

# Metaller og neurologiske sygdomme

**Årsagen til flere neurodegenerative sygdomme findes i samspillet mellem metaller og proteiner i nerveceller, og i denne sidste artikel beskrives specifikke proteiner, som er sårbare over for virkningen af ionerne**

*Af GCP-koordinator, B.Sc. (Farmaci) Lene Stevner og professor emeritus, dr.scient. Ole Farver*

Det er en spændende tid for koordinationskemikere. De kan lære neurobiologer om metalion- og oxygenkemi og medvirke til at opnå dybere forståelse af de molekylære mekanismer for nogle af de vigtigste neurologiske sygdomme. De anormale biokemiske processer udviser fællestræk: Proteinophobning i hjerneceller og oxidation af væv forårsaget af redoxaktive metalioners koordinering til særlige proteiner, hvorved nerve-cellerne funktion ophører.

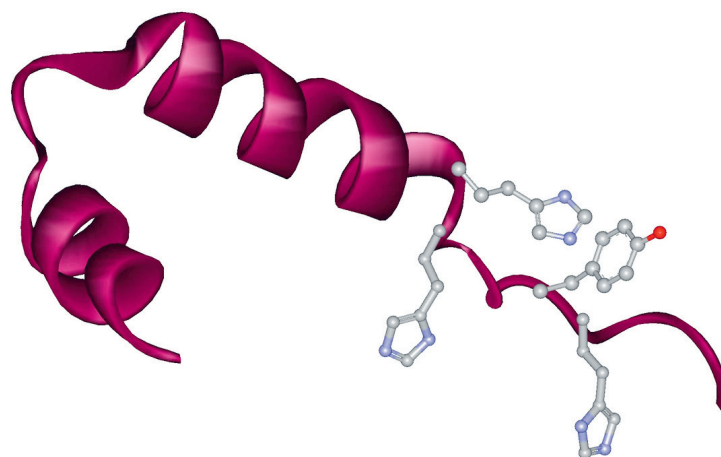
Hermed får overgangsmetaller chancen for at optræde som hovedaktør i et nyt neurovidenskabeligt forskningsområde.

## Alzheimers sygdom (AD)

AD er den mest almindelige neurodegenerative sygdom. Den rammer især ældre, men optræder også blandt yngre personer. Nerveceller i hjernen degenererer og proteiner udfældes. Proteiner, der aflejres mellem cellerne, kaldes plaques, og inde i cellerne kaldes de tangles eller sammenfiltringer.

Flere mekanismer synes at medvirke til, at sygdommen opstår. Plaqueophobningen af et  $\beta$ -amyloid peptid ( $A\beta$ ) kan begrænses af katalase, der omdanner  $H_2O_2$  til  $O_2$  og vand. Det tyder på, at peroxid spiller en rolle, og inflammatoriske (betændelseslignende) forandringer i hjernen antyder oxidative angreb. Peroxid og andre reaktive oxygen-specier (ROS) som hydroxylradikalet og superoxidanionen dannes i væv ved katalyse af jern- eller kobberioner. Celler har opbygget et sofistikeret forsvarssystem, der minimerer metallernes skadevirkning.  $A\beta$  består af et ca. 4 kDa peptid, som proteaser klipper ud af amyloid precursor-proteinet (APP). APP-funktionen kendes ikke med sikkerhed, men sandsynligvis indgår det i metaliontransport ind og ud af celler. Hvordan sygdommen starter er ukendt, men der er en forbindelse mellem aflejring/deponering af  $A\beta$ -peptidet i hjernebarken, oxidativ stress og neuronal død. Aflejringen af  $A\beta$  har tidligere været anset som den primære pathogenese, og arveligt betingede ændringer af APP øger mængden af  $A\beta$ . Længden og sammensætningen af  $A\beta$ -peptidet har betydning for sygdomsudviklingen.  $A\beta(40)$  er mest almindeligt, men især ophobning af  $A\beta(42)$  ses i amyloide aflejringer. Derfor er  $A\beta$ -deponeringen et oplagt mål for behandling af AD.

Det humane  $A\beta$ -peptid indeholder tre histidin- (#6, 13, 14) og en tyrosin-sidekæde (#10). Hos mus og rotter er tyrosin (Tyr) erstattet med phenylalanin (Phe). EPR-undersøgelser viser at to kobberioner er forbundet med en imidazolbro - i stil med binding af de to metalioner i SOD.  $Zn^{2+}$ -ioner udfælder det humane  $A\beta$ -peptid, mens peptidet hos mus og rotter er upåvirket af zink eller kobber. Det er én årsag til, at der ikke ses amyloid ophobning her.  $Zn$ - og  $Cu$ -koncentrationerne stiger kraftigt i hjernen hos AD-patienter, ca. med en faktor fem. Også indhol-



$A\beta$ -peptidet ses som et magentabånd, og kun tyrosin-sidekæden på plads #10 (Tyr10) og de tre kobberbindende histidiner er vist. Radikaler som  $\cdot OH$  eller  $\cdot O_2^-$  kan angribe sidekæder på proteiner som f.eks. oxygenatomet (vist med rødt) på Tyr10. Læg mærke til peptidets spiralopbygning; en typisk  $\alpha$ -helix-struktur.]

det i plasma er forhøjet, hvilket tyder på, at balancen er generelt påvirket.

Det drejer sig ikke kun om opløselighed.  $Cu$ - $A\beta$ -komplekset er redoxaktivt, og neurotoksiciteten skyldes sandsynligvis peroxiddannelse. Rækkefølgen af den  $Cu(II)$ -reducerende og peroxiddannende effekt af  $A\beta$ -peptider er

$$A\beta(42)_{human} > A\beta(40)_{human} \gg A\beta(40)_{mus}$$

Peroxid kan reagere med f.eks. Tyr10 og starte en kædeproces, som fører til sammenvoksning af  $A\beta$ . I mus og rotters  $A\beta$  med Phe10 udvikles ikke AD – med mindre de bliver genetisk manipulerede.

Det reducerende substrat, der medvirker til  $A\beta$ -medieret peroxiddannelse, er sandsynligvis kolesterol, som findes i stor koncentration i hjernen. Kolesterol binder til  $Cu/A\beta$ , der katalyserer reduktionen af  $O_2$  til  $H_2O_2$ . Kobber bindes til  $A\beta(42)$  med en stabilitetskonstant på  $10^{15} M^{-1}$  (ligesom for  $Cu(II)$ -SOD), mens den for  $A\beta(40)$  er  $10^{10} M^{-1}$ . Derfor er  $A\beta$  sandsynligvis kobberbundet *in vivo* og kan spille en afgørende rolle for de strukturelle ændringer, der fører til plaquedannelse.

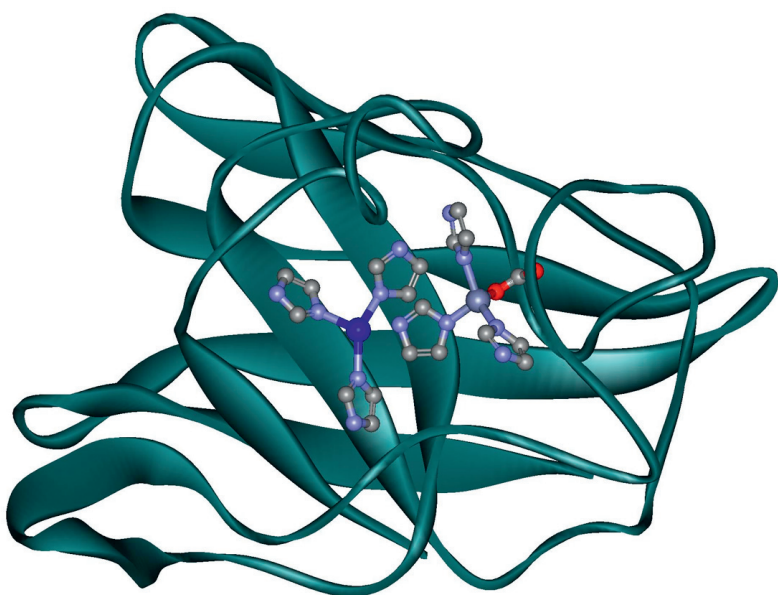
Opklaringen af mekanismen for den  $Cu/A\beta$ -katalyserede kovalente krydsbinding og plaquedannelse er afgørende for forståelsen af AD-sygdommens årsag. Udvikling af kobberchelater, der kan modvirke den skadelige redoxkemi, bliver derfor et vigtigt forskningsområde.

## Amyotrofisk lateral sclerose (ALS)

ALS er en ubønhørligt fremadskridende sygdom, der skyldes ►

nedbrydning af de muskelstyrende nerver i rygmarv og hjerne-stamme. Årsagen er ukendt, men både spontane tilfælde og en arvelig form kendes. Hos patienter med arvelig ALS er der påvist mutationer i ét bestemt gen, der koder for enzymet Cu-Zn superoxiddismutase (SOD), men betydningen af det ændrede enzym i ALS-udviklingen er ukendt. Kobberchaperonen (CCS)\* leverer metalionerne til SOD. Det er opsigtsvækkende, at en ændring i SOD forvandler antioxidanten til en tikkende bombe, som fremkalder ALS. Et ændret SOD giver oxidative skader med proteinophobninger, idet mutanten sandsynligvis er årsag til andre oxidative stressdefekter. Et af de største paradokser i neurovidenskaben er, at **antioxidante** enzymer med metalioner i de aktive centre forvandles til **prooxidanter**. På denne måde risikerer enzymer, som ellers bevarer og beskytter liv, at have den modsatte effekt.

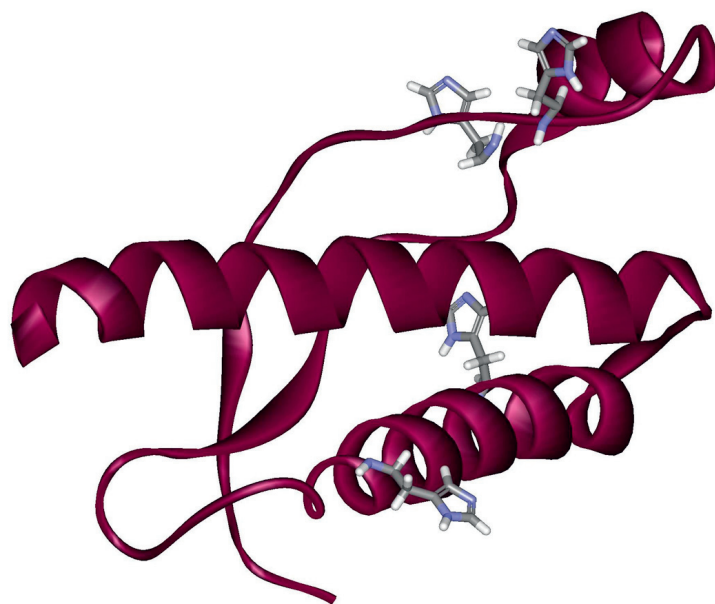
Opdagelsen synes i strid med sund fornuft, men er fundamental for forståelsen af, hvordan ændringer i SOD fører til ALS. Da frie kobberioner har lige så stor katalytisk dismutase-virkning som SOD, er funktionen af SOD at inkorporere kobberionens effekt i enzymet. Så forhindres Fenton-reaktioner\* med



SOD katalyserer nedbrydningen af superoxidradikalet,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Enzymet indeholder to metalioner, kobber (blå) og zink (grå) som sidder bundet til histidinsidekæder i "det aktive center", hvor radikalet forankres og nedbrydes. Resten af proteinet tjener til stabilisering og kontrol. Kun skelettet er vist; her som et bredt blå-grønt bånd. Denne opbygning er en typisk  $\beta$ -sandwichstruktur.

dannelse af OH-radikaler, men kobberionen i SOD har potentialet til at producere toksiske forbindelser.

De patogene ændrede SOD-former har ikke mistet deres naturlige funktion, når proteinet er fuldt besat med kobber og zink; dog ses en mindre affinitet for zink end i det intakte enzym. SOD-molekyler uden zink er stærkere oxiderende og reduceres af cellulære forbindelser som GSH\*. SOD kan donere en enkelt elektron til oxygenmolekylet og danne superoxidanionen, modsat den naturlige SOD-funktion. Superoxid kan reagere med NO og danne det meget aggressive peroxynitrit, der angriber mange aminosyresidekæder. ApoSOD uden metalioner er ikke neurotoksisk; kun den form som alene indeholder kobber fører til udvikling af ALS.



C-terminale ende af Prionproteinet. De fire histidinsidekæder er vist. Selve det  $\alpha$ -helix-formede peptidskelet er vist som et mørkerødt bånd.

## Prionproteiner og kobber

Creutzfeldt-Jakobs sygdom (CJD) er en sjælden neurologisk sygdom, som medfører en hastigt udviklet hukommelsessvækkelse og koordinationsbesvær. Som andre demenssygdomme forekommer den mest hos ældre. I 15% af tilfældene er der tale om en arvelig form.

CJD skyldes ligesom AD amyloid-dannelse i hjernen, men sygdommen er mere aggressiv og desuden smitsom. Et modificeret prionprotein,  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , ophobes i den CJD-angrebne hjerne. Den normale form,  $\text{PrP}^{\text{C}}$ , er et kobberbindende protein med SOD-aktivitet. Ligesom APP-proteinets kan  $\text{PrP}^{\text{C}}$  transportere kobberioner ud af cellen. Den N-terminale ende af  $\text{PrP}$  er ustruktureret i opløsning, mens den C-terminale ende indeholder 3  $\alpha$ -helix og 2 små  $\beta$ -sheet sektioner.

Den eksakte struktur af  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  kendes ikke, men CD-undersøgelser viser en øget  $\beta$ -sheet forekomst. Det er foreslået, at den konformationsændring, som forårsager omdannelsen af  $\text{PrP}^{\text{C}}$  til  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , er kinetisk kontrolleret med en høj aktiveringsenergi, der forhindrer en spontan omlejring.

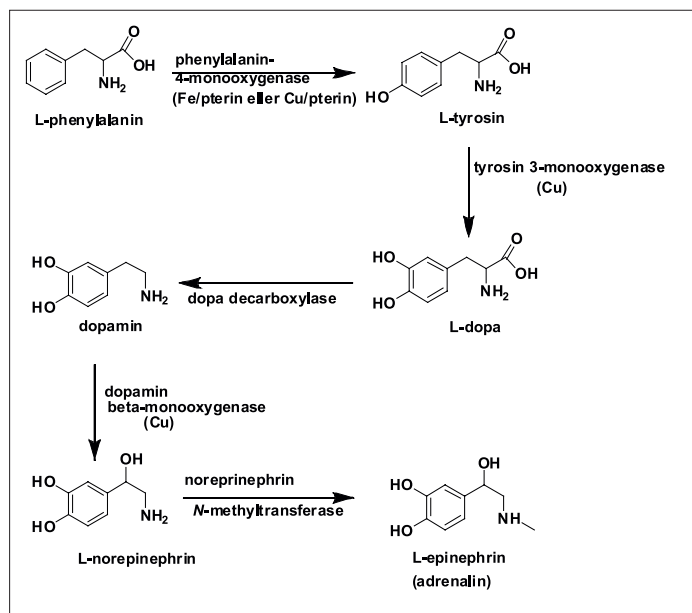
$\text{PrP}^{\text{C}}$ 's SOD-aktivitet er interessant pga. de neuropatologiske ligheder mellem CJD, AD og ALS. Hvis  $\text{PrP}^{\text{C}}$  og A $\beta$  virkelig er fysiologiske SOD-type antioxidanter, kan alle tre sygdomme have én fælles årsag: Nemlig et ødelagt antioxidant protein med et katalytisk kobbercenter. Indtil videre er der kun indirekte evidens for den oxidative neuropatologi i CJD.

De konformationsændringer i  $\text{PrP}^{\text{C}}$ , som fører til de ændrede strukturer, afhænger af Cu- og Zn-chelering. Så alt tyder på, at dannelsen af det ondartede  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -prion skyldes metalionbinding. Udvikling af lægemidler, der stabiliserer  $\text{PrP}^{\text{C}}$ , synes derfor oplagt.

## Parkinsons sygdom (PD)

PD er karakteriseret ved muskelstivhed og rysten samt nedsat bevægelighed. Sygdommen kan ikke helbredes, men den kan effektivt holdes nede i mange år med medicin. PD er den mest udbredte neurodegenerative sygdom efter Alzheimers. Cirka én ud af 1.000 danskere har sygdommen.

Hjernen bruger signalstoffet dopamin til kontrol af bevægelse - det dannes og nedbrydes derfor konstant. Ved PD nedsættes produktionen af dopamin, mens nedbrydningen fortsætter uændret, og det giver underskud af signalstoffet. Både rygning,



Biosyntese af neurotransmittere. Bemærk, at flere af trinene katalyseres af kobberholdige enzymer.

indtagelse af kaffe og alkohol nedsætter risikoen for at blive ramt af PD. Naturen er ikke nødvendigvis politisk korrekt.

Udbrud af PD skyldes destruktion af nerveceller pga. ophobning af  $\alpha$ -synuclein (AS)-proteinet. Både jern- og kobberioner i fysiologiske koncentrationer er i stand til at accelerere AS-sammenklumpning, så cellerne mister evnen til at producere dopamin. AS består af 140 aminosyrer i tre forskellige regioner: (i) en amfipatisk N-terminal ende (1-60); (ii) en stærkt hydrofobisk selvaggregerende midterdel (61-95) som er mistænkt for at starte sammenvoksning; (iii) en sur C-terminal ende (96-140).

I den native, monomere tilstand kan proteinet indtage en række konformationer uden en veldefineret sekundær struktur. Men ved vekselvirkning med lipidmembraner undergår det en dramatisk konformationsændring enten til en  $\alpha$ -helix-foldning eller (ved tilstedeværelse af metalioner) til en krydsbundet  $\beta$ -konformation med højt organiserede amyloid-agtige fibre.  $\text{Cu}^{2+}$  er mere effektiv end  $\text{Fe}^{3+}$  til at aktivere sammenkobling af AS, og der findes høje koncentrationer af kobber i PD-patienters spinalvæske. AS-proteinet binder til kobberioner med høj affinitet ( $K = 10^7 \text{ M}^{-1} - 10^4 \text{ M}^{-1}$ ). Den første konstant er stor nok til, at kobber kan bindes til AS under fysiologiske omstændigheder. Kobber(II)ioner katalyserer sammenvoksning af AS ved tilstedeværelse af hydrogenperoxid, og denne oxidative oligomerisering bliver forstærket af  $\text{A}\beta$ -peptidet (jf. AD), der sandsynligvis er ansvarlig for produktion af peroxid eller anden ROS-dannelse. Den kobberinducerede sammenvoksning forhindres, hvis den C-terminale ende skæres af; derimod er  $\text{A}\beta$ -virkningen uafhængig af C-terminalen. To mutationer, i enten Ala30 eller Ala53, er tæt knyttet til udbrud af PD.

Forbavsende nok koordineres den første kobberion til aminosyresidekæder i den N-terminale del og ikke til den negativt ladede C-terminale del. Både CD-, EPR- og NMR-studier har vist, at kobber binder til aminosyrer i områderne 3-9 og 49-52. Hvis His50 modificeres kemisk, mister hele den N-terminale del af proteinet sin evne til at binde kobber. EPR-målingerne viser, at kobber koordineres til 2N og 2O. Det andet kobberbindende center findes i den C-terminale ende af proteinet omkring region (110-140). NMR-målinger viser, at Asp119, Asp121, Asp122 og Glu123 tjener som ligander her. Det er i overensstemmelse med EPR-målinger, der viser, at kobber bindes til 4 O-atomer.

Hvorfor forstærker kobberbinding til AS tendensen til sammenvoksning? Måske forårsager koordinationen konformationsændringen i den N-terminale del af proteinet og en svagere beskyttelse af den amyloid-dannende midterdel. Det understreger, at PD er en kobberion associeret neurodegenerativ lidelse. Mekanismen er endnu engang et oxidativt angreb med hydrogenabstraktion, og der er stærk evidens for en Tyr-medieret kædeproces. Tre af de fire tyrosiner i AS findes i den C-terminale ende. Hermed synes PD nært beslægtet med de andre amyloid-relaterede sygdomme, ALS, CJD og AD og viser, at ændringer i kobberionmetabolismen er et vigtigt element i neurodegenerative sygdomme.

### Hvad nu?

Udbrud af neurodegenerative sygdomme skyldes nedbrydning eller omdannelse af særlige proteiner i hjernen. En effektiv indsats mod årsagen til sygdommenes oprindelse gennem studier af de defekte metalloproteiner frem for at behandle virkningen vil på afgørende vis kunne udskyde eller helt forhindre sygdommenes udbrud. Her tænkes især på:

- en styrket forskning og udvikling inden for metalbindende molekyler, der specifikt kan fjerne overskud af kobber uden samtidig at påvirke de livsnødvendige kobberholdige enzymer; f.eks. ved binding til nanopartikler i formuleringer der kan bringe molekylerne over blod-hjerne barrieren.
- udvikling af passende antioxidant til reduktion af det oxidative stress i hjernen hvor prækliniske studier i cellekultur allerede er fortaget.
- fortsat udvikling af molekyler der forhindrer misfoldning og sammenklumpning af proteinerne.

Tilsammen vil det føre til en mere rationel og effektiv behandling af de frygtede neurodegenerative sygdomme. En forskning der nødvendigvis lægger op til et tæt samarbejde mellem uorganiske kemikere, biokemikere, neurobiologer og formuleringsfarmaceuter.

### E-mail-adresser

Lene Stevner: less@life.ku.dk

Ole Farver: of@farma.ku.dk

\*) Se den første artikel "Livsvigtige metalioner", der blev bragt i Dansk Kemi nr. 11, side 28-31.

### Kilder

R.R. Crichton & R.J. Ward: Metal-based neurodegeneration. J. Wiley & Sons, 2006

O. Farver & I. Pecht: Elucidation of electron-transfer pathways in copper and iron proteins by pulse radiolysis experiments, side 1-78. Progress in Inorganic Chemistry. J. Wiley & Sons, 2007

H.R. Hansen &

O. Farver: Metals in Medicine: inorganic medicinal chemistry, side 151-172. Textbook of Drug Design and Discovery. Taylor & Francis, 2009

L. Stevner & O. Farver: Kobber på hjernen, Vol. 4, side 18-22. Aktuell Naturvidenskab, 2009

Repræsentativ  
Formaling og Sigtning

NYHEDER

www.skanlab.com

retsch@skanlab.com