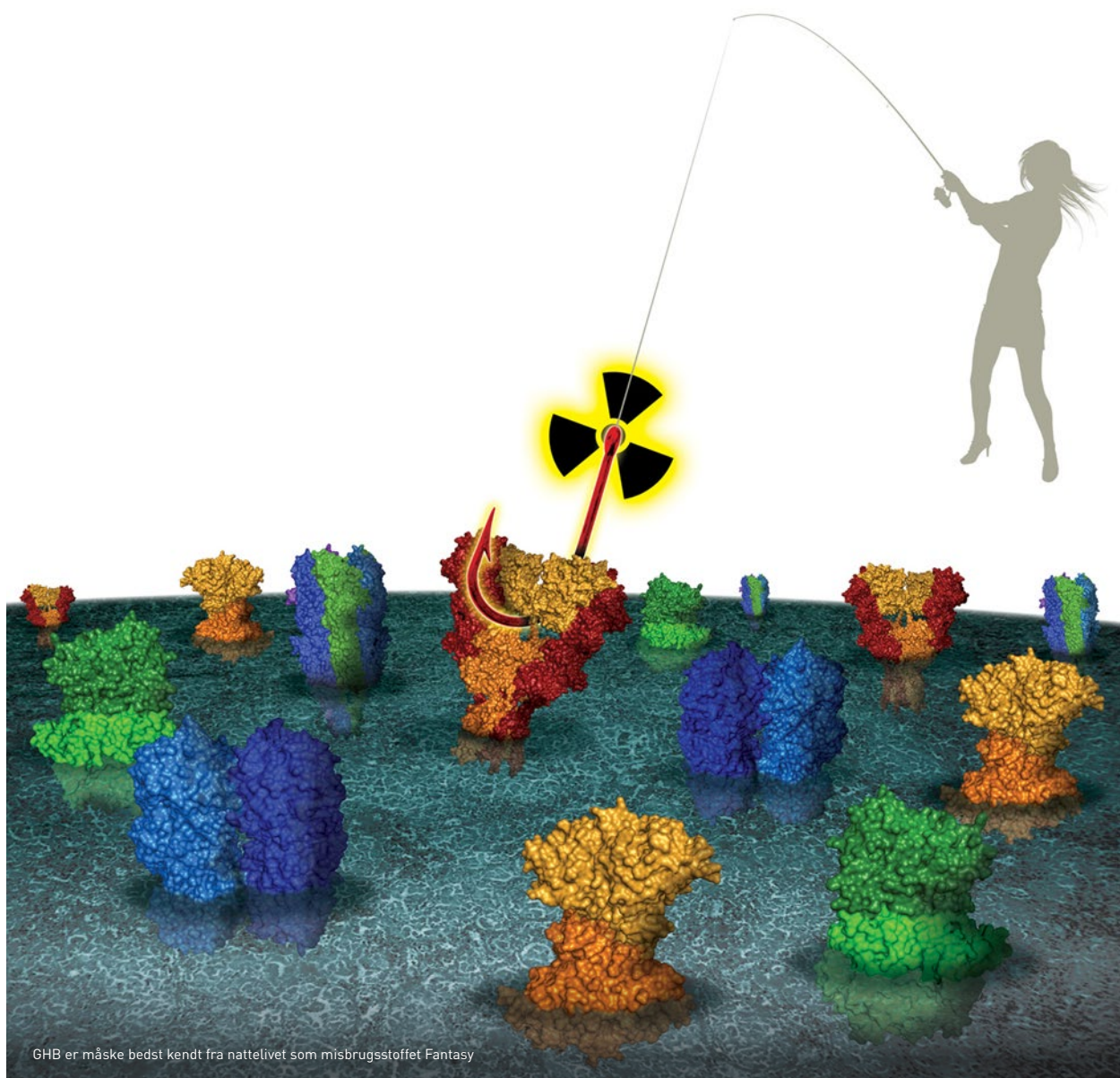
-Hydroxysmørsyre (GHB) er et eksempel på en forældreløs ligand som har fascineret forskere i mere end 30 år - man har nemlig ikke vidst, hvilke af hjernens proteiner GHB binder til, og hvad det betyder. Først for nylig er den forældreløse ligand blevet parret med en receptor,

som vel at mærke kommer fra en rendyrket kernefamilie, og som har potentiel relevans for GHBs rolle i hjernen.

GHB: FORUNDERLIGT STOF MED MANGE VIRKNINGER

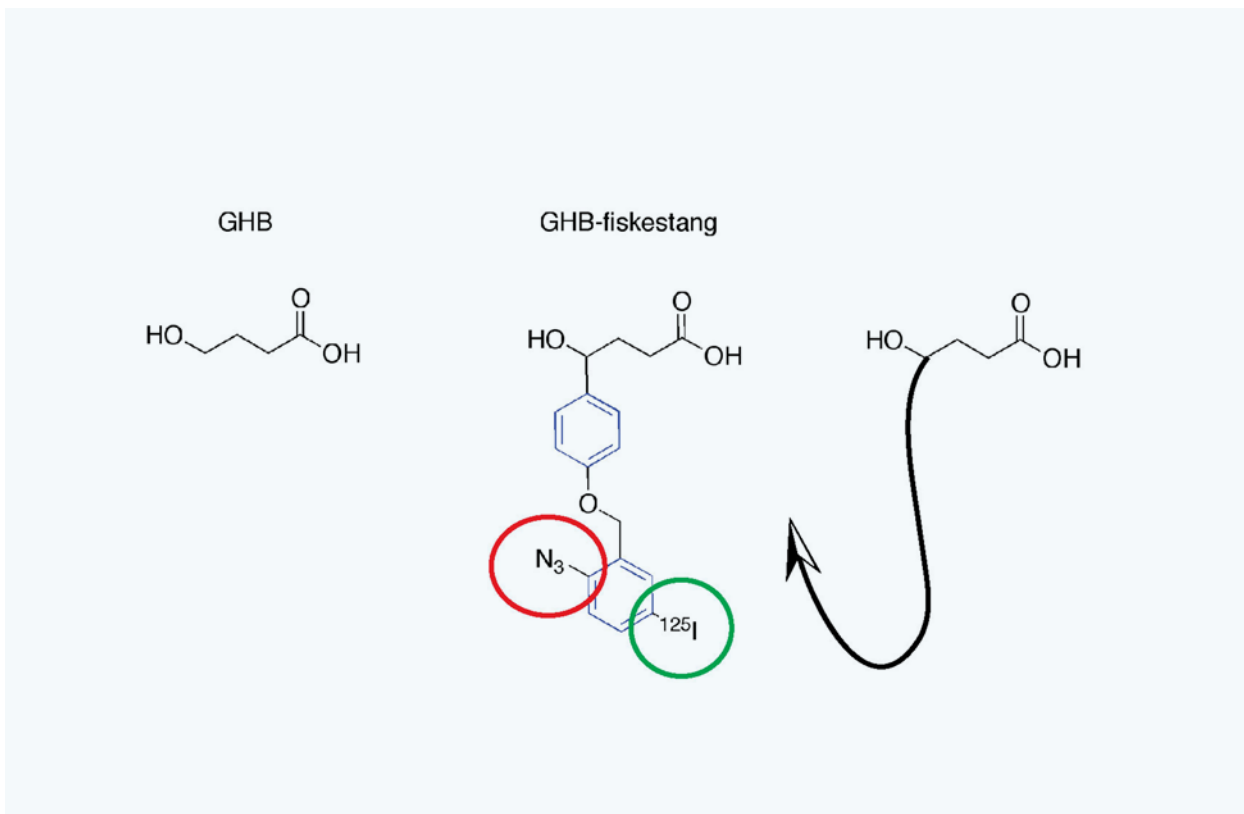
GHB er en kemisk forbindelse, der forekommer naturligt i menneskets hjerne, men stoffet er også kendt som lægemidlet Xyrem (mod visse søvnlidelser) og måske bedst kendt fra natlivet som misbrugsstoffet Fantasy. Når GHB indtages i moderate mængder, medfører det euforiske og afslappende effekter, men i højere doser eller blandet med alkohol kan misbrug af stoffet medføre koma og død.

Betydningen af den naturlige forekomst af GHB i hjernen er stadig ukendt, dog tyder tidligere forskning på, at GHB fungerer som et kemisk signalstof i hjernen. Målet er at karakterisere GHBs bindingssteder i hjernen på molekylært plan og korrelere disse med fysiologisk og farmakologisk funktion.



GHB er måske bedst kendt fra nattelivet som misbrugsstoffet Fantasy

ILLUSTRATION: JENS RAADAL/SUND, KU



Den molekylære fiskestang.

DEN MOLEKYLÆRE FISKESTANG

Med henblik på at kunne identificere det hidtil ukendte GHB bindingsprotein har vi udviklet et molekyle, der fungerer som en fiskestang, der kan fiske proteinet ud fra hjernens samlede pulje af proteiner. Dette specialdesignede molekyle besidder lige netop de egenskaber, der kræves, for at isolere GHBs bindingsprotein. Det vil sige at det binder til det rigtige protein, det har en "krog", så det kan sætte sig fast på proteinet, og det har en "lampe", der lyser, så det er muligt at detektere molekylet.

Vi har designet sådan et molekyle – vores specifikke molekylære GHB-fiskestang - til at indeholde forskellige funktionelle grupper, der hver især opfylder disse forskellige krav.

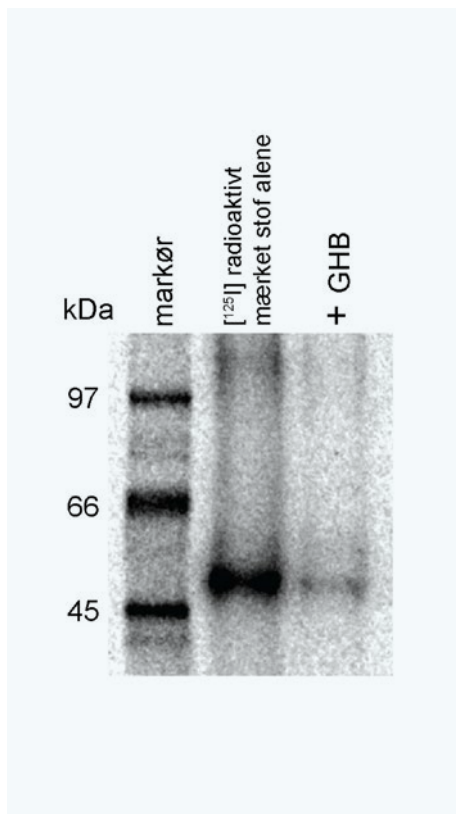
Den ene ende af fiskestangen er strukturelt identisk med GHB og vil derfor fungere som madding, der sørger for, at fiskestangen binder til det samme protein i hjernen som GHB.

Fiskestangen indeholder også to aromatiske ringe (blå), der øger fiskestangens tilknytning

til bindingsproteinet. Eksperimenter har vist, at tilstedeværelsen af sådanne strukturer medfører, at molekylet binder op til 700 gange stærkere til bindingsproteinet end GHB selv. Det betyder også, at fiskestangen er yderst selektiv overfor det ønskede protein; det binder altså ikke til andre af hjernens proteiner.

For at sikre at vores GHB-madding ikke falder af sit bindingssted under forsøget har vi inkorporeret en N₃-gruppe (rød cirkel) i molekylet, der også kaldes en azid-gruppe. Hvis molekylet belyses med ultraviolet lys, vil der ske en reaktion mellem azid-gruppen og aminosyrer i proteinet, og molekylet vil dermed binde sig kovalent til proteinet, som en fiskekrog, der sætter sig fast i munden på en fisk. Efter denne reaktion kan man således udsætte proteinet for de nødvendige forsøgsbetingelser, der ændrer proteinets struktur, uden at fiskekrogen falder af.

Den molekylære fiskestangs sidste egenskab er "lampen", der gør det muligt at følge molekylet. Denne lampe består af en radioaktiv



iod-isotop ^{125}I (grøn cirkel). ^{125}I udsender et kraftigt signal, som radiofølsomme målere kan opfange, og det er dermed muligt at påvise tilstedeværelsen af molekylet ned til meget små mængder. Ved at udnytte det specialdesignede molekyle er det lykkedes os at isolere GHB-bindingproteinet fra rottehjernevæv og bestemme størrelsen på proteinet.

GHB AKTIVERER RECEPTORER FRA KERNEFAMILIEN GABAA

Vores sekvensanalyser viste, at GHB binder til en klasse af kendte receptorproteiner, som også aktiveres af hjernens vigtigste signalstof, -aminosmørsyre (GABA). GABA virker hæmmende på nerveceller ved at binde til ionkanal-forbundne GABAA receptorer, som ved aktivering lukker klorid ind i cellen og derved bremser signaloverførslen. GABAA receptorer er molekyllære angrebepunkter for en lang række kendte lægemidler og er en både meget heterogen og fascinerende receptor kernefamilie. De kan opbygges af 19 forskellige subenheder i fem-leddede komplekser, hvor netop kombinationen af subenheder dikterer deres

Gel af proteinopløsning fra hjernebærkekstrakt efter fotoreaktion. Båndene på gelen viser proteiner gjort radioaktive ved binding med vores foto-radioaktive GHB-molekyle. Tilsætning af en høj koncentration af GHB fortrænger det radiomærkede stof og bekræfter, at båndene kommer fra proteiner, der kan binde GHB. Det specifikt GHB-bindende protein har en størrelse på ca. 50 kDa, estimeret ud fra den radioaktive følsomme markør med forskellige kendte proteiners størrelse yderst til venstre i billedet.

Betydningen af den naturlige forekomst af GHB i hjernen er stadig ukendt, dog tyder tidligere forskning på, at GHB fungerer som et kemisk signalstof i hjernen.

farmakologiske specificitet. De kan måles på elektrofysiologisk, da åbningen af kloridkanalen efter stimulering med den kemiske forbindelse giver anledning til strøm. Således opdagede vi, at GHB kun kan aktivere visse former for GABAA receptorer. Dette blev eftervist ved at udtrykke forskellige klonede GABAA receptorer i celler og måle på deres elektrofysiologiske signal ved tilsætning af GHB. Signalet viste sig at være mest følsomt ved en bestemt kombination [41] af GABAA receptorer - denne ene ud af uendelig mange GABAA receptor kombinationer genkender GHB i så lave koncentrationer, som der er naturligt forekommende i hjernen.

FREMTIDIG BETYDNING

Det er nu af stor interesse at forstå, hvor GHB hører hjemme rent mekanistisk i den menneskelige hjerne, og hvordan GABAA receptoren muligvis kan bruges som et fremtidigt mål for udvikling af bedre lægemidler. Uhyre interessant er det, at GHB, i modsætning til GABA selv, foretrækker en speciel underklasse af GABAA receptorer mens GABA kan virke på dem alle. Det kunne være naturens måde at give GHB en unik funktion på og som kan vise sig at være terapeutisk fordelagtig. Så selv efter 30 år som forældreløs mener vi nu, at GHB er godt på vej til at blive en unik bestanddel af hjernekemien absolutte kernefamilie.

DEN SENESTE PUBLIKATION FRA PROJEKTET

$\alpha 4\beta 6$ GABAA receptors are high-affinity targets for γ -hydroxybutyric acid (GHB)
Absalom N, Eghorn LF, Villumsen IS, Karim N, Bay T, Olsen JV, Knudsen GM, Bräuner-Osborne H, Frølund B, Clausen RP, Chebib M, Wellendorph P. Proc Natl Acad Sci U S A. 109: 13404-9 [2012].