

Protein med overraskende forbindelser

En særlig gruppe proteiner kaldet ORProteiner, som findes i alle organismer med cellekerner, har ganske uventet vist sig at være involveret i kræftcellers vækst. Forskerne prøver nu at finde ud af præcis, hvilken funktion disse proteiner har for om muligt at udnytte dette til medicinudvikling.

Af Thomas Bjørnskov Poulsen

■ Små organiske molekyler kan have dramatiske effekter på vores celler. Der findes f.eks. molekyler, som kan få stamceller til at blive til hjerteceller, molekyler, som kan få celler til at spise sig selv, og – ikke mindst – molekyler, som kan få celler til at dø. I mange tilfælde skyldes sådanne biologiske aktiviteter vekselvirkningen mellem det organiske molekyle og blot én type af protein ud af de mange tusinde, som findes i de fleste celler.

Det siger derfor næsten sig selv, at det kan være en særdeles vanskelig opgave at finde frem til et sådant "målprotein" (eller "target", som er det engelske

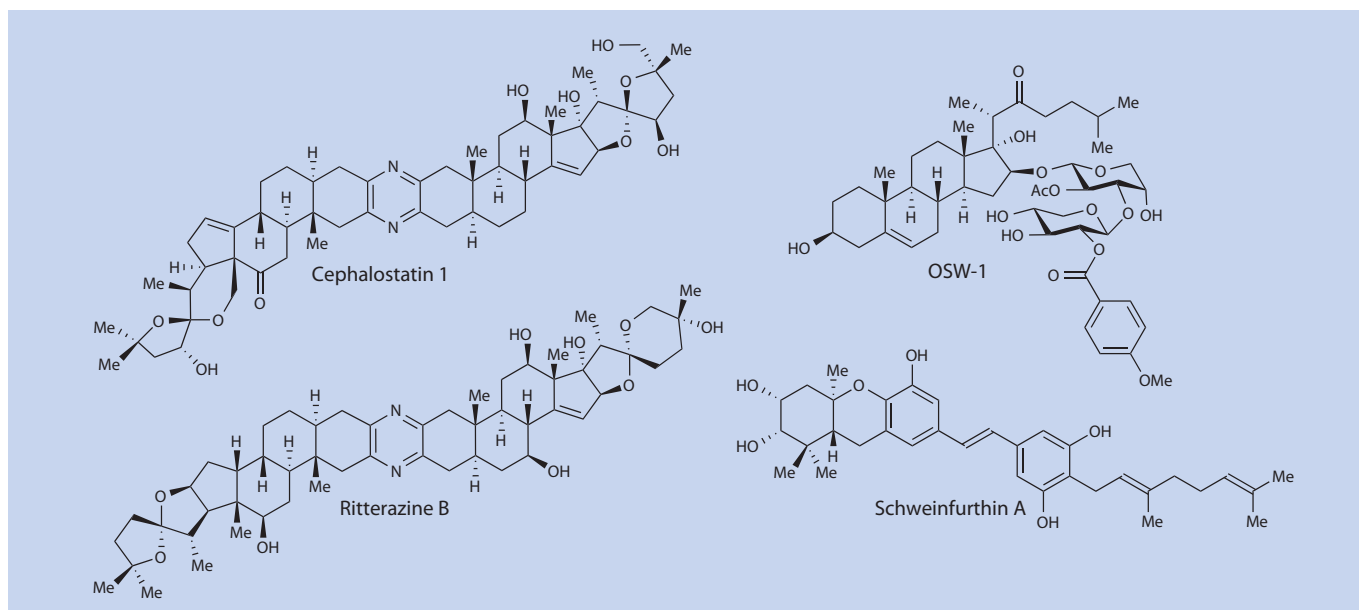


Billedet viser en eksperimentel teknik til adskillelse af store biologiske molekyler, såsom proteiner, vha. såkaldt gel-elektroforese. Teknikken anvendes som udgangspunkt for mere detaljerede analyser så som "western blotting" eller masse-spektrometrisk proteinanalyse. Begge dele blev anvendt i studierne beskrevet i artiklen.

Foto: Thomas B. Poulsen

udtryk), hvis dette ikke er kendt i forvejen. Ydermere kan det være noget af et detektivarbejde at forstå, hvordan vekselvirkningen mellem molekyle og protein kan resultere i den observerede biologiske aktivitet. Vi kan kalde dette for molekylets "mekanisme".

Overraskelserne kan dog være store, når det lykkes at finde frem til et målprotein for et bioaktivt molekyle. Hvis der er tale om et molekyle, hvis biologiske aktivitet er relateret til en bestemt sygdom – f.eks. at molekylet er selektivt giftigt for kræftceller – kan opdagelsen af et uventet målprotein først og fremmest lære os noget nyt om sygdommen og dens underliggende biologi (nemlig



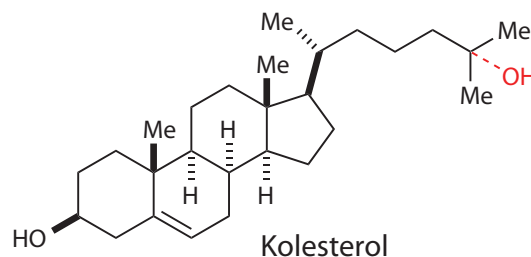
Figur 1. Kemiske strukturer for de fire naturstoffer, som har vist sig selektivt giftige for kræftceller. Cephalostatin 1 og ritterazine B stammer begge fra organismer (hhv. orme og tunikater), der lever på havbunden, mens OSW-1 og schweinfurthin A begge stammer fra planter.

Kolesterol og oxysteroler (boks 1)

Kolesterol er et livsnødvendigt fedtstof, idet det indgår som en hovedbestanddel i mange af de membransystemer, som findes i vores celler. Det er samtidig også en vigtig byggesten for kroppens syntese af en lang række andre vigtige molekyler, f.eks. steroidhormoner, galdesyrer og D-vitamin. Store mængder kolesterol kan dog være skadeligt, hvilket kan lede til en række hjerte-kar problemer.

I forbindelse med stofskiftet dannes en række kolesterol-lignende forbindelser, såkaldte oxysteroler, som findes i meget små mængder i vores celler.

Oxysterolerne er langt mere vandopløselige end kolesterol og de kan påvirke en række pro-



Figuren viser et kolesterolmolekyle (med sort). Når en alkohol-gruppe (OH med rød) er påhæftet kulstof-25 i kolesterolmolekylet har vi en oxysterol – 25-hydroxysterol. På figuren angiver "Me" en methyl-gruppe.

cesser i cellers omsætning af fedtstoffer i kraft af deres evne til at binde en række forskellige proteiner (herunder ORProtei-

nerne). Man ved dog endnu ikke, hvor vigtig en rolle oxysterolerne spiller i vores organisme som helhed.

at det nyfundne protein tilsyneladende spiller en rolle for sygdommens udvikling), og det kan samtidig være startskuddet til ny medicinudvikling.

Et nyt målprotein for kræftbehandling

Som del af et forsker-team fra Department of Chemistry & Chemical Biology på Harvard University var jeg en af de forskere, der for nylig fik sig en stor overraskelse under studier af en gruppe af naturstoffer (figur 1), som netop er selektivt giftige for kræftceller. Vi havde tidligere fundet, at disse fire naturstoffer sandsynligvis havde samme biologiske mekanisme, vurderet bl.a. ud fra statistiske sammenligninger af mere end

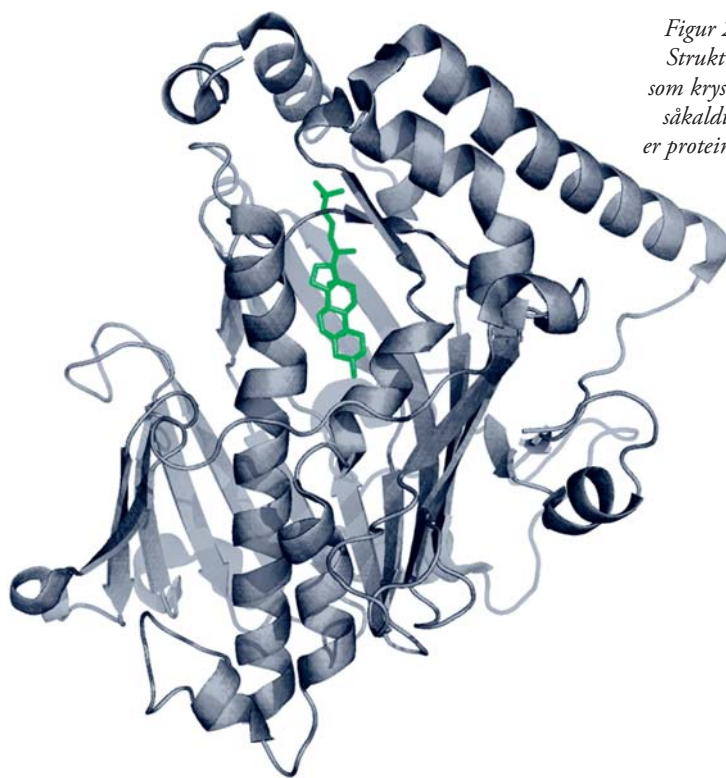
40.000 molekylers evne til at slå kræftceller ihjel. Undersøgelser (bl.a. via såkaldt affinitets-kromatografi – se figur 3) af disse fire naturstoffer har vist, at de alle binder sig til to forskellige proteiner tilhørende en særlig gruppe kaldet ORProteiner. Og det var heri overraskelsen bestod, idet denne gruppe proteiner ikke tidligere er blevet sat i forbindelse med kræft. Dermed kan disse proteiner være kandidater for udvikling af kræftmedicin.

Binder til kolesterol

Alle eukaryote organismer fra gærceller til mennesket har ORProteiner i sig, og i mennesker findes der 12 af dem. Men man ved ikke præcis hvilken funktion disse ORProteiner udfører indeni cellerne. Det gælder også de to ORProteiner, vi identificerede som målproteiner for de fire naturstoffer.

Det ene af disse proteiner hedder OSBP, og det blev oprindeligt opdaget for sin evne

til at binde stærkt til oxiderede former af kolesterol, de såkaldte oxysteroler (se boks 1). Denne evne har også lagt navn til proteinet, således at OSBP er en forkortelse af **OxySterol Bin-dende Protein**. Forkortelsen "ORProteiner" for hele familien betyder simpelthen **OSBP-Relaterede-Proteiner**. Det andet ORProtein, vi identificerede i vores undersøgelse, er tæt beslægtet med OSBP og kaldes ORP4L. Begge de to protei-



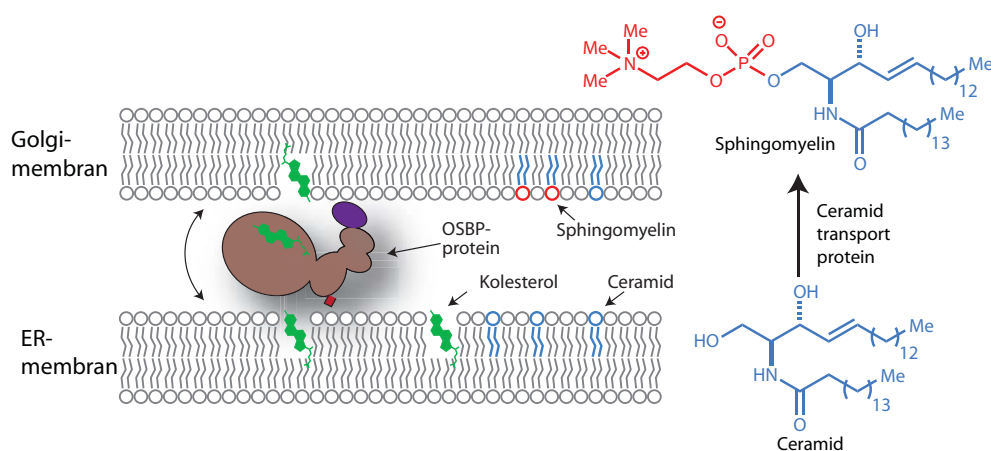
Figur 2. Struktur af et ORProtein fra gær. Strukturen er afsløret ved at gro proteinet som krystaller og undersøge det ved hjælp af såkaldt røntgenkrystallografi. I strukturen er proteinet farvet grå. Midt i strukturen ses et oxysterol-molekyle (grøn), som er bundet i en lomme midt i proteinet. På den måde skjermes det fra det omgivende vandige miljø, hvori det ikke er opløseligt.

ner binder, foruden oxysteroler, også stærkt til kolesterol.

Man kender den 3-dimensionelle struktur af et af ORProteinerne fra gær, hvor man kan se, at oxysterolmolekylet er bundet i en dyb lomme i strukturen (figur 2).

Vores efterfølgende undersøgelser viste, at alle fire naturstoffer binder både OSBP og ORP4L med meget høj affinitet. Ved at anvende en lang række biokemiske og cellebiologiske eksperimenter kunne vi efterfølgende godtgøre, at OSBP og ORP4L med stor sandsynlighed netop er de proteiner, som "formidler" den biologiske aktivitet af alle fire naturstoffer. Dette vil sige, at kræftceller dør, når de udsættes for naturstofferne, netop fordi disse binder til OSBP og/eller ORP4L. Dette lyder umiddelbart til at være en trivial konklusion, men det kræver faktisk mange beviser, før man kan konkludere noget som helst i den henseende.

Fedtstofsammensætning i cellens organeller (boks 2)



Membranerne i cellens forskellige organeller indeholder vidt forskellige koncentrationer af fedtstoffer. F.eks. indeholder membranen i det endoplasmatiske reticulum (ER-membranen) ca. 5 % kolesterol, mens plasmamembranen indeholder 30-40 % kolesterol. Denne koncentrationsforskel bibeholdes på trods af, at organellerne konstant udveksler små fedtstoffoldige vesikler, som man umiddelbart skulle tro ville ensrette fedtstofsammensætningen.

Faktisk ved man, at når udvekslingen af vesikler blokeres, så sker der kun en delvis

blokering af transporten af f.eks. kolesterol. Det antyder stærkt, at andre mekanismer er ansvarlige for dele af fedtstoftransporten. Transportproteiner, som er dedikerede til at fragte en type fedtstof fra et sted til et andet, er oplagte kandidater til at varetage en sådan opgave.

Figuren viser en model for, hvordan man kan forestille sig, at proteinet OSBP kunne fungere som et transportprotein for kolesterol. Et sådant fedtstoftransportprotein kunne virke i såkaldte "close contact sites", som er områder hvor to membraner er meget tæt

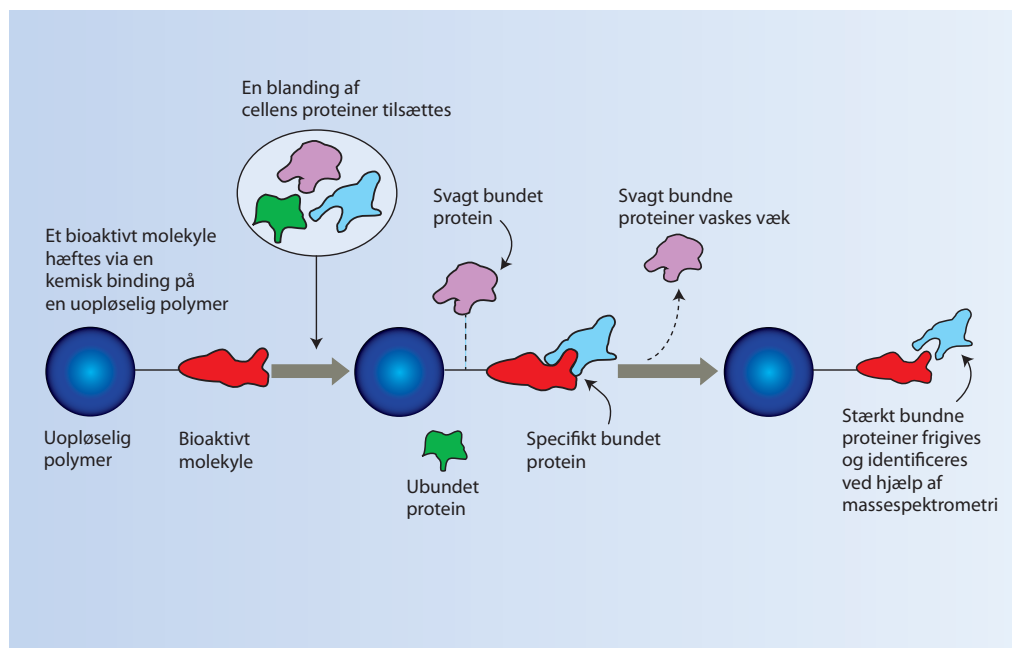
på hinanden. OSBP-proteinet indeholder særlige domæner (lilla og rød på figuren), der gør det muligt for proteinet at vekselvirke med membraner for to forskellige organeller i cellen; golgi-apparatet og endoplasmatiske reticulum (ER).

En tilsvarende mekanisme kendes for de to vigtige fedtstoffer, ceramid og sphingomyelin. Ceramid transporteres af et ceramid-transportprotein (kaldet CERT) fra ER-membranen til Golgi-membranen, hvor det omdannes til sphingomyelin ved, at et enzym påsætter den røde kemiske gruppe.

Sensorer eller transportører?

Vi står nu med to helt store ubesvarede spørgsmål: Nemlig hvilken funktion disse ORProteiner har i vores celler, og hvorfor kræftceller tilsyneladende er mere afhængige af disse proteiner end raske almindelige celler er det. Vi kender endnu ikke svarene på disse spørgsmål, men flere interessante scenarier kan udtænkes. Baseret på de tilgængelige informationer om ORProteinerne, er det sandsynligt, at de enten fungerer som sterolsensorer, dvs. proteiner som "måler" sterolkoncentrationen i cellerne og bruger den information til at påvirke andre cellulære processer, eller at ORProteinerne er transportproteiner, som kan transportere f.eks. kolesterol fra et af cellens organeller til et andet.

Et sensorprotein kunne fungere som et slags kolesterolbarometer for cellen, hvor proteinet eksempelvis signalerer til andre proteiner i cellen, at der er tilstrækkelige mængder kolesterol til stede for at cellen



Figur 3. Princippet bag såkaldt affinitetskromatografi, som går ud på at identificere netop de proteiner, der binder til et bestemt bioaktivt molekyle.

kan dele sig. Det er en oplagt mulighed, at kræftceller kan udnytte et sådant system til at dele sig ukontrolleret.

Transport-teorien

Den anden mulighed – at ORProteinerne er transportproteiner af kolesterol – er en interessant teori, idet dette evt. kan forklare de store forskelle i fedtstofsammensætning, som kan observeres i cellens forskellige organeller (se boks 2). Denne teori understøttes af, at langt de fleste medlemmer af proteinfamilien, inklusiv OSBP og ORP4L, indeholder strukturdømnener, der giver dem mulighed for at vekselsvirke med flere forskellige lipidmembraner, enten i form af cellens plasmamembran eller membranerne i cellens forskellige organeller.

F.eks. kan OSBP vekselsvirke med membranerne hos de to celleorganeller endoplasmatiske reticulum og Golgi-apparat. I netop disse to organellers membransystemer foregår biosyntesen af en række meget vigtige fedtstoffer. Man har faktisk allerede fundet et transportprotein (kaldet CERT), som transporterer fedtstoffet ceramid fra membranen i det endoplasma-

tiske reticulum til Golgi-membranen, hvor ceramid efterfølgende omdannes til et andet fedtstof sphingomyelin (se boks 2). Man forestiller sig, at transporten foregår i områder, hvor to membraner er meget tæt på hinanden. Transportproteiner, som kan vekselsvirke med begge membraner, vil i sådanne "close contact sites", som det hedder på fagsprog, kunne operere effektivt og samtidigt "koordinere" deres aktivitet.

Den tætte sammenhæng mellem koncentrationen af sphingomyelin og kolesterol, som man kan observere i blandt andet cellens plasmamembran, kunne således være en konsekvens af koordinerede aktiviteter af CERT samt et eller flere ORProteiner. I den forbindelse har vi faktisk også vist, at biosyntesen af sphingomyelin blokeres, når de fire naturstoffer tilsættes celler.

Denne opdagelse kunne derfor netop indikere en koordination mellem transporten af kolesterol og fedtstoffet ceramid, der som nævnt er den direkte forløber for sphingomyelin. Hvis transporten af forskellige fedtstoffer – herunder kolesterol – viser sig at

være en vigtig parameter for at en celle kan dele sig hurtigt, så kan man igen forestille sig, at kræftceller kan udnytte dette til at accelerere deres celledeling. De vil derfor også være specielt følsomme, når processen blokeres med et af de fire naturstoffer.

Opdagelse med fremtidsperspektiver

Opdagelsen af, at ORProteinerne er målproteiner for de fire naturstoffer er interessant af flere årsager. For det første fordi der nu er etableret en klar forbindelse mellem ORProteiner og kræftsygdom. Man vil derfor i fremtiden kunne tage en mere systematisk tilgang og forsøge at udvikle nye – og simple molekyler – som også vekselsvirker med ORProteiner, og som vil kunne testes for deres anti-kræft aktivitet i levende organismer. For det andet fordi man nu vil kunne anvende de fire naturstoffer som molekyllære værktøjer til at studere ORProteinerne og dermed forsøge endeligt at afdække disse proteins cellulære funktion. Her kunne man jo håbe på endnu en overraskelse.

Om forfatteren



Thomas B. Poulsen er tidligere Post Doc på Department of Chemistry & Chemical Biology, Harvard University hos Prof. Matthew D. Shair (stipendie fra Lundbeckfonden). Han er nu på Institut for Kemi, Aarhus Universitet. thpou@chem.au.dk

Videre læsning:

M. D. Shair et al.: *Natural Products Reveal Cancer Cell Dependence on Oxysterol-Binding Proteins*. *Nature Chemical Biology*, 2011, vol. 7, p. 639-647.

A. Harvey: *Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products*. *Drug Discovery Today*, 2000, vol. 5, p.294-300.

M. Bredel & E. Jacoby: *Chemogenomics: an emerging strategy for rapid target and drug discovery*. *Nature Reviews Genetics*, 2000, vol. 5, p.262-275.