



## *I **alzheimerhjärnan** sprids giftigt oligomert beta-amyloid med hjälp av **exosomer***

Hjärnans sjukdomar är svårförstådda och Alzheimers sjukdom har förbryllat forskare i över ett sekel. Såväl de kliniska symtomen, sjukdomens utbredning i hjärnan vid obduktion som nya data från imaging-studier talar samstämmigt för att sjukdomen tidigt drabbar hjärnans limbiska system (entorhinal cortex och hippocampus) och sedan gradvis sprider sig för att drabba fler och fler delar av hjärnan. Varför sjukdomen börjar där den gör vet vi inte i dag men spridningen gör att den drabbade gradvis förlorar viktiga mänskliga förmågor som minne, språk, abstraktion och resonemang samt dör i förtid. Exosomer tycks vara involverade i spridningen av sjukdomen visar ny svensk forskning. I denna artikel beskriver **Anna Ansell-Schultz** och **Martin Hallbeck**, båda Linköpings universitet, dessa intressanta fynd.



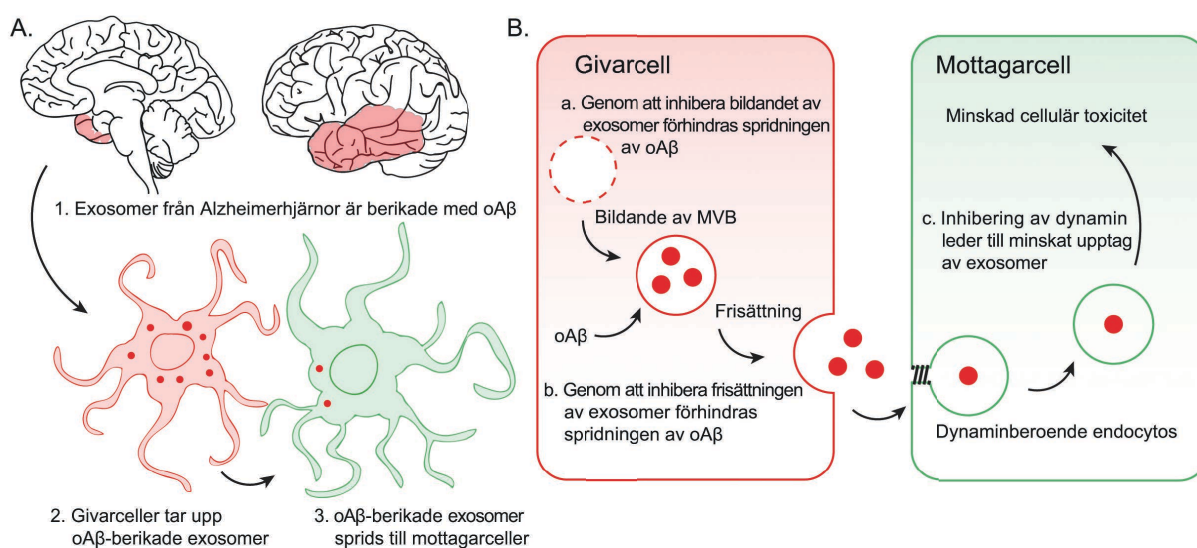
**Ur ett neuropatologiskt perspektiv** är Alzheimers sjukdom en proteinopati och definieras av två patologiska fynd i hjärnan, extracellulära inlagringar av beta-amyloid, så kallade plack, och intracellulära ansamlingar av hyperfosforylerat tau, så kallade neurofibrillära nystan.<sup>1</sup> Ursprungligen ansågs de extracellulära plackerna vara orsaken till Alzheimers sjukdom men forskning tyder på att så inte är fallet. Snarare är det intracellulära ansamlingar av mindre aggregat av beta-amyloid som till stor del tycks vara drivkraften och orsaken till de neurotoxiska effekterna vid Alzheimers sjukdom,<sup>2</sup> medan placken istället verkar vara en effekt av sjukdomen. Detta skifte av fokus; från de extracellulära olösliga plackerna till de intracellulära lösliga oligomera formerna av beta-amyloid (oAβ), har revolutionerat vårt sätt att förstå hur celler i hjärnan skadas vid Alzheimers sjukdom och hur sjukdomen kan spridas i hjärnan. Sannolikt är det alltså oligomert beta-amyloid som ligger bakom denna spridning.

Så hur sprids oligomert beta-amyloid mellan nervceller i hjärnan? Den huvudsakliga teorin härstammar från den sällsamma biologin hos prionsjukdomar, där felveckade proteiner sprids mellan nervceller och inducerar en kedjereaktion som resulterar i endogen aggregering med påföljande skador på nervcellen. Vi har tidigare visat att oligomert beta-amyloid kan ansamlas intracellulärt och sedan spridas till

andra nervceller och därigenom orsaka nervcellsskador och död.<sup>3,4</sup> Nyligen har andra forskare visat att sådan spridning fungerar som en utlösare för ytterligare patologisk aggregering av beta-amyloid i mottagarcellen på samma sätt som för prioner.<sup>5</sup> Likväl är det, trots många års forskning, fortfarande ett mysterium hur denna spridning går till. Vi har nu kunnat göra ett viktigt genombrott i förståelsen av de specifika cellulära mekanismerna som ligger bakom denna patologiska spridning av oligomert beta-amyloid mellan nervceller.<sup>6</sup>

#### EXOSOMER – CELLENS BUDBILAR OCH SOPPÅSAR

Vi har vid tidigare studier visat att det endosomala systemet i cellen är involverat i upptag av extracellulärt oligomert beta-amyloid, vilket tyder på att detta system kan ha en nyckelroll i hanteringen och spridningen av oligomert beta-amyloid.<sup>4</sup> Det endosomala systemet sorterar material som cellen tagit upp genom endocytos, följt av transport till antingen lysosomen för nedbrytning eller tillbaka till cellytan för utsöndring genom exocytos. Kontrollen av denna transport har visats vara nedsatt vid både Alzheimers och Parkinsons sjukdom. Denna kontroll sköts av retromeren, ett multiproteinkomplex som är involverat i intracellulär sortering och återvinning. Vi har nyligen visat att en försämrad funktion av retromeren leder till ökad ansamling av oligomert beta-amyloid inuti cel-



*”Exosomer kan produceras och frisättas av praktiskt taget alla celler i kroppen och finns i stort antal i de flesta kroppsvätskor såsom blod, urin, saliv och cerebrospinalvätska.”*

len. Nyvunnen kunskap visar att exocytos, via membranbundna vesiklar, förmodligen är den vanligaste formen för celler i hela kroppen att kommunicera och dela material. En viktig del av exocytosen sker genom membranbundna intraluminala vesiklar som bildas i så kallade multivesikulära kroppar (MVB). När dessa multivesikulära kroppar sammansmälter med plasmamembranet frisätts vesiklarna till den extracellulära miljön, dessa vesiklar kallas exosomer.

Exosomer kan produceras och frisättas av praktiskt taget alla celler i kroppen och finns i stort antal i de flesta kroppsvätskor såsom blod, urin, saliv och cerebrospinalvätska. Även om exosomer redan beskrevs på 1980-talet så är det först på senare år som man förstått att de inte bara fungerar som en alternativ bortskaffningsväg för cellens restprodukter. Aktuell forskning har istället visat att exosomer är ytterst viktiga för cellulär kommunikation genom att leverera proteiner, RNA och lipider mellan celler. Eftersom nervcellernas förmåga att ta hand om och bryta ned skräp är nedsatt i Alzheimers sjukdom var vår hypotes att intracellulära felveckade proteiner, såsom oligomert beta-amyloid, då istället hamnar i exosomer som därigenom kan sprida sjukdomen vidare till nya nervceller.

#### EXOSOMER FRÅN ALZHEIMERHJÄRNOR ÄR BERIKADE MED OLIGOMERT BETA-AMYLOID

Då exosomer har visats sig innehålla proteiner som alfa-synuklein, tau och monomert beta-amyloid undersökte vi om neuronala exosomer också innehåller oligomert beta-amyloid samt om exosomer från patienter med Alzheimers sjukdom innehåller förhöjda halter av oligomert beta-amyloid. För detta användes donerad hjärnvävnad från temporala neocortex från avlidna patienter med avancerad sjukdom (Braak stadium V-VI). Vi undersökte även hjärnvävnad från individer som inte visat några tecken på demens eller någon annan neurodegenerativ sjukdom innan de avled. Vi började med att rena fram exosomer från hjärnvävnaden och mätte mängden oligomert beta-amyloid med ELISA genom att använda två olika selektiva antikroppar mot oligomert beta-amyloid, mAb158<sup>8</sup> och den kommersiellt tillgängliga 82E1. Antikroppen mAb158 är utvecklad av professor Lars Lannfeldts forskargrupp i Uppsala och humaniserad av BioArtic AB i Stockholm och kallas då BAN2401. mAb158 minskar oligomert beta-amyloid i hjärna vid behandling av transgena alzheimermöss. BAN2401 har genomgått en stor klinisk fas 2b-studie med positiva resultat på amyloid-PET, biomarkörer i ryggsvätska och på kognition. Resultaten från ELISA-mätningarna med antingen mAb158 eller 82E1 visade att exosomer från alzheimerhjärnor innehöll signifikant högre koncentration av oligomert beta-amyloid än exosomer i hjärnvävnad från friska individer. Detta resultat är viktigt då det även indikerar möjligheten att använda exosomer för diagnostik av Alzheimers sjukdom genom att mäta mängden exosomalt oligomert beta-amyloid i åtkomliga kroppsvätskor såsom cerebrospinalvätska.

#### OLIGOMERT BETA-AMYLOID SPRIDS GENOM ATT LIFTA MED EXOSOMER

Vi ville därefter undersöka om exosomerna från patienthjärnor kunde tas upp av nervcellslika celler i odling och om de



## *"Exosomer från alzheimershjärnor innehöll signifikant högre koncentration av oligomert beta-amyloid"*

kunde spridas från cell till cell. För att studera detta använde vi ett av oss utvecklat samodlingssystem med differentierade SH-SY5Y-celler (dSH-SY5Y) eller humana inducerade pluripotenta stamceller (hiPSC) differentierade till fenotypiska nervceller. Både dSH-SY5Y och hiPSC tog effektivt upp exosomer isolerade från såväl sjuk som frisk hjärnvävnad. Vi använde dessa celler som givarceller för samodling och kunde visa att dessa exosomer kan spridas vidare till nya mottagarceller. Resultaten visar att upptaget och spridningen av exosomer i sig inte är beroende av förekomsten av oligomert beta-amyloid utan tyder snarare på att oligomert beta-amyloid kan utnyttja exosomer för att lifta mellan celler, potentiellt till både nära och fjärran destinationer i hjärnan. Överraskande kunde vi också se att en andel av överfört oligomert beta-amyloid i mottagarcellen fortfarande var samlokalisat med de ursprungliga exosomerna vilket visar att delar av de exosomer som tas upp av cellerna kan frisättas igen, fortfa-

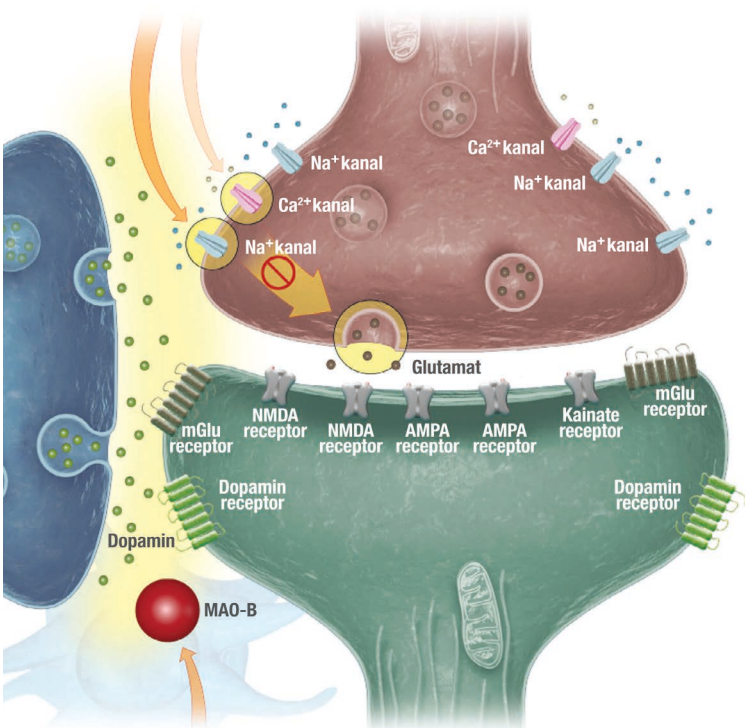
rande intakta och med kvarvarande innehåll av oligomert beta-amyloid.

### **EXOSOMERNAS SPRIDNING AV OLIGOMERT BETA-AMYLOID LEDER TILL MINSKAD CELLULÄR VIABILITET**

Vad händer då med mottagarcellen när exosomerna har utsöndrat sitt innehåll? För att undersöka detta använde vi oss igen av vårt samodlingssystem i vilken framrenade exosomer från både alzheimerdrabbad och frisk hjärnvävnad applicerades. Mottagarcellerna undersöktes därefter för både viabilitet samt neuropatologiska förändringar. Dessa experiment visade att exosomer från alzheimershjärnan inducerar signifikant mer cellulär toxicitet hos mottagarcellen. Mottagarcellen uppvisade också neuropatologiska förändringar typiska för neurodegeneration, såsom dystrofiska neuriter med förändringar i organisationen av cytoskelettet samt förlust av och minskad komplexitet hos nervutskotten. Exosomer isolerade från frisk hjärnvävnad orsakade inte motsvarande cellulära toxicitet eller neuropatologiska förändringar.

### **SPRIDNINGEN AV OLIGOMERT BETA-AMYLOID OCH DESS TOXISKA EFFEKTER KAN STOPPAS**

Eftersom exosomer från alzheimerpatienter är berikade med oligomert beta-amyloid och kan spridas från en nervcell till en annan, borde det då inte vara möjligt att stoppa denna spridning och de skador spridningen orsakar genom att hämma bildningen av exosomer? Vi undersökte denna hypotes



XADAGO (safinamid) – med två verkningsmekanismer

## **Xadago verkar både genom minskad nedbrytning av dopamin och modulering av glutamatfrisättningen.<sup>1</sup>**

**Xadago är en tilläggsterapi till en stabil dos av levodopa (L-dopa) hos vuxna patienter i mellan till sent stadium av idiopatisk Parkinsons sjukdom med symptomfluktuationer.<sup>1</sup>**

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

**XADAGO**  
(safinamid)

Referens: 1. Xadago SPC 2017/02.

**Xadago** (safinamid) 50 & 100 mg filmdragerade tabletter, monoaminoxidas-B-hämmare. RX, (F). Medel vid parkinsonism, ATC-kod: N04BD03. **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 symptomfluktuationer. **Varning & försiktighet:** Vänligen läs produktresumén innan förskrivning. Samtidig användning med SSRI och MAO-hämmare, nedsatt leverfunktion, näthinneförtvning, impulskontrollstörningar och dopaminerga biverkningar. Har ingen eller försumbar effekt på förmågan att framföra fordon eller använda maskiner. Baserad på produktresumé: 2017/02. Se [www.fass.se](http://www.fass.se) för mer information. ▼ Detta läkemedel är föremål för utökad övervakning.

**Subventioneras endast som tilläggsterapi till levodopa hos patienter med "On-Off"-syndrom trots optimal behandling med levodopa.**

**Kontakt:** Nigaard Pharma AS, Medicon Village, 223 81 Lund, [contact@zambongroup.com](mailto:contact@zambongroup.com)

**Zambon**

genom att modulera exosombiogenesen i odlade celler. Genom att utnyttja silencing RNA-metoden (siRNA) kunde vi nedreglera bildningen av två proteiner som krävs för att exosomer ska kunna bildas och frisättas. Därefter undersökte vi om det förelåg skillnader i överföring av exosomer och spridningen av oligomert beta-amyloid, vi undersökte det dels när fysiska kontakter mellan nervtrådar finns och dels när givar- och mottagarceller var åtskilda av ett membran så att fysiska kontakter inte kunde bildas. Intressant nog kunde vi konstatera att spridningen av oligomert beta-amyloid nästan helt blev stoppad om cellerna saknade fysisk kontakt och enbart hade kontakt genom den extracellulära miljön. Men även när cellerna hade fysisk kontakt så kunde nästan hälften av spridningen av oligomert beta-amyloid stoppas genom att blockera exosomerna. Dessa resultat är mycket spännande eftersom de indikerar att exosomer i stor utsträckning är ansvariga för spridningen av oligomert beta-amyloid mellan nervceller. Vi ville också ta reda på hur exosomerna tas upp i mottagarcellerna. Då nervceller kan använda olika typer av endocytos undersökte vi även vilken typ av endocytos som är viktigast för upptag av exosomer. Genom att använda oss av flera olika kemiska inhibitorer för olika typer av endocytos kunde vi visa att upptag av exosomer av nervceller är en aktiv dynaminberoende process. Intressant nog visade det sig att upptaget av exosomer innehållande oligomert beta-amyloid var annorlunda från upptaget av fritt extracellulärt oligomert beta-amyloid, som alltså inte är lika beroende av dynamin för att endocyteras. Experimenten visade en signifikant minskning av överföring av exosomalt oligomert beta-amyloid när dynaminberoende endocytos blockerades. Det ledde i sin tur till minskad cellulär toxicitet. Dynaminberoende endocytos förefaller alltså vara en viktig cellulär mekanism för spridningen av exosomer innehållande oligomert beta-amyloid från en nervcell till en annan.

## SAMMANFATTNING

Den gradvisa försämringen vid Alzheimers sjukdom gör att patienter med initiala milda minnesproblem gradvis förlorar allt mer av sina kognitiva förmågor, blir beroende av andra och dör i förtid. Denna gradvisa symtomutveckling beror på att allt större delar av hjärnan drabbas av sjukdomen. Genom att använda exosomer isolerade från såväl alzheimerspatienters hjärnor som nervceller i odling har vi visat att exosomer i stor omfattning är ansvariga för att oligomert beta-amyloid kan spridas mellan celler från ett hjärnområde till nästa och därmed orsaka den karaktäristiska progressiva patologin. Således visade vi att exosomer från alzheimershjärnor innehåller signifikant mer oligomert beta-amyloid än exosomer från friska individer. Detta resultat öppnar upp för nya diagnostiska möjligheter där exosomer från cerebrospinalvätska skulle kunna användas som biomarkörer. Dessa oligomert beta-amyloidberikade exosomer ledde till toxicitet och skador på mottagarcellerna. Våra resultat visar samtidigt att det är möjligt att stoppa spridningen av oligomert beta-amyloid, och de åtföljande cellskadorna, genom att förhindra bildandet, frisättningen eller upptaget av exosomer. Sammantaget kunde vi visa att exosomer har en stor roll vid spridningen av det cytotoxiska oligomert beta-amyloid och indikerar att denna

mekanism är viktig för den progressiva sjukdomsprocessen i hjärnan hos alzheimerspatienter. Vår förhoppning är följaktligen att nya läkemedel som riktas mot exosomer skulle kunna vara en möjlig framtida behandling mot Alzheimers sjukdom.

## REFERENSER

1. Braak H and Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991; 82:239-259. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1759558>
2. Gouras GK, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, et al. Intra-neuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am J Pathol* 2000; 156:15-20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10623648>
3. Domert J, Rao SB, Agholme L, Brorsson AC, Marcusson J, et al. Spreading of amyloid-beta peptides via neuritic cell-to-cell transfer is dependent on insufficient cellular clearance. *Neurobiol Dis* 2014; 65:82-92. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24412310>
4. Nath S, Agholme L, Kurudenkandy FR, Granseth B, Marcusson J, et al. Spreading of neurodegenerative pathology via neuron-to-neuron transmission of beta-amyloid. *J Neurosci* 2012; 32:8767-8777. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22745479>
5. Olsson TT, Klementieva O, and Gouras GK. Prion-like seeding and nucleation of intracellular amyloid-beta. *Neurobiol Dis* 2018; 113:1-10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29414379>
6. Sardar Sinha M, Ansell-Schultz A, Civitelli L, Hildesjo C, Larsson M, et al. Alzheimer's disease pathology propagation by exosomes containing toxic amyloid-beta oligomers. *Acta Neuropathol* 2018; 136:41-56. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29934873>
7. Ansell-Schultz A, Reyes JF, Samuelsson M, and Hallbeck M. Reduced retromer function results in the accumulation of amyloid-beta oligomers. *Mol Cell Neurosci* 2018; 93:18-26. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30257187>
8. Englund H, Sehlin D, Johansson AS, Nilsson LN, Gellerfors P, et al. Sensitive ELISA detection of amyloid-beta protofibrils in biological samples. *J Neurochem* 2007; 103:334-345. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17623042>



**ANNA ANSELL-SCHULTZ**

Förste forskningsingenjör, Institutionen för klinisk och experimentell medicin, Linköpings universitet  
anna.ansellschultz@liu.se



**MARTIN HALLBECK**

Biträdande professor, Institutionen för klinisk och experimentell medicin, Linköpings universitet  
martin.hallbeck@liu.se

