

Vigtig struktur afdækket

For ti år siden besluttede et forskerhold på DTU, at de ville finde strukturen af det enzym, der styrer omdannelsen af kroppens to vigtigste signalstoffer - dopamin og noradrenalin. Ti års hårdt arbejde gav resultat, og strukturen viser, at ikke meget ser ud, som man forestillede sig.

Af Katrine Meyn, km@techmedia.dk

Til august er det ti år siden, at lektor Hans Mølager Christensen og hans ph.d.-studerende Trine Vendelboe, Institut for Kemi, DTU besluttede sig for at løse strukturen af enzymet dopamin β -hydroxylase. Enzymet styrer omdannelsen af to af kroppens vigtigste signalstoffer – dopamin og noradrenalin. De så af-dækningen af strukturen som et vigtigt skridt i forståelsen af en række neurologiske sygdomme og dermed også i udviklingen af mere effektiv behandling. Det gælder f.eks. sygdomme som angst, ADHD, skizofreni m.fl. – listen er lang.

Mange bump på vejen

Ganske få år forinden havde Hans Mølagers gruppe arbejdet med en anden klasse af metalloproteiner, som det var lykkedes at producere rekombinant i *E. coli*. Og det på trods af, at den generelle holdning var, at det ikke kunne lade sig gøre. Man

troede slet ikke, at *E. coli* indeholdt den type af proteiner. Men det lykkedes, og da DNA-genom-sekventeringen kom, viste det sig, at *E. coli*-bakterien indeholdt over 160 af den pågældende slags proteiner, de var bare til stede i for små mængder til at blive detekteret.

Inspireret af den erfaring besluttede forskningsgruppen at forsøge at producere dopamin β -hydroxylase i *E. coli*.

- Vi startede ved begyndelsen og forsøgte at fremstille enzymet i de simplest mulige organismer, fortæller lektor Hans Mølager Christensen og fortsætter:

- Vi var nødt til at fremstille enzymet rekombinant i cellefabrikker. For denne type af enzymer findes kun i ganske få celler i kroppen, så vi kunne ikke skaffe det fra naturlig kilde. Det skal produceres i cellefabrikker, altså i celler som kan opformeres i laboratoriet og som kan lave enzymer i store mængder.

- Det virkede dog overhovedet ikke. Vi kunne ikke få bakterierne til at producere proteinet. Vi prøvede alle mulige "tricks"



Det er Hans Mølager Christensen og hans gruppe, der står bag løsningen af strukturen af enzymet dopamin β -hydroxylase, der styrer omdannelsen af dopamin til noradrenalin. Foto: Anne Frejberg Juhl-Schmidt.

HEK-celler

Human Embryonic Kidney cells. Oprindeligt troede man, at denne cellelinje stammede fra nyrerne, men sekventeringen af cellernes genom viser, at de stammer fra en slags tidlige nerveceller.

med at snyde bakterierne til at producere de rigtige disulfidbroer. Vi vidste godt, at det var et kobber-protein, vi skulle producere og vi vidste, at vi skulle lade være med at tilsætte kobber, da frie metalioner er meget giftige for bakterierne (der er kun ca. 1 fri metalion til stede i hver bakteriecelle). Alligevel fungerede det ikke, fortæller Hans Mølager.

Næste forsøg blev i gærceller (eukaryote celler). Det kom der heller ikke noget protein ud af.

- Denne gang var vi hurtigere til at acceptere, at det ikke virkede, fortæller han.

Da forskerne på DTU Kemi i samarbejde med forskere på Københavns Universitet begyndte at udtrykke enzymet i bananflueceller (*Drosophila melanogaster* celler) kom den første succes. Ca. fem år inde i projektet lykkedes det at fremstille proteinet. Det kunne bare ikke krystalliseres, så strukturen kunne ikke afdækkes.

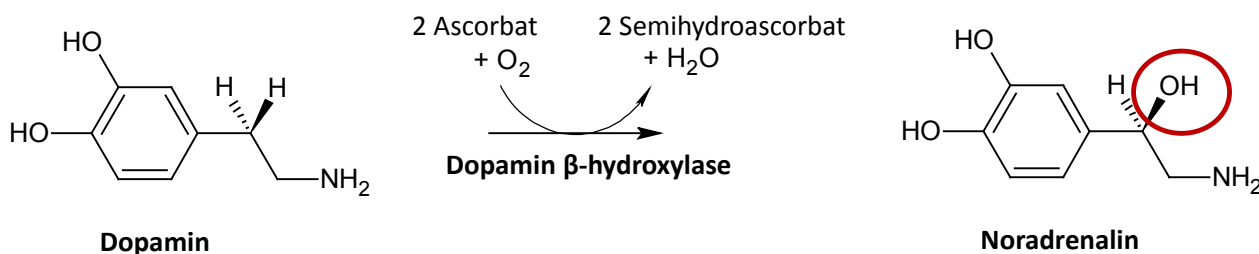
Arbejdet mod krystallisering

Enzymet dopamin β -hydroxylase er glykosyleret, det vil sige, at det har sukkermolekyler siddende på overfladen.

- Sukkermolekylerne er ofte meget uensartede, og vi fik sporet os ind på, at det formentlig var derfor, vi ikke kunne krystallisere enzymet, fortæller Hans Mølager.

Opgaven var nu at gøre glykosyleringen på overfladen mere ensartet – så krystallerne bedre kunne pakkes. Samtidig valgte gruppen at arbejde i HEK-celler, se faktaboks, der minder om nerveceller.

- I denne del af projektet har vi samarbejdet med et forskerhold fra universitetet i Oxford.



SIKRE PRODUKTER FOR PHARMA OG MEDICO

- Rådgivning om humantoksikologi og miljørisikovurdering
- Risikovurdering af restkoncentrationer og urenheder
- Identifikation og strategi ved anmeldelse af problematiske stoffer
- Dokumentation af biosafety
- Økotoksikologiske test i henhold til GLP og ISO 17025

www.tox.dhi.dk

DHI
Agern Allé 5, DK-2970 Hørsholm
Tel: 45 16 9200 – Fax: 45 16 9292
dhi@dhigroup.com

The expert in **WATER ENVIRONMENTS**



- Når vi skulle producere et enzym, der var involveret i neurologiske sygdomme, så synes vi, at det lød som en fornuftig idé, at være så tæt på det oprindelige som muligt. Endelig lykkedes det i 2012 at fremstille proteinet. Det tog en uge at udtrykke det, én dag at oprense og én dag at krystallisere.

Nu dukkede der imidlertid en række nye udfordringer op. For hvordan skulle strukturen afdækkes?

Først skulle der opsamles spredningsmønstre på en af de store synkrotroner (når man sender røntgenstrålen fra synkrotronen ind på krystallen, spredes lyset, hvilket giver et mønster, man bruger til at lave modellen af enzymets struktur).

Det viste sig at være vanvittigt svært at lave den nødvendige såkaldte fasing. I de simpleste tilfælde plejer man at tage strukturen af et protein, man kender i forvejen, og som er næsten magen til. Den bruger man som model til at løse strukturen ud fra (Molecular replacement). Problemet var, at der ikke var andre strukturer, der lignede. Så selv om der eksisterer en proteindatabase med 100.000 strukturer til rådighed, så var der ikke nogle af de kendte strukturer, der kunne bruges. Der måtte tages andre metoder i brug, dvs. der måtte andre grundstoffer og atomer ind i strukturen. Alle S-atomer i methionin blev udskiftet med selen. Ud over det, blev der fremstillet andre mere klassiske derivater, hvor platin blev indsat. Vha. dette og nogle af forskernes specialudviklede programmer lykkedes det at finde fasen i systemet. Fasen skulle bruges til at lave elektron-tæthedskortene. Dvs. gitterkort, der viser strukturens omrids.

- Dernæst fik vi Pernille Harris, lektor i protein- og røntgenkrystallografi på DTU Kemi, med i projektet. Sammen med ph.d.-studerende Trine Vendelboe byggede hun strukturen én aminosyre ad gangen. Der er over 1.200 aminosyrer i enzymet, hvilket gør det til et meget stort puslespil, fortæller Hans Mølager.

Strukturen

Strukturen er særlig. Det er en dimer, hvor hver monomer består af fire meget integrerede domæner, der alle holder sammen om hinanden, se figuren. Dertil er der en række disulfid-broer inde i proteinet. Det er sekundære strukturer, der hjælper med at holde enzymet sammen.

En af de overraskelser strukturen har budt på, er, at det indeholder bindingslommer til små molekyler. Og at der er et "nyt" metalbindingscenter, som ikke har noget med selve funktionen at gøre, men derimod enzymets regulering. I det hele taget tyder strukturen på, at enzymet virker på en helt anden måde end antaget. Forskerne har indtil nu troet at kobbercentrene, som er de aktive sites, hvor den kemiske reaktion finder sted, sad meget langt fra hinanden. Det gør de også i den ene side af strukturen, men i den anden side sidder de lige ved siden af hinanden. Tidligere, da man troede, at centrene sad langt fra hinanden, var det svært at forstå, hvordan de på en orkestreret måde kunne koordinere reaktionerne, så de skete på det rigtige tidspunkt. Nu giver det meget mere mening. Enzymet virker ved en flip-flop-mekanisme. Dvs. den ene halvdel af enzymet udfører den enzymatiske reaktion, mens den anden halvdel udskiller produktet (noradrenalin) og optager et substratmolekyle (dopamin). Herefter skifter enzymet tilstand og reaktionen sker i den modsatte halvdel osv.

Flere spørgsmål end svar

- Da vi startede projektet for ti år siden, tænkte vi, at når vi har strukturen, forstår vi det meste. Men realiteten er, at der er opstået mange flere spørgsmål, end vi har fået svar. Vi ved endnu ikke, hvordan det aktive site med de to kobberioner tæt på hinanden ser ud. Det vil være helt afgørende for at forstå,

hvordan enzymet virker, at få det afklaret. Det bliver vanvittig spændende. Det er det, vi skal bruge den kommende tid til at finde ud af.

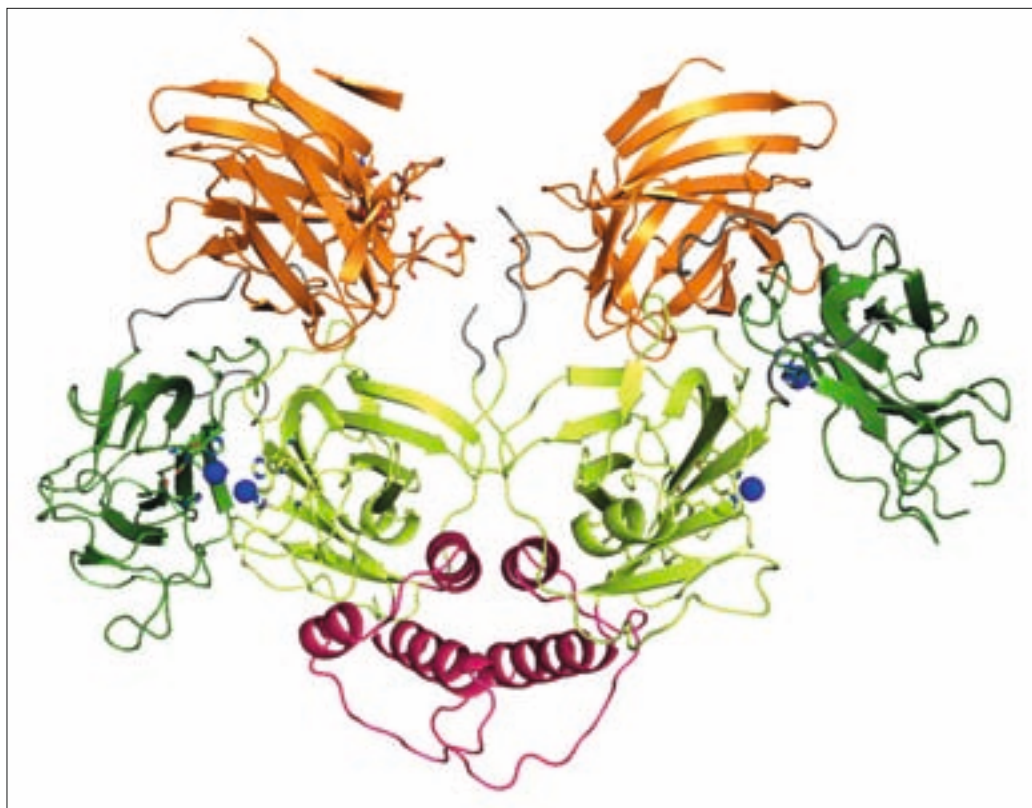
- Det samme gælder bindingslommerne, og hvad der kan sidde i af små molekyler? Og metalcenteret, som ingen har set før, og som kan regulere et eller andet. Vi kan ikke se, hvad det er for et metal, der sidder der. Men det er uhyre vigtigt at finde ud af, da det vil have stor betydning for udvikling af fremtidig medicin til lindring af de rigtig mange sygdomme, som er knyttet til dette enzym, slutter Hans Mølager.

Henvisninger:

Videnskabelig artikel: <http://advances.sciencemag.org/content/2/4/e1500980.full>.

Mere om enzymet og dets betydning: <http://www.kemi.dtu.dk/Nyheder/Nyhed?id=B1DB8F57-67B6-4F9C-9FC6-510E8782CC89>.

Mere om metal-holdige proteiner: <http://www.kemi.dtu.dk/-/media/Institutter/Kemi/Gymnasietilbud/kapitler-Kemiske/pdf/kap5.ashx?la=da>.
Mere om strukturbestemmelse af proteiner: <http://www.kemi.dtu.dk/-/media/Institutter/Kemi/Gymnasietilbud/kapitler-Kemiske/pdf/livetskemi.ashx?la=da>.



Strukturen af dopamin β -hydroxylase dimeren. De katalytiske domæner i grøn, med kobberionerne i blå. Bemærk hvordan der i den ene halvdel er kort afstand mellem kobberionerne (4-5 Å), mens der i den anden halvdel er langt (11 Å). Dimeriserings-domænet er i rød. Det regulatoriske DOMON-domæne er orange. Det har fået navn efter enzymet dopamin β -hydroxylase. Denne type af domæner findes i over 1.600 andre proteiner, der er bare ingen, der ved, hvad de laver - vi er simpelthen nødt til at finde ud af, hvad det gør, og hvordan det virker.