

Kan beta-amyloids aggregeringsprocess manipuleras?

Alzheimers sjukdom karaktäriseras av nervcellsdöd i hjärnan och förekomsten av extracellulära amyloida plack som till största delen utgörs av aggregerade amyloid β -peptider ($A\beta$). I en ny studie har man funnit att molekylen p-FTAA kan förhindra formation av cytotoxiska $A\beta$ -former. Studien presenteras här av **Ann-Christin Brorsson**, docent i molekylär bioteknik, Linköpings universitet.

Det första symtomet i sjukdomsbilden vid Alzheimers sjukdom är problem med närminnet, men allteftersom sjukdomen fortskrider förlorar personen sin förmåga att utföra även de enklaste vardagssysslor, som att sköta sin hygien, laga mat med mera. En allmän hypotes är att de mindre lösliga aggregaten av $A\beta$, så kallade oligomerer, är giftiga och orsakar nervcellsdegenerering och att större och olösliga amyloida plack, som bildas i slutet av $A\beta$ s aggregeringsprocess, inte har någon giftverkan.^{1,2} Därför skulle en minskad nivå av $A\beta$ -oligomerer, med hjälp av molekyler som kan störa aggregeringsprocessen, kunna vara ett sätt att förhindra $A\beta$ s giftverkan på nervceller.

Flera forskningsresultat på en särskild grupp av självlysande konjugerade molekyler, så kallade luminescent conjugated oligothiophenes (LCOs), har vi-

sat att dessa molekyler kan binda till proteinaggregat och ge spektrala egenskaper som skiljer sig mellan olika morfologier på aggregaten.^{3,4} Av alla LCOs är p-FTAA (penta-formylthiophene acetic acid) den mest karaktäriserade molekylen, som även visat sig ha en förmåga att binda till de mindre oligomera aggregaten av $A\beta$.⁵ Denna egenskap hos p-FTAA väckte vårt intresse att undersöka om molekylen kunde förändra $A\beta$ s toxicitet. I en studie fann vi att p-FTAA motverkar ackumulering av toxiska $A\beta$ -oligomerer till förmån för bildandet av större och ofgiftiga amyloida former, vilket visar att p-FTAA har egenskaper som skulle kunna användas för terapeutiska ändamål.

P-FTAA MINSKAR TOXICITETEN AV $A\beta$

För att undersöka om p-FTAA kunde påverka $A\beta$ s giftverkan exponerades

celler för olika aggregerade former av $A\beta$ med och utan tillsats av p-FTAA. Försöket visade att de $A\beta$ -aggregat som bildas tidigt i aggregeringsprocessen har störst giftverkan på cellerna och att gifteffekten avtar för de aggregat som bildas senare i aggregeringsprocessen. I närvaro av p-FTAA ökade överlevnadsgraden för cellerna markant och utseendet på cellerna återgick från att vara kraftigt deformerade till det normala, vilket visade att p-FTAA kan förhindra $A\beta$ -toxicitet.

P-FTAA PÅSKYNDAR FORMATION AV OLÖSLIGA $A\beta$ -AGGREGAT

Cellförsöken gav oss information om att små $A\beta$ -oligomerer har störst giftverkan och att p-FTAA har en räddande effekt, men på vilket sätt kunde p-FTAA skydda cellerna mot giftiga $A\beta$ -aggregat? För att nysta i frågan gjorde



“Därför skulle en minskad nivå av A β -oligomerer, med hjälp av molekyler som kan störa aggregeringsprocessen, kunna vara ett sätt att förhindra A β s giftverkan på nervceller.”

vi ett försök där vi analyserade halten lösliga och olösliga A β -aggregat vid olika tidpunkter under aggregeringsprocessen av A β med och utan p-FTAA. Resultatet visade att p-FTAA förskjuter jämvikten mellan lösliga och olösliga A β -aggregat, till förmån för formation av olösliga A β -former. Försöket visade därmed att p-FTAA reducerar A β s giftverkan genom att minska populationen av lösliga A β -former som är toxiska och främja formation av olösliga A β -former som inte har någon giftverkan.

P-FTAA UNDERLÄTTAR FORMATION AV AMYLOIDA A β -FORMER

För att ytterligare undersöka effekten av p-FTAA på A β s aggregeringsprocess använde vi en antikropp som specifikt kan detektera amyloida proteinaggregat. I detta försök kunde vi se att när A β aggregerade tillsammans med p-FTAA

bildades amyloida aggregat betydligt tidigare i aggregeringsprocessen jämfört med då A β aggregerade utan p-FTAA. För att kontrollera aggregatens amyloida egenskaper analyserades dessa ytterligare med en spektroskopisk metod, så kallad cirkulär dikroism, vilket bekräftade att aggregaten hade en amyloid karaktär.

P-FTAA ÖKAR STABILITETEN OCH REDUCERAR HYDROFOBICITETEN HOS A β -AGGREGAT

Vår studie hade nu visat att p-FTAA påskyndar formation av olösliga A β -aggregat som inte är giftiga för cellen och som har en amyloid karaktär. I vårt nästa försök ville vi undersöka om specifika egenskaper kunde skilja sig mellan amyloida A β -aggregat som bildats med eller utan p-FTAA. Vi fann att amyloida aggregat som bildats i närvaro

av p-FTAA både hade en högre stabilitet och var mindre hydrofoba jämfört med amyloida A β -aggregat som bildats i frånvaro av p-FTAA. Detta resultat visade att p-FTAA kan förhindra att A β -oligomerer, med en potentiell giftverkan, lossnar från större amyloida aggregat samt att p-FTAA minskar exponeringen av hydrofoba ytor på aggregerade A β -strukturer, vilket skulle kunna reducera deras giftverkan då dessa aggregat blir mindre benägna att binda till hydrofoba cellytor. Vi testade även kapaciteten hos amyloida aggregat, med och utan p-FTAA, att fungera som ett startmaterial till bildning av nya A β -aggregat och fann att p-FTAA kan reducera denna egenskap hos A β -aggregat, vilket därmed indikerar att p-FTAA även skulle kunna motverka spridning av A β i hjärnan.

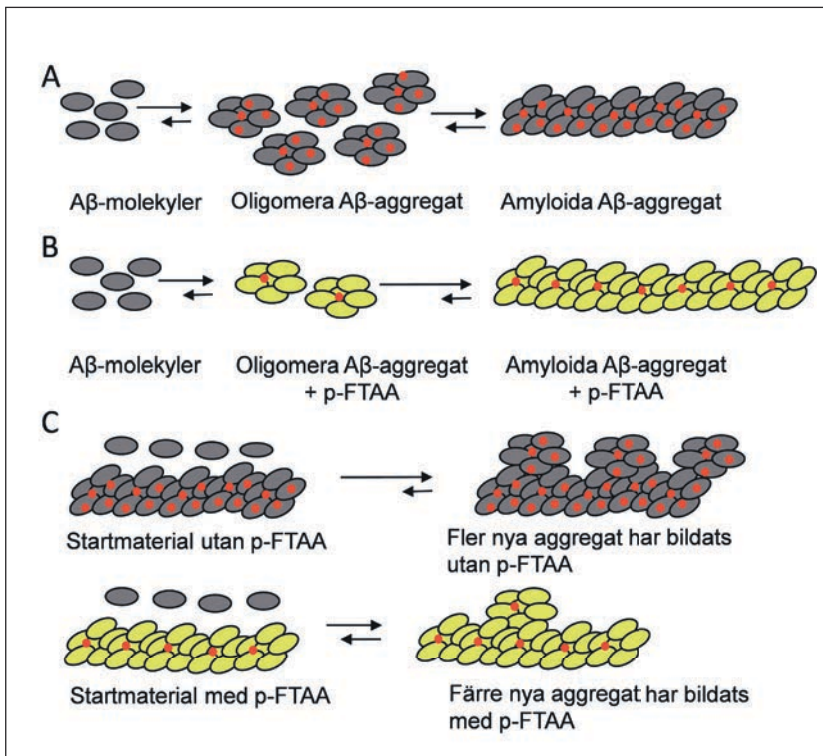


Bild 1. A) Aggregeringsprocessen av Aβ initieras av att enskilda Aβ molekyler klibbar fast vid varandra och bildar oligomera Aβ-aggregat med cytotoxiska egenskaper som minskar i takt med att större Aβ-aggregat bildas. I slutet på aggregeringsprocessen bildas inerta amyloida aggregat. B) p-FTAA binder till de oligomera Aβ-aggregaten (visualiserat i gult) och påskyndar formation av amyloida aggregat vilket leder till att populationen av giftiga Aβ-oligomera reduceras till förmån för bildning av större inerta Aβ-aggregat. p-FTAA både ökar stabiliteten och reducerar exponeringsgraden av hydrofoba ytor på aggregerade Aβ-strukturer (visualiserat i rött). C) p-FTAA reducerar kapaciteten hos amyloida Aβ-aggregat att fungera som startmaterial för formation av nya Aβ-aggregat.

“Cellförsöken gav oss information om att små Aβ-oligomera har störst giftverkan och att p-FTAA har en räddande effekt, men på vilket sätt kunde p-FTAA skydda cellerna mot giftiga Aβ-aggregat?”

HUR KAN VÅRA RESULTAT ANVÄNDAS I JAKTEN PÅ ETT LÄKEMEDEL MOT ALZHEIMERS SJUKDOM?

I bild 1 illustreras en sammanfattning av resultaten från vår studie som visar att p-FTAA kan påverka Aβs aggregeringsprocess och förhindra cytotoxicitet genom att minska halten av oligomera Aβ-former till förmån för bildning av amyloida Aβ-aggregat. Dessa aggregat har en högre stabilitet och en lägre exponeringsgrad av hydrofoba ytor samt

en försämrad förmåga att generera nya Aβ-aggregat jämfört med Aβ-aggregat som bildas utan p-FTAA. Användningen av terapeutiska medel för Alzheimers sjukdom som främjar Aβ-aggregering mot en olöslig amyloid struktur är kontroversiell eftersom utsträckningen, i vilken Aβ-plackbelastning påverkar nervcellsdegenerering och synaptisk förlust i hjärnan, inte har fastställts. Det har föreslagits att perifert lokaliserat Aβ-plack är ansvarigt för axondystrofi

och synaptisk degenerering⁶ och att det perifera området av plack står i jämvikt med lösliga oligomera Aβ-former som skulle kunna vara involverade i sjukdomsförloppet². Dessutom kan oligomera Aβ-former bildas via sekundär nukleering vilket kräver en yta av amyloida aggregat.⁷ Däremot kan friska individer med en tung belastning av plack fortfarande ha normala kognitiva funktioner, vilket visar att plack också kan vara helt inert med avseende på nervcellsdegenerering och synaptisk förlust.⁸ En molekyl som accelererar Aβs aggregeringsprocess kan vara av terapeutisk nytta eftersom den kan binda in lösliga toxiska Aβ-oligomera till inerta aggregat och främja formationen av amyloida plack. Detta skulle medföra att populationen av giftiga Aβ-former reduceras till förmån för formation av större inerta aggregat. Vår studie visar att p-FTAA inducerar en stabilitet i konformationen hos amyloida Aβ-aggregat, vilket hypotetiskt skulle kunna påverka balansen mellan olika Aβ-former mot amyloida plack och därmed motverka att hjärnans nervceller utsätts för giftiga Aβ-former. Aβs aggregeringsprocess skulle även kunna manipuleras så att aggregeringsvägen helt blockeras för att undvika formation av giftiga Aβ-aggregat. Vi har funnit att proteinet lysozym innehar denna egenskap och våra studier på detta system visar att lysozym kan binda till enskilda Aβ-molekyler och helt stoppa fortsatt aggregering till förmån för bildning av giftfria komplex mellan lysozym och Aβ. Lysozym kan förhindra giftverkan hos Aβ både i cellsystem och i bananflugor.^{9,10} Forskningen kring Alzheimers sjukdom är en ständig kamp mot tiden för att hitta det ultimata botemedlet som kan förhindra att fler människor drabbas och det återstår att se vad som blir lösningen på denna utmaning.



ANN-CHRISTIN BRORSSON
Docent i molekylär bioteknik,
Linköpings universitet
anki@ifm.liu.se

REFERENSER

1. Tomic JL, Pensalfini A, Head E and Glabe CG. Soluble fibrillar oligomer levels are elevated in Alzheimer's disease brain and correlate with cognitive dysfunction. *Neurobiol Dis* 2009; 35:352-358.
2. Cheng IH, Scearce-Levie K, Legleiter J, Palop JJ, Gerstein H, Bien-Ly N, Puolivali J, Lesne S, Ashe KH, Muchowski PJ and Mucke L. Accelerating amyloid-beta fibrilization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. *J Biol Chem* 2007; 282:23818-23828.
3. Klingstedt T, Aslund A, Simon RA, Johansson LB, Mason JJ, Nystrom S, Hammarstrom P and Nilsson KP. Synthesis of a library of oligothiophenes and their utilization as fluorescent ligands for spectral assignment of protein aggregates. *Org Biomol Chem* 2011; 9:8356-8370.
4. Klingstedt T and Nilsson KP. Conjugated polymers for enhanced bioimaging. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1810:286-296.
5. Hammarstrom P, Simon R, Nystrom S, Konradsson P, Aslund A and Nilsson KP. A fluorescent pentameric thiophene derivative detects in vitro-formed prefibrillar protein aggregates. *Biochemistry* 2010; 49:6838-6845.
6. Koffie RM, Meyer-Luehmann M, Hashimoto T, Adams KW, Mielke ML, Garcia-Alloza M, Micheva KD, Smith SJ, Kim ML, Lee VM, Hyman BT and Spires-Jones TL. Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:4012-4017.
7. Cohen SI, Linse S, Luheshi LM, Hellstrand E, White DA, Rajah L, Otzen DE, Vendruscolo M, Dobson CM and Knowles TP. Proliferation of amyloid-beta42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:9758-9763.
8. Aizenstein HJ, Nebes RD, Saxton JA, Price JC, Mathis CA, Tsopelas ND, Ziolkowski SK, James JA, Snitz BE, Houck PR, Bi W, Cohen AD, Lopresti BJ, DeKosky ST, Halligan EM and Klunk WE. Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Arch Neurol* 2008; 65:1509-1517.
9. Helmfors L, Boman A, Civitelli L, Nath S, Sandin L, Janefjord C, McCann H, Zetterberg H, Blennow K, Halliday G, Brorsson AC and Kägedal K. Protective properties of lysozyme on β -amyloid pathology: implications for Alzheimer disease. *Neurobiol Dis* 2016; 83:122-133.
10. Sandin L, Bergkvist L, Nath S, Kielkopf C, Janefjord C, Helmfors L, Zetterberg H, Blennow K, Li H, Nilsberth C, Garner B, Brorsson AC and Kägedal K. Beneficial effects of increased lysozyme levels in Alzheimer's disease modelled in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Journal* 2016, in press.

XADAGO
(safinamid)

Ny tilläggsterapi till en stabil dos av levodopa (L-dopa) hos vuxna patienter i mellan till sent stadium av idiopatisk Parkinsons sjukdom med symtomfluktuationer

- Verkar genom både dopaminerga och icke-dopaminerga verkningsmekanismer
- Ökar on-tiden utan besvärande dyskinesier
- Stabiliserar de motoriska symtomen i upp till 2 år

Referens: Xadago SPC 2016/01.

Xadago (safinamid) 50 & 100 mg filmdragerade tabletter, monoaminoxidas-B-hämmare. RX, (F) Subventioneras endast som tilläggsbehandling till levodopa hos patienter med "On-Off"-syndrom trots optimal behandling med levodopa.

▼ Detta läkemedel är föremål för utökad övervakning.

Indikation: Xadago är indicerat för behandling av vuxna patienter med idiopatisk Parkinsons sjukdom som tilläggsterapi till en stabil dos av levodopa (L-dopa) enbart eller i kombination med andra läkemedel mot Parkinsons sjukdom hos patienter i mellan till sent stadium med symtomfluktuationer. Varning & försiktighet: Vänligen läs produktresumén innan förskrivning. Samtidig användning med SSRI och MAO-hämmare, nedsatt leverfunktion, nathinneförsvining, impuls-kontrollstörningar och dopaminerga biverkningar. Har ingen eller försumbar effekt på förmågan att framföra fordon eller använda maskiner. Kontakt: Nigaard Pharma AS, Medicin Village, 223 81 Lund, contact@zambongroup.com Baserad på produktresumé: 2016/05. Se www.fass.se för mer information.

Zambon