

Henriette Elisabeth Autzen i laboratoriet ved University of California, San Francisco. Foto: University of California



KAPLØBET OM MEMBRANPROTEINET “TRPM4”

Ny teknologi gør, at forskere kan kortlægge membranproteiner med meget større præcision end tidligere. Opdagelserne er nødvendige for at kunne udvikle medicin mod blandt andet hud- og hjertesygdomme, men konkurrencen inden for forskningsområdet er brutal.

Om forfatteren
Kristian Sjøgren er videnskabsjournalist
ksjoegren@gmail.com



**DANMARKS FRIE
FORSKNINGSFOND**
INDEPENDENT RESEARCH
FUND DENMARK

Artiklen er sponsoreret af Danmarks Frie Forskningsfond | Natur og Univers.

Danmarks Frie Forskningsfond dækker alle videnskabelige hovedområder og uddeler hvert år godt 1 mia. kr. til forskningsprojekter baseret på forskernes egne ideer. Danmarks Frie Forskningsfond består af 84 anerkendte forskere udpeget på baggrund af deres høje faglige kompetence. Formand for Danmarks Frie Forskningsfond | Natur og Univers er professor ved Aarhus Universitet, Michael Møller Hansen. Læs mere på www.dff.dk

Det lyder som noget, der er taget ud af et afsnit af 24 timer med Kiefer Sutherland i rollen som agenten Jack Bauer, der i kapløb med tiden forsøger at forhindre verdens undergang.

Det var midt i april 2017, og post-doc Henriette Elisabeth Autzen stod foroverbøjet over mikroskopet i sit laboratorie ved Department of Biochemistry and Biophysics ved University of California San Francisco. Hun var i færd med som den første i verden at kortlægge strukturen af proteinet TRPM4 (transient receptor

potential cation channel subfamily M member 4), der spiller en stor rolle i udviklingen af forskellige hjerte- og hudsygdomme. Det var på mange måder ukendt terræn for den unge forsker, for hun arbejdede med en teknik, kaldet cryoEM (cryogenisk elektronmikroskopi), hvis hastige udvikling inden for blot få år havde kastet helt nye indsigter i proteiners strukturer af sig. Der var endda tale om, at Nobelprisen samme år kunne tilfalde forskerne bag udviklingen af teknikken.

Den dag i 2017 kom Henriette Elisabeth Autzens chef, professor

Yifan Cheng, dog ind i laboratoriet med nedslående insider-information. Han havde fra sin gode ven og kollega erfaret, at denne var lige på trapperne med en offentliggørelse af strukturen af TRPM4. Det ville gøre måneder af Henriette Elisabeth Autzens forskningsarbejde til rene spildtimer, for i forskningens verden er der sjældent medaljer til nummer 2.

»Det var virkelig surt. Inden for det felt, jeg arbejder i, er folk ekstremt kompetitive, hvilket betyder, at hvis man trækker vejret én gang for meget i sin forskning, bliver man

TRPM – en gruppe af membranproteiner

TRPM (transient receptor potential cation channel subfamily M) er en gruppe af membranproteiner, der sidder i kroppens celler og medierer transport af forskellige ioner over cellemembranen. Det drejer sig blandt andet om ionerne kalium, calcium og natrium. TRPM-familien består af 8 proteiner, der er nummere-

rede fra 1 til 8, og deres funktioner afhænger i særdeleshed af, hvor i kroppen de befinder sig. Ud over TRPM-proteinerne findes der i familien også andre TRP-proteiner. De inkluderer blandt andet TRPV1, der binder til capsaicin og derfor er ansvarlig for fornemmelsen af at spise chili.

TRPM-underfamilien består af:

- **TRPM1**, der spiller en rolle for vores syn. Fejl i genet bag proteinet er koblet til natblindhed hos mennesker. TRPM1 er desuden koblet til den plettede struktur i Appaloosa-hestes pels.
- **TRPM2** findes specielt i hjernen, men er koblet til mange forskellige funktioner i kroppen, herunder immunforsvarets funktion og udskilning af insulin fra bugspytkirtlen. TRPM2s mange funktioner gør, at det kan kobles til en lang række sygdomme fra bipolar og Alzheimers til autoimmune sygdomme som gigt samt fedme og diabetes. TRPM2 er også involveret i vores muligheder for at fornemme varme i spektret fra 33 til 38 grader celsius.
- **TRPM3** er koblet til udskilning af insulin fra bugspytkirtlen og dermed muligvis involveret i kroppens glukosehomeostase.
- **TRPM4** findes fortrinsvis i blodårerne og i hjertemusklens, hvor proteinet er involveret i afvikling af de elektriske signaler, som holder hjertet kørende. Mutationer i TRPM 4 er koblet til øget risiko for hjertesygdommene progressiv arvelig hjerterytmeforstyrrelse og Brugada syndrom samt hudsygdommen PSEK.
- **TRPM5** spiller en rolle for blandt andet smagsfornemmelse. Eksempelvis er proteinet involveret, når vi smager noget bittert, sødt eller umami. Proteinets er også koblet til signalering i forhold til smagen af fedt. TRPM5 sidder i bugspytkirtlen, hvor det er en del af mekanismen bag udskilning af insulin i forbindelse med et måltid. Aktivering af TRPM5 kan i mus lede til øget udskillelse af insulin og dermed beskytte mod type 2-diabetes.
- **TRPM6** er involveret i reguleringen af magnesiumoptag i leveren og i tarmene.
- **TRPM7** er blandt andet involveret i immunforsvarets funktion i tarmene. Proteinets er også essentielt for cellers muligheder for at hænge sammen i et væv.
- **TRPM8** er udtrykt i lungerne, blæren og prostata og forbundet med følelsen af kulde og koldesmerter. Derudover aktiveres TRPM8 også af stofferne mentol og incillin og er på den måde ansvarlig for kuldefølelsen, der opstår i munden, halsen og lunger ved at spise et mentolbolsche.

overhalet inden om af andre. Så kan rigtig mange timer i laboratoriet være spildt. På daværende tidspunkt havde jeg kun en grovkornet skitse af TRPM4, så jeg var ikke i nærheden af at kunne publicere noget fornuftigt. Jeg var i den grad på bagkant, men jeg ville ikke give op,« fortæller Henriette Elisabeth Autzen.

Fra det tidspunkt blev Henriette Elisabeth Autzens forskningsarbejde et hæsblesende ræs for ikke at komme til at stå tilbage i kulissen, når laurbærerne for kortlægningen af TRPM4 skulle uddeles.

Indhentede modstanderne på målstregen

Den endelig forløsning på mange måneders hårdt arbejde i kapløb med tiden kom i januar 2018, da Henriette Elisabeth Autzens kortlægning af TRPM4 endelig kom på tryk i *Science*. For forskere, som konstant skal knæfalde for fonde for at få forskningsmidler, er en artikel i *Science* som at få den ultimative blåstempling af deres arbejde. Det gør det også meget lettere at få penge til videre forskning.

Historien slutter dog ikke her. Som ved et rent lykketræf udgav *Nature* i

samme uge ikke blot én anden forskergruppes kortlægning af TRPM4, men også en tredje kortlægning af præcis det samme membranprotein. Derudover kom der i *Science* et fjerde studie af en tæt beslægtet TRPM-kanal, TRPM8. Mange måneders benhårdt arbejde i et voldsomt opskruet tempo havde altså resulteret i, at fire forskergrupper kom ud med deres forskningsresultater på præcis samme tid i starten af 2018.

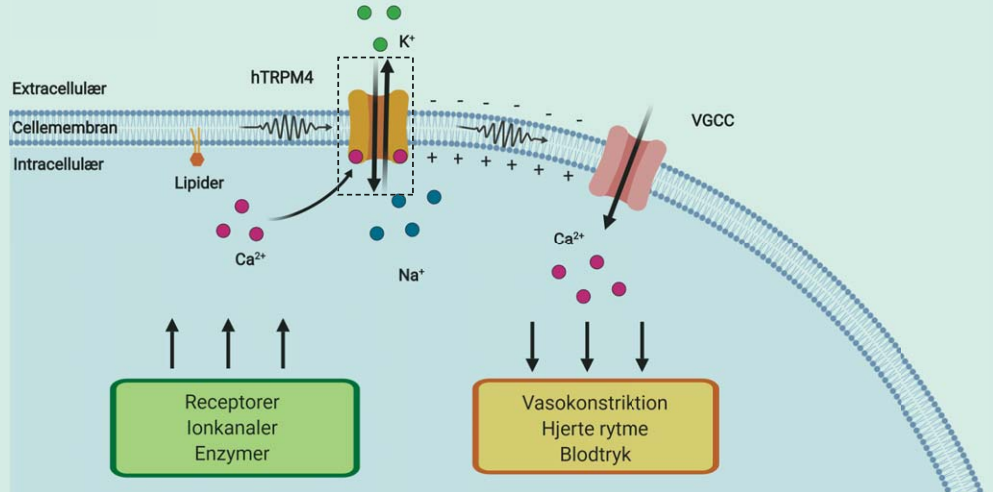
Senere fandt Henriette Elisabeth Autzen ud af, at den tredje forskergruppe fra *Nature* faktisk havde



**DANMARKS FRIE
FORSKNINGSFOND**
INDEPENDENT RESEARCH
FUND DENMARK

hTRPM4 i en simplificeret celle

Den præcise effekt af hTRPM4 afhænger af celletypen, som den findes i, men hTRPM4 fungerer altid som et calciumafhængigt reguleringscheckpoint i cellerne. hTRPM4 aktiveres af en forhøjet intracellulær calciumkoncentration (pink), membrandepolarisering (kurvet pil) og lipider (orange) i cellemembranen. Disse signaler initieres af andre kanaler, receptorer og enzymer som respons på signaler fra det ekstra- og intracellulære miljø. Calciumioner binder til det calcium-bindingssted, som Henriette Autzen og hendes kollegaer identificerede i hTRPM4 og får dermed hTRPM4 til at åbne. Åbningen af



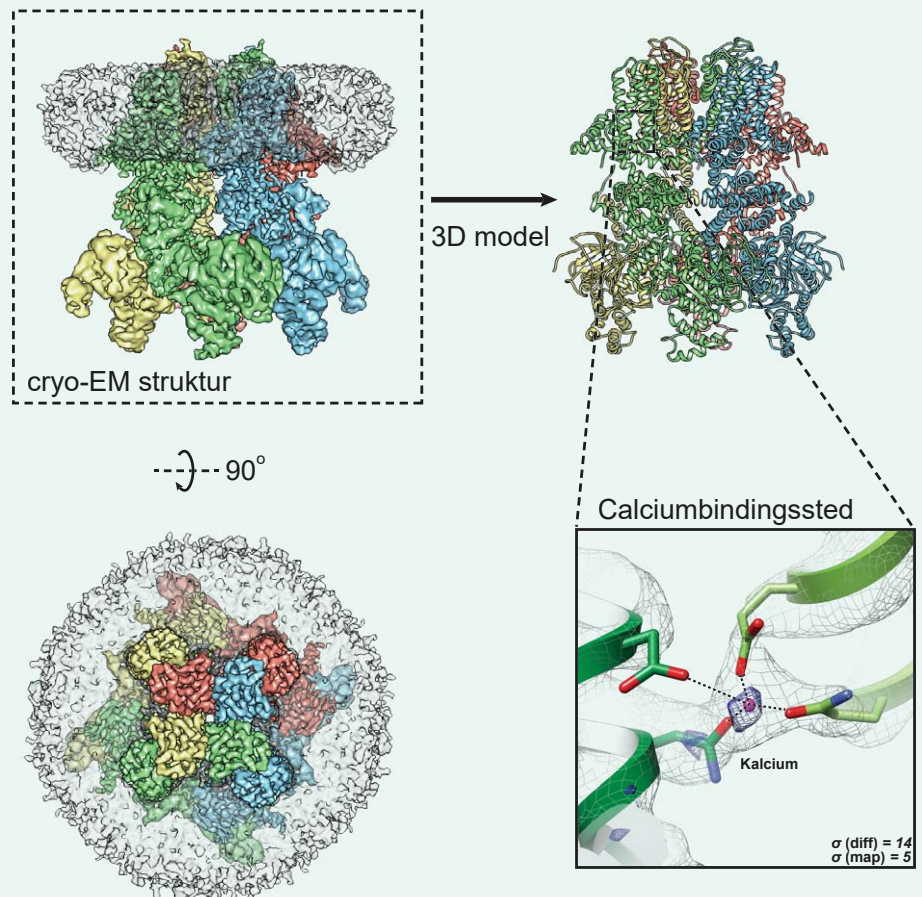
hTRPM4 får natriumioner til at flyde ind i cellen, mens kalium samtidigt flyder ud. Netto opbygges der en positiv ladning på indersiden af cellemembranen og en negativ ladning på ydersiden. Denne depolarisering af cellemembranen påvirker andre kanaler, f.eks. VGCC som får mere calcium til at flyde ind i cellen, som i hjertet får muskelfibre til at trække sig sammen. På figuren ses hTRPM4 som en simplificeret orange kanal og VGCC i lysrød.

Cryo-EM strukturen af hTRPM4

Cryo-EM strukturen

af hTRPM4 set fra hvad der svarer til membranplanen og oppefra membran ydersiden. hTRPM4 består af fire individuelle kæder (blå, gul, rød og blå) som associerer med hinanden og dermed danner en kanal i midten, hvorigennem natrium og kalium kan flyde ind og ud af cellen. Strukturen kan bruges til at lave en model af hTRPM4.

Figurens højre del viser et udsnit af modellen af hTRPM i grønne farver, som er overlagt med cryo-EM-densiteten vist som en grå densitet. Calciumionen er vist som en pink sfære. Figuren illustrerer, at opløsningen af cryo-EM-densiteter i dag er så gode, at man med stor sikkerhed kan identificere ioner og mindre stoffer bundet til proteiner.



været foran hende gennem hele forløbet, men at hun havde indhentet dem præcis på målstregen. Havde hun haft influenza en uge undervejs, var hun kommet for sent til afslutningsfesten, og så havde næsten et helt års arbejde været forgæves.

»Mange forskere ender med helt at skulle opgive mange måneder eller års arbejde, fordi de bliver overhalet inden om af andre, så det var helt fantastisk, at jeg nåede det. Derudover havde vi tre forskningsgrupper, som havde arbejdet på TRPM4 hver for sig, angrebet problemstillingen lidt forskelligt, så selvom vi alle sammen havde kortlagt det frie membranprotein, havde vi hver især også lavet en kortlægning, hvor det var bundet til forskellige andre molekyler. Det gjorde den samlede pakke meget overbevisende,« forklarer Henriette Elisabeth Autzen.

Involveret i hjertesygdomme

TRPM4, der var omdrejningspunktet i det forskningsdrama, som udspillede sig i slutningen af 2017, er en ionkanal, der sidder i rigtig mange af kroppens celler. Her danner det en passage gennem cellemembranen, som ionerne kalium og natrium kan passere igennem. Natrium og kalium er med til at styre mange af cellernes funktioner, blandt andet optag af næringsstoffer eller evnen til at sende elektriske signaler til nabocellerne. Det betyder, at uden ionkanaler og ionpumper til at transportere de to typer ioner over membranen, bliver cellerne som døde fisk i vandet. De kan ingenting.

TRPM4 findes især i vores blodårer og i hjertet. Specifikt for TRPM4 gælder det, at forskere har koblet mutationer i de gener, der står bag TRPM4, sammen med udvikling af sygdommen progressiv arvelig hjerterytmeforstyrrelse. Lidelsen er forholdsvis sjælden, men kan lede til både besvimelse, pludseligt hjer-testop og dødsfald.

Mutationer i TRPM4 opstår generelt

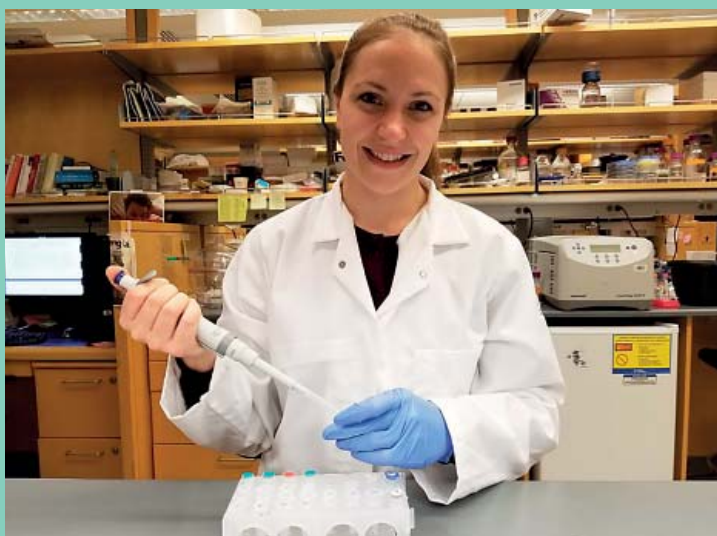


Foto: University of California, San Francisco.

Om forskeren:

Henriette Elisabeth Autzen er postdoc ved Department of Biochemistry and Biophysics, University of California, San Francisco (UCSF), hvor hun er udsendt fra Molekylær Biologisk Institut, Aarhus Universitet. Henriette er født og opvokset i Aalborg, men fik sin bachelor og kandidatuddannelse i medicinal kemi ved Kemisk Institut ved Aarhus Universitet og senere sin ph.d. ved Molekylær Biologisk Institut også ved Aarhus Universitet.

Henriette tog med økonomisk støtte fra Den Frie Forskningsfond til UCSF i starten af 2016 for at løse strukturen af TRPM4 og samtidig lære at benytte cryo-EM. Henriettes forskningsinteresser centrerer sig omkring struktur- og funktionsstudier af ionkanaler, og det er især med henblik på at undersøge deres interaktioner med syntetiske molekyler og den omkringliggende lipidmembran.

i enkelte af proteinets byggesten, hvilket ofte ændrer på dets funktionalitet, så det bliver enten mere eller mindre aktivt i cellemembranen. Denne ændring i aktivitet forskyder den hårfine balance mellem kalium og natrium både indeni og udenfor cellen, hvilket forstyrrer de elektriske signaler, som cellen udsender.

Da TRPM4 fortrinsvis sidder i hjertermusklen, leder mutationerne til, at cellerne ikke kan producere de elektriske signaler, der skal til for at opretholde en normal hjerterytme. Derudover går cellerne ofte til grunde og bliver til arvæv, hvilket yderligere kan styrke graden af hjerterytmeforstyrrelser.

Mutationer i TRPM4 kan også lede til udvikling af hjertesygdommen Brugada syndrom, der også involve-

rer hjerterytmeforstyrrelser og risiko for pludseligt dødsfald.

»Det var det protein, som vi kortlagde. For nogle måneder siden fandt forskere også ud af, at mutationer i TRPM4 er involveret i udvikling af hudsygdommen progressiv symmetrisk erytrokeratoderma også kaldet PSEK. Proteinets spiller altså ind flere forskellige steder i forskellige sygdomme, hvilket kun gør det mere interessant,« siger Henriette Elisabeth Autzen.

Åbner for ny medicin og færre bivirkninger

Interessen for TRPM4 skyldes blandt andet, at man på den lange bane gerne vil bruge viden om strukturen af proteinet til at designe medicin mod de pågældende sygdomme. For at biokemikere skal



**DANMARKS FRIE
FORSKNINGSFOND**
INDEPENDENT RESEARCH
FUND DENMARK

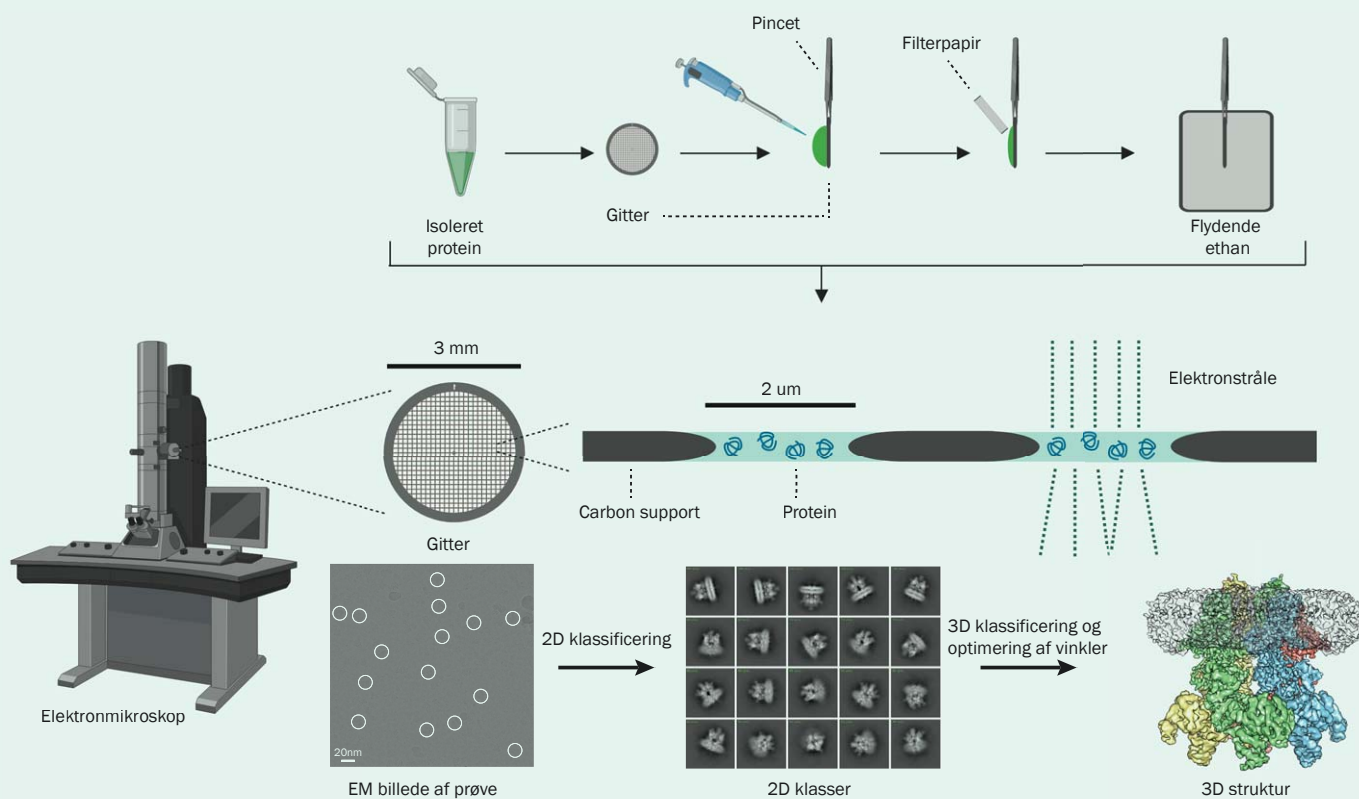
Sådan fungerer cryo-EM

Kryo-elektronmikroskopi (forkortet cryo-EM på engelsk) har forskere udviklet på i lige så lang tid, som de har udviklet på røntgenkristallografi, men teknikken kunne indtil for få år siden ikke bruges til at bestemme den atomistiske struktur af proteiner. Udvikling af både hardware og software har dog gjort cryo-EM konkurrencedygtig i forhold til røntgenkristallografi, og i 2017 gik nobelprisen i kemi til Joachim Frank, Richard Henderson og Jacques Dubochet, der er tre prominente forskere, som har bidraget til udvik-

lingen af cryo-EM som metode.

I cryo-EM inkorporerer man det isolerede protein i en tynd film af is med en temperatur på -195 grader celsius. På grund af den lave temperatur bliver vandet i prøven ikke til krystallinsk is med en regulær struktur, som man kender det fra istærninger i fryseren, men i stedet ligesom glas amorf og uden regulære interaktioner. Dette fastholder proteinets tilstand, som var det i en opløsning i modsætning til i et krystalgitter, hvilket bruges i

røntgenkristallografi. I et mikroskop skyder forskere på den tynde film af proteiner med elektroner, og elektronerne interaktioner med proteinerne bruger de til at projicere billeder af proteinerne i 2D. Billeder af flere hundredtusinder identiske proteiner med alle mulige tilfældige orienteringer bliver fanget i 2D og sættes sammen til en 3D-struktur ved hjælp af avancerede algoritmer, som kan relatere billedernes vinkel i forhold til hinanden. Ud fra 3D-strukturen kan forskerne derefter bygge en atomistisk model.



Figuren viser processen i kryo-elektronmikroskopi. Det isolerede protein påføres et 3 mm gitter, hvorefter det meste af prøven fjernes igen med filterpapir. Prøven, som bliver tilbage, ender i huller i gitteret og fryses hurtigt i flydende ethan ved cirka -195 grader celsius. Dette skaber en amorf is med proteinet, som ligger i mange forskellige orienteringer i den nu frosne buffer i gitteret. Herefter bliver gitteret med prøven sat ind i vakuumet på et elektronmikroskop og skudt på med elektroner. Mange tusind projektioner af enkelte proteiner ekstraheres, hvorefter de kan blive sammensat i 2D og efterfølgende 3D. 3D-strukturen kan forfines ved at optimere bestemmelsen af vinkler, som de enkelte proteiner antager i forhold til hinanden.

kunne designe molekyler, der eksempelvis blokerer for funktionen af TRMP4, så det ikke forårsager hjertetytmeforstyrrelser, skal de have et overblik over, hvordan proteinet ser ud for på den måde at finde steder, hvor de kan koble et blokerende molekyle på. Det kan de nu på baggrund af det arbejde, som Henriette

Elisabeth Autzen har lavet.

Ydermere er TRMP4 kun ét protein ud af en stor familie af lignende proteiner. Det betyder, at når lægemiddelproducenter forsøger at lave lægemidler, der blokerer for det ene protein, er der risiko for, at de også kommer til at blokere for et

andet. Gør de det, kan det lede til uheldige bivirkninger. For eksempel er søsterproteinet TRPM5 involveret i udvikling af diabetes. Når TRPM5 aktiveres, stiger produktion af insulin i bugspytkirtlen. Derfor ville det være meget uheldigt, hvis lægemiddelindustrien fik designet et molekyle til at blokere

for TRPM4, som samtidig blokerer for TRPM5 og for bugspytkirtlens udskilning af insulin.

»Her er det nødvendigt at kende til strukturerne af alle proteinerne i familien, så man ved, hvilke forskelle der er mellem dem. Ellers kan man komme til at blokere for eller på anden måde påvirke flere af dem, når man bare vil ramme det ene,« forklarer Henriette Elisabeth Autzen.

Finder forskelle i TRP-familien

På det mere detaljerede plan viste Henriette Elisabeth Autzens kortlægning af TRPM4 fra 2017/2018 blandt andet, at proteinet kun danner en smal kanal gennem cellemembranen. Der er formentlig er forklaringen på, at TRPM4 sammen med TRPM5 er de eneste ud af TRP-familiens 27 proteiner, som ikke lader calcium passere igennem.

Selvom calcium altså ikke kan passere gennem TRPM4, spiller ionen dog stadig en tilsyneladende vigtig rolle for membranproteinets funktion. I hvert fald viser Henriette Elisabeth Autzens kortlægning, at der på TRPM4 findes et domæne, hvor calcium kan binde og derved ændre strukturen og formentlig også funktionen af TRPM4.

»Vi fandt ud af, at det her sted på TRPM4, hvor calcium kan binde, faktisk sidder helt inde i den del af proteinet, som sidder i cellemembranen. Det fortæller os noget om, hvordan kanalen fungerer og aktiveres. Siden vores opdagelse har andre forskere fundet lignende domæner i andre TRP-proteiner, og det kommer til at være interessant at finde ud af, hvorfor nogle proteiner inden for familien tilsyneladende lader calcium passere igennem, mens andre blot binder det som en del af deres aktivering,« siger Henriette Elisabeth Autzen.

Ydermere fandt hun i sin strukturelle kortlægning, at TRPM4 har et meget stort cytoplasmisk domæne, hvilket er den del af membranproteinets, som sidder uden for

cellen. I en medicinsk sammenhæng er det cytoplasmiske domæne formentlig det mest interessante. Det vil være her, at man vil forsøge at udvikle forskellige molekyler, som kan binde til og blokere funktionen af membranproteinets. De cytoplasmiske domæner varierer også meget mellem de forskellige proteiner i familien, og hos TRPM4 er domænet relativt stort i forhold til i de andre proteiner.

»Det gør det mere realistisk at tro på, at man kan udvikle et molekyle, som kun binder til TRPM4 uden at binde til de andre proteiner i TRP-familien,« siger Henriette Elisabeth Autzen.

Ny teknik giver bedre kortlægning af proteiner

I sin forskning har Henriette Elisabeth Autzen benyttet en helt ny teknik til at kortlægge proteiner med. Metoden hedder cryoEM, og hendes chef, professor Yifan Cheng, var den første forsker til at benytte teknikken til at kortlægge strukturen af et membranprotein, nemlig TRPV1 som interagerer med capsaicin, der er det aktive stof i chilipeber.

Strukturel kortlægning af proteiner ved hjælp af cryoEM fungerer på denne måde:

Indledningsvist udtrykker forskerne det ønskede protein i en cellelinje. Henriette Elisabeth Autzen benyttede sig i sin forskning af en human cellelinje. Efterfølgende isolerer forskerne proteinerne i et opløsningsmiddel, der tillader membranproteinernes fedtelskende dele at være tolerante overfor en vandbaseret opløsning. Ved at udtrykke proteinet i samme sekvens som en proteinmarkør, som forskere har specialiserede værktøjer til at fange, kan forskerne bagefter isolere de specifikke proteiner, som de vil undersøge, fra alle de andre proteiner i en celle.

Når først proteinet er oprenset, plader forskerne det ud over et lille gitter og fryser det øjeblikkeligt med ethan, der er nedkølet ved hjælp

af flydende kvælstof. Herefter kan de fotografere det med et elektronmikroskop, som beskyder proteinet med elektroner fra alle tænkelige vinkler. Det giver udslag i form af en masse 2D repræsentationer af proteinet. En matematisk algoritme sætter efterfølgende alle de mange billeder sammen til en 3D-model. Voila!

»Det svarer til, at en fotograf går rundt om et objekt og tager en masse billeder, som han derefter sætter sammen til noget, der kan illustreres i 3D,« forklarer Henriette Elisabeth Autzen.

Vil kortlægge muterede proteiner

Foruden de medicinske indsigter, som kan komme ud af at kortlægge membranproteiner, kan forskningen også bruges til at blive klogere på cellerne i sig selv.

Calcium er på den ene eller anden måde involveret i reguleringen af alle TRPM-membranproteinerne, og calcium er måske det vigtigste af kroppens signalmolekyler. Ved at forstå, hvordan calcium spiller sammen med TRPM-proteinerne, får forskerne indsigt i, hvordan celler i det hele taget reguleres, kommunikerer og fungerer. Det er vigtigt at vide, ikke kun for at kunne kurere sygdomme, men også for overhovedet at kunne forstå, hvorfor de opstår, når noget går galt i generne.

I den sammenhæng spiller Henriette Elisabeth Autzens forskning indtil videre kun en lille rolle, men det kan ændre sig.

»På nuværende tidspunkt drejer min forskning sig om at følge op på de fund, som vi gjorde i 2017 og 2018. Mere specifikt vil jeg meget gerne kortlægge proteinet, når der er opstået en mutation i det og finde ud af, hvilken rolle den omkringliggende lipidmembran spiller. Det kan forhåbentlig være med til at komme med en molekylærbiologisk forklaring på, hvordan mutationer i generne bag TRPM4 kan resultere i hjerte- og hudsygdomme,« siger Henriette Elisabeth Autzen. ■

Videre læsning:
Henriette E. Autzen, Alexander G. Myasnikov, Melody G. Campbell, Daniel Asarnow, David Julius, Yifan Cheng: Structure of the human TRPM4 ion channel in a lipid nanodisc. *Science* 12 Jan 2018; Vol. 359, Issue 6372, pp. 228-232. DOI: 10.1126/science.aar4510