

KAN FORSTÅElsen AF ET ENZYM LØFTE HUMØRET?

Et nyt forskningsprojekt skal afklare samspillet mellem strukturen og funktionen af et enzym, som spiller en central rolle i produktionen af "humørmolekylet" serotonin i hjernen.

Enzymet kan nemlig være et interessant mål for nye lægemidler mod depression.

Om forfatteren
Carsten R. Kjær
Aktuel Naturvidenskab
crk@aktuelnaturvidenskab.dk



**DANMARKS FRIE
FORSKNINGSFOND**
INDEPENDENT RESEARCH
FUND DENMARK

Artiklen er sponsoreret af Danmarks Frie Forskningsfond | Natur og Univers.

Danmarks Frie Forskningsfond dækker alle videnskabelige hovedområder og uddeler hvert år godt 1 mia. kr. til forskningsprojekter baseret på forskernes egne ideer. Danmarks Frie Forskningsfond består af 84 anerkendte forskere udpeget på baggrund af deres høje faglige kompetence. Formand for Danmarks Frie Forskningsfond | Natur og Univers er professor ved Aarhus Universitet, Lars Arge. Læs mere på www.dff.dk

Tænk, hvis et enkelt molekyle alene regulerede vores humør. Så kunne man måske en gang for alle udrydde depression som folkesygdom ved at kontrollere mængden af dette molekyle i kroppen. Og man kunne undgå de daglige eller årstidsbestemte humørsvingninger med et tilskud af dette molekyle. Det kan lyde tillukkende, men så enkel er verden – desværre – ikke.

Et af de molekyler, som man dog ved spiller en rolle for vores humør og en række andre vigtige mentale fænomener som aggression og hukommelse, er signalstoffet serotonin. Siden slutningen af 1960'erne har man været klar over, at mangel på serotonin i hjernen kan være en faktor i udviklingen af depression. Det har været baggrunden for udviklingen af den klasse af antidepressiv medicin kaldet SSRI, som blandt andet den danske lægemiddelvirksomhed Lundbeck har haft stor succes med. Denne type medicin virker ved at gribe ind i de

biokemiske processer, der er med til at regulere niveauet af serotonin i hjernen.

På trods af, at der i efterhånden mange år har været stor videnskabelig og kommerciel interesse forbundet med at forstå, hvordan produktionen af serotonin reguleres i vores krop, er der stadig store huller i vores viden. På institut for Kemi på DTU står lektor Günther Herbert J. Peters i spidsen for et projekt finansieret af Danmarks Frie Forskningsråd | Natur og Univers, hvor han sammen med kolleger fra DTU, Københavns Universitet og University of Manchester vil lægge en af de manglende brikker i det komplicerede puslespil. Forskerne håber, at projektet vil være med til at åbne nye veje at gå for udvikling af lægemidler mod depression.

To veje til serotonin

Serotonin er som nævnt et signalstof (en neurotransmitter), og det betyder, at molekylet medvirker til

at overføre signaler mellem nerveceller. Serotonin dannes i kroppen ud fra tryptophan, som er en essentiel aminosyre – det vil sige en livsnødvendig aminosyre, som kroppen ikke selv kan danne ved stofskifte, så den skal optages via proteiner i kosten. Omdannelsen af tryptophan til serotonin er en kompliceret affære. Og i virkeligheden er der to forskellige signalveje, der fører til dannelsen af serotonin. Det har nemlig vist sig, at langt størstedelen af kroppens serotonin ikke findes i hjernen, men i fordøjelsessystemet, hvor det er med til at regulere tarmens bevægelser. Serotonin kan imidlertid ikke passere den såkaldte blod-hjerne-barriere, og derfor skal den serotonin, som hjernen har brug for, altså produceres direkte i hjernevævet. I en årrække var det lidt af et mysterium, hvordan det gik til. Men så opdagede man en ny variant af et enzym kaldet tryptophan-hydroxylase, der spiller en afgørende rolle i omdannelsen af tryptophan til serotonin. Og det

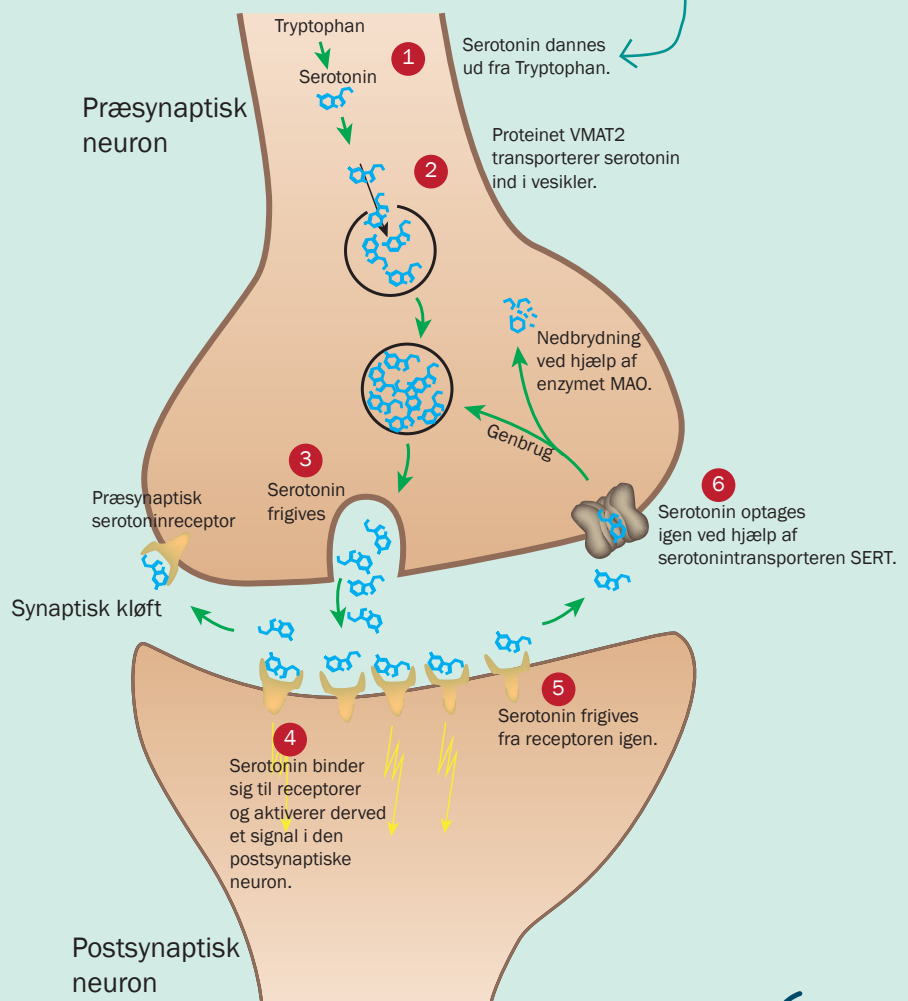
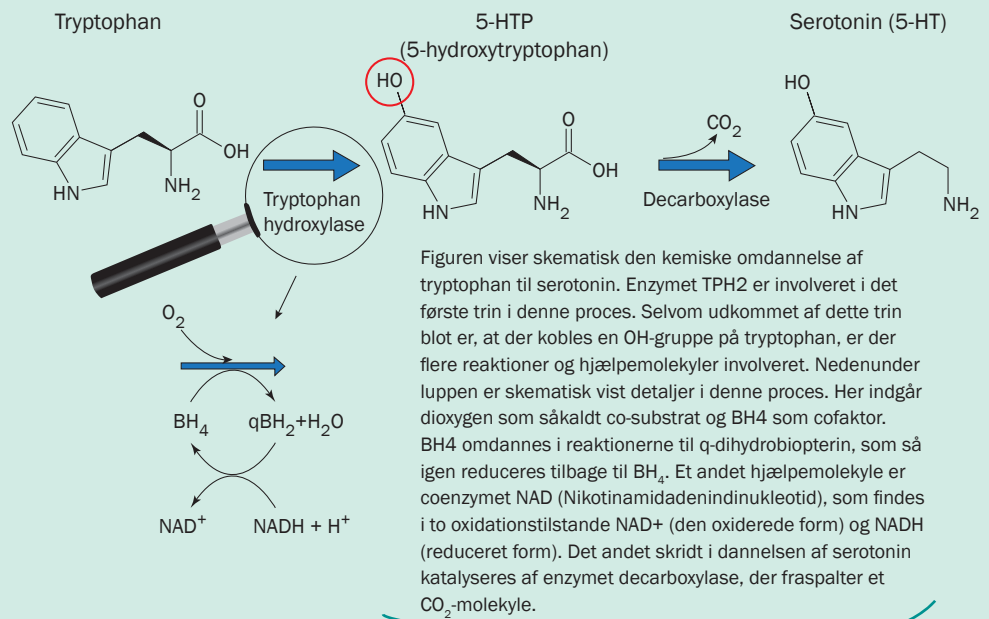
Serotonin i hjernen

Figuren nederst viser den overordnede forståelse af, hvordan serotonin opfører sig i hjernen i kontaktfladen mellem to nerveceller (neuroner). En sådan kontaktflade kaldes en synapse, og de to nerveceller kaldes henholdsvis den præsynaptiske og postsynaptiske neuron. Førstnævnte afgiver impulsen, mens den sidstnævnte er modtageren. Serotonin dannes i den præsynaptiske neuron ud fra tryptophan, og det transporteres herefter med enzymet VMAT2 ind i såkaldte vesikler. Herefter bringes serotonin til enden af neuronen, hvor det frigives i mellemrummet mellem de to celler. På den postsynaptiske neuron sidder særlige serotoninreceptorer, og når serotonin binder sig til disse, aktiveres et signal, der fortsætter gennem cellen. Der sidder også serotoninreceptorer på den præsynaptiske neuron, som spiller en rolle i forhold til at regulere frigivelsen af serotonin.

Et protein kaldet serotonintransporteren bringer serotonin ind i den præsynaptiske neuron igen, og her bliver en del af det genbrugt, mens en del nedbrydes af enzymet Monoamin-oxidase (MAO).

Serotonintransporteren (blot kaldet SERT) er det specifikke mål for den klasse af antidepressive lægemidler kaldet SSRI (*selective serotonin reuptake inhibitors*), som med et noget uheldigt udtryk populært er blevet kaldt "lykkepiller". Disse lægemidler virker ved at blokere "genoptagelsen" af serotonin, hvilket betyder at der forbliver mere serotonin i den synaptiske kløft. Det vil alt andet lige betyde, at mere serotonin kan binde sig til receptorer på den postsynaptiske neuron og dermed sikre, at nervesignalerne overføres effektivt mellem cellerne.

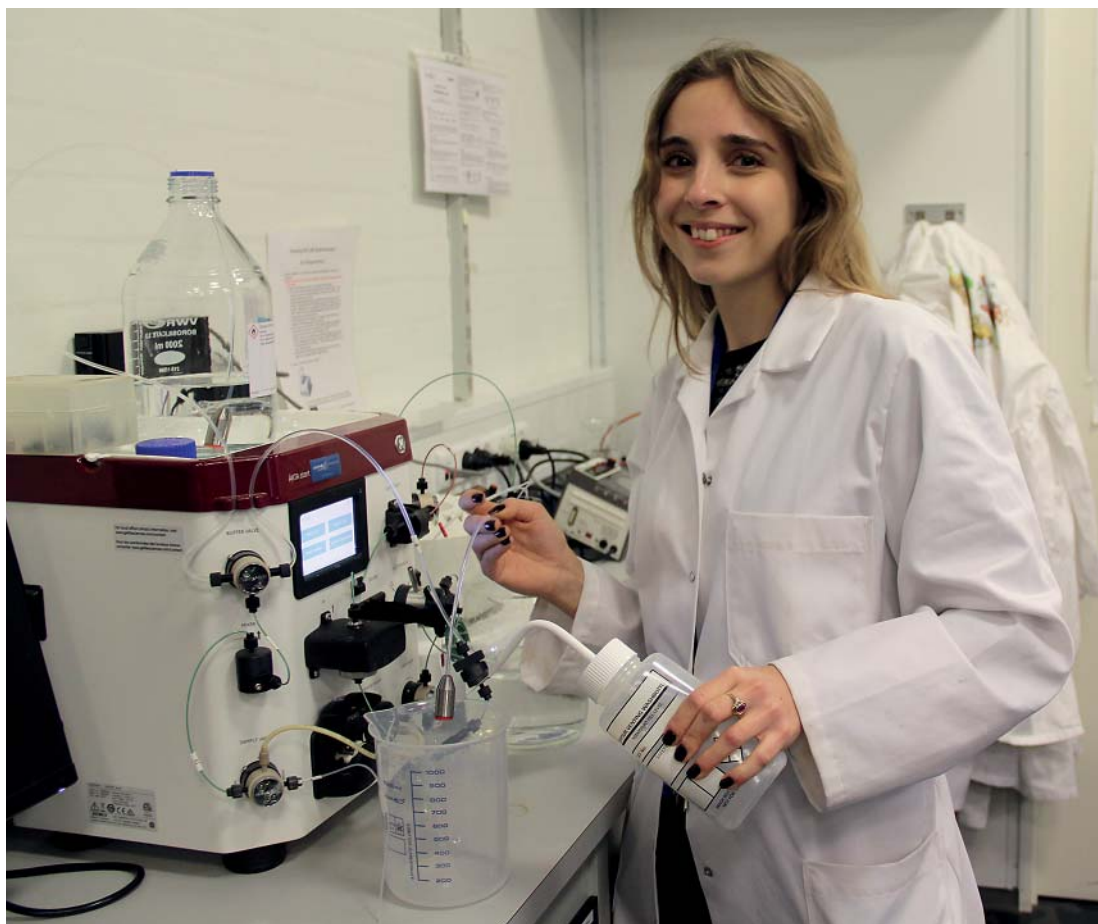
Hvis man kan udvikle lægemidler, der har enzymet TPH2 som mål (altså det enzym, som Günther H.J. Peters og kolleger interesser



sig for), vil det gribe ind et helt andet sted i serotonin-systemet – ved punkt 1 på figuren, hvor tryptophan omdannes til seroto-

nin. Hvis man kan øge aktiviteten af TPH2, vil der simpelthen blive produceret mere serotonin i nervecellen.

Ph.d.-studerende Natalia Teresa Skawinska arbejder også på projektet. Her er hun i færd med at betjene HPLC-udstyr (højtrykssvæskrokromatografi), som bruges til at adskille de enkelte komponenter i en prøve, hvorefter de kan bestemmes og kvantificeres.
Foto: Anne Frejberg



er denne "nye" variant af enzymet, som dette forskningsprojekt konkret drejer sig om.

Helt overordnet foregår omdannelsen af tryptophan til serotonin i to skridt: Først kobles en såkaldt hydroxygruppe (det vil sige en kemisk gruppe bestående af hydrogen og oxygen, OH) på tryptophan. Derefter omdannes dette mellemprodukt til serotonin ved, at der fraspaltes et CO₂-molekyle. Disse to trin i processen katalyseres af hvert deres enzym. Og enzymet tryptophan-hydroxylase (blot forkortet TPH) varetager det første af de to trin. Navnet på enzymet fortæller, at enzymets rolle er at hydroxylere (altså indsætte en OH-gruppe i) tryptophan. Det kan umiddelbart lyde simpelt, men det er en proces, der involverer flere forskellige reaktioner og medvirken fra andre molekyler. De to varianter af enzymet kaldes blot TPH1 og TPH2. Og det er TPH2, der er involveret i dannelsen af serotonin i hjernen, mens TPH1 indgår i dannelsen af

serotonin uden for hjernen.

Netop de reaktioner, som TPH2 katalyserer, er helt centrale, da det er dette trin i processen, der bestemmer, hvor stor produktionen af serotonin til enhver tid er i hjernen.

Enzym med ekstra lås

Når forskerne har kastet deres interesse på enzymet TPH2 skyldes det, at det populært sagt stadig er en hvid plet på landkortet i forhold til at forstå, hvordan dets struktur hænger sammen med dets funktion. Og da enzymet udgør et potentielt mål for lægemidler er det interessant at forstå detaljerne i, hvordan enzymet fungerer – specielt i forhold til, hvordan funktionen af TPH2 adskiller sig fra TPH1. Projektet bygger på, at Günthers kollega Hans Erik Mølager Christensen i en årrække har arbejdet med TPH1 og TPH2, så forskerne nu har en god ide om, hvad der er baggrunden for forskellen på virkemåder af de to enzymer. Deres hypotese er, at TPH2 har et såkaldt

"allosterisk bindingssted", som TPH1 ikke har. Et allosterisk bindingssted er et sted på enzymet, hvor et andet molekyle kan binde sig til enzymet og herved medvirke til, at enzymet bliver aktivt. Det er vigtigt at bemærke, at et sådant allosterisk bindingssted ikke er det samme som det, man kalder enzymets "aktive site". Det aktive site er det, man normalt forbinder med et enzyms katalytiske aktivitet. Det aktive site har normalt form som en lomme i enzymet, hvor det molekyle, som enzymet virker på (dets substrat), specifikt kan binde sig til. Et allosterisk bindingssted befinder sig derimod udenfor det aktive site, men har alligevel afgørende indflydelse på, at enzymet fungerer som det skal – nærmest som en ekstra sikkerhedslås på enzymet. I det konkrete tilfælde forestiller forskerne sig, at en del af enzymet TPH2 har form som en slags arm, der spærrer for adgangen til det aktive site. For at tryptophan kan binde sig til TPH2, skal enzymet først ændre struktur,

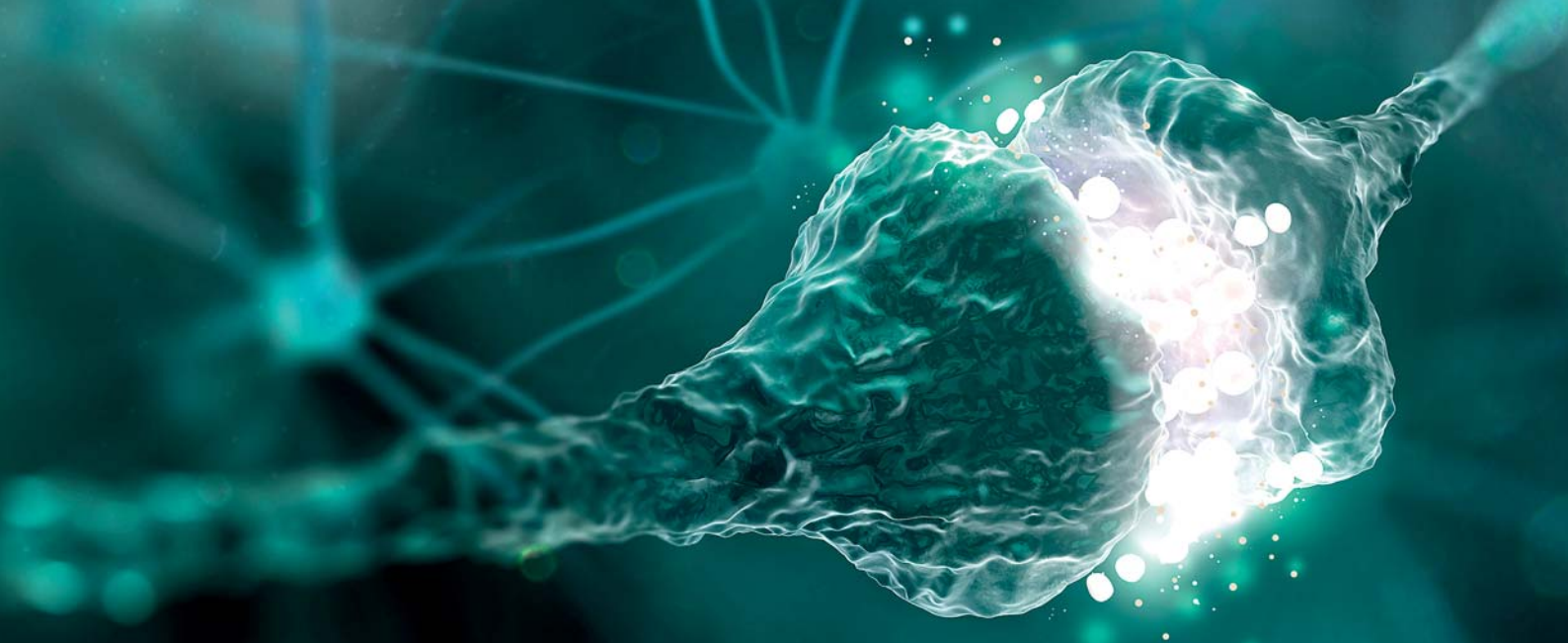
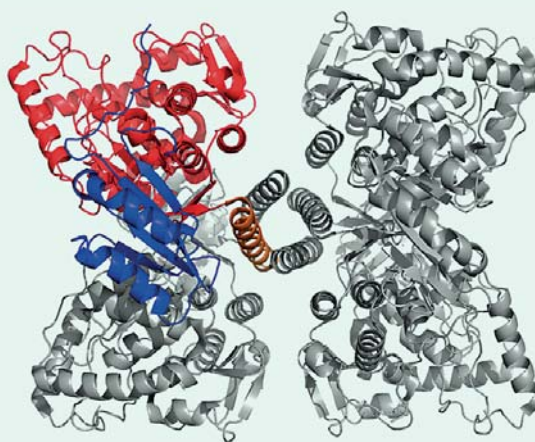


Illustration: Shutterstock

Enzymer – struktur og funktion

Enzymer er biomolekyler, hvis rolle i organismen er at katalysere kemiske reaktioner - det vil sige få reaktionerne til at forløbe, uden at enzymet selv bliver forbrugt i processen. Grundlæggende består et enzym af en lang kæde af aminosyrer, og denne kæde er foldet i en kompliceret struktur. Den tredimensionelle struktur af enzymet er afgørende for, at enzymet fungerer, som det skal. Ofte er et enzym delt ind i flere forskellige domæner, der hver især danner en kompakt, tredimensionel struktur, og som kan have forskellige funktioner. Vejen til at forstå, hvordan et specifikt enzym virker, går altså over at afklare, hvordan det er bygget op – både hvad angår sekvensen af aminosyrer og den tredimensionelle struktur.

Illustrationen viser enzymet phenylalanin-hydroxylase (i dette tilfælde fra en rotte). Det er et enzym, der ligner TPH2, som forskerne undersøger i deres projekt. Enzymet er opbygget som tetramerer – det vil sige en sammenkobling af fire ens enheder. Hver af disse fire enhe-



der består af et regulatorisk domæne (blå), et katalytisk domæne (rød) og et tetrameriseringsdomæne (orange). TPH2 ligner et langt stykke af vejen denne struktur, men der er forskelle – især i det regulatoriske domæne. En tilsvarende tredimensionel struktur af TPH2 med alle tre domæner kan endnu ikke vises, da forskerne endnu ikke kender denne struktur i sin fulde udstrækning.

Eksperimentelle metoder

Når forskerne i projektet skal undersøge strukturen af de forskellige varianter af enzymet TPH2, som de producerer på baggrund af deres computermødel, skal flere teknikker tages i brug. Den overordnede struktur kan bestemmes ved hjælp af røntgenkrystallografi eller småvinkel-røntgenspredning.

Proteinmolekyler har ikke en statisk struktur, men er derimod meget dynamiske molekyler, hvor forskellige områder fluktuerer med vidt forskellige hastigheder og dimensioner. Den nyeste forskning viser, at denne komplekse dynamik er tæt forbundet med vigtige aspekter af proteinernes funktion, regulering og vekselvirkninger. At kunne måle denne indre dynamik er derfor vigtigt for proteinforskere – og samtidig en udfordring. Men det kan gøres ved at måle hastigheden, hvormed

hydrogenatomer i et protein udveksles med deuterium (en tung udgave af hydrogen med en ekstra neutron i kernen). Da deuterium er tungere end hydrogen kan man påvise denne udveksling ved hjælp af massespektrometri. Rygraden i et protein udgøres af såkaldte amidgrupper, og på hver amidgruppe sidder et hydrogenatom, som kontinuert udveksles med deuterium, hvis proteinet befinder sig i tungt vand (det vil sige vand, hvor vandmolekylerne har fået udskiftet et eller begge hydrogenatomer med deuterium). De hydrogenatomer, der sidder i tætpakkede områder af proteinet, udveksles langsomt, mens hydrogenatomer, der sidder i fleksible eller åbne områder i proteinet, udveksles hurtigt. Med denne teknik – kaldet HDX-MS – kan man med høj følsomhed detektere og kortlægge selv små ændringer i proteins rumlige struktur og dynamik.



**DANMARKS FRIE
FORSKNINGSFOND**
INDEPENDENT RESEARCH
FUND DENMARK

Videre læsning
Forskernes projekt: Allosteric regulation of tryptophan hydroxylase isoform 2 er finansieret af Danmarks Frie Forskningsfond | Natur og Univers (DFF-Forskningsprojekt 1). Se DFF's bevillingsliste på www.dff.dk

så denne blokering fjernes. Og det sker, når det rigtige molekyle binder sig til det allosteriske bindingssted.

En tværfaglig øvelse

De senere år har der været en stigende interesse for enzyms allosteriske bindingssteder, netop fordi de repræsenterer mulige mål for lægemidler. I de fleste tilfælde opdager man dog allosteriske bindingssteder ved tilfældigheder. Hvis man vil udnytte deres potentiale indenfor behandling af sygdomme er der derfor brug for en mere systematisk tilgang til at afsløre disse vigtige kontaktpunkter i enzymer. Det er netop sådan en systematisk undersøgelse, forskerne nu er i gang med at udsætte THP2 for. Deres mål er at afklare strukturen af dette specifikke sted på enzymet, hvordan det fungerer, og hvordan det vekselvirker med enzyms katalytiske domæne.

Og det er i høj grad en tværfaglig øvelse. Først skal der bygges en computermodel af strukturen i den del af enzymet, hvor den afgørende vekselvirkning finder sted. Man kender i dag ikke den tredimensionelle struktur af hele TPH2, men man ved, at enzymet er inddelt i tre domæner. De to relevante domæner i denne sammenhæng er det katalytiske domæne – altså der, hvor tryptophan binder sig til enzymet – og så et domæne, der har en regulatorisk funktion. Hvilken funktion dette regulatoriske domæne har, ved man endnu ikke, men forskernes hypotese er, at det allosteriske bindingssted befinder sig i dette domæne af enzymet. Computermodellen vil også gøre det muligt for forskerne at identificere mulige molekyler (ligander), der vil være tilbøjelige til at binde sig til det allosteriske bindingssted.

Næste fase af projektet er så at producere virkelige udgaver af de varianter af de katalytiske og regulatoriske domæner, som computermodellerne er nået frem til, samt at teste bindingen til de ligander,

Om forskerne i projektet

Günther H. J. Peters er lektor ved Institut for Kemi ved DTU og leder af forskningsgruppen *Chemistry at the Interface to Biology*. Han forsknings er indenfor computermodellering af makromolekyler og bioinformatik.
ghp@kemi.dtu.dk



Pernille Harris er lektor ved Institut for Kemi ved DTU og leder af forskningsgruppen "Proteinstruktur og -vekselvirkninger". Hun arbejder bl.a. med røntgenkystallografi og småvinkel-røntgenspredning.
ph@kemi.dtu.dk



Hans Erik Mølager Christensen er lektor ved Institut for Kemi ved DTU og leder af forskningsgruppen Metalloprotein Chemistry and Engineering. Hans forskning er centreret omkring metalloenzymer involveret i neurologiske sygdomme.
hemc@kemi.dtu.dk



Kasper Dyrberg Rand er professor mso og gruppeleder ved Institut for Farmaci, Københavns Universitet, hvor han blandt andet arbejder med teknikken HDX-MS.
kasper.rand@sund.ku.dk



Desuden deltager Dr. Robin Curtis fra University of Manchester i projektet. Han er bl.a. ekspert inden for lysspredningsteknikker.
R.Curtis@manchester.ac.uk



som er blevet identificeret. Det er en lang proces og kommer til at involvere en lang række forskellige eksperimentelle metoder.

Håbet er, at de eksperimentelle resultater og resultaterne fra computersimuleringerne stemmer overens – eller at man på basis af de eksperimentelle resultater, kan lave nogle nye og bedre computermodeller, så vi kommer nærmere på en detaljeret forståelse af, hvordan især det regulatoriske domæne af TPH2 virker og spiller sammen med andre molekyler, der findes i hjernen.

Muligt mål for nye lægemidler

Som nævnt er det oplagte anvendelsesmæssige perspektiv af forskernes arbejde med TPH2, at det på længere sigt vil kunne gøre det muligt at udvikle lægemidler, der specifikt er rettet mod dette enzym. Hvis man med et lægemiddel kunne øge aktiviteten af TPH2, vil det være en ret direkte måde at øge produktionen af serotonin i hjernen. Og det vil være en principielt ander-

ledes måde at gribe ind i serotonin-systemet på end med klassiske SSRI-lægemidler, som virker ved at blokere et bestemt transportprotein, der kan siges at være en del af et "genbrugssystem" for serotonin i nervecellerne.

Når man designer lægemidler, der har til formål enten at aktivere et enzym eller blokere det, så er disse lægemidler normalt rettet mod det aktive site i enzymet. Men hvis man vil ramme TPH2 på den måde, kan man næppe undgå den uønskede bivirkning, at dets slægtning TPH1 også aktiveres og øger serotoninproduktionen andre steder i kroppen, for eksempel i fordøjelsessystemet. Det problem kan man undgå, hvis lægemidlet i stedet designes til at binde sig til det allosteriske bindingssted på TPH2, så det kun er dette specifikke enzym, der aktiveres. Netop potentialet for færre bivirkninger er en af grundene til, at der generelt er stigende interesse for enzyms allosteriske bindingssteder som mål for lægemidler. ■



**DANMARKS FRIE
FORSKNINGSFOND**
INDEPENDENT RESEARCH
FUND DENMARK