

Självständigt arbete (examensarbete), 15 hp  
Kandidatexamen i biomedicinsk laboratorievetenskap  
VT 2017

## Visualisering av amyloider och patogenes i skadad näthinna

Daniel Persson

## Sektionen för lärande och miljö

### **Populärvetenskaplig sammanfattning**

Amyloider är ett samlingsnamn för den ackumulering av felvecklade proteiner som sätter sig i de extracellulära delarna av våra organ och vävnader. Alla proteiner börjar som en lång aminosyra och normalt veckas aminosyran till sin rätta form så proteinet kan utföra sin funktion. Men av diverse anledningar (ålder, mutationer) kan proteiner få en felaktig konformation och fler proteiner med samma felaktiga konformation kan klibba ihop sig till aggregat av felvecklade proteiner, amyloider. När amyloider bildats är dessa olösliga, svåra att bryta ner och arrangeras ofta i  $\beta$ -flakstruktur. Amyloider rika på  $\beta$ -flak benämns oftast  $A\beta$  och denna typ av amyloid är associerad till många sjukdomar.  $A\beta$  är särskilt toxiska mot neuron (nervceller) då de skapar inflammatoriska och biokemiska processer som dödar neuron. Ansamling av  $A\beta$  är därför förekommande i neurodegenerativa sjukdomar som Alzheimers och ålders-relaterad makuladegeneration (AMD).

Den fullständiga patologin (sjukdomsförlopp) som  $A\beta$  orsakar i näthinnan är inte förstådd, men  $A\beta$  samlas under det retinala pigmentepitelet (RPE) och Bruchs membran där  $A\beta$  orsakar och driver flera skadliga processer. I anslutning till RPE finns fotoreceptorerna (tappar och stavar) som ansvarar för registrering av ljus och färg. Samlingar av  $A\beta$  under RPE orsakar atrofi (förtvining) av både RPE och fotoreceptorerna, vilket resulterar i förlust av skarp syn och i allvarliga fall även blindhet.

Visualisering av amyloider och den patogenes dessa samlingar orsakar kräver snabba och känsliga metoder så att diagnos och terapeutisk behandling kan ske snabbt. I denna studie visualiserades amyloider i ljusodlad näthinna från gris med Kongo röd och patogenesen med TUNEL, anti-ubiquitin och ProteoStat med fluorescensmikroskop.

Kongo röd är ett fluorescerande färgämne som vid inbindning till amyloider avger en röd färg som enkelt kan detekteras.

TUNEL är en metod som används för att hitta fragmenterat DNA som är karaktäristiskt för celldöd. TUNEL använder ett enzym som ökar tillförseln av inmärkte dUTPs (byggblock) som kan detekteras. TUNEL har förmågan att detektera celler som genomgått apoptos (programmerad celldöd) och nekros (sjuklig form av celldöd).

Ubiquitin är ett protein som upprätthåller cellulär balans genom att se till att rätt protein finns närvarande i cellen genom att förstöra skadliga proteiner. Skadliga proteiner som ska förstöras märks in med ubiquitin och med immunohistokemisk metod kan dessa inmärkte proteiner hittas. Metoden använder primära antikroppar (anti-ubiquitin) som binder till inmärkte proteiner. Sekundära antikroppar konjugerade till ett fluorescerande ämne binder till de inbundna primära antikropparna och hela komplexet detekteras.

Aggresomer är cellulära komponenter som bildas när cellen utsätts för ogynnsamma förhållanden så som ansamlingar av toxiska proteiner. Aggresomer förvarar de toxiska proteinerna tills det att cellen återhämtat sig och kan ta hand om proteinerna själva. Kan inte cellen återhämta sig kommer aggresomerna att bryta ned proteinerna.

ProteoStat är liksom Kongo röd ett fluorescerande färgämne som vid inbindning till aggresomer fluorescerar en röd färg som kan detekteras. ProteoStat är en snabb metod för att hitta aggresomer, men det finns alltid en risk för ospecifik inbindning. Användning



av Transmissionsmikroskop är en långsammare metod att hitta aggresomer, men medför fullständig verifiering av att aggresomer finns närvarande.

Resultatet i denna studie visade att amyloider var förekommande och den undersökta patogenesen hade skett i näthinnans yttre lager (ONL). Troligtvis beror detta på att de känsliga fotoreceptorerna finns i ONL och att den primära ljusinducerade patogenesen associerad till A $\beta$  i näthinnan börjar i de känsliga fotoreceptorerna. RPE har förmågan att producera A $\beta$ , samt reservoarer där dessa lagras. Extra ackumulering och eventuell produktion av A $\beta$  under RPE orsakar förtvining av detta område, vilket inkluderar fotoreceptorerna.

Visualisering av amyloider och patogenes kräver snabba och känsliga metoder för diagnos och terapeutisk behandling.

**Författare**

Daniel Persson

**Titel**

Visualisering av amyloider och patogenes i skadad näthinna

**Handledare**

Kjell Johansson. Professor i zoo-fysiologi

**Examinator**

Bodil Hernroth. Professor i biomedicinsk laboratorievetenskap.

**Sammanfattning**

Ansamling av amyloid beta ( $A\beta$ ) i de extracellulära miljöerna är associerad till många svåra sjukdomar som Alzheimers och ålders-relaterad makuladegeneration (AMD). Amyloider karakteriseras av att de är olösliga, toxiska mot neuron och orsakar därför svår skada. AMD är den ledande orsaken till blindhet och irreversibelt förlorande av skarp syn då  $A\beta$  manifesterar i makula. I AMD orsakar  $A\beta$  inflammatorisk aktivitet där det retinala pigmentepitelet bryts ned och ljuskänsliga fotoreceptorer dör genom apoptos. Idag lever ca 150 miljoner människor med AMD där många har svårt att utföra vardagliga uppgifter till följd av förlust av skarp syn.

Idag är Kongo röd en av de vanligaste metoderna för att visualisera amyloider *in vitro*. Den patogenes som orsakas av amyloider kan analyseras med immunofluorescens och immunohistokemi.

Syftet med studien var att undersöka förekomst av amyloider i samband med celldöd i näthinna från gris, undersöka den patogenes som amyloider orsakar med immunofluorescens och immunohistokemi, samt undersöka om det finns korrelation mellan amyloider och celldöd. Resultatet visade att amyloider var förekommande i näthinnan och hade orsakat celldöd och ansamling av aggresomer.

Amyloider och den patologi som orsakats kunde visualiseras i det yttre lagret av näthinnan.

**Ämnesord** Amyloid, Kongo röd, TUNEL, ubiquitin, ProteoStat, Ålders-relaterad makular degeneration.

**Author**

Daniel Persson

**Title**

Vizualisation of amyloids and pathogenes in damaged retina

**Supervisor**

Kjell Johansson. Professor in zoophysiology

**Examiner**

Bodil Hernroth. Professor in Biomedical Science.

**Abstract**

Deposition of amyloid beta ( $A\beta$ ) in the extracellular environment are associated to some severe diseases, like Alzheimer's disease and age-related macular degeneration (AMD). Amyloids are characterized by insolubility, toxicity towards neuron and are there-for damaging to tissues. AMD is the primary cause of blindness and irreversible loss of central vision through manifestation of  $A\beta$  in the macula. In AMD,  $A\beta$  drives an inflammatory action that degenerates the retinal pigment epithelium and cause atrophy of photoreceptors.



Today ~150 million people live with AMD where many find difficulties performing everyday tasks due to loss of sharp vision.

Congo red is a gold standard for visualizing amyloids *in vitro* and the pathogenesis caused by amyloids can be analyzed by immunofluorescence and immunohistochemistry. The purpose of this study was to show the presence of amyloids relating to cell death in pig retina, show the pathogenesis caused by amyloids by using immunofluorescence and immunohistochemistry, and investigate whether there is correlation between amyloids and cell death.

The result showed that amyloids were present in the retina and caused cell death and gathering of aggresomes.

Amyloids and the caused pathology could be visualized in the outer layer of the retina.

### **Keywords**

Amyloid, Congo red, TUNEL, ubiquitin, ProteoState, Age-related macular degeneration

## **Innehåll**

Populärvetenskaplig sammanfattning .....	2
1. Inledning.....	1
1.1. Amyloider .....	1
1.2. Ålders-relaterad Makular Degeneration, AMD .....	1
1.3. Metoder för att visualisera amyloider och patogenes .....	2
1.4. Kongo röd .....	2
1.5. Thioflavin-T .....	3
1.6. TUNEL .....	3
1.7. Ubiquitin .....	3
1.8. Aggresomer och ProteoStat .....	4
1.9. Syfte .....	4
2. Material och Metoder .....	4
2.1. Vävnadssektioner .....	4
2.2. Kongo röd .....	4



2.3. Thioflavin-T .....	5
2.4. TUNEL .....	5
2.5. Kongo röd & TUNEL.....	5
2.6. Ubiquitin.....	5
2.7. ProteoStat & TEM.....	5
3. Resultat.....	6
3.1. Visualisering av amyloider med Kongo röd.....	6
3.2. Celldöd i samband med amyloider .....	6
3.3. Ubiquitin och proteinaggregat .....	6
3.4. Aggresomer visualiseras med ProteoStat & TEM.....	7
4. Diskussion .....	8
5. Slutsats.....	9
6. Tackord.....	9
Referenser.....	9
Bilagor .....	12

## 1. Inledning

### 1.1. Amyloider

Amyloider är ett samlingsnamn för de fiberliknande aggregat som uppkommer av felvecklade proteiner i organ och vävnader. Amyloider bildas av normalt lösliga proteiner som klibbar ihop till olösliga aggregat som är motståndskraftiga mot nedbrytning. Amyloida aggregat karakteriseras av att de är toxiska, olösliga och rika på  $\beta$ -flak struktur som arrangeras i en "kross  $\beta$ -struktur" där kedjorna går i en ortogonal riktning mot axis (Rambaran & Serpell, 2008). Arrangering av många  $\beta$ -strukturer medför många intermediära väte-bindningar som gör aggregaten väldigt stabila och svåra att bryta ner (Knowles, 2014). Amyloid Beta ( $A\beta$ ) uppkommer genom klyvning av dess protein amyloid precursor protein (APP). APP är ett membranprotein som är koncentrerat i neuroners synapser där de utför en viktig roll i funktion och bildande av bland annat muskelceller. Beroende på hur APP klyvs uppstår olika  $A\beta$ -strukturer där  $A\beta_{1-40}$  och  $A\beta_{42}$  är de främst förekommande (Lynn *et al*, 2016; Zheng & Koo, 2011). Studier har visat att  $A\beta$  är väldigt toxiska mot neuron då  $A\beta$  startar oxidativ stress som får neuron att genomgå apoptos (Brien & Wong, 2011). Ansamlingar av  $A\beta$  i de extracellulära miljöerna är därför associerad till flera svåra sjukdomar där Alzheimers är den mest kända och studerade. Alzheimers ansåg tidigare vara en sjukdom som var isolerad till enbart hjärnan. Nya studier har däremot visat att den patogena orsakad av  $A\beta$  i hjärnan hos Alzheimers patienter även kan ses i näthinnan (Masuzzo *et al*, 2016). Ögats näthinna är en del av det centrala nervsystemet och möjliggör på så vis en visualisering av  $A\beta$  *in vivo*. Idén att använda näthinnan som en förlängning av hjärnan har öppnat upp nya dörrar för forskning och nya studier försöker koppla ihop Alzheimers med olika nedgraderande sjukdomar som sker i näthinnan.

### 1.2. Ålders-relaterad Makular Degeneration, AMD

En av de sjukdomar som kopplas ihop med Alzheimers i näthinnan är ålders-relaterad makular degeneration (AMD). AMD och Alzheimers är båda neurodegenerativa, karakteriseras av ackumulation av  $A\beta$ -aggregat och ökad ansamling av  $A\beta$  med ökad ålder ses i båda sjukdomarna (Keenan *et al*, 2014). AMD är den ledande orsaken till blindhet och irreversibelt förlorande av skarp syn då  $A\beta$  manifesterar i makula (gula fläcken), ett område där tapparna sitter som tätast och ansvarar för människans skarpa, fokuserade syn (Koronyo-Hamaoui *et al*, 2011; Ratnayaka *et al*, 2015). Förlorande av central syn gör det svårt att utföra vardagliga sysslor, som att läsa, köra bil och att urskilja människor. Idag lever uppskattningsvis 150 miljoner människor med progressiv nedbrytning av makula till följd av ansamlingar av  $A\beta$ -plack (Lynn *et al*, 2017). Det finns två former av AMD, den torra och den våta formen. Torr AMD karakteriseras av ansamlingar av olösliga, extracellulära aggregat kallade drusen mellan RPE och Bruchs membran som orsakar atrofi av RPE och fotoreceptorer. Den våta formen av AMD karakteriseras av bildande av nya kärl som så småningom bryter igenom Bruchs membran. Det är den våta formen som oftast orsakar blindhet hos AMD-patienter (Ambati & Fowler, 2012).

Den fullständiga patologin bakom AMD är inte fullt förstådd, men innefattar en kaskadreaktion som drivs/orsakas av  $A\beta$ . AMD orsakar nedsättning av det retinala

pigmentepitelet (RPE), som ansvarar för underhåll av fotoreceptorer samt funktioner i blod-näthinna-barriären, som i sin tur skapar en immun-privilegerad miljö i näthinnan. Ansamlingar av A $\beta$  under RPE triggar igång en inflammatorisk reaktion som slutar med att fotoreceptorer som detekterar och reagerar på ljus dör (Wakx *et al*, 2015). Tidigare antogs att celldöd av fotoreceptorer orsakades enbart genom apoptos. Nyare studier visar dock att andra celldödsmechanismer som autofagi och nekros också kan orsaka celldöd av fotoreceptorer (Murakami *et al*, 2013). Det har nyligen upptäckts att det finns många reservoarer av A $\beta$  i näthinnan. RPE, ganglion celler och det inre lagret av näthinnan uttrycker APP, samt innehåller alla nödvändiga komponenter för att producera A $\beta$  (Ratnayaka *et al*, 2015). Den ökade fyndigheten av A $\beta$  aggregat i åldrad näthinna kan bero på att de försvarssystem som ska avlägsna aggregaten försämras med åldern.

### 1.3. Metoder för att visualisera amyloider och patogenes

Ansamlingar av A $\beta$  aggregat i extracellulära miljöer är associerade till många allvarliga sjukdomar. Förmågan att visualisera amyloider tidigt och undersöka den patologi som orsakas ställer höga krav på den valda analysmetoden. Metoden måste vara tillräckligt känslig och stabil för utvärdering av sjukdomsbelopp, diagnos och terapeutisk behandling.

Användning av fluorescerande färgämnen har länge varit den dominanta metoden för att visualisera och kvantifiera amyloider. Idag är Kongo röd och Thioflavin-T de mest använda färgämnen och de båda anses vara gyllene standarder för visualisering av amyloider (Biancalana & Koide, 2010; Picken, 2010).

En del av den patogenes och skador orsakade av amyloider i näthinnan kommer att undersökas med TUNEL, anti-ubiquitin och ProteoStat.

### 1.4. Kongo röd

Sedan början av 1900-talet har Kongo röd använts som histologisk färgning för att visualisera amyloider. I alkaliska förhållanden har Kongo röd sitt optiskt maximala absorbans vid 490 nanometer och färgen kommer därför att vara röd då vitt ljus absorberar blått och grönt ljus (Howie & Brewer, 2008). När Kongo röd sedan binder till amyloider flyttas den maximala absorbansen till 540 nanometer, vilket visualiserar amyloider som äppel-grön färg vid undersökning med polariserat ljus. Detektion av amyloider med den karaktäristiska gröna emissionen i polariserat ljus har länge varit den gyllene standarden för metoden. Nya studier har däremot visat att undersökning i fluorescensmikroskop har högre känslighet och minskar antalet falsk-negativa resultat (Marcus *et al*, 2012). Vid undersökning med fluorescensmikroskop kommer Kongo röd vid inbindning av amyloider att avge en röd emission i grönt ljus.

Kunskapen om hur Kongo röd interagerar med amyloider är ännu inte helt förstådd. Wu *et al* (2012) presenterade i sin studie en hypotes att Kongo röd har en hög affinitet till amyloider tack vare de ”räfflor” som finns på  $\beta$ -strukturernas ytor. Medan Khurana *et al* (2001) föreslår att Kongo röds uppbyggnad möjliggör hydrofoba och elektrostatiska interaktioner som gör att Kongo röd kan binda in till protein.



### 1.5. Thioflavin-T

Thioflavin-T (ThT) är ett färgämne som etablerats till en av de mest använda metoderna för att detektera amyloider sedan den först introducerades i mitten av 1900-talet (Wolfe *et al*, 2010).

När ThT binder till amyloider kommer ThT:s excitation maximum ändras från 385 till 450 nanometer och dess emission maximum från 445 till 482 nanometer (Biancalana & Koide, 2010). Den ökade fluorescens som uppstår vid inbindning gör det lättare att detektera amyloider. ThT binder mer specifikt till amyloider än Kongo röd, men liksom med Kongo röd är kunskapen om hur ThT binder till amyloider inte helt förstådd. Thioflavin T har en intressant struktur i det fall att färgämnet har en hydrofob och en polär thiazol-grupp. Enligt Khurana *et al* (2005) finns det en möjlighet att kvävet i thiazol-gruppen skapar vätebindningar med hydroxyl-grupperna i amyloider och ger därmed en specifik inbindning.

### 1.6. TUNEL

TdT-medieted dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) är en av de främsta färgteknikerna för att visualisera celler som genomgått apoptos *in situ*. TUNEL är dock inte begränsad till detektion av apoptos, utan kan även detektera celler som genomgått nekros orsakade av toxiska komponenter som amyloider (Loo, 2002). När DNA-kedjor fragmenteras kommer TdT binda in till de fria 3'-hydroxylgrupperna i kedjan. TdT katalyserar tillförseln av märkta dUTP som sedan kan detekteras med immunohistokemiska metoder (Garrity *et al*, 2003).

### 1.7. Ubiquitin

Ubiquitin är ett protein med förmågan att reglera många processer i eukaryota organismer genom en process kallad ubiquitinerings. Genom ubiquitinerings förändrar ubiquitin andra proteiners stabilitet, lokalisering och därmed proteinets funktion. Ubiquitin är involverad i många cellulära processer, men är kanske mest känd för sin roll inom apoptos (Smith, 2015). Ubiquitin-proteasome systemet (UPS) har en viktig roll i att upprätthålla cellulär homeostas (cellulär balans). UPS ser till att rätt proteiner finns närvarande vid rätt koncentration genom att förstöra proteiner som skadats, är missvecklade eller inte fungerar korrekt. I näthinnan utför inte UPS bara nedbrytning av proteiner utan även differentiering, signaltransduktion och hantering av stressförhållanden (Campello *et al*, 2013). Haveri i UPS kan ge upphov till olika sjukdomstillstånd. Enligt Hong *et al* (2014) finns det växande bevis för korrelation mellan A $\beta$  och haveri i UPS i Alzheimers sjukdom. Och eftersom hjärnan och näthinnan är länkade via CNS kan detta haveri av UPS också ses i näthinnan. Hos Alzheimers patienter kan nedsättning av UPS leda till en onormalt hög ackumulering av A $\beta$  som i sin tur inte bara inhiberar proteosomernas aktivitet, utan även påverkar de multivesiculära kropparnas (MVB) signalväg. När proteosomala aktiviteter inhiberas till följd av ackumuleringar av A $\beta$  kommer andelen ubiquitinerade proteiner att öka i cellen, vilket kan visualiseras med immunohistokemi. Polyklonala anti-ubiquitin antikroppar konjugerade till en fluorescerande sekundär antikropp kommer att användas för att detektera ubiquitinerade filament i näthinnan.

### 1.8. Aggresomer och ProteoStat

Aggresomer är cytoplasmatiska strukturer som tar hand om missvecklade proteiner eller aggregat och är på så vis en försvarsmekanism när exempelvis UPS nedgraderas (Olzmann *et al*, 2008). Aggresomer bildas som svar på faktorer som hotar den cellulära hemostasien som cellulär stress och virusinfektion (Shen *et al*, 2010). Aggresomer utgörs av chaperon-molekyler, proteosomala subenheter och polyubiquitinerade proteiner. Denna uppbyggnad av återveckling- och nedbrytande enheter gör aggresomer väl anpassade för hantering av missvecklade proteinaggregat (Dehvari *et al*, 2015). När koncentrationen av missvecklade protein och aggregat blir för hög att hantera kommer andelen aggresomer att öka och samlar in allt toxiskt för förvaring och nedbrytning via autofagi. Aggresomer kan hittas med en rad olika metoder som Transmission elektroskop (TEM) eller ProteoStat.

ProteoStat är ett fluorescerande färgämne som erbjuder snabb och enkel visualisering av aggresomer. I lösning är ProteoStat icke-fluorescerande, men vid inbindning till aggregat avges en röd fluorescens som är lätt att detekteras.

Visualisering av aggresomer med TEM är tidskrävande och kräver erfarenhet vid hantering av instrumentet. Användning av TEM bekräftar dock förekomst av aggresomer då inget färgämne används som kan binda ospecifikt. Aggresomer är lokaliserade nära cellkärnan och centrosomer, samt omkringliggande mitokondrier (Saliba *et al*, 2002).

### 1.9. Syfte

Syftet med studien var att undersöka förekomst av amyloider i samband med celldöd i näthinna från gris, den patogenes som amyloider orsakar skall undersökas med färgämne, immunohistokemi och immunofluorescens, samt att undersöka om det finns korrelation mellan amyloider och celldöd.

## 2. Material och Metoder

### 2.1. Vävnadssektioner

Kryostatsnitt (10-12  $\mu\text{m}$ ) av vävnadsodlad näthinna från gris fanns till studentens förfogande och var monterade på positivt laddade monteringsglas. Näthinnorna hade hanterats med Sarstedt TC Inserts, odlats i 24, 48, 72 timmar i ljus och förvarades i 20°C. Näthinnor som inte ljusodlats användes som negativ kontroll. Grisars näthinnor är lika människors i struktur och fördelning av fotoreceptorer och är därför lämpligt provmaterial. Enligt djurförsök (2015) får djurförsök i forskning-och studieyfte endast användas om resultat inte kan uppnås på annat sätt och måste uppfylla de djurhälsodirektiv bestämda av EU. Innan varje färgning och behandling torkades glasen i rumstemperatur, vävnadssektionerna begränsades med hydrofobisk barriär och tvättades med PBS 2×5 min.

Samtliga glas monterades med DAPI och analyserades med fluorescensmikroskopet Olympus BX60 och kameran Olympus DP71.

### 2.2. Kongo röd

Modifiering av Bennholds Kongo röd utfördes för visualisering av amyloider. 0,4 ml natriumhydroxid-lösning (SIGMA-ALDRICH., Hannover, Tyskland) blandades med



40 ml Kongo röd-lösning (SIGMA-ALDRICH., ST Louis, USA) och lösningen filtrerades innan användning. Vävnadssektionerna färgades 45 minuter med filtrerad Kongo röd följt av tvätt i destillerat vatten, snabb differentiering i 1% alkalisk alkohollösning (1% NaOH., KEBOLab., Darmstadt, Tyskland & 50% Etanol., Scharlau., Gato Perez, Spanien). Vävnadssektionerna tvättades 2 omgångar i destillerat vatten och monterades med DAPI.

### **2.3. Thioflavin-T**

Thioflavin-T var ospecifik för amyloider i denna studie. Protokoll och resultat redovisas som bilaga.

### **2.4. TUNEL**

För TUNEL användes In situ Cell Death Detection Kit, (Fluorescein., Roche. Mannheim, Tyskland).

2 µl enzymlösning (vial 1) blandades med 15,5 µl PBS. 39 µl label-lösning (vial 2) blandades med 118 µl PBS. De två lösningarna blandades väl och 100 µl av den slutliga lösningen applicerades på vävnadssektionerna. Glasen inkuberades i rumstemperatur 1 timme skyddad från ljus och tvättades i destillerat vatten innan montering.

### **2.5. Kongo röd & TUNEL**

Vävnadssektionerna behandlades med antigen retrieval (pH 6) i natriumcitrat-lösning ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ., SIGMA-ALDRICH. S-4641) med 0,5 % Tween 20 (SIGMA-ALDRICH. Steinheim, Tyskland) i mikrovågsugn 3×15 min vid 95°C följt av tvätt i PBS 20 min. Därefter färgades snitten med Kongo röd följt av TUNEL enligt utförande beskrivet ovan. Efter färgning med Kongo röd tvättades glasen 2 gånger i destillerat vatten innan TUNEL-färgning utfördes.

### **2.6. Ubiquitin**

Antigen retrieval utfördes enligt beskrivning ovan för Kongo röd & TUNEL. Purified anti-Ubiquitin (Biolegend., Lot: B131060) (1:100) applicerades på vävnadssektionerna och glasen inkuberades över natt 4°C i humified chamber (MIST., Newton Powys, UK). Vävnadssektionerna tvättades med PBS och inkuberades med sekundär Goat-Anti Mouse IgG F(ab)(FITC) (1:500) i mörker 45 min. Sektionerna tvättades med PBS och monterades med DAPI.

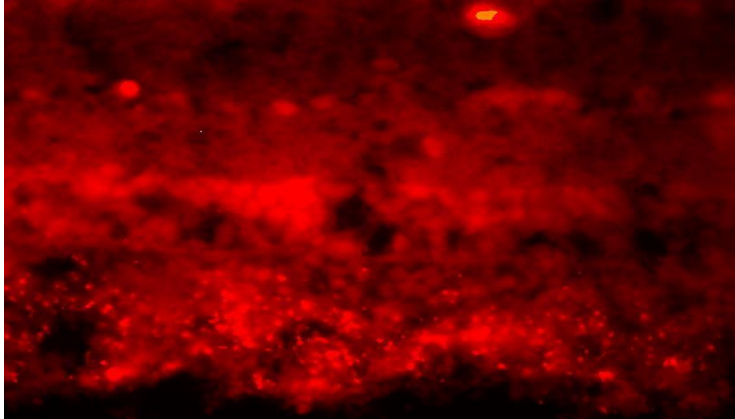
### **2.7. ProteoStat & TEM**

Färgning med ProteoStat utfördes med ProteoStat Aggresome Detection Kit (Enzo., Farmingdale, NY) enligt tillverkarens protokoll. Vävnadssektionerna täckes med permabiliserings buffer (50µl Triton X-100, 50µl EDTA och 10ml 1X Assay buffert) i 5 minuter innan sektionerna tvättades med PBS och inkuberades i mörker med ProteoStat reagens (1:500 & 1:1000) i 15, 30 och 60 min. Sektionerna tvättades 2×5 min med PBS och monterades. (TritonX-100., SIGMA-ALDRICH., Steinheim, Tyskland). Undersökning av aggresomer utfördes även med Transmission Elektroskop (JOEL1400 PLUS. (100kv)).

### 3. Resultat

#### 3.1. Visualisering av amyloider med Kongo röd

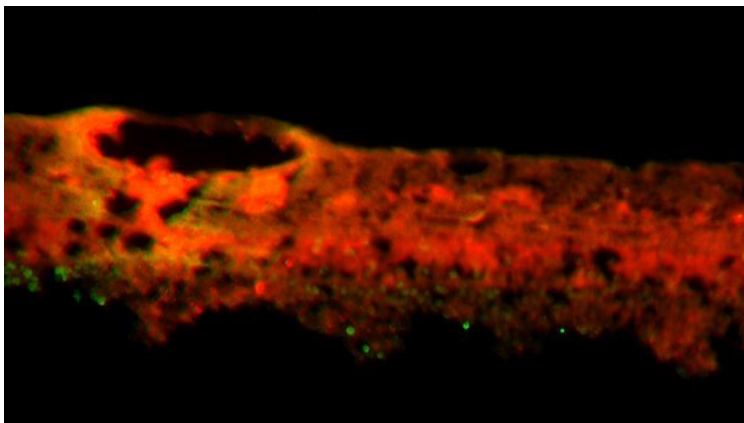
En modifiering av Bennholds Kongo röd visar förekomst av amyloider i näthinna ljusodlad i 72 timmar. I Figur 1 visas amyloider som röd fluorescens i olika storlekar i det yttre lagret av näthinnan (ONL).



Figur 1. Amyloider visas som röd fluorescens i näthinnans yttre lager i förstoring 40X.

#### 3.2. Celldöd i samband med amyloider

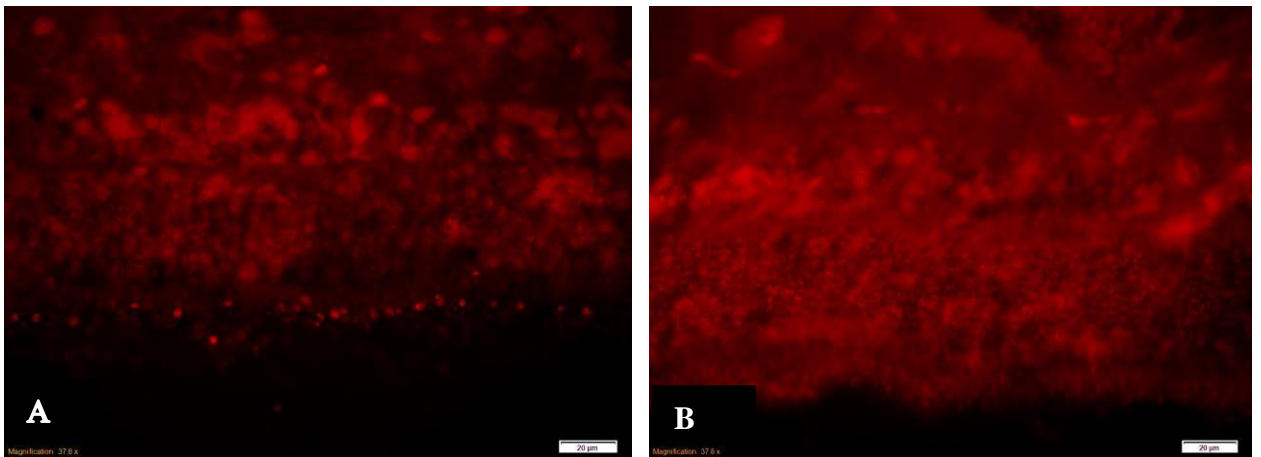
Förmågan att detektera celldöd i närvaro av amyloider undersöktes vidare genom att kombinera Kongo röd-färgning med TUNEL. Figur 2 är en superimpose av två bilder tagna i samma område i grönt respektive rött filter. TUNEL lyser genom cellkärnan och Kongo röd lyser rött runt omkring som en ring. Celldöd har skett i ONL.



Figur 2. Celldöd i näthinnans yttre lager visas med kombination av TUNEL och Kongo röd.

#### 3.3. Ubiquitin och proteinaggregat

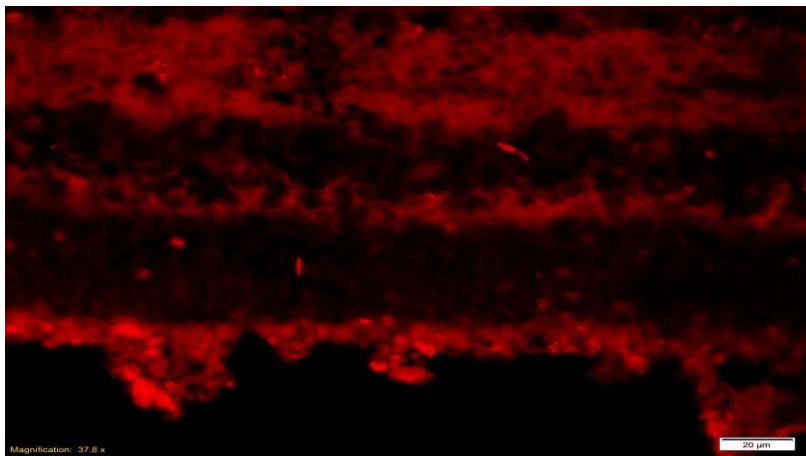
Immunohistokemisk reaktivitet med ubiquitin visualiseras med intensiv röd fluorescens i Figur 3. Stor ansamling av ubiquitin är begränsad till det yttre lagret av näthinnan. Reaktionen visar ansamlingar av ubiquitinerade aggregat i olika storlekar och fluorescerande intensitet.



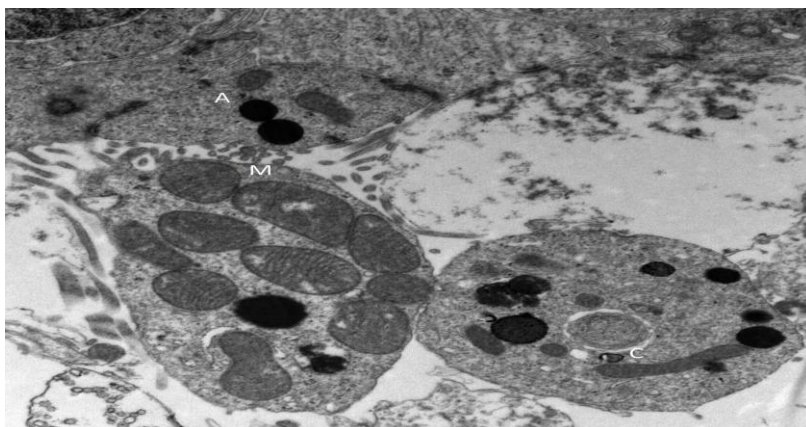
Figur 3. A) Ubiquitinerade aggregat visualiseras som röd fluorescens i näthinnans ONL. B) Negativ kontroll visar ingen förekomst av ubiquitinerade aggregat. Autofluorescens lyser genom vävnaden.

### 3.4. Aggresomer visualiseras med ProteoStat & TEM

Ett försök att visualisera förekomst av aggresomer i skadad näthinna utfördes med ProteoStat-färgning. Likt många andra färgämnen fluorescerar ProteoStat med högre intensitet vid inbindning av aggregerade protein (Figur 4). Undersökning av att ProteoStat bundit till aggresomer bekräftas med TEM i Figur 5.



Figur 4. Proteostat avger röd fluorescens vid inbindning av aggresomer i ONL.



Figur 5. TEM bekräftar förekomst av aggresomer (A), samt omkringliggande mitokondrier (M) och centrosom (C),

#### 4. Diskussion

Modifiering av Bennholds Kongo röd visade bättre resultat vid inbindning till amyloider än produktbeskrivningen från SIGMA-ALDRICH (St. Louis, USA).

Produktbeskrivning från SIGMA-ALDRICH för amyloidfärgning med Kongo röd var avsedd för paraffinbäddade snitt och kan därför ha genererat ospecifik inbindning med hög bakgrund för kryostatnsnitt (Figur 6 i bilaga).

Ansamlingar av amyloider var begränsade till det yttre lagret av näthinnan, ONL.

Resultatet av amyloidfärgning med Kongo röd visar troligtvis uttryck av A $\beta$ . Detta är dock inte verifierat då Kongo röd inte bara binder specifikt till A $\beta$  utan även till andra isomerer av amyloider (Khurana *et al*, 2001).

Fortsatt immunohistokemisk undersökning med antikroppar riktade mot A $\beta$ , samt undersökning med gammastrålning hade kunnat bekräfta om A $\beta$  var närvarande i näthinnan (Morris & Serpell, 2012).

Visualisering av amyloider med Thioflavin T var ospecifik i denna studie (Figur 7 i bilaga). Troligtvis beror detta på att färgning med Thioflavin T enligt flera protokoll var avsedd för paraffinbäddade 4-5  $\mu$ m vävnadssnitt.

Kongo röd och TUNEL är lämpliga metoder att kombinera för visualisering av celldöd i närvaro av amyloider. TUNEL har genererat en grön fluorescens och markerat flera döda celler i näthinnans yttre lager. Näthinnan har slitits sönder i det yttre området där celldöden har skett, vilket beror på att vävnaden behandlats hårt vid infärgning. Hade näthinnan varit hel är det troligt att fler celler som genomgått celldöd kunnat upptäckas. Om TUNEL detekterat nekros eller apoptos gick inte att avgöra.

Användning av fluorescensmikroskop har bevisligen minskat antalet falska-negativa resultat. Autofluorescens kan dock ge falskt-positiva resultat, vilket illustreras i Figur 3B. Vävnadssnittet i Figur 3B har inte ljusodlats (negativ kontroll) och förmodligen är det autofluorescens som för en icke-insatt person kan misstas för amyloider eller ubiquitinerade aggregat.

Immunohistokemisk användning med anti-ubiquitin och goat-anti-mouse visade förekomst av ubiquitinerade proteiner och proteinaggregat. Förekomsten var begränsad till ONL och antyder att skadliga proteiner har lagrats i fotoreceptorerna.

Förekomst av aggresomer bekräftades i ONL, både av ProteoStat och TEM. ProteoStat är en känslig metod för att detektera aggresomer, men det finns alltid en risk för ospecifik inbindning vid användning av fluorescerande färgämnen. ProteoStat har genererat en röd fluorescens i ONL vid inbindning till aggresomer. Undersökning med TEM var tidskrävande men bekräftade förekomst av aggresomer och omkringliggande organeller vid direktsänd mikroskopering.

Resultatet visade att ackumulering av amyloider och patogenes är begränsad till ONL i denna studie. Detta kan bero på att den primära ljusinducerade patogenesen associerad till A $\beta$  i näthinnan drabbar de känsliga fotoreceptorerna.

Tidigare studier har visat att drusen som ackumulerar under RPE innehåller proteinaggregat och skapar en fysisk separation av fotoreceptorer från RPE, vilket leder

till atrofi av fotoreceptorer (Danis, 2015; Schuman, 2010). Fotoreceptorerna i näthinnan är metaboliskt aktiva och är väldigt känsliga för fysikalisk och kemisk påverkan. Denna känslighet i samband med de inflammatoriska processer som A $\beta$  orsakar är en logisk orsak till varför den primära patogenesen drabbar fotoreceptorerna.

Det har bevisats att RPE uttrycker APP, har de cellulära komponenterna att producera A $\beta$ , samt innehåller reservoarer av A $\beta$ . En ökad produktion och lagring av A $\beta$  i direkt samband till RPE är en annan möjlig förklaring till att fotoreceptorerna i ONL dör då A $\beta$  är toxiska mot neuron.

Figur 2 visar celldöd och ansamling av amyloider. Vävnaden som färgats med Kongo röd och TUNEL avslöjar ett fåtal celler med dubbelfärgning. Det är dock svårt att säga om det finns en korrelation mellan amyloider och celldöd. Antalet dubbelfärgade celler och tagna bilder är för få för att göra en statistisk bedömning. Vävnaden är också väldigt trasig orsakat av hård infärgning, vilket kan påverka resultatet. För att få mer exakta resultat hade fler vävnadssektioner behövt färgas med Kongo röd och TUNEL. Ett protokoll med Thioflavin-T avsett för 20  $\mu$ m kryostatsnitt i kombination med TUNEL hade möjligtvis kunnat ge mer statistiska resultat. En röd fluorokrom till TUNEL hade behövt användas då Thioflavin-T avger grön fluorescens.

## 5. Slutsats

Amyloider är toxiska aggregat i den intra-och extracellulära miljöerna. Visualisering av eventuell proteinopati kräver snabba och känsliga metoder för tidig diagnostik och terapeutisk behandling.

Kongo röd är ett lämpligare färgämne att visualisera amyloider i kryostatsnitt än Thioflavin-T. Användning av fluorescensmikroskop vid undersökning av amyloider med Kongo röd bör ersätta den traditionella undersökningen i polariserat ljusmikroskop. TUNEL, ProteoStat och ubiquitin är samtliga lämpliga metoder att undersöka den patogenes som amyloider orsakar i näthinnan.

## 6. Tackord

Jag vill tacka min Labb-och skrivhandledare Kjell Johansson för all handledning och stöd som jag fått under examensarbetet. Jag vill dessutom tacka de pedagoger som gjort projektet möjligt.

Slutligen vill jag tacka mina föräldrar som stöttat och trott på mig under hela min studietid.

## Referenser

Ambati, J., Fowler, B.J. (2012). Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron* 75: 26-39.

Biancalana, M., Koide, S. (2010). Molecular Mechanism of Thioflavin-T Binding to Amyloid Fibrils. *Biochim Biophys Acta* 1804: 1405-1412.

Campello, L., Rudd, J. E., Cuenca, N., Nieto, J. M. (2013). The Ubiquitin- Proteasome System in Retinal health and Disease. *Molecular Neurobiology* 47: 790-810.

Danis, R.P., Lavine, J.A., Domalpally, A. (2015). Geographic atrophy in patients with advanced dry age-related macular degeneration: current challenges and future prospects. *Clinical Ophthalmology* 9: 2159-2174.

Dehvari, N., Mahmud, T., Persson, J., Bengtsson, T., Graff, C., Winblad, B., Rönnbäck, A., Behbahani, H. (2015). Amyloid precursor protein accumulates in aggresomes in response to proteasome inhibitor. *Neurochemistry International* 60: 533-542.

Djurförsök. (2015). *Om lagar kring djurförsök*. [www.djurforsok.info](http://www.djurforsok.info) [2017-08-25].

Garrity, M. M., Burgart, L. J., Riehle, D. L., Hill, E. M., Sebo, T. J., Witzig, T. (2003). Identifying and Quantifying Apoptosis: Navigating Technical Pitfalls. *Mod Pathol* 16: 389-394.

Hong, L., Huang, H-C., Jiang, Z-F. (2014). Relationship between amyloid-beta and the ubiquitin–proteasome system in Alzheimer’s disease. *Neurological Research* 36: 276282.

Howie, A. J., Brewer, D. B. (2008). Optical properties of amyloid stained by Congo red: History and mechanisms. *Elsevier* 40: 285-301.

Keenan, T., Goldacre, R., Goldacre, M. (2014). Associations Between Age-Related Macular Degeneration, Alzheimer Disease, and Dementia. *JAMA Ophthalmol* 132: 63-68.

Khurana, R., Coleman, C., Zanetti, C.I., Carter, S.A., Krishna, V., Grover, R.K., Roy, R., Singh, S. (2005). Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *Journal of Structural Biology* 151: 229-238.

Khurana, R., Uversky, V.N., Nielsen, L., Fink, A.L. (2001). Is Congo Red an Amyloid-specific Dye? *Journal of Biological Chemistry* 276: 22715-22721.

Knowles, TPJ., Vendruscolo, M., Dobson, CM. (2014). The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15: 384-396.

Koronyo-Hamaoui, M., Koronyo, Y., Ljubimov, A. V., Miller, C. A., Ko, MHK., Black, K. L., Schwartz, M., Farkas, D. L. (2011). Identification of amyloid plaques in retinas from Alzheimer’s patients and noninvasive *in vivo* optical imaging of retinal plaques in a mouse model. *ELSEVIER* 54: 204-217.

Loo, D. T. (2002). In Situ Detection of DNA Damage. *Methods in Molecular Biology* 203: 21-30.



Lynn, S.A., Keeling, E., Munday, R., Gabha, G., Griffiths, H., Lotery, A.J., Ratnayaka, J.A. (2017). The complexities underlying age-related macular degeneration: could amyloid beta play an important role? *Neural Regeneration Research* 12: 538-548.

Marcus, A., Sadimin, E., Richardson, M., Goodwell, L., Fyfe, B. (2012). Fluorescence Microscopy Is Superior to Polarized Microscopy for Detecting Amyloid Deposits in Congo Red–Stained Trephine Bone Marrow Biopsy Specimens. *Am J Clin Pathol* 138: 590-593.

Masuzzo, A., Dinet, V., Cavanagh, C., Mascarelli, F., Krantic, S. (2016). Amyloidosis in Retinal Neurodegenerative Diseases. *Front Neurol*.

Morris, K.L. Serpell, L.C. (2012). X-ray fibre diffraction studies of amyloid fibrils. *Methods Mol Biol* 849: 121-135.

Murakami, Y., Notomi, S., Hisatomi, T., Nakazawa, T., Ishibashi, T., Miller, J.W., Vavvas, D.G. (2013). Photoreceptor cell death and rescue in retinal detachment and degenerations. *Prog Retin Eye Res* 37: 114-140.

O'Brien, R.J., Wong, P.C. (2011). Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annu Rev Neurosci* 34: 185-204.

Olzmann, J.A., Li, L., Chin, L.S. (2008). Aggresome Formation and Neurodegenerative Diseases: Therapeutic Implications. *Current Medical Chemistry* 15: 47-60.

Picken, M.M. (2010). Amyloidosis-where are we now and where are we heading? *Arch Pathol Lab Med* 134: 545-551.

Rambaran, R. N., Serpell, L. C. (2008). Amyloid fibrils. *Prion* 2: 112-117.

Reynaud, E. (2010). Protein *Misfolding and Degenerative Diseases*. [www.nature.com](http://www.nature.com) [2017-04-15].

Ratnayaka, J. A., Serpell, L. C., Lotery, AJ. (2015). Dementia of the eye: the role of amyloid beta in retinal degeneration. *Eye* 29: 1013-1026.

Saliba, R.S., Munro, P.M.G., Luthert, P.J., Cheetham, M.E. (2002). The cellular fate of mutant rhodopsin: quality control, degradation and aggresome formation. *Journal of Cell Science* 115: 2907-2918.

Schuman, S.G., Koreishi, A.F., Farsiu, S., Jung, S., Izatt, J.A., Toth, C.A. (2010). Photoreceptor Layer Thinning over Drusen in Eyes with Age-related Macular Degeneration Imaged In Vivo with Spectral Domain Optical Coherence Tomography. *Ophthalmology* 116: 488-496.

Shen, D., Coleman, J., Chan, E., Nicholson, T.P., Dai, L., Sheppard, P.W., Patton, W.F. Novel Cell- and Tissue-Based Assay for Detecting Misfolded and Aggregated Protein Accumulation Within Aggregates and Inclusion Bodies. *Cell Biochem Biophys* 60: 173185.

Smith, Y. (2015). What is Ubiquitin? [www.news-medical.net](http://www.news-medical.net) [2017-05-02].

Wakx, A., Dutot, M., Massicot, F., Mascarelli, F., Limb, A., Rat, P. (2016). Amyloid  $\beta$  Peptide Induces Apoptosis Through P2X7 Cell Death Receptor in Retinal Cells: Modulation by Marine Omega-3 Fatty Acid DHA and EPA. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 178: 368-381.

Wolfe, L.S., Calabrese, M.F., Nath, A., Blaho, D.V., Miranker, A.D., Xiong, Y. (2010). Protein-induced photophysical changes to the amyloid indicator dye thioflavin T. *PNAS* 107: 16863-16868.

Zheng, Hui., Koo, E.H. (2011). Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Molecular Neurodegeneration* 6.

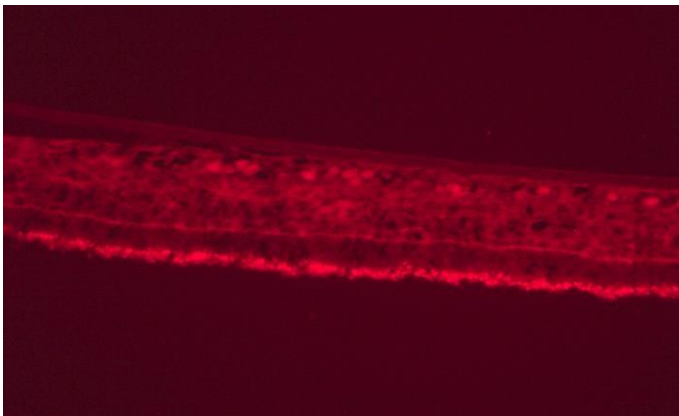
## Bilagor

### **1X PBS-Tween 20 (0,1M PBS, 0,5% Tween 20, pH 7,4)**

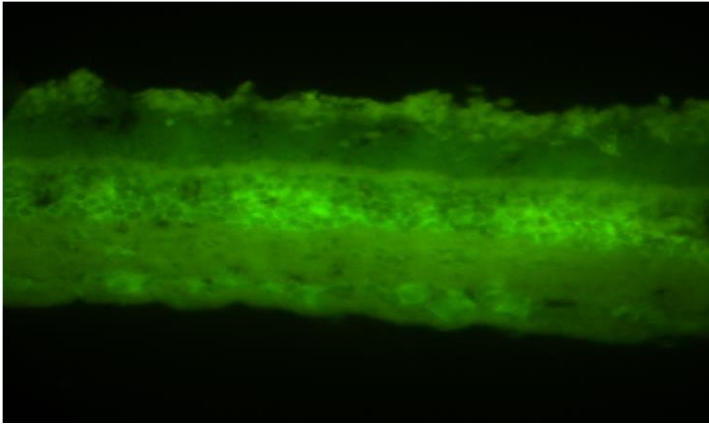
9,0 g NaCl (PROLABO., Leuven, Belgien) blandades med 1,1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> och 0,32 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, båda från (Merck., Darmstadt, Tyskland) och löstes i destillerat vatten (ELGA., Purelab UHO). pH justerades till 7,4 och 5 ml Tween 20 (SIGMAALDRICH., Steinheim, Tyskland) tillsattes och lösningen späddes till 1 liter. PBS-lösningen användes till alla färgningar och behandlingar.

### **1% Thioflavin-T**

0,2 g Thioflavin-T (SIGMA-ALDRICH., Hannover, Tyskland) blandades med 20 ml 1X PBS-Tween 20. Lösningen blandades, filtrerades och 100  $\mu$ l applicerades på vävnadssektionerna som inkuberades 15, 30 och 45 min i mörker.



Figur 6. Färgning av näthinna med Kongo röd enligt tillverkarens beskrivning. Amyloider kan inte visualiseras.



Figur 7. Kryostatsnittad näthinna färgad med Thioflavin T. Förekomst av amyloider kan inte visualiseras.