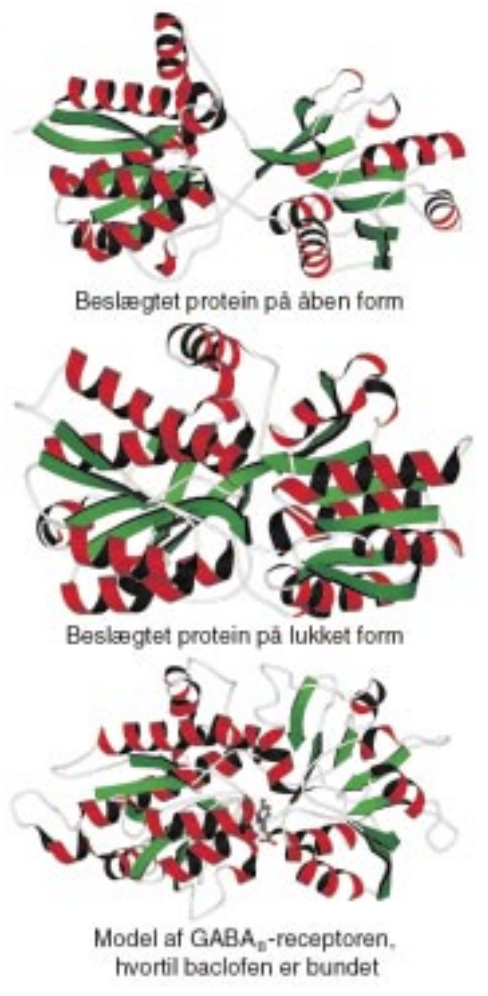


3D-modeller fremmer forståelsen af samspillet mellem receptor og lægemiddelstof

GABA_B receptorerne på hjernens nerveceller er et mål for lægemidler mod bl.a. spasticitet. Moderne computermetoder gør det muligt at modellere den tredimensionelle struktur af den del af receptoren, som binder lægemiddelstoffer.

Af Flemming Steen Jørgensen, Karla Frydenvang, Hans Bräuner-Osborne og Kurt Kristiansen



Realistiske tredimensionelle modeller af organismens makromolekyler kan i dag konstrueres med computermetoder. Modellerne øger forståelsen for, hvordan molekylerne påvirker hinanden og gør det muligt - på rationel vis - at designe nye lægemiddelstoffer.

Tilbage i 1981 opdagede Bowery og medarbejdere, at den kemiske forbindelse baclofen specifikt aktiverede en hidtil ukendt receptor, som blev reguleret af signalstoffet gamma-aminosmørsyre (GABA). Det viste sig hurtigt, at der var tale om en receptor, som ikke havde andet til fælles med den allerede kendte GABA_A-receptor, end at de begge blev aktiveret af det samme signalstof. I de følgende år blev den nye receptor karakteriseret farmakologisk og blev døbt GABA_B-receptoren.

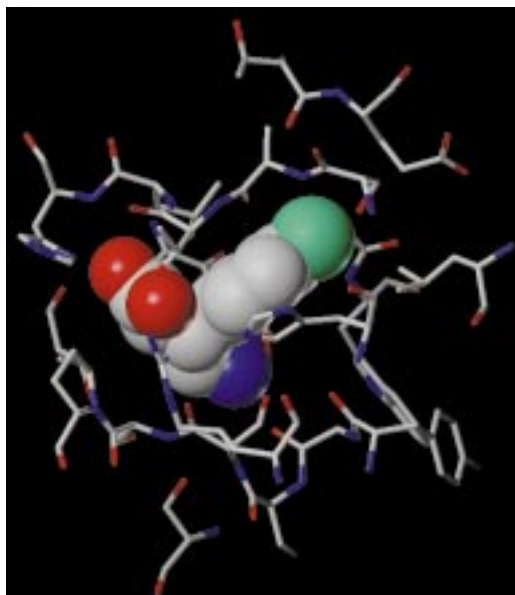
Først i 1997 skete det næste store fremskridt inden for området, idet receptorens aminosyresekvens blev bestemt. Det var nu muligt endtydigt at identificere GABA_B-receptoren som en receptor i cellemembranen, der aktiverer G-proteiner i nervecellerne. G-proteinerne er cellernes omstillingsbord, som omsætter ydre stimuli til interne reaktioner.

GABA_B-receptoren afviger funktionelt fra flertallet af nervecellernes receptorer, og den tredimensionelle struktur af GABA_B-receptoren er fortsat ukendt. Man ved imidlertid, at en stor del af receptoren er placeret udenfor cellemembranen, og man formoder, at signalstoffer og lægemiddelstoffer bindes til denne del af receptoren.

Med denne viden som udgangspunkt besluttede vi i slutningen af 1998 at konstruere en tredimensionel model af GABA_B-receptorens extracellulære del. En sådan model vil gøre det muligt at forklare sammenhængen mellem molekylær struktur og biologisk aktivitet for forbindelser, som stimulerer GABA_B-receptorerne og måske også for forbindelser, som blokerer dem. Dét vil forbedre mulighederne for at designe nye lægemiddelstoffer, som påvirker receptoren.

Baclofen, som oprindeligt blev brugt til at identificere GABA_B-receptoren, bruges i dag som muskelafslappende lægemiddel til behandling af spastiske kramper. GABA_B-receptoren er samtidig et potentielt mål for lægemiddelstoffer til behandling af andre sygdomme i centralnervesystemet, bl.a. depression.

Den tredimensionelle struktur af den del af GABA_B-receptoren, som binder signalstoffer og lægemiddelstoffer. Modellen er baseret på homologibygning, hvor man benytter kendte proteinstrukturer til at forudsige ukendte strukturer. Receptoren kan antage to former, en åben form, hvor bindingstedet er tomt, og en lukket form, når GABA eller baclofen binder til receptoren. Øverst ses den beslægtede proteinstruktur, som er anvendt ved modelleringen af den åbne form. I midten ses den beslægtede proteinstruktur, som er anvendt ved modelleringen af den lukkede form. Nederst vises den færdige model af den del af GABA_B-receptoren, hvortil baclofen bindes. Alpha-helices er farvede røde og beta-sheets grønne.



Modelbygning af proteiner

GABA_B-receptoren er et protein. Proteiner er opbygget af aminosyrer, der er koblet sammen som perler på en snor. Ved sekventering bestemmer man rækkefølgen af aminosyrerne i et protein. I cellerne foldes den lange perlekæde af aminosyrer sammen, og det er den endelige tredimensionelle struktur, som bestemmer proteinets funktion.

Den tredimensionelle struktur af proteiner bestemmes eksperimentelt med NMR-spektroskopi eller røntgenkristallografi. I øjeblikket rapporteres dagligt strukturen af 5-6 nye proteiner, men antallet af proteiner der sekventeres vokser endnu hurtigere. Derfor er der betydelig interesse i at udvikle metoder, som kan forudsige den tredimensionelle struktur af proteiner.

Det er i dag muligt at konstruere nøjagtige tredimensionelle modeller af et protein efter et princip, der kaldes homologbygning. Proteiner, der er evolutionært beslægtede, eller homologe, har med stor sandsynlighed næsten den samme tredimensionelle struktur. Det betyder, at såfremt man kender den tredimensionelle struktur af et eller flere beslægtede proteiner, kan man konstruere en tredimensionel model af det ukendte protein.

Et af de vigtigste trin i homologbygningen er valget af, hvilken tredimensionel struktur modelbygningen skal baseres på. Samtidig må man afklare, hvor stor en del af den udvalgte struktur, der er fælles for de homologe proteiner og hvor stor en del, der skal modificeres i modelleringen af det ukendte protein. Dette kræver, at sekvensen af det ukendte protein sammenlignes med sekvensen og den tredimensionelle struktur af flest mulige homologe proteiner.

Det første skridt i modelbygningen af GABA_B-receptoren var at finde de proteiner, der kunne bruges som udgangspunkt. Det blev hurtigt klart, at vores model skulle baseres på en række aminosyrebindende proteiner, hvis tredimensionelle struktur var bestemt eksperimentelt ved hjælp af røntgenkristallografi. Disse proteiner er involveret i transport af aminosyrer og forefindes i to former, en lukket form, hvor en aminosyre er bundet til proteinet, og en åben form, hvor der ikke er bundet noget til proteinet.

Lægemedelstoffet baclofen, som bruges til at dæmpe muskelkrampe hos spastikere, ses her bundet til GABA_B-receptoren. Baclofen er vist som en rumopfyldende model, mens receptorens aminosyrer er vist som pinde. Atomerne er farvede efter atomtype, dvs. kulstof hvide, nitrogen blå, oxygen røde og chlor grønt.

Fra kendte proteiner til GABA_B-receptoren

Vi valgte at gå ud fra strukturen af et leucin-isoleucin-valin bindende protein, fordi dette protein havde størst sekvenslighed, 22% identitet, med GABA_B-receptoren. Her kender man kun strukturen af den åbne form. Ved at sammenligne og udnytte sekvensvariationen i forskellige aminosyrebindende proteiner og andre receptorer var det muligt at identificere, hvilke områder, der repræsenterede de strukturelt konserverede dele, og som derfor kunne tages direkte fra strukturen af vort udgangsprotein.

For at få en så nøjagtig model som muligt, blev de to halvdele af den bindende del af GABA_B-receptoren modelbygget uafhængigt af hinanden. Baseret på strukturen af et beslægtet protein, der forefindes på den lukkede form, blev de to domæner dernæst placeret i forhold til hinanden. Næste trin i modelbygningen var at placere baclofen i receptoren. Derefter blev modellen af komplekset forfinet ved hjælp af molekylodynamiske simuleringer for at sikre, at strukturen var så realistisk som mulig. Denne proces blev gentaget adskillige gange og den bedste model udvalgt for det videre arbejde.

Baclofen kan opfattes som en analog af GABA med en ekstra aromatisk gruppe. I den endelige model antager GABA-delen af baclofen en udstrakt konformation, mens den aromatiske gruppe er placeret i en lomme mellem de to halvdele af GABA_B-receptoren.

Evaluering af modelberegningen

For at modellen kan bruges i forbindelse med design af nye lægemiddelstoffer, er det et ufravigeligt krav, at den kan forklare eksisterende struktur-aktivitetsdata.

Som udgangspunkt for evalueringen brugte vi (*R*)- og (*S*)-baclofen, der kemisk er helt ens, men som er spejlbilledformer, dvs. de forholder sig til hinanden som en højre hånd til en venstre hånd. De to spejlbilledformer blev nu placeret i receptormodellen ved hjælp af et program, der genererer tusindvis af mulige orienteringer og udvælger de mest sandsynlige ud fra strukturelle kriterier.

Det viste sig - heldigvis - at (*R*)-baclofen bindes bedre til modellen end (*S*)-baclofen, hvilket er i god overensstemmelse med eksperimentelle data.

Med henblik på endeligt at verificere modellen er en række punktmutterede receptorer blevet klonet og testet for binding af baclofen. Her har man primært valgt at mutere de aminosyrer, som har kontakt med baclofen. Foreløbige resultater viser sig at være i god overensstemmelse med modellen. Alt tyder således på, at modellen af GABA_B-receptoren er realistisk, samt at den kan anvendes til design af nye forbindelser.



Lic.scient. Flemming Steen Jørgensen er docent ved Institut for Medicinalkemi.



Lic.pharm. Karla Frydenvang er forskningslektor ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Hans Bräuner-Osborne er forskningsadjunkt ved Institut for Medicinalkemi.



Dr.scient. Kurt Kristiansen var i 1998-99 tilknyttet Institut for Medicinalkemi som post-doctoral fellow via et DANVIS-stipendium.