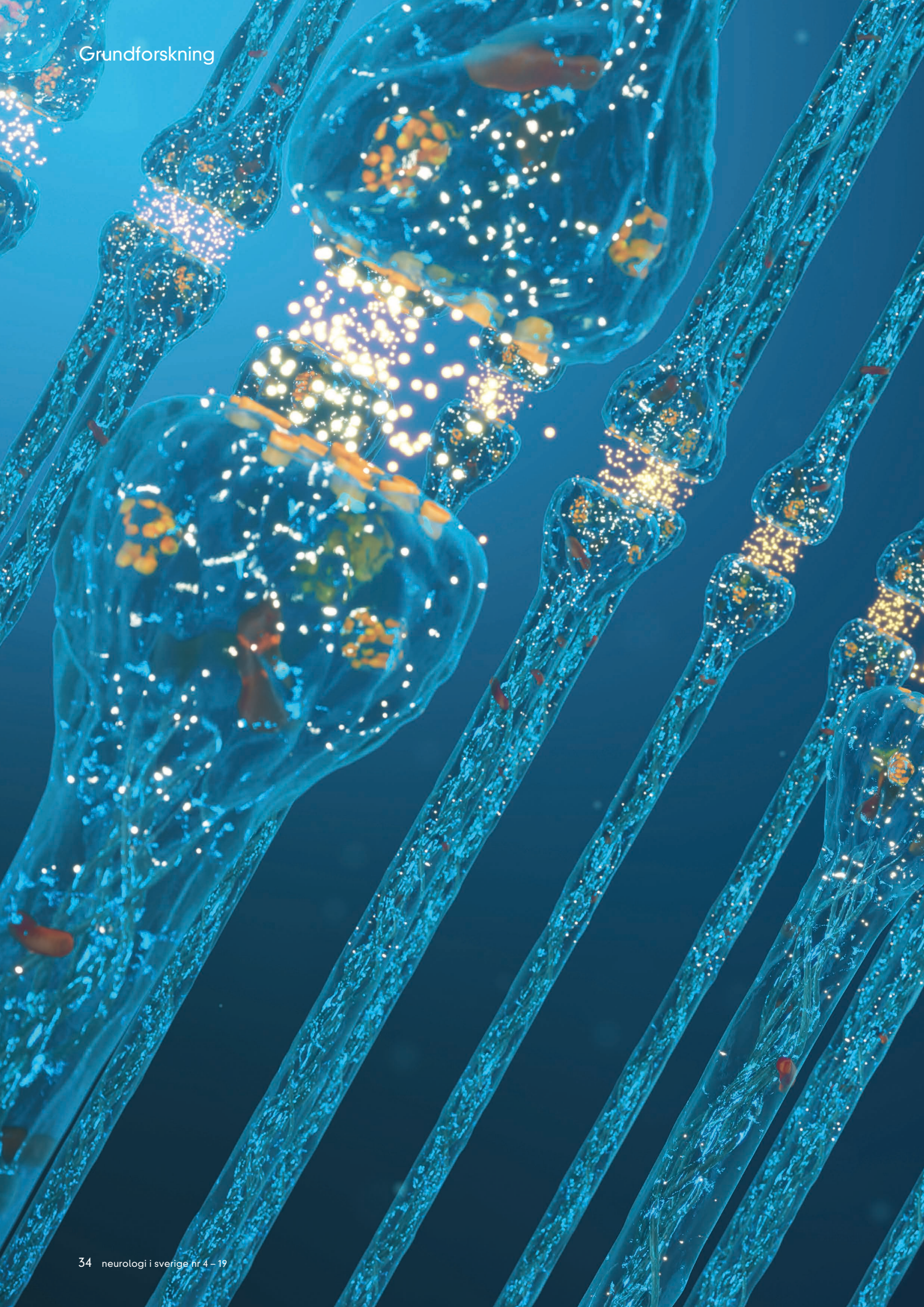
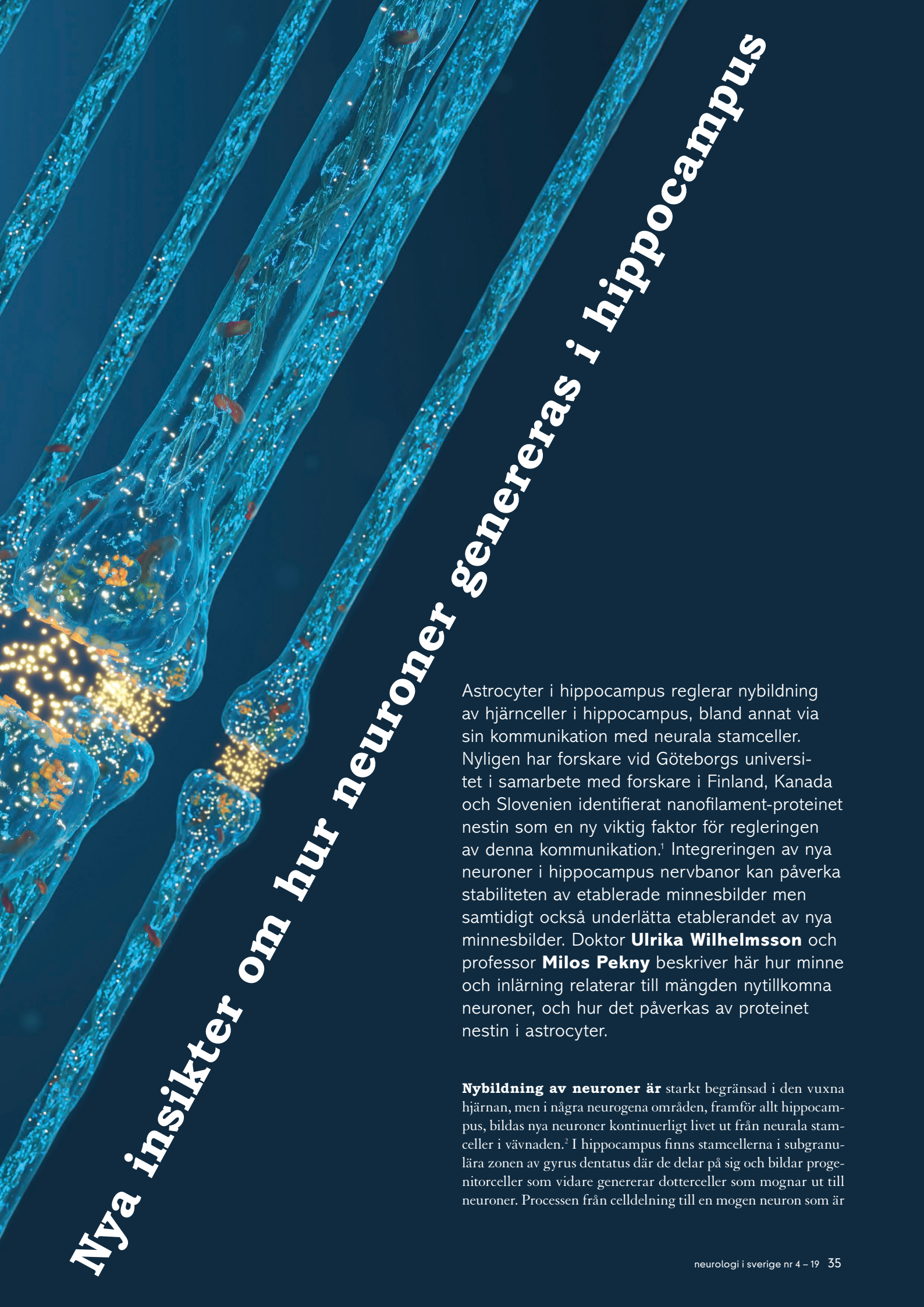






Nya insikter om hur neuroner genereras i hippocampus

Astrocyter i hippocampus reglerar nybildning av hjärnceller i hippocampus, bland annat via sin kommunikation med neurala stamceller. Nyligen har forskare vid Göteborgs universitet i samarbete med forskare i Finland, Kanada och Slovenien identifierat nanofilament-proteinet nestin som en ny viktig faktor för regleringen av denna kommunikation.¹ Integreringen av nya neuroner i hippocampus nervbanor kan påverka stabiliteten av etablerade minnesbilder men samtidigt också underlätta etablerandet av nya minnesbilder. Doktor **Ulrika Wilhelmsson** och professor **Milos Pekny** beskriver här hur minne och inlärning relaterar till mängden nytillkomna neuroner, och hur det påverkas av proteinet nestin i astrocyter.

Nybildning av neuroner är starkt begränsad i den vuxna hjärnan, men i några neurogena områden, framför allt hippocampus, bildas nya neuroner kontinuerligt livet ut från neurala stamceller i vävnaden.² I hippocampus finns stamcellerna i subgranulära zonen av gyrus dentatus där de delar på sig och bildar progenitorceller som vidare genererar dotterceller som mognar ut till neuroner. Processen från celledelning till en mogen neuron som är

integrerad med fullt utväxta dendritter och axoner tar ungefär en månad hos möss, men i primater kan det ta 6 månader eller längre. De nybildade, ännu ej helt mogna neuronerna har fullt utvuxna dendritter och axon med synapser, men innan de mognar ut helt har de en annorlunda signalering jämfört med de befintliga neuronerna i gyrus dentatus. De omogna neuronerna har nämligen en lägre tröskel för att aktiveras av elektriska impulser och signalerar starkare till andra neuroner. Rådande konsensus inom forskningsfältet är att de omogna neuronerna i hippocampus är viktiga för minne och inläring genom att bidra till en bättre separering av spatialt eller temporalt snarlika minnesbilder. Detta sker via en feedback-inhibering, det vill säga deras signalering leder till att färre mogna neuroner i gyrus dentatus aktiveras av en specifik minnesbild och att de ej aktiveras av en annan liknande minnesbild.³ Dock kan en hög neurogenes med många omogna neuroner också leda till att tidigare minnesbilder trängs bort till förmån för etablerandet av nya minnesbilder, något som i forskningsfältet kallas för kognitiv flexibilitet.^{4,5} Sammantaget kan mängden nybildade ännu ej mogna neuroner i hippocampus påverka hur väl vi kan skilja på snarlika minnesbilder, men också hur tidigare minnen trängs bort till förmån för etablerandet av nya.

NESTIN OCH NYBILDNING AV NEURONER

Nanofilamentproteinet nestin uttrycks i många typer av odifferentierade celler, det vill säga stamceller och pluripotenta celler under tidiga utvecklingsstadier. Därför har nestin länge används som en markör för att identifiera odifferentierade celler i vävnadssnitt och i cellodlingar. För att kunna studera funktionen av nestin vid embryonal utveckling, skapade professor Nagys forskargrupp i Toronto transgena möss som saknar nestin. Deras studier visade att avsaknad av nestin inte hade någon betydelse för utvecklingen av musembryon till vuxna möss.⁶ I den vuxna friska hjärnan uttrycks nestin framförallt i neurala stamceller som finns i de neurogena områdena i hippocampus och vid de laterala ventriklarna, men nestin uttrycks också av en del astrocyter i hippocampus. Astrocyter finns i alla delar av CNS och är i antal den dominerande celltypen i människans hjärna. Deras primära funktioner är att förse neuronerna med en optimal miljö och att forma neuronernas nätverk genom att styra nybildningen av synapser och reglera styrkan hos befintliga synapser. Vår forskargrupp vid Göteborgs universitet fokuserar på astrocyters funktion vid regeneration och plasticitet i den vuxna hjärnan och vi har använt de transgena mössen som saknar nestin för att ta reda på om nestin har någon funktion vid neurogenes i den vuxna hjärnan.

För att utvärdera hur neurogenesen påverkades av avsaknaden av nestin följde vi nybildningen av neuroner från neurala stamceller. Vi spårade nybildade celler genom att injicera vuxna möss med en tymidinanalog (BrdU) som inkorporeras i DNA-strängen vid celldelning, för att sedan detektera dessa celler och deras dotterceller på vävnadssnitt med hjälp av immunohistokemisk infärgning. Sex veckor efter injektioner med BrdU jämförde vi antalet celler som innehöll BrdU och uttryckte proteinmarkörer för neuroner (NeuN och calbindin) i hippocampus på vävnadssnitt från kontroll-

möss och från möss utan nestin [Bild 1]. Det visade sig att möss utan nestin hade 60 procent fler nybildade neuroner i hippocampus jämfört med kontrollmössen.

ÖKAD NEUROGENES OCH STÖRRE KOGNITIV FLEXIBILITET HOS MÖSS UTAN NESTIN

För att undersöka om denna ökade neurogenes påverkade mössens förmåga till inläring och minnesförmåga utsatte vi grupper av möss för olika beteendetester. Först undersökte vi om mössen hade några generella avvikande beteenden i ett så kallat "open field test". Den undersökningen visade att det inte var någon skillnad i beteende mellan möss med eller utan nestin gällande nervositet, aktivitet och nyfikenhet, viktiga parametrar som kan påverka utfallet av de olika minnes- och inläringstester som vi vill göra på dem.

Därefter provade vi mössens minne i "object recognition test" där man utnyttjar mössens naturliga nyfikenhet att undersöka ett nytt objekt mer än ett redan bekant föremål. Först får musen under en kvart bekanta sig med två identiska föremål. Senare får musen komma tillbaka till samma miljö där ett av föremålen har bytts ut mot ett nytt annorlunda föremål och tiden musen undersöker respektive föremål registreras. Möss med och utan nestin visade lika mycket intresse för det nya föremålet efter tre timmar, men mössen utan nestin ägnade mindre tid åt att undersöka ett nytt föremål 24 timmar senare. Alltså hade mössen utan nestin en sämre minnesförmåga av det gamla föremålet jämfört med kontrollmössen. Detta betyder att hos möss utan nestin, med ökad neurogenes, har den tidigare minnesbilden trängts undan, medan den finns kvar hos kontrollmössen. Detta följer tankegången om en ökad kognitiv flexibilitet vid fler omog-

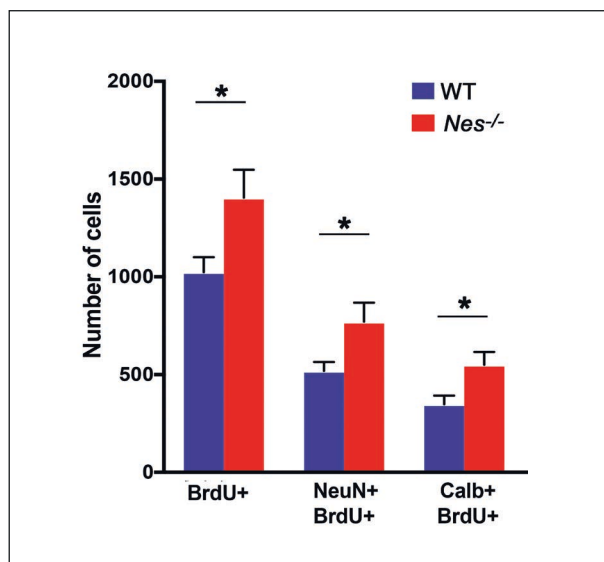


Bild 1. Möss som saknar nestin bildar fler nya neuroner i hippocampus. Genom att spåra de celler i hippocampus som 5 veckor tidigare genomgått celldelning och då inkorporerat BrdU i sitt DNA, visade vi att möss utan nestin (Nes^{-/-}) har fler nya celler med BrdU jämfört med kontrollmöss (WT), och fler BrdU-celler som differentierat till neuroner och därmed uttrycker NeuN och calbindin (Calb). Modifierad från Wilhelmsson U, et al 2019.

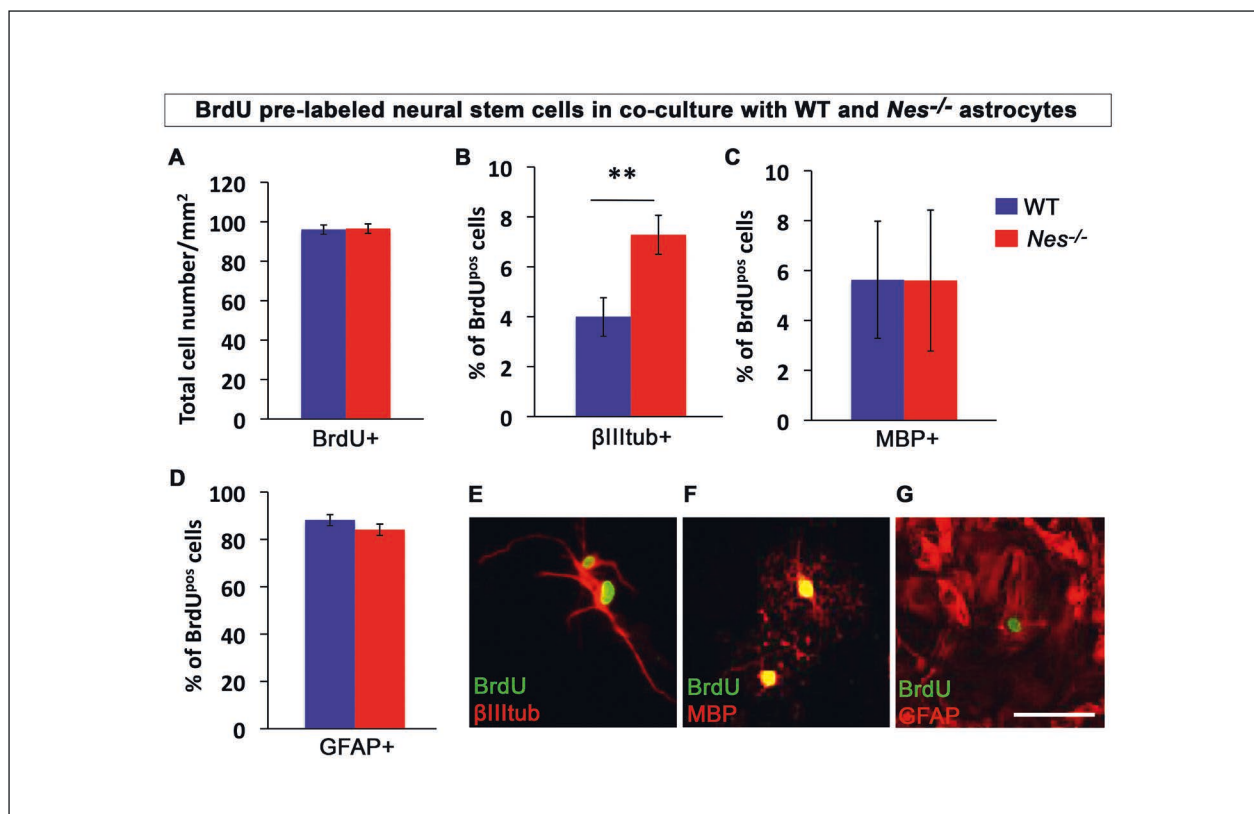


Bild 2. Ökad neuronal differentiering av neurala stamceller när de är i kontakt med astrocyter som saknar nestin. Vi odlade neurala stamceller inmärkt med BrdU tillsammans med normala astrocyter (WT) eller med astrocyter som saknar nestin (*Nes*^{-/-}) och lät stamcellerna differentiera under sex dagar. Totala antalet celler genererade från stamcellerna var jämförbara mellan grupperna (A), men stamcellerna som odlats i kontakt med astrocyter utan nestin genererade fler neuroner positiva för beta3-tubulin (B) jämfört med de som odlats med normala astrocyter. Mängden oligodendrocyter positiva för MBP (C) och astrocyter positiva för GFAP (D) genererade från stamcellerna var jämförbara mellan grupperna. E-G visar exempel på celler differentierade från de neurala stamcellerna som uttrycker celltypspecifika proteiner för neuroner (E), oligodendrocyter (F) och astrocyter (G).¹

na neuroner i hippocampus. Andra minnes- och inlärningstester vi nyligen gjort (opublicerade data) visar också på ökad kognitiv flexibilitet hos möss som saknar nestin.⁷

NESTIN I ASTROCYTER MEN INTE I NEURALA STAMCELLER PÅVERKAR NEUROGENESEN

Eftersom nestin framför allt finns i de neurala stamcellerna, undersökte vi sedan om en ökad celldelning av dessa celler kunde vara orsaken till ett högre antal nybildade neuroner i hippocampus hos möss utan nestin. Överraskande nog såg vi ingen skillnad i celldelningen av neurala stamceller eller progenitorceller mellan möss med eller utan nestin, ej heller i antalet neuroblaster – neuroner i sitt allra tidigaste utvecklingsstadium. Detta betyder att det ökade antalet nybildade neuroner beror snarare på en bättre överlevnad av nybildade neuroner, något som regleras av till exempel tillväxtfaktorer och signalsubstanter i cellernas omgivning.

Även i cellodlingar med neurala stamceller där de tillåts dela på sig och sedan differentiera till neuroner, såg vi att frånvaro av nestin i de neurala stamcellerna inte påverkar deras celldelning eller differentiering till neuroner. Eftersom astrocyter i de neurogena områdena kommunicerar på många olika sätt med neurala stamceller och därmed påver-

kar stamcellernas celldelning och neuroblasternas överlevnad och differentiering, undrade vi om dessa astrocyter, som också uttrycker nestin, hade ett finger med i spelet.

Därför började vi studera nybildning av neuroner i cellodlingar där neurala stamceller odlas tillsammans med antingen normala astrocyter eller astrocyter utan nestin. Våra försök visade att differentieringen av neuroner från normala neurala stamceller var högre när de odlades nära astrocyter som saknade nestin jämfört med när de odlades bredvid normala astrocyter med nestin [Bild 2]. Våra försök visade också att detta skedde endast när stamcellerna och astrocyterna var i direktkontakt med varandra.

FÖRÄNDRAD SIGNALERING VIA NOTCH

Vi har tidigare sett att andra nanofilamentproteiner i astrocyter (vimentin och GFAP) kan påverka astrocyternas signalering till neurala stamceller som differentierar till neuroner,⁸⁻¹⁰ och då kunde vi konstatera att detta skedde genom en minskad aktivering av Notch, en signalväg som finns i många typer av celler och är viktig för att styra celldelning och differentiering av till exempel stamceller och cancerceller.

Vi undersökte om aktiveringen av signalvägen Notch var förändrad i neurala stamceller när de var i kontakt med ast-

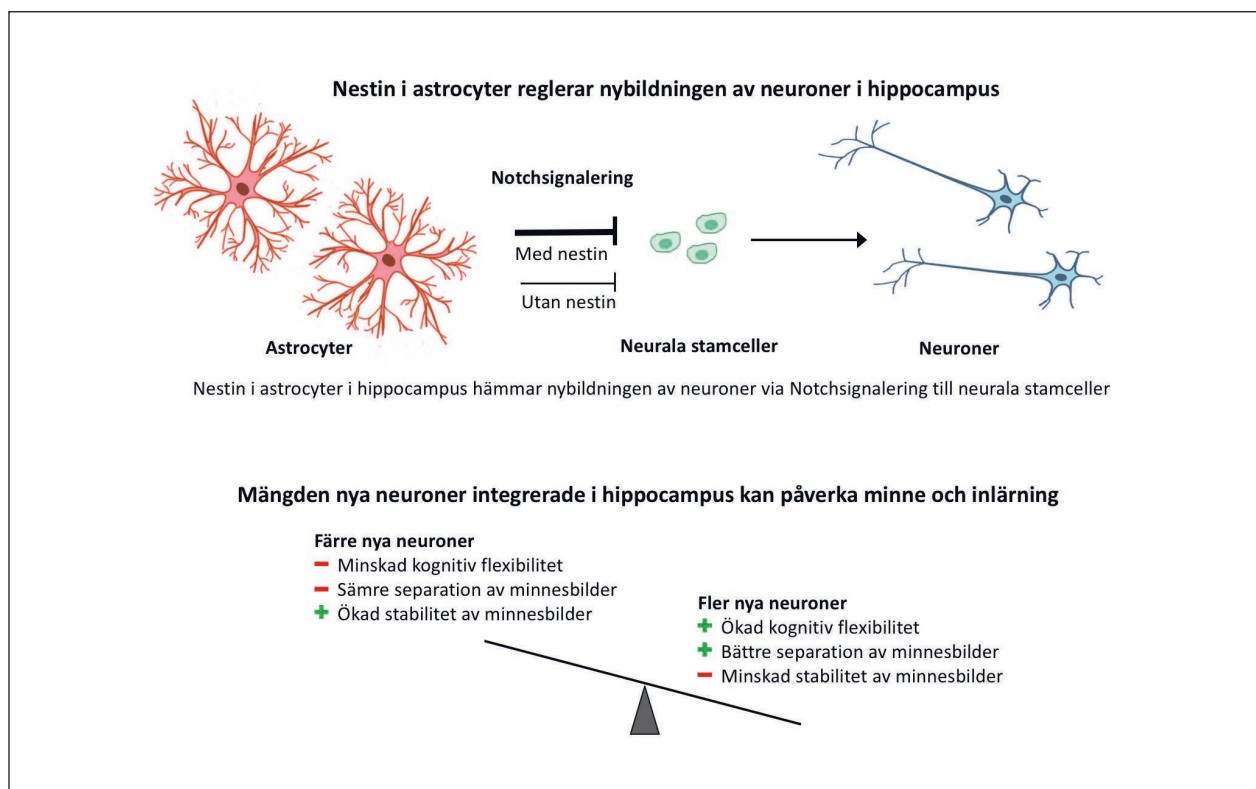


Bild 3. Nestin i astrocyter påverkar antalet nybildade neuroner genom signalering till neurala stamceller via signalvägen Notch. Astrocyter i nära kontakt med neurala stamceller i hippocampus reglerar via Notch stamcellernas nybildning av neuroner. En minskad Notch-signaler i möss utan nestin ger en ökad neurogenes med fler nya omogna neuroner som leder till större kognitiv flexibilitet och bättre separation, men sämre stabilitet av nya minnesbilder.¹

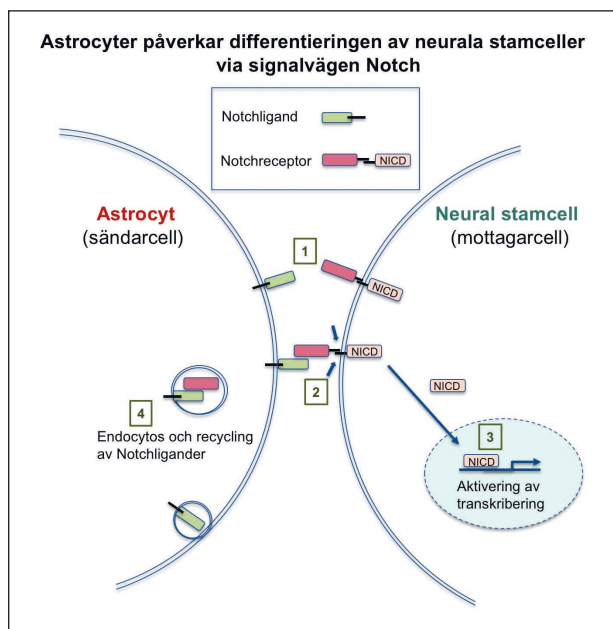


Bild 4. Schematisk beskrivning av Notch-signaler mellan astrocyter och neurala stamceller. Notch-ligander (t ex Jagged1) på astrocytens yta binder in till Notch-receptorn på den neurala stamcellen (1). Vid inbindning friläggs klyvningsställe på Notch-receptorn (t ex Notch1) där gamma-sekretas klipper av Notch-receptorn (2). Den inre delen av Notch-receptorn (NICD) kan nu transporteras in till cellkärnan och aktivera transkribering av gener som vidhåller stamcellens odifferentierade karaktär (3). Komplexet Notch-ligand och yttre del av klyvd Notch-receptor endocyteras av astrocyten, även ej inbundna Notch-ligander kan endocyteras (4). När astrocyter utan nestin signalerar till neurala stamceller via Notch ser vi att färre neurala stamceller har NICD i sin cellkärna. Astrocyter utan nestin har färre intracellulära vesiklar innehållande Notch-ligand Jagged1 och vesiklarna är annorlunda fördelade i cellen jämfört med hos normala astrocyter.¹

rocyter som saknar nestin jämfört med normala astrocyter, och kunde konstatera att så var fallet [Bild 3].

Vi utförde ytterligare experiment för att ta reda på vad som är förändrat i signaleringen från astrocyter som aktiverar Notch i neurala stamceller, och studerade de Notch-ligander på astrocyternas yta som binder in till Notch-receptorn på de neurala stamcellerna [Bild 4]. Vi fann att dessa Notch-ligan-

der och de vesiklar som de transporteras i inuti cellen, återvinns och sorteras på ett annorlunda sätt i astrocyter som saknar nestin jämfört med i normala astrocyter. Detta belyser nanofilamentproteinernas betydelse för transport och återvinning av intracellulära vesiklar, något som vi och andra tidigare visat i astrocyter och i andra typer av celler.

"Även om direkta bevis för funktionen av de nybildade neuronerna i människans hippocampus saknas, så visar studier på däggdjur att neurogenes i hippocampus är viktig för många aspekter av lärande och minne."

Våra resultat visar på hur signalering mellan astrocyter och neurala stamceller styr nybildningen av neuroner i hippocampus [Bild 3]. Även om direkta bevis för funktionen av de nybildade neuronerna i människans hippocampus saknas, så visar studier på däggdjur att neurogenes i hippocampus är viktig för många aspekter av lärande och minne. Nyligen publicerade resultat visar att nybildning av neuroner i människans hippocampus sker även i den åldrade hjärnan och är betydligt lägre hos patienter med Alzheimers sjukdom², något som kan vara en av bakomliggande orsaker till försämrade minnes- och inlärningsfunktioner hos patienter med Alzheimers sjukdom.



ULRIKA WILHELMSSON
Doktor, Institutionen för neurovetenskap och fysiologi, Sahlgrenska akademien vid Göteborgs universitet
ulrika.wilhelmsson@neuro.gu.se



MILOS PEKNY
Professor, Institutionen för neurovetenskap och fysiologi, Sahlgrenska akademien vid Göteborgs universitet
milos.pekny@neuro.gu.se

REFERENSER

1. Wilhelmsson U, et al. Nestin regulates neurogenesis in mice through Notch signaling from astrocytes to neural stem cells. *Cereb Cortex* 2019; 29(10):4050-66.
2. Moreno-Jimenez EP, et al. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nat Med* 2019; 25(4): 554-560.
3. Goncalves JT, Schafer ST and Gage FH. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell* 2016; 167(4):897-914.

4. Akers KG et al. Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adulthood and infancy. *Science* 2014; 344(6184):598-602.
5. Anacker C and Hen R. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility - linking memory and mood. *Nat Rev Neurosci* 2017; 18(6):335-346.
6. Mohseni P, et al. Nestin is not essential for development of the CNS but required for dispersion of acetylcholine receptor clusters at the area of neuromuscular junctions. *J Neurosci* 2011; 31(32):11547-52.
7. Wilhelmsson U, et al. Nestin null mice show improved reversal place learning. *Neurochem Res* 2019; In press.
8. Lebkuechner I, et al. Heterogeneity of Notch signaling in astrocytes and the effects of GFAP and vimentin deficiency. *J Neurochem* 2015; 135(2):234-48.
9. Pekny M, et al. Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol* 2016; 131(3):323-45.
10. Wilhelmsson U, et al. Astrocytes negatively regulate neurogenesis through the Jagged1-mediated Notch pathway. *Stem Cells* 2012; 30(10):2320-9.

NANOFILAMENTPROTEINER I ASTROCYTER – INTRESSANTA MÅLMOLEKYLER FÖR BEHANDLING AV SJUKDOMAR I CNS

Nanofilamentproteiner, eller intermediära filamentproteiner som de också kallas, finns i alla kroppens celler och nanofilament benämns tillsammans med aktin och mikrotubuli traditionellt som cellens skelett. Intressant nog verkar nanofilamentproteiner göra mycket mer än att ge ett mekaniskt stöd åt celler och vävnader. Nanofilamentproteiner koordinerar signalvägar vid stress och verkar som en samlingshub för signalproteiner i cellen. Vår forskargrupp som leds av professor Milos Pekny undersöker hur nanofilamentproteiner i astrocyter reglerar astrocyternas svar och aktivering vid till exempel stroke och neurodegenerativa sjukdomar. Vi har visat att nanofilamentproteinerna GFAP och vimentin är viktiga när celler utsätts för stress, exempelvis påfrestningar på grund av suboptimala förhållanden i cellens omgivning. I astrocyter kan detta ske till exempel vid en stroke då syresättningen i vävnaden runt infarkten är låg. Astrocyters stresshantering och överlevnad under sådana påfrestningar är viktig även för omgivande neuroners chanser till överlevnad i vävnaden. Vi har tidigare visat att astrocyternas nanofilament påverkar hur astrocyterna kontrollerar plasticiteten i hjärnan, till exempel nybildning av synapser och utväxt av axoner. Därför är astrocyternas nanofilamentproteiner potentiella målmolekyler för utvecklandet av nya behandlingsstrategier för sjukdomar i CNS.