

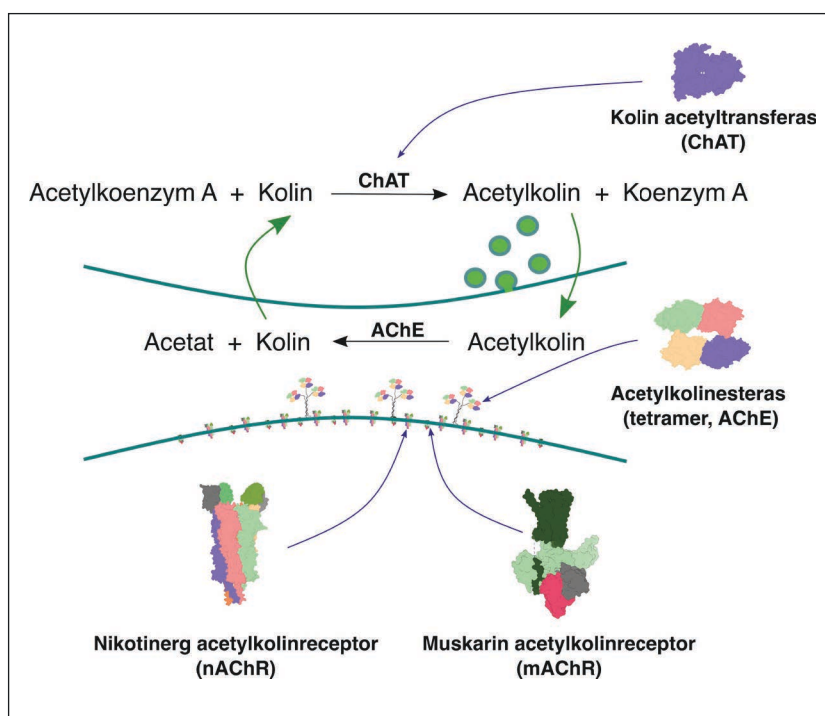
# **Neurokemisk** *forskning* *ger nya möjligheter att utveckla* *läkemedel för behandling av* **nervgasförgiftning**





Nervgaser är kemiska stridsmedel som utövar sin toxiska verkan genom att förhindra terminering av kolinerg signalering. Behandlingsmetoder och motgifter som står till buds för att häva nervgasförgiftning börjar bli till åren och har många begränsningar. Ett forskarlag vid Totalförsvarets forskningsinstitut, FOI, avdelningen för CBRN-skydd och säkerhet, berättar här om sina studier som syftar till att förnya motmedelsforskningen, och på sikt bidra till utvecklingen av förbättrad behandling av nervgasförgiftning.

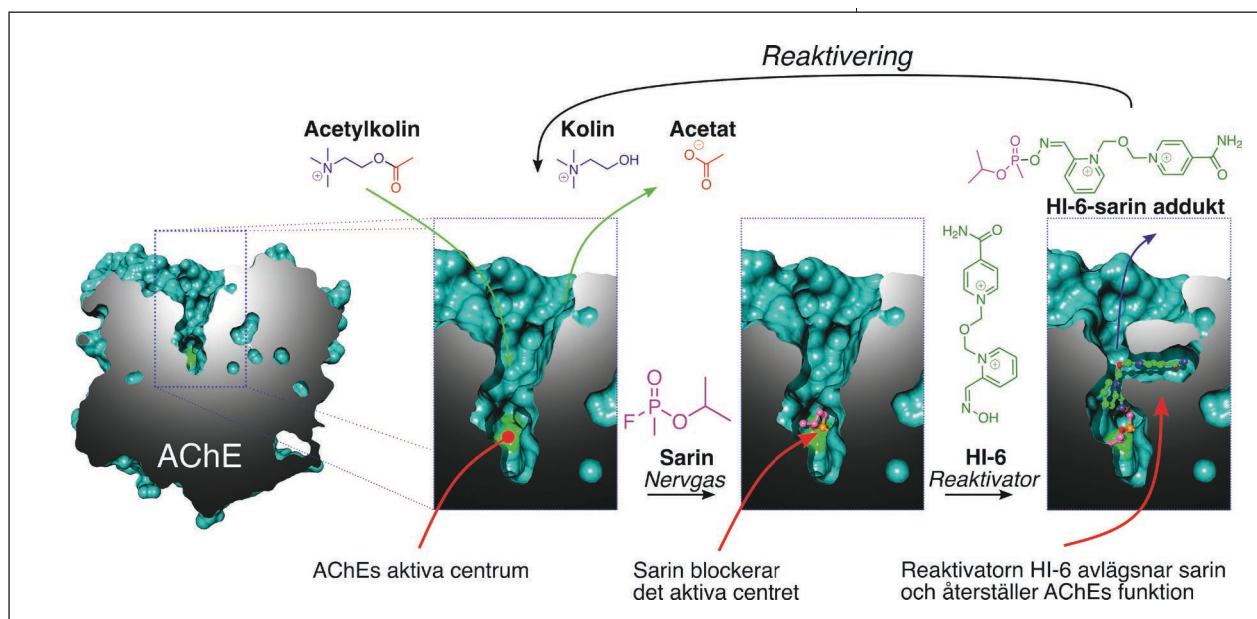
**Kolinerga neuron styr** flera basala kroppsfunctioner och medverkar till fysiologisk homeostas. I CNS har kolinerg signalering betydelse för bland annat minne och inlärning, och modulering av neuronens aktivitet. Kolinerga signaler används också av motorneuron som kontrollerar kontraktion av glatt muskulatur, reglerar sekretion och styr muskelfrörelser. Signalsubstansen i det kolinerga nervsystemet är acetylkin som frisätts ur presynaptiska neuron och stimulerar receptorer på anslutande nerv- eller muskelceller. Den kolinerga signalen termineras av enzymet acetylkinesteras som ansvarar för att avsluta aktiveringen av de postsynaptiska receptorerna genom att mycket effektivt katalysera hydrolys av acetylkin till kin och acetat [Figur 1].<sup>1</sup> Acetylkinesteras-inhibitorer såsom pyridostigmin och donepezil har klinisk användning för att öka halten av acetylkin i synapsen vid sjukdomar som exempelvis myastenia gravis och Alzheimers sjukdom. Potenta irreversibla acetylkinesteras-inhibitorer som permanent förstör enzymets funktion kan emellertid orsaka mycket allvarliga förgiftningar. Ett exempel är exponering för organofosforbaserade pesticider (bekämpningsmedel) där förgiftningar årligen leder till ett stort antal dödsfall, framför allt i utvecklings-



Figur 1. Förenklad översikt över den kolinerga synapsen och metabolismen av neurotransmittorn acetylkin. Kolin-acetyltransferas (ChAT) katalyserar produktion av acetylkin från kolin med hjälp av acetyl-koenzym A i det presynaptiska neuronet. Acetylkinesteras (AChE) katalyserar hydrolys av acetylkin till kin i synapsen vilket terminerar den kolinerga signalen.

länder.<sup>2</sup> Kemiska stridsmedel av nervgastyp, såsom sarin, tabun och VX, är också acetylkinesteras-inhibitorer och inaktiverar enzymet effektivt genom att binda dess katalytiska centrum kovalent

[Figur 2]. Vid exponering av en acetylkinesteras-inhibitor ansamlas acetylkin i synapserna vilket utlöser en kolinerg kris. Vanliga symptom är mios, hypersekretion, bradykardi och kram-



Figur 2. Biokemin vid en nervgasförgiftning och reaktivering av inhiberat acetylkolinesteras (AChE). Enzymet inhiberas av en nervgas, i det här fallet sarin, vilket leder till en kolinerg kris. Det nervgasinhiberade enzymet kan reaktiveras genom administrering av en lämplig reaktivator, här representerad av HI-6. De högupplösta tredimensionella strukturerna är bestämda med röntgenkristallografi och kvantkemiska beräkningar har använts för analysen.

*Trots att kemvapenkonventionen förbjuder användning av kemikalier som vapen i väpnade konflikter har senare års världshändelser visat att nervgaser fortsatt är ett hot mot fred, säkerhet och människors hälsa.*

per. Trots att kemvapenkonventionen förbjuder användning av kemikalier som vapen i väpnade konflikter har senare års världshändelser visat att nervgaser fortsatt är ett hot mot fred, säkerhet och människors hälsa.

#### ETT OBESVARAT MEDICINSKT BEHOV AV EFFEKTIVA BEHANDLINGAR AV NERVGASFÖRGIFTNING

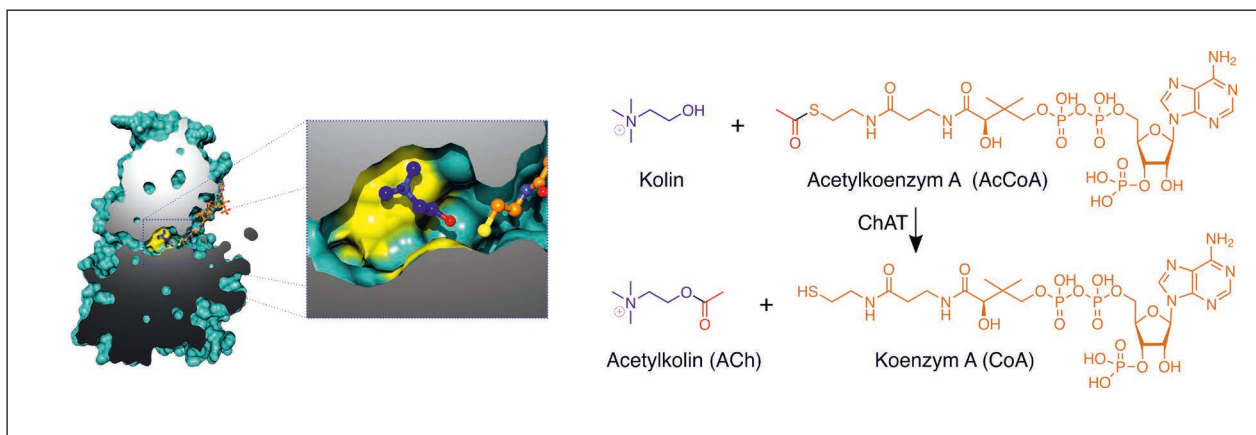
Nervgasförgiftning går i vissa fall att häva med medicinska motmedel. Behandlingens effektivitet beror på vilken typ av nervgas det är fråga om, omfattningen av exponeringen, och hur snabbt det medicinska omhändertagandet kan påbörjas. Symtomdämpande åtgärder spelar en viktig roll, där antikolinergika (exempelvis atropin) och benzodiazepiner (exempelvis diazepam) används för att mildra effekterna av den kolinerga överstimuleringen och lindra kramp.

Ofta krävs även livsuppehållande intensivvård som kan vara mycket resurskrävande. För behandling av nervgasförgiftning finns även specifika motgifter, så kallade reaktivatorer, som avlägsnar nervgasen från acetylkolinesteras och därmed återställer funktionen hos det kolinerga nervsystemet. Nervgasinhiberat acetylkolinesteras genomgår en process kallad åldring, där en kemisk omlagring av den enzymsbundna nervgasen ger ett ännu stabilare enzym-inhibitor-komplex. Det åldrade stadiet av hämmat acetylkolinesteras kan inte reaktiveras, och det är därför viktigt att reaktivatorer sätts in så tidigt som möjligt efter exponering. Beroende på vilken nervgas det rör sig om varierar tiden till åldring mellan ett fåtal minuter till dygn. Valet av reaktivator kan ha betydelse för behandlingsresultatet, eftersom de har olika förmåga att reaktivera ace-

tylkolinesteras beroende på vilken nervgas som bundit enzymet.<sup>3</sup> Behandling av allvarlig nervgasförgiftning med de medel som finns tillgängliga kräver expertis inom klinisk toxikologi och intensivvård, snabbt insatta åtgärder och helst vetenskap om vilken nervgas som orsakat förgiftningen. Den behandling som används i dag togs fram under 1970- och 1980-talen, med den tidens kunskap om det kolinerga nervsystemet som grund. Vår forskning syftar till att modernisera forskningsfältet om motmedel vid nervgasförgiftning genom att beakta ny kunskap om kolinerg neurokemi och till att introducera nya experimentella metoder för att påskynda utvecklingen av förbättrade läkemedel.

#### NYA EFFEKTIVA OCH BREDSPEKTRIGA REAKTIVATORER FÖR FRAMTIDEN

Reaktivatorer är motmedel som kan reagera med nervgaser bundna till acetylkolinesteras och frigöra enzymet som därmed återfår sin funktion [Figur 2]. Trots begränsningar hos befintliga reaktivatorer i fråga om effektivitet och ogynnsam specificitet för vissa nervgaser har inga nya läkemedel för behandling av nervgasförgiftning tillkommit på flera decennier. Genom vår forskning om de molekylära interaktionerna mellan nervgasinhiberat acetylkolines-



Figur 3. Kolin-acetyltransferas' (ChAT) struktur och funktion. Substraten kolin och acetyl-koenzym A möts mitt i den katalytiska tunneln där acetylgruppen överförs. Strukturrepresentationen i figuren har genererats genom sammanläggning av kristallstrukturerna 2FY3 och 2FY4 (protein data bank). Acetyl-koenzym A är inte stabil i enzymet och har därför ersatts av koenzym A vid kristalliseringen.

” Vi använder just nu den detaljerade kunskapen om reaktiveringskinetiken till att utveckla nya experimentella reaktivatorer med alternativa kontakter med enzymet som kan göra dem effektiva mot ett bredare spektrum av nervgaser.

teraser och reaktivatorer har vi försökt öka förståelsen för de faktorer som styr dessa motmedels effektivitet och specificitet.<sup>4</sup> Sådan kunskap kan förbättra möjligheterna att designa effektivare reaktivatorer som är användbara mot förgiftningar orsakade av ett brett spektrum av organofosforbaserade nervgaser och pesticider. Vi har använt en kombination av röntgenkristallografi, avancerad reaktionskinetik och datorsimuleringar för att kartlägga reaktivatorers verkningsmekanism på atomär nivå. Interaktionen med nervgasinhiberat acetylcholinesteras har visat sig ha flera delsteg där reaktivatorn först måste anta rätt konformation för att ta sig in i enzymets aktiva centrum. Därefter sker flera förändringar av reaktivatorns läge för att positionera den korrekt i förhållande till den bundna nervgasen. En nukleofil attack överför sedan nervgasen till reaktivatorns oximgrupp. För att enzymet ska återfå full aktivitet krävs även att reaktivator-nervgasaddukten lämnar det aktiva centralt snabbt. För alla steg i processen har interaktioner

med acetylcholinesteras och rörelser i enzymet en avgörande roll för hur effektivt reaktivering kan ske. Våra data visar tydligt hur sådana interaktioner skiljer sig beroende på vilken nervgas som bundit enzymet.<sup>5</sup> Vi använder just nu den detaljerade kunskapen om reaktiveringskinetiken till att utveckla nya experimentella reaktivatorer med alternativa kontakter med enzymet som kan göra dem effektiva mot ett bredare spektrum av nervgaser. Forskningen om reaktivatorer sker i samarbete med Professor Anna Linusson Jonsson vid Umeå universitet.

#### KOLIN-ACETYLTRANSFERAS ÄR EN NYCKELSPELARE I DET KOLINERGA NERVSYSTEMET

Acetylkolin tillverkas från kolin av enzymet kolin-acetyltransferas med hjälp av kofaktorn acetyl-koenzym A (AcCoA) [Figur 1]. Kolin-acetyltransferas är på så vis acetylcholinesteras' antipod. Acetylkolin som producerats av kolin-acetyltransferas lagras i vesiklar som fuserar med cellmembranet och frisätter

acetylkolin vid en nervimpuls. Med tanke på kolin-acetyltransferas' centrala roll i nervsystemet och kopplingen mellan störningar i kolinerg signalering och flera vanliga och allvarliga sjukdomar såsom Alzheimers sjukdom och myastena syndrom är kunskapsläget om detta enzym bristfälligt. Exempelvis fanns tills helt nyligen ingen känd hämmare av enzymet med en vedertagen verkningsmekanism, och därför finns ännu inga användbara farmakologiska verktyg för att studera enzymets roll i kolinerg neurokemi.

Vår forskning om kolin-acetyltransferas syftar till att vitalisera motmedelsområdet genom att belysa en ny möjlig väg att behandla nervgasförgiftning. Eftersom kolin-acetyltransferas står för produktionen av acetylkolin i de presynaptiska neuronerna är det en rimlig hypotes att en sänkning av kolin-acetyltransferas' aktivitet vid ett förgiftningstillstånd där acetylcholinesteras är inhiberat kan minska den kolinerga överstimuleringen [Figur 1].<sup>6</sup> Eftersom kolin-acetyltransferas är ett uppströms mål för behandling skulle en sådan effekt vara relevant oavsett vilken nervgas som orsakat förgiftningen, eller om enzym-nervgaskomplexet har åldrats. För att undersöka kolin-acetyltransferas' potential som mål för behandling av nervgasförgiftning krävs en genomgripande genomlysning av enzymets strukturbio-logiska förutsättningar för inhibitorutveckling och hur redan kända hämmare av enzymet fungerar. Vår forskning har på senare år varit inriktad på att



besvara dessa frågor. Kolin-acetyltransferas' struktur har studerats tidigare och med hjälp av röntgenkristallografi har interaktionsmönstret med koenzym A och kolin kartlagts.<sup>7</sup> Genom enzymet går en rörformad tunnel och i mitten av den möts substraten vid den katalytiska aminosyran histidin 324 som förflyttar en acetylgrupp från acetyl-koenzym A till kolin [Figur 3]. Acetyl-koenzym A är en långsträckt molekyl och har flera bidragande kontakter med enzymet. Koenzym A och acetyl-koenzym A finns båda i jämförlig halt i cellens cytoplasma och kolin-acetyltransferas har likvärdig affinitet för dem båda, vilket gör att enzymet kan ockuperas av såväl acetyl koenzym A som koenzym A.

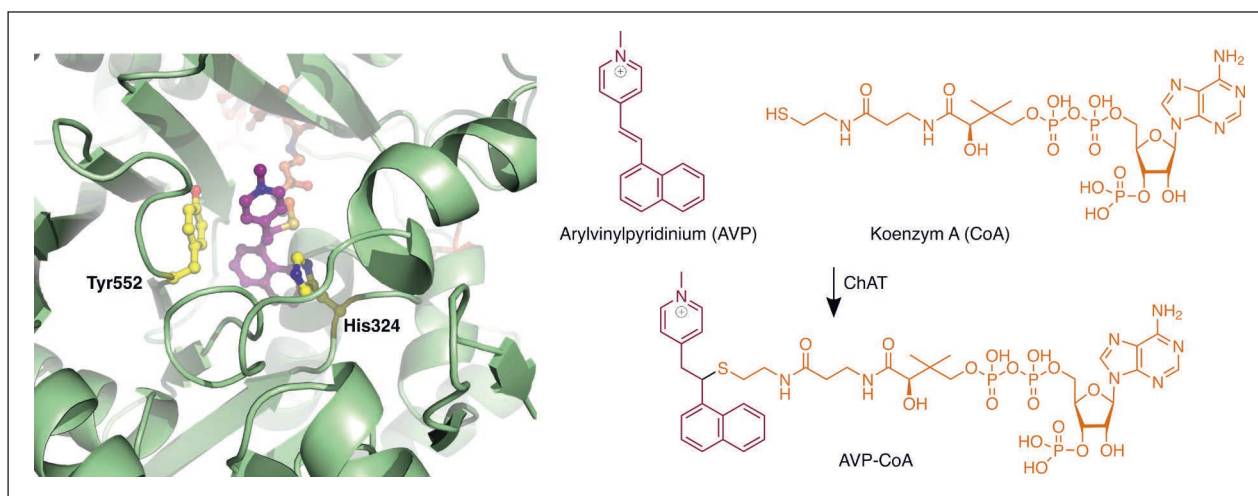
Nyligen avslutade vi en studie vars målsättning var att förstå hur kända kolin-acetyltransferas-inhibitorer fungerar. Det långsiktiga syftet är att bygga en kunskapsbas för vidare utveckling av nya selektiva inhibitorer. Vi valde att fokusera på arylvinylpyridiner som upptäcktes redan 1967.<sup>8</sup> Även om dessa föreningar har god potens *in vitro* och har använts för försök *in vivo*, gör deras otydliga biokemiska och farmakologiska profil att de är olämpliga för användning inom forskning om kolinerg signalering. Arylvinylpyridin-klassen av inhibitorer omfattar mer än 160 kemiska analoger, men ingen har tidigare lyckats förklara hur arylvinylpyridiner fungerar eller de förbryllande struktur-aktivitets-samband som präglar dem. Genom att använda röntgenkristallografi för att



” Vi strävar efter att kunna framställa ett experimentellt verktyg i form av en inhibitor som är potent, har god selektivitet för kolin-acetyltransferas, och har en hög permeabilitet i vävnad.

med atomär upplösning bestämma kolin-acetyltransferas' interaktion med arylvinylpyridiner försökte vi förstå hur dessa hämmare fungerar. De första åren gav våra ansträngningar inga tydliga resultat. Eftersom kofaktorn acetyl-koenzym A är så viktig för enzymets funktion och kanske även bidrar till att göra enzymets mottagligt för hämmare provade vi att också inkludera koenzym A

i experimenten. Resultatet var häpnadsväckande, det tycktes som koenzym A hade reagerat med arylvinylpyridinen, och bildat en större molekyl, arylvinylpyridin-koenzym A [Figur 4]. I kristallstrukturen syns tydligt hur aminosyran histidin 324 är positionerad för att katalysera reaktionen, och att pyridiniumringen tar stöd mot tyrosin 552. Genom att sätta upp en testreaktion i buffert



Figur 4. Kristallstruktur som visar att kolin-acetyltransferas (ChAT) katalyserar reaktionen mellan arylvinylpyridiner (lila) och koenzym A (orange) vilket ger den aktiva hämmaren arylvinylpyridin-koenzym A som produkt. Två aminosyresidokedjor som är viktiga för reaktionen har inkluderats (gult).

mellan koenzym A och arylvinylpyridin i närvaro av kolin-acetyltransferas och analysera resultatet med masspektrometri kunde vi med en oberoende teknik bekräfta att arylvinylpyridin-koenzym A bildades, och att den hade en hämmande effekt på kolin-acetyltransferas. Våra resultat visar alltså att arylvinylpyridiner inte är hämmare av kolin-acetyltransferas utan är substrat som reagerar med koenzym A *in situ* för att bilda en produkt som är själva hämmaren.<sup>9</sup> Detta är en unik upptäckt, och såvitt vi vet har en liknande reaktion aldrig tidigare observerats. Vår kristallstruktur av arylvinylpyridin-koenzym A på plats i kolin-acetyltransferas kan liknas vid en karta över möjliga interaktioner mellan hämmare och kolin-acetyltransferas, och vi använder just nu denna karta för att designa nya kolin-acetyltransferas-inhibitorer som binder enzymet med ett väldefinierat interaktionsmönster. Vi strävar efter att kunna framställa ett experimentellt verktyg i form av en inhibitor som är potent, har god selektivitet för kolin-acetyltransferas, och har en hög permeabilitet i vävnad. Vår förhoppning är att ett sådant verktyg kan användas för att undersöka om kolin-acetyltransferas är ett relevant mål för behandling av nervgasförgiftning.

#### REFERENSER

1. Bertrand D, Wallace TL: A review of the cholinergic system and therapeutic approaches to treat brain disorders. I: Shoaib M, Wallace TL (Eds): Behavioural pharmacology of the cholinergic system. Cham: Springer Nature Switzerland; 2020. s 1-28.
2. Boedeker W, Watts M, Clausing P, Marquez E: The global distribution of acute unintentional pesticide poisoning: estimations based on a systematic review. BMC Public Health 2020, 20: 1875.
3. Worek F, Thiermann H, Wille T: Organophosphorous compounds and oximes: a critical review. Arch Toxicol 2020; 94: 2275-2292.
4. Allgardsson A, Berg L, Akfur C, Hörnberg A, Worek F, Linusson A, Ekström FJ. Structure of a prereaction complex between the nerve agent sarin, its biological target acetylcholinesterase, and the antidote HI-6. Proc Nat Acad Sci 2016; 113(20):5514-5519.
5. Artursson E, Andersson P-O, Akfur C, Linusson A, Börjegen S, Ekström F: Catalytic-site conformational equilibrium in nerve-agent adducts of acetylcholinesterase: Possible implications for the HI-6 antidote substrate specificity. Biochem Pharmacol 2013; 85:1389-1397.
6. Gray AP, Platz RD, Henderson TR, Chang TCP, Takahashi K, Dretchen KL: Approaches to protection against nerve agent poisoning. (Naphthylvinyl)pyridine derivatives as potential antidotes. J Med Chem 1988; 31(4):807-814
7. Kim AR, Rylett RJ, Shilton BH: Substrate binding and catalytic mechanism of human choline acetyltransferase. Biochemistry 2006; 45(49):14621-14631
8. Crispin Smith J, Cavallito CJ, Foldes FF: Choline acetyltransferase inhibitors: a group of styryl-pyridine analogs. Biochem Pharmacol 1967; 16(12):2438-2441.
9. Wikteliuss D, Allgardsson A, Bergström T, Hoster N, Akfur C, Forsgren N, Lejon C, Hedenström M, Linusson A, Ekström F: In situ assembly of choline acetyltransferase ligands by a hydrothiolation reaction reveals key determinants for inhibitor design. Angew Chem Int Ed 2021; 60:813-819.



Forskarlaget vid Totalförsvarets Forskningsinstitut (FOI): DANIEL WIKTELIUS, NINA FORSGREN, TOMAS BERGSTRÖM, ANDERS ALLGARDSSON, FREDRIK EKSTRÖM, ELISABET ARTURSSON  
Kontakt: daniel.wikteliuss@foi.se