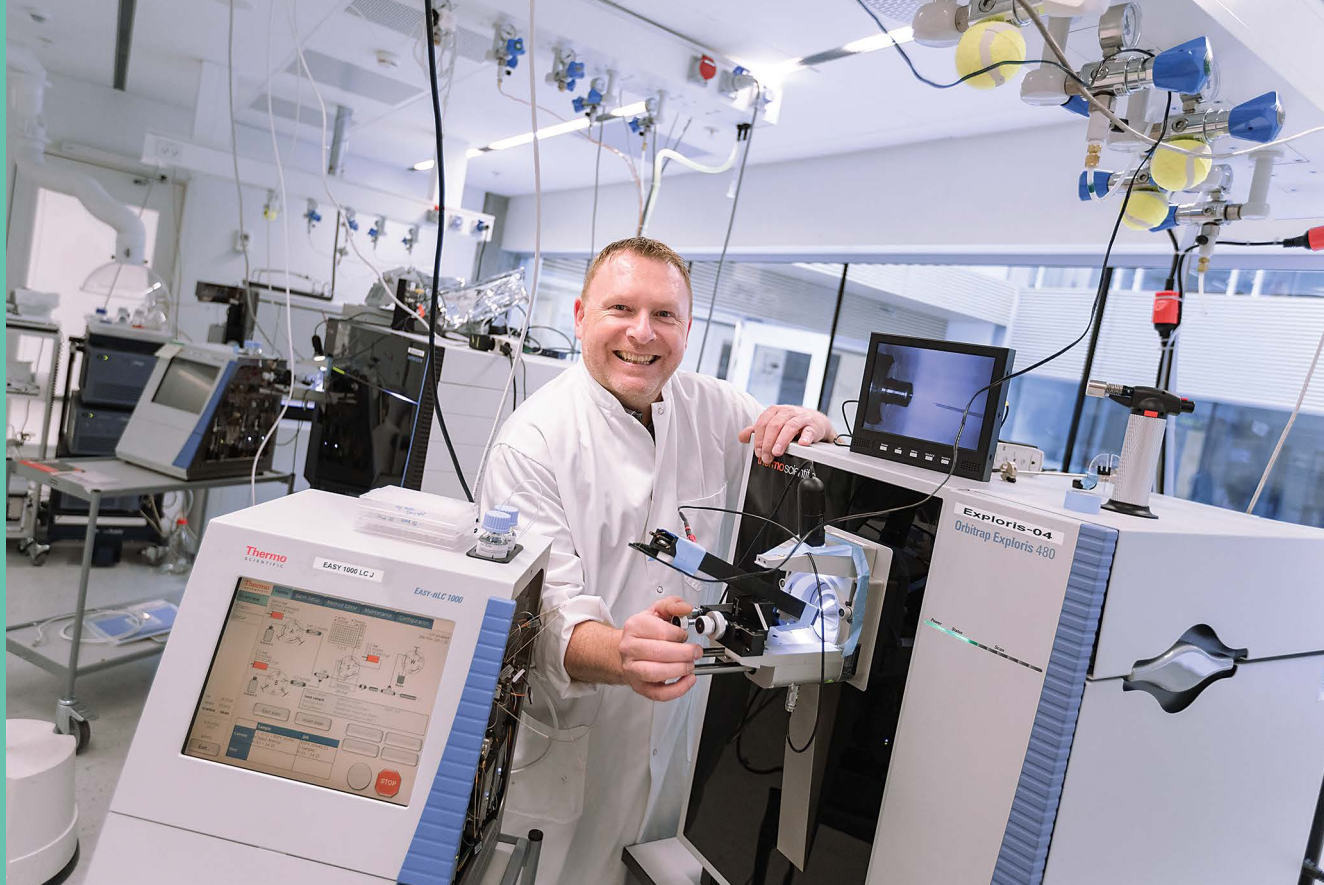


Martin Røssel Larsen
ved et massespektro-
meter på SDU.

Foto: Jacob Fredegaard Hansen



MINIHJERNER I REAGENSGLAS

gør forskere klogere på psykiske sygdomme

Om forfatteren
Kristian Sjøgren,
videnskabsjournalist.
ksjoegren@gmail.com



**DANMARKS FRIE
FORSKNINGSFOND**
INDEPENDENT RESEARCH
FUND DENMARK

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

Danmarks Frie Forsknings-
fond dækker alle viden-
skabelige hovedområder
og uddeler hvert år godt 1
mia. kr. til forskningspro-
jekter baseret på forsker-
nes egne ideer. Danmarks
Frie Forskningsfond består
af 84 anerkendte forskere
udpeget på baggrund
af deres høje faglige
kompetence. Formand for
Danmarks Frie Forsknings-
fond | Natur og Univers er
professor ved Københavns
Universitet, Søren Bak.
Se mere på www.dff.dk

**Forskere har udviklet en metode til at lave stamcellebaserede “minihjerner”
i reagensglas og studere bittesmå forandringer i enderne af nervecellerne.
Sådanne ændringer kan have betydning for udvikling af blandt andet
skizofreni og andre psykiske sygdomme.**

Det er veletableret, at for-
skellige psykiske lidelser
som for eksempel skizo-
freni eller bipolar lidelse
har deres udspring i en dysfunktio-
nel hjerne. Hjernen fungerer sim-
pelthen ikke, som den skal, og det
skyldes blandt andet, at signaler
ikke når korrekt frem fra den ene
nervecelle i hjernen til den anden.
Alt det er velkendt, men derefter be-
gynder forskerne indenfor området

at blive lidt vage i formuleringerne.
Det skyldes i særdeleshed, at det
er ekstremt svært at studere signa-
lering i hjernen, og hvad der er af
forskell i signalering i en rask hjerne
og en hjerne, som udvikler psykisk
sygdom.

Den problemstilling arbejder for-
skere fra Syddansk Universitet,
Københavns Universitet og MRC i
Cambridge på at finde løsninger på.

Ved hjælp af “minihjerner” fra både
raske og personer med psykisk syg-
dom samt en metode til at studere
kommunikationen mellem nervecel-
ler på en helt ny måde kommer de
nu flere skridt tættere på at forstå
hjernen. Opdagelserne bringer dem
blandt andet tættere på at kunne
udvikle lægemidler, der retter op på
problemerne i signaleringen mellem
nerveceller i en dysfunktionel hjerne,
ligesom de også skal til at studere,

hvad der skete med hjernen for otte millioner år siden, da vores slægtslinje blev adskilt fra chimpansernes. Blandt andet udviklede chimpansernes hjerter sig i en retning, så de ikke kan rammes af mange af de vira, som mennesker kan. Det kan have betydning for udvikling af neurologiske sygdomme som Parkinsons sygdom.

»Vi har udviklet forskellige metoder til at studere hjernen på helt nye måder, og det åbner op for et nyt forskningsområde, hvor vi kan blive klogere på hjernen som organ, og hvad der sker, når den ikke fungerer, som den burde. Blandt andet tyder noget på, at chimpanser ikke kan få Parkinsons, hvilket kan hænge sammen med, at nogle modifikationer af proteiner i deres hjerneceller gør det umuligt for virus at trænge ind i cellerne. Vi er de eneste i verden, der har udviklet en metode til at kunne studere denne hypotese,« fortæller en af forskerne bag det interessante danske forskningsarbejde, professor Martin Røssel Larsen fra Institut for Biokemi og Molekylær Biologi ved Syddansk Universitet.

Når et nervesignal starter

Inden vi kommer frem til de helt store perspektiver i de danskudviklede metoder, skal vi lige tre skridt tilbage for at kunne forstå, hvad det hele drejer sig om. Når det kommer til signalering i hjernen mellem nerveceller (neuroner), sker det i celleenderne, hvor en nerveimpuls blive afsendt fra den ene celle til den anden. Selve nerveimpulsen kaldes et aktionspotentiale, og det starter med en såkaldt depolarisering, der er en ændring i positiv retning af den elektriske spændingsforskel over cellemembranen.

Signalet til denne depolarisering sker ikke igennem udtryk af proteiner, men i stedet gennem det, som hedder posttranslationelle modifikationer af proteiner. Cellerne laver med andre ord ikke de signalrelevante proteiner fra bunden ved at aflæse et gen, men ændrer i stedet i allerede producerede proteiner, så de på meget kort tid kan aktiveres og derved sætte gang i den signalkaskade, som ultimativt leder til en impuls sendt afsted fra den præsynaptiske neuron. Disse posttranslati-

Om Martin Røssel Larsen

Han er professor i biomedicinsk massespektrometri og systembiologi ved Institut for Biokemi og Molekylær Biologi ved Syddansk Universitet (SDU). Han er oprindeligt uddannet fra SDU og skrev sin ph.d.-afhandling under Professor Peter Roepstorff, som var en af pionererne indenfor biologisk massespektrometri. Derefter blev han ansat som først postdoc ved Australian Proteome Analysis Facility i Sydney, Australien, inden han kom tilbage til SDU som lektor. I 2011 blev han professor ved Institut for Biokemi og Molekylær Biologi på SDU. Martin Røssel Larsens primære forskningsinteresser er anvendelsen af biomedicinsk massespektrometri til at studere posttranslationelle modifikationer indflydelse på signalering i nerver og andre hjerneceller i normale og sygdomsmæssige tilstande.

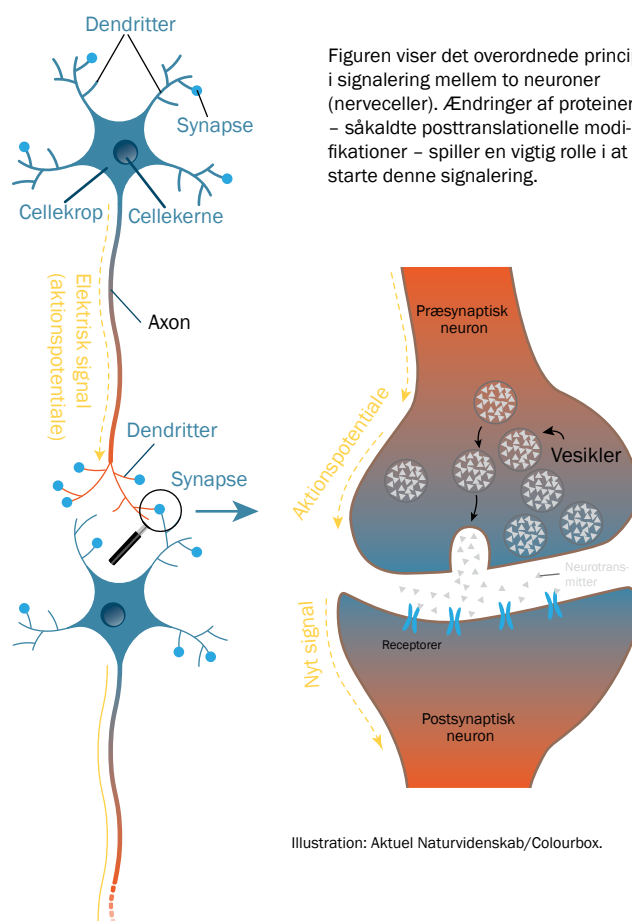


Illustration: Aktuell Naturvidenskab/Colourbox.

nelle modifikationer er der hundredvis af, men lad os for eksemplets skyld kigge på fosforylering. Ved en posttranslationel fosforylering bliver der på et protein påsat en fosfatgruppe. Dette arbejde udføres af en gruppe enzymer, der hedder kinaser, som derved er i stand til at ændre strukturen eller funktionen af proteinet. Drejer det sig om et protein med relevans for cellulær signalering, kan dette protein blandt andet have indflydelse på frigivelse af neurotransmittere fra såkaldte

vesikler, der er små kugler opbygget af rester af cellemembran og som indeholder transmittermolekyler.

Når en nervecelle skal sende et signal til en anden nervecelle, skal man derfor forestille sig, at der først sker en posttranslationel modifikation af et eller flere proteiner, hvilket leder til en proces, der fører vesikler ud til nerveendens overflade, hvorfra de frigiver neurotransmittere. Mange af de frigivne neurotransmittere når frem til en modtagende

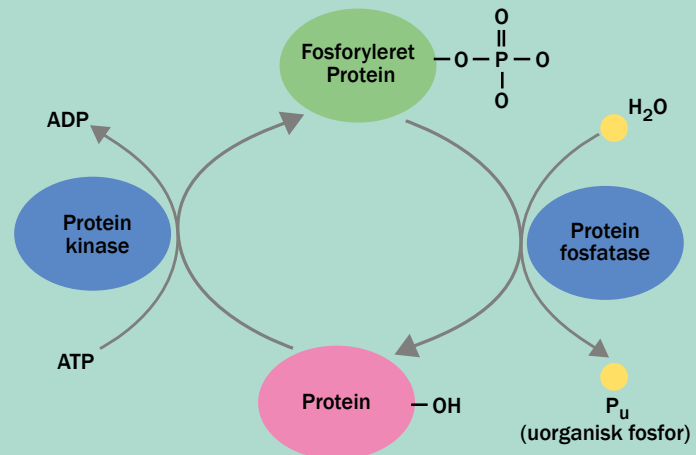
Om posttranslationelle modifikationer

Posttranslationelle modifikationer er kemiske ændringer på proteiner efter deres syntese (translation) i ribosomerne. Den kemiske modifikation består typisk i at tilføje en særlig kemisk gruppe til bestemte aminosyrer i proteinet. Sådanne modifikationer spiller afgørende roller i reguleringen af proteins funktion, stabilitet, lokalisering og interaktioner med andre biomolekyler. Posttranslationelle modifikationer kan være reversible eller irreversible og udføres af specifikke enzymer. Nogle af de mest almindelige posttranslationelle modifikationer er:

Fosforylering: Tilføjelse af en fosfatgruppe (PO_4^{3-}). Det ændrer ofte proteinets aktivitet ved enten at aktivere eller deaktivere det.

Glykosylering: Tilføjelse af kulhydratgrupper. Dette er vigtigt for proteinfoldning, stabilitet og celle-celle-interaktioner.

Methylering: Tilføjelse af methylgrupper (CH_3). Dette kan ændre, hvordan gener udtrykkes.



Figuren viser princippet i fosforylering: En fosfatgruppe, der stammer fra molekylet ATP, sættes på et protein ved hjælp af et enzym (kinase). Herved kan proteinet aktiveres, eller fosfatgruppen kan udgøre en overflade, som andre proteiner kan binde til. Ved hjælp af enzymer kaldet fosfataser kan fosfatgruppen fjernes fra proteinet igen.

Acetylering: Tilføjelse af en acetylgruppe ($-\text{COCH}_3$). Dette påvirker for eksempel, hvordan gener udtrykkes.

Ubiquitinerings: Tilføjelse af det lille protein ubiquitin. Dette er ofte et signal til proteinets nedbrydning, for eksempel nedbrydning af cykliner i cellecycklus.

Posttranslationelle modifikationer er essentielle for den dynamiske regulering af cellulære processer og muliggør et hurtigt respons på ændringer i cellens miljø.

De er involveret i næsten alle aspekter af cellens funktion fra signalering og genudtryk til cellecycklus og programmeret celledød.

nervecelle, der processerer signalet og omdanner det til aktion, for eksempel bevægelse af en finger. Alt det sker indenfor en brøkdel af et sekund og er grundlaget for al signalering mellem celler i hjernen.

Kigger proteinerne i kortene

Når de posttranslationelle modifikationer ikke helt sker, som de burde, kan der ske små fejl i justeringen af signalet mellem hjernens celler. Det er klart, at hvis de posttranslationelle modifikationer er helt i skoven, er resultatet en komplet dysfunktionel hjerne, hvilket ikke er foreneligt med liv. Men ved små problemer i fintuningen af signaleringen mellem hjernens celler kan det blandt andet lede til udvikling af psykiske tilstande som skizofreni og andre lidelser.

De danske forskere har udviklet en metode til netop at studere posttranslationelle modifikationer i

hjernens nerveender.

»Metoden benytter massespektrometri, som måler massen på proteiner eller fragmenter af proteiner kaldet peptider. Derved kan vi se, hvad der er blevet påsat eller fjernet af posttranslationelle modifikationer. Vi kan også sige, hvor på proteinet for eksempel en fosfatgruppe er sat på eller fjernet. Ved at oprense nerveender og stimulere dem kan vi efterligne en depolarisering i nerveenderne fra hjerneceller og se, hvad det skaber af posttranslationelle modifikationer, ligesom vi kan se, hvad der er af forskelle i de posttranslationelle modifikationer mellem raske og syge hjerneceller,« forklarer Martin Røssel Larsen.

Han uddyber, at forskerne med metoden også kan se, hvor stor betydning bestemte posttranslationelle modifikationer har for et givent

proteins funktion. Bliver der som eksempel påsat voldsomt mange fosfatgrupper på en given aminosyre i et protein, når neuronet bliver depolariseret, må netop fosforyleringen af denne aminosyre have stor betydning for den cellulære signalering, som proteinet er involveret i.

Laver minihjerner i reagensglas

Med en anden del af den udviklede metode er forskerne kommet omkring det problem, at man ikke bare kan udtage frisk hjernevæv fra levende mennesker for at studere nervesignalering i laboratoriet. Hjernevæv fra døde mennesker er heller ikke så let at få fingrene i og virker ikke til at studere dynamiske ændringer i hjernen.

Problemet med at bruge mus og rotter til at studere posttranslationelle modifikationer er desuden, at ligesom chimpansehjernen er for-

Om udvikling af minihjerner

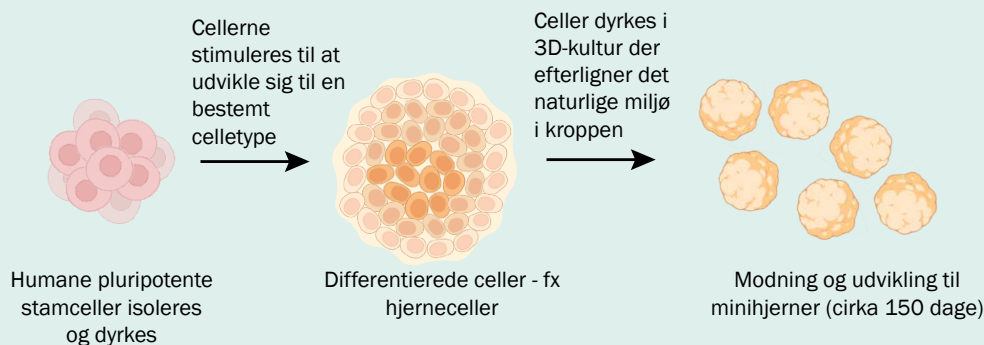


Illustration: BioRender/Maria Kyung-Ah Petersen, Matias Adonis Jul Ryding & Martin Røssel Larsen.

Organoider er tredimensionelle cellekulturer, der er afledt fra pluripotente stamceller, og som efterligner strukturen og funktionen af rigtige organer. Disse miniatureorganer udvikles gennem en proces, der omfatter specifikke signaler og vækstfaktorer, som styrer cellernes differentiering og organisering. Organoider repræsenterer en banebrydende metode til at studere menneskelig udvikling, sygdomsmodeller og lægemiddelafrøvnning.

Pluripotente stamceller har evnen til at differentiere til enhver celletype i kroppen. Der findes to hovedtyper af stamceller; embryonale stamceller og inducerede pluripotente stamceller. Embryonale stamceller stammer fra tidlige embryoner, mens inducerede pluripotente stamceller er voksne celler, der er genetisk omprogrammeret til en pluripotent tilstand. Det er sidstnævnte, som forskerne har benyttet i deres forskning til at lave minihjerner.

Forskere kan benytte organoider til flere former for studier:

Sygdomsmodeller: Efterligner sygdomme som kræft, neurodegenerative lidelser eller infektionssygdomme.

Lægemiddelafrøvnning: Test af lægemiddelvirkning og toksicitet på humane celler i organlignende systemer.

Studie af udviklingsbiologi: Forståelse af fosterudvikling og, hvordan organerne bliver dannet.

Regenerativ medicin: Potentiale for at reparere eller erstatte beskadiget væv.

Udviklingen af organoider fra pluripotente stamceller repræsenterer en revolution indenfor biomedicinsk forskning, da de tilbyder en mere realistisk model for humane organer end traditionelle cellekulturer. De giver også forskere adgang til at studere organer, der kan være svære at få humane celler fra, herunder hjernen.

skellig fra menneskers, er musenes og rotternes hjerner det i den grad også. Det er med andre ord ikke til at vide, om posttranslationelle modifikationer i nerveceller fra muse- eller rottehjerner overhovedet er relevante i studier af sygdom hos mennesker.

Dette problem har forskerne dog løst på en genial måde, hvor de i laboratoriet kan skabe "minihjerner", der i struktur og funktion ligner det, som sidder inde bag øjnene hos os alle sammen. Det geniale ved metoden er dog ikke kun, at det er minihjerner, som kan studeres i laboratoriet, men også at hjernerne er skabt ud fra celler fra en blodprøve. Forskerne skal altså slet ikke rode rundt i hjernen hos folk for at kunne studere eventuelle problemer i de posttranslationelle modifikationer i deres nerveender. I stedet benytter forskerne en meto-

de, hvor de tvinger blodceller til at gå tilbage i udvikling, så de går fra at være differentierede blodceller til at blive til såkaldte pluripotente stamceller, der kan udvikle sig til at blive til en lang række celler, herunder nerveceller. Forskerne benytter derefter forskellige signalstoffer til at få de pluripotente stamceller til at udvikle sig til netop nerveceller, som samlet set skaber en lille tredimensionel minihjerne i et reagensglas. Den minihjerne kan forskerne eksperimentere på i uendelighed.

Det smarte ved at bruge minihjerner i reagensglas er også, at forskerne kan skabe minihjernerne ud fra den enkelte person og blandt andet skabe minihjerner fra personer med psykiske sygdomme eller personer uden disse lidelser. Det er med andre ord muligt for forskerne at studere forskelle i posttranslationelle modifikationer mellem minihjer-

ner fra psykisk syge personer og i den sammenhæng raske kontroller. Martin Røssel Larsen forklarer, at hans samarbejdspartnere udtager blodceller fra patienter, som efterfølgende bliver omprogrammeret til stamceller og derefter bliver brugt til at lave minihjerner.

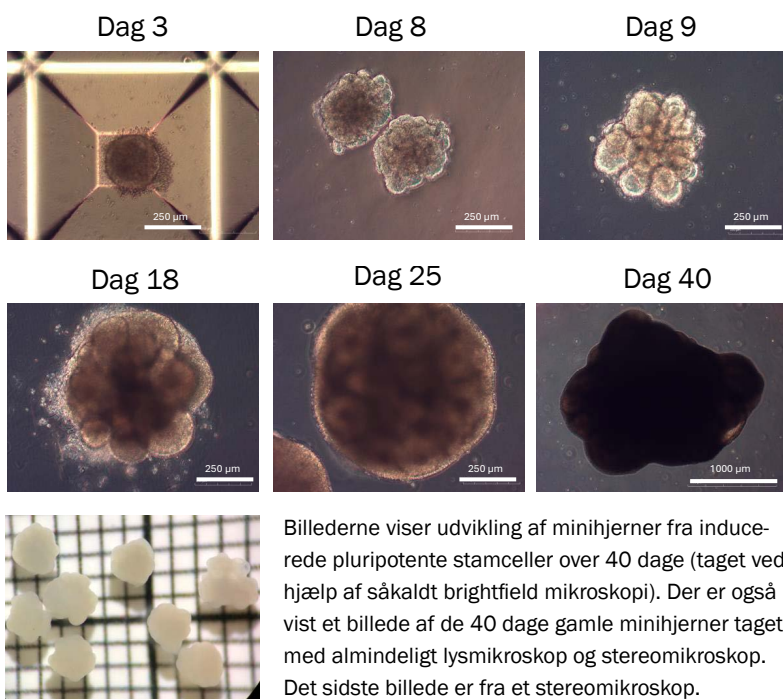
»Det betyder, at vi ikke længere behøver at få hjerneceller fra afdøde, men at vi alligevel kan studere nedarvet risiko for forskellige sygdomme i hjernen, fordi det genetiske udtryk, som leder til udvikling af for eksempel skizofreni, også vil blive udtrykt i blodcellerne og derfor også i de minihjerner, som vi studerer,« siger han.

450 forskellige typer modifikationer

Netop når vi taler om det genetiske udtryk, har de nyudviklede metoder nogle klare fordele fremfor blot at studere genetisk disposition



**DANMARKS FRIE
FORSKNINGSFOND**
INDEPENDENT RESEARCH
FUND DENMARK



Studerer forskelle mellem hjerter hos raske og syge

Med metoderne på plads kan forskerne nu for første gang komme et spadestik dybere i forståelsen af, hvad der sker i hjernen hos personer, der udvikler skizofreni eller andre psykiske sygdomme.

Forskerne er allerede i gang med blandt andet at lave minihjerner ud fra blodprøver taget fra personer med skizofreni. Indtil videre har forskerne lavet flere minihjerner for skizofreni og kontroller. De indledende undersøgelser efter forskelle mellem hjerneerne har blandt andet afsløret, at der er mange forskelle mellem raske og syge hjerter, men også indbyrdes mellem minihjerner fra personer med skizofreni.

»Formålet med at studere disse minihjerner er også, at vi kan bruge dem som modelsystemer til afprøvning af eventuelle behandlinger. Er nogle posttranslationelle modifikationer associeret med udvikling af skizofreni, kan vi forsøge at behandle med stoffer, der hæmmer for eksempel de kinaser eller fosfataser, som er skyld i fejlene. Denne type lægemidler kender vi allerede til fra kræftbehandling, og det kan være, at de også vil virke ved skizofreni,« siger Martin Røssel Larsen.

Han uddyber, at skizofreni bare er det første skridt på vejen. Forskerne har også på tapetet at udvikle minihjerner ud fra blodprøver taget fra personer med bipolar lidelse og autisme.

»Det drejer sig også om at forstå forskelle og ligheder mellem disse sygdomme. Meget ved de forskellige psykiske lidelser minder om hinanden, og det er da et håb, at sygdommene ligner hinanden så meget i deres udtryk, at man måske kan behandle dem alle sammen med samme behandling,« siger Martin Røssel Larsen.

Han tilføjer, at forskerne indtil videre har fokuseret på undersøgelser af forskelle i posttranslationelle fosforyleringer, men at forskerne fremadrettet vil rette blikket mod nogle af de andre 450 forskellige former for posttranslationelle modifikationer.

for udvikling af psykisk sygdom. Forskere har i mange år forsøgt at blive klogere på arveligheden i psykiske sygdomme, og det har de blandt andet gjort ved at studere små genetiske forskelle mellem mennesker. De studier har peget på hundredvis af gener, hvor givne mutationer er mere hyppige hos personer med for eksempel skizofreni sammenlignet med i den brede befolkning. Problemet med disse studier har dog været, at det er meget svært at komme fra identifikationen af en mutation til rent faktisk at forstå, hvorfor netop denne genetiske variant er associeret til øget risiko for udvikling af skizofreni.

En stor del af problemet skyldes, at det for det første ofte ikke er til at sige, om et gen overhovedet bliver udtrykt som et protein. Det kan lige så vel være, at genet bliver holdt nede og slet ikke har nogen effekt på noget som helst. For det andet sker der rigtig mange posttranslationelle modifikationer af proteiner, efter de er blevet oversat fra gener. Alene når det gælder fosforylering af proteiner, er 500 forskellige kinaser med til at sætte fosfatgrupper på forskellige steder på proteinet, ligesom over 200 forskellige fosfataser er med til at tage dem af

igen. Fosforylering er desuden blot én af forskellige mulige posttranslationelle modifikationer. Der findes over 450 forskellige typer af posttranslationelle modifikationer, som alle sammen er med til at styre et proteins aktivitet, interaktioner og funktioner. Martin Røssel Larsen har med sine kollegaer blandt andet identificeret, at der på nogle proteiner i nerveenderne på mus findes 150 steder, hvor proteinet kan modificeres med en fosfatgruppe. Alt sammen bare for at sige, at der kan ske rigtig meget fra det genetiske niveau til effekt af protein. Derfor vil Martin Røssel Larsen med sine kollegaer også hellere studere proteinerne i sig selv i stedet for genetikken, der potentielt ligger bag,

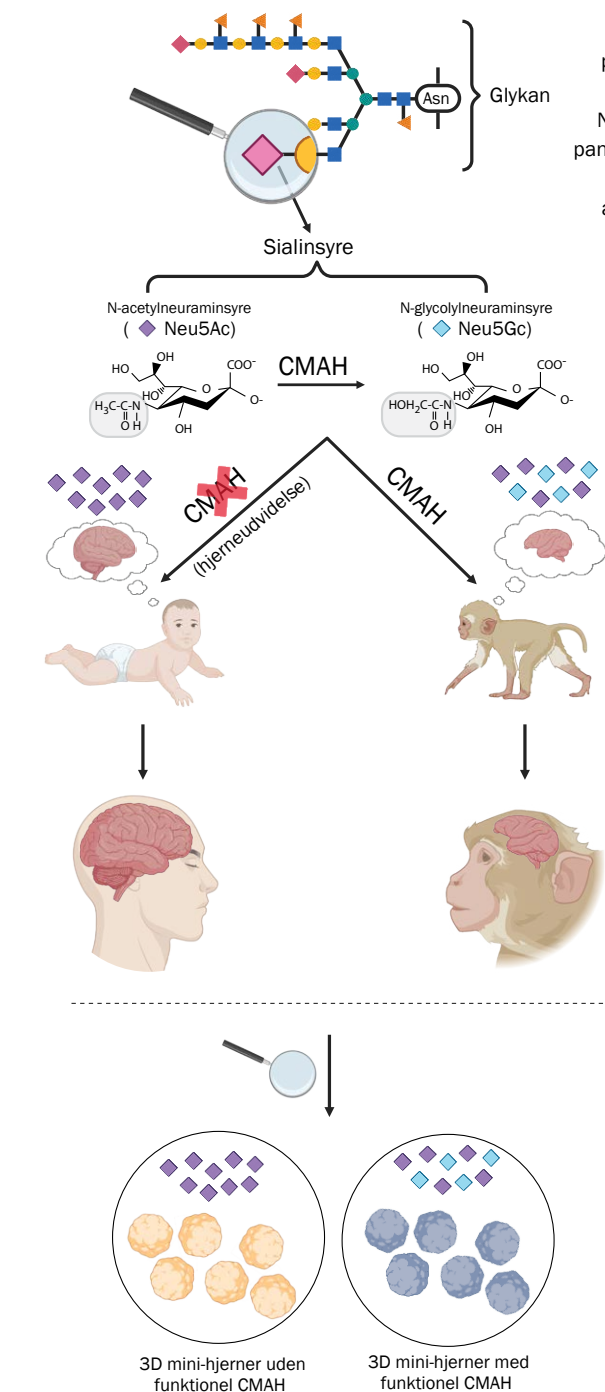
»Der er identificeret hele 200 risikogener for skizofreni, men blot under én procent af dem, der udvikler skizofreni, er i genetisk højrisiko. De resterende er det ikke. Det peger på, at hvis vi kun kigger på genetik og ikke på proteinerne, kommer vi ikke til at forstå, hvad der går galt i hjernen hos personer, der udvikler skizofreni. I den sammenhæng har ingen før os kigget på de posttranslationelle modifikationer,« forklarer Martin Røssel Larsen.

Chimpanser og Parkinsons

Og så er vi fremme ved chimpanserne. Forskningen kan nemlig ikke kun bruges til at studere forskelle mellem raske og syge menneskehjerner, men også gøre forskere klogere på, hvad der skete for otte millioner år siden, da mennesker og chimpanser gik hver deres evolutionære vej. Kigger man på forskelle mellem os og vores chimpanseslæggtninge, er vi genetisk set kun 1,5 procent forskellige, men lige efter det evolutionære split mellem de to arter gennemgik vi mennesker en enorm hjerneekspansion, som sendte os til Månen med mobiltelefoner, mens chimpanserne forblev i skoven.

En af de nævneværdige forskelle mellem vores hjerner er evnen til at lave posttranslationelle modifikationer med kulhydratet sialinsyre, der sættes på glykaner på proteiner i celler. Her har chimpanser muligheden for at påsætte to slags sialinsyre på glykaner på proteiner, mens vi faktisk kun kan påsætte én slags sialinsyre. De proteiner, der er modificeret med disse glykanstrukturer, sætter sig blandt andet på overfladen af nerveenderne, hvor sialinsyren normalt stikker ud. I den cellulære signalering har denne modifikation betydning for, hvad der kan binde til cellers overflader, samt på den cellulære signalering. Derfor er forskelle i sialinsyre-biologien mellem mennesker og chimpanser også på otte procent, selvom den genetiske forskel kun er 1,5 procent. Sialinsyre er forskellen.

Martin Røssel Larsen har med sine kollegaer modtaget en bevilling til at studere denne forskel mellem mennesker og chimpanser og blandt andet undersøge, hvad der sker med menneskets hjerneudvikling, hvis vores hjerneceller bliver modificeret til at kunne producere begge former for sialinsyre. Forskerne skal også undersøge det omvendte i chimpanser. Et andet interessant perspektiv ved sialinsyre er, at det kan blive påsat forskellige kulstoffer på kulhydratstrukturen på humane proteiner og proteiner fra chimpanser, hvilket har stor betydning for virale infektioner. Når sialinsyre bliver sat på humane membranproteiner i en såkaldt 2,6-binding, kan vira som influenza-virus benytte sialinsyre til at trænge ind i cellerne. Da 2,6-bindingen er meget lidt til stede i chimpanser, kan



Figuren viser øverst glykanstrukturer på proteiner, som indeholder sialinsyre. Der findes to primære slags sialinsyrer: Neu5Ac, som både mennesket og chimpanser har, og så Neu5Gc, som kun findes hos chimpanser. Forskellen ligger i, at chimpanser har et funktionelt enzym CMAH, mens menneskets CMAH-gen er muteret under evolutionen, så dette

enzym ikke er aktivt i menneskeceller. Martin Røssel Larsen og kolleger vil nu undersøge, hvilken betydning denne forskel har for tidlig hjerneudvikling og associerede biologiske processer ved at studere minihjerner med og uden funktionel CMAH.

chimpanser ikke blive smittet med influenza fra mennesker.

Når det kommer til Parkinsons sygdom, mener mange forskere faktisk, at sygdommen er resultatet af en reaktivering af virus i hjernen. Netop det kan være forskellen på, hvorfor mennesker kan få Parkinsons sygdom, mens chimpanser ikke kan. Det kan simpelthen være, at nogle posttranslationelle modifikationer skaber forskelle mellem dem og os, så influenza og andre virus kan trænge ind i vores hjerner

og skabe et væld af problemer der, men ikke hos chimpanserne.

»Det er et andet projekt, som vi har fået en bevilling til. Vi er de eneste i verden, der har udviklet en metode til specifikt at studere posttranslationelle modifikationer med sialinsyre. Det åbner op for en masse forskning i både forskelle mellem mennesker og chimpanser, ligesom vi måske kan blive klogere på, hvorfor mennesker udvikler Parkinsons sygdom, og hvad vi kan gøre ved det,« siger Martin Røssel Larsen.

Illustration: BioRender/Maria Kyung-Ah Petersen, Matias Adonis Juli Ryding & Martin Røssel Larsen.



**DANMARKS FRIE
FORSKNINGSFOND**
INDEPENDENT RESEARCH
FUND DENMARK