

Nye NMDA-receptor-ligander til udforskning af hjernen

Det er lykkedes at designe og fremstille en ny gruppe af stoffer, NHP5G. De aktiverer selektivt en gruppe af receptorer kaldet NMDA-receptorer. Det kan give os vigtig information om denne receptorgruppes betydning i hjernen og måske pege på nye måder at behandle forskellige sygdomme i hjernen på

Af lektor og ph.d. Rasmus Prætorius Clausen, ph.d.-studerende Rune Riisgård, postdoc Simon Dalsgaard Nielsen, ph.d. og lektor Jesper Kristensen, ph.d., Institut for Medicinalkemi, Det Farmaceutiske Fakultet, Københavns Universitet og postdoc Kasper Bo Hansen, ph.d., Emory University School of Medicine, Atlanta, USA

Dedikeret til professor Mikael Begtrup

En ny gruppe af stoffer, NHP5G, er designet og fremstillet på Det Farmaceutiske Fakultet (DFF) på Københavns Universitet. NHP5G-stofferne aktiverer selektivt NMDA-receptorerne. Det kan give os vigtig information om denne receptorgruppes betydning i hjernen, og om receptorernes funktion på det molekylære niveau. Endelig kan det pege på nye måder at behandle forskellige hjernesygdomme på.

Man ved, at NMDA-receptorerne spiller en stor rolle for indlæring og hukommelse. Man mener også, at de er involverede i psykotiske lidelser som skizofreni og i de neuro-degenerative hjernesygdomme såsom multipel sclerose og Parkinsonisme. NHP5G-stoffer kan bane vejen for nye måder at behandle disse og beslægtede lidelser på.

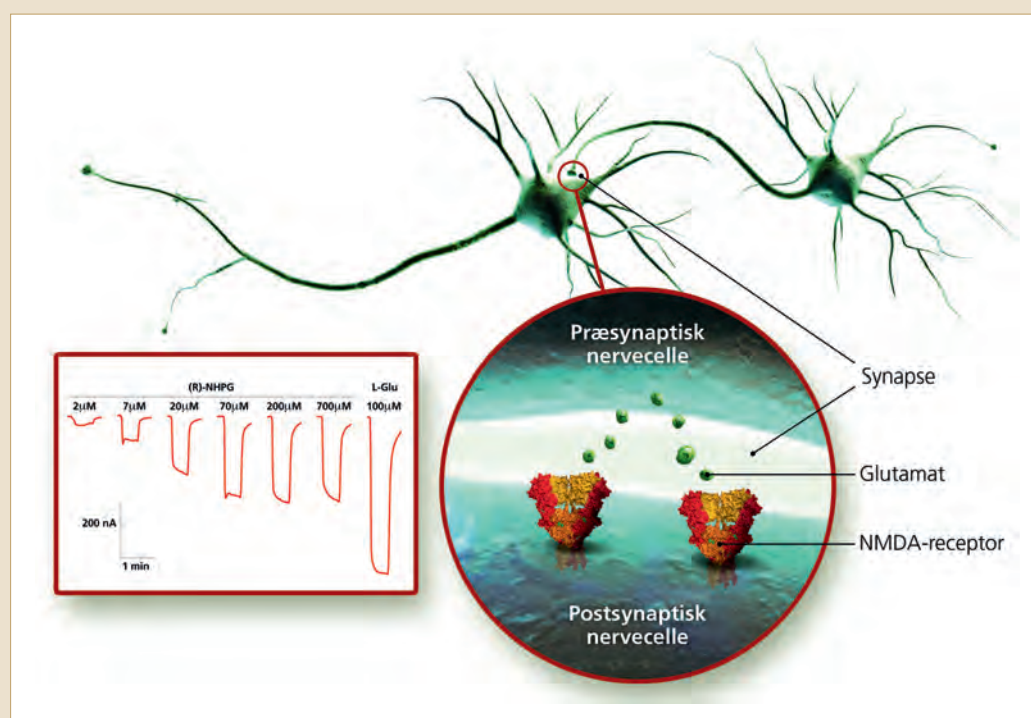
Ved at designe og fremstille NHP5G-stofferne har vi vist, at man kan differentiere aktiveringen af forskellige NMDA-receptorer. De nye stoffer kan dels pege på nye behandlingsveje, men er

også vigtige værktøjer til at forstå de forskellige NMDA-receptorerers rolle i hjernen. Endvidere er stofferne de første rapporterede partielle agonister af NMDA-receptorerne. Dvs. stoffer, der kun delvist aktiverer receptorerne. De kan derfor også bruges til at få viden om, hvordan receptorerne virker på molekylært niveau.

NMDA-receptorer er en undergruppe af glutamatreceptorer

NMDA-receptorer genkender det signalstof i hjernen, der hedder glutamat. Glutamat er en aminosyre, der også kendes som smagsforstærkeren "det tredje krydderi" eller "umami" (umami er betegnelsen for det femte smagelement - de øvrige er de gamle kendinge: sødt, salt, surt og bittert), fordi det aktiverer glutamat-receptorer på tungen.

Men glutamat aktiverer først og fremmest glutamatreceptorer i hjernen og er det mest udbredte signalstof i hjernen. Det ►



Figur 1. Nerveceller kommunikerer vha. kemiske signalstoffer, der kaldes neurotransmittere. Kontaktfladerne mellem nervecellerne er små spalter på ca. 20 nm. Dette område kaldes en synapse. I synapsen omdannes en nervecelles elektriske signal til et kemisk signal, som igen omdannes til et elektrisk signal i den anden nervecelle. Det sker ved, at afsendercellen frigiver neurotransmitteren i synapsespalten, når det elektriske signal når synapsen. Den frigivne neurotransmitter genkendes på modtagercellen af et receptorprotein, der er en ligand-styret ionkanal. Når receptoren binder neurotransmitteren, åbner den for sin ionkanal, så der strømmer ioner henover cellemembranen. Derved skabes en elektrisk impuls i modtagercellen. Det mest forekommende signalstof i hjernen er glutamat. Til venstre ses elektrofysiologiske målinger af strømmen gennem glutamatreceptoren, når den aktiveres af hhv. glutamat og forskellige koncentrationer af det nye stof NHP5G. NHP5G kan ikke generere ligeså meget strøm som glutamat, dvs. den er en partiel agonist.

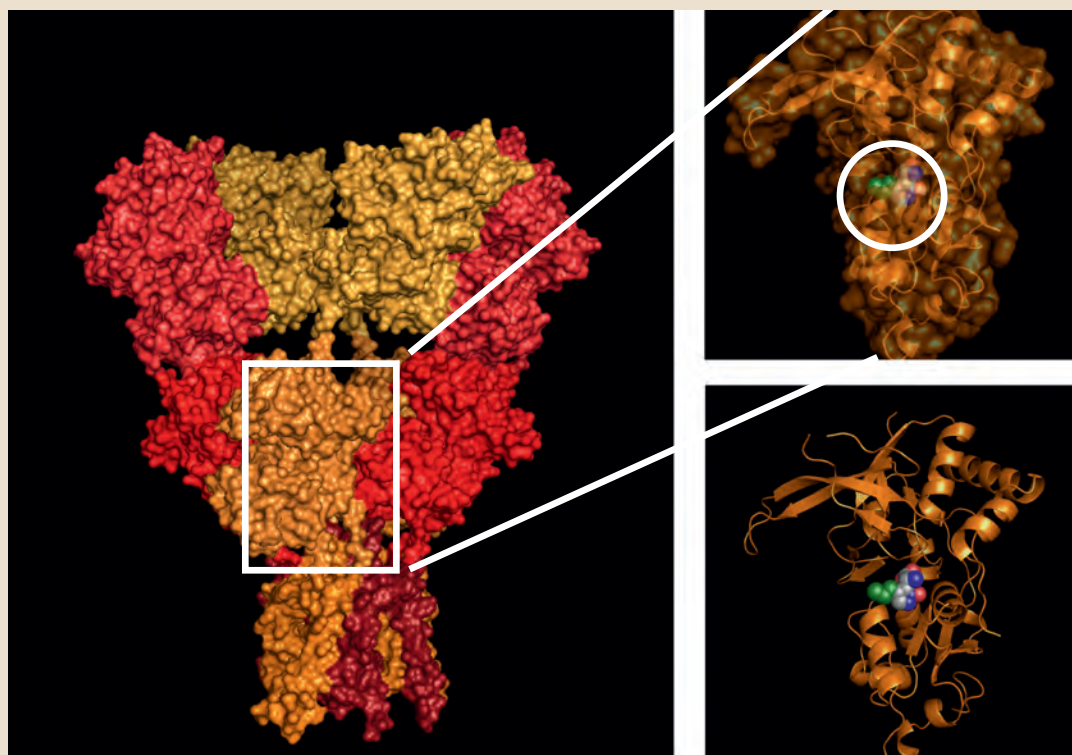
er involveret i det meste af neurotransmissionen i hjernen, modsat de mere kendte signalstoffer serotonin og dopamin. De receptorer i hjernen, der genkender glutamat, er derfor meget vigtige for mange af centralnervesystemets (CNS) funktioner og dermed også involveret i en række hjernelidelser. Men fordi de er så udbredte i hjernen, er de også svære at udvikle lægemidler imod, da stofferne skal være meget selektive for ikke at påvirke det meste af CNS.

Selektiv påvirkning af subtyper med nye stoffer

Der har gennem flere årtier foregået intens forskning i at udvikle nye kemiske stoffer, der påvirker glutamatreceptorer i hjernen, og det er nu lykkedes vores forskningsgruppe på DFF at udvikle de første stoffer, der selektivt kan aktivere subtyper af NMDA-receptorer. Sådanne stoffer kan være vigtige redskaber til at klarlægge, hvilken rolle forskellige subtyper af NMDA-receptorer spiller i hjernen. I sidste ende kan videreudviklingen af stofferne føre til en bedre behandling af skizofreni og også neuro-degenerative hjernesygdomme såsom multipel sclerose og parkinsonisme.

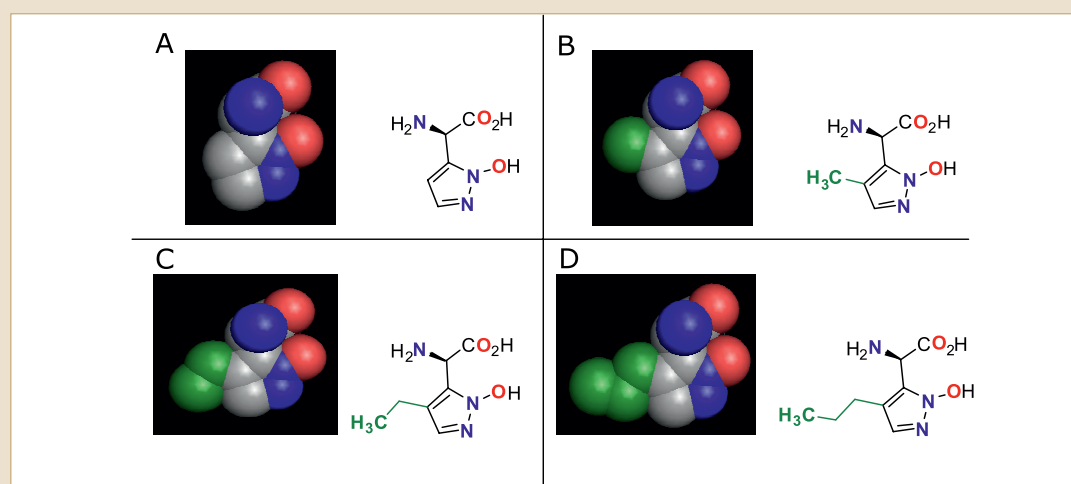
Der findes 7 forskellige klonede undertyper af NMDA-receptorer. De subtyper, der genkender glutamat, kaldes GluN2A, GluN2B, GluN2C og GluN2D (de andre genkender aminosyren glycine). Og de stoffer, der findes i dag, aktiverer eller blokerer alle fire undertyper. Det udgør et problem, da receptorerne ikke kun spiller en rolle i forbindelse med hjernelidelser, men også i normale funktioner som hukommelse og indlæring. Derfor fås en række bivirkninger ved benyttelse af disse uselektive stoffer.

Man ved ikke, hvilke af de fire undertyper der er involveret i sygdomme, da man hidtil ikke har haft kemiske stoffer, der selektivt kan blokere eller aktivere en enkelt undertype. Det har derfor ikke været muligt at undersøge de enkelte undertypers bidrag i forbindelse med

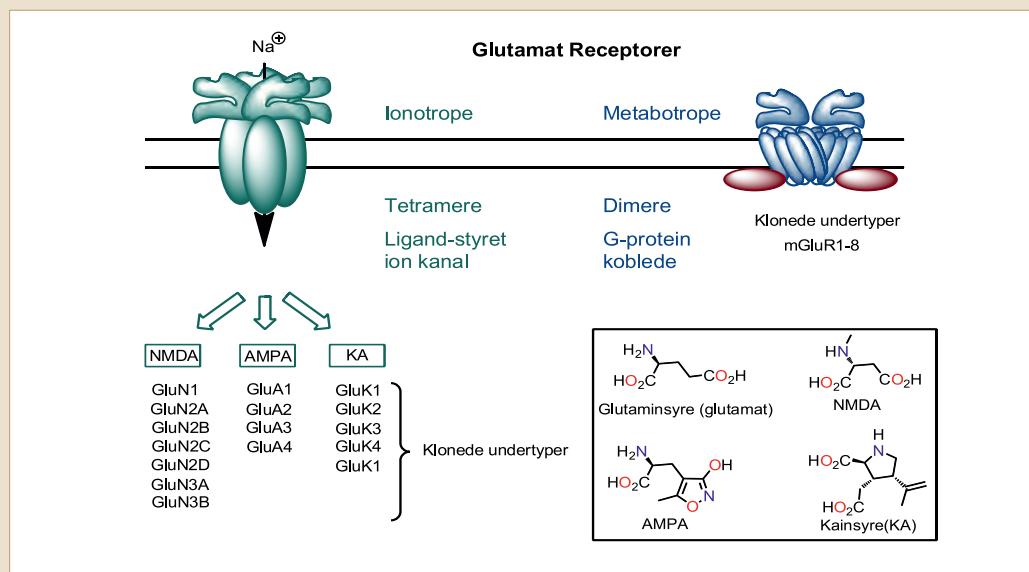


Figur 2. Her ses en glutamatreceptors rummelige struktur. Glutamatreceptorerne har en tetramer opbygning. Dvs. at fire af de klonede undertyper går sammen og danner den ligand-styrede ionkanal. For AMPA-receptorer kan fire ens undertyper gå sammen. For NMDA-receptorer skal receptoren indeholde 2 GluN1 (Rød) som aktiveres af glycine og 2 GluN2, der aktiveres af glutamat. Hver undertype består af 3 domæner: et transmembrandomæne nederst der danner ionkanalen; et ligandbindingsdomæne formet som en muslingeskal, der lukker sammen om glutamat; et aminoterminaldomæne, som man ikke helt kender funktionen af, men som også har form som en muslingeskal. Til højre har vi klippet ligandbindingsdomænet ud af receptoren og vist den med propyl-NHP5G (stof D) "docket". Ligandbindingsdomænet er vist både i en rumfyldende model (øverst) og en spaghettimodel (nederst), der tydeligere viser foldningen af proteinet, og hvor liganden er placeret. Foreløbige resultater indikerer, at området omkring den grønne propylgruppe er forskelligt imellem de fire subtyper af NMDA-receptorer. Disse små forskelle kan gøre det muligt at designe stoffer, der kan kende forskel på de fire forskellige undertyper, der findes af disse receptorer.

sygdomme eller normale funktioner. Men med den nyudviklede gruppe af NHP5G-stoffer, er det nu vist, at det er muligt at gå målrettet efter de enkelte undertyper. Afhængigt af de substituent, der sidder på NHP5G, påvirkes undertyperne forskelligt.



Figur 3. Fire NHP5G-analoger både som kemisk formel og i deres rummelige 3D-struktur. De fire stoffer adskiller sig fra hinanden ved at have kulstofkæder af forskellig længde på den flemleddede pyrazolring. På figuren er kulstof farvet grå, ilt rød og kvælstof blå. Kulstof, der bygges på den flemleddede pyrazolring, er angivet med grøn. NHP5G uden substituent (stof A) viser sig at aktivere alle fire undertyper af NMDA-receptorer lige meget (ca. 50%). Men når der sættes et eller to kulstofatomer på (stof B og C), er der stor forskel på, hvor meget de enkelte undertyper aktiveres. Med tilføjelse af tre kulstofatomer (propyl-NHP5G, D) har man et stof, der blokerer NR2A, men stadig kan aktivere NR2D ca. 37%. Det er første gang, man ser store forskelle i graden af aktivering af forskellige NMDA-receptorundertyper, og det er perspektivrigt i håbet om at kunne udvikle selektive stoffer.



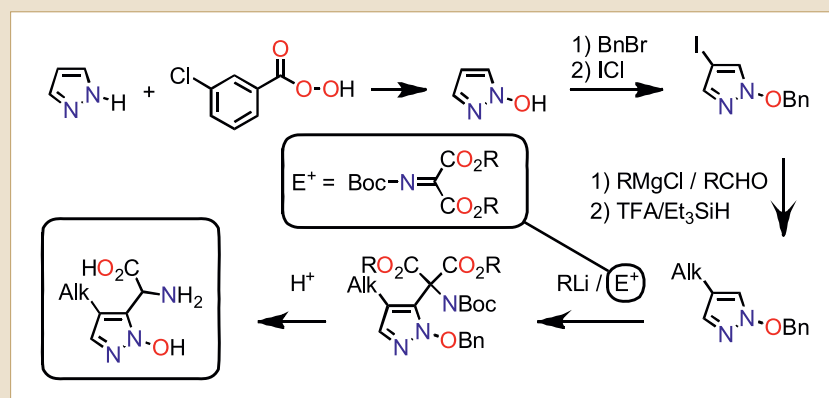
Figur 4. Glutamatreceptorerne er en meget heterogen gruppe af receptorer, der inddeles i to klasser. De ionotrope glutamatreceptorer er hurtigtvirkende ligand-styrede ionkanaler, der er placeret i nervecellernes synapser og kan depolarisere cellemembranen og dermed omsætte det kemiske signal til et elektrisk aktionspotentiale. De metabotrope er G-protein-koblede receptorer, der giver anledning til metaboliske ændringer i cellen, og de er derfor mere langsomtvirkende. NMDA-receptorerne hører til de ionotrope receptorer, som inddeles i tre grupper, NMDA-, AMPA- og kainsyre-receptorer. De er opkaldt efter stoffer, der selektivt aktiverer dem. Inden for hver gruppe findes forskellige klonede subtyper. Der således 4 AMPA-, 5 kainsyre-, og 7 NMDA-subtyper.

Docking til design af NHP5G-stoffer

I første omgang havde vi blot fremstillet den usubstituerede NHP5G og vist, at den var en partiel agonist. Dvs. at NMDA-receptoren kun blev delvist aktiveret ved mættende koncentrationer af NHP5G. Aktiveringsgraden bestemmes ved at måle den strøm, der passerer over cellemembranen, når natrium- og kaliumioner løber gennem ionkanal-delen af NMDA-receptoren (figur 1). Med NHP5G er den strøm mindre end ved tilsætning af glutamat.

NHP5G havde samme affinitet og aktiveringsgrad på alle GluN2-subtyper. En tredimensionel struktur af receptorproteinets bindingslomme med glutamat har været til rådighed i flere år. Vha. molecular modelling kunne vi docke det nye stof ind i stedet for glutamat (dvs. placere det nye stof i en model i stedet

for NHP5G uden kulstofkæde i stand til at aktivere alle fire under-typer lige meget, mens propyl-NHP5G aktiverer de fire under-typer meget forskelligt og faktisk er i stand til at blokere aktivering af en af undertyperne. Vi har i første omgang fremstillet en lille serie med methyl-, chlor-, ethyl-, propyl- og isopropyl-substituenter. Disse stoffer opfører sig meget forskelligt. Vi planlægger derfor at udvide denne serie af stoffer. Således vil vi i fremtiden prøve at sætte mange andre "grønne" grupper på. Vi vil således udvide alkan-serien, men arbejder samtidig på en syntesevej, der muliggør alken og alkyn samt polære funktionelle grupper. Den nye syntesevej er udviklet, så der indføres substituerer så sent i synteseforløbet som muligt, så der kun er få trin tilbage for hver ny substituent. Det er ikke muligt med docking at forudsige akti- viteten, men den har hjulpet os på rette spor.



Figur 5. Oversigt over syntesevejen frem til de nye ligander. I det første trin oxideres pyrazol til 1-hydroxypyrazol vha. meta-chlorperbenzoesyre. Derefter benzyleres OH-gruppen inden pyrazolkernen iødes med iodonochlorid. Iod-magnesium-udskiftning genererer et Grignard-reagens, der reageres med forskellige aldehyder. Reduktion af de dannede sekundære alkoholer med TFA/Et₃SiH giver hydroxypyrazoler med forskellige alkylgrupper, der sidder direkte på kernen. Slutteligt introduceres aminosyredelen via et reagens, der er udviklet på Farma: Deprotonering af ringen med en meget stærk alkyl-lithiumbase efterfulgt af reaktion med dette reagens indfører aminosyregrup- pen i beskyttet form. Til sidst fjernes alle beskyttelsesgrupperne, og ligan- derne er klar til test.

NHP5G-analoger som farmakologiske værktøjer

Målet er at udvikle stoffer, der er i stand til at akti- vere eller blokere en enkelt under-typer. Det vil give farmakologiske værktøjer, som kan give svar på, hvilken rolle de enkelte under-typer spiller for ner- vecellerne samt de hjernefunktioner og sygdomme, hvor NMDA-receptoren er involveret. Den viden kan bruges til at pege på nye terapeutiske muligheder inden for de mange hjernesygdomme, som der i dag ikke findes gode behandlingsmetoder til.

Vi er endvidere ved at karakterisere stofferne i meget detaljerede elektrofysiologiske eksperimenter,

hvor man måler på en enkelt glutamatreceptor af gangen. Stof- ferne er unikke til disse eksperimenter idet man ikke tidligere har haft partielle agonister til NMDA-receptoren, som er nødvendige for at kunne bestemme den komplicerede kinetik for receptorens aktivering. Vi regner derfor med, at stofferne er farmakologiske værktøjer, der kan være med til at løfte sløret for, hvordan recep- toren fungerer på det molekylære niveau.

E-mail-adresse

Rasmus Prætorius Clausen: rac@farma.ku.dk