




# Neurofilament light

## – en markör för nervcellsskada

I ett VINNOVA-finansierat samarbetsprojekt mellan Göteborgs universitet, Sahlgrenska akademien och UmanDiagnostics har forskare tagit fram en högkänslig metod för att mäta proteinet neurofilament light (NFL) i blodprover. **Henrik Zetterberg**, professor i neurokemi, Göteborgs universitet och University College London, samt klinisk kemist vid Sahlgrenska Universitetssjukhuset, beskriver här bakgrunden till metoden.

**Neurofilament är strukturella** intermediärfilament i grovkalibriga nervcellskott. Dessa filament är uppbyggda av tre subenheter som brukar kallas light (NFL), medium (NFM) och heavy (NFH), beroende på hur de vandrar vid polyakrylamidgelelektrofores. När grovkalibriga axoner går sönder, oberoende av genes, läcker neurofilament ut i hjärnans interstitiella vätska och kommer ut i cerebrospinalvätskan (CSV) och i blodet. Vi har i många år haft välbeprövade metoder för att mäta NFL i CSV, ett metodarbete som inleddes av doktor Jan-Erik Karlsson och Professor Lars Rosengren vid Sahlgrenska Universitetssjukhuset på slutet av

1980-talet och utmynnade i en första enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 1996.<sup>1</sup> Den metod Rosengren och Karlsson hade utvecklat byggde på polyklonala antikroppar mot NFL från kyckling och kanin. Rosengren och medarbetare lyckades med tiden göra den mycket känslig, så att NFL-koncentrationen i CSV även från friska människor kunde uppmätas. Niklas Norgren och Torgny Stigbrand i Umeå lyckades tillsammans med Rosengren och Karlsson sedermera ta fram monoklonala anti-NFL-antikroppar,<sup>2</sup> som tillsammans gav en ännu känsligare metod med en nedre detektionsgräns på 50–60 ng/L och, kanske viktigast av allt, en



*”När grovkalibriga axoner går sönder, oberoende av genes, läcker neurofilament ut i hjärnans interstitiella vätska och kommer ut i cerebrospinalvätskan (CSV) och i blodet.”*

## *nu möjlig att mäta i blod*

obegränsad tillgång på antikropp.<sup>3</sup> Med dessa metoder har en rad viktiga studier genomförts. Pionjärbetet leddes från Sverige, men huvudresultaten har verifierats av forskargrupper från hela världen.

### **CSV-NFL INDIKERAR NERVCELLSKADA**

Resultaten visar att CSV-NFL-koncentrationen är förhöjd vid en rad neurodegenerativa sjukdomar, såsom amyotrofisk lateral skleros, frontallobsdemens, atypiska parkinsonsjukdomar, subkortikal vaskulär demens och Alzheimers sjukdom.<sup>4</sup> Graden av ökning korrelerar med sjukdomsintensitet, både mätt som klinisk progression och tid till död. CSV-NFL ökar vidare vid skov av multipel skleros och normaliseras vid lyckosam behandling.<sup>5</sup> CSV-NFL ökar även vid en rad akuta neurologiska tillstånd, såsom stroke,<sup>6</sup> anoxisk hjärnskada,<sup>7</sup> traumatisk hjärnskada<sup>8</sup> och hjärnskakning.<sup>9</sup> Även här korrelerar graden av ökning med kliniskt utfall; hög CSV-NFL-koncentration talar för allvarlig skada och ökad risk för dåligt utfall. Vid akuta tillstånd ökar NFL under de närmaste da-

garna och når ett maximum ca 7–10 dagar efter skadan, för att normaliseras under de kommande sex månaderna, om inte ytterligare skador tillkommer eller den sjukliga processen kvarstår. Sammantaget talar ett stort antal studier för att CSV-NFL är en känslig och användbar markör för att påvisa nervcellsskada, särskilt i hjärnsubstans rik på grovkalibriga nervcellskott, och att detta kan vara användbart i läkemedelsstudier som ett objektiva mått på om läkemedelskandidaten verkligen bromsar upp den nervcellsskadande processen.

### **BLODMARKÖRER FÖR HJÄRNSKADA?**

Stora forskningsresurser har lagts ner på försök att utveckla pålitliga blodmarkörer för CNS-skada, men med magert resultat. Serum S-100B kan enligt vissa studier användas som ett screeningtest hos patienter med misstänkt hjärnskakning för att selektera de patienter som behöver göra en CT hjärna inför eventuell neurokirurgisk konsultation, men testet är inte tillräckligt känsligt eller specifikt för att påvisa axonskada vid

hjärnskakning (den skada som troligen är viktigast för att orsaka postkommotionella besvär, som ibland kan bli långvariga och handikappande, och som även kan ge upphov till kronisk traumatisk encefalopati vid upprepade hjärnskakningar innan hjärnan läkt färdigt). Vidare saknas känsliga tester för att påvisa nervcellskada vid neurodegenerativa eller neuroinflammatoriska tillstånd.

### EN NY MÄTMETOD

Vi har tillsammans med Niklas Norgren vid UmanDiagnostics nu tagit fram en metod att kvantifiera NFL i blod. Metoden bygger på samma antikroppar och standardprotein som i CSV-testet som UmanDiagnostics tillverkar, men har överförs till ett nytt instrument, framtaget av en forskargrupp i Boston, kring vilken ett bolag har bildats: Quanterix.<sup>10</sup> Quanterix tillverkar ett Single molecule array (Simoa)-instrument, vars analysprincip bygger på klassisk sandwich ELISA-teknik, där mål-molekylen, som man vill mäta, fångas i en sandwich mellan en "capture"- och en detektionsantikropp, som är märkt på ett kvantifierbart sätt. I Simoa-tekniken är capture-antikroppen konjugerad till magnetiska kulor (1000-tals antikroppar per kula). Antikropps-konjugerade magnetiska kulor inkuberas med provet tillsammans med  $\beta$ -galaktosidaslänkade detektionsantikroppar. Ospecifik bindning tvättas bort, varefter kulorna dras ner i mikrobrunnar (tillverkade med CD-teknik av Sony) med hjälp av en magnet. En mikrobrunn håller en volym på ca 50 femtoliter och endast en kula per brunn får plats. Substratet för  $\beta$ -galaktosidas tillsätts, varefter mikrobrunnarna sluts med hjälp av en oljefilm. Gridden (ser ut lite som ett kinesiskt schackbräde) av mikrobrunnar kan sedan fotograferas (för att säkerställa att endast mikrobrunnar som har kulor i sig räknas), varefter fluorescensen mäts med en CCD-kamera. Lysande brunnar innehåller antigen och, om man har spätt ner lösningen till en sådan antigenkoncentration att exempelvis 1 av 10 brunnar lyser, vet man att en sådan brunn innehåller endast ett antigen. Kompartimentaliseringen av detektionsreaktionen, så enkel och genial, möjliggör således kvantifiering på en-molekylsnivå!

### VI KAN NU MÄTA NFL I BLOD

Överföringen av UmanDiagnostics CSV-NFL-metod till Simoa-instrumentet har resulterat i en metod med en analytisk känslighet under 1 ng/L. Vi kan uppmäta koncentrationen av NFL i serum och plasma, även på friska individer, och har hittills kunnat visa att serum-NFL korrelerar med CSV-NFL med en korrelationskoefficient på 0,88,<sup>11</sup> att serum-NFL är förhöjt vid hivrelaterad encefalopati<sup>11</sup> och vid traumatisk hjärnskada<sup>12</sup>, samt hos amerikansk fotbollsspelare efter en intensiv tävlingssäsong.<sup>13</sup> Vi undersöker för närvarande hjärnskakning vid ishockey samt patienter med neurodegenerativa sjukdomar och multipel skleros. Förhoppningen är att detta skall bli det första kliniskt användbara testet för nervcellskada vid neurodegenerativa och neuroinflammatoriska sjukdomar, samt hjärnskakning.

### REFERENSER:

1. Rosengren LE, Karlsson JE, Karlsson JO, Persson LI, Wikkelso C. Patients with amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases have increased levels of neurofilament protein in CSF. *J Neurochem* 1996 Nov; 67(5):2013-8.
2. Norgren N, Karlsson JE, Rosengren L, Stigbrand T. Monoclonal antibodies selective for low molecular weight neurofilaments. *Hybrid Hybridomics* 2002 Feb; 21(1):53-9.
3. Norgren N, Rosengren L, Stigbrand T. Elevated neurofilament levels in neurological diseases. *Brain Res* 2003 Oct 10; 987(1):25-31.
4. Skillbäck T, Farahmand B, Bartlett JW, Rosén C, Mattsson N, Nägga K, Kilander L, Religa D, Wimo A, Winblad B, Rosengren L, Schott JM, Blennow K, Eriksdotter M, Zetterberg H. CSF neurofilament light differs in neurodegenerative diseases and predicts severity and survival. *Neurology* 2014 Nov 18; 83(21):1945-53.
5. Gunnarsson M, Malmström C, Axelsson M, Sundström P, Dahle C, Vrethem M, Olsson T, Piehl F, Norgren N, Rosengren L, Svenningsson A, Lycke J. Axonal damage in relapsing multiple sclerosis is markedly reduced by natalizumab. *Ann Neurol* 2011 Jan; 69(1):83-9.
6. Hjalmarsson C, Bjerke M, Andersson B, Blennow K, Zetterberg H, Aberg ND, Olsson B, Eckerström C, Bokemark L, Wallin A. Neuronal and glia-related biomarkers in cerebrospinal fluid of patients with acute ischemic stroke. *J Cent Nerv Syst Dis* 2014 May 19; 6:51-8.
7. Rosén C, Rosén H, Andreasson U, Bremell D, Bremner R, Hagberg L, Rosengren L, Blennow K, Zetterberg H. Cerebrospinal fluid biomarkers in cardiac arrest survivors. *Resuscitation* 2014 Feb; 85(2):227-32.
8. Van Geel WJ, Rosengren LE, Verbeek MM. An enzyme immunoassay to quantify neurofilament light chain in cerebrospinal fluid. *J Immunol Methods* 2005 Jan; 296(1-2):179-85.
9. Zetterberg H, Hietala MA, Jonsson M, Andreasen N, Styrdud E, Karlsson I, Edman A, Popa C, Rasulzada A, Wahlund LO, Mehta PD, Rosengren L, Blennow K, Wallin A. Neurochemical aftermath of amateur boxing. *Arch Neurol* 2006 Sep; 63(9):1277-80.
10. Rissin DM, Kan CW, Campbell TG, Howes SC, Fournier DR, Song L, Piech T, Patel PP, Chang L, Rivnak AJ, Ferrell EP, Randall JD, Provuncher GK, Walt DR, Duffy DC. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nat Biotechnol* 2010 Jun; 28(6):595-9.
11. Gisslén M, Price RW, Andreasson U, Norgren N, Nilsson S, Hagberg L, Fuchs D, Spudich S, Blennow K, Zetterberg H. Plasma concentration of the neurofilament light protein (NFL) is a biomarker of CNS injury in HIV infection: a cross-sectional study. *EBioMed* 2015, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.11.036>.
12. Shahim P. Blood biomarkers for traumatic brain injury. Thesis, University of Gothenburg, 2015, <http://hdl.handle.net/2077/39572>.
13. Oliver J, Jones M, Kirk M, Gable D, Repshas J, Johnson T, Andreasson U, Norgren N, Blennow K, Zetterberg H. Serum neurofilament light in American football athletes over the course of a season. *J Neurotrauma* 2015 Dec 23. [Epub ahead of print].



### 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](mailto:henrik.zetterberg@clinchem.gu.se)