

# Vägen till standardiserade **ALZHEIMERMARKÖRER**

Forskare vid Göteborgs universitet har utvecklat en referensmetod för standardiserade mätningar som kan diagnostisera Alzheimers sjukdom årtionden innan symtomen visar sig. Metoden kommer nu formellt användas som standard inom Alzheimer-diagnostiken världen över.

**Henrik Zetterberg**, professor i neurokemi, Sahlgrenska akademien vid Göteborgs universitet och University College London, beskriver här bakgrunden till metoden.

**Alzheimers sjukdom är vår vanligaste** demensorsakande sjukdom. Neuropatologiskt ser man extracellulära senila plack bestående av utfällningar av 42 aminosyror långt  $\beta$ -amyloid ( $A\beta_{42}$ ), intraneuronala neurofibriller (nystan) bestående av tau-proteininklusioner och nervcells förlust. Enligt den så kallade amyloidkaskadhypotesen, som stöds av både genetiska och biokemiska data (även om den inte är helt oomtvistad), är det  $A\beta_{42}$  som orsakar Alzheimers sjukdom.<sup>1</sup>

Alla människor bildar  $A\beta_{42}$  från ett större moderprotein kallat amyloid prekursorprotein (APP). Den normala funktionen av  $A\beta_{42}$  är osäker, men data från knockout-möss talar för att proteinet kan ha med trimning av synaptiska nätverk att göra. Inom neurofysiologin talar man om synaptisk homeostas. Synapser måste omsättas, både nybildas och tas bort;  $A\beta_{42}$  skulle kunna ha en fysiologisk roll vid reglerad synapsborttagning.

## SENILA PLACK BESTÅR AV $A\beta_{42}$

$A\beta_{42}$ -proteinet är klabbigt och självhäftande. Vissa forskare liknar  $A\beta_{42}$  vid ett prionprotein, som i oturliga fall kan felveckas och därefter katalysera sin egen felveckning. Detta förstärker i sin tur självhäftningsprocessen så att proteinet bildar oligomerer och till slut fibriller, som utgör huvuddelen av de senila placken. Varför detta sker hos vissa människor men inte hos andra är oklart. Vid familjär Alzheimers sjukdom, som utgör mindre än en promille av alla fall, finns mutationer i APP-genen eller i generna för de enzymer som klyver ut  $A\beta_{42}$  från APP; dessa mutationer har som gemensam

nämnare att de ökar  $A\beta_{42}$ -ansamlingarna i hjärnan. En del data talar för att människor som utvecklar den vanliga, sporadiska formen av Alzheimers sjukdom har en lätt nedsatt clearance av proteinet från hjärnan ut i likvor och blod, vilket kan initiera en amyloidkaskad på ett koncentrationsberoende sätt.

$A\beta_{42}$  börjar ansamlas i hjärnan i form av senila plack 10-30 år innan de första symtomen på sjukdom uppkommer. Detta är intressant ur en patogenetisk synvinkel. Placken verkar vara atoxiska under många år men till slut initieras en toxisk fas då nervceller börjar skadas. Troligen sammanfaller detta med att placken börjar läcka särskilt giftiga former av  $A\beta_{42}$ .

## VIKTIG BIOMARKÖR FÖR ALZHEIMERS SJUKDOM

Det var i mitten av 1980-talet som två forskare, George Glenner och Colin Masters, oberoende av varandra, lyckades visa att senila plack vid Alzheimers sjukdom består av  $\beta$ -amyloid. George Glenner är död, men Colin Masters är fortfarande en aktiv forskare i Melbourne och en het nobelpriskandidat om  $\beta$ -amyloid-angripande läkemedelskandidater till slut visar sig vara effektiva mot Alzheimers sjukdom. Så snart Glenner och Masters hade publicerat sina fynd började forskare att utveckla metoder att mäta  $\beta$ -amyloid. Det finns flera kortare vattenlösliga former av  $\beta$ -amyloid och de första testerna, som mätte "totalt"  $\beta$ -amyloid i likvor, kunde inte visa på någon tydlig skillnad mellan Alzheimer-patienter och kontroller. Först när specifika metoder för att mäta 42 aminosyror långt

“Placken verkar vara  
atoxiska under många  
år men till slut initieras  
en toxisk fas då nerv-  
celler börjar skadas.”





$\beta$ -amyloid utvecklades uppdagades att detta faktiskt var en lovande biomarkör. Patienter med senila plack i hjärnan har lägre koncentrationer av  $A\beta_{42}$  i lumballikvor. Förklaringen till detta är att det  $A\beta_{42}$  som ständigt bildas i den normala nervcellsmetabolismen fastnar i hjärnan, utan att komma ut i likvor.

Likvorkoncentrationen av  $A\beta_{42}$  kan avgöra om en människa har plackpatologi eller inte med en diagnostisk träffsäkerhet på >90 procent, vilket har verifierats i ett stort antal studier. Om man kombinerar mätning av  $A\beta_{42}$  med koncentrationsbestämning av total-tau (en axonskademarkör) och fosfo-tau (en neurofibrillmarkör) i likvor kan man få information, inte bara om patienten har plackpatologi, utan även om denna patologi har börjat skada hjärnan.

Det finns i dagsläget ett tiotal kommersiellt tillgängliga metoder för att mäta likvorkoncentrationen av  $A\beta_{42}$ . Dessa metoder är inte standardiserade mot varandra och ger olika absolutkoncentrationer, även om den relativa skillnaden mellan Alzheimer-patienter och kontroller är mycket reproducerbar.

**“Likvorkoncentrationen av  $A\beta_{42}$  kan avgöra om en människa har plackpatologi eller inte med en diagnostisk träffsäkerhet på >90 procent, vilket har verifierats i ett stort antal studier.”**

#### OLIKA MÄTMETODER – SAMMA RESULTAT

För att komma runt problemet med varierande koncentrationer med olika metoder (ett problem som omöjliggör användandet av globalt giltiga referensgränser) har vi initierat ett standardiseringsarbete inom International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC). Detta arbete består av två delar: dels att utveckla en referensmetod för  $A\beta_{42}$ ,<sup>2</sup> dels att utveckla ett referensmaterial, som kan användas för att kalibrera de olika  $A\beta_{42}$ -metoderna.<sup>3</sup> Referensmetoden, som vi har utvecklat, bygger på masspektrometrisk bestämning av totalkoncentrationen av  $A\beta_{42}$  i likvor, efter denaturering och mobilisering av allt  $A\beta_{42}$  i provet så att det kan mätas i masspektrometern. Metoden mäter  $A\beta_{42}$  i relation till en ren lösning av  $A\beta_{42}$ , koncentrationsbestämd genom aminosyraanalys.

Metoden publicerades 2014 i *Clinical Chemistry*<sup>4</sup> och har nu granskats och formellt certifierats av Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM) som en officiell referensmetod (metodnummer C11RMP9). Detta innebär att vi nu har verktyget att koncentrationsbestämma ett referensmaterial bestående av ett stort antal alikvoter av lik-

vorpooler med låg, mellan och hög koncentration av  $A\beta_{42}$ , som har tagits fram i samarbete med Institute of Reference Materials and Measurements (IRMM) i Belgien. Referensmaterialet kommer att certifieras och göras tillgängligt för det globala Alzheimer-fältet under 2017 och därefter kommer de olika mätmetoderna att kunna standardiseras gentemot varandra, så att man får samma resultat i Alzheimer-utredningar och kliniska provningar oavsett om patienten undersöks i Göteborg, New York, Tokyo eller Hongkong. Arbetet kan jämföras med andra standardiseringsprojekt, t.ex. den historiska arkivmetern i Paris; för att mätningar av en viss storhet skall ge samma resultat måste de metoder som används vara kalibrerade mot varandra.

#### SÄKRARE DIAGNOSTIK TIDIGT I FÖRLOPPET

Varför är då detta så viktigt? Alzheimers sjukdom är en svår neurodegenerativ sjukdom. Risken att drabbas ökar med åldern, troligen beroende på att den äldre hjärnan är mindre effektiv på att göra sig av med det  $A\beta_{42}$  som normalt bildas. Ett stort antal läkemedelskandidater som är riktade mot  $A\beta_{42}$  är för närvarande under prövning i fas III-studier. Det mesta talar för att dessa läkemedel kommer att vara som mest effektiva om behandling sätts in innan man är dement på grund av Alzheimers sjukdom, d.v.s. under fasen när plackpatologin ännu inte har skadat hjärnan för mycket. Denna fas kan upptäckas genom koncentrationsbestämning av  $A\beta_{42}$  i likvor. I och med certifieringen av en referensmetod för detta ändamål, är vi ett stort steg närmare att kunna diagnostisera plackpatologi vid Alzheimers sjukdom på ett säkrare sätt över hela världen. Vi är därmed bättre förberedda inför ankomsten av nya läkemedel mot denna vanliga sjukdom.



**HENRIK ZETTERBERG**

Professor i neurokemi, Sahlgrenska akademien vid Göteborgs universitet och University College London, och överläkare i klinisk kemi vid Sahlgrenska Universitetssjukhuset  
henrik.zetterberg@clinchem.gu.se

#### REFERENSER:

- Hardy J, Bogdanovic N, Winblad B, Portelius E, Andreassen N, Cedazo-Minguez A, Zetterberg H. Pathways to Alzheimer's disease. *J Intern Med* 2014; 275(3):296-303.
- Mattsson N, Zegers I, Andreasson U, Bjerke M, Blankenstein MA, Bowser R, Carrillo MC, Gobom J, Heath T, Jenkins R, Jeromin A, Kaplow J, Kidd D, Laterza OF, Lockhart A, Lunn MP, Martone RL, Mills K, Pannee J, Ratcliffe M, Shaw LM, Simon AJ, Soares H, Teunissen CE, Verbeek MM, Umek RM, Vanderstichele H, Zetterberg H, Blennow K, Portelius E. Reference measurement procedures for Alzheimer's disease cerebrospinal fluid biomarkers: definitions and approaches with focus on amyloid  $\beta_{42}$ . *Biomark Med* 2012; 6(4):409-17.
- Mattsson N, Zetterberg H. What is a certified reference material? *Biomark Med* 2012; 6(4):369-70.
- Leinenbach A, Pannee J, Düllfer T, Huber A, Bittner T, Andreasson U, Gobom J, Zetterberg H, Kobold U, Portelius E, Blennow K; IFCC Scientific Division Working Group on CSF proteins. Mass spectrometry-based candidate reference measurement procedure for quantification of amyloid- $\beta$  in cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 2014; 60(7):987-94.