

Nya fynd om hur ALS sprids i CNS

Amyotrofisk lateralskleros (ALS) är en neurodegenerativ sklerotisk nervsjukdom som leder till att motoriska nervceller i hjärna och ryggmärg gradvis förtvinar. I Sverige är det drygt 200 personer som får diagnosen varje år. Nya fynd indikerar att sjukdomen sprids från cell till cell, vilket beskrivs i denna artikel av professor **Thomas Brännström**, Institutionen för medicinsk biovetenskap, Umeå universitet.

Likt många medicinska syndrom med ärftligt inslag har amyotrofisk lateralskleros kunnat knytas till mutationer i allt fler gener under senare år (tabell 1). Först upptäckta var mutationer i genen för enzymet koppar-zink superoxid-dismutas (SOD1) där kopplingen till ALS upptäcktes 1993. Många av de i tabellen uppräknade muterade generna påver-

kar proteinnedbrytning eller RNA-hantering. SOD1 är inte bara det först upptäckta proteinet där mutationer ger upphov till ALS, utan upptar även en särställning då det finns nästan 200 kända olika mutationer i genen som med olika styrka kan kopplas till sjukdomen. Det är osäkert om det finns proteinvarianter av SOD1 som ej kan kopplas till ALS. Dessa

mutationer i SOD1 kan ge sjukdomsförlopp med stor skillnad i normalförlopp. En variant, mutationen D90A, ger i flertalet patienter i Norden upphov till sjukdom med recessivt nedärvningsmönster och långsamt förlopp. Nästan alla andra uppvisar ett dominant nedärvningsmönster och ofta snabba sjukdomsförlopp, ett exempel på detta är den i Danmark förekommande G127X-mutationen. Båda dessa nämnda mutationer är upptäckta vid Umeå universitet av en forskargrupp med Peter Andersen (Nat Genet 1995;10:61-6). Sammantaget inger dessa observationer anledning att anta att sjukdomens utveckling vid SOD1-mutationer beror på proteinets struktur. Förutom gener som är kopplade till att sjukdomen utvecklas, har hittills fyra gener som minskar risken att sjukdomen uppkommer identifierats vid undersökningar.

”SOD1 är inte bara det först upptäckta proteinet där mutationer ger upphov till ALS, utan upptar även en särställning då det finns nästan 200 kända olika mutationer i genen som med olika styrka kan kopplas till sjukdomen.”

ETT PUSSEL AV GENFÖRÄNDRINGAR

Studier av flera av de i tabellen uppräknade proteinerna har visat att de är förändrade inte bara hos patienter med mutationer i motsvarande gen, men även hos många andra patienter utan kända mutationer eller ärflighet. Särskilt proteinerna SOD1 och TARDBP har av flera forskargrupper visats förändrade hos en stor andel av ALS-patienterna. Inklusioner av dessa proteiner ses vid mikroskopisk undersökning av motoriska nervceller i centrala nervsystemet (PLoS One 2010;5(7):e11552). Detta sammantaget med nyare forskning där metoder att söka mutationer i många eller på sistone alla gener hos en patient har använts och visat att det hos en och samma individ förekommer fler muterade gener än vad som kan förklaras av den generella frekvensen av mutationer i dessa gener, talar för att flera genförändringar kan samverka för att ge upphov till sjukdomen. Kartläggningen av genförändringar vid ALS ger således ett pussel som när det läggs ger upphov till en kartbild över sjukdomens patogenes.

HYPOTES OM FELVECKADE PROTEINER

Mutationer i flera av de gener som kan orsaka ALS kan även ge upphov till frontallobsdemens, exempelvis FUS, TARDBP och C9orf72. Även vid frontallobsdemens kan inklusioner av motsvarande proteiner ses. Vid frontallobsdemens ses dock inklusioner i andra grupper av nervceller än vid ALS.

Sedan andra halvan av 1800-talet är det känt att symtomen vid ALS-sjukdomen i de flesta fall sprider sig på ett karakteristiskt sätt. Anledningen till denna spridning har varit okänd och många hypoteser har lagts fram, bland annat har

| Upptäckt | Gen | Frekvens |
|----------|-----------------|----------|
| 1993 | SOD1 | 2-7% |
| 1995 | Neurofilament-H | ovanlig |
| 2001 | Alsin | ovanlig |
| 2004 | Dynactin | ovanlig |
| 2004 | Senataxin | ovanlig |
| 2004 | Peripherin | ovanlig |
| 2004 | VAPB | ovanlig |
| 2006 | Angiogenin | ovanlig |
| 2006 | TARDBP | 1-2% |
| 2006 | CHMP2B | ovanlig |
| 2009 | FUS | 1-2% |
| 2010 | Optineurin | ovanlig |
| 2010 | VCP | ovanlig |
| 2010 | Spatacsin | ovanlig |
| 2011 | Ubiquilin-2 | ovanlig |
| 2011 | C9orf72 | 5-15% |
| 2011 | Sequestome1 | ovanlig |
| 2011 | SIGMAR1 | ovanlig |
| 2012 | Profilin1 | ovanlig |
| 2014 | CHCHD10 | ovanlig |
| 2014 | Matrin3 | ovanlig |
| 2015 | TBK1 | ? |
| 2016 | NEK1 | ? |

Tabell 1. Proteiner som kunnat knytas till uppkomsten av ALS.

selektiv utsatthet hos vissa grupper av nervceller eller möjligheten av spridning av något smittämne diskuteras.

Vid Parkinsons sjukdom har det av en svensk forskargrupp under ledning av Patrik Brundin visats att aggregat av alfasynuklein, så kallade lewy-kroppar, kan spridas till celler i implantat av embryologisk vävnad från patienternas egna nervceller (Nat Med 2008;14:501-3). Ett fynd som starkt talar för spridning av proteiner som en sjukdomsmekanism vid neurodegenerativa sjukdomar. Många experimentella studier vid både Parkinsons sjukdom och Alzheimers sjukdom från de senaste åren stödjer denna hypotes. Den aggregering som föregår sjukdomsspridningen beror på att proteinerna antar en onaturlig konformation och/eller att cellerna misslyckas hantera felaktigt bildade proteiner (felveckning). En forskargrupp under Stefan Marklund vid Umeå Universitet har visat att även mycket små mängder felveckat SOD1 kan orsaka sjukdomen (Brain. 2004;127:73-88). Hur dessa små mängder kan orsaka så stor skada var länge ett svårförklarat fenomen.

HUR SPRIDS ALS I CNS?

Forskning under de senaste åren har kastat nytt ljus över hur

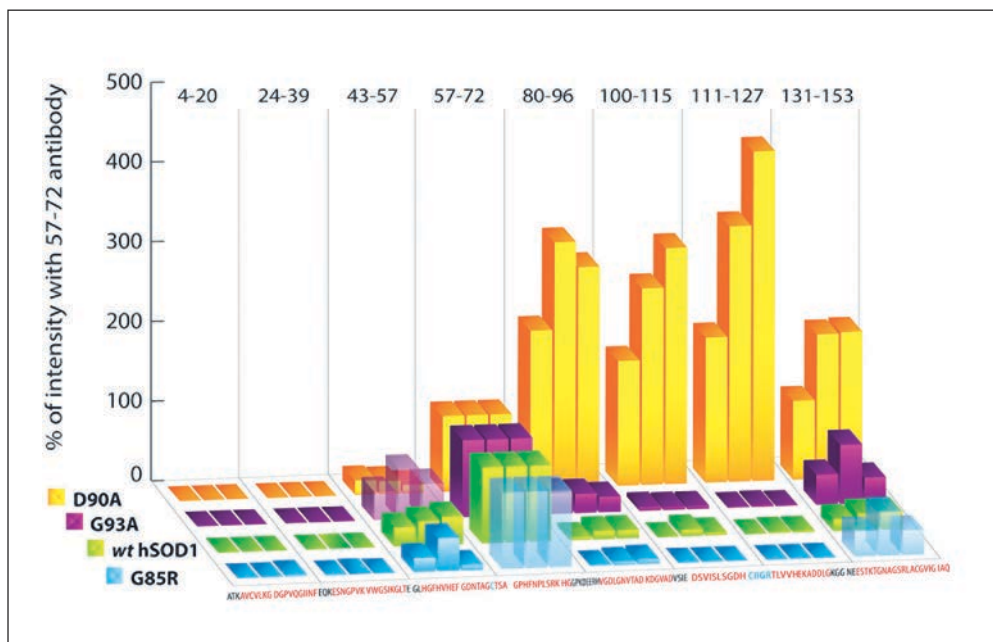


Bild 1. I bilden visas mätningar av 8 olika antikroppars reaktioner med aggregat av SOD1 hos 4 olika transgena musstammar (D90A-, G93A- och G85R-mutationerna i SOD1 samt överuttryck i möss av den normala humana allelen – wt hSOD1). De olika antikropparna är framtagna genom immunisering med polypeptider från SOD1:s aminosyrasekvens (angiven längs ned). Den översta raden anger

vilka aminosyresekvenspositioner som använts. Varje stapel indikerar mätningar från en individ (för varje stam har tre djur använts). Mätvärdena har normaliserats mot värdet för antikroppen mot aminosyror 57-72. De guldfärgade staplarna representerar aggregat av typ B, medan övriga staplar representerar aggregat av typ A.

ALS kan sprida sig i centrala nervsystemet. Ett viktigt fynd gjordes 2011 när en forskargrupp vid Universitet i Cambridge under ledning av Anne Bertolotti visade att aggregat av proteinet SOD1 kunde spridas mellan nervceller i cellkulturer (Proc Natl Acad Sci U S A; 108:3548-53). Nästa steg togs 2014 av en forskargrupp vid Floridauniversitet i Gainesville under ledning av David Borchelt, som visade att injektioner av homogeniserad hjärnvävnad från möss som uttrycker muterat humant SOD1-protein kopplat till ett markörprotein, hos nyfödda möss av samma typ gav upphov till ALS mycket tidigare än vad som skulle förväntas (Acta Neuropathol 2014;128:791-803).

En avgörande svårighet vid humanstudier av neurodegenerativa sjukdomar är att centrala nervsystemets finare morfologi och biokemi nästan uteslutande kan studeras på postmortal vävnad. Sjukdomens tidiga stadier kan inte närmare undersökas annat än på djurmodeller. De tillgängliga djurmodellerna för både Alzheimers sjukdom och Parkinsons sjukdom uppvisar enbart begränsade likheter med den humana bilden.

Omgående efter upptäckten av D90A- och G127X-mutationerna under 1990-talet påbörjades ett arbete för att utveckla transgena djurmodeller (möss) av dessa sjukdomar. Här har den humana genen satts in i mössen. Båda dessa modeller har visat sig i detalj återspegla många delar av humana sjukdomsfynd. De transgena D90A-mössen uppvisar problem med kontroll av urinblåsans funktion i likhet med ALS-patienter med motsvarande mutation (J Neuropathol Exp Neurol 2006;65:1126-36). Den mikroskopiska bilden av

motoriska nervceller vid G127X-mutationen är förutom cellstorleken identisk. En stor fördel med SOD1-proteinet är att den humana formen inte interagerar med den murina formen hos möss.

Sammantaget tyder fynden på en generell förekomst av aggregerat SOD1 i nervceller vid ALS och att dessa aggregat kan spridas mellan celler, på att de kan ha en central betydelse vid uppkomsten av sjukdomen. För att studera dessa aggregat i detalj tog Stefan Marklund och hans forskargrupp fram antikroppar riktade mot olika delar (epitoper) av SOD1-proteinet. Då SOD1-aggregat (i likhet med aggregat vid Alzheimers sjukdom och Parkinsons sjukdom) bildar tunna fibriller (långa trådar) gjorde han antagandet att vissa delar av SOD1-molekylen skulle bilda kärnan i dessa fibriller och andra delar exponeras mot fibrillernas yta. Om aggregaten studerades i nära normaltillstånd skulle således enbart vissa av antikropparna kunna reagera med aggregaten (bild 1). På detta vis kan en epitop-profil för aggregatens struktur skapas. När sedan aggregat från de olika djurmodellerna undersöktes framkom att det förekom aggregat med en epitop-profil kallad A, men hos D90A-mössen kunde även aggregat med en annan epitop-profil, kallad B, ses. När man sedan jämförde D90A-mössen med mycket typ A-aggregat fann man att dessa levde längre än D90A-mössen med mycket typ B-aggregat. Således tydde fynden på att aggregatens typ styrde symptomutvecklingen (Proc Natl Acad Sci U S A 2015; 112:4489-94). Den troligaste förklaringen för ett sådant resultat var att de iakttagna aggregaten uppvisar en prion-liknande spridningsmekanism.

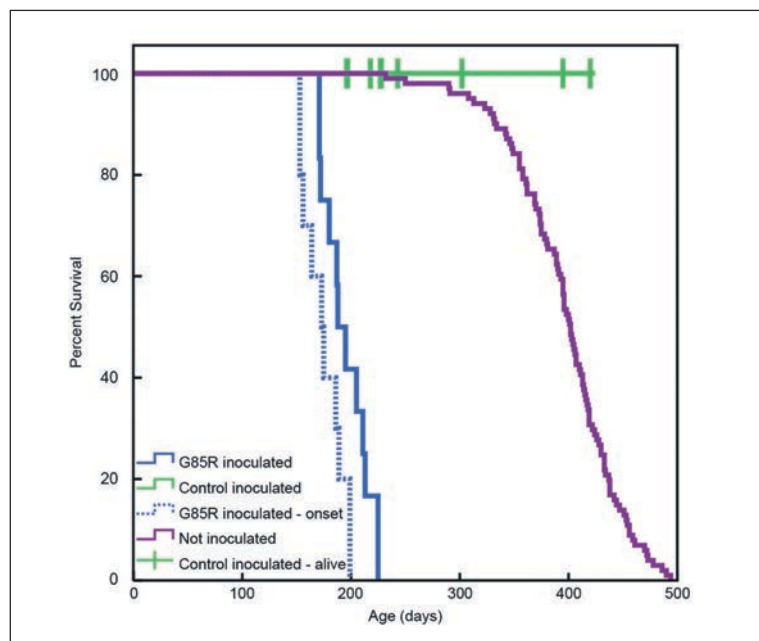


Bild 2. Bilden visar överlevnaden hos dels möss uttryckande den humana G85R-mutationen i SOD1 (violett linje) samt överlevnaden hos G85R-möss som vid 100 dagars ålder blivit injicerade med preparationer från terminal ryggmärg hos dessa G85R-möss (blå

linjer, den streckade linjen anger när första sjukdomssymtom observerats). Injektioner tidigarelägger mössens sjukdom med cirka 200 dagar. Möss som blivit injicerade med preparationer från normala möss utan muterat humant SOD1 (grön linje).

INJEKTIONER AV AGGREGAT PÅSKYNDAR SJUKDOMEN

För att testa detta ytterligare har Thomas Brännströms forskargrupp använt preparationer med de olika typerna av aggregat (A och B) och injicerat dem i ryggmärgen hos möss. Här användes en djurmodell som uttrycker den humana G85R-mutationen i SOD1-genen. Den är särskilt lämplig, för hos denna uppträder aggregat av SOD-proteinet först i sjukdomens slutstadium. Om hypotesen att sjukdomen sprids via en prionliknande mekanism är korrekt skulle injektionerna inducera en ansamling av mycket större mängder aggregat än vad som injicerades. Denna ansamling skulle även vara aggregattypiskt; injektion av typ A skulle leda till ansamling av typ A-aggregat och injektion av typ B-aggregat skulle leda till ansamling av typ B-aggregat. G85R-modellen har aldrig påvisats bilda typ B-aggregat. Dessutom förutsade hypotesen att dessa aggregat skulle ha förmåga att sprida sig i nervsystemet. Den injicerade mängden aggregat valdes så att den motsvarar den mängd som återfinns i ryggmärgen vid sjukdomens slutstadium i mössen.

Vid försöken (bild 2) kunde det visas att injektionerna ledde till en sjukdomsutveckling som kom nästan 200 dagar tidigare än normalt hos möss. Denna sjukdomsutveckling startade alltid i bakbenen, trots att den normalt hos G85R-modellen startar i frambenen hos omkring ca 40 procent av mössen. Dessa fynd tyder således på att injektionerna orsakade symptomen. En kontrollgrupp som injicerades med preparationer gjorda på möss utan human SOD1-gen insatt, utvecklade ej sjukdomssymtom, pekande på att det kirurgiska traumat inte hade någon effekt i sig (J Clin Invest. 2016;126:2249-53).

När sedan det centrala nervsystemet i mössen undersöktes sågs att aggregat ansamlades i allt högre utsträckning allt längre ifrån injektionsplatsen ju längre tid som förflutit efter injektionerna. Den totala mängden aggregat i det centrala nervsystemet var månghundrafalt större än den injicerade mängden och aggregaten var epitop-specifik gentemot den injicerade typen. Allt detta visar att de små injicerade mängderna orsakar en prionlikande spridning av aggregat SOD1 och sjukdomens symtom.

Fyndet att en prionliknande aggregering driver sjukdomsutvecklingen vid ALS sätter fokus på behandlingsstrategier som kan hindra denna aggregering. Flera olika strategier är här tänkbara. Då fynden indikerar att sjukdomen sprids från cell till cell är en möjlig strategi att med antikroppar fånga upp och destruera aggregat på deras väg mellan cell till cell. Vilka epitoper som sådan terapi sannolikt bör riktas emot kan förutsägas av de försök som genomförts av Stefan Marklunds forskargrupp. En annan strategi är att redan tidigare i utvecklingen söka påverka aggregering direkt med molekyler som kan tillföras och verka intracellulärt och som förhindrar SOD1-molekylerna att aggregera i första skedet. För att upptäcka denna typ, krävs enkla testmetoder som kan genomföras i stor skala och utveckling av sådana metoder pågår.



THOMAS BRÄNNSTRÖM
Professor, Institutionen för medicinsk bioteknik, Umeå universitet
thomas.brannstrom@umu.se