

En internationell forskargrupp har nyligen avslöjat nya amyloidogena egenskaper hos S100A6, ett signalprotein som reglerar flera cellprocesser och som finns i astrocyter kring de motornervceller som degenererar i ALS. Teamet, som leds av den portugisiska biofysikern **Cláudio Gomes**, har upptäckt att S100A6 kan bilda amyloidfibriller och att S100A6 har förmågan att påskynda aggregering av superoxiddismutas-1, ett neuropatologiskt kännetecken hos ALS. Denna studie antyder alltså en ny mekanism genom vilken proteinet S100A6 kan vara en viktig trigger av ALS i neuronal vävnad.

Några av de mest förödande neurodegenerativa sjukdomarna är associerade med avlagringen av proteinaggregat – amyloid – i det centrala och perifera nervsystemet. Det är inte klart huruvida aggregaten orsakar dessa sjukdomar eller bara är en biprodukt av dem, men de uppstår alltid i sjukdomar som Alzheimers, Parkinson och ALS (amyotrofisk lateralskleros). Intressant nog finns det inga tydliga genetiska faktorer som förklarar uppkomsten av de flesta sjukdomsfallen. Nu har ett tvärvetenskapligt forskarlag från Portugal, Sverige och Tyskland identifierat en kalciumbindande signalomvandlare – proteinet S100A6 – som är överuttryckt i ALS-drabbade vävnader. S100A6 har förmågan att accelerera den karakteristiska amyloidaggregationsprocessen vid ALS¹.

AMYLOID MARKERAR PLATSEN

Proteiner är centrala för levande system. De är genetiskt kodade molekylära maskiner som utför viktiga funktioner, från katalys (exempelvis metabola enzymer), mekaniskt arbete (exempelvis muskelfibrer), transport (exempelvis hemoglobin) till signalering (exempelvis

cytokiner). Många av dessa roller beror på små förändringar i proteinernas tredimensionella struktur, som de som syns i specifika signalomvandlare för kalciumbindning för att de ska erhålla förmågan att sätta igång gentranskription eller avfyra aktionspotentialer.

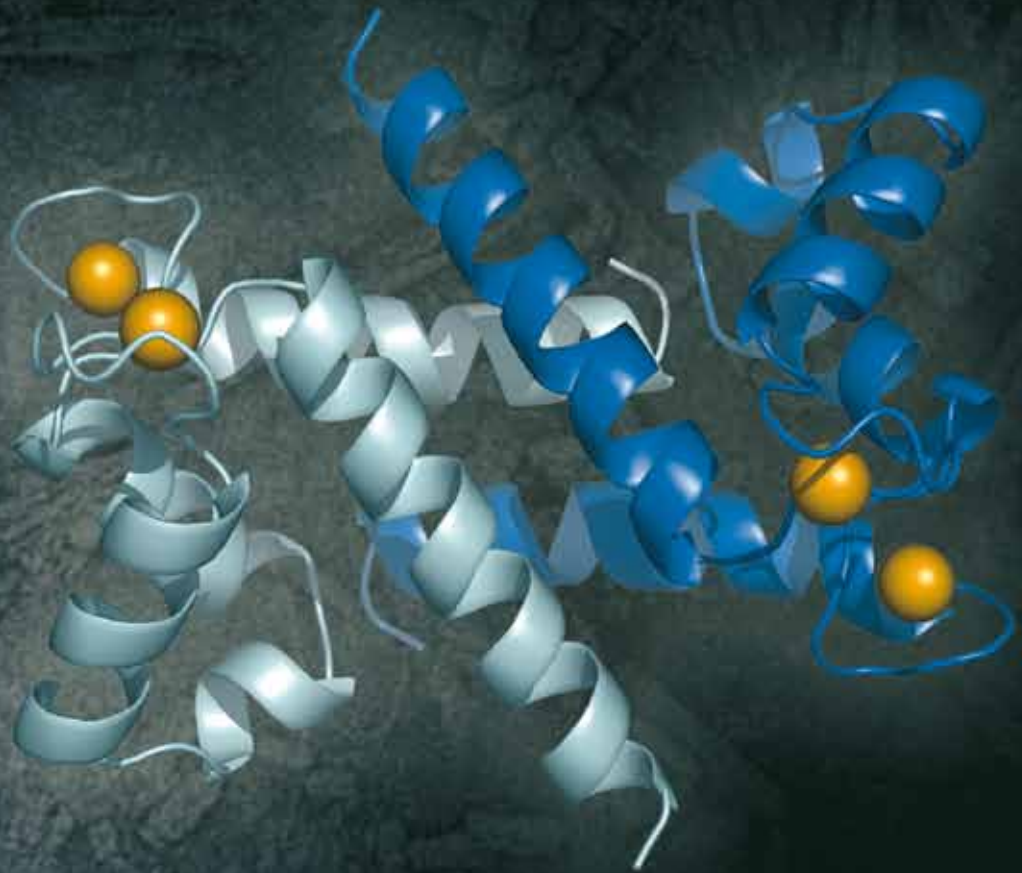
Men proteiner är också mottagliga för mer drastiska – och ofta sjukliga – strukturella förändringar. Detta är fallet med amyloider, proteinaggregat som är resistent mot proteolytisk nedbrytning. Teoretiskt kan alla proteiner genomgå amyloidutveckling, men bara ett fåtal kan göra det under fysiologiska villkor. Centrala och perifera nervsystemet hyser en stor del av de humana proteinerna som är kända för att bilda amyloider.

Detta har betydande neuropatologiska konsekvenser: amyloider stör cellfysiologin, och de blir giftiga genom att störa vävnadens arkitektur, genom att inducera neuroinflammation och apoptos och genom att ackumulera metalljoner som främjar uppkomsten av oxidativ stress. Men av än större vikt är att vävnader inte kan eliminera amyloider på något enkelt sätt, vilket innebär att de tenderar att ackumuleras.

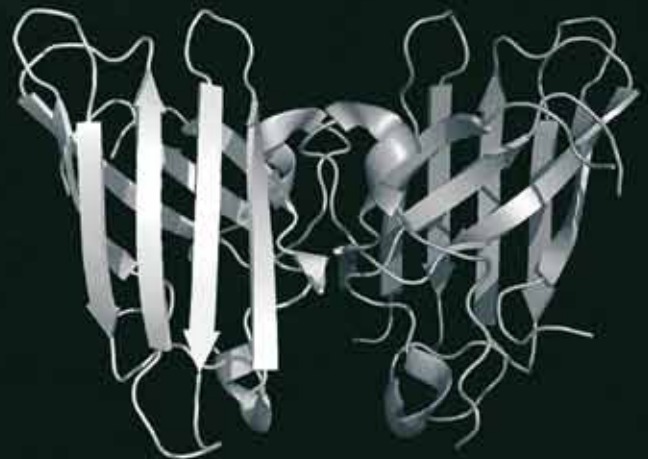
Dessa toxiska mekanismer delas med proteiner och peptider som är förknippade med flera neurodegenerativa tillstånd, som Alzheimers (amyloid- β -peptid), Parkinson (α -synuklein) och ALS (Cu, Zn-superoxiddismutas, SOD1). Det är inte klart om amyloid är orsaken till eller en följd av dessa sjukdomar, men de är alltid närvarande i drabbade vävnader i avancerade sjukdomsstadier och är en av få pålitliga sjukdomsmarkörer. För Alzheimers sjukdom förkortades inkuberingsfasen och ökade amyloidaggregationen och neurodegenerationen vid intracerebrala injektioner av amyloida prekursorer till möss².

Detta innebär att förekomsten av amyloida avsättningar kan stimuleras av andra proteiner. Medverkan av flera proteiner i aggregeringsprocessen kan ligga bakom den komplexa och sporadiska karaktären av amyloida sjukdomar. December 2012 rapporterade ett arbetslag lett av Cláudio Gomes från Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa i Portugal, att de identifierat ett nytt protein, kallat S100A6, som har förmågan

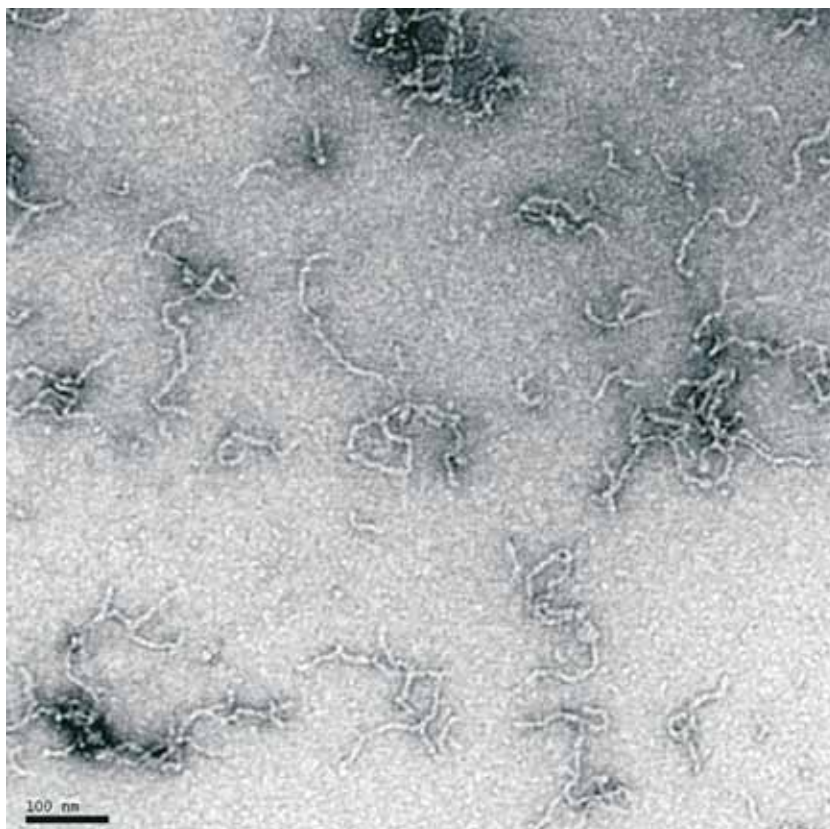
Upptäckt av ny trigger av ALS i internationellt samarbete



”Teoretiskt kan alla proteiner genomgå amyloidutveckling, men bara ett fåtal kan göra det under fysiologiska villkor.”



S100A6-AMYLOIDFIBRILLER



Figur 1. Elektronmikroskopbild som visar S100A6-amyloidfibriller som filament av olika storlekar.

att självständigt bilda amyloider och som dessutom kan underlätta och påskynda amyloidaggregation av SOD1, ett kännetecken för ALS (figur 1). Dessa resultat har publicerats i *Journal of Biological Chemistry* (JBC)¹.

S100-PROTEINER

S100-proteiner är en grupp kalciumsignalerande proteiner, som reglerar cellcykeln, celltillväxt, differentiering och motilitet. Människor har 21 proteiner ur denna grupp i olika vävnader och i olika subcellulära lokaliseringar där de utövar olika funktioner. Vanligtvis förekommer höga proteinnivåer i hjärnan. Denna proteinfamilj identifierades först i hjärnhomogenat från nötkreatur baserat på proteinets löslighet (S) i mättat (100%) ammoniumsulfat, därav beteckningen S100.

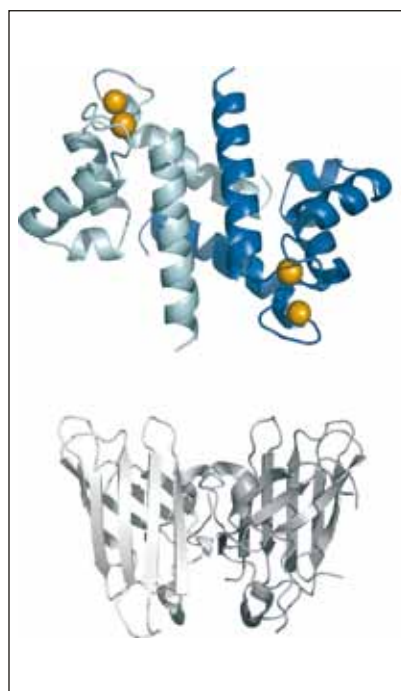
Exempelvis svarar S100B för cirka två procent av allt proteininnehåll i hjärnan. S100B är känd för sina koncentrationsberoende cellulära effekter i det

centrala nervsystemet, där de är neurotrofiska vid nanomolära koncentrationer och inducerar apoptos och förvärrar neurotoxiciteten av amyloid- β i Alzheimers vid mikromolära koncentrationer. S100-proteiner är vanliga kliniska markörer baserat på förändrade uttrycksnivåer av vissa S100-proteiner i cancer och neurodegenerativa, inflammatoriska och autoimmuna sjukdomar (figur 2).

METALLJONER LIGGER BAKOM

Den biologiska aktiviteten hos S100-proteiner moduleras av olika metalljoner – kalcium, zink och koppar – som ändrar proteinstrukturen vid interaktion. En vanlig strukturell förändring i S100-proteiner sker vid kalciumbindning som alstrar ett ”aktivt” protein, som i sin tur aktiverar andra signalerande partner. Men vissa S100-proteiner kan binda till varandra i grupper om 4 till 12 proteinsubenheter, som formar oligomerer på ett metalljonberoende sätt.

3D-STRUKTUR AV S100A6 OCH SOD1



Figur 2. 3D-strukturer av proteinerna S100A6 (överst) och SOD1 (botten). De orangefärgade sfärerna i S100A6 representerar kalciumjoner, som aktiverar signaleringsegenskaperna hos detta protein.

Denna association är fysiologisk och förekommer till exempel vid proinflammatoriska svar (S100A12) eller neuritutväxt (S100A4). Den roll S100-proteiner har i patogen har omprövats efter Ludmilla Morozova-Roches grupp i Umeå upptäckt, som visade att de proinflammatoriska S100A8/A9-proteinerna bildar amyloidavsättningar (kallade corpora amylacea) i prostatan hos cancerpatienter och att dessa amyloider kan framkallas av kalcium eller zink³. Även om proteinavlagring är relevant i andra cancer typer, öppnade denna upptäckt frågan om andra S100-proteiner än S100A8/A9 också är involverade i amyloidsjukdomar.

ETT LYCKAT SAMARBETE

Kollegan Cláudio Gomes blev slumpartat varse Ludmilla Morozova-Roches upptäckt vid ett informellt möte i maj 2009 i hennes laboratorium vid Umeå universitet. Först då insåg de båda att de delade forskningsintressen i S100-prote-

iner. Cláudio Gomes är biofysiker och har forskat om metalljoners roll i strukturen och stabiliteten hos S100-proteiner sedan 2005 i samarbete med Günter Fritz, en kristallograf som arbetar på avdelningen för neuropatologi vid Freiburgs universitet, Tyskland. Günter Fritz har experimentellt bestämt strukturen på flera S100-proteiner och har biofysiskt karakteriserat metalljoners bindning till flera S100-proteiner.

Gomes-Fritz-samarbetet har redan tidigare kopplat S100A2, kalcium och zink till varandra i cancer⁴, men ingen hade övervägt att forska om S100-amyloider, trots att amyloidforskning var ett bekant ämne för Gomeslaget⁵. Cláudio Gomes hade också varit intresserad av ALS⁶ och mekanismerna för SOD1-amyloidavsättning. Om man funderar över S100-proteinernas möjlighet att bilda amyloider är S100A6 ett självklart forskningsmål, ett protein som reglerar celltillväxt och tumörbildning.

S100A6 är överuttryckt i Alzheimers sjukdom⁷ och ALS⁸. I ALS-patienter är S100A6 mycket överuttryckt i reaktiva astrocyter i hjärnstammen och ryggmärgen, vilka omger degenererande axoner till motorneuron. I sin tur innehåller dessa ALS-drabbade nervceller cytoplasmiska SOD1-aggregat, som är vanligt förekommande sjukdomsindikatorer. Med detta som utgångspunkt gick Gomes, Morozova-Roche och Fritz

sammans för att med gemensamma ansträngningar forska på om S100A6 också kan bilda amyloid och om detta amyloid kan ha en inverkan på ALS.

” Det är inte klart om amyloid är orsaken till eller en följd av dessa sjukdomar, men de är alltid närvarande i drabbade vävnader.”

S100A6 AMYLOIDER

Gomes involverade sin doktorand Hugo M. Botelho i S100A6-amyloidprojektet och den första uppgiften var att bestämma om S100A6 kunde bilda amyloid i likhet med Ludmilla Morozova-Roches S100A8/A9. Efter bekräftelse i datormodeller om att amyloidpotentialen fanns, sattes experimentet upp för att testa denna hypotes. Ren S100A6 inkubades i sura förhållanden och tioflavin-T

(en fluorescerande indikator av amyloid) användes tillsammans med andra biofysiska tekniker (ljusspridning och infrarött ljusabsorption) för att mäta amyloidbildning.

S100A6 bildade amyloid mycket snabbt, inom några timmar. Som en jämförelse tog lysozym, som är involverad i systemisk amyloidos, fyra dagar fram till att amyloid kunde detekteras. S100A6-amyloid bildades även vid fysiologiska förhållanden.

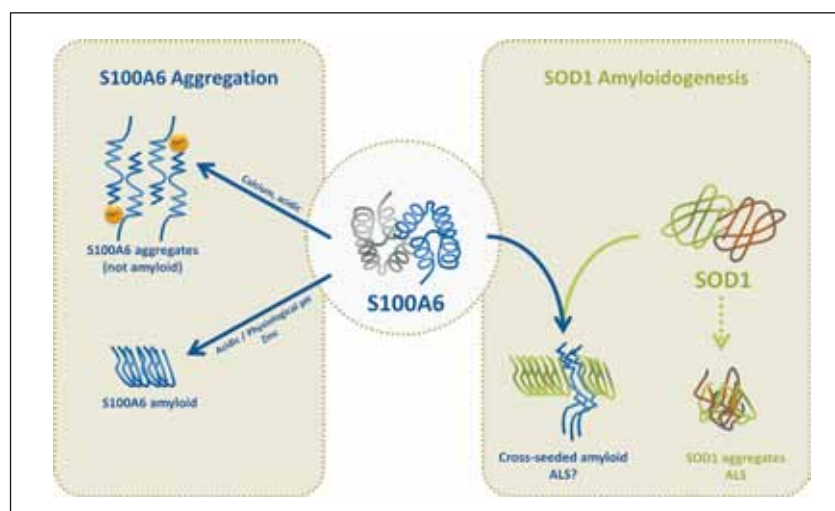
Vid denna tidpunkt hade också bilder av S100A6-amyloid skapats med elektronmikroskopi av Isabel Cardoso, en samarbetspartner vid Instituto de Biología Molecular e Celular i Porto, Portugal. Än mer intressant var att Gomes och Botelho insåg att kalcium hämmade S100A6-amyloidbildning i sura förhållanden. Botelho besökte sedan Morozova-Roches laboratorium för att mäta S100A6 celltoxicitet med neuroblastomceller med hjälp av Umeå universitets doktorand Kiran Yanamandra. Tillsammans observerade de att S100A6-amyloid var giftigt, om inte kalcium ingick.

NYA INSIKTER OM ALS?

Det internationella teamet hade nu visat att S100A6 var i stånd att bilda giftigt amyloid. Men kunde det ha någon effekt på ALS? Det patologiska kännetecknet för ALS är SOD1-amyloidavsättningar i nervceller, inte S100A6. Emellertid kan de förhöjda nivåerna av S100A6 i närheten av ALS-degenererande neuron indikera någon association mellan de två proteinerna, kanske genom en process som kallas amyloidkorsympning, varvid en liten mängd i förväg bildat amyloid fungerar som en mall för ytterligare avsättning. Kanske de höga nivåerna av S100A6 i ALS-patienter utgör tillräckligt med amyloid för att starta SOD1-aggregering.

SOD1-aggregeringen studerades i Gomes laboratorium av postdoc Sónia Leal. Leal och Claudio kunde observera att en liten mängd S100A6-amyloid påskyndade SOD1-aggregering (figur 3). I närvaro av S100A6 tog SOD1-amyloid 30 procent kortare tid på sig att bildas. Detta resulterade i att teamet föreslog nya hypoteser om de mekanismer som leder till ALS debut. Med tanke på att de motoriska nervceller som skadats i

AGGREGERING AV S100A6 OCH SOD1



Figur 3. Aggregering av S100A6 och SOD1. S100A6 kan spontant bilda giftigt amyloid under olika förhållanden. Denna process hämmas av kalcium vid sura betingelser via bildningen av icke-amyloidaggregat. SOD1 kan också bilda aggregat som finns hos ALS-patienter. Små mängder S100A6 kan påskynda aggregering av SOD1 (en process som kallas amyloidkorsympning), vilket tyder på en potentiell roll för att främja ALS-patologi.

ALS (innehållande SOD1-aggregat) är omgivna av aktiverade astrocyter som överproducerar S100A6 föreslog Gomes och hans medarbetare att uppbyggnaden av S100A6 kan främja samspelet mellan proteiner i den komplexa miljön i en synaps.

Efter hand kan S100A6 också komma att befärma bildningen av SOD1-aggregat *in vivo*, vilka är kända för att utbreda sig i neuroner på ett prionliknande sätt, där det sprider och vidmakthåller sjukdom. Teamet fortsätter nu att utreda S100-amyloider på djupet och ytterligare spännande upptäckter förväntas inom en snar framtid^{9,10}.



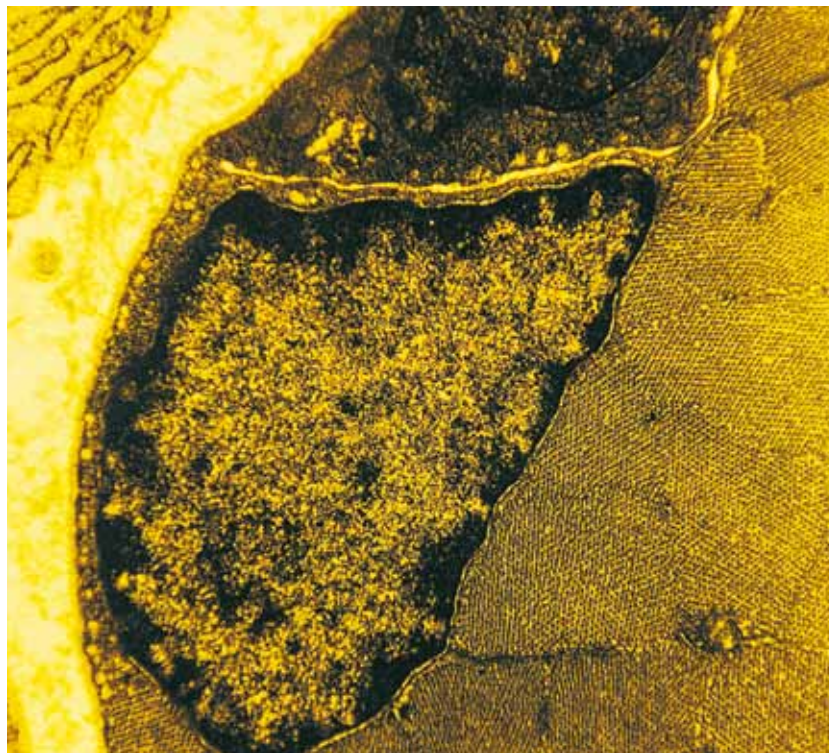
HUGO M. BOTELHO
PhD, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal



LUDMILLA A. MOROZOVA-ROCHE
professor, Institutionen för medicinsk biokemi och biofysik, Umeå universitet, Umeå, Sverige.
ludmilla.morozova-roche@medchem.umu.se



CLÁUDIO M. GOMES
professor, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal, www.itqb.unl.pt/pbfs



REFERENSER

1. Botelho HM, Leal SS, Cardoso I, Yanamandra K, Morozova-Roche LA, Fritz G, Gomes CM. S100A6 Amyloid Fibril Formation Is Calcium-modulated and Enhances Superoxide Dismutase-1 (SOD1) Aggregation. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287:42233-42.
2. Stohr J, Watts JC, Mensinger ZL, Oehler A, Grillo SK, DeArmond SJ, Prusiner SB, Giles K. Purified and synthetic Alzheimer's amyloid beta (Aβ) prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109:11025-30.
3. Yanamandra K, Alexeyev O, Zamotin V, Srivastava V, Shchukarev A, Brorsson AC, Tartaglia GG, Vogl T, Kaye R, Wingsle G, Olsson J, Dobson CM, Bergh A, Elgh F, Morozova-Roche LA. Amyloid formation by the pro-inflammatory S100A8/A9 proteins in the ageing prostate. *PLoS one*. 2009;4:e5562.
4. Botelho HM, Koch M, Fritz G, Gomes CM. Metal ions modulate the folding and stability of the tumor suppressor protein S100A2. *The FEBS journal*. 2009;276:1776-86.
5. Leal SS, Botelho HM, Gomes CM. Metal ions as modulators of protein conformation and misfolding in neurodegeneration. *Coordination Chemistry Reviews*. 2012;256:2253-70.
6. Kim S, Leal SS, Ben Halevy D, Gomes CM, Lev S. Structural requirements for VAP-B oligomerization and their implication in amyotrophic lateral sclerosis-associated VAP-B(P56S) neurotoxicity. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285:13839-49.
7. Boom A, Pochet R, Authélet M, Pradier L, Borghgraef P, Van Leuven F, Heizmann CW, Brion JP. Astrocytic calcium/zinc binding protein S100A6 over expression in Alzheimer's disease and in PS1/APP transgenic mice models. *Biochimica et biophysica acta*. 2004;1742:161-
8. Hoyaux D, Boom A, Van den Bosch L, Belot N, Martin JJ, Heizmann CW, Kiss R, Pochet R. S100A6 overexpression within astrocytes associated with impaired axons from both ALS mouse model and human patients. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2002;61:736-44.
9. Botelho HM, Fritz G, Gomes CM. Analysis of S100 oligomers and amyloids. *Methods in molecular biology*. 2012;849:373-86.
10. Fritz G, Botelho HM, Morozova-Roche LA, Gomes CM. Natural and amyloid self-assembly of S100 proteins: structural basis of functional diversity. *The FEBS journal*. 2010;277:4578-90.