



*Har kemisk reaktions-
kinetik någon relevans
för Alzheimers sjukdom?*



Aggregering av amyloid β -protein har kopplats till uppkomst och progression av Alzheimers sjukdom. Hittills har kunskaperna om de molekylära mekanismerna bakom aggregeringsprocessen varit begränsade. En ny metod har använts för att identifiera de mikroskopiska delstegen i förloppet och kan ligga till grund vid utveckling av nya specifika bromsmediciner. I denna artikel beskrivs metoden av **Sara Snogerup Linse**, professor i fysikalisk kemi och molekylär proteinvetenskap, Lunds universitet.

Alzheimers sjukdom drabbar allt fler individer. Det första fallet beskrevs i litteraturen 1906 av Alois Alzhemier.¹ Forskare har sedan dess under många årtionden sökt svar på frågor som "Vad är det som får sjukdomen att starta?", "Hur skall diagnostiska tester vara konstruerade för att upptäcka sjukdomen innan det är för sent att bota den?" och "Kan vi hitta botemedel mot denna svåra sjukdom?". Forskning pågår på många olika plan och man börjar närma sig svaren på de tre frågorna. Förhoppningsvis kommer någon inom denna mycket aktiva och diversifierade forskning snart fram till ett genombrott. Varför valde då vi, som ett litet fysikalisk-kemiskt laboratorium, att ge oss in i detta redan så heta fält i början av 2010-talet? Det var ju inte lönt att göra det som andra redan gör och gör mycket bättre än vi någonsin skulle kunna göra. Nu i efterhand kan det verka som att vi ställde frågorna "Vad görs inte idag?" och "Är det något av detta som vi skulle kunna göra?". Ett svar på dessa frågor var en detaljerad utredning av reaktionskinetiken för en av de underliggande molekylära processerna. Och det blev den vinkeln vi gav oss på. Men egentligen halkade vi in på ett bananskal.

Varför valde vi att studera amyloid β -peptidens aggregeringsprocess?

VARFÖR VALDE VI ATT STUDERA AMYLOID β -PEPTIDENS AGGREGERINGSPROCESS?

Även om ingen vet exakt vilka molekylära processer som får Alzheimers sjukdom att dra igång och fortsätta, finns en rad huvudmisstänkta processer och proteiner. Ett av proteinerna är amyloid β -proteinet eller amyloid β -peptiden ($A\beta$) och ett annat är protein tau. Bland de misstänkta proteinerna finns också en rad proteaser, som bidrar till att producera $A\beta$ från ett membranbundet förstadium, samt kinaser som fosforylerar tau bland annat så att dess laddning ändras. Enligt amyloidkaskadhypotesen, som introducerades av Hardy och Higgins på 1990-talet,² börjar sjukdomsförloppet med att $A\beta$ aggregerar utanför nervceller och det leder i sin tur till aggregering av tau inne i cellerna och celldöd. Dessutom pekar den kun-

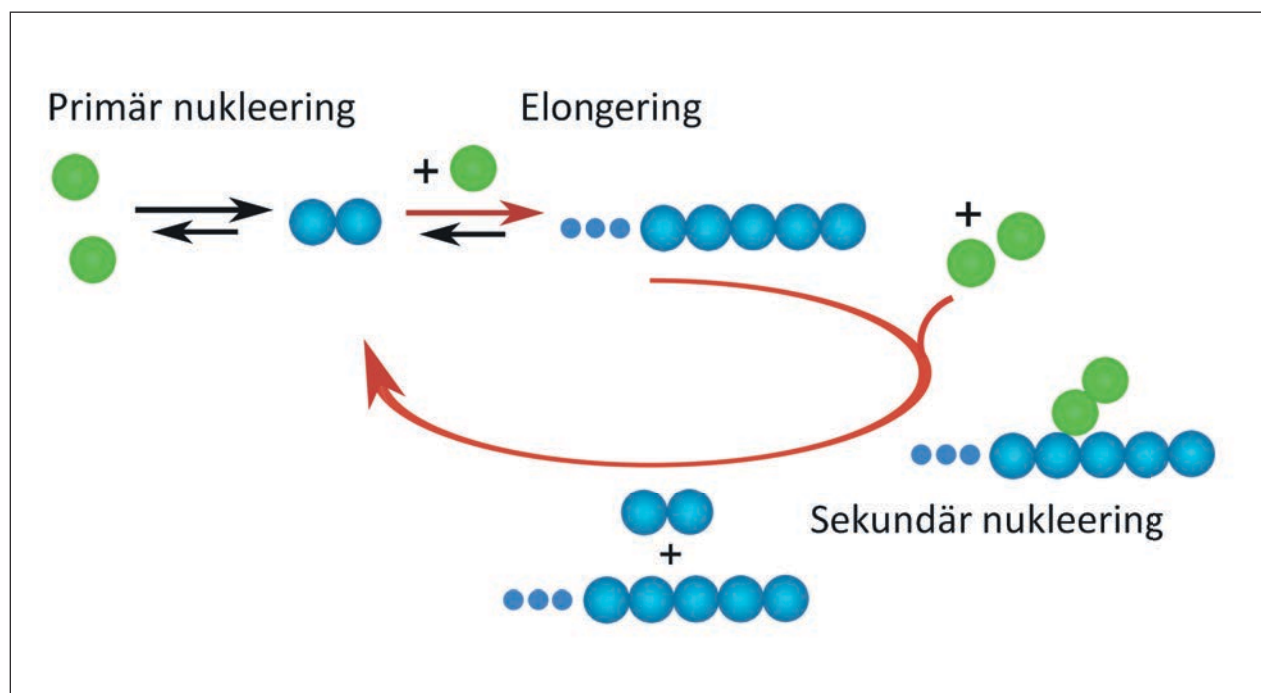


Bild 1. Aggregering av amyloid β -peptiden ($A\beta$) följer en cyklisk mekanism som ger processen en autokatalytisk natur. Det enda steg som kan ske vid tiden noll om man börjar från rena monomerer är primär nukleering. Både elongering och sekundär nukleering sker med högre hastighet så fort en mycket liten mängd aggregat har bildats. Därmed övergår processen i ett självförstärkande cykliskt beteende.

”Inom reaktionskinetik studerar man hur fort olika reaktioner sker och vilka parametrar som styr hastigheten.”

skap man har idag på att det varken är monomerer av $A\beta$ eller de stora aggregaten som dödar nervceller, utan små aggregat som också kallas oligomerer.³ Vi skulle egentligen studera hur $A\beta$ s aggregeringsprocess störs av nanopartiklar och det var då vi upptäckte att ingen studerat hur den ostörda processen gick till. Vi fann massor med beskrivningar av processen i litteraturen, men det visade sig vara postulerade hypoteser och i inget fall kunde vi hitta att den postulerade mekanismen utretts. Det var då vi halkade in på det berömda bananskalet.

REAKTIONSKINETIK OCH REAKTIONSMEKANISM

Inom reaktionskinetik studerar man hur fort olika reaktioner sker och vilka parametrar som styr hastigheten. När man letar efter en reaktionsmekanism

är målet att dissekera en reaktion i de delsteg som sker. Typiskt är att reaktionshastigheten för varje delsteg fås av produkten av en hastighetskonstant och koncentrationerna av alla ämnen som reagerar i det steget. I en hypotesfri (”unbiased”) ansats att finna en reaktionsmekanism och underliggande hastighetskonstanter sätter man upp ett mycket stort antal välkontrollerade experiment där man vet exakt starttillstånd och följer sedan med lämplig mätmetod hur någon molekylär form som ingår i processen ändras som funktion av tiden. Tricket är att köra om experimentet många gånger med små variationer i starttillståndet. Sedan försöker man passa olika kinetiska modeller till data. Den enklaste modell som kan passa alla data väljs ut och används för att förutsäga utfallet av nya typer av exper-

riment än dem man redan kört. När sedan dessa nya experiment körts ser man om den föreslagna mekanismen håller. Vi valde i vårt arbete att applicera denna klassiska metod, för att utreda mekanismen för $A\beta$ s aggregeringsprocess. Vi samarbetar med en grupp på Cambridge University i England. De bygger de kinetiska modellerna, medan vi i Lund jobbar med att få experimenten att fungera i laboratoriet, men det är ett mycket nära samarbete där vi hjälper varandra med utvecklingsidéer.

$A\beta$ S AGGREGERINGSPROCESS

Vi har funnit en mekanism som passar med alla våra data och som också stämt med alla vidare prediktioner och nya experiment hittills. Denna mekanism är cyklisk snarare än linjär (Bild 1) och består av tre delsteg (mikroskopiska steg): i) primär nukleering, ii) elongering och iii) sekundär nukleering.⁴ Dessa mikroskopiska steg (Box 1–3) sker inte i en ordnad följd utan parallellt. Det är vanligt att man delar in den makroskopiskt observerbara processen i olika faser, som till exempel kan kallas lagfas, tillväxtfas och slutplatå (Bild 2). Ingen av dessa makroskopiska faser kan tillskrivas ett särskilt mikroskopiskt steg, utan alla tre



NYHETSBREV
BLÄDDERBAR PDF

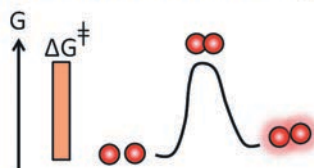
Boka dig för vårt nyhetsbrev och Neurologi i Sverige som blädderbar PDF

Vi skickar sedan flera år tillbaka ett nyhetsbrev där vi länkar de nyheter vi lagt ut på **www.neurologiisverige.se** under veckan som gått. Det blir med andra ord en bra sammanfattning av nyhetsflödet inom ert område. Om du vill hålla dig uppdaterad går du in på webbsidan och anmäler dig i det formulär du hittar under en stor knapp som det står prenumerera på i högerspalten på förstasidan. Där kan du också klicka för om du vill ha tidningen som blädderbar PDF. Om du hellre skickar ett mail med uppgifterna till **redaktionen@pharma-industry.se** går det lika bra.



Pharma Industry Publishing AB
Tyra Lundgrens väg 6, 134 40 Gustavsberg
telefon +46 8 570 10 520
e-mail: redaktionen@pharma-industry.se
Hemsida: www.pharma-industry.se

Box 1. Primär nukleering



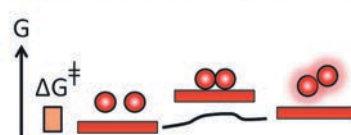
Två eller fler monomerer slår sig samman icke-kovalent och bildar en kärna, nukleus. Denna process kan ske i lösning eller på en främmande yta, såsom t ex en kärlvägg eller ett biologiskt membran. Den höga energibarriären innebär ett lågt värde på hastighetskonstanten. En kärna (nukleus) är det minsta aggregat vars tillväxthastighet är högre än dess sönderfallshastighet.

Box 2. Elongering



Aggregat växer till genom addition av monomerer. Denna process kan ske vid ändarna av amyloid-fibriller. Den mycket låga energibarriären innebär ett högt värde på hastighetskonstanten. Processen kan ha flera delsteg: association av monomerer på ändan av fibrillen, följt av konformationsomvandling. Beroende på förhållandena kan associationen eller konformationsändringen vara hastighetsbestämmande.

Box 3. Sekundär nukleering



Två eller fler monomerer slår sig samman icke-kovalent och bildar en nukleus. Denna process sker på ytan av ett redan bildat aggregat av samma slags monomerer. Ytan fungerar som en katalysator som sänker energibarriären och hastighetskonstanten får ett högt värde. Processen kan ha flera delsteg: association av monomerer på fibrillen, nukleering på dess yta och slutligen frisläppning av de nya aggregat som bildats.

steg sker under alla tre faserna, fast i olika proportion.⁵

Om du går längs en gata med restauranger är det mycket större sannolikhet att du väljer en restaurang där det redan är folk, än att du går in i en tom restaurang för att starta en ny folksamling. Det finns ett större motstånd att starta en ny ansamling än att bygga på en som redan finns. På kemiskt språk säger man att energibarriären för nukleering (Box 1) är högre än för elongering (Box 2). Vid tiden noll finns bara en process som kan ske i ett prov som bara innehåller monomerer: monomerer kan associera med varandra i lösningen eller på någon yta, såsom provrörets väggar eller luft-vatten-gränssytan. Detta kan leda till det vi kallar primär nukleering, kärnbildning (Box 1). En kärna, nukleus, definieras som det minsta aggregat vars tillväxthastighet är högre än dess sönderfallshastighet.⁵ Sannolikheten är alltså större att kärnan växer vidare genom att fler monomerer adderas till den, än att kärnan faller sönder i monomerer. På kemiskt språk är energibarriären för att bilda kärnan hög och hastighetskonstanten är låg. Det delsteg som innebär att aggregat växer till kallas inom amyloidfältet för elongering (Box 2). Namnet antyder att aggregaten växer i huvudsak på längden och blir väldigt långa nålliknande aggregat som kallas fibrer eller fibriller.

Man har länge känt till dessa båda delsteg, primär nukleering och elongering, samt att om man tillsätter små mängder av redan bildade aggregat till

en monomerlösning så sker reaktionen fortare.⁶ Det nya vi funnit är att monomerer av A β kan associera till ytan av fibriller och nukleera där. Detta kallas sekundärnukleering (Box 3). Så fort det finns få aggregat i lösningen kommer denna process att helt dominera över primärnukleeringen. Detta gäller under hela aggregeringsprocessen, förutom under de allra första procenten av lagfasen. Det gäller troligen också under sjukdomstiden då monomert och aggregat A β samexisterar. Sekundärnukleering i sig är inget nytt utan har tidigare påvisats i processer som kristallisation och vid polymerisering av hemoglobin i sickle-cell-anemi.⁷ Det nya är att den förekommer i A β -peptidens aggregeringsprocess och att det är den dominerande nukleeringsvägen för A β -peptiden, samt att det är den väg som ger upphov till den allra största mängden toxiska former för A β -peptiden.⁴

SKER AGGREGERINGEN PÅ SAMMA SÄTT I KROPPSVÄTSKA ELLER INNE I EN CELL?

Det kan man förstås inte vara säker på, men det är högst sannolikt att de mikroskopiska steg vi funnit i rena system också förekommer i mer komplexa biologiska system. Man kan säga att försöken med rena prover visar vilka processer som kan förekomma. Det hade varit oerhört svårt att finna den kunskapen i ett komplext prov. Däremot påverkas hastighetskonstanterna av lösningens sammansättning och varje steg sker därför med annan hastighet i ett mer komplext system. Den relativa hastigheten för olika delsteg kommer också att variera och vara annorlunda i det mer komplexa systemet. Sedan kan det förstås förekomma fler delsteg både i buffert och i kroppsvätskor, till exempel lateral association av fibriller. I ett biologiskt sammanhang finns många olika

”Det nya vi funnit är att monomerer av A β kan associera till ytan av fibriller och nukleera där.”

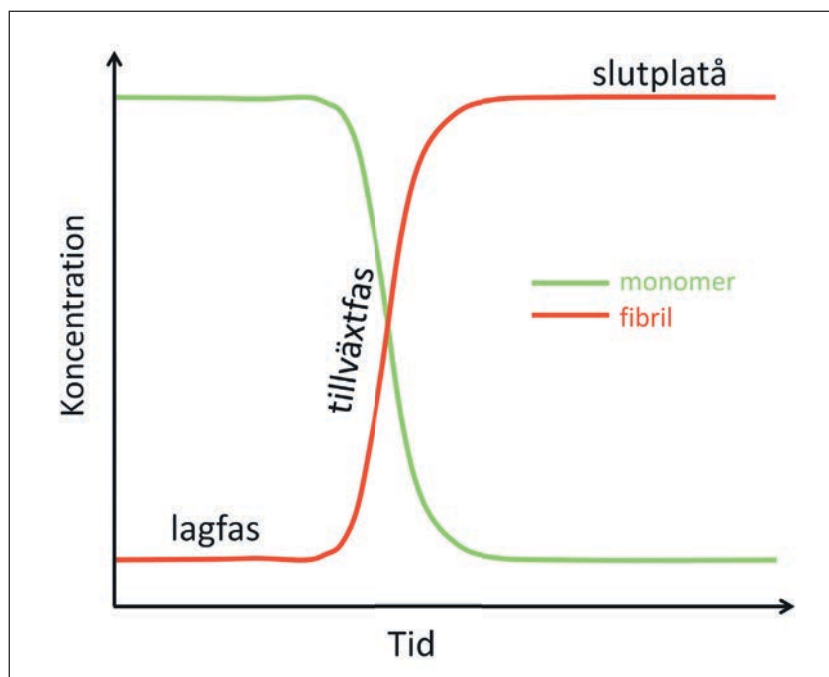


Bild 2. Den makroskopiskt observerbara aggregeringskurvan (rött), samt koncentrationen av monomerer (grönt) visas som funktion av tiden. Kurvans olika faser kallas ofta lagfas, tillväxtfas och slutlig plata.

varianter av A β , samt många andra aggregeringsbenägna proteiner, så samaggregerings- och korskatalytiska processer behöver också utredas.

KAN AGGREGERINGSKINETIK ANVÄNDAS FÖR ATT VASKA FRAM BÄTTRE INHIBITORER?

Kan man utnyttja kunskapen om aggregeringsprocessen för att förstå Alzheimers sjukdom eller utveckla botemedel? Det är en fråga som söker sitt svar. Det vi kan göra för tillfället är att utnyttja vår kunskap om processen till att ta fram selektiva inhibitorer. Den makroskopiskt observerbara kurvan (Bild 2) ändras på olika sätt om en inhibitor selektivt slår ut vart och ett av de tre mikroskopiska stegen (Bild 3A-C), beroende på vilket steg som slås ut kan också genereringen av de farliga oligomera formerna fördröjas eller minskas. Om primärnukleeringen hämmas förlängs lag-

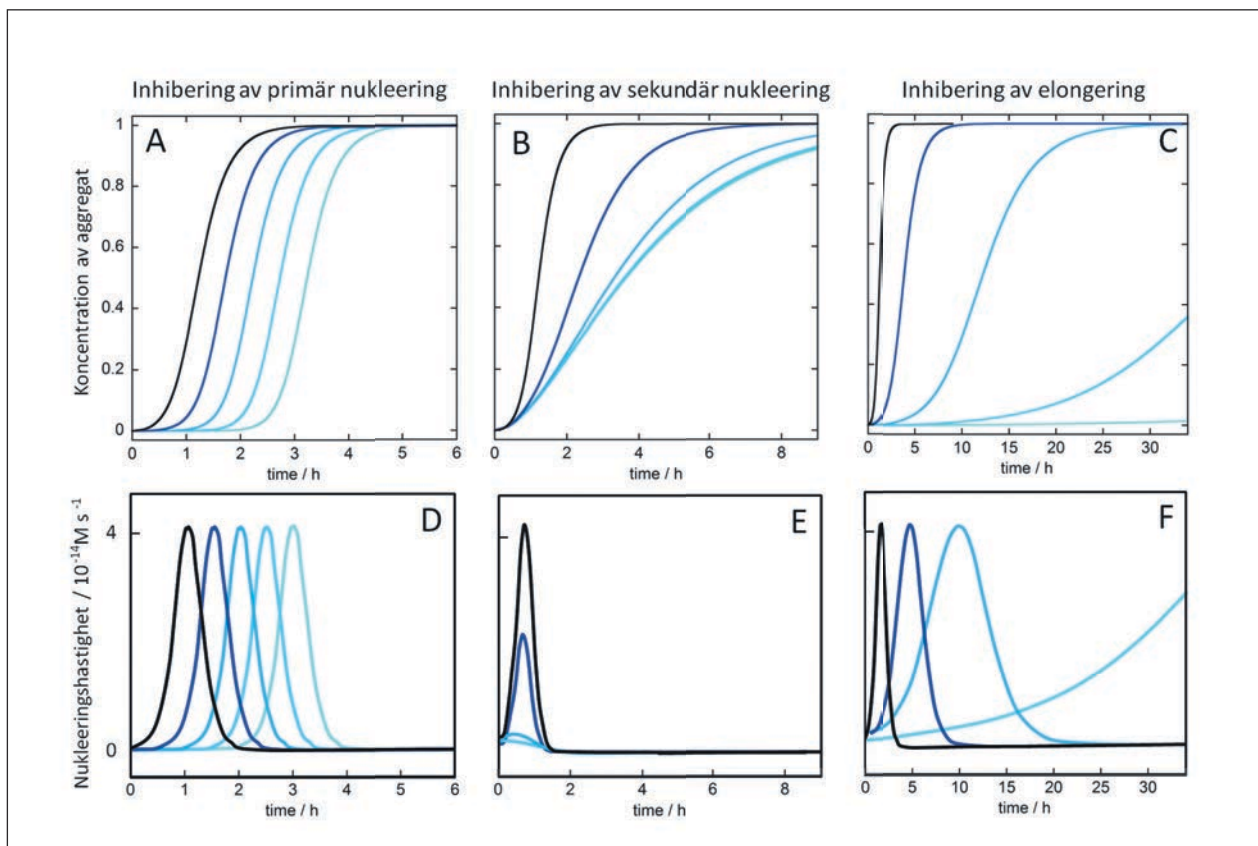


Bild 3. Selektiv inhibering av olika mikroskopiska processer leder till helt olika förändringar av den makroskopiska aggregeringskurvan (A-C) och påverkar genereringen av toxiska oligomerer på olika sätt (D-F). I panel A-C visas den makroskopiskt observerbara aggregeringskurvan för 3 μ M A β 42 i svart, och kurvorna i allt ljusare blått visar vad som händer om en mikroskopisk hastighetskonstant i taget gradvis minskas för A - primärnukleering, B - sekundärnukleering och C - elongering. Bildandet av toxiska oligomerer är proportionellt mot den totala nukleeringshastigheten som visas i panel D-F för 3 μ M A β 42 i svart, och i allt ljusare blått där en mikroskopisk hastighetskonstant i taget gradvis minskas för D - primärnukleering, E - sekundärnukleering och F - elongering.

”Det vi kan göra för tillfället är att utnyttja vår kunskap om processen till att ta fram selektiva inhibitorer.”

fasen, men tillväxtfasen har samma lutning (Bild 3A). Bildningen av oligomera former förskjuts senare i tiden även om den totala mängden blir den samma (Bild 3D). Det beror på att den största mängden oligomerer bildas genom sekundärnukleering. Om sekundärnukleeringen hämmas förlängs lagfasen ytterst lite, men tillväxtfasen får en flackare lutning (Bild 3B). Den totala mängden oligomera former blir kraftigt reducerad (Bild 3E). Det beror på att bara den mängd oligomerer som bildas genom primärnukleering kvarstår. Slutligen, om elongeringen hämmas förlängs lagfasen samtidigt som tillväxtfasen får en flackare lutning (Bild 3C). Bildningen av oligomera former förskjuts senare i tiden men den totala mängden blir kraftigt ökad (Bild 3F). Det beror på att när tillväxten av aggregat blockeras bildas i stället ett större antal aggregat och dessa är små (oligomerer) innan de blir stora.

Denna kunskap om hur processen påverkas har redan testats i en serie pilotstudier. I en av dessa fann vi att en kroppsegen proteindomän, Brichos, selektivt inhiberar sekundärnukleeringen, kraftigt minskar mängden oligomerer som genereras och begränsar A β s toxicitet i cellförsök och elektrofysiologi.⁸ I en annan studie fann vi att chaperonproteinet DNAJB6 i huvudsak inhiberar primärnukleeringen, men med viss effekt också på sekundärnukleering.⁹ I det senast publicerade arbetet har vi undersökt småmolekyler som redan är godkända av FDA för behandling av andra sjukdomar. Vi har funnit några, exempelvis bexarotene, som verkar ha mer eller mindre selektiv effekt och som också begränsar toxiciteten hos A β i cellförsök och i *C. elegans*.¹⁰ Om någon av dessa inhibitorer kommer att få ge praktisk nytta återstår att se. Men metoden finns nu på plats och kanske blir det helt andra proteiner eller småmolekyler från framtida studier som kommer att kun-

na ge bot eller lindring. Mer troligt är att det blir något helt annat från en annan angreppsvinkel. Mångfald är nyckeln till framgång i detta svåra fält.



SARA SNOGERUP LINSE
Professor i fysikalisk kemi och molekylär proteinvetenskap, Lunds universitet
sara.linse@biochemistry.lu.se

REFERENSER

1. Alzheimer A. Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozeß der Hirnrinde. *Neurol Central* 1906; 25:1134.
2. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992; 256(5054):184-185.
3. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 2002; 416(6880):535-539.
4. Cohen SI, Linse S, Luheshi LM, Hellstrand E, White DA, Rajah L, Otzen DE, Vendruscolo M, Dobson CM, Knowles TP. Proliferation of amyloid- β 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(24):9758-9763.
5. Arosio P, Knowles TP, Linse S. On the lag phase in amyloid fibril formation. *Phys Chem Chem Phys* 2015; 17(12):7606-7618.
6. Jarrett JT, Lansbury PT Jr. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 1993; 73(6):1055-1058.
7. Ferrone FA, Hofrichter J, Eaton WA. Kinetics of sickle hemoglobin polymerization. II. A double nucleation mechanism. *J Mol Biol* 1985; 183(4): 611-631.
8. Cohen SI, Arosio P, Presto J, Kurudenkandy FR, Biverstål H, Dolfe L, Dunning C, Yang X, Frohm B, Vendruscolo M, Johansson J, Dobson CM, Fisahn A, Knowles TP, Linse S. A molecular chaperone breaks the catalytic cycle that generates toxic A β oligomers. *Nat Struct Mol Biol* 2015; 22(3):207-213.
9. Månsson C, Arosio P, Hussein R, Kam-pinga HH, Hashem RM, Boelens WC, Dobson CM, Knowles TP, Linse S, Emanuelsson C. Interaction of the molecular chaperone DNAJB6 with growing amyloid-beta 42 (A β 42) aggregates leads to sub-stoichiometric inhibition of amyloid formation. *J Biol Chem* 2014; 289(45):31066-31076.
10. Habchi J, Arosio P, Perni M, Costa AR, Yagi-Utsumi M, Joshi P, Chia S, Cohen SI, Müller MB, Linse S, Nollen EA, Dobson CM, Knowles TP, Vendruscolo M. An anti-cancer drug suppresses the primary nucleation reaction that initiates the production of the toxic A β 42 aggregates linked with Alzheimer's disease. *Sci Adv* 2016; 2(2):e1501244.

