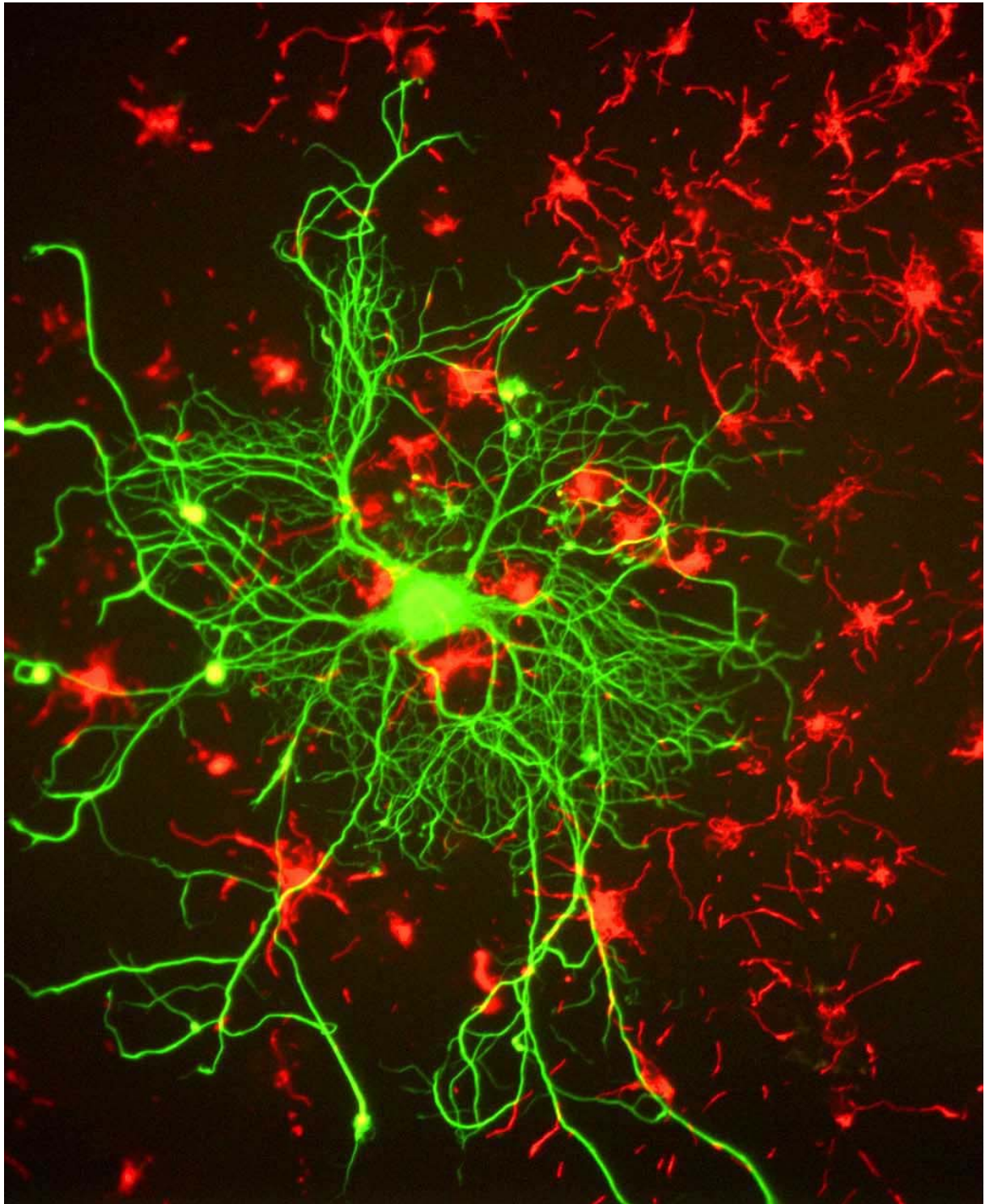


DEGENERASJON

VED

ALZHEIMERS SYKDOM



**Prosjektoppgave i grunnstudiet i medisin skrevet av Bahareh Jouleh, kull V01,
mars 2006**

**Universitetet i Oslo
Det medisinske fakultet**

INNHALDSFORTEGNELSE

1- Abstract	s.3
2- Innledning	s.4
3- Alzheimers sykdom	
3.1- Forekomst	s.4
3.2- Etiologi	s.4
3.3- Kliniske symptomer og tegn	s.5
3.4- Patologiske kjennetegn	s.5
3.5- Diagnostisering	s.6
3.6- Disponerende faktorer	s.6
3.7- Behandling	s.8
4- Basalmedisinsk forskning innen Alzheimers sykdom	
4.1- Innledning til studier av basale mekanismer vedrørende Alzheimers forskning plakkdannelsen	
4.1.1- Plakkdannelsen	s.9
4.1.2- Forstadier til plakk	s.11
4.1.3- Nevrofibrillær tangles	s.12
4.1.4- Dyremodeller for AD	s.12
4.2- Metoder	
4.2.1- Humant autopsimateriale fra AD-pasienter	s.13
4.2.2- Konstruering av transgene mus	s.13
4.2.3- Innstøpning og frysesubstitusjon	s.14
4.2.4- Immunocytokjemisk teknikk	s.15
4.3- Resultater	s.17
4.4- Diskusjon	s.23
5- Referanser	s.24
6- Vedlegg	s.25

1- ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is classified as a neurodegenerative disease that accounts for more than 60% of all cases of dementia. AD is characterized by two hallmark lesions: amyloid plaques and neurofibrillary tangles. According to the amyloid hypothesis, A β is the initiator of a cascade of reactions which causes Alzheimer's at the end. But it is suggested that soluble oligomers of A β may play an early and critical role in neuronal dysfunction prior to overt plaque accumulation in the brain. Autopsy material from cases ranging from clinically non-demented to demented was prepared for electron microscopy to determine the cell association and ultra structural location of various forms of amyloid. Immunogold studies showed oligomeric A β over thin filaments extracellularly, representing pre-amyloid fibres, and within the cytoplasm and terminals of a subset of neurons. The observation of oligomeric A β within neuronal terminals suggests a role for intracellular soluble A β oligomers in neuronal dysfunction and plasticity.

Recently a transgenic model for AD was derived that is characterized by the development of both plaques and tangles. These mice, referred to as the 3xTg-AD mice, harbour clinical mutations in the APP, PS1 and tau genes. In this model, plaques and tangles manifest in a progressive manner in AD-relevant brain regions such as the hippocampus, amygdala and cortex, with plaque developing prior to the neurofibrillary pathology. In our study we analyzed 3xTg-AD mice ranging from 6, 12, 18 and 30 months of age. Utilizing immunocytochemistry both at the light and electron microscopic level, we demonstrate various tau aggregates, including paired helical filaments. The tau modifications occur in a hierarchical manner, which first manifests with hyperphosphorylation and then proceed to mature tangles. The ultra structural analysis of these 3xTg-AD mice should enable us to detail the development of plaque and tangles and the interaction between them in the pathogenesis of this disorder.

2- INNLEDNING

Alzheimer er en nevrodegenerativ sykdom som rammer mange mennesker i verden, riktignok flest eldre men også yngre mennesker kan rammes av den. Det finnes dessverre ingen kurerende behandling for sykdommen per i dag. Dette til tross for mye innsats fra forskernes side for å løse Alzheimer-gåten.

I denne oppgaven vil jeg først skrive generelt om Alzheimer. Deretter vil jeg presentere noen av mine resultater innen basalforskning på Alzheimer.

3- ALZHEIMERS SYKDOM

3.1-Forekomst

Alzheimers sykdom (AD) er en degenerativ hjernesykdom som forårsaker demens. I 2002 var prevalensen for demens i Norge på ca. 60000 (1). Av disse hadde omtrent 60 % AD. Årlig blir om lag 9000 nordmenn rammet av demens. Flere kvinner rammes av sykdommen enn menn. Prevalensen øker med økende alder og over 95 % av dem som får Alzheimer er over 65 år.

Da andelen eldre i befolkningen øker raskt, forventes forekomsten å stige betydelig i de neste tiårene.

3.2-Etiologi

Etiologien til AD er foreløpig ukjent. Men som ved mange andre sykdommer, spiller genetiske faktorer også en rolle ved noen tilfeller av Alzheimer. Den arvelige varianten av sykdommen kjennetegnes blant annet ved debut i relativt ung alder.

Familiær AD (FAD)

FAD-pasientene utgjør mindre enn 10 % av AD tilfellene.

Noen av disse er forårsaket av punktmutasjoner i A β -regionen (amyloid-beta-regionen) på APP-genet (genet for amyloid precursor protein).

Andre dominant arvelige former for AD som ikke er knyttet til kromosom 21 er mutasjoner i genene for presenilin 1 og 2 (PS1 og PS2) på henholdsvis kromosom 14 og 1. Funksjonen til disse 2 homologe proteinene er ikke kjent. Men det er holdepunkter for at PS1 regulerer aktiviteten til det såkalte γ -sekretase enzymet og dermed er involvert i metabolismen av APP-proteinet (2,3).

Downs syndrom

APP-genet sitter på kromosom 21. Pasienter med Downs syndrom har 3 eksemplarer av kromosom 21 og vil derfor få en økt ekspresjon av APP-proteinet. Dette i motsetning til FAD, hvor ulike mutasjoner medfører større produksjon av det farlige A β -proteinet.

Også hos disse pasientene debuterer sykdommen vanligvis i ung alder (rundt 40-årene).

Sporadisk (idiopatisk)

Mesteparten av Alzheimer-pasientene lider av denne formen av sykdommen. Som navnet forteller, er årsaken her ukjent. Ved sporadisk AD vil symptomene ofte ikke melde seg før i 65-70 årene.

3.3-Kliniske symptomer og tegn

AD debuterer oftest med langsomt tiltakende hukommelsesforstyrrelser der spesielt kortidshukommelsen er affisert. Etter hvert tilkommer andre typiske demenssymptomer som: redusert oppmerksomhet, orienteringsevne og kommunikasjonsevne, endringer i atferd og emosjoner samt språkvansker og apraksi. Noen blir deprimerte mens andre blir mer aggressive eller mistenksomme. Det er også de som blir emosjonelt labile og skifter fra og være aggressive til å bli helt apatiske. Ved langkommet demens er det i tillegg vanlig med motoriske forstyrrelser som muskelstivhet, balanseproblemer og inkontinens (4).

3.4-Patofysiologiske kjennetegn

Makroskopisk ser man en diffus cerebral atrofi som kan være meget utpreget. Atrofien starter typisk i hippocampus-området og brer seg derfra over hele hjernens overflate. Sjeldne ganger er frontal og temporal lappene mer affisert slik at det ligner på frontotemporal demens.



(a)

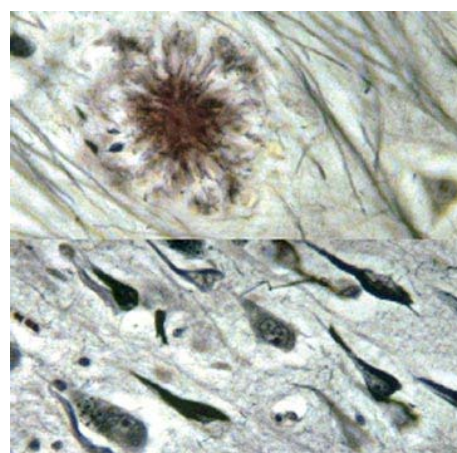
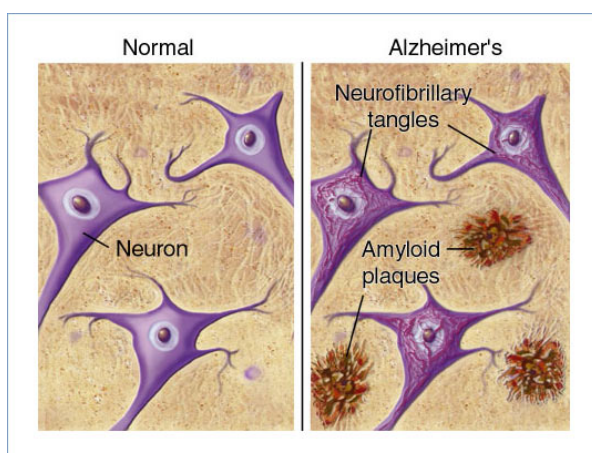
Figur 1a: AD-hjerne med uttalt kortikal atrofi



(b)

Figur 1b: Normal hjerne

Mikroskopisk karakteriseres AD ved opphopning av amyloide plakk og neurofibrillær tangles i hjernevevet til pasientene. I tillegg til dette ser man et uttalt tap av nerveceller, initialt gjelder dette for kolinerge nevroneer.



Figur 2: Skjematisk tegning som sammenlikner normalt hjernevev med en AD-hjerne.

Figur 3: Lysmikroskopisk bilde av plakk (øverst) og tangles (nederst)

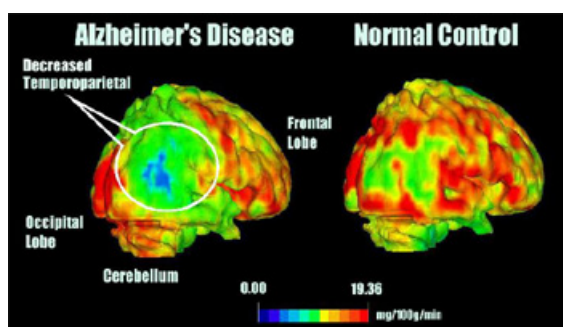
3.5-Diagnostisering

Klassifikasjonssystemet ICD-10 deler Alzheimer i 2 kategorier etter blant annet alder ved debutering av sykdommen. Begge gruppene må oppfylle generelle kriterier for demens. Dette er tilstedeværelse av kognitiv svikt samt svikt av emosjonell kontroll, motivasjon eller sosial atferd. Pasienten må likevel være ved klar bevissthet og tilstanden må ha vart i minst 6 måneder (4).

Ved mistanke om Alzheimers sykdom er det svært viktig først å utelukke differensialdiagnoser som til tider kan minne sterkt om AD. Dette er blant annet depresjon, hypotyreose, hjernesvulst, delir og afasi av andre grunner samt syns- og hørselssvekkelse. I tillegg kan medikamenter indusere demenssymptomer hos eldre personer.

MMS (mini mental score) er en test som brukes til å påvise moderate grader av kognitiv svikt. Testen egner seg meget godt til bruk i allmennpraksis som et screeningsverktøy. Men ulempen ved MMS er at den er lite sensitiv ved begynnende demens.

CT-caput kan vise om det er synlig atrofi i hjernen og bør rekvireres av legen. Men det som kompliserer det hele er skillet mellom patologisk atrofi som ledd i Alzheimers sykdom og fysiologisk aldersbetiget substanssvinn.



Figur 4: SPECT (eller andre cerebrale blodstrømsstudier) kan også benyttes av spesialist til å differensiere AD fra andre former for demens.

Ved Alzheimers sykdom forventer man å finne redusert perfusjon avgrenset til hjernens temporoparietale regioner som et uttrykk for substanssvinn i disse områdene. Ved frontotemporal demens derimot, vil frontalregionen være mest affisert (5). Det er likevel knyttet en del usikkerhet til den diagnostiske presisjonen av SPECT hos eldre med kognitiv svikt.

I spinalvæsken til AD-pasienter kan ulike proteiner påvises, men de er ikke tilstrekkelig sensitive eller spesifikke til klinisk bruk.

Diagnosen AD kan egentlig ikke stilles med sikkerhet før pasientens hjerne blir undersøkt post mortem. Først da kan man undersøke om de patologiske kriteriene for sykdommen, nemlig plakk og tangles, er oppfylt.

3.6-Disponerende faktorer

Risikofaktorene for AD kan vi dele inn i genetiske og ervervede.

De genetiske faktorene som kan bidra til eller forårsake Alzheimer er blant annet mutasjoner i genene for APP, PS1 og PS2, Downs syndrom (trisomi 21) og polymorfisme i genene for Apolipoprotein-E, A2M og LRP.

Amyloide avleiringer er som sagt ment å ha en sentral rolle i sykdommens patofysiologi. Derfor kan både APP-proteinet og alle andre proteiner som deltar og eller modifierer metabolismen av APP, være sete for mutasjoner og dermed genetiske risikofaktorer.

Genetiske polymorfismer øker risikoen for sent debuterende AD.

Apolipoprotein-E (ApoE) er normalt tilstedet i lipoproteinpartikler som er ansvarlige for lipidtransporten i blod og vevsvæske. På grunn av polymorfisme kan genet for dette proteinet kode for 3 forskjellige varianter av ApoE, nemlig ApoE₂, ApoE₃ og ApoE₄. Mens ApoE₃ er den mest vanlige varianten, og ApoE₂ virker beskyttende mot AD, regnes ApoE₄ for å være en risikofaktor for utvikling av både hjerte-karsykdommer og sent debuterende AD.

Homozygote for ApoE₄-allelet har betydelig økt risiko for å utvikle AD etter 75 års alderen mens heterozygote har en moderat forhøyet risiko for sykdommen.

Likeledes mener man at liknende polymorfismer i genene for A2M (alfa-2-makroglobulin) og LRP (low density lipoprotein-reseptorrelatert protein) påvirker Alzheimers sykdom. Mens A2M er en proteasehemmer til stede i vevsvæsken, er LRP en ApoE-reseptor i cellemembraner som også kan binde APP og A2M.

Det er sannsynlig at allele former for ApoE, A2M og LRP, påvirker omsetningen av A β -proteinet via følgende reaksjonsvei:

- A2M binder seg til ekstracellulært A β og danner et proteinkompleks som i sin tur binder seg til LRP på cellemembraner. Her blir komplekset endocyttert og degradert.
- ApoE konkurrerer med A β om binding til LRP
- ApoE kan også konkurrere med A β -A2M-komplekset om binding til LRP

Alle disse 3 proteinene, ApoE, A2M og LRP, avleires også i senile plakk. Derfor kan det tenkes at de har ulik effekt på deponering av amyloid i hjernen. ApoE₄ antas i tillegg å føre til økt dannelse av tangles i nevroner (2,3).

Ervervete risikofaktorer assosieres enten med økt APP-syntese eller økt nevrotoksisitet av A β -proteinet. Nevronal skade medfører en inflammatorisk respons, gliaaktivering og økt dannelse av blant annet APP, ApoE, A2M og LRP.

Generelt kan man si at høy alder er den viktigste risikofaktoren for AD. Etter en alder av 65 år vil risikoen fordobles for hvert 5. år. Aldring medfører økt oksidativt stress og dannelse av frie oksygenradikaler, noe som vil øke nervecellenes sårbarhet. Dette skyldes antakelig en nedsatt aktivitet av DNA-reparasjonsenzymene. På denne måten kan A β -proteinets akkumulering i hjernevevet virke mer nevrotoksisk hos eldre.

Høy alder er også assosiert med stadig økt risiko for svikt i prosesseringen av mRNA som igjen kan resultere i dannelse av endrede former av proteiner uten at det foreligger mutasjoner i genene. Det er kjent at slik svikt kan gi opphav til en abnorm variant av APP-proteinet. Om denne APP-varianten kan forårsake amyloidavleiringer, er ennå uklart (2).

Traumatiske hodeskader øker risikoen for AD (f.eks. hos bokser) og det samme gjør trolig cerebrovaskulær sykdom og koronar hjertesykdom. Dette er muligens på grunn av redusert cerebral perfusjon og iskemi-indusert nevronal skade som igjen forårsaker økt A β -dannelse. Hos pasienter med AD som er positive for ApoE₄ er det funnet økt hyppighet av tilstedeværelse av herpes simplex-virus type I og chlamydia pneumonia-genom. Dette har medført spekulasjoner om at infeksjon med disse agens kan øke risikoen for utvikling eller forverring av AD.

3.7-Behandling

Det finnes foreløpig ingen kurerende behandling for Alzheimers sykdom. Derfor kan AD-pasienter inntil videre bare tilbys symptomatisk behandling.

En av årsakene til AD kan være svikt av neurotransmitteren acetylkolin. Dette budbringer-molekylet spiller en stor rolle for hjernens kognitive funksjoner, deriblant hukommelsen. Man har forsøkt å behandle pasientene ved tilførsel av byggesteinene til acetylkolin uten at det har gitt tilfredsstillende resultater. Derimot har man fått bedre resultater av å gi pasientene behandling med kolinesterasehemmere, som hindrer nedbrytning av allerede eksisterende acetylkolin. Aricept, Exeron og Reminyl blir bare anbefalt gitt til pasienter med mild til moderat AD.

De psykologiske symptomene som er en del av bildet ved Alzheimers sykdom, blir ofte behandlet med medikamenter som ellers brukes til de samme symptomene innen psykiatrien. Her har for eksempel SSRI-preparater (selektive serotonin reopptaksinhibitorer) en sentral rolle ved emosjonelle forstyrrelser som depresjon, angst og aggressivitet. Det kan også bli aktuelt å behandle med antipsykotiske midler ved symptomer som uttalt mistenksomhet og vrangforestillinger (4).

Da man mener at oksidativt stress spiller en rolle i patogenesen av Alzheimer, er det naturlig å foreslå økt inntak av antioksidanter både i form av frukt og grønnsaker og i form av vitaminer (vitamin C og E) som forebyggende behandling. Det finnes studier som bekrefter antioksidanters gunstige virkning på AD (6), men flere andre faktorer kan virke forebyggende ved å utsette debut og forsinke forløpet av sykdommen. Disse er blant annet regelmessig mosjon og sunt kosthold, adekvat behandling av hypertensjon, reduksjon av kolesterol og andre kjente risikofaktorer. Og sist men ikke minst: det er sunt å bruke hjernen!

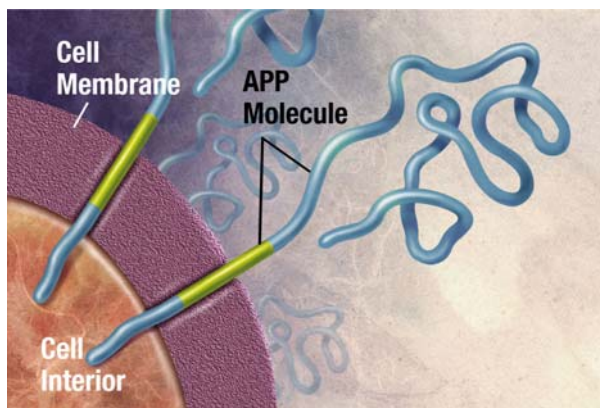
4- BASALMEDISINSK FORSKNING INNEN ALZHEIMERS SYKDOM

I min forskning har jeg undersøkt hvorvidt det forekommer ulike former av A β -proteinet i hjernemateriale fra Alzheimer pasienter post mortem (abstract 1, se vedlegg).

Videre har jeg undersøkt en transgen musemodell med tanke på forekomst av plakk og tangles. Nytteverdien av å karakterisere slike modeller er at de kan tjene som et godt verktøy i kartlegging av basale mekanismer som ligger til grunn for Alzheimers sykdom (abstract 2, se vedlegg).

4.1-Innledning til studier av basale mekanismer vedrørende Alzheimer-forskning

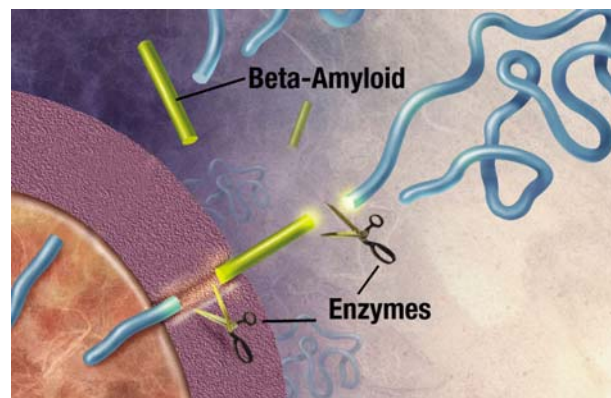
4.1.1-Plakkdannelsen

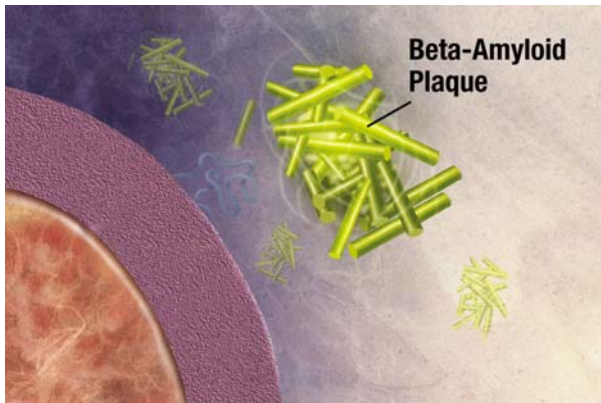


Figur 5a: APP (amyloid-precursor protein) er et transmembranprotein med et lite intracellulært og et stort ekstracellulært domene.

Funksjonen til dette proteinet er ennå ikke kjent, men forbindes med celle-til-celle kontakt, muligens i form av en membranreseptor. Proteinet er å finne i kolesterolholdige områder, såkalte "lipid rafts". Disse områdene er satt i forbindelse med nedbryting av APP idet de endocytteres.

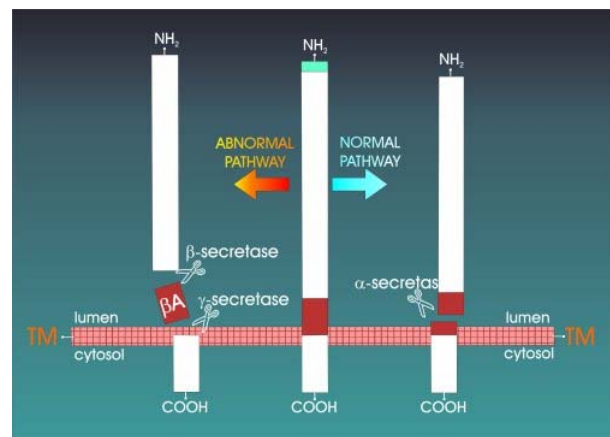
Figur 5b: Her blir APP spaltet ved hjelp av enzymene β -sekretase og γ -sekretase. Dette er en patologisk metabolisme av APP-proteinet som resulterer i et aggregatprotein kalt Amyloid- β (A β).



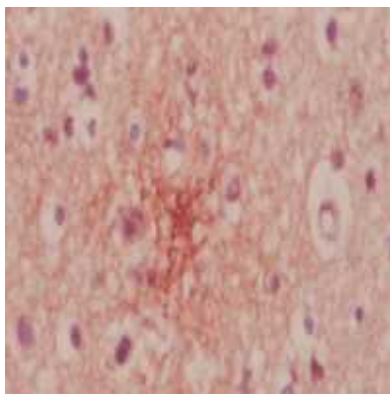


Figur 5c: $A\beta$ er et uløselig polypeptid på 42-43 aminosyrer som polymeriseres til amyloidfibriller. Disse fibrillene aggregerer og danner større proteinutfellinger som blir kalt for amyloide plakk.

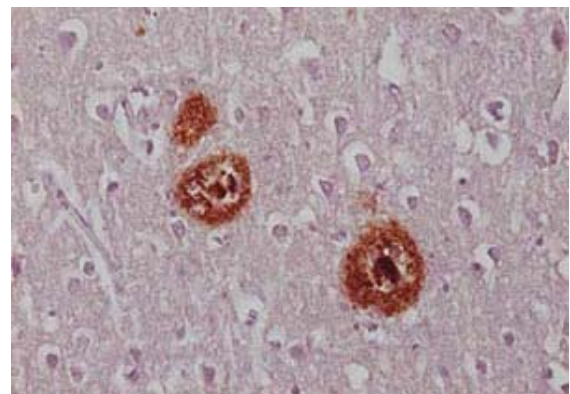
Figur 6: APP blir normalt metabolisert via enzymet α -sekretase som spalter proteinet i den amyloiddannende regionen og dermed danner et ufarlig løselig molekyl. Som nevnt tidligere er det 2 andre enzymer som er ansvarlige for den patologiske nedbrytningen av APP-proteinene (2,7).



Senile plakk er en fellesbetegnelse for plakk i alle former og stadier. Plakk i et tidlig stadium kalles diffuse plakk og består for det meste av ikke-fibrillær ekstracellulær $A\beta$. Nevrittiske plakk derimot inneholder $A\beta$ i fibrillær form omringet av ødelagte aksoner. Disse kommer i et senere stadium av sykdommen (7).



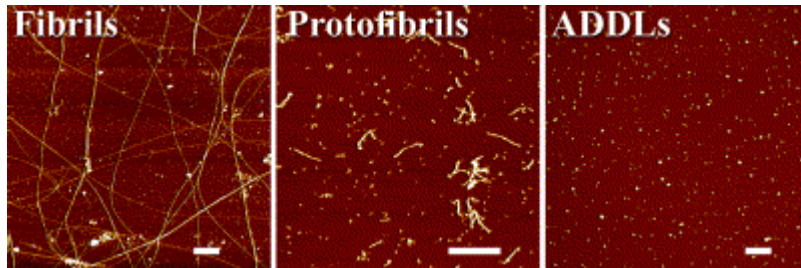
Figur 7: Diffus amyloid plakk



Figur 8: Nevrittiske amyloide plakk

4.1.2-Forstadier til plakk

Etter hvert har man begynt å fokusere mer på forstadiet til A β -fibriller, nemlig den løselige formen for A β før den begynner å aggregere. Dette er et oligomerisk protein som også blir kalt for ADDL (A β -derived diffusible ligands). Disse finnes i 2 former: en sfærisk og en kurvaktig form, hvor de sfæriske partiklene sitter sammen som perler på en snor. ADDL er blant annet funnet i cerebrospinalvæsken til AD-pasienter (8).



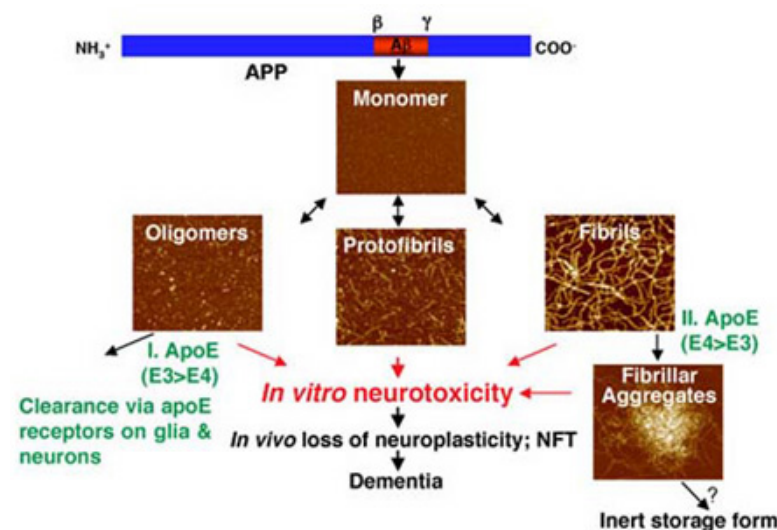
Figur 9: A β i ulike stadier.

Det er flere hypoteser for Alzheimers sykdom.

Den mest kjente blant dem heter amyloid-hypotesen (2). Her blir det satt fokus på opphopningen av A β -proteinene som det første trinnet i en lang kjedereaksjon som fører til neurodegenerasjon ved Alzheimers sykdom. I følge denne hypotesen kommer tanglesformasjonen sekundært til og som en følge av plakkdannelsen. A β er et toksisk protein som påvirker synapsene og aktiverer astrocyttene. Resultatet blir progressivt skade på synapser og nevroner. Skadene endrer ione-sammensetningen i nervecellene som igjen fører til oksidativt stress og endret kinase/protease aktivitet. Det siste fremmer formasjonen av tangles samt en omfattende celledskade som resulterer i massiv celledød og til sist demens.

Men hvilken form er den mest toksiske formen av A β ?

Nyere data viser til at det er den oligomere formen av A β som muligens er den mest toksiske varianten (9), ja faktisk opptil 1000 ganger mer toksisk enn A β 42-fibre. Dette settes i forbindelse med at oligomere former er løselige og kan bevege seg fritt i hjernevevet og blokkere synapsefunksjoner.



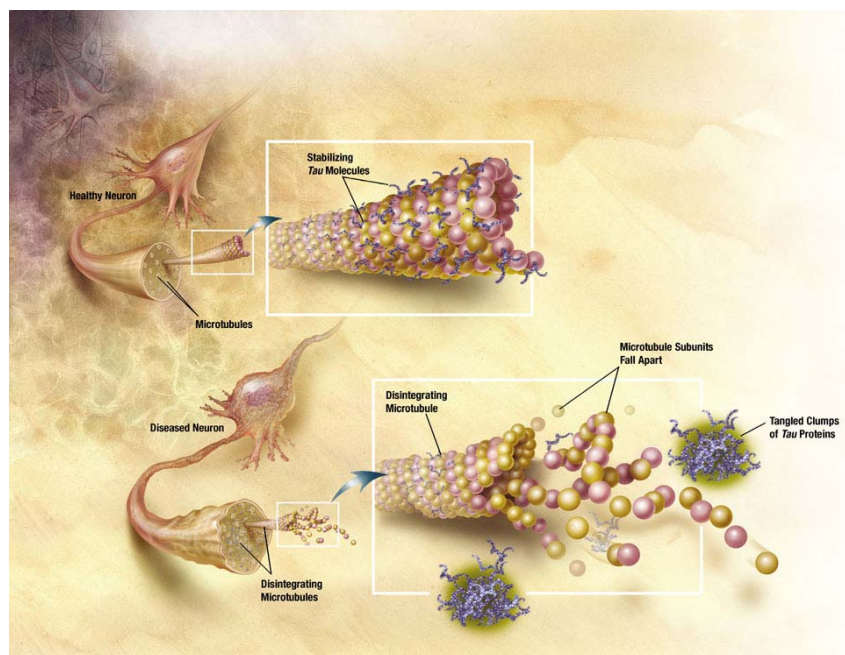
Figur 10: Bildet til venstre viser en skematisk fremstilling av monomere A β -fibriller og aggregering til inerte plakk.

4.1.3-Nevrofibrillær tangles (NFT)

Som beskrevet tidligere krever post mortem-diagnosen av AD tilstedeværelse av både nevrittiske plakk og tangles.

NFT er filamenter med hyperfosforylerte tau-proteiner som er tvinnnet sammen og danner store aggregater. Tau er et løselig strukturprotein som normalt er lokalisert i aksoner. Der virker den stabiliserende for mikrotubuli og fremmer polymerisering av denne.

Patologisk tau har derimot mindre affinitet for mikrotubuli som derfor vil depolymerisere samtidig som det blir dannet større filamenter med patologisk tau. Disse filamentene er aksonskadelige (10).



Figur 11: Skjematisk skisse over hyperfosforylering av tau-proteiner i en syk celle sammenlignet med en frisk nervecelle

4.1.4-Dyremodeller for Alzheimers sykdom

For å studere sammenhengen mellom plakk og tangles og deres effekt på synaptisk funksjon, benyttet vi en trippel-transgen modell, en anerkjent modell for interaksjon mellom disse proteinene. Modellen er enestående idet den uttrykker begge ”hallmarks” i motsetning til mange andre modeller som kun uttrykker plakk (11,12).

Flere studier indikerer at hukommelsesvansker i mange transgene AD-modeller kommer før akkumuleringen av ekstracellulære plakk. De transgene 3xTg musene utvikler en aldersavhengig opphopning av plakk og tangles i de relevante områder i hjernen. I disse musene er det første patologiske manifestasjon opphopningen av A β intranevronalt. Og mangel på synaptisk plastisitet samt forstyrrelse av læring og hukommelse ser nettopp ut til å induseres av akkumulasjon av intranevronal A β .

I tillegg er det vist at disse musene mangler alfa-7-nikotinerge acetylkolin-reseptorer i de områder i hjernen hvor det er en slik intranevronal oppsamling.

Dette støtter opp under teorien om at intracellulær A β spiller en viktig rolle (11,12).

4.2-Metoder

4.2.1-Humant autopsimateriale fra AD pasienter

Post mortem-materiale ble hentet fra en hjernebank i "Institute of Brain Aging and Dementia, Irvine, California". Alzheimer pasienter som blir medlem i denne klinikken donerer automatisk hjernen sin til forskning etter døden. De får en tett oppfølging gjennom de ulike fasene i sykdommen og får samtidig kartlagt sine kognitive funksjoner fortløpende. Dermed vil forskere som benytter seg av disse materialene kunne ha en klinisk og mental status å knytte sine funn opp mot. Dette samtidig som pasientene og deres pårørende vil få god hjelp fra klinikken mens pasienten fortsatt er i live.

Det er selvfølgelig umulig å perfunderer en menneskehjerne av etiske hensyn. Derfor vil morfologien i humant materiale ofte være dårligere bevart.

4.2.2-Konstruering av transgene mus

Transgene mus er mus som har fått manipulert sine gener ved hjelp av tekniske hjelpemidler. Det kan enten være tilsatt (knock-in) eller fjernet (knock-out) DNA fra dyrets genom.

Disse musene kan brukes i en rekke forskjellige sammenhenger, deriblant innen basalmedisinsk forskning. Her får forskerne anledning til å studere egenskapene til et bestemt gen nøyere.

Det finnes 3 forskjellige metoder som kan brukes til å lage transgene mus på (13):

1-mikroinjeksjon i befruktet eggcelle:

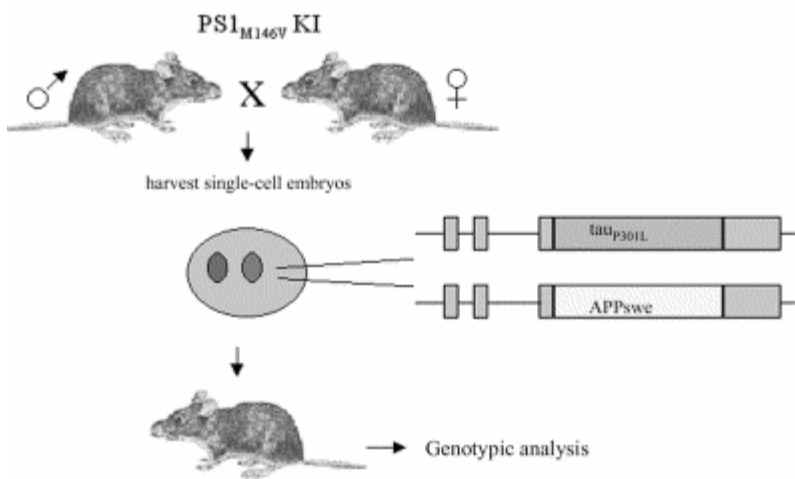
Transgenet injiseres i en befruktet eggcelle før celledifferensieringen er startet. Dermed blir celler i alle organene hos det nye individet transgene. Men ved denne metoden kan man ikke på forhånd styre hvor det aktuelle transgenet skal plasseres i genomet og transgenet kan til og med ødelegge et vitalt gen i cellen den blir injisert i. Derfor vil de fleste eggcellene gå til grunne eller ikke uttrykke transgenet. Mellom 1-30 % av eggcellen kan gi opphav til levende transgene dyr.

2-blastocyst injeksjon:

Her blir transgenet først injisert i embryonale stamceller (ES-celler). (Dette er museceller i kultur som er i stand til å differensiere til alle typer vev). Deretter skal man påvise at transgenet finnes i ES-cellene, før de blir injisert i muse-blastocyster. (Blastocyststadiet er et stadium av fosterutviklingen der fosteret ennå ikke er noe mer enn en celleblære med hulrom inni. Dette er lenge før celledifferensieringen starter). Ved denne metoden blir dyret en mosaikk, som betyr en blanding, av transgene og opprinnelige celler. Noen kjønnsceller er transgene mens andre ikke er det. Mosaikkdyrene kan pares med hverandre slik at man får frem homozygote transgene dyr.

3-vha. et retrovirus:

Her blir det brukt virus til å overføre et transgen inn i musecellene. Virusgenet er da rekombinant. Disse dyrene blir også mosaikk og må derfor avles videre for å skape homozygote transgene dyr. Det kan også være behov for spesielle oppbevaringsmetoder for disse musene, da de kan være smittefarlige.



Figur 12: Våre mus er blitt avlet frem etter metode 1 (beskrevet ovenfor). Ved en mikroinjeksjonsteknikk har man injisert 2 uavhengige transgener, for henholdsvis humant APP og tau, samtidig inn i encellede embryo. Disse var høstet fra knock-in mus som var homozygot for en mutasjon i PS1-genet. Embryoene ble deretter reimplantert i fostermødre. Ved å kartlegge avkommets genotype ved Southern blotting ble de aktuelle

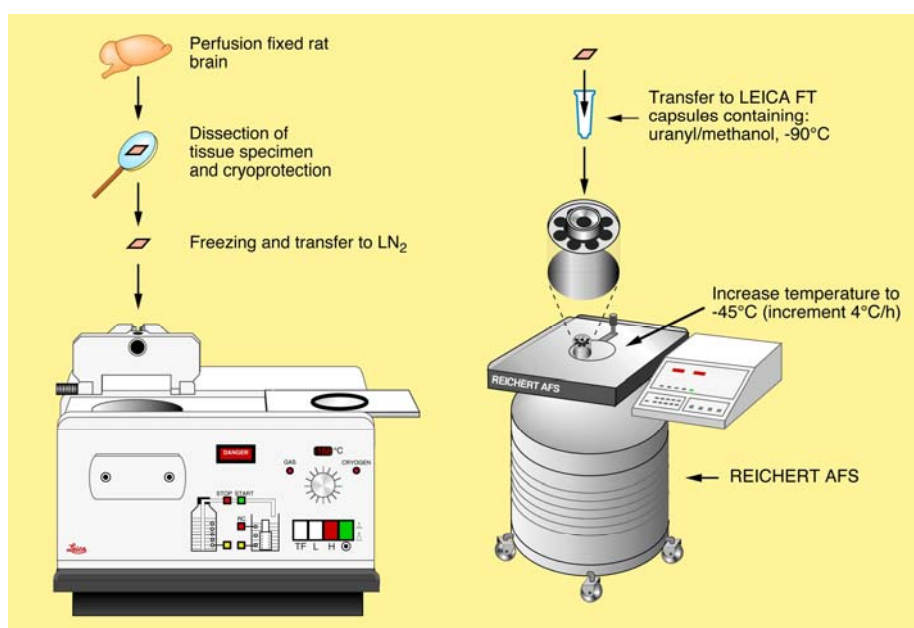
trippel-transgene musene identifisert. Dette ble også verifisert på proteinnivå med Western blotting (11).

4.2.3-Innstøpning og frysesubstitusjon

Både humant materiale og dyremateriale ble behandlet for innstøpning.

Humant materiale var fra pasienter uten AD-diagnose, med mild eller fremskreden sykdom.

Dyrene ble avlivet ved ulike aldre: 6mnd, 12mnd, 18mnd og 30mnd. For å bevare morfologien best mulig ble det humane materialet inkubert i en paraformaldehydløsning og musene perfunderert med paraformaldehyd i blanding med glutaraldehyd. Etter perfusjon ble hjernen tatt ut og lagret i en fortennet løsning inntil videre prosessering. For å orientere hvor i vevet plakker og tangles befant seg benyttet vi lysmikroskopiske snitt inkubert med antistoffer rettet mot disse. (For protokoll: se under immunocytokjemiske metoder, protokoll for LM-snitt). Tilsvarende områder i nabosnitt ble så dissekert ut og støpt inn i et plastmateriale. I hovedsak var det områder fra cortex og hippocampus.



Figur 13: Frysesubstitusjonsteknikk: Bildet til venstre viser en skjematisk fremgangsmåte på innstøpning av biologisk materiale. Vevet kommer ut i plastkapsler som muliggjør skjæring på ultramikrotom.

4.2.4-Immunocyto kjemisk teknikk

Det innstøpte materialet ble skåret på en ultratom, først i semitynne deretter i ultratynne snitt. De semitynne snittene ble farget med tuldoidinblått og studert gjennom et lysmikroskop. Disse ble brukt som et grovere kart over celler og strukturer som befant seg på vevet slik at man lettere kunne orientere snittene under elektronmikroskopet.

Protokoll for merking av LM (Light microscopy)-snitt:

- 1- skyll med 0,1 M Napi
 - 2- inkuber i 1 M ethanolamin i 0,1 M NaPi (pH 7,4) – 30 min
 - 3- vask i buffer A – 3x1 min
 - 4- inkuber i buffer B med 10% nyfødt kalveserum og NaN_3 (1mg/ml) – 1t
 - 5- inkuber i primær antistoff i samme løsning – 12 til 48 t
 - 6- vask i buffer C – 3x1 min + 2x10 til 20 min
 - 7- inkuber i biotinilert esel-anti-kanin Ig (1:100) i buffer C – 1t
 - 8- vask i buffer C – 3x1 min + 2x10 til 20 min
 - 9- inkuber med streptavidin-biotinilert horseraddish peroxidase komplekser (1:100) i buffer C – 1 t
 - 10- vask med buffer C – 3x1 min + 2x10 til 20 min
 - 11- vask i buffer A – 3x1 min
 - 12- Inkuber i 0,1 M NaPi uten H_2O_2 , men med diaminobenzidin – 6 min
 - 13- Inkuber i 0,1 M Napi med H_2O_2 og diaminobenzidin – 5 min
 - 14- Stopp reaksjonen med 0,1M Napi – 2x3 min
- 0,1M NaPi med pH 7,4: 1000 ml H_2O
 - 11,5 g Na_2HPO_4
 - 2,3 g NaH_2PO_4
 - Buffer A: 0,135 M NaCl + 0,01 M NaPi
 - Buffer B: 0,3 M NaCl + 0,1 M Tris buffer (pH7,4)
 - Buffer C: buffer B + 1% nyfødt kalveserum (uten NaN_3)

Protokoll for merking av EM (elektron microscopy)-snitt:

- 1- griddene etses i natriummethanolate (fjerner plast og blottlegger epitoper)
- 2- inkuber i TBST med 50 mM glycine – 10 min
- 3- inkuber i TBST med 2% HSA – 10 min
- 4- inkuber i primærantistoff blandet med TBST+2% HSA (human serum albumin) – over natten
- 5- vask 3 ganger i TBST
- 6- legg i TBST – 10 min
- 7- vask 3 ganger i TBST
- 8- legg i TBST – 10 min
- 9- legg i TBST+ 2% HSA – 10 min
- 10- inkuber i gullpartikler blandet med 2% HSA og PEG (polyethyleneglycol) – 1 time
- 11- vask 6 ganger i DDW (dobbeltdestilert vann)

12- tørk griddene

13- fremkalling: inkuber i 2% uranyl-acetat – 1,5 min

vask 3 ganger i DDW

tørk griddene

inkuber i 0,3% bly-citrat – 1,5 min

vask 3 ganger i DDW

tørk griddene

- TBST (trisphosphatebuffersaline) :

1000 ml 0,1M natriumfosfatbuffer pH 7,4

200 ml 0,05 M Tris/HCl-buffer pH 7,4

700 ml destilert H₂O

7 g NaCl

0,4 g KCl

(evt. tilsatt 0,2g NaN₃ mot oppvekst av bakterier)

Antistoffer som ble brukt:

A β -42: gjenkjenner aminosyrene 1-42 i A β -domenet i APP, produsert i University of Irvine, (polyklonalt antistoff)

6E10: gjenkjenner alle former for amyloid (monoklonalt antistoff)

G-10: gjenkjenner A β -40 (monoklonalt antistoff)

G-11: gjenkjenner A β -42 (monoklonalt antistoff)

A11: gjenkjenner oligoformer av A β -proteinet, produsert av Glabe-lab, UCI, Irvine

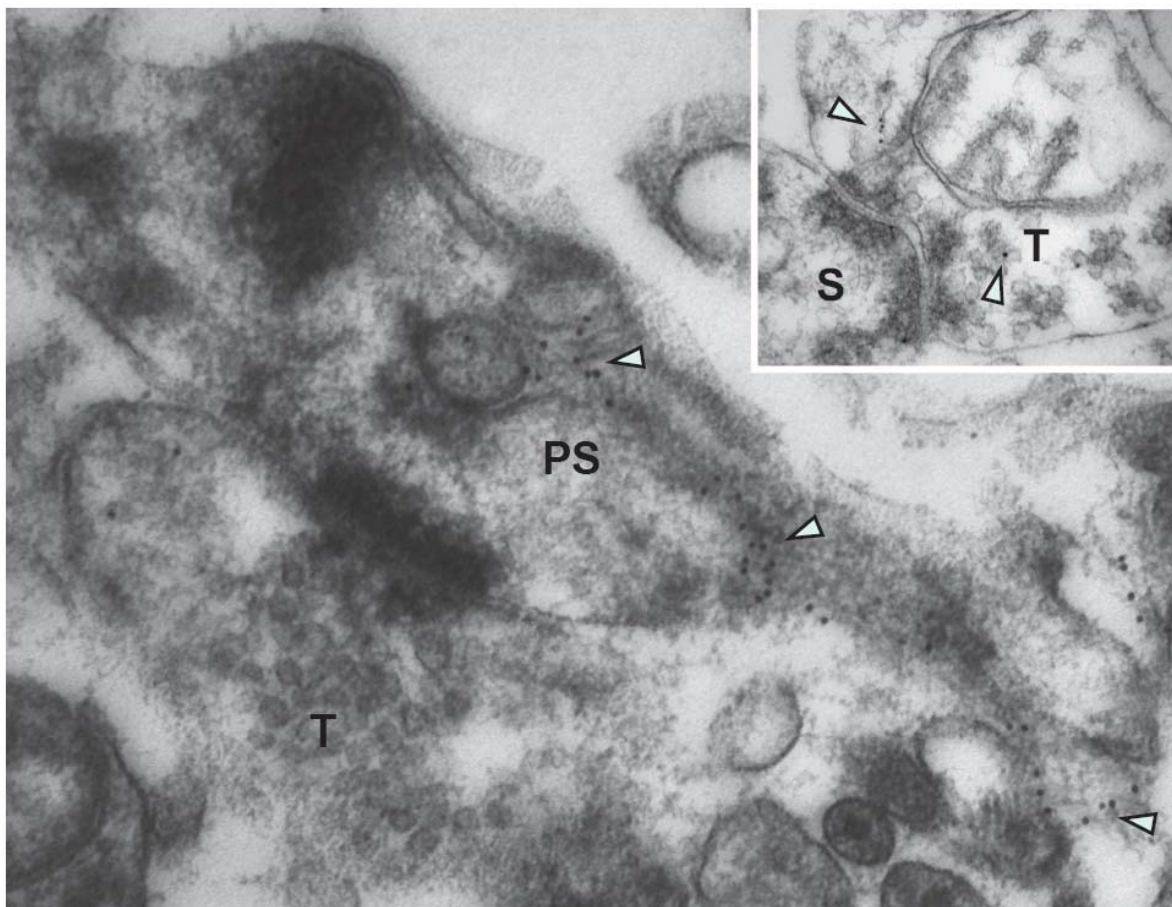
AT-8: gjenkjenner hyperfosforylering av tau-proteinet (monoklonalt) Chemicon

PHF: gjenkjenner paired helical filaments (polyklonalt) Chemicon

4.3-Resultater

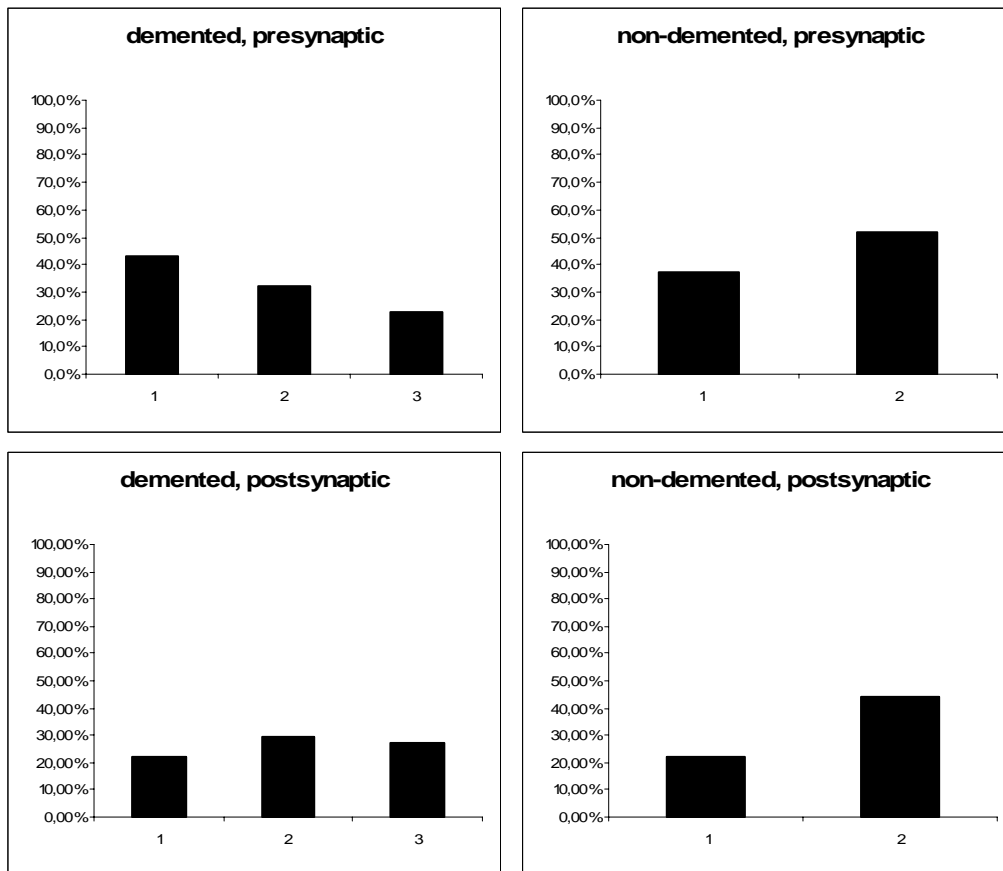
1-Er opphopning av A β -oligomerer i nerverterminaler årsaken til synaptisk dysfunksjon ved AD?

For å svare på dette spørsmålet ville vi undersøke om det er mulig å detektere en reell opphopning av ADDL i nerverterminaler hos pasienter. Autopsimateriale fra 3 AD-pasienter og 2 kontroll-pasienter ble brukt til dette formålet. Ved hjelp av immunocyto-kjemiske teknikker ble ultratynne snitt fra hjernen til hver pasient inkubert i A11-antistoffet som gjenkjenner oligomerisk A β . Snittene ble så studert ved hjelp av et elektronmikroskop og det ble tatt bilder av tilfeldige synapser.



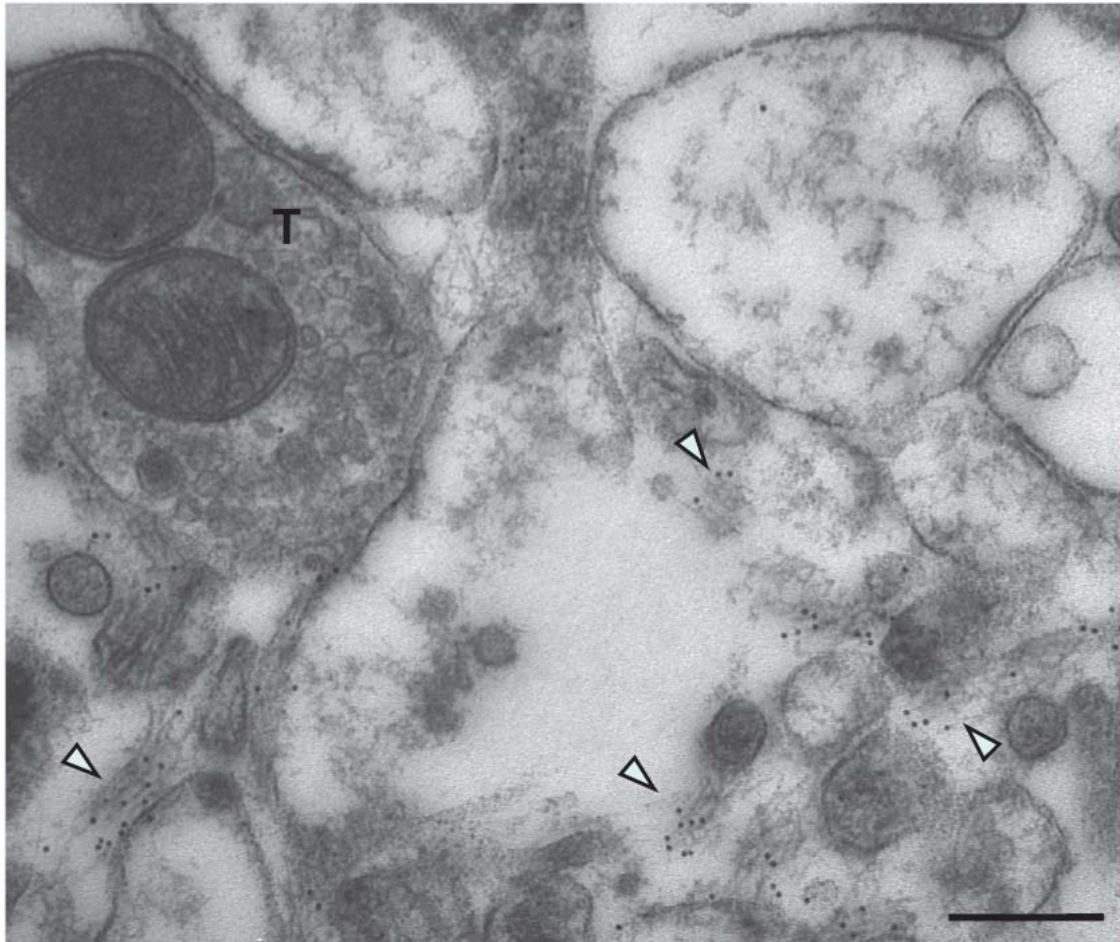
Bilde 1: Synapser merket med A11, antistoff rettet mot oligomerisk A β . På begge bildene ser vi gullpartikler i både presynaptisk (merket med T) og postsynaptisk (PS og S) terminal.

Det ble gjort en kvantifisering av mengden oligomerisk A β lokalisert i synapser. Pre- og postsynaptiske terminaler ble kvantifisert hver for seg og resultatene ble plottet inn i hvert sitt histogram.



Figur 14: Det ble laget 2 histogram for hver pasientgruppe (pasient 1, 2 og 3 demente og pasient 1 og 2 ikke-demente) som viser hvor stor andel av et gitt antall tilfeldigvalgte synapser (>50) inneholdt gullpartikler.

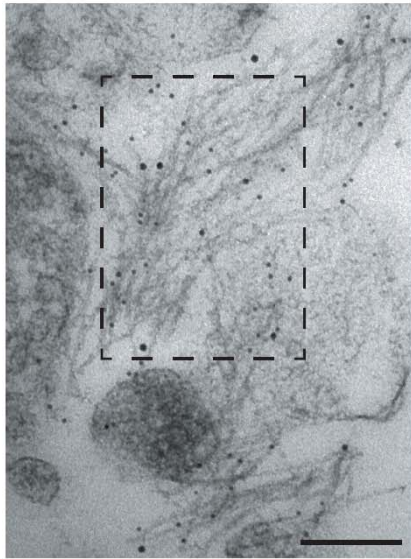
Etter å ha studert resultatene og sammenliknet demente og ikke-demente pasienter, kan vi ikke finne noen signifikant forskjell mellom disse 2 pasientgruppene. Dermed kan vi ikke bekrefte at det finnes mer A β -oligomerer lokalisert i synapser hos AD-pasienter sammenliknet med ikke-demente eldre mennesker. Om den lille mengden som er der likevel kan forårsake en synaptisk dysfunksjon, kan vi ikke si noe om med sikkerhet. Andre strukturer i hjernevevet ble undersøkt. Her kunne oligomere befinne seg både i gliastrukturer og i ekstracellulært materiale (se bilde 2). Løselige oligomere som transporteres lett over cellemembraner kan tenkes å være toksisk idet de har områder i proteinet som kan polymeriseres med seg selv og andre strukturer. På denne måten kan for eksempel ionekanaler, synaptisk transmisjon og andre transportmekanismer blokkeres, som får betydning for cellens funksjon.



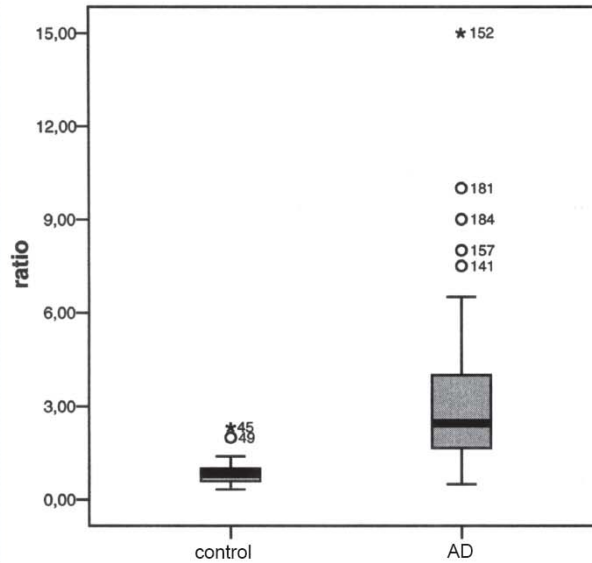
Bilde 2: Pilene peker på områder med A β -fibriller som er merket med gullpartikler. Dette bekrefter tilstedeværelse av oligomere former av A β også ekstracellulært.

2- Består typiske AD-plakk bare av A β i fibrillær form? Eller finnes det også A β -oligomere i plakk?

Her ble det igjen brukt autopsimateriale fra tidligere AD-pasienter samt kontrollpasienter (som ikke hadde den kliniske diagnosen AD). Ultratynne snitt ble denne gangen inkubert i 2 antistoffer, nemlig A β -42 og A11. A β -42 er et antistoff som gjenkjenner den aggregerte formen for A β mens A11 er rettet mot oligomerisk A β . Snittene ble studert under elektronmikroskopet og det ble tatt bilder av typiske plakk. Det ble så lagt en stiple ramme på et tilfeldig område på bildet og alle små og store gullpartikler innenfor denne rammen ble talt opp. På denne måten fant vi en ratio mellom mengden A11 (små gullpartikler) og A β -42 (store gullpartikler).



Bilde 3: Elektronmikroskopisk bilde av et plakk dobbeltmerket med A11 og A β -42 (henholdsvis store og små gullpartikler). Gullpartiklene innenfor rammen ble talt opp og ratio (A11/A β -42) ble beregnet.

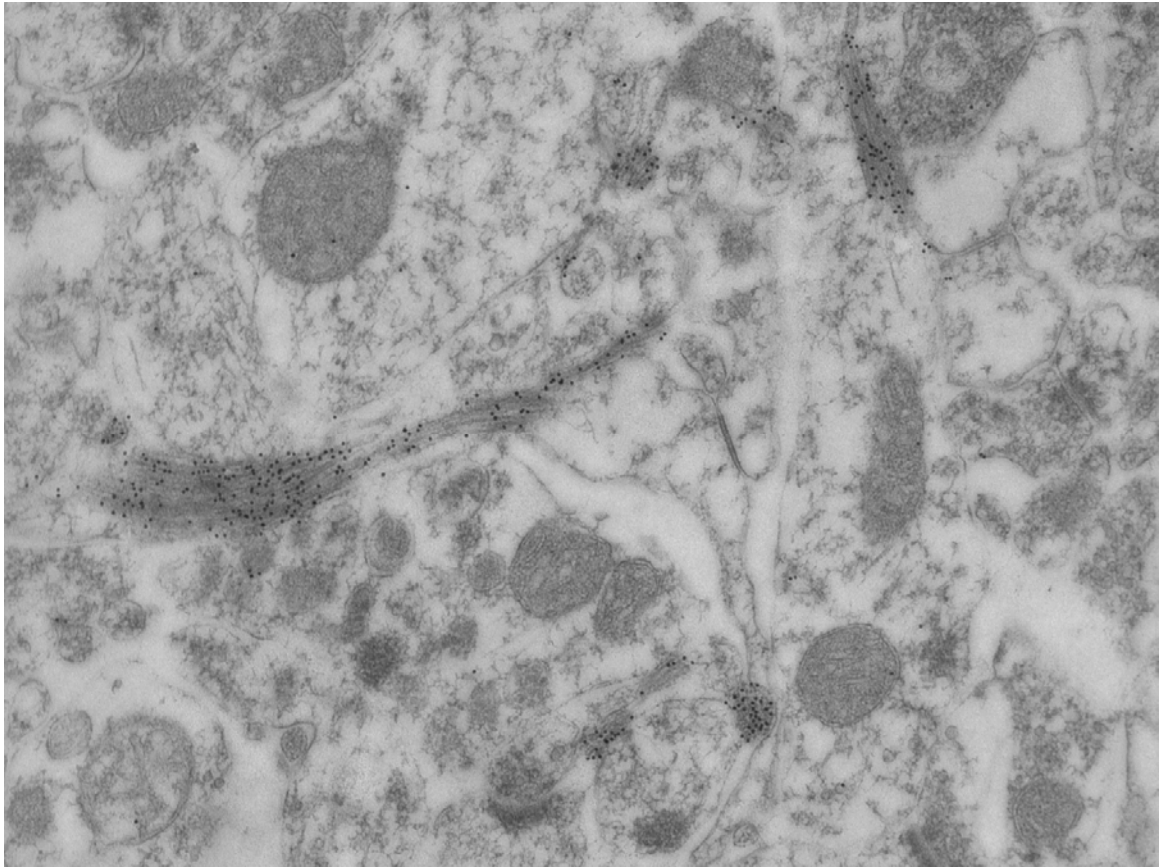


Figur 15: Resultatene fra AD-pasient og kontroll-pasient ble brukt til å lage en boksplot for hver av disse.

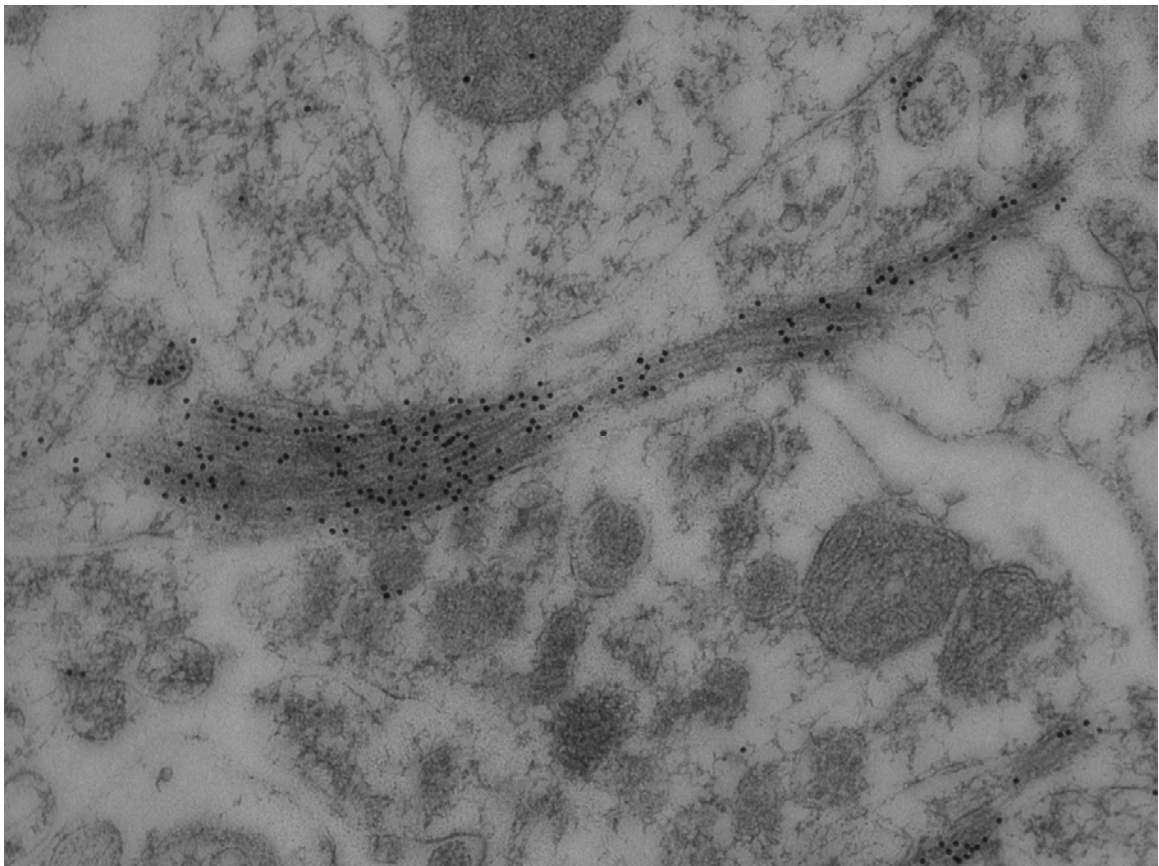
Svakheten med disse funnene er at de baseres på en enkelt Alzheimer pasient (og tilsvarende bare en kontrollpasient). Men hvis vi likevel går ut ifra at denne pasienten er representativ for en rekke AD-pasienter, kan vi trekke følgende konklusjoner: Vi ser en mye større spredning i resultatene fra AD-pasienten sammenliknet med kontroll-pasienten. Mens kontrollhjernen hadde en median-ratio på ca.1 (like mye A11 som A β -42 i plakkene) var det i AD-hjernen mer enn dobbelt så mye A β i oligomerform enn i plakkform. Dette funnet kan styrke teorien om at forstadiet til amyloide plakk, altså oligomerisk A β , er den toksiske formen av proteinet.

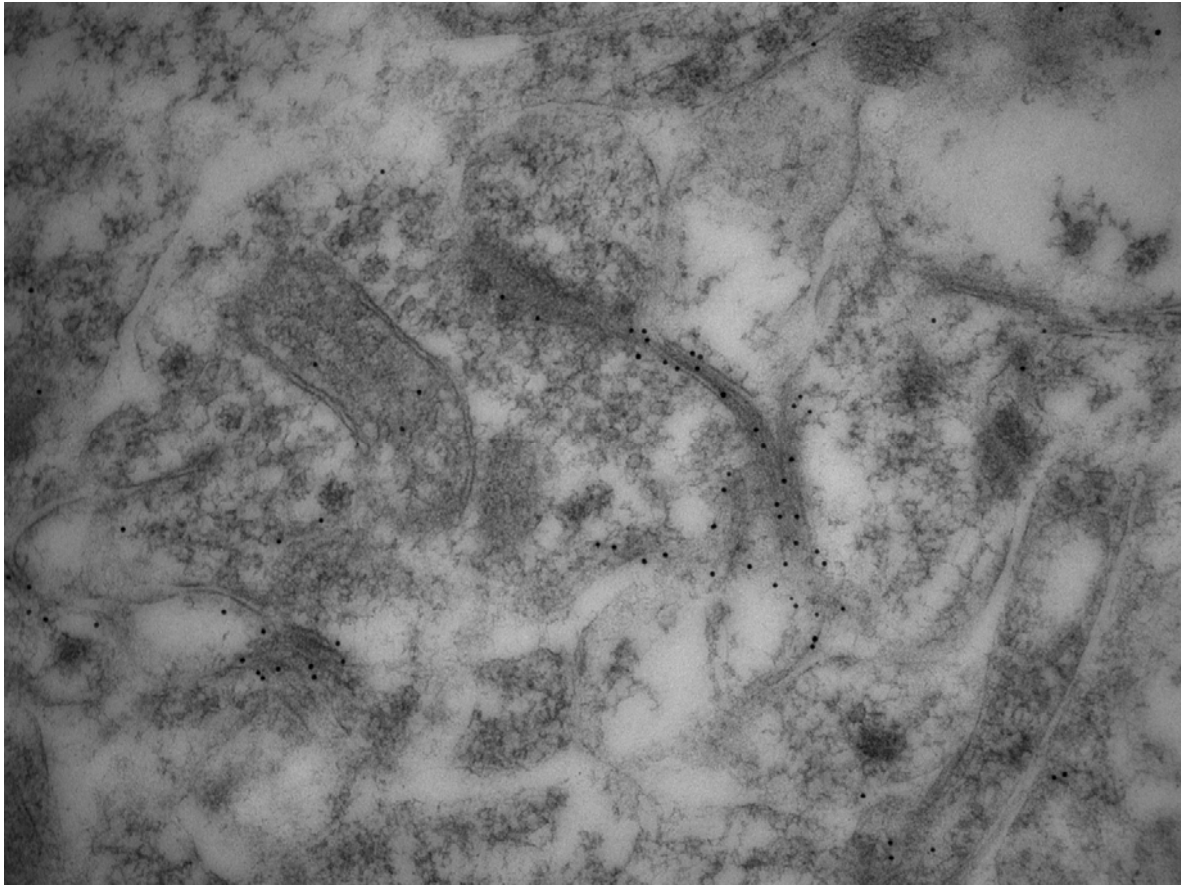
3- I hvilken alder utvikler 3xTg-musene plakk i hjernen? Kommer plakkene før tangles?

For å svare på dette spørsmålet brukte vi materiale fra transgene mus som var avlivet i ulike aldre: 6, 12, 18 og 30 mnd. gamle. Plakkene kom til syne ved 12mnd. Før dette stadiet observerte vi noe immunoreaktivitet intracellulært. Ved 18 og 30mnd var plakkene tydelige med typisk fibrillær struktur. Bildene 4 og 5 viser typiske depoer av plakk merket med gullpartikler. Foruten typiske ekstracellulære aggregater kunne man observere fibriller rundt synapser, noe som kan tyde på direkte affisering av synaptisk funksjon (bilde 6).



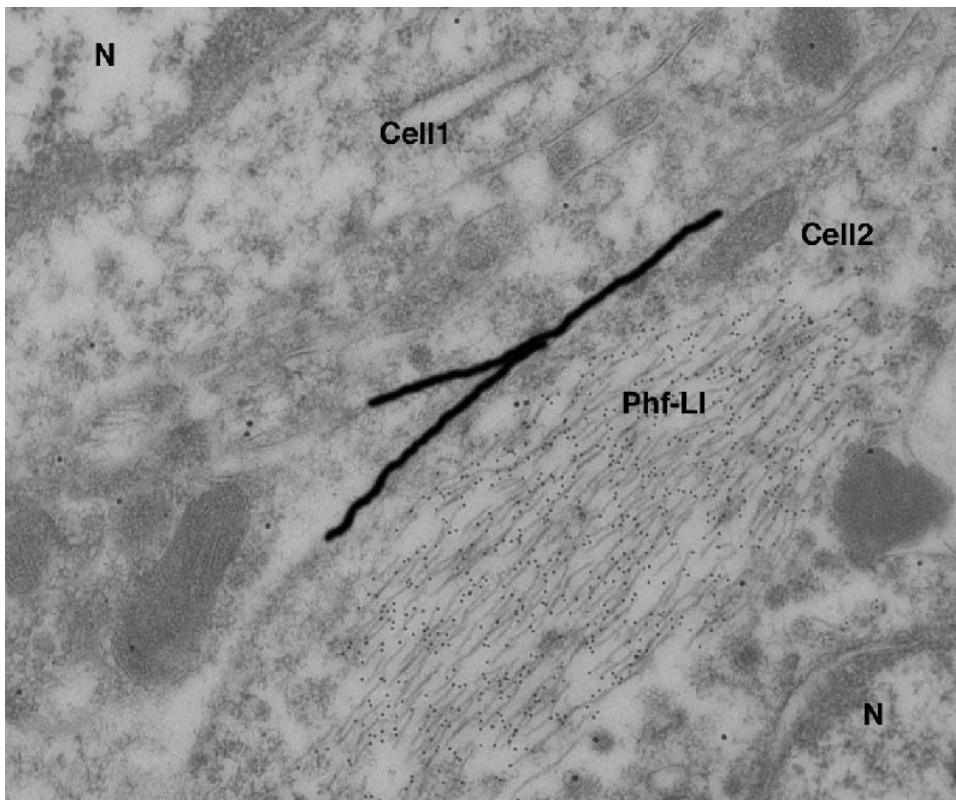
Bilde 4(over) og bilde 5(under): 30 mnd. gammel 3xTg-mus: områder med plakk, ekstracellulær opphopning av A β -42. Bildet over er tatt med 26500x forstørrelse, mens bildet under er samme utsnitt, 40000x forstørret.





Bilde 6: 30mnd. gammel 3xTG-mus, plakk i terminalspalten, G2-11(A β -42 monoklonalt). Kan det tenkes at dette kan blokkere signaloverføringen mellom disse to cellene?

På samme måte som ved datering av plakk undersøkte vi når ulike former av tau-fosforylering forekom. "Modne tangles" kunne kun observeres i 30mnd gamle mus. Dette tyder på at plakkene kommer før tangles.



Bilde 7: 30 mnd. gammel 3xTG-mus, elektronmikroskopisk bilde som viser intracellulær opphopning av nevrofibrillær tangles (markert med "Phf-LI" i en nervecelle). Grensen mellom 2 nerveceller er markert med svart strek.

Arbeidet med kartleggingen av plakk og tangles i disse musene er ennå ikke avsluttet. Det er blant annet interessant å undersøke om man kan finne A11 i dette materialet, og eventuelt hvor. Inntil nå har det dessverre ikke vært kommersielle antistoffer som gjenkjenner A β -oligomere tilgjengelig på markedet. Det gjør at man må benytte seg av det ene antistoffet vi har brukt så langt, A11. Ved bruk av immunocytokjemiske metoder blir resultatet mye mer pålitelig ved bruk av flere parallelle antistoffer som gjenkjenner samme protein!

4.4-Diskusjon

I min forskning har jeg undersøkt ulike former for amyloidproteinet hos Alzheimer pasienter. A β -oligomere har egentlig vært kjent like lenge som andre varianter av A β (15). Man har lenge spekulert i deres sammenheng med A β -fibre og rolle i patogenesen til AD. Men det er først nå, når nye og bedre teknikker er blitt tilgjengelig, at forskere begynner å nøste opp i disse spørsmålene.

Etter hvert ble det utviklet et nytt antistoff, A11, som er i stand til å gjenkjenne A β -oligomere (8). I vårt arbeid har vi brukt dette antistoffet til å kartlegge tilstedeværelsen av oligomere i Alzheimer-hjerner generelt og i områder med amyloide plakk spesielt. Resultatet så langt antyder at A β -aggregater i AD-materialet inneholder en større andel oligomere enn tilsvarende plakk hos ikke-demente individer. Dette er et interessant funn da det samtidig er flere studier som nå viser betydningen av oligomere både innenfor Alzheimer og andre degenerative sykdommer som Parkinson og Huntington.

Mye tyder på at det likevel kanskje ikke er de store proteinaggregatene som er de mest skadelige men heller disse små mikroskopisk usynlige oligomerene!

Det er gjort forsøk på å forhindre akkumulering av denne toksiske formen av A β -proteinet ved hjelp av passiv immunisering av transgene mus med A11. Resultatet var oppsiktsvekkende. Man så nemlig ikke bare en nedgang i mengden oligomere, men også en signifikant reduksjon av mengden fosforylert tau og aktiv GSK3 β (15). Det siste er en av kinasene som fosforylerer tau og dermed bidrar til dannelsen av tangles. Dette funnet er med på å styrke teorien om at A β -oligomere kommer før formasjonen av tangles i patogenesen til AD. Det kan dermed tenkes at et angrep på oligomere former av A β , for eksempel i form av vaksinasjon, er en sikker og effektiv måte å forhindre dannelsen av både plakk og tangles på. De siste produserte transgene musene er en unik modell for Alzheimers sykdom, da de ikke bare uttrykker plakk, men også tangles. Vi har så langt forsøkt å kartlegge utviklingen av sykdom hos disse 3xTg-musene ved å undersøke hjernemateriale fra mus i 4 forskjellige aldre. Men etter hvert kan disse musene også være en ideell modell for videre forskning på de toksiske A β -oligomerene.

Takk til

Til slutt vil jeg takke Reidun Torp som har vært en støttende og tålmodig veileder for meg, samt Professor Ole Petter Ottersen som har gitt meg muligheten til å jobbe på labben hans og være en del av hans forskningsgruppe siden 2002.

5- REFERANSER

1. Engedal K: Diagnostikk og behandling av demens. Tidsskr Nor Lægeforen 2002, 122: 520-524
2. Fladby T, Mæhlen J: Amyloid- og tau-hypotesene ved degenerativ demens. Tidsskr Nor Lægeforen 1999, 119: 976-979
3. Myhre A, Tysnes O: Etiologi og genetikk ved Alzheimers sykdom. Tidsskr Nor Lægeforen 2002, 122: 50-53
4. www.legehanboken.no (Norsk elektronisk legehåndbok)
5. Øksengård A, Haakonsen M, Dullerud R, Babovic A, Laake K, Engedal K: Bildediagnostiske metoder ved demensutredning. Tidsskr Nor Lægeforen 2002, 122: 710-714
6. Landmark K: Kan inntak av vitamin C og E hemme utvikling av Alzheimers demens? Tidsskr Nor Lægeforen 2006, 126: 159-161
7. Love S: Neuropathological investigation of dementia: a guide for neurologists. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 2005, 76: 8-14
8. Kaye R, Head E, Thompson J L, McIntire T M, Milton S C, Cotman C W, Glabe C G: Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of Pathogenesis. Science 2003, 300: 486-489
9. Klein W L, Krafft G A, Finch C E: Targeting small A β oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? Trends in Neurosciences 2001, 24: 219-223
10. LaFerla F M, Oddo S: Alzheimer's disease: A β , tau and synaptic dysfunction. Trends in Molecular Medicine 2005, 11: 170-176
11. Oddo S, Caccamo A, Shepherd J D, Murphy M P, Golde T E, Rakez K, Metherate R, Mattson M P, Akbari Y, LaFerla F M: Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: Intracellular A β and synaptic dysfunction. Neuron 2003, 39: 409-421
12. Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng B P, LaFerla F M: Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging 2003, 24: 1063-1070
13. www.labanimals.no/Litteratur/Kompendiet/Kompendium-24.html
14. Oddo S, Caccamo A, Smith I F, Green K N, LaFerla F M: A dynamic relationship between intracellular and extracellular pools of A β . American journal of pathology 2006, 168: 184-194
15. www.alzforum.org

Illustrasjoner:

Illustrasjonen på forsiden: www.mbi.ufl.edu/Dept/Faculty/Shaw.html

Figur 1: <http://webs.wofford.edu/pittmandw/psy330/2002www/alzheimer/index.htm>

Figur 2: www.ahaf.org (American health association foundation)

Figur 3: www.sciencemuseum.org.uk/exhibitions/brain/28.asp

Figur 4: www.bic.uci.edu/images/alz3d.jpg

Figur 5a, 5b, 5c og 11: Alzheimer's Disease Education and Referral Center, a service of the National Institute on Aging (www.alzheimers.org)

Figur 7: www.curie.u-psud.fr

Figur 8: www.uni-saarland.de/verwalt/presse/campus/2004/1/37-alzheimer.html

6- VEDLEGG

Abstract 1

CELL ASSOCIATION AND ULTRASTRUCTURAL LOCATION OF SOLUBLE OLIGOMERS OF A^β IN HUMAN BRAIN.

[R.Torp^{1*}](#); [E.Head²](#); [L.Margol³](#); [B.Jouleh¹](#); [R.Keyed³](#); [C.Glabe³](#)

1. *Inst. of Basic Mol. Med. Sci., Univ. of Oslo, Oslo, Norway*

2. *Inst. of Brain Aging & Dementia, Irvine, CA, USA*

3. *Dept of Mol. Biol. & Biochem., Irvine, CA, USA*

Soluble oligomers of A^β may play an early and critical role in neuronal dysfunction prior to overt plaque accumulation in the brain. Recently, an antibody against a molecular mimic of oligomeric A^β has been described (Kayed et al. 2003, *Science*; 300: 486-489).

Autopsy material from cases ranging from clinically non-demented to demented was prepared for confocal and electron microscopy and biochemical studies. Double label confocal studies revealed plaque associated oligomeric A^β in addition to small punctate deposits. To determine the cell association and ultrastructural location, immunogold studies showed oligomeric A^β over thin filaments extracellularly, representing pre-amyloid fibers, and within the cytoplasm and terminals of a subset of neurons. Biochemical studies confirmed that a subset of cases exhibit oligomeric A^β in the soluble fraction isolated from frontal cortex. The observation of oligomeric A^β within neuronal terminals suggests a role for intracellular soluble A^β oligomers in neuronal function and plasticity as reported previously (*Trends Neurosci*; 2001, 24; 219-224).

Abstract 2

ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF A TRIPLE-TRANSGENIC MODEL OF ALZHEIMERS DISEASE

[R.Torp^{1*}](#); [S.Oddo²](#); [B.Jouleh¹](#); [F.M.LaFerla²](#)

1. *CMBN Dept of Anat., Univ of Oslo, Oslo, Norway*

2. *Dept Neurol and Behavior, Univ. of California, Irvine, CA, USA*

We recently developed a transgenic model that is characterized by the development of both plaques and tangles. These transgenic mice, referred to as the 3xTg-AD mice, harbor clinical mutations in the APP, PS1 and tau genes. In this model, plaques and tangles manifest in a progressive manner in AD-relevant brain regions such as the hippocampus, amygdala and cortex, with plaque developing prior to the neurofibrillary pathology. In this study we analyzed 3xTg-AD mice ranging from 3, 6, 9, 15 and 30 months of age. Utilizing immunohistochemistry both at the light and electron microscopic level, we demonstrate various tau aggregates, including paired helical filaments. The tau modifications occur in a hierarchical manner, with MC1 immunoreactivity preceding changes in hyperphosphorylation, which first manifests with AT-180-, then AT-8-, and last with PHF1-immunoreactivity. The ultrastructural analysis of these 3xTg-AD mice should enable us to detail the role that neurofibrillary tangles and paired helical filaments play in the pathogenesis of this disorder as well as the role that A^β plays in their development.