

# Alzhe

## *Ny upptäckt angående* **beta-amyloid**

En upptäckt från forskare vid Lunds universitet utmanar en tidigare obestridd konsensus om beta-amyloid i Alzheimers sjukdom. Experimenten genomfördes i samarbete med synkotronljusanläggningen Max IV i Lund.

**Alzheimers sjukdom är den vanligaste** orsaken till demens. I tidiga stadier drabbas närminnet, men allt eftersom sjukdomen fortskrider blir den drabbade helt beroende av vård och hjälp, även vid de mest enkla vardagssysslorna. Sjukdomen beskrevs första gången i början av 1900-talet av den tyska neuropsykiatrikern Alois Alzheimer, efter att han undersökt en patient med mycket svår förvirring och minnesförlust. När hans patient slutligen avled lät han undersöka hjärnan och beskrev sina fynd vid en konferens 1906. Då beskrevs för första gången de specifika skador på hjärnan som kallas plack. Dessa be-

stod av en då ännu okänd substans. Nu vet man att dessa amyloida plack till stor del består av peptiden beta-amyloid. Beta-amyloid bildas genom sekventiell klyvning av proteinet beta-amyloid prekursor protein, eller APP som det förkortas. Ansamling och aggregering av beta-amyloid tros vara en drivande orsak till sjukdomsframskridandet i Alzheimers sjukdom, en teori som benämns den amyloida kaskadhypotesen.<sup>1,2</sup> Terapier som minskar produktionen av beta-amyloid har därför testats i hopp om att bromsa, eller till och med stoppa sjukdomsprocessen. Läkemedelsförsök har genomförts i

# Alzheimers

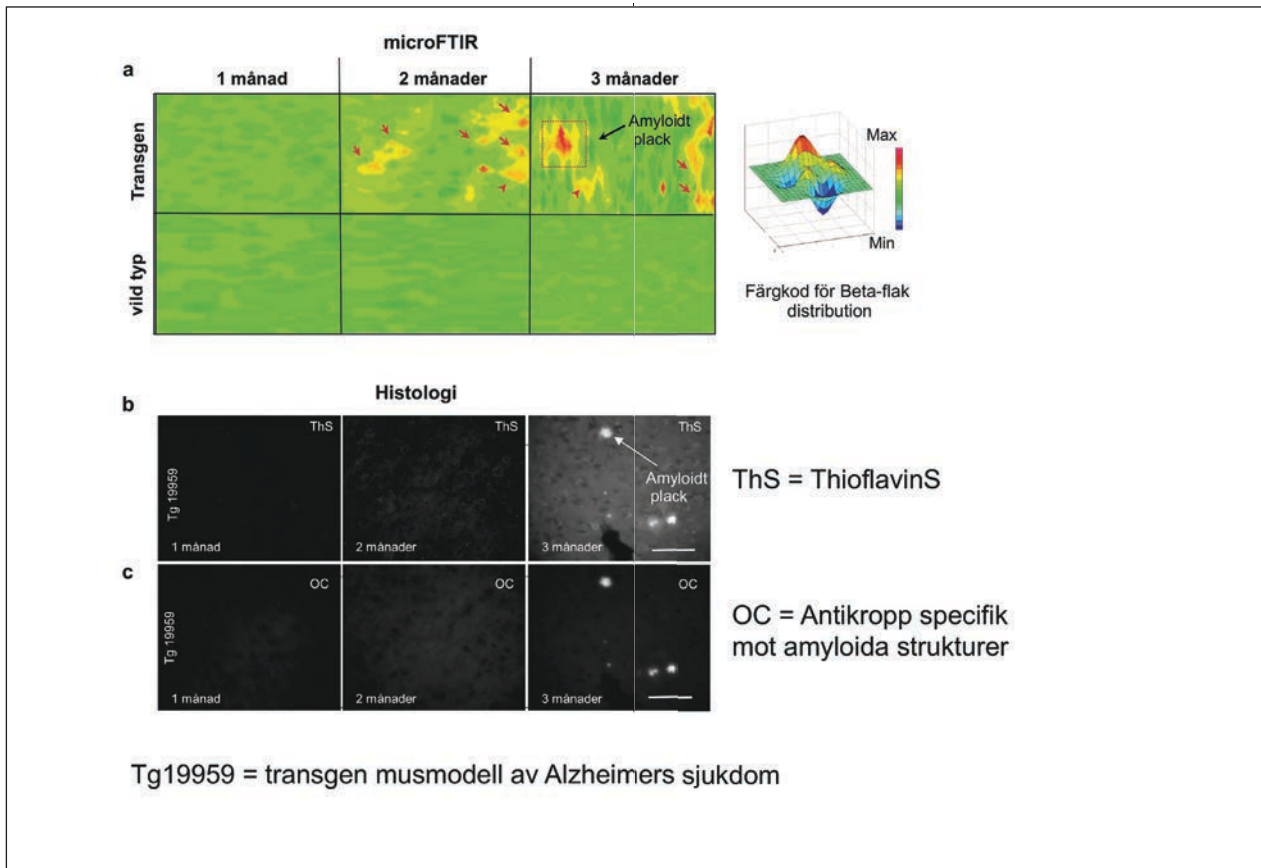
syfte att hämma beta-amyloidproducerande enzymer. Även vaccinering mot beta-amyloid har testats, i syfte att immunförsvaret ska rensa bort peptiderna innan de blir skadliga. Flera av dessa terapier har misslyckats i kliniken. Inte bara på grund av bristande effekt; en del av dem har varit direkt skadliga för patienterna.<sup>3</sup>

*”Trots över hundra års forskning är mycket ännu okänt kring de tidigaste stadierna av Alzheimers sjukdom.”*

#### **TYDLIGA FÖRÄNDRINGAR SKER INNAN PLACK UPPSTÅR**

Trots över hundra års forskning är mycket ännu okänt kring de tidigaste stadierna av Alzheimers sjukdom. Hur plack uppstår ännu inte kartlagt. Därför ville vi studera de tidiga förändringar i hjärnan som sker innan plack uppstår. För detta användes transgena möss som manipulerats genetiskt för att utveckla Alzheimers sjukdom. De här mössen utvecklar både plack och minnesproblem.<sup>4</sup> Icke-transgena möss användes som kontroller.

För att undersöka dessa tidiga stadier av sjukdomen samarbetade vi med Max IV-laboratoriet i Lund, där en metod som kallas mikro-Fourier-transform-infraröd-spektroskopi (mikroFTIR) användes. Metoden syftar till att studera absorption av infraröd strålning, vilket ger information om proteiners sekundärstruktur.<sup>5</sup> Sekundärstruktur uppstår med hjälp av inter- och intramolekylära vätebindningar mellan peptidkedjorna i proteiner. Vid studier av amyloid är då betaflakssignaler intressanta eftersom det visats att amyloid är organiserat i betaflak. Mössen studerades vid en, två och tre månaders ålder. Vid en månads ålder hade de transgena mössen samma sekundärstruktur som de icke-transgena mössen. Vid två månaders ålder visade mikroFTIR-signalen att proteinernas sekundärstruktur hade ändrats och att de nu hade bildat betaflak vilket inte förekom hos de icke-transgena mössen. Vid tre månaders ålder hade mössen en mycket stark betaflakssignal [se Figur 1a]. För att undersöka om denna signal kom från amyloida plack, färgades de intilliggande histologiska snitten in med olika antikroppar samt kemikalien tioflavin-S [se Figur 1b och 1c]. Vad som upptäcktes var överraskande; vid två månaders ålder visade infärgning med antikroppar att mängden beta-amyloid ökat, men inte mängden fibriller. Vi noterade även att infärgningsmönstret inte var förenligt med plack. Vid tre månaders ålder var placken dock fullt synliga, både med antikroppar



1a) Visar representativa betaflaksignaler från histologiska snitt. Notera hur betaflaksignalerna uppkommer vid två månaders ålder i transgena möss, men att vildtypsmössen inte alls får dessa.  
 1b) Visar intilliggande histologiska snitt infärgade med thioflavin S (ThS) som binder in till amyloida strukturer. Här ser vi att ThS först ger signal i tre månader gamla transgena möss. En och två månader gamla möss är helt utan signal.  
 1c) Visar samma histologiska snitt infärgade med en konformationsspecifik antikropp (OC) riktad mot amyloida strukturer. Även här ses enbart infärgning i tre månader gamla transgena möss (mätstickan motsvarar 50 mikrometer).

och tioflavin-S. Detta är mycket spännande, eftersom det innebär att tidigare stadier i aggregationsprocessen av beta-amyloid nu kan observeras med mikroFTIR jämfört med infärgning med antikroppar och tioflavin-S. Dessa tidiga processer har inte heller varit möjliga att observera med hjälp av andra metoder, såsom PET och in vivo-multifotonspektroskopi. Där har det tidigare rapporterats om plack som verkar dyka upp inom ett dygn för att sedan växa till full storlek på endast ett par dagar.<sup>6</sup>

**ÄR BETA-AMYLOIDS NORMALA KONFORMATION EN TETRAMER?**

Nästa steg var att ta reda på vilken typ av förändringar som sker i hjärnan på dessa möss, innan placken bildas. Dock innebär många vedertagna metoder att proteinets naturliga struktur förändras i experimentprocessen. I detta avseende är mikroFTIR en bra metod då den inte påverkar strukturen av beta-amyloid. Dessutom användes blå nativ polyakrylamid gel-elektrofores (BN-PAGE), där proteiner separeras baserat på storlek, liksom vid annan elektrofores. I BN-PAGE behålls dock vissa fysiska interaktioner mellan proteiner. Genom att studera mus-hjärnor med BN-PAGE upptäcktes först att fler aggregat

av beta-amyloid med hög molekylärvikt dök upp vid två och tre månads ålder än vid en månads ålder. Vi blev dock väldigt förvånade när vi med denna metod upptäckte att beta-amyloid inte verkade existera som en monomer utan som en tetramer i sin naturliga form.

*”Vi blev dock väldigt förvånade när vi med denna metod upptäckte att beta-amyloid inte verkade existera som en monomer utan som en tetramer i sin naturliga form.”*

Dessutom verkade denna tetramer försvinna när de transgena mössen blev två och tre månader gamla, det vill säga vid den tidpunkten då betaflaksignalerna förändras och beta-amyloid aggregerar, så som vi tidigare demonstrerade med mikroFTIR.

*”Genom användning av metoder som minimalt påverkar proteiners struktur och konformation har vi visat att beta-amyloid aggregerar och formar betaflakstrukturer innan plack uppstår.”*

#### **SYNAPSER FÖRSTÖRS VID ANSAMLINGEN AV BETA-AMYLOID**

För att ta reda på var denna ansamling av beta-amyloid sker, färgades beta-amyloid in i hjärnsnitt från de en, två och tre månader gamla transgena mössen, tillsammans med antikroppar mot det postsynaptiska proteinet drebrin och det presynaptiska proteinet synaptophysin. Dessa experiment visade att beta-amyloid verkar ansamlas först postsynaptiskt, men med stigande ålder även presynaptiskt. Vid tre månaders ålder var det tydligt att synapserna var svullna och de verkade ha tagit skada av beta-amyloidansamlingen.

#### **KAN MAN UTVECKLA NYA BEHANDLINGAR MED DEN HÄR KUNSKAPEN?**

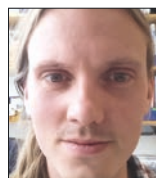
Vid en annan amyloid sjukdom, familjär amyloid polyneuropati (FAP), ansamlas och aggregerar proteinet transtyrelin i perifera delar av nervsystemet. Forskning har visat att transtyrelin normalt sett bildar en tetramer, men att strukturen störs vid FAP. Detta leder till att proteinet ansamlas och förlorar sin naturliga funktion och aggregerar. Vad som är väldigt intressant är att ett läkemedel som stabiliserar den normala konfigurationen av transtyrelin har utvecklats.<sup>7</sup> Detta läkemedel har fungerat väl i kliniska prövningar och är i dag den enda behandling som lyckats bromsa en amyloid sjukdom. Vår förhoppning är att genom grundlig kartläggning av de naturligt förekommande beta-amyloida tillståndet(en) kunna utveckla en liknande strategi som skulle kunna användas för att behandla Alzheimers sjukdom.

#### **SAMMANFATTNING**

Genom användning av metoder som minimalt påverkar proteiners struktur och konformation har vi visat att beta-amyloid aggregerar och formar betaflakstrukturer innan plack uppstår. Vi visade även att en typ av beta-amyloid med låg molekylvikt försvinner vid denna tidpunkt. Vår metod visar att denna typ av beta-amyloid till form, storlek och egenskaper, verkar vara en tetramer. Det är tänkbart att man med denna vetskap samt efter vidare kartläggning av beta-amyloid, kan skapa nya läkemedel som stabiliserar tetramerstrukturen av beta-amyloid och på så vis i slutändan skydda hjärnan mot de skadliga beta-amyloidformerna.

#### **REFERENSER**

1. Hardy J. The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. *J Neurochem*, 2009; 110(4):1129-34.
2. Hardy JA and Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992; 256(5054):184-5.
3. Karran E and De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *J Neurochem* 2016; 139 Suppl 2:237-252.
4. Chishti MA, et al. Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J Biol Chem* 2001; 276(24):21562-70.
5. Amenabar I, et al. Structural analysis and mapping of individual protein complexes by infrared nanospectroscopy. *Nat Commun* 2013; 4:2890.
6. Meyer-Luehmann M, et al. Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 2008; 451(7179):720-4.
7. Dubrey S, Ackermann E, and Gillmore J. The transthyretin amyloidosis: advances in therapy. *Postgrad Med J* 2015; 91(1078):439-48.



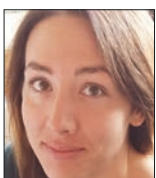
**ISAK MARTINSSON**  
Doktorand, Experimentell demensforskning,  
Lunds universitet  
isak.martinsson@med.lu.se



**OXANA KLEMENTIEVA**  
Postdoc, Experimentell demensforskning,  
Lunds universitet  
oxana.klementieva@med.lu.se



**BODIL ISRAELSSON**  
Biomedicinsk analytiker, Experimentell  
demensforskning, Lunds universitet  
bodil.israelsson@med.lu.se



**KATARINA WILLÉN**  
Doktorand, Experimentell demensforskning,  
Lunds universitet  
katarina.willen@med.lu.se



**GUNNAR GOURAS**  
Professor, Experimentell demensforskning,  
Lunds universitet  
gunnar.gouras@med.lu.se