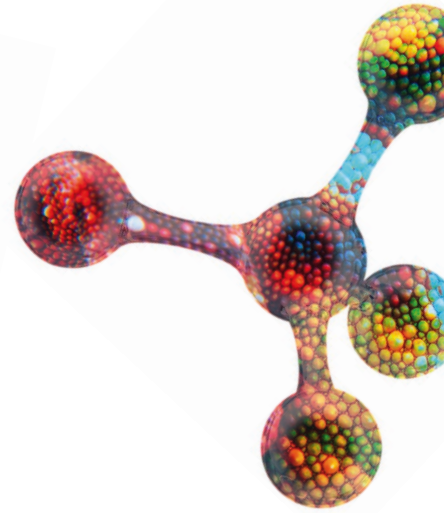


Molekylära kameleonter sätter

Upptäckter av forskare vid Linköping universitet visar att Alzheimerspatologi är mer komplex än man tidigare förstått och öppnar upp för utvecklingen av en mer avancerad molekylär diagnostik av Alzheimers sjukdom. Experimenten som genomfördes i samarbete med ett antal internationella forskargrupper, beskrivs i denna artikel av **Peter Nilsson**, professor i organisk kemi, och **Per Hammarström**, professor i proteinkemi, båda vid Linköpings universitet.

Ansamlingar och aggregat av felveckade proteiner, så kallade plack, trassel och inklusionskroppar, kan observeras i hjärnan hos patienter med en mängd olika neurodegenerativa sjukdomar, såsom Alzheimers och Parkinsons sjukdom. Dessa proteinaggregat uppkommer många år innan de kliniska symtomen kan upptäckas och tros vara en underliggande orsak till sjukdomsframskridandet i dessa sjukdomar. Markörer, så kallade ligander, som kan identifiera proteinaggregat har utvecklats med syftet att diagnostisera sjukdomarna så tidigt som möjligt. I dag används exempelvis Pittsburgh compound B (PIB) för att detektera proteinaggregat bestående av amyloid-beta med hjälp av positronemissionstomografi (PET) som ett komplement för att diagnostisera Alz-

heimers sjukdom och 18F-AV-1451 samt 18F-THK5351 för neurofibrillärt trassel av tau.^{1,2} Från ett forskningsperspektiv, är dessa ligander även essentiella för att studera och förstå de grundläggande molekylära och cellulära mekanismerna som ligger till grund för dessa sjukdomar. Under många år har läkemedelsföretag arbetat med behandlingsstrategier att rensa ut amyloida plack som behandling av Alzheimers sjukdom. Under 2017 var 105 behandlingar i klinisk prövning.³ Av dessa var 70 procent sjukdomsförändrande varav majoriteten var riktade mot minskning av amyloid-beta. Tyvärr har dessa strategier inte nått de kliniska målen i de prövningar som gjorts.



Alzheimers sjukdom i nytt ljus

”När oligotiofenen binder till ett proteinaggregat sänder den ut en unik färg, vilket innebär att aggregatet kan visualiseras med hjälp av färgen från liganden.”

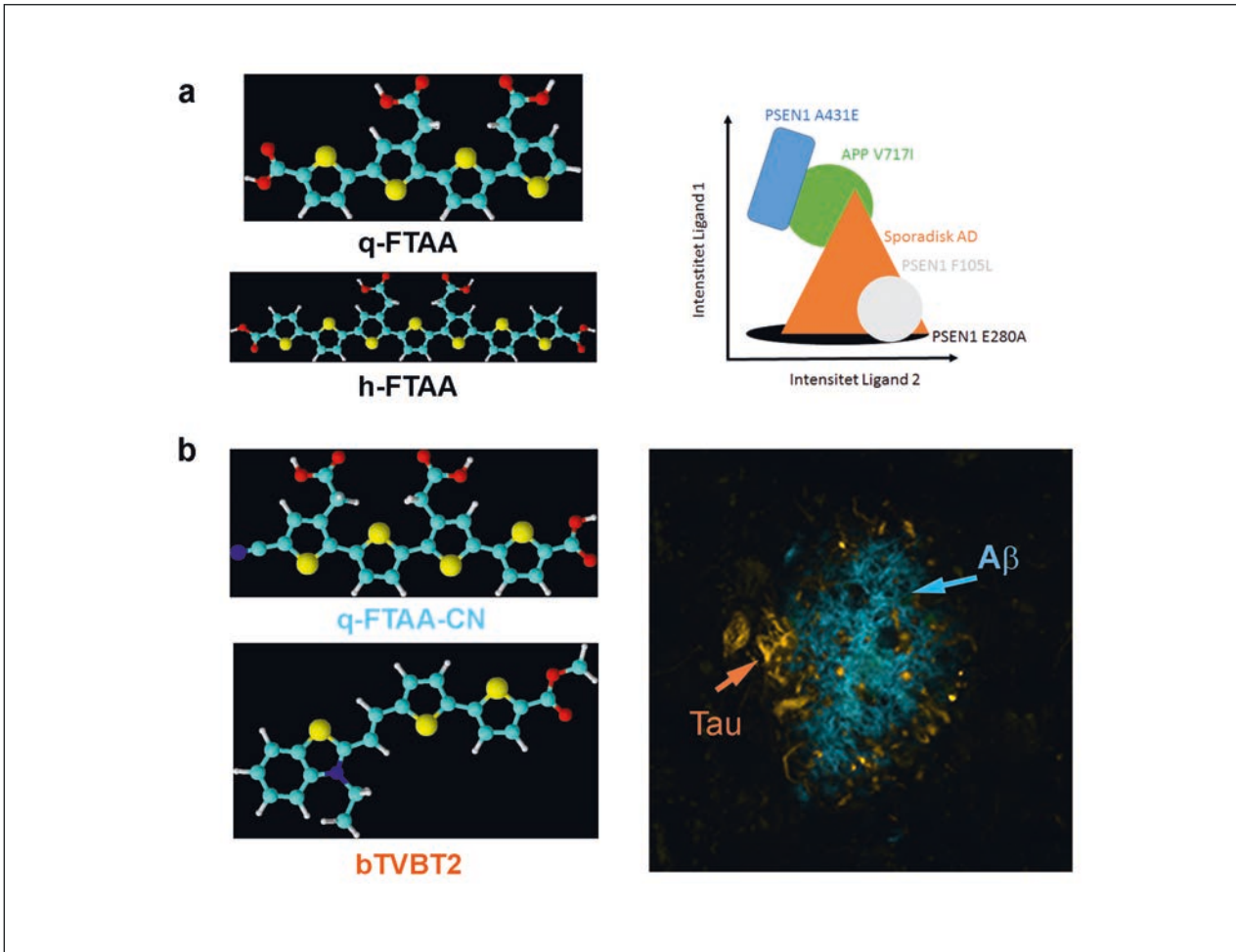
OLIKA VARIANTER AV PROTEINAGGREGAT

Trots många års forskning så kvarstår det många frågor angående hur proteinaggregat bildas samt hur de ser ut, det vill säga vilken struktur de har. De senaste åren har många forskningsstudier visat att ett enskilt protein kan bilda olika strukturvarianter av proteinaggregat.⁴ Denna så kallade aggregatpolymorfism har tidigare observerats för prionproteinet, som orsakar bland annat Creutzfeldt-Jakobs sjukdom och Kuru. I prionsjukdomar har man visat att olika prionaggregat kan ge upphov till olika typer av stammar av prioner som angriper olika delar av hjärnan samt ger upphov till varierande sjukdomsbilder. Ursprungligen ansågs variationen av sjukdomsbilder och den uppenbara skillnaden av dessa stammar

vara ett starkt argument för att prionsjukdomar orsakades av virus. Så är inte fallet utan det är strukturen hos prionproteinaggregaten som är kopplade till denna variation. Nyligen visade man att patienter med olika klinisk bild av Alzheimers sjukdom sannolikt hade olika dominerande typer av amyloid-beta-aggregat.⁵ Denna slutsats framkom efter biofysikaliska studier av amplifierade amyloid-beta-aggregat i provrör ympade från fibriller från patientmaterial.

KAMELEONTLIGANDER SOM SÄRSKILJER AMYLOID-BETA-AGGREGAT

Finns det då en variation av amyloid-beta-aggregat i hjärnan hos patienter med Alzheimers sjukdom? För att studera detta användes en typ av ”kameleontligander” som vi utvecklat vid Linköpings universitet. Dessa ligander, som kallas oligotiofenor, kan fånga upp ljus och därefter skicka ut ljus, så kallad fluorescens, med olika färger. När oligotiofenen binder till ett proteinaggregat sänder den ut en unik färg, vilket innebär att aggregatet kan visualiseras med hjälp av färgen från liganden. Till skillnad från traditionella ligander som i princip endast påvisar förekomsten av proteinaggregat, kan oligotiofenerna särskilja olika typer av proteinaggregat.⁶ Ef-



FIGUR 1A) MOLEKYLRUKTURER AV OLIGOTIOFENERNA LIGAND 1 (QFTAA) OCH LIGAND 2 (HFTAA).

Schematisk bild av fördelningen av fluorescensintensitet från ligand 1 och ligand 2 från kärnan i amyloid-beta-plack i patienter med Alzheimers sjukdom. Olika patientgrupper uppvisar varierande fördelning av ligandernas infärgning. Grupperna av sporadisk Alzheimers sjukdom (sporadisk AD) och familjära fall av Alzheimers sjukdom med PSEN1-mutationer och AβPP-mutationer är markerade i olika färgfält. Bilden är förenklad från originaldata.⁸

FIGUR 1B) MOLEKYLRUKTURER AV OLIGOTIOFENERNA QFTAA-CN OCH bTVBT2.

Fluorescensmikroskopibild av ett histologiskt preparat från en patient med Alzheimers sjukdom. Bilden är framtagen med hyperspektralmikroskopi som särskiljer amyloid-beta-aggregat infärgad med qFTAA-CN (ljusblå) och tau-aggregat infärgad med bTVBT2 (orange).

tersom ligandens färg varierar beroende på strukturen den binder till, kan den liknas vid en kameleont, därav begreppet "kameleontligander". Forskaren Sofie Nyström som arbetar i vårt laboratorium, fann att en kombination av två oligotofener (qFTAA och hFTAA) [Figur 1a] påvisade tidigare okända förändringar hos amyloid-beta-aggregat i musmodeller där konformationsförändringar inom plackets kärna ägt rum flera månader efter att aggregaten bildats.⁷ Denna metod ökade ytterligare kontrasten mellan olika former av amyloid-beta-aggregat. Tillsammans med forskargrupper från Tyskland, Sverige (Göteborg), Colombia, England och USA, testades denna metod med kombinerade oligotofener på hjärnvävnad från patienter diagnostiserade med Alzheimers sjukdom.⁸ Kohorten inkluderade vävnad från patienter med familjära mutationer i presenelin 1 (PSEN1)- och AβPP-generna eller sporadiska former av Alzheimers sjukdom. De histologiska snitten avbildades med fluorescensmikroskopi

och olika färger kunde observeras från kärnan av amyloid-beta-placken. Vid en djupgående analys kunde man se olika infärgningsmönster mellan amyloid-beta-aggregat från sporadisk respektive familjär Alzheimers sjukdom [Figur 1a]. Mönstren uppvisade en mycket stor variation som särskilde enskilda patienter och patientgrupper som bildade kluster. Liganderna visade även tydlig infärgning av amyloid-beta-ansamlingar i hjärnvävnad från en patient som tidigare visat sig negativ för PIB. Denna patients aggregat uppvisade anorlunda oligotofeninfärgning i jämförelse med sporadisk Alzheimers sjukdom vilket stärker hypotesen att det är aggregatpolymorfism som orsakar låg PIB-bindning.

VAD ÄR SKILLNADEN MELLAN AMYLOID-BETA-AGGREGATEN?

Nästa steg var att ta reda på om de olika typerna av infärgningsmönster kunde korreleras till några andra faktorer som

man tror har att göra med amyloid-beta-ansamlingar i hjärnan. Det fanns ingen korrelation mot apolipoprotein E (ApoE) genotyp, ålder vid dödsfallet, postmortem intervall. Inte heller korrelerade mönstret tydligt mot total amyloid-beta-ansamling eller ratiot mellan A β 40/42 i aggregaten trots att familjära mutationer ofta skiftar denna amyloid-beta-produktion. Det verkar således vara just strukturvariationen som är avgörande för hur fallen grupperas. Ett experiment för att stärka denna hypotes gjordes därför genom att härma prionfältets forskning. Aggregat från olika patientgrupper ympades in i unga genetiskt identiska transgena möss som överproducerar mänskligt amyloid-beta. Mössens aggregat som bildades vid denna ympning liknande mönstret som observerades i originalpatienten. Härvid har alltså ympen verkat som en mall för nybildning av amyloid-beta-aggregat där strukturen replikeras i värdjuret likt hur prionstammar utvecklas.

LIGANDER MOT OLIKA TYPER AV PROTEINAGGREGAT

I Alzheimers sjukdom kan man förutom amyloid-beta-aggregat även se annan typ av proteinaggregat, så kallat neurofibrillärt trassel, som består av proteinet tau. Samspelet mellan dessa patologiska proteinaggregat är inte helt klarlagt, men ansamlingar av tau kan också hittas vid en grupp mindre vanliga tillstånd såsom progressiv supranukleär pares, kortikobasal degeneration, samt vissa former av frontotemporal demens och chronic traumatic encephalopathy som kan upp-

stå hos individer som fått våld mot huvudet vid upprepade tillfällen. Vid tidigare studier har vi identifierat en ligand, q-FTAA-CN, framtagen av forskaren Marcus Bäck i vårt laboratorium [Figur 1b]. Denna ligand binder selektivt till amyloid-beta-aggregat och för att identifiera en ligand som istället binder till neurofibrillärt trassel av tau, modifierade kemisten Hamid Shirani denna ligand genom att introducera nya kemiska byggblock, bTVBT2 [Figur 1b].⁹ För att undersöka om dessa nya ligander, bTVBTs, selektivt detekterade tau-ansamlingar, färgades hjärnsnitt från patienter med Alzheimers sjukdom. Dessa experiment visade selektiv infärgning av tau-aggregat och i kombination med den amyloid-beta-aggregat-selektiva liganden, kunde man tydliga särskilja de två olika aggregattyperna i hjärnvävnaden [Figur 1b]. Selektiviteten har även bekräftats med antikroppar mot tau respektive amyloid-beta. Sammantaget visade våra studier att det är fullt möjligt att kemiskt skräddarsy småmolekylära ligander som binder till proteinaggregat som består av olika typer av proteiner.

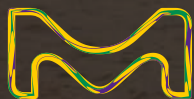
KAN MAN UTVECKLA NY DIAGNOSTIK ELLER BEHANDLING MED DENNA KUNSKAP?

Våra upptäckter har flertalet konsekvenser för diagnostik och eventuell behandling av Alzheimers sjukdom. Den individuella variationen i aggregattyper är antagligen en komplicerande faktor när man ska bestämma distributionen och graden av amyloid-beta- och tau-ansamlingar med PET-avbild-

REBIF® - 20 ÅRS ERFARENHET VID BEHANDLING AV MS^{1,2,3}

Att kunna se framåt är den största gåvan

1. PRISMS-2. Lancet. 1998;352(9139):1498-1504.
2. PRISMS-15. Kappos L, et al. JNNP. 2015;0:1-6.
3. Schwid SR, et al. ClinTher. 2007;29(9):2031-2048.



EXPERIENCE MATTERS

Rebif®
(interferon beta-1a)

MERCK

REBIF® (interferon beta-1a), Rx. Farmakoterapeutisk grupp: immunstimulerande medel, interferoner, ATC-kod L03A B07. Injektionsvätska, lösning. För subkutan injektion. Förfyllda sprutor 22 mikrogram, 44 mikrogram och 8,8 mikrogram + 22 mikrogram. Cylinderampull, kassett 22 mikrogram / 0,5 ml, 44 mikrogram / 0,5 ml, och 8,8 mikrogram / 0,1 ml + 22 mikrogram / 0,25 ml. Förfylld injektionsspenna, 22 mikrogram, 44 mikrogram och 8,8 mikrogram + 22 mikrogram. Indikation: Patienter med en enda demyeliniseringsepisod med en aktiv inflammationsprocess, om alternativa diagnoser har uteslutits, och om patienterna bedöms uppvisa hög risk för att utveckla kliniskt definitiv multipel skleros. Patienter med skovvis förlöpande multipel skleros. I kliniska prövningar karakteriserades detta av 2 eller flera akuta skov under närmast föregående 2-årsperiod. Effekt har inte visats på patienter med sekundär progressiv multipel skleros utan pågående skovaktivitet. Ingår i förmånssystemet. För aktuell information se fass.se. Datum för översyn av produktresumén juli 2015.

ning hos patienter med Alzheimers sjukdom. Därmed kommer det sannolikt att behövas ett antal olika ligander för att erhålla en så korrekt diagnostik som möjligt. Ett utökat bibliotek av ligander för PET-avbildning skulle även leda till att nya potentiella behandlingsformer skulle kunna följas upp på ett mer detaljerat sätt. Variationen i aggregattyper mellan olika patienter med Alzheimers sjukdom kommer sannolikt också innebära att ett flertal olika behandlingsstrategier kommer att behövas för att neutralisera aggregaten och spridningen av dessa. Exempelvis kan en monoklonal antikropp riktad mot amyloid-beta känna igen ett fåtal olika aggregat som bara finns hos en specifik grupp av patienter, vilket skulle innebära att det skulle vara en fördel att använda en kombination av olika antikroppar för att slå mot så många former av amyloid-beta-aggregat som möjligt. I framtiden kommer vi även att undersöka den terapeutiska potentialen hos småmolekylära ligander eftersom liknande ligander har visat en terapeutisk effekt mot prionsjukdomar.¹⁰ Från ett diagnostiskt perspektiv, kommer vi även undersöka om ligander kan användas för att kartlägga förekomsten av olika proteinaggregat i cerebrospinalvätska eller blod. Vår förhoppning är att genom grundlig kartläggning och kemisk optimering av en mängd olika ligander kunna utveckla en arsenal av verktyg som skulle kunna användas för att diagnostisera och behandla Alzheimers sjukdom och liknande neurodegenerativa sjukdomar.

“Ett utökat bibliotek av ligander för PET-avbildning skulle även leda till att nya potentiella behandlingsformer skulle kunna följas upp på ett mer detaljerat sätt.”

SAMMANFATTNING

Genom användning av ligander som binder till olika former av aggregerade protein har vi visat att det finns en variation av olika typer av amyloid-beta-aggregat hos patienter med sporadisk eller familjär Alzheimers sjukdom. Vi visade även att det går att skraddarsa ligander som selektivt binder till olika proteinaggregat, såsom amyloid-beta eller tau. Det är fullt möjligt att man med denna vetenskap kan skapa nya diagnostiska verktyg samt nya läkemedel som riktas mot en viss typ av proteinaggregat och därmed få en bredare arsenal av diagnostiska och terapeutiska alternativ för att förstå och behandla Alzheimers sjukdom.



REFERENSER

1. Klunk WE, et al. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol*. 2004; 55(3):306-19.
2. Harada R, et al. Characteristics of Tau and Its Ligands in PET Imaging. *Biomolecules*. 2016; 6(1):7.
3. Cummings J, et al. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2017. *Alzheimers Dement (N Y)* 2017; 3(3): 367-384.
4. Fändrich M, et al. Amyloid fibril polymorphism: a challenge for molecular imaging and therapy. *J Intern Med*. 2018; 283(3):218-237.
5. Qiang W, et al. Structural variation in amyloid- β fibrils from Alzheimer's disease clinical subtypes. *Nature* 2017; 541(7636):217-221.
6. Klingstedt T and Nilsson KPR, Luminescent conjugated poly- and oligo-thiophenes: optical ligands for spectral assignment of a plethora of protein aggregates. *Biochem Soc Trans*. 2012; 40(4):704-10.
7. Nyström S, et al. Evidence for age-dependent in vivo conformational rearrangement within A β amyloid deposits. *ACS Chem Biol*. 2013; 8(6):1128-33.
8. Rasmussen J, et al. Amyloid polymorphisms constitute distinct clouds of conformational variants in different etiological subtypes of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017; 114(49):13018-13023.
9. Shirani H, et al. Synthesis of Thiophene-Based Optical Ligands That Selectively Detect Tau Pathology in Alzheimer's Disease. *Chemistry*. 2017; 23(67):17127-17135.
10. Herrmann US, et al. Structure-based drug design identifies polythiophenes as antiprion compounds. *Sci Transl Med*. 2015; 7(299):299ra123.



PETER NILSSON
Professor i organisk kemi, Linköpings universitet
peter.r.nilsson@liu.se



PER HAMMARSTRÖM
Professor i proteinkemi, Linköpings universitet
per.hammarstrom@liu.se