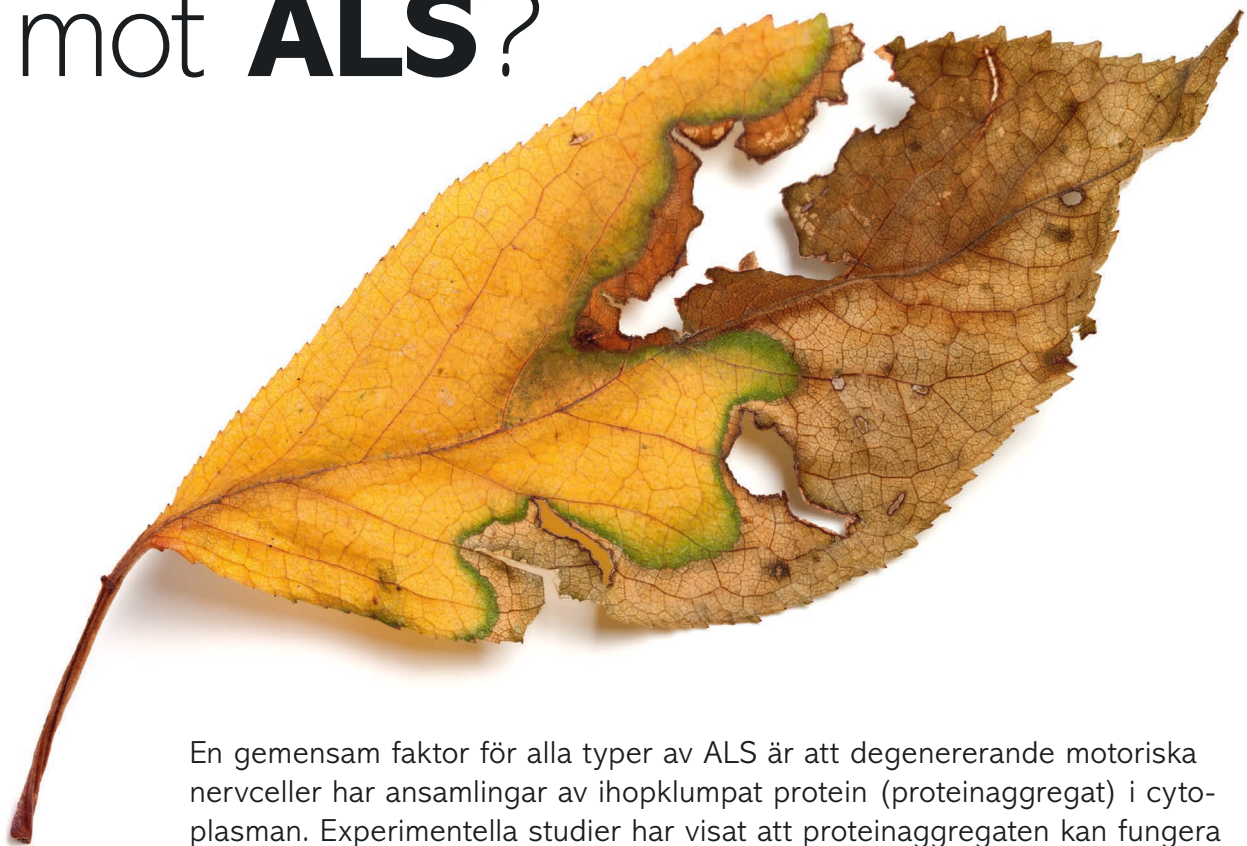
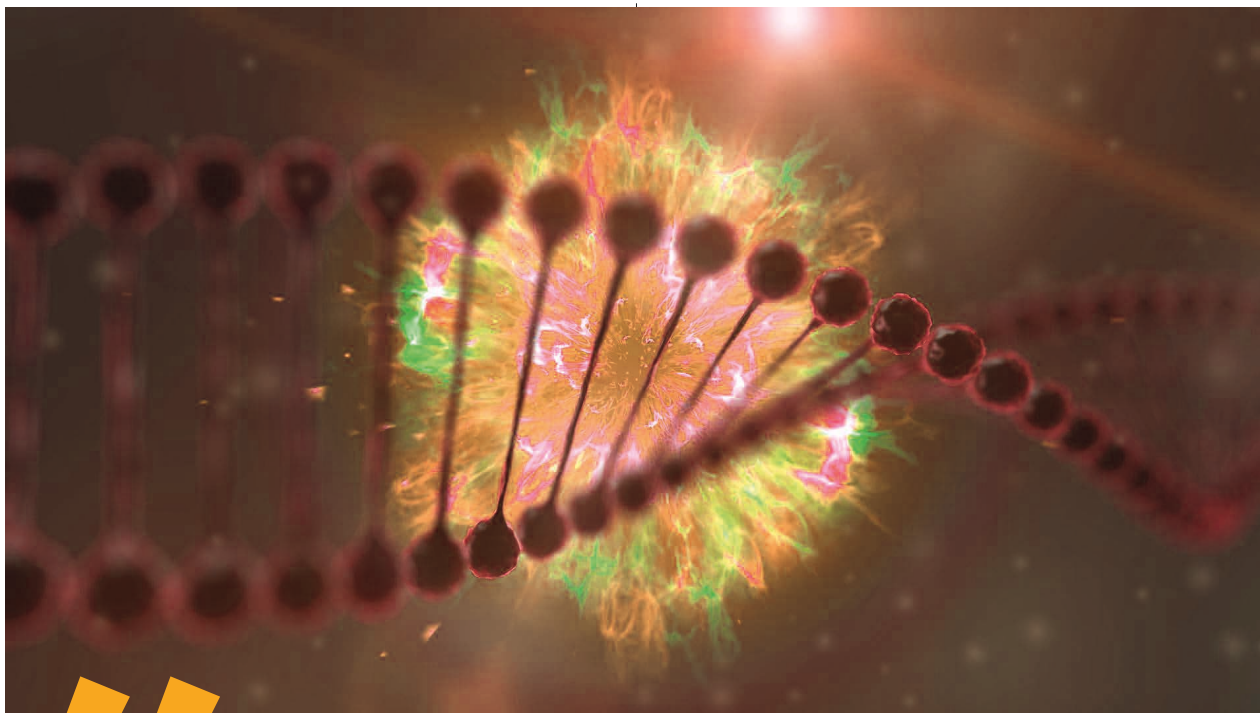


Hopp om **nya** **immunoterapier** mot **ALS**?



En gemensam faktor för alla typer av ALS är att degenererande motoriska nervceller har ansamlingar av ihopklumpat protein (proteinaggregat) i cytoplasman. Experimentella studier har visat att proteinaggregaten kan fungera som "prioner", som sprider sig mellan celler där de fortplantar sig för att bilda nya sjukdomsframkallande aggregat enligt samma mall. Fenomenet verkar vara en gemensam faktor för hur ALS och andra neurodegenerativa sjukdomar som Alzheimers- och Parkinsons sjukdom sprids mellan olika regioner i nervsystemet. ALS-forskare vid Umeå Universitet har nu utvecklat specifika antikroppar som kan binda, och minska spridning av sjukdomsassocierade SOD1-aggregat i transgena musmodeller för ALS. Försöken ger hopp om utveckling av nya immunoterapier som kan bromsa sjukdomen.



I dag har man identifierat ett 40-tal olika genetiska förändringar som kan orsaka eller öka risken för ALS. Sådana ALS-associerade genetiska förändringar kan i dag påvisas i omkring 15 procent av alla patienter.

ALS – EN MULTIVARIABEL GRUPP AV SJUKDOMAR

Amyotrofisk lateral skleros, ALS, är ett samlingsnamn på en grupp motorneurondegenerativa sjukdomar. Det finns många olika typer av ALS och symptomen och sjukdomsförloppet varierar. Gemensamt för alla varianter är att motoriska nervceller i hjärnan, hjärnstammen och/eller ryggmärgen degenererar och slutar signalera till skelettmuskulaturen. Muskulaturen som tappar nervimpulser blir allt svagare, och blir så småningom förlamade. Vanligtvis börjar symptomen i en enskild kroppsdel och sprider sig sedan stegvis till övriga skelettmuskler i kroppen. Patienterna avlider ofta inom 3 år efter diagnos, som ett resultat av koldioxidförgiftning eller lunginflammation när andningsmuskulaturen drabbas.

Åldrande är den största riskfaktorn och ALS drabbar fler män än kvinnor. Orsaken till 85 procent av fallen är dock fortfarande okänd. I dag har man identifierat ett 40-tal olika genetiska förändringar som kan orsaka eller öka risken för ALS. Sådana ALS-associerade genetiska förändringar kan i dag påvisas i omkring 15 procent av alla patienter. Det finns ett läkemedel som används rutinmässigt vid ALS – Rilutek. Det är en tablett som skall tas dagligen och skall förskrivas så fort man ställt diagnosen. Exakt hur Rilutek fungerar är

inte känt i dag, men man vet att behandlingen bromsar förloppet och kan ge patienten 6–18 månader längre överlevnad. Ju tidigare Rilutek sätts in desto bättre effekt. Det finns ännu ingen behandling som botar sjukdomen, men med kunskapen om de många olika genetiska förändringar och cellulära processer som kan bidra till sjukdomsutveckling, står det klart att det kommer att behövas olika typer av läkemedel för att framgångsrikt behandla olika varianter av ALS.

MUTATIONER I SOD1-GENEN KAN ORSAKA ALS

Mutationer i SOD1-genen var den första orsakande faktor som associerades med ALS och är fortfarande, efter en expansion av en hexanukleotidsekvens i C9orf72-genen, den näst vanligaste kända orsaken till ALS. Cirka 20 procent av alla patienter med ärftlig ALS är bärare av SOD1-mutationer, men de förekommer även i sporadiska fall som ”de novo”-mutationer och återfinns, beroende på population, i 2–5 procent av alla patienter. I dag har forskare identifierat mer än 200 olika SOD1-mutationer i ALS-patienter. Olika mutationer i genen kan dessutom associeras till olika symptomutveckling och överlevnadstid. A4V-mutationen, som är vanligast i USA, leder till exempel oftast till en aggressiv sjukdomsutveckling med en medelöverlevnadstid på mindre än 2 år efter diagnos. D90A-mutationen, som är den vanligaste förekommande SOD1-mutationen i Sverige, associeras istället till en exceptionellt långsam försämring och en överlevnadstid som ofta överskrider 10 år.

FELVECKLAT SOD1-PROTEIN ANSAMLAS

I ANGRIPNA MOTORISKA NERVCELLER

SOD1-genen kodar för proteinet superoxiddismutas 1 (SOD1) vars normala funktion är att neutralisera syreradikaler (superoxider) som är extremt skadliga för cellen. SOD1-proteinet finns uttryckt i alla celler och utgör cirka 0,1 pro-



Varför just cellerna i nervsystemets motorcentra, men inte celler i andra organ, degenererar på grund av muterat SOD1 är fortfarande okänt.

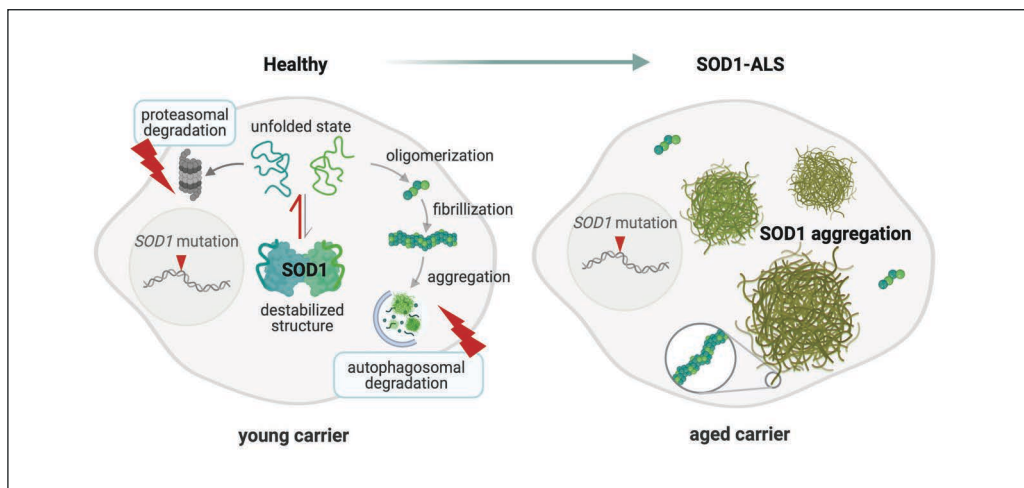
cent av det totala lösliga proteinet i det centrala nervsystemet. Varför just cellerna i nervsystemets motorcentra, men inte celler i andra organ, degenererar på grund av muterat SOD1 är fortfarande okänt. Mutationer i SOD1-genen bidrar till ALS genom att proteinet får en ny toxisk funktion, snarare än att proteinet förlorar sin vanliga funktion. Bevisen bygger bland annat på att mutationer som inte försämrar proteinets enzymatiska aktivitet också kan ge upphov till ALS. Klumpar av felvecklat SOD1 i motoriska nervceller och gliaceller är ett kännetecken för SOD1-ALS, men återfinns även i vävnad från sporadiska fall och patienter som är bärare av andra ALS-associerade gener. Proteinhomeostasen verkar vara satt ur spel i de angripna cellerna vid ALS, så även icke-muterade ostrukturerade SOD1-proteiner ansamlas och antar nya molekyllära strukturer som klumpar ihop sig och bildar skadliga aggregat i cellerna.

SOD1-ALS – EN "PRION-SJUKDOM"

För att kunna studera vilka mekanismer som påverkar felveckling och aggregering av SOD1 och hur de här proteinaggregaten påverkar celler och sjukdomsutveckling använder vi oss bland annat av transgena möss som sjukdomsmodeller. Transgent uttryck av en muterad SOD1-variant som orsakar ALS i människor, men även kraftigt överuttryck av den normala SOD1-genen, resulterar nämligen i en dödlig ALS-lik-

nande förlamningssjukdom i möss. Vår tidigare forskning har dessutom identifierat två strukturellt olika typer av SOD1, typ A och typ B, som kan bildas i nervsystemet hos transgena möss. För att studera om de här aggregaten bidrar till utveckling av ALS, har vi tagit preparationer av aggregat av humant SOD1 från ALS-sjuka möss och sprutat in i ryggmärgen på möss som bär på sjukdomsgenen, men fortfarande är unga och friska. Försöken visade att både typ A- och typ B-aggregat inducerade en ALS-liknande sjukdom. Symtomen började med muskelförsvagning i det ben som får sina nervsignaler från området i ryggmärgen som injicerades med SOD1-aggregat och spred sig senare i tur och ordning till musens övriga ben på ett sätt som liknar hur symtomen sprider sig hos ALS-patienter. Samtidigt började det bildas nya ansamlingar av felstrukturerade SOD1-proteiner som felvecklats enligt samma mall som den strukturella variant som sprutats in. Felaktigt strukturerat SOD1 kan alltså fungera som ett "prion" som sprider sig genom nervsystemet. "SOD1-prionet" kan också ta sig in i nya celler där det fungerar som en mall för att få andra SOD1-proteiner att forma sig enligt samma sjukdomsframkallande struktur.

De två olika sjukdomsframkallande SOD1-prionerna som kan bildas i ALS-sjuka möss ger båda upphov till ALS-liknande sjukdom men med olikheter i symtomutveckling och överlevnadstid. Eventuella skillnader mellan olika SOD1-strukturer som bildas i olika patienter, möjligen som resultat av olika SOD1-mutationer, skulle kunna vara en bidragande orsak till skillnader i symtom, sjukdomsutveckling och överlevnad. Tyvärr har vi inte lyckats isolera tillräckliga mängder felvecklade SOD1-aggregat från patientvävnad för att kunna strukturbestämma dem ännu, men injektion av aggregatpreparationer av vävnad från två obducerade patienter med SOD1-aggregat gav liknande resultat och spridning av felvecklade SOD1-proteiner med typ A-struktur i transgena möss.



Figur 1 illustrerar hur SOD1-proteinet kan bidra till utveckling av ALS. När normalt SOD1-protein translaterats, modifieras det och vecklas ihop till dess specifika tredimensionella struktur som är extremt stabil och essentiell för dess normala enzymatiska funktion. De flesta sjukdomsassocierade mutationer förhindrar korrekt proteinstruktur eller försämrar stabiliteten i 3D-strukturen. Mängden SOD1-protein som vecklas upp och antar ett ostrukturerat tillstånd ökar. När proteinet vecklas upp, exponeras klubbiga ytor som normalt är dolda i proteinets inre struktur och gör att proteinmolekyler klistrar ihop sig med varandra på ett felaktigt sätt och bildar de sjukdomsassocierade proteinstrukturer som tros ligga bakom SOD1-ALS. I optimalt fungerande celler rensas ostrukturerat protein och felaktiga proteinstrukturer snabbt bort, via proteasomdegradering eller nedbrytning via autofagosomer, men i åldrade celler försvagas proteinhomeostasens kontrollfunktioner. Då kan mutationer eller andra stressfaktorer som resulterar i många felaktiga proteiner göra att systemet överbelastas och att felaktiga proteinstrukturer ansamlas i skadliga aggregat.

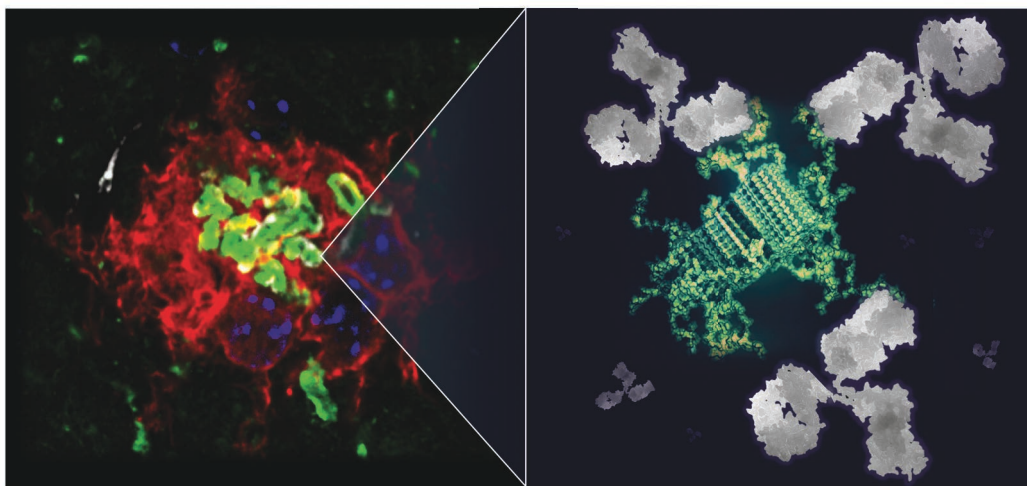
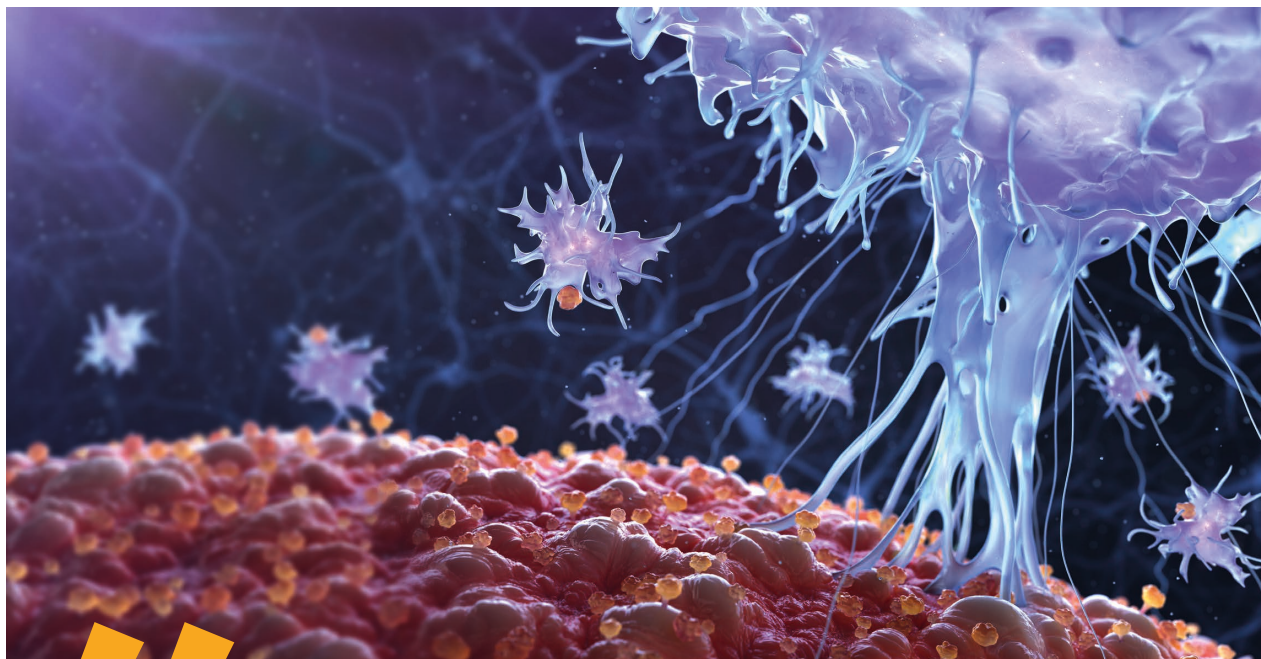


Bild 2. Bilden till vänster visar ett foto av immunofluorescensfärgad ryggsävnad från antikroppsbehandlade möss. Förhoppningen är att immunterapi med antikroppar som binder sjukdomsframkallande proteiner ska minska spridning i nervsystemet och förhindra att det tas upp av nya celler. Antikroppar som bundit kan, förutom att fungera som ett steriskt hinder för upptag, också signalera till astrocyter och mikroglia, hjärnans immunceller, som kan rensa bort rester av döda celler och skadade proteiner. På fotot syns mikroglia celler (rött) som omringat en ansamling proteinaggregat med felvecklat SOD1 (grönt) med inbundna antikroppar (vitt). Foto: Manuela Lehmann, Anna-Lena Bolender. Bilden till höger är en illustration som visualiserar hur fibrillstrukturer av SOD1-protein (grönt) som ansamlas och aggregerar i cellerna kan se ut i förstoring. Ostrukturerade proteinsekvenser som sticker ut ur fibrillens kärna kan binda antikroppar (vitt). Antikropparna kan bromsa spridning och amplifiering av skadliga proteinstrukturer i nya celler.



Förhoppningen är att vi ska kunna utveckla en optimerad antikropp och att studierna kan bidra till utveckling av fungerande immunterapi för patienter med SOD1-ALS.

GENTERAPI FÖR ATT BROMSA ELLER FÖRHINDRA SOD1-ALS

I dag pågår eller planeras studier av genterapibehandlingar för ALS som orsakas av genetiska förändringar i *SOD1*-, *FUS*- och *C9orf72*-genen. En strategi för att förhindra utveckling av SOD1-ALS, eller bromsa spridning av symtom, som redan är i klinisk prövning, är anti-sense oligos (ASOs), små stabiliserade RNA-molekyler som binder SOD1-mRNA-molekyler och begränsar nybildning av SOD1-protein. En sådan behandling skulle kunna bromsa utvecklingen av skadliga SOD1-strukturer men också stoppa redan existerande SOD1-prioner från att amplifieras och spridas. Ett eventuellt problem med en sådan strategi är att ASO-molekylerna inte kan skilja på muterat och normalt SOD1-RNA. Behandlingen förhindrar alltså även uttryck av normalt SOD1 från den friska genkopien. Studier i musmodeller där man slagit ut SOD1-genen har visat att möss kan leva och utvecklas normalt utan SOD1-protein. Åldrade möss utan SOD1-funktion utvecklar visserligen en partiell försvagning av neuromuskulära kopplingar, men de utvecklar inte ALS-liknande symtom. Människor verkar heller inte påverkas av en halverad SOD1-aktivitet men nya studier, där vi för första gången identifierat fall med total avsaknad av funktionellt SOD1-protein, har visat att förlust eller möjligen en kraftig nedsättning av SOD1-aktivitet kan vara betydligt allvarigare för människor. Barn som föds utan SOD1 utvecklar, redan som spädbarn, bland annat en kraftig muskelförtvinning med

tecken på skador på både hjärnans och ryggmärgens motoriska nervceller. En ny studie har visat att även hundar som föds utan SOD1-aktivitet får liknande symtom. De nya fynden väcker frågan om hur mycket man kan sänka produktionen av normalt SOD1 innan cellerna tar skada, och visar på att SOD1-aktivitet och nivåer av syreradikaler bör kontrolleras nog i försökspersonerna. Fas 1/2 ASO-studien har indikerat positiv effekt av den högsta dosen och försökspersonerna erbjuds en förlängd behandling av aktiv substans över 5 år för att undersöka eventuella bieffekter av långtidsbehandling. Även en fas 3 studie har påbörjats och Umeå kommer att vara svenskt studiecenter för en prövning av SOD1-ASO mot presymtomatisk familjär ALS i försökspersoner som är bärare av en SOD1-mutation men inte utvecklat symtom vid studistart.

ANTIKROPPAR MOT SJUKDOMSASSOCIERADE PROTEINSTRUKTURER

En annan strategi för att bromsa SOD1-ALS, som är under utveckling på flera fronter, är immunterapi mot sjukdomsframkallande SOD1-proteinaggregat. Antikroppar som selektivt binder till aggregatspecifika strukturer skulle kunna förhindra prion-liknande spridning och fortplantning av toxiska SOD1-aggregat. En sådan metod skulle inte påverka den normala SOD1-funktionen och dess viktiga nedbrytning av skadliga syreradikaler. ALS-forskargruppen i Umeå har utnyttjat sin kunskap om SOD1-aggregatens ytstruktur för att ta fram specifika monoklonala antikroppar. Antikropparna binder till olika domäner som finns exponerade i både ostrukturerat SOD1 och de sjukdomsframkallande SOD1-aggregaten, men inte i normalt SOD1.

IMMUNTERAPI SOM BEHANDLING AV ALS

Antikropparna har testats i immunterapiförsök på våra musmodeller, där vi kan inducera ALS-likande sjukdom genom att injicera SOD1-prioner i ryggmärgen. I ett första försök lät

vi antikroppar binda SOD1-prionerna innan vi injicerade dem i transgena möss som uttrycker human muterat SOD1-protein. Försöken visade att antikropparna bromsade spridning av SOD1-prioner i nervsystemet och ALS-liknande förlamningssymtom. I nästa försöksomgång behandlade vi olika grupper av de transgena mössen med veckovis injektioner av två olika SOD1-antikroppar. Försöken visade att båda antikropparna passerade blod-hjärnbarriären och uppnådde liknande koncentrationer i cerebrospinalvätskan. Båda antikropparna band till SOD1-aggregaten i in vitro-studier, men våra analyser på behandlade djur visade att bara den antikropp som riktade sig mot en domän i proteinets terminala ände kunde binda in till aggregaten inne i nervsystemet. Antikroppen som band till SOD1-aggregaten i ryggmärgen kunde bromsa prion-liknande spridning och sjukdomsutveckling i djurmodellerna. Den andra antikroppen, som binder till en sekvens i mitten av proteinet, kunde däremot inte påvisas binda till SOD1-aggregat i ryggmärgen i de behandlade djuren. Den antikroppen visade sig ha rakt motsatt effekt, och resulterade istället till att sjukdomsutvecklingen accelererades.

Våra studier visade också att antikroppar inte tar sig in i celler i någon större utsträckning, så det är främst extracellulära proteinaggregat, och spridningen från cell till cell, som kan nås med antikroppsbasead immunterapi. Försöken är så här långt lovande men vägen till patienter är lång. Vi har lärt oss mycket under studiens gång och nu vill vi testa fler lovande kandidater och modifiera våra befintliga antikroppar så att de kan bli ännu effektivare och kommunicera bättre med nervsystemets immunceller. Förhoppningen är att vi ska kunna utveckla en optimerad antikropp och att studierna kan bidra till utveckling av fungerande immunterapi för patienter med SOD1-ALS.

En första, fas 1/2 klinisk prövning av immunterapi med en antikropp, som utvecklats av ett läkemedelsbolag och riktar sig mot en annan domän av ostrukturerat SOD1, är planerad att startas upp under 2021. Studien ska även inkludera svenska ALS-patienter, både med och utan SOD1-mutation.



ULRIKA NORDSTRÖM

ALS forskning Umeå, Grupp Peter Andersen, Institutionen för klinisk vetenskap/Neurovetenskaper, Umeå universitet
ulrika.nordstrom@umu.se

REFERENSER:

Andersen PM, Al-Chalabi A. Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nat Rev Neurol* 2011;7:603-615.

Andersen PM, Nordström U, Tsiakas K, Johannsen J, Volk AE, Bierhals T, Zetterström P, Marklund SL, Hempel M, Santer R. Phenotype in an Infant with SOD1 Homozygous Truncating Mutation. *N Engl J Med* 2019 Aug 1;381(5):486-488.

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.

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.

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, Dec;136(6):939-953

Lehmann M, Marklund M, Bolender AL, Bidhendi EE, Zetterström P, Andersen PM, Brännström T, Marklund SL, Gilthorpe JD, Nordström U. Aggregate-selective antibody attenuates seeded aggregation but not spontaneously evolving disease in SOD1 ALS model mice. *Acta Neuropathol Commun* 2020 Sep 14;8(1):161.

Maier M, Welt T, Wirth F, Montrasio F, Preisig D, McAfoose J, Vieira FG, Kulic L, Späni C, Stehle T, Perrin S, Weber M, Hock C, Nitsch RM, Grimm J. A human-derived antibody targets misfolded SOD1 and ameliorates motor symptoms in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Transl Med* 2018 Dec 5;10(470):eaah3924

Miller T., Cudkowicz M., Andersen P.M. et. al., Phase 1–2 Trial of Antisense Oligonucleotide Tofersen for SOD1 ALS, *N Engl J Med* 2020; 383:109-119

Paré B, Lehmann M, Beaudin M, Nordström U, Saikali S, Julien JP, Gilthorpe JD, Marklund SL, Cashman NR, Andersen PM, Forsberg K, Dupré N, Gould P, Brännström T, Gros-Louis F. Misfolded SOD1 pathology in sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Sci Rep*. 2018 Sep 21;8(1):14223.

Prusiner SB. Cell Biology. A Unifying Role for Prions in Neurodegenerative Diseases. *Science* 2012; 336(6088):1511-1513. Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, et al. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 1996;13:43-47.

Rosen DR, Siddique T, Patterson D, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993;362:59-62.