

Molekylær farmakologiske subtyper



Professor, dr. pharm., Ph.D.
Hans Bräuner-Osborne, Institut for Medicinalkemi, Det Farmaceutiske Fakultet, Københavns Universitet. Modtager af Lundbeckfondens Pris for Yngre Forskere 2006.

Udvikling af lægemidler har gennemgået en radikal ændring siden Hippocrates blev lægekunstens fader i 460 B.C. Fra at medicin, som f.eks. opium, blev kendt via empirisk brug af planter, er lægemiddeludvikling i dag præget af rationelt design af stoffer med en ønsket farmakologisk virkning på et specifikt mål molekyle (*target*) i kroppen. Denne proces er dog ikke opstået fra den ene dag til den anden, men er gået gennem adskillige udviklingsfaser. Ved udvikling af nye selektive stoffer i 70erne og 80erne blev man således i stigende grad klar over eksistensen af subtyper og isoformer af receptorer, transportører, ionkanaler og enzymer i forskellige organer og hjerneregioner. Dette førte til udvikling af nye lægemidler med færre bivirkninger, idet man mere specifikt kunne ramme det syge organ. Den selektive histamin H₂ receptor antagonist cimetidin og den selektive adrenerge β₂ receptor agonist salbutamol er klassiske eksempler på denne udvikling.

I begyndelsen af 80erne klonedes DNA for de første receptorer, ionkanaler og enzymer, og i det efterfølgende årti blev tusindvis flere klonet. Det viste sig hurtigt, at mange af observationerne fra organfarmakologien kunne forklares med eksistensen af subtyper af disse targetmolekyler. Hermed blev molekylær farmakologien født, idet hver enkelt subtype kunne udtrykkes i cellelinier og ved hjælp af effektive biokemiske assays kunne man profi-

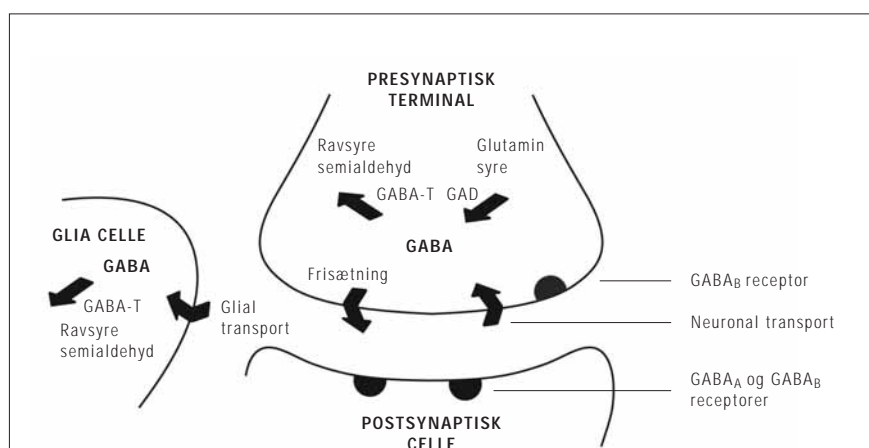
lere nye stoffers subtype selektivitet med hidtil uset præcision og hastighed. I løbet af 90erne blev disse biokemiske metoder udviklet yderligere og ved implementering af robotter kunne man udvikle *high-throughput screening* (HTS) hvor tusindvis af stoffer kunne testes om dagen.

I 90erne blev *high-throughput* DNA sekventering også udviklet, bl.a. ved implementering af robotter som ved HTS screening. Dette gjorde det muligt at sekventere hele genomer (arvematerialet), hvilket kulminerede i 2001 med publicering af det humane genom, der gjorde det muligt at identificere og klonede de sidste subtyper og isoformer af receptorer, transportører, ionkanaler og enzymer. Man har således fået et fuldstændigt overblik over antallet af receptor- og transportør subty-

per for hjernens forskellige signalstoffer som f.eks. γ-aminosmørsyre (GABA) – den vigtigste og mest udbredte hæmmende neurotransmitter i centralnervesystemet (CNS).

GABA – HJERNENS HÆMMENDE SIGNALSTOF

En typisk GABAerg synapse er skitseret i fig. 1. Det ses, at GABA dannes i præsynapsen ud fra glutaminsyre via dekarboxylering med enzymet glutaminsyre dekarboxylase (GAD). GABA oplagres i vesikler og frisættes til synapsen, når neuronene aktiveres. Den frisatte GABA vil herefter aktivere såvel præ- og postsynaptiske receptorer, hvorefter GABA genoptages præsynaptisk og i de omliggende gliaceller via en energikrævende GABA-transportør.



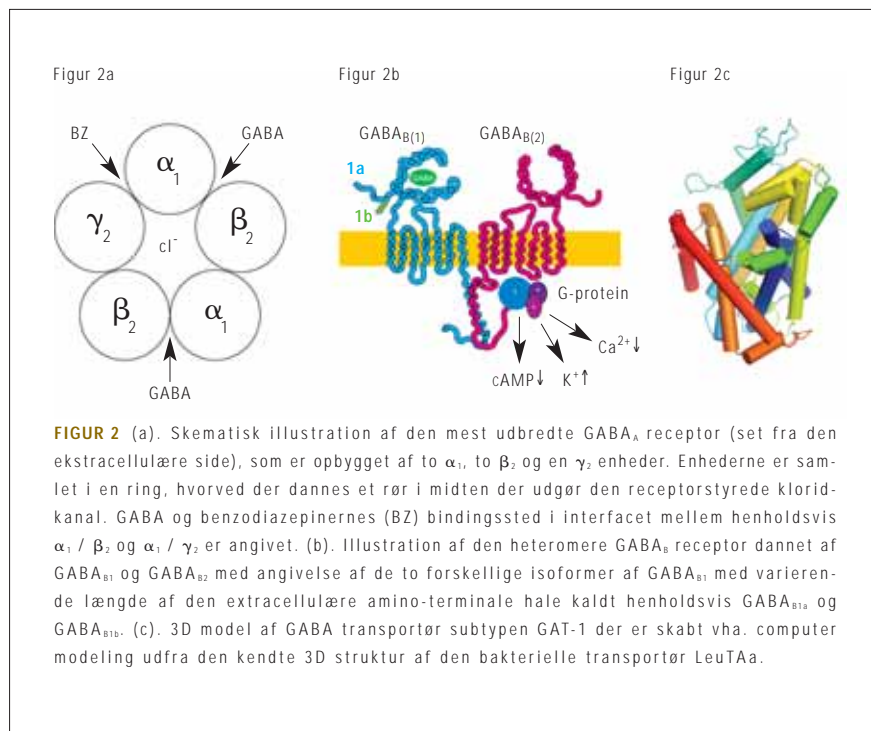
FIGUR 1 Skematisk illustration af en typisk GABAerg synapse med angivelse af GABA's biosyntese og metabolisering, transportmekanismer og receptorer. Ved transmission fra den præsynaptiske nervecelle frigives signalstoffet GABA til spalten mellem de to celler. Herefter aktiveres GABA receptorer på både den præ- og postsynaptiske nervecelle, hvor førstnævnte fungerer som auto-feedback, der hæmmer yderligere frigivelse af GABA fra præsynapsen. Signalet ophører ved at GABA transportører "suger" GABA tilbage i præsynapsen og i de omliggende glia celler. GAD: glutaminsyre dekarboxylase. GABA-T: GABA-transaminase.

Den optagne GABA vil delvist blive genanvendt præsynaptisk, mens den resterende del nedbrydes til ravsyresemialdehyd og ravsyre med enzymerne GABA-transaminase (GABA-T) og ravsyre dehydrogenase. Ravsyren indgår herefter i citronsyrecyklus.

På baggrund af farmakologiske data er GABA receptorerne blevet inddelt i GABA_A og GABA_B receptorer. GABA_A receptorerne er receptorstyrede ionkanaler, der ved aktivering fører til åbning af en kloridkanal. Herved følger klorid-ionerne den elektrokemiske gradient, hvilket i de fleste tilfælde betyder en transport af klorid-ioner ind i cellen. Cellen bliver herved hyperpolariseret og dermed sværere at depolarisere ved efterfølgende stimulative input. GABA_B receptoren er G-protein koblet og hæmmer dannelsen af cyklisk AMP (cAMP). Postsynaptisk fører aktivering af GABA_B receptoren endvidere til åbning af en kaliumkanal, hvilket fører til hyperpolarisering. Præsynaptisk fører aktivering af GABA_B receptoren til lukning af en calciumkanal og reduktion af den intracellulære calcium koncentration, hvilket er med til at stoppe yderligere frisættelse af GABA. GABA_B receptoren er således også inhibitorisk, men har endvidere en vigtig feedback funktion i synapsen.

GABA SYSTEMETS SUBTYPER

18 forskellige GABA_A receptor enheder er blevet klonet og opdelt i syv forskellige familier, hvor hovedparten har beslægtede enheder: α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ og ρ_{1-3} . Som det fremgår af fig. 2 er en funktionel GABA_A receptor opbygget af fem enheder samlet i en ring omkring et rør i midten, der udgør klorid-kanalen. Teoretisk er der således tusindvis af mulige kombinationer



af de 18 enheder, men det har vist sig, at der kun dannes relativt få kombinationer *in vivo*. Receptorer bestående af to α_1 , α_2 , α_3 eller α_5 enheder sammen med to β_1 , β_2 eller β_3 enheder og én γ_2 eller δ enhed er således de mest udbredte. F.eks. er $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ receptoren den mest dominerende subtype, der stort set er udtrykt i alle CNS regioner, mens andre receptor kombinationer har mindre udbredelse og er mere specifikt udtrykt. GABA binder til interfacet mellem α og β enhederne, mens benzodiazepinerne (mest anvendte lægemiddelgruppe indenfor GABA systemet, hvor *diazepam* og *valium* er de klassiske eksempler) binder til interfacet mellem α og γ enhederne.

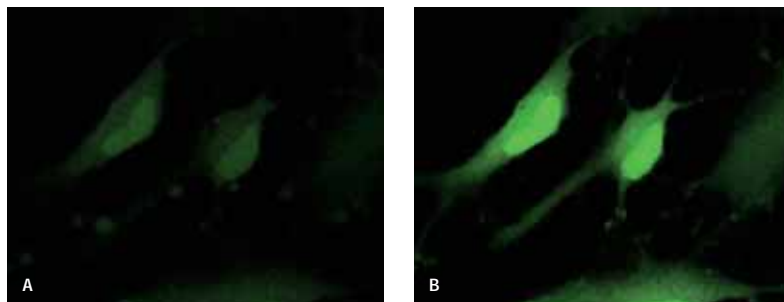
GABA_B receptoren er en heterodimer sammensat af de to enheder; GABA_{B1} og GABA_{B2} (fig. 2b). Hovedparten, hvis ikke alle funktionelle GABA_B receptorer består af disse to enheder, og det er således ikke umiddelbart muligt at opnå subtype selektivitet indenfor GABA_B receptoren. Der er dog blevet identificeret to forskellige isoformer af GABA_{B1} med varierende længde af den extracellulære amino-terminale hale kaldt henholdsvis GABA_{B1a} og GABA_{B1b}.

Endelig er der blevet identificeret fire forskellige subtyper af GABA transportører, der alle bruger co-transport af natrium ioner som energikilde til at transportere GABA mod dens koncentrationsgradient.

Samlet set er der således en lang række subtyper indenfor GABA systemet, som alle er potentielle lægemiddel *targets*. Op-gaven er så "blot" at finde ud af, hvilke subtyper der er involveret i de forskellige sygdomsprocesser og derefter udvikle selektive stoffer, der specifikt rammer disse subtyper.

FLUORESCENS VISER FARMAKOLOGI

For at nå målet, at udvikle subtype selektive stoffer, har man udviklet nye farmakologiske HTS testsystemer, som hurtigt kan karakterisere nyudviklede stoffer på en række forskellige receptorsubtyper, der udtrykkes individuelt i cellelinier. Endvidere åbner disse teknologier mulighed for at udføre screening af stofbiblioteker, som kan føre til nye kemiske strukturer med nye farmakologiske egenskaber såsom øget subtype selektivitet. De mest udbredte testsystemer er baseret på fluorescerende stoffer, der øger deres fluorescens, når de



FIGUR 3 A. Konfokal mikroskopi billede af to celler transfekteret med en ionotrop glutamat receptor og loaded med stoffet Fluo-4, der fluorescerer grønt når det binder calcium ioner. B. Billede af de samme celler, der er blevet aktiveret med glutamat, hvorved der strømmer calcium ind i cellen, hvilket fører til kraftigt grøn fluorescens fra Fluo-4 markøren.

f.eks. binder calcium eller membranpotentialet over cellemembranen ændres (fig. 3). Hermed kan aktivering af langt de fleste receptorer og den natrium afhængige transport af signalstoffer hurtigt og billigt måles i samme apparat. På denne vis er der således udviklet fluorescens baserede assays for både GABA_A og GABA_B receptorer samt GABA transportører, som anvendes i forbindelse med testning af nyudviklede kemiske stoffer.

Knockout mus

Et af hovedformålene med udviklingen af GABA ligander er at tilvejebringe nye subtype selektive stoffer, som efterfølgende vil kunne anvendes til at undersøge den fysiologiske funktion og det terapeutiske potentiale af de enkelte subtyper. En anden vej til at nå dette mål er anvendelse af knockout mus, hvor de enkelte receptor-subtyper fjernes fra musens arvemateriale, hvorefter man sammenligner analyser af disse knockout mus med den oprindelige vildtype mus. Forekomsten af de tidligere nævnte GABA_{B1a} og GABA_{B1b} isoformer af GABA_B receptoren havde afstedkommet nogen undren. Da variationen sidder langt fra GABA's bindingssted (fig. 2) kunne man ikke identificere stoffer, der kunne differentiere mellem de to isoformer, og valgte derfor at gå den lange vej og lave to

knockout mus, der henholdsvis manglede GABA_{B1a} (1a^{-/-}) og GABA_{B1b} (1b^{-/-}). Fem år efter påbegyndelsen af projektet var de genetisk modificerede mus fremstillet og analyseret, og der viste sig meget spændende resultater, idet de to isoformer har forskellig lokalisering i synapsen og forskellig funktion i forbindelse med f.eks. indlæring og hukommelse.

FANTASY'S VIRKNINGSMEKANISME

Endeligt kan man kombinere de to metoder, selektive stoffer og knockout mus, til at opnå ny viden om stoffers virkningsmekanisme *in vivo*. F.eks. havde det længe

været diskuteret, hvordan rusmidlet gamma-hydroxysmørsyre (GHB, *Fantasy*) virkede *in vivo*. Nogle mente der eksisterede en decideret GHB receptor, mens andre mente at stoffet virkede via aktivering af GABA_B receptoren. For at løse denne gåde blev stoffet givet til vildtype mus og til mus, der havde fået fjernet GABA_{B1} receptoren. Den efterfølgende analyse af musene viste, at alle kendte effekter af GHB var tilstede i vildtype musene, mens de var fjernet i GABA_{B1} knockout musene. Interessant nok bandt GHB stadig til hjernen hos GABA_{B1} knockout musene på samme måde som til vildtype musene, så det er muligt, at der eksisterer en GHB receptor, som dog i givet fald stadig skulle føre til aktivering af GABA_B receptoren (f.eks. via øget GABA frigivelse). Først når proteinet, der binder GHB i knockout musen, bliver identificeret, får vi endelig vished for om GHB virker direkte eller indirekte på GABA_B receptoren. Derfor jages dette protein nu for at man kan komme helt til bunds i problematikken.

MOLECULAR PHARMACOLOGICAL SUBTYPES

γ -Aminobutyric acid (GABA) is the most important inhibitory neurotransmitter in the central nervous system (CNS). Upon release into the synapse, GABA activates GABA_A and GABA_B receptors, which belong to the families of ligand-gated ion channels and G-protein coupled receptors, respectively. Signal transmission is terminated by GABA re-uptake into neurons and glia cells by GABA transporters. A number of receptor and transporter subtypes have been identified and are currently being pursued as targets for the development of novel drugs. A key point in this regard is to achieve subtype selectivity in order to develop effective drugs with fewer side effects. To reach this goal, highly efficient pharmacological assays for numerous subtypes based on fluorescence markers of cell activation have been developed. They are employed to characterise novel compounds targeting the GABA system. In addition, a number of genetically modified mice with targeted disruption of individual GABA_B receptor subtypes have been generated and analysed. The combination of novel selective compounds and genetically modified mice provides a strong platform for understanding the complex physiology of the individual receptor and transporter subtypes forming the basis for GABA neurotransmission.