

Forfatterne



Malene Bredal Brohus er postdoc ved Sektion for Bioteknologi, Institut for Kemi og Biovidenskab, Aalborg Universitet. Malene har speciale i proteinkemi og var med til at åbne calmodulin-projektet. Hun har lavet en stor mængde biofysiske analyser af calmodulin-varianter evne til at binde calcium-ioner og til at binde til calcium-kanaler. mbrohus@bio.aau.dk



Helene Halkjær Jensen er postdoc ved Sektion for Bioteknologi, Institut for Kemi og Biovidenskab, Aalborg Universitet. Med en baggrund i cellebiologi har Helene arbejdet på calmodulin-projektet siden 2018. Hun udvikler en metode til at undersøge calmodulins effekt på hjerteslag i laboratoriet. hhj@bio.aau.dk



Mette Nyegaard er lektor ved Institut for Biomedicin, Aarhus Universitet. Mette er genetiker og har en bred erfaring i kortlægning af gener i sjældne sygdomme. Hun ledte arbejdet med at identificere den første calmodulin-mutation. nyegaard@biomed.au.dk



Foto: Colourbox

EN GENFEJL, DER GÅR LIGE I HJERTET

Mutationer i det lille protein calmodulin har vist sig at være involveret i sygdomme, der kan medføre hjerterytmeforstyrrelser og endda hjertestop.

Det har åbnet forskernes øjne for, hvilke andre hemmeligheder dette livsvigtige protein gemmer på.

Enhver hjertelæge har i skuffen nogle patientjournaler, som forbliver en gåde. De kan involvere børn med uforklarlige hjerteproblemer eller familier med nedarvede hjertefejl, hvor man ikke kan finde et defekt gen. Netop sådan en familie findes i Sverige: for nu ca. 30 år siden, besvimelede en 12-årig dreng under en fodboldkamp. Hans 15-årige bror døde pludseligt under

en svømmekonkurrence. Blandt deres øvrige søskende og senere nevøer og niecer lider mange af hyppige besvimelser. Dog har ingen af de berørte familiemedlemmer vist nogen tegn på sygdommen forud for hændelserne. De har normale hjertediagrammer (EKG), og deres hjertestruktur er normal ved ultralydsscanning. Fælles for hændelserne er, at de opstår i situationer med fysisk eller psykisk

påvirkning. Der ses først tegn på en underliggende hjertesygdom, hvis man optager et EKG/hjertediagram under fysisk belastning.

Den svenske familie er i dag diagnosticeret med den sjældne hjerterytmelidelse *catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia* (CPVT), som typisk skyldes fejl i hjertets ryanodinreceptorer, en klasse af calciumkanaler i hjertecel-

Et meget vigtigt protein

Calmodulin er et meget unikt protein, fordi det er ekstremt bevaret. Mennesker har tre gener, som koder for calmodulin, *CALM1-3*. Selvom der er variationer i den genetiske sekvens for *CALM1-3*, produceres der fuldstændig identiske proteiner fra de tre gener – det er usædvanligt. Men også når man kigger på andre arter, er calmodulin forbløffende bevaret. Figuren viser en sammenligning af protein-sekvensen for calmodulin fra forskellige arter. Hvert bogstav repræsenterer en specifik aminosyre og en rød markering indikerer variation i den pågældende aminosyre sammenlignet med menneske-proteinsekvensen. Selv så forskellige arter som mus og laks har calmodulin-protein, der er præcis magen til det i mennesker. I planter

				20				40	
Menneske	ADQLTEEQIA	EFKEAFSLFD	KDGDGTITTK	ELGTVMRSLG	QNPTEAELQD	50			
Gris	ADQLTEEQIA	EFKEAFSLFD	KDGDGTITTK	ELGTVMRSLG	QNPTEAELQD	50			
Mus	ADQLTEEQIA	EFKEAFSLFD	KDGDGTITTK	ELGTVMRSLG	QNPTEAELQD	50			
Laks	ADQLTEEQIA	EFKEAFSLFD	KDGDGTITTK	ELGTVMRSLG	QNPTEAELQD	50			
Bananflue	ADQLTEEQIA	EFKEAFSLFD	KDGDGTITTK	ELGTVMRSLG	QNPTEAELQD	50			
Kornblomst	ADQLTEEQIA	EFKEAFSLFD	KDGDGTITTK	ELGTVMRSLG	QNPTEAELQD	50			
Gær	SSNLTTEEQIA	EFKEAFSLFD	KDNNGSISSS	ELATVMRSLG	LSPSEAEVND	50			
		60		80		100			
Menneske	MINEVDADGN	GTIDFPEFLT	MMARKMKDTD	SEEEIREAFR	VFDKDGNGYI	100			
Gris	MINEVDADGN	GTIDFPEFLT	MMARKMKDTD	SEEEIREAFR	VFDKDGNGYI	100			
Mus	MINEVDADGN	GTIDFPEFLT	MMARKMKDTD	SEEEIREAFR	VFDKDGNGYI	100			
Laks	MINEVDADGN	GTIDFPEFLT	MMARKMKDTD	SEEEIREAFR	VFDKDGNGYI	100			
Bananflue	MINEVDADGN	GTIDFPEFLT	MMARKMKDTD	SEEEIREAFR	VFDKDGNGFI	100			
Kornblomst	MINEVDADGN	GTIDFPEFLT	LMARKMKDTD	SEEEIREAFR	VFDKDGNGFI	100			
Gær	LMNEIDVDGN	HQIEFSEFLA	LMSRQLKSND	SEQUELEAFK	VFDKNGDGLI	100			
		120		140					
Menneske	SAAELRHVMT	NLGEKLTDEE	VDEMIREADI	DGDGQVNYEE	FVQMMTAK	148			
Gris	SAAELRHVMT	NLGEKLTDEE	VDEMIREADI	DGDGQVNYEE	FVQMMTAK	148			
Mus	SAAELRHVMT	NLGEKLTDEE	VDEMIREADI	DGDGQVNYEE	FVQMMTAK	148			
Laks	SAAELRHVMT	NLGEKLTDEE	VDEMIREADI	DGDGQVNYEE	FVQMMTAK	148			
Bananflue	SAAELRHVMT	NLGEKLTDEE	VDEMIREADI	DGDGQVNYEE	FVTMMTAK	148			
Kornblomst	SAAELRHVMT	NLGEKLTDEE	VEEMIREADI	DGDGQVNYEE	FVKIMMAK	148			
Gær	SAAELKHVLT	STIGEKLDAE	VDDMLREVS	DGSGEINIQQ	FAALL-SK	146			

er der desuden kun få forskelle. Og i gær – en encellet organisme – er proteinet nogenlunde samme størrelse og har forholdsvis ens sekvens.

Det fortæller, at calmodulin er et meget vigtigt protein med en fuldstændig basal funktion. Man vil højst sandsynligt ikke kunne leve uden!

lerne. Fejlene betyder, at patienterne kan besvime eller få hjertestop uden varsel, når hjertet pludseligt skal præstere under adrenalinpåvirkning som ved motion, eller når man bliver forskrækket.

Men undersøgelser af den svenske families DNA viste, at ingen i familien havde fejl i de gener, der koder for ryanodinreceptoren eller i andre gener, der er kendt for at være involveret i sygdommen CPVT. Derfor indledte den ene af denne artikels forfattere, Mette Nyegaard, sammen med en lille håndfuld kollegaer i 2006 jagten på det ukendte sygdomsgen. Det var et møjsommeligt arbejde at kortlægge de kromosom- og genområder, som de sygdomsramte havde tilfælles og som var forskellige fra de raske familiemedlemmer. Svaret på den genetiske screening var meget overraskende: De syge familiemedlemmer havde en punktmutation i genet *CALM1*. *CALM1* er et af tre gener, som koder for proteinet calmodulin, der fungerer som en calcium-sensor i cellerne. Dette protein var aldrig før blevet kædet sammen med sygdomme i mennesker, og grundet

dets afgørende funktion i vores celler troede man dengang ikke, at mennesker kunne overleve med calmodulin-mutationer.

Calmodulin – en calciumsensor

Siden denne første calmodulin-mutation blev beskrevet i 2012, er andre patienter med uforklarlige hjerteproblemer blevet undersøgt. Det betyder, at man i dag kender omkring 30 tilfælde af mutationer i calmodulin. Alle patienterne lider af enten CPVT eller lang QT-syndrom (LQTS), som også er en hjertelidelse med spontane hjertestop. Det er meget overraskende, at calmodulin-mutationer ikke giver symptomer andre steder i kroppen, da calmodulin spiller en vigtig rolle i alle kroppens celler. Det kan skyldes, at hjertemuskulaturen er et højt specialiseret væv – men det kan også være fordi, at man ikke har ledt efter disse mutationer i andre typer patienter.

Men hvad gør calmodulin så specielt? Alle kroppens celler producerer calmodulin. Proteinets "måler" koncentrationen af calcium og giver den information videre til andre proteiner, som derefter ændrer

funktion, eksempelvis ved at aktivere bestemte signaler, åbne for iontransport eller tænde eller slukke bestemte gener.

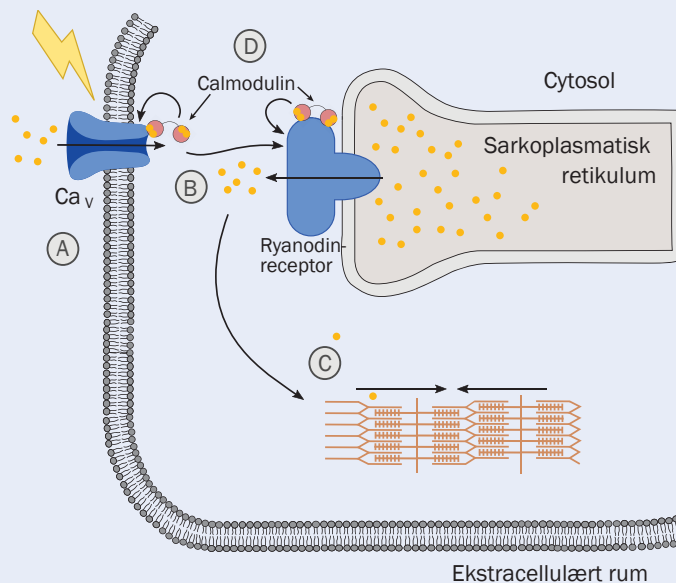
I kroppens celler fungerer calcium-ioner som et af de vigtigste signalstoffer. I cellens cytosol – det vil sige den væske, der findes inde i cellen, men uden for cellekernen og organellerne – er calciumkoncentrationen meget lav, omkring 100 nM. Uden for cellen og inde i særlige organeller, der fungerer som calciumlager (endoplasmatiske retikulum eller sarkoplasmatiske retikulum i muskelceller), er calciumkoncentrationen 1-2 mM – altså mere end 10.000 gange højere end i cytosolet. Det betyder, at der er en meget stor koncentrationsgradient af calcium hen over dels cellemembranen, dels den membran, der adskiller endoplasmatiske/sarkoplasmatiske retikulum fra cytosolet. Denne gradient kan drive en kraftig strøm af calcium ind i cellens cytosol, hvis en pore åbner, eller et transportprotein i membranerne aktiveres. Det betyder også, at selv meget små ændringer i calcium-mængden i cellen kan fungere som et signal for en specifik

Calcium og calmodulin styrer et hjerteslag

Et hjerteslag startes af et såkaldt aktionspotentiale og en hurtig strømning af Na^+ - og K^+ -ioner henover cellemembranen.

Elektrisk styrede Ca^{2+} -kanaler (Ca_v , voltage-gated calcium channel) mærker denne elektriske stimulering og åbner (A). Der er en meget stor koncentrationsgradient af Ca^{2+} over membranen, som driver Ca^{2+} gennem Ca_v -kanalen og ind i cellen. Ryanodin-receptoren, som sidder i membranen til sarkoplasmatiske retikulum inde i cellen, registrerer denne stigning i koncentrationen af Ca^{2+} i væsken inde i cellen (cyto-solet) og åbner (B). Derved strømmer en stor mængde Ca^{2+} -ioner ud fra sarkoplasmatiske retikulum og stimulerer sammentrækning af aktin-myosin-fibre (C).

På samme tid binder calmodulin nogle af de Ca^{2+} -ioner, som nu er til stede i cyto-solet (D). Calmodu-



lin binder også til Ca_v -kanalen og ryanodinreceptoren. Når calmodulin binder Ca^{2+} , ændres proteinets tredimensionelle struktur. Denne ændring signalerer til calciumkanalerne om at lukke. På den måde fungerer calmodulin som en Ca^{2+} -sensor, der

hjælper med at lukke kanalerne. Hvis ikke det sker, strømmer for meget Ca^{2+} ind i cyto-solet. Det kan gøre hjerteslaget så langt, at cellen ikke når at nulstille, inden et nyt aktionspotentiale ankommer, og så kan hjerterytmen kortslette.

cellulær funktion. For eksempel kan nogle typer receptorer aktivere såkaldte G-proteiner, som igen aktiverer et calcium-transportprotein til at åbne for en calciumindstrømning. Denne øgede mængde calcium kan efterfølgende stimulere frigivelsen af et hormon fra cellen eller en anden aktivitet.

Calcium og calmodulin styrer et hjerteslag

Under et hjerteslag udnyttes calcium-signalet til at stimulere de muskelsammentrækninger, som får hjertet til at pumpe blod rundt i kroppen. Da hjertet skal pumpe igen og igen, frigives calcium i bølger, som styrer hjerteslagene. Det er derfor ekstremt vigtigt, at calciummængderne frigives tidsmæssigt meget præcist – og ligeså vigtigt, at calcium fjernes igen, inden næste hjerteslag. Det er en elektrisk stimulering fra et såkaldt aktionspotentiale, der udgør startsignalet for indstrømningen af calcium i en hjertecelle. Calcium-indstrømning-

gen sker hovedsageligt gennem to calcium-kanaler: elektrisk styrede kanaler i cellemembranen (Ca_v) og de før omtalte ryanodinreceptorer (RyR), der sidder i membranen til sarkoplasmatiske retikulum. Først stimulerer et aktionspotentiale Ca_v til at åbne, og de indstrømmende calcium-ioner stimulerer så RyR til at åbne og lade store mængder calcium strømme fra sarkoplasmatiske retikulum ind i cyto-solet. Den sammenlagte stigning i calciumniveauet stimulerer sammentrækningen af cellens muskelfibre.

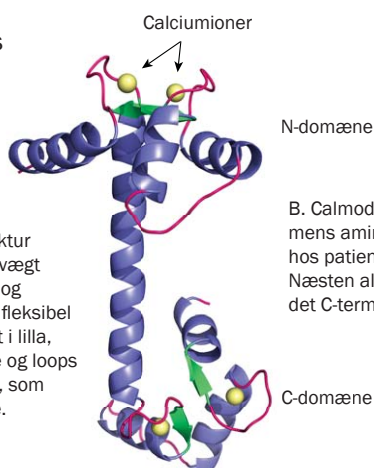
Calmodulin binder til bestemte områder på Ca_v - og RyR-kanalerne. Når calcium-koncentrationen i cyto-solet overstiger en tærskelværdi, binder calcium-ioner til calmodulin. Dermed sker der en konformationsændring af calmodulin, som forplanter sig til Ca_v eller RyR, der som følge heraf lukker. Dermed lukkes den indgående strøm af calcium, og cyto-solet kan tømmes for calcium for at gøre klar til næste hjerteslag.

Calmodulin-mutationer kan give hjerrestop

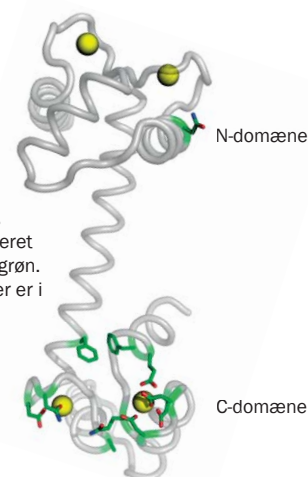
Hos patienter med calmodulin-mutationer er en af de 148 aminosyrer i calmodulin udskiftet med en anden. Denne udskiftning påvirker ofte både bindingen af calcium – den kan i nogle tilfælde være 50 gange dårligere – og bindingen til Ca_v og RyR. Det betyder, at calmodulin for det første "måler" calcium-koncentrationen forkert. For det andet bliver beskeden om ændringer i calcium-koncentrationen videregivet forkert eller for sent til Ca_v og RyR. Den manglende information fra calmodulin forplanter sig som en dominoeffekt: Når Ca_v og RyR ikke modtager rettidig besked fra calmodulin om at lukke, vil calcium-ionerne fortsætte med at strømme ind i hjertecellen, som igen vil fortsætte med at trække sig sammen, indtil calcium-strømmen bliver stoppet. Netop sådan en situation med for meget calcium i hjertecellens cytosol giver en meget stor risiko for, at hjerterytmen

Figurerne viser calmodulins struktur og vekselvirkning med ryanodinreceptoren.

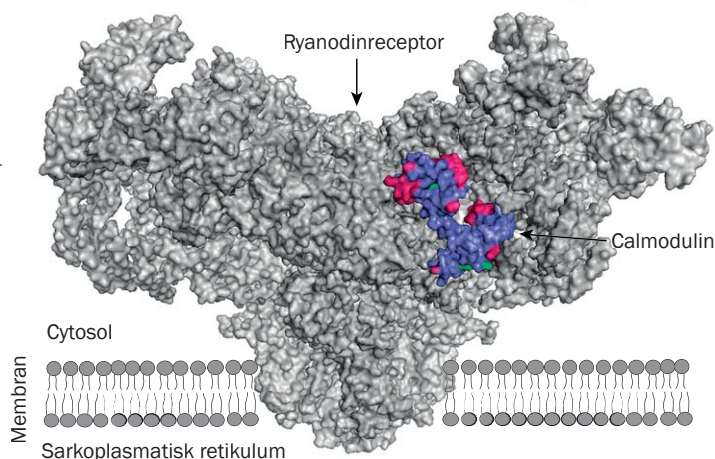
A. Den tredimensionelle struktur af calmodulin ligner en håndvægt og består af to domæner (N- og C-domænet) forbundet af en fleksibel linker-region. Alfa-helix er vist i lilla, mens beta-strenger er grønne og loops er pink. De fire calcium-ioner, som bindes af calmodulin, er gule.



B. Calmodulin er her vist i grå, mens aminosyrer, som er muteret hos patienter, er fremhævet i grøn. Næsten alle kendte mutationer er i det C-terminale domæne.



C. Calmodulin bundet til ryanodinreceptoren. For begge proteiner er overfladen vist. Ryanodinreceptoren sidder i membranen til sarkoplasmatiske retikulum med en meget stor del stikkende ud i cytosolet. Calmodulin binder til et område på siden af ryanodinreceptoren.



kortsluttes og ligger til grund for hjerterytmeforstyrrelser og i værste tilfælde hjertestop.

Funktionelle studier udført på Aalborg Universitet under ledelse af professor Michael Toft Overgaard, og andre steder i verden, har generelt afsløret, at CPVT-associerede calmodulin-mutationer ændrer calmodulins evne til at lukke RyR-kanalen, mens LQTS-associerede calmodulin-mutationer påvirker lukningen af Ca_v -kanalen.

Calmodulin: lille men vigtig

Da calmodulin bliver produceret i alle kroppens celler, kan det betragtes som et "husholdningsprotein"; et protein som er med til at opretholde de basale funktioner for at cellen kan eksistere. Men af flere grunde er calmodulin unik. Calmodulin kan nemlig vekselvirke med mere end 300 andre proteiner i cellen, hvilket er et overvældende tal. Samtidig er calmodulin et forholdsvis lille protein bestående

af blot 148 aminosyrer. Det betyder, at enhver aminosyre er vigtig, og at selv små ændringer i calmodulin kan have indflydelse på proteinets struktur og dermed funktion.

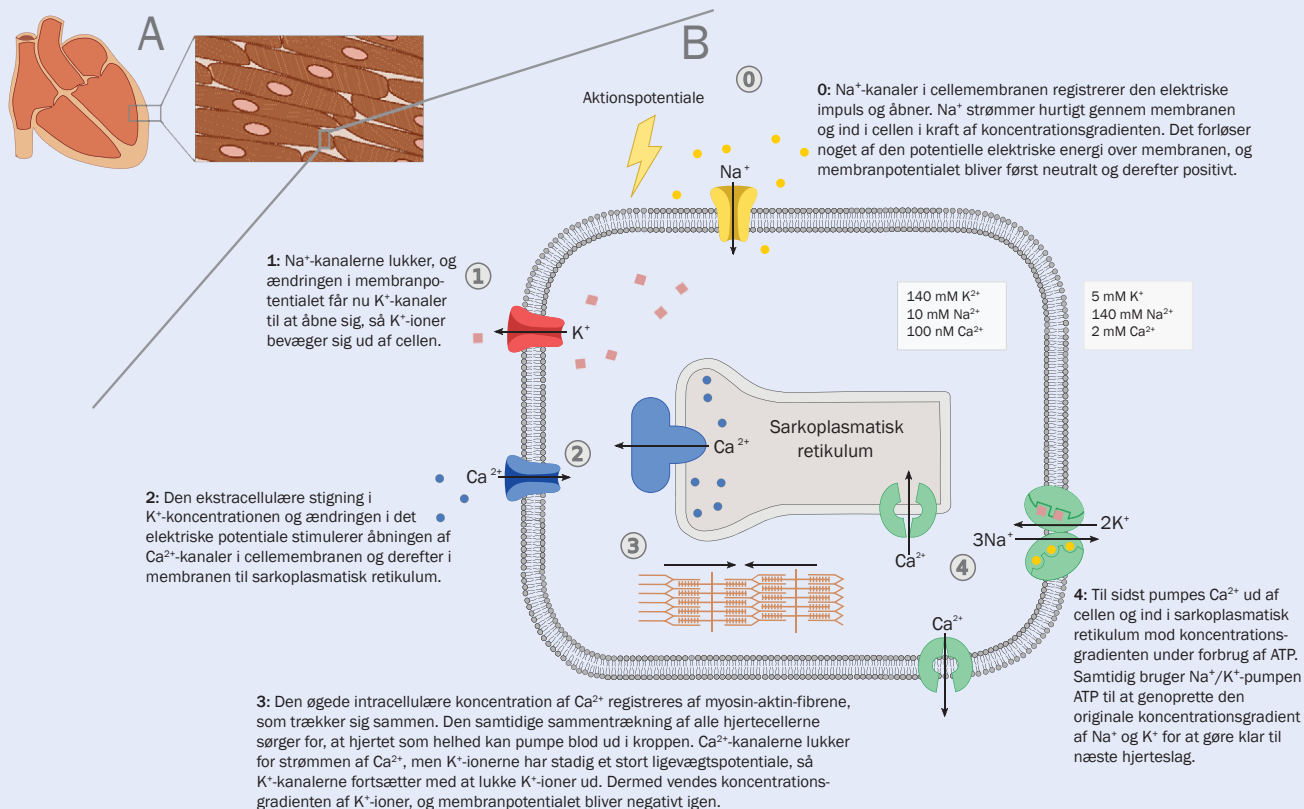
Strukturelt er calmodulin bygget op, så det har form som en håndvægt med to kugleformede domæner, der er forbundet af en fleksibel kæde af aminosyrer. Hvert domæne er formet således, at aminosyrerne kan koordinere (binde) to calcium-ioner.

Det ene domæne (kaldet det C-terminale domæne) binder calcium stærkt og kan derfor måle lave koncentrationer. Det andet domæne (kaldet det N-terminale domæne) binder calcium svagere, og måler først ved højere koncentrationer. Det betyder, at calmodulin kan fungere som en sensor af calciumkoncentrationer over et bredt område. På den måde kan calmodulin følge dynamikken af calciumstrømninger under et hjerteslag og videregive information om ændringer til andre

proteiner såsom Ca_v - og RyR-kanalerne.

Hos patienter med mutationer i calmodulin findes mutationerne altid i et af domænerne. Faktisk har næsten alle patienter mutationer i det C-terminale domæne – kun den svenske familie har en mutation i det N-terminale domæne. Det er ikke afklaret, hvorfor mutationerne er sådan fordelt. Man kan forestille sig, at patienter med mutationer andre steder ikke kan leve med dem – at et foster med sådan en mutation ville blive aborteret spontant. Omvendt kan man også forestille sig, at disse mutationer slet ikke vil give sygdom, og derfor er man ikke stødt ind i dem, når man undersøger hjertepatienter.

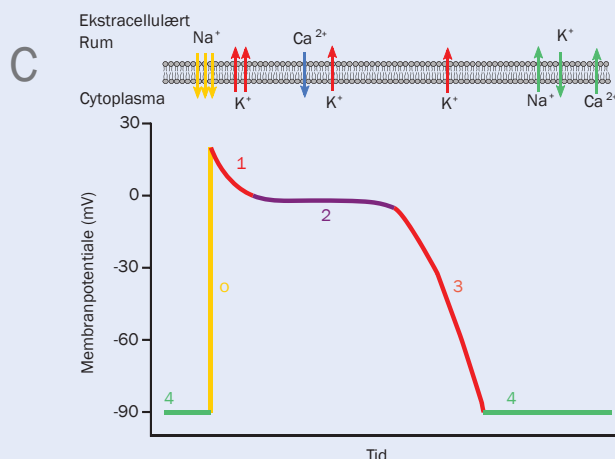
Man kan danne sig et billede af, i hvilken grad et bestemt gen tåler mutationer, ved at søge i store databaser, som indeholder gensekvenser fra rigtig mange mennesker fra raske populationer (baggrundsbe-



Sådan foregår et hjerteslag

Sammentrækning af hjertemusklens pumper blodet rundt i kroppen. Hjertemuskelcellerne er opbygget af striber af aktin og myosin (A), som kan trække sig sammen, når de stimuleres af Ca^{2+} -ioner.

B. Hjerteceller opretholder en koncentrationsgradient af K^+ , Na^+ og Ca^{2+} -ioner over cellemembranen. Dermed opstår en potentiel energi (membranpotential), som udnyttes ved et hjerteslag. Med en elektrode kan man måle ændringerne i hjertecellens membranpotential under et hjerteslag (C).



Videre læsning
 Jensen HH, Brohus M, Nyegaard M and Overgaard MT (2018) Human Calmodulin Mutations. Front. Mol. Neurosci. 11:396. doi: 10.3389/fnmol.2018.00396

Nyegaard M. m. fl.: (2012) Mutations in calmodulin cause ventricular tachycardia and sudden cardiac death. Am J Hum Genet. 91(4):703-12. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.08.015.

Video med animation på LinkedIn: [kortlink.dk/xkc2](https://www.linkedin.com/company/kortlink)

folkningen). Gør man det, er der påfaldende få mutationer i calmodulin sammenlignet med andre gener. Det tyder på, at der er mange calmodulin-mutationer, som man ikke kan leve med.

Viden om calmodulin-mutationer giver nye perspektiver

I dag behandles patienter med calmodulin-mutationer med almindelige hjerte-behandlinger. Mange får indopereret en defibrillator for hurtigt at genoprette forstyrrelser i hjerterytmen og undgå hjertestop, og de får medicinsk behandling, der dæmper effekten af adrenalin. Med det, vi kender til calmodulin-mutationer i dag, kan vi begynde at danne os et billede af, hvilke konsekvenser

en eventuel nyopdaget mutation vil have. Det giver lægerne en bedre forståelse af, hvilken medicinsk behandling den enkelte patient bør modtage for at undgå hjerterytmeforstyrrelser og hjertestop. Det åbner også en dør til udvikling af ny medicin, der kan virke mere specifikt til gavn for patienter med calmodulin-mutationer.

Patienter med calmodulin-mutationer er også videnskabeligt og medicinsk interessante af mere generelle årsager: Når man forstår følgerne af mutationerne, kan man udlede viden om, hvordan det raske protein må virke. Samtidig får man en større forståelse for, hvordan calmodulin vekselvirker med andre proteiner i hjertet. Det er interessant, fordi flere af

de molekyler, calmodulin vekselvirker med, er mål for mange almindelige former for hjertemedicin. Derfor har opdagelsen af denne nye gruppe af patienter åbnet for nye vinkler i forskningen og dermed også potentielt for fremstilling af ny medicin.

Endelig er der et vigtigt spørgsmål, som trænger sig på: Kan det virkelig passe, at mutationer i så vigtigt og bevaret et protein som calmodulin udelukkende giver hjerteproblemer, eller kan vi i fremtiden forvente at opdage skadelige effekter af mutationerne i øvrige dele af kroppen, for eksempel hjernen? I så fald kan forekomsten og konsekvenserne af calmodulin-mutationer være mere omfattende, end vi hidtil har troet. ■