

Nyupptäckt sjukdomsmekanism vid ALS – **Prionliknande spridning**

En ny mekanism för hur den neurodegenerativa sjukdomen ALS (amyotrofisk lateralskleros) utvecklas har upptäckts av ALS-gruppen vid Umeå universitet. Proteinet SOD1 (Superoxid dismutas-1) felveckas och bildar aggregat i det centrala nervsystemet (CNS). Dessa aggregat sprider sig sedan i CNS via så kallad templatstyrd spridning, det vill säga det felveckade proteinet provocerar andra nativa proteiner av samma sort att anta samma felaktiga och patologiska struktur. Aggregatbildningen kan direkt kopplas till sjukdomsutveckling i de transgena försöksdjur som använts i studierna. Detta visas i en nyligen publicerad avhandling¹ av **Johan Bergh**, leg. läkare och doktor vid institutionen för medicinsk biovetenskap, Umeå universitet.

Denna process är väldigt lik det som händer vid prionsjukdomar som Creutzfeldt-Jakobs sjukdom och galna ko-sjukan. Nyligen har det även påvisats att andra neurodegenerativa sjukdomar som Alzheimers och Parkinsons sjukdom har en prionliknande sjukdomsmekanism.² I och med de nya forskningsresultaten kan även ALS läggas till i denna grupp. Upptäckten kan öppna för framtida utveckling av läkemedel.

MUTATIONER I SOD1 ÄR LÄNKAT TILL ALS

Varje år drabbas ca 200–250 personer av ALS i Sverige och i hela världen lever det ca 223.000 människor med sjukdomen. Antalet ALS-fall växer för varje år och uppskattnings-

vis har prevalensen ökat till ca 377.000 år 2040.³ Amyotrofisk lateralskleros definierades redan i slutet av 1800-talet av den franske neurologen Jean-Marin Charcot som en sjukdom som drabbar både övre motorneuron i motorcortex och de nedre motorneuronen i hjärnstammen och ryggmärgen.⁴ Nästa stora framsteg inom ALS-forskningen skulle dröja ända till 1993, då mutationer i genen superoxid dismutas-1 (SOD1) länkades till ALS.⁵ Sedan dess har över 210 mutationer i SOD1 hittats hos ALS-patienter och 3–6 procent av det totala antalet personer med ALS har en mutation i denna gen. SOD1-proteinet är ett strukturellt stabilt, antioxidativt enzym som uttrycks i alla celler. Mekanismen för hur muta-



"Detta till trots finns fortfarande relativt lite kännedom om vad som orsakar aggregering av SOD1-protein in vivo, och hur dessa aggregat påverkar sjukdomsförloppet vid ALS."

av proteinaggregat

tioner i SOD1 orsakar ALS är inte helt klarlagd, men det är visat att mutationerna destabiliserar SOD1-proteinet. Detta leder till att proteinet monomeriserar och felveckas. Monomererna klumpar därefter ihop sig till större aggregat, vilka inte kan brytas ned effektivt av cellernas proteindegraderingssystem. Dessa aggregat av SOD1-protein hittas hos både patienter med mutation i SOD1, men även hos ALS-sjuka som saknar mutation i SOD1-genen.⁶ Därav finns anledning att misstänka att SOD1-proteinet har en bredare betydelse i uppkomsten av ALS.

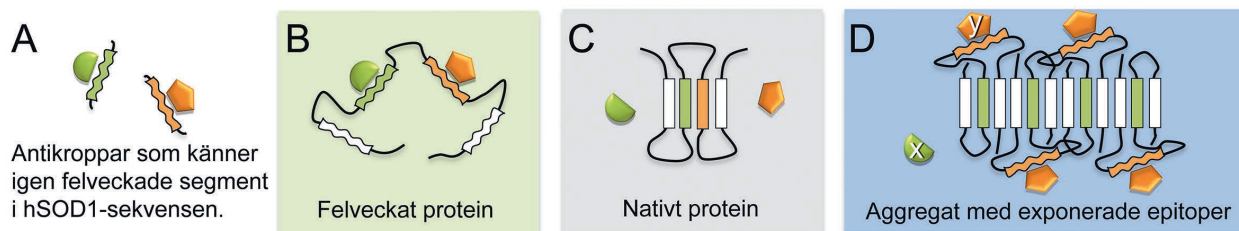
ÄR SOD1-PROTEINET INBLANDAT I ALLA TYPER AV ALS?

Upptäckten att SOD1-aggregat bildas hos patienter med sporadisk ALS (SALS) manade oss att undersöka om även icke-muterat SOD1, så kallat vildtyps-protein (hSOD1^{wt}), också kan orsaka ALS. För att göra detta använde vi oss av försöksdjur. Den mest etablerade djurmodellen som används inom ALS-forskning är den så kallade SOD1-musen. I denna mus har den humana varianten av SOD1 (hSOD1) klippts in i dess genom, en så kallad transgen mus. Ett flertal olika modeller med mutationer i olika delar av SOD1 finns tillgängliga i dag. Vi utvecklade en ny musmodell, som överuttryckte hSOD1^{wt} i samma mängd som den mest etablerade SOD1-modellen (hSOD1^{G93A}) inom ALS-forskning. Den nyutvecklade, homozygota, hSOD1^{wt}-modellen utvecklade prematura

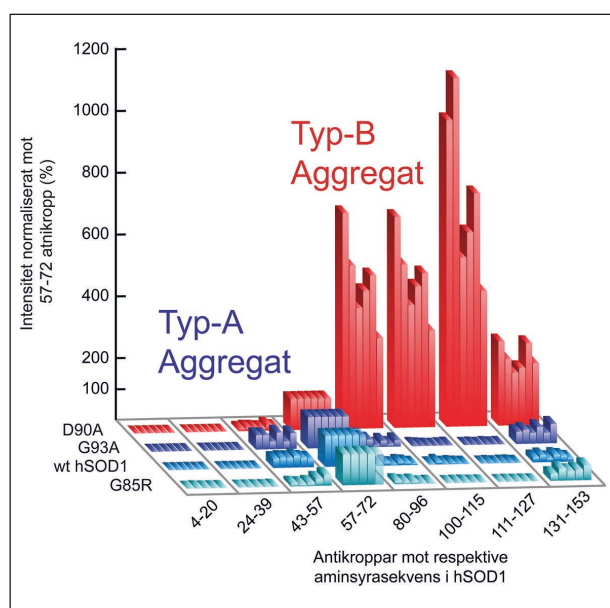
ALS-liknande symtom och fick terminal sjukdom redan efter ca 370 dagar (en frisk mus lever över 800 dagar). I likhet med ALS-patienter och andra musmodeller med mutation i SOD1 kunde uttalad motorneurondöd och cytoplasmiska aggregat av hSOD1-protein observeras i både ryggmärg och hjärna i hos möss med terminal sjukdom.⁷ Med detta resultat kunde vi dra slutsatsen att mutation i SOD1 inte är nödvändig för utveckling av ALS i musmodeller. Detta resultat ger ytterligare stöd för hypotesen att SOD1 har en generell betydelse i ALS.

OLIKA STAMMAR AV SOD1-AGGREGAT

Aggregat av SOD1-protein i motorneuron är ett kännetecken för ALS, både i människa och i djurmodeller. Detta till trots finns fortfarande relativt lite kännedom om vad som orsakar aggregering av SOD1-protein *in vivo*, och hur dessa aggregat påverkar sjukdomsförloppet vid ALS. För att undersöka detta utvecklades en ny metod för att bestämma ytstrukturen på SOD1-aggregat, då denna struktur skiljer sig från nativt SOD1. Ett flertal peptidantikroppar riktade mot korta, konsekutiva regioner (epitoper) i SOD1-proteinets aminosyrasekvens tillverkades.⁶ Samtliga antikroppar visade sig vara specifika för felveckat/oveckat SOD1, det vill säga ingen bindning av det "friska" nativa SOD1 proteinet kunde registreras. Detta förhållande utnyttjades vid analys av aggregatstrukturer.



Figur 1. Peptidantikroppar specifika för felveckat hSOD1. (A) Antikropparna tillverkades mot korta konsekutiva segment i hSOD1-sekvensen. (B) När proteinet är felveckat/oveckat är epitoperna flexibla och tillgängliga för peptidantikropparna. (C) Det nativa hSOD1-proteinet är en rigid struktur, vilket gör att antikropparna inte kan binda till proteinet. (D) hSOD1-aggregat är delvis ordnat. Antikropp X kan inte binda till aggregatet, då dess epitop är lokaliserad i aggregatkärnan, medan antikropp Y:s epitop är lättillgänglig i en flexibel svans utanpå aggregatet. Anpassad från Bergh J, et al 2015.⁸



Figur 2. Strukturanalys av hSOD1-aggregat. Aggregat från transgena musmodeller med mutationerna D90A-, G93A-, G85R- eller viltyps-hSOD1 analyserades med binär mappning av epitoper. Musmodeller med hSOD1D90A-mutation utvecklade en aggregatstruktur där de polyklonala antikropparna mot aminosyrasegmenten 80-96, 100-115 och 111-127 hade klart bättre affinitet. Anpassad från Bergh J, et al 2015.⁸

ren, då antikroppar mot olika SOD1-segment binder olika bra beroende på aggregatets utformning. Antikropparna binder starkt till flexibla fransar av aminosyror på aggregatets yta, men kommer inte åt den rigida kärnan av aggregatet [figur 1].

Aggregat av SOD1 renades fram ur ryggmärg från 4 olika transgena musmodeller (hSOD1^{G93A}, hSOD1^{G85R}, hSOD1^{wt}, samt hSOD1^{D90A}) som utvecklade terminal ALS. Aggregaten fångades upp på ett filter och färgades in med de respektive SOD1-specifika peptidantikropparna. Två tydligt särskilda aggregatstrukturer (typ-A och typ-B) identifierades med den nya metoden [figur 2], som vi kallar binär mappning av epitoper (binary epitope mapping).⁸ Dessa två aggregat var strukturellt skilda från de åtta olika hSOD1-aggregat som vi utvecklat *in vitro*. Detta tydliggör att de cellulära förhållandena i CNS är av betydelse vid utveckling av proteinaggregat.

Utöver strukturskillnaderna, skilde sig aggregaten åt med avseende på molekylära egenskaper och förmåga att sprida sig

i vävnad. Typ-B-aggregat hade en mer explosiv spridningsförmåga och var känsligare för exponering av denaturerande lösningar. Att proteinaggregat med aggressiv spridning också är mer fragila är en etablerad realitet inom prionfältet.

Typ-B-aggregat, som enbart utvecklades i hSOD1^{D90A}-modellen, var även associerade med kortare överlevnad. Både typ-A- och typ-B-aggregat utvecklades i denna djurmodell, och ju högre andel av typ-B-aggregat som utvecklades, desto kortare överlevnad och aggressivare sjukdomsförlopp kunde observeras.

Sammantaget ger detta stöd för att SOD1-aggregat i sig är centrala vid SOD1-associerad ALS, samt att dess struktur påverkar sjukdomsförloppet vid sjukdomen. Denna typ av mekanism kan man även se vid prionsjukdomar som Creutzfeldt-Jakobs sjukdom.

PRIONLIKANDE ÖVERFÖRING OCH SPRIDNING AV SOD1-AGGREGAT

En prion är ett infektiöst, mycket stabilt, felveckat protein som har förmåga att få andra proteiner av samma typ att anta samma felveckade struktur som prionprotein (templatstyrd spridning). Vi misstänkte att typ-A- och typ-B-aggregaten som vi upptäckt egentligen var prioner. För att undersöka detta renades dessa två aggregat fram genom att homogenisera ryggmärg från terminalt sjuka SOD1-möss. Mindre beståndsdelar som oligomerer och monomerer avlägsnades från homogenatet. Därefter injicerades typ-A-, typ-B- eller kontrollhomogenat i ventralhornet i ryggmärgen på asymtomatiska, 100 dagar gamla, hSOD1^{G85R}-möss (detta kallas "seeding" av prioner). hSOD1^{G85R}-möss överuttrycker redan muterat humant SOD1, men utvecklar hSOD1-aggregat sent (vid 300 dagars ålder), och lever länge (i genomsnitt till ca 400 dagars ålder, då de dör av terminal ALS). Därför är modellen bra för att undersöka tidiga seeding-effekter.

De möss som injicerats med hSOD1-aggregat fick symptom på ALS cirka 70 dagar efter injektion, och utvecklade terminal sjukdom efter ytterligare 30 dagar, 200 dagar tidigare än möss som injicerats med kontrolllösning.⁹ De initiala symptomen observerades alltid i det vänstra bakbenet, vilket motoriskt representerar det lumbala ventralhornet i ryggmärgen, det vill säga området där injektionen av hSOD1-aggregat utfördes. Med andra ord kan ALS-symptomen associeras med hSOD1-aggregatens lokalisering.

Intracyttoplasmiska SOD1-inklusioner och motorneuron-död observerades histopatologiskt i ryggmärg. Dessutom

kunde vi bekräfta att aggregatspridningen var templatstyrd. hSODI^{G85R}-modellen utvecklar normalt sett bara typ-A-aggregat,⁸ men vid injektion av typ-B-aggregat så utvecklades överraskande också aggregat av typ-B i dess CNS.

Aggregaten skiljde sig åt med avseende på spridningsförmåga, och överlevnadstiden hos musmodellen påverkades beroende på vilken aggregattyp som injicerats. Effektiviteten av seedingen var dessutom koncentrationsberoende, ju mer aggregat som injicerats, desto tidigare utvecklades terminal ALS i SOD1-mössen.

Sammanfattningsvis talar resultaten ovan för att hSOD1-aggregat av typ-A och typ-B är ALS-inducerande prioner. Den samlade bilden tyder på att SOD1-associerad ALS är en sjukdom med prionliknande mekanism.

"Effektiviteten av seedingen var dessutom koncentrationsberoende, ju mer aggregat som injicerats, desto tidigare utvecklades terminal ALS i SOD1-mössen."

AGGREGAT FRÅN ALS-PATIENTER KAN OCKSÅ INDUCERA SJUKDOM?

Hur relevant är denna mekanism för människor med ALS? För att ge svar på detta producerades i nästa studie "seeds" av ryggmärg från en ALS-patient med trunkeringsmutationen G127X. Koncentrationen av hSOD1-aggregat är mycket lägre i den mänskliga ryggmärgen än hos hSOD1-möss, vilket gör det svårt att direkt bestämma ytstrukturen på aggregaten. Däremot går det att indirekt få en uppfattning om vilken aggregatstruktur som produceras *in vivo* hos denna ALS-patient, då vi vet att aggregeringen är templatstyrd.⁹ När prematur aggregatbildning initieras i ALS-musen, bör dessa aggregat således anta samma form som de injicerade aggregaten.

Vi injicerade, likt tidigare, aggregat i ryggmärgen på 100 dagar gamla hSODI^{G85R}-möss. De humana hSODI^{G127X}-aggregaten provocerade fram sjukdom ca 100 dagar tidigare jämfört med humant kontrollhomogenat, en signifikant skillnad. Injektionen av hSODI^{G127X}-aggregat inducerade produktion av typ-A-aggregat, oavsett om mottagarmusen injicerats med hSODI^{G127X}-aggregat från mus eller människa.¹⁰ Humana seeds var, oväntat, 3 gånger potentare i sin sjukdomsinducering än seeds från möss.

Denna studie visar att material från en ALS-patient med SOD1-mutation kan inducera prionliknande spridning av hSOD1-aggregat, vilket i sin tur talar för att denna mekanism är av stor vikt även i människa.

Sammantaget presenterar avhandlingen en ny metod för att karaktärisera strukturen på hSOD1-aggregat som bildas vid ALS. Med information om hSOD1-aggregatens utformning underlättas produktionen av specifika antikroppar mot hSOD1-aggregat. Antikropparna skulle i förlängningen kunna användas terapeutiskt för att bryta ner och minska sprid-

ning av dessa skadliga aggregat. Resultat från binär mappning av epitoper tyder på att en prionliknande växt och spridning av SOD1-aggregat är den primära sjukdomsmekanismen hos ALS-patienter med mutation i SOD1. Då aggregat av SOD1 kan identifierats i både familjära och sporadiska ALS-fall kan denna mekanism teoretiskt vara av betydelse även hos personer med ALS som saknar SOD1-mutation. Mer data behövs dock för att undersöka om så är fallet även i praktiken. De nya fynd som avhandlingen presenterar är av betydelse vid framtida läkemedelsutveckling mot ALS.



JOHAN BERGH

Leg. läkare, doktor vid institutionen för medicinsk biovetenskap, Umeå universitet
johan.bergh@umu.se

1. Bergh J. Structural Investigation of SOD1 Aggregates in ALS : Identification of Prion Strains Using Anti-Peptide Antibodies, in Umeå University medical dissertations. 2018, Umeå universitet: Umeå. p. 94.
2. Prusiner SB. Cell Biology. A Unifying Role for Prions in Neurodegenerative Diseases. Science 2012; 336(6088):1511-1513.
3. Chio A, Logroscino G, Traynor BJ, et al. Global Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review of the Published Literature. Neuroepidemiology 2013; 41(2):118-130.
4. Sibilla C and Bertolotti A. Prion Properties of Sod1 in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Potential Therapy. Cold Spring Harb Perspect Biol 2017; 9(10).
5. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, et al. Mutations in Cu/Zn Superoxide-Dismutase Gene Are Associated with Familial Amyotrophic-Lateral-Sclerosis. Nature 1993; 362(6415):59-62.
6. Forsberg K, Jonsson PA, Andersen PM, Bergemalm D, Graffmo KS, Hultdin M, Jacobsson J, Rosquist R, Marklund SL, and Brännström T. Novel Antibodies Reveal Inclusions Containing Non-Native SOD1 in Sporadic ALS Patients. PLoS ONE 2010; 5(7).
7. Graffmo KS, Forsberg K, Bergh J, Birve A, Zetterström P, Andersen PM, Marklund SL, and Brännström T. Expression of Wild-Type Human Superoxide Dismutase-1 in Mice Causes Amyotrophic Lateral Sclerosis. Hum Mol Genet 2013; 22(1):51-60.
8. Bergh J, Zetterström P, Andersen PM, Brännström T, Graffmo KS, Jonsson PA, Lang L, Danielsson J, Oliveberg M, and Marklund SL. Structural and Kinetic Analysis of Protein-Aggregate Strains in Vivo Using Binary Epitope Mapping. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015; 112(14):4489-4494.
9. Bidhendi EE, Bergh J, Zetterström P, Andersen PM, Marklund SL, and Brännström T. Two Superoxide Dismutase Prion Strains Transmit Amyotrophic Lateral Sclerosis-Like Disease. J Clin Invest 2016; 126(6):2249-53.
10. Ekhtiari Bidhendi E, Bergh J, Zetterstrom P, Forsberg K, Pakkenberg B, Andersen PM, Marklund SL, and Brannstrom T. Mutant Superoxide Dismutase Aggregates from Human Spinal Cord Transmit Amyotrophic Lateral Sclerosis. Acta Neuropathol 2018.