



**Protein-protein interaktion
et nyt mål for udvikling af lægemidler**

Bach, Anders; Gottschalk, Marie; Kristensen, Anders Skov; Strømgaard, Kristian

Published in:
Lægemiddelforskning

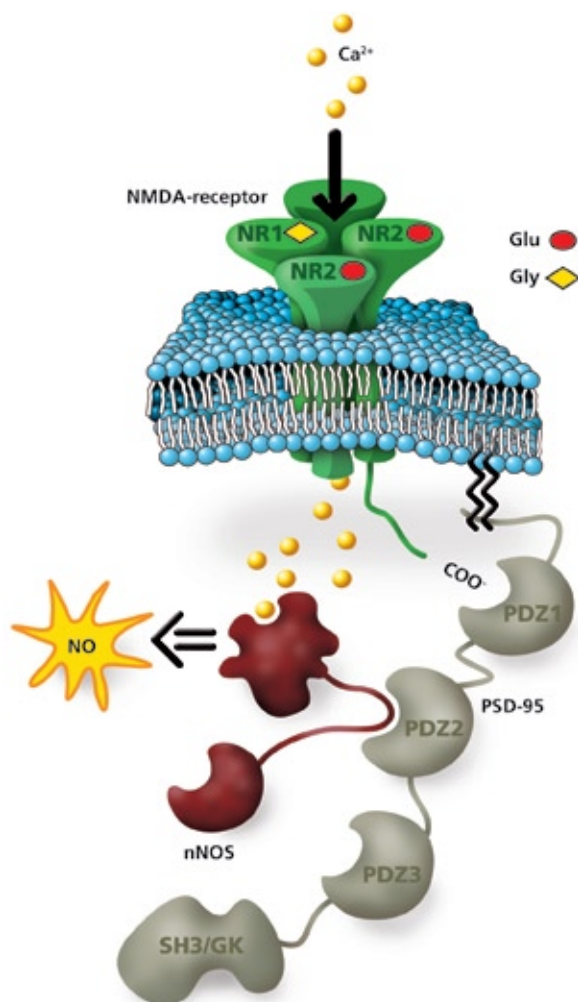
Publication date:
2008

Document version
Også kaldet Forlagets PDF

Citation for published version (APA):
Bach, A., Gottschalk, M., Kristensen, A. S., & Strømgaard, K. (2008). Protein-protein interaktion: et nyt mål for udvikling af lægemidler. *Lægemiddelforskning*, 10-12.

Protein-protein interaktioner

– et nyt mål for udvikling af lægemidler



Store mængder calcium kommer ind i cellen, når NMDA-receptoren stimuleres af for meget glutamat. Herved overaktiveres enzymet nNOS, der danner stoffet nitrogen oxid (NO), som i store mængder dræber hjernecellerne. Proteinet PSD-95 er bindeleddet mellem receptoren og nNOS. Ved at hæmme vekselvirkningen mellem receptoren og PSD-95 kan man potentielt stoppe de skadelige virkninger af glutamat uden at ødelægge den normale funktion af NMDA-receptoren.

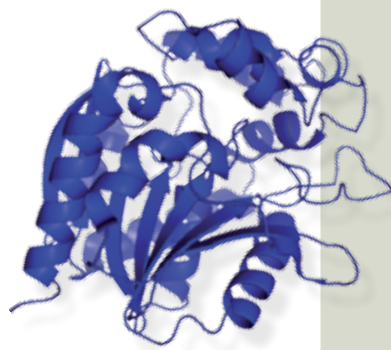
Lægemidler virker typisk ved at binde sig til proteiner – fx receptorer, som er involveret i en sygdomsproces – og stoppe deres skadelige funktioner. Desværre medfører strategien ofte bivirkninger. En ny metode går ud på at påvirke receptorernes samspil med proteiner inde i cellerne. Dette princip åbner for udvikling af lægemiddeltoffer til behandling af hjerneskader som følge af slagtilfælde.

Af Anders Bach, Marie Gottschalk, Anders S. Kristensen og Kristian Strømgaard

Lægemidler virker primært ved at binde til et eller flere af kroppens mere end 20.000 forskellige proteiner; især de proteiner der fungerer som receptorer eller enzymer. Efter bindingen aktiverer eller hæmmer medicinen proteinet afhængig af, hvilken sygdom der behandles. De fleste af nutidens lægemidler binder til proteiner, som sidder i cellernes membraner, hvor de fungerer som receptorer for kroppens signalstoffer og hormoner. Selv om denne metode hidtil har været succesfuld, er der i dag et stort ønske om at finde alternative strategier for udvikling af lægemidler.

Et af problemerne ved den traditionelle tilgang er nemlig, at den sygdomsrelevante receptor kan være så vigtig for kroppens almindelige funktioner, at en medicinsk blokering af receptoren fører til alvorlige bivirkninger. I de senere år er der derfor opstået stor interesse for en alternativ strategi, hvor lægemidlet ikke påvirker receptoren direkte, men i stedet ændrer de vekselvirkninger, som receptoren har med proteiner inde i cellen. Et eksempel på sådanne vekselvirkninger er protein-protein interaktioner, hvor to proteiner binder sig til hinanden for at udøve en fysiologisk effekt.

Protein-protein interaktioner finder sted i alle celler og menes bl.a. at være involveret i sygdomme som kræft og hjernesygdomme. I Kemisk Biologi-gruppen på Det Farmaceutiske Fakultet arbejder vi med studier af protein-protein interaktioner som nye mål for lægemidler, og vi sætter især fokus på proteinerne indbyrdes vekselvirkninger i hjernen. For en lang række hjernesygdomme såsom Alzheimers sygdom og slagtilfælde findes der i dag kun utilstrækkelige behandlingsmu-



ligheder, og derfor er der behov for at udvikle nye lægemidler, som kan behandle og afhjælpe disse sygdomme. Ved udviklingen af lægemiddelstoffer mod hjerneskader efter slagtilfælde har man fokuseret på at blokere for de signalstoffer i hjernen, der aktiverer de involverede receptorer. Herved beskyttes receptoren mod overaktivering, men desværre påvirkes receptorens normale funktion også, og det resulterer i uacceptable bivirkninger. Det har vist sig at være endog meget vanskeligt at finde en tilfredsstillende balance mellem den ønskede effekt på sygdommen og bivirkningerne.

Et fundamentalt anderledes princip for behandling af disse sygdomme er derfor at udvikle lægemidler, som forandrer receptorproteinets vekselvirkning med proteiner inde i cellen. På den måde påvirkes receptorens normale funktion ikke, mens den sygdomsfremkaldende effekt potentielt kan stoppes.

Bivirkninger kan undgås

Specifikt fokuserer vi på hjernens primære aktiverende signalstof – glutamat – som påvirker en række receptorer i hjernen, hvoraf en af de vigtigste er NMDA-receptoren. Denne receptor findes i membraner på mere end 90 procent af alle nerveceller, og dens normale funktion er at lede calcium ind i nervecellen, når receptoren aktiveres af glutamat. Når et område i hjernen bliver skadet under et slagtilfælde, bliver indstrømningen af calcium via NMDA-receptoren imidlertid et problem. Det skyldes, at store mængder glutamat frigives fra de døde hjerneceller, hvorved signalstoffet overaktiverer NMDA-receptorerne i det omkringliggende raske væv, hvilket medfører et for højt niveau af calcium inde i cellerne. Resultatet er en giftig kædereaktion, som kan føre til, at cellerne dør, hvorved den akutte hjerneskade spreder sig voldsomt. De biokemiske processer bag celledøden kendes relativt godt. En afgørende mekanisme er, at calcium inde i cellen aktiverer enzymet nNOS, som danner stoffet nitrogen-oxid. Nitrogen-oxid er uhyre giftigt i store mængder, og der er påvist en direkte sammenhæng mellem forhøjet aktivitet af NMDA-receptoren, frigivelse af store mængder nitrogen-oxid og hjerneskader.

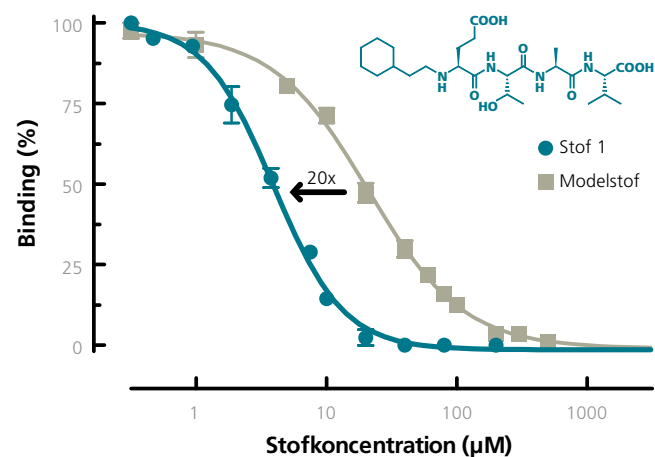
SIGNALSTOFFER, RECEPTORER OG SLAGTILFÆLDE

Signalstof: Signalstoffer (neurotransmittere) er kemiske forbindelser, som bruges af hjerneceller (neuroner) til at kommunikere med hinanden. Signalstofferne frigives af én celle og binder til en anden celledes receptor.

Receptor: Disse proteiner sidder i celledmembranen. Når et signalstof binder til en receptor, aktiveres receptoren, og et elektrisk signal opstår inde i cellen. Dette signal kan så kommunikeres videre til andre celler.

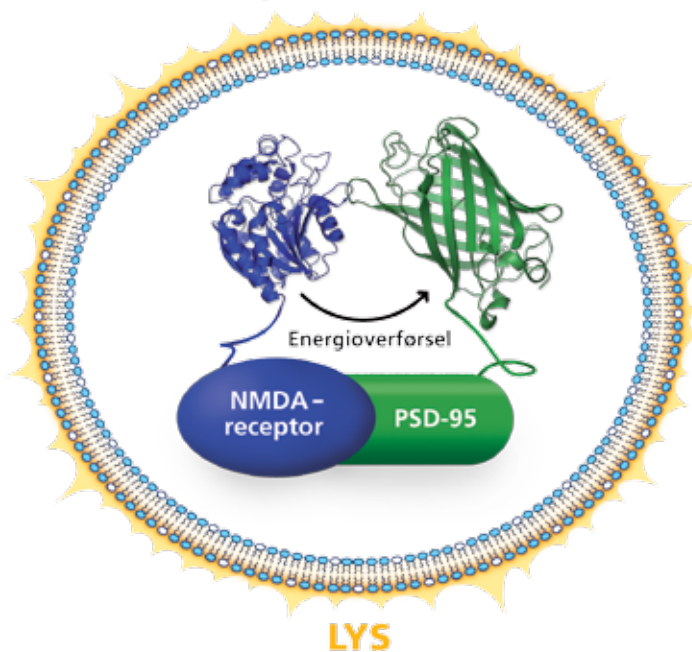
Glutamat: Aminosyren glutamat er det primære aktiverende signalstof i hjernen, og det udøver sin effekt ved at binde sig til glutamat-receptorer; deriblandt den type, som hedder NMDA-receptorer.

Overaktivering: Under et slagtilfælde kommer glutamat-holdige hjerneceller ud af kontrol og frigiver for meget glutamat. Derved overaktiveres glutamat-receptorerne på andre hjerneceller, og det sætter en kædereaktion i gang, som i sidste ende medfører, at cellerne dør. Denne proces menes at være årsag til de hjerneskader, der som regel opstår i forbindelse med slagtilfælde.

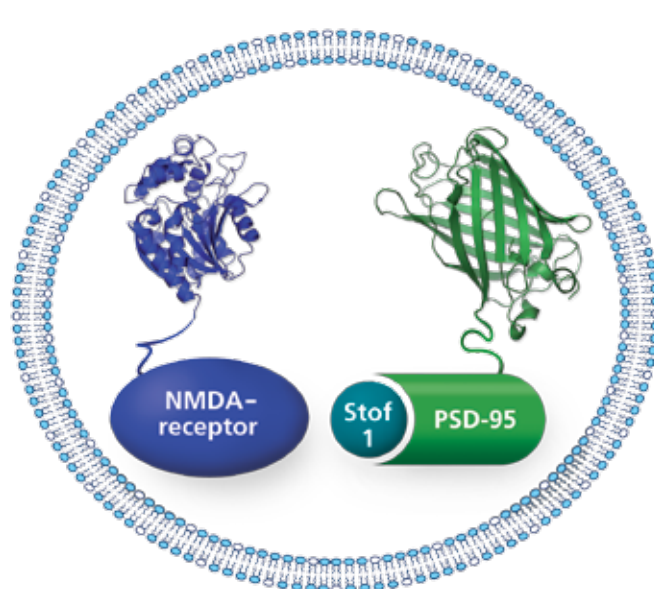


Med udgangspunkt i den kemiske struktur af den del af NMDA-receptoren, som binder til PSD-95, er det lykkedes at designe og fremstille en række stoffer, som binder meget potent til proteinet. Det bedste – stof 1 – binder 20 gange bedre til PSD-95 end NMDA-receptoren selv.

Protein-protein interaktion



Blokeret interaktion



Ved hjælp af metoden bioluminescence resonance energy transfer (BRET) kan man se, om lysende proteiner binder til hinanden inde i en levende celle. Når proteinerne er bundet til hinanden, kan energi overføres imellem dem, hvilket påvirker deres evne til at udsende lys. Ved at måle intensiteten af det udsendte lys, kan man således bestemme, i hvor høj grad stof 1 hæmmer protein-protein interaktionen mellem NMDA-receptoren og PSD-95.

Enzymet nNOS skal fysisk være tæt på NMDA-receptoren for at blive aktiveret og danne nitrogen-oxid. Den tætte kontakt opnås ved hjælp af proteinet PSD-95, som danner en bro mellem receptoren og enzymet. Der er allerede udviklet et modelstof, som kan bryde forbindelsen mellem enzymet og NMDA-receptoren, og en række forsøg har vist, at stoffet kan formindske skaderne efter et slagtilfælde, uden at den normale funktion af NMDA-receptoren påvirkes. Modelstoffet er et peptid, der kan trænge ind i cellen, og dette peptid er nu i klinisk udvikling for behandling af hjerneskader. Peptider er dog ikke optimale lægemidler, fordi de hurtigt nedbrydes i kroppen. Vores mål er derfor at udvikle stabile stoffer, som binder sig til PSD-95 og forhindrer, at proteinet kan danne bro mellem enzymet og NMDA-receptoren.

For at kunne finde stoffer, som kan frakoble PSD-95 fra NMDA-receptoren, har man brug for en metode til at måle, hvorvidt proteinet og NMDA-receptoren binder sig til hinanden. Vi har etableret en sådan metode – fluorescens polarisation – som med stor succes har været benyttet til at finde en række stoffer, som kan bryde interaktionen mellem PSD-95 og NMDA-receptoren. I laboratoriet har vi fremstillet en serie af stoffer, som er op til 20 gange mere potente end det stof, der er i klinisk udvikling. Stofferne er nu ved at blive patenteret.

Lovende lægemiddelstoffer

En ulempe ved metoden er, at NMDA-receptoren og PSD-95 er fjernet fra deres naturlige miljø inde i hjernecellen. Fluorescens polarisation kan således ikke bruges til at vurdere, om de udviklede stoffer kan frakoble proteinet fra NMDA-receptoren i levende celler. For at kunne bestemme dette har vi etableret en anden teknologi – bioluminescence resonance energy transfer – som tillader os at måle vekselvirkninger mellem proteiner, når proteinerne befinder sig inde i en inakt hjernecelle.

Teknologien er baseret på, at proteiner, der kan udsende lys, kan overføre lysenergi til andre proteiner, når proteinerne er meget tæt på hinanden. Derfor kan man ved at måle lysintensiteten fra celler, som indeholder et par lysende proteiner, bestemme, om disse to proteiner binder til hinanden. Desuden kan man måle, om et stof kan hæmme bindingen mellem proteinerne.

Vi har ved hjælp af genmanipulation introduceret lysende versioner af NMDA-receptoren og PSD-95 i levende celler. Vi kan således tilsætte vores aktive stoffer til cellerne og måle, hvor effektivt stofferne er i stand til at bryde vekselvirkningen mellem PSD-95 og NMDA-receptoren. De stoffer, som har en gunstig effekt, kan bruges i det videre arbejde med at udvikle dem til lovende lægemiddelkandidater til behandling af slagtilfælde.

Cand.scient. Anders Bach er ph.d.-studerende på Institut for Medicinalkemi.

Cand.scient. Marie Gottschalk er ph.d.-studerende på Institut for Medicinalkemi.

Ph.d. Anders S. Kristensen er lektor på Institut for Medicinalkemi.

Ph.d. Kristian Strømgaard er professor på Institut for Medicinalkemi.