



Ny human GABA-transportør et muligt mål for behandling af epilepsi

Christiansen, Bolette; Kvist, Trine; Jensen, Anders Asbjørn; Bräuner-Osborne, Hans

Published in:
Lægemiddelforskning

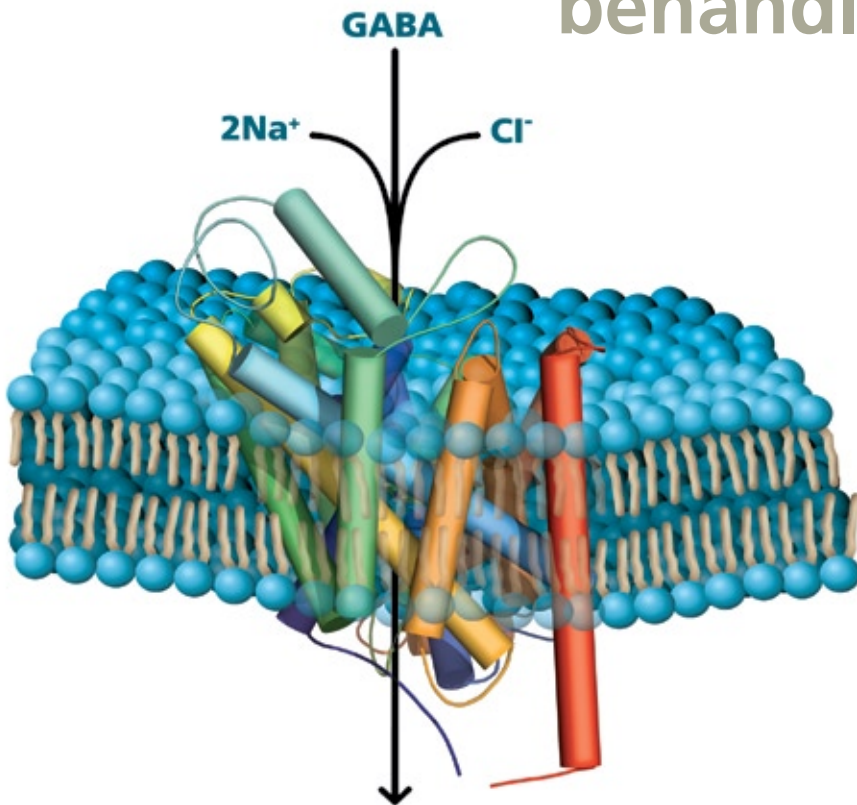
Publication date:
2008

Document version
Også kaldet Forlagets PDF

Citation for published version (APA):
Christiansen, B., Kvist, T., Jensen, A. A., & Bräuner-Osborne, H. (2008). Ny human GABA-transportør: et muligt mål for behandling af epilepsi. *Lægemiddelforskning*, 25-27.

Ny human GABA-transportør

– et muligt mål for behandling af epilepsi



Signalstoffet GABA transporteres fra ydersiden af cellen og ind i cellen ved hjælp af en GABA-transportør. Transporten kan kun foregå, hvis der samtidig sker transport af to natriumioner og en chloridion. Strukturelt består transportøren bl.a. af 12 mindre dele, der går igennem cellemembranen. Delene er angivet med forskellige farver. Dette kaldes et 12 transmembran-domæne.

Sygdomme som epilepsi, depression og Parkinsons sygdom skyldes feilkommunikation i hjernen, som bl.a. kan forklares ved uorden i mængden af signalstoffer. Lægemidler kan rette op på denne uorden og behandle symptomerne på sygdommene. Vi har fundet en ny medspiller i hjernen, der kan få en rolle i behandling af epilepsi.

Af Bolette Christiansen, Trine Kvist, Anders A. Jensen og Hans Bräuner-Osborne

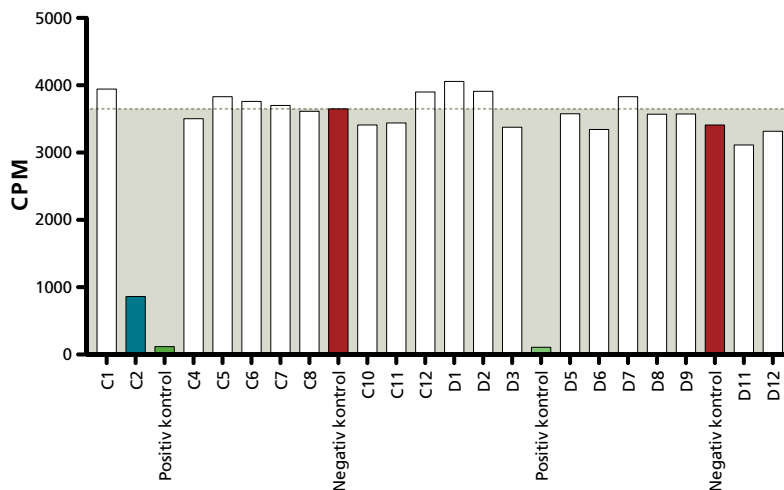
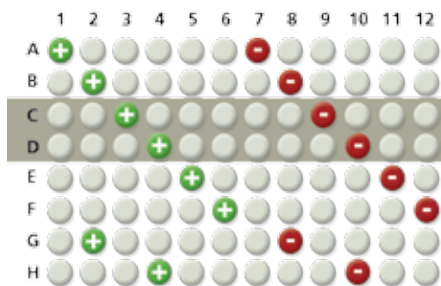
Den menneskelige hjerne består af et kompliceret netværk af celler, der benytter signalstoffer til at kommunikere med hinanden. Der findes både hæmmende og aktiverende signalstoffer, og det er vigtigt for hjernens funktion, at der hele tiden er balance imellem dem. Som et led i opretholdelsen af den hårfine balance benytter hjernen transportører. Det er proteiner, som er indlejret i cellemembranen på cellerne. Transportørerne kan fjerne signalstoffer fra rummet mellem hjernecellerne ved fx at returnere stofferne til de celler, som producerer og udsender dem. På den måde forhindrer

transportørerne, at nabocellerne overstimuleres af for store mængder af et signalstof.

Det vigtigste hæmmende signalstof i hjernen er GABA, også kaldet γ -aminosmørsyre. GABA fjernes fra virkningsstedet i hjernen ved hjælp af GABA-transportører, og derved afsluttes signalstoffets hæmmende signalering. GABA-transportører er proteiner, som specifikt genkender GABA og transporterer signalstoffet fra ydersiden af cellen og ind i cellen. Man kan sammenligne med et security check i lufthavnen. Flypassagerer med et boarding pass kan gå igennem kontrollen og ind i området før gaten, men når de først er kommet igennem, kan de ikke gå tilbage ad den samme vej.

GABA-transportører og epilepsi

GABA-transportører er medicinsk interessante, fordi de er mulige mål for nye lægemidler til behandling af epilepsi. Epilepsi skyldes en overaktivitet i hjernen, som hænger sammen med ubalance mellem to vigtige signalstoffer. Det ene signalstof er glutamat, der medvirker til at øge aktiviteten i hjernen, mens det andet er GABA, der nedsætter aktivitetsniveauet.



Søgning efter hæmmere af GABA-transportøren blev foretaget ved en screening af en samling af 3000 stoffer. Der blev brugt plader med 96 brønde (8 x 12). Her ses et eksempel på en plade samt resultaterne fra række C og D. Der er god adskillelse mellem de positive kontroller (grøn) og de negative kontroller (rød). På pladen fandtes ét stof med effekt på GAT-2, nemlig stoffet i brønd C2 (blå).

Epilepsi kan derfor bl.a. behandles ved at øge mængden af GABA i hjernen. Der findes allerede et lægemiddel, Gabitril® til behandling af epilepsi, hvor det aktive lægemiddelstof specifikt hæmmer en GABA-transportør. Dette lægemiddel forhindrer, at GABA fjernes fra virkningsstedet og medvirker derfor indirekte til at øge mængden af det hæmmende signalstof ved virkningsstedet i hjernen. Resultatet er, at den epileptiske overaktivitet dæmpes.

Opdagelsen af den nye transportør

Fire forskellige GABA-transportører er tidligere blevet klonet fra rottehjerner, og de betegnes GAT-1, BGT-1, GAT-2 og GAT-3. Der er ligeledes fundet fire forskellige GABA-transportører i mus, men fra mennesket har man indtil videre kun klonet tre forskellige transportører, nemlig GAT-1, BGT-1 og GAT-3.

Det undrede os, at GAT-2 ikke var fundet i menneskelige hjerneceller, og vi begyndte derfor at lede efter den manglende humane transportør. En søgning i offentligt tilgængelige databaser over den menneskelige arvmasse – genomet – resulterede i, at vi fandt et gen, der i høj grad lignede genet for GAT-2 fra rotte og mus. Vores efterfølgende undersøgelser viste, at genet ganske rigtigt koder for det protein, som udgør den humane GAT-2-transportør.

GABA-transportører tilhører en familie af Na⁺/Cl⁻-afhængige transportører; dvs. transportører, der kun kan transportere signalstoffet, når der er natriumioner og chloridioner til stede. For at vende tilbage til sammenligningen med et security check kan natriumioner og chloridioner betragtes som boarding pass'et, som er nødvendigt for, at flypassagerer kan få lov til at gå igennem kontrollen.

Strukturelt er disse transportører kendetegnet ved at have et transmembrant domæne, hvor begge ender af proteinet er lokaliseret inde i cellen. En analyse af sekvensen af det fundne genprodukt viste, at dette strukturelle mønster gik igen for GAT-2. Vi kunne også vise, at GAT-2 findes i hjerne, nyre, testikler og lunge, og det tyder på, at GAT-2 har en biologisk og potentielt vigtig funktion i mennesket.

Funktion på molekylært plan

Det næste trin var at vise, at GAT-2 rent faktisk er en transportør, som kan transportere GABA ind i cellen. Det lykkedes os at indføre genet for GAT-2 i et eksperimentelt cellesystem, hvor genet udtrykkes, så vi kan undersøge funktionen af transportøren i cellernes membraner. Vi udviklede derefter to forskellige farmakologiske metoder til at undersøge den nye GABA-transportør.

Ved den første metode brugte vi radioaktivt mærket GABA, som vi tilførte cellerne. Efter et givent tidsrum målte vi mængden af radioaktivt mærket GABA inde i cellerne, og vi kunne derved påvise, at GAT-2 rent faktisk havde transporteret GABA ind i cellen.

Ved den anden metode benyttede vi et fluorescerende farvestof, som kan komme ind i cellen, og som giver et fluorescerende signal, når der sker transport af ioner over cellemembranen. Vi ved, at GABA-transportører kun kan transportere signalstoffer, når der samtidig sker transport af natriumioner og chloridioner. Man kan derfor bruge det fluorescerende signal som et indirekte mål for transport af GABA. Ved denne metode kunne vi også demonstrere transport af GABA via GAT-2.

Hæmmere af GABA-transportører

For tre årtier siden blev nipecotinsyre udviklet på Det Farmaceutiske Fakultet, og stoffet viste sig at være en af de første effektive hæmmere af GABA-transport. Opdagelsen førte til, at Novo Nordisk A/S udviklede lægemidlet Gabitril®, som specifikt hæmmer GAT-1. Der er dog endnu ikke fundet specifikke og effektive hæmmere af de tre andre underarter af GABA-transportører, heriblandt GAT-2. Vi ønskede derfor at lede efter nye ke-



Til eksperimentel undersøgelse af GABA-transportøren benyttes bl.a. denne fortyndingsrobot. Maskinen kan nemt og hurtigt lave fortyndinger af kemiske stoffer og bruges sammen med farmakologiske metoder til at karakterisere effekten af kemiske stoffer på transportøren.

miske stoffer, der kan hæmme transporten af GABA. Vi har en samling af 3000 stoffer, der alle ud fra deres kemiske struktur anses for at være egnede til fremtidig udvikling af lægemidler. Man kan undersøge effekten af disse stoffer på GAT-2 ved at foretage en screening, hvor man tester hvert stof i én koncentration og ser om det har effekt eller ej. Succesen af en sådan screening afhænger i høj grad af adskillelsen mellem positive og negative kontroller, dvs. om man med sikkerhed kan afklare, om et stof har en virkning. Man ønsker således hverken at få falske negative resultater, fordi man derved går udenom potentielt interessante stoffer, eller falske positive resultater, fordi man så efterfølgende skal udføre et stort arbejde for at afklare, hvilke stoffer der i virkeligheden har en effekt.

Vi etablerede et screeningsystem, hvor der var rigtig god adskillelse mellem de positive og negative kontroller, og derfor kunne vi med høj sikkerhed identificere stoffer med effekt på GAT-2. Ved screeningen fandt vi i alt otte stoffer, som har effekt på GAT-2. Vi er nu i gang med at undersøge, hvil-

ke af disse stoffer der er mest interessante; dvs. hvilke stoffer der både virker specifikt og effektivt på GAT-2.

GAT-2 og sygdomme

Vi mangler endnu at opnå en tilbundsående forståelse af sammenhængen mellem GAT-2 og epilepsi – eller andre hjerne sygdomme, som er relateret til GABA-signalering. Forskere fra Det Farmaceutiske Fakultet har for nyligt været med til at vise, at GABA-transportøren BGT-1 kan have en vigtig rolle i hjernen og muligvis være relevant i behandling af epilepsi. Et kemisk stof, der var udviklet til at kunne hæmme BGT-1 (EF1502, se side 22-24), var årsagen til, at forskerne kunne nå til denne konklusion.

Hvis vi på tilsvarende måde kan finde et kemisk stof, som effektivt kan hæmme GAT-2 vil vi kunne sige meget mere om den fysiologiske funktion af den nyopdagede transportør og afklare, om transportøren kan være vigtig i behandling af sygdomme som fx epilepsi.

Cand.pharm. Bolette Christiansen er ph.d.-studerende på Institut for Medicinalkemi.

Cand.pharm. Trine Kvist er ph.d.-studerende på Institut for Medicinalkemi.

Ph.d. Anders A. Jensen er lektor på Institut for Medicinalkemi.

Dr.pharm. Hans Bräuner-Osborne er professor på Institut for Medicinalkemi.