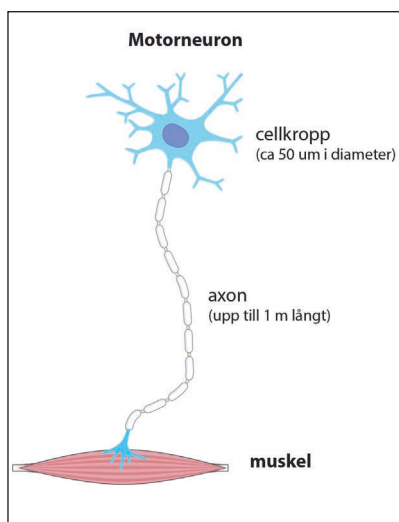




# Axon-seq – en ny metod för sjukdomsmekanismer i **ALS**

I ALS är det de motoriska nervcellerna, motorneuronen, vilka styr våra muskler, som progressivt förloras, vilket orsakar en slutligen fatal förlamning. Det första synliga tecknet på att motorneuron drabbats av patologi i denna obotliga sjukdom är att dess kontakt med muskeln brutits då dess långa utskott, axonet, förtvinar. För att bättre förstå detta tidiga stadium av sjukdomsutveckling i ALS har forskare vid Karolinska Institutet tagit fram en ny metod som radikalt förbättrar möjligheterna att undersöka axoner. **Eva Hedlund**, docent och forskningsledare, ger här en bakgrund till metoden.

**Motorneuron** är specialiserade nervceller vilka styr all skelettmuskulatur i kroppen och därmed de basala rörelsemönster som vi tar för givna, till exempel att vi kan röra på armar och ben, svälja, tugga, kontrollera våra ansiktsuttryck samt andas. Motorneuron har sin cellkropp – med cellkärna och arvsmassa – och ett stort antal korta utskott, så kallade dendriter, i det centrala nervsystemet (hjärnan, hjärnstammen och ryggmärgen). De har också ett mycket långt utskott – axonet – som växer ut till periferin för att kontakta och styra muskler som ibland finns på avstånd längre än en meter bort [Figur 1].<sup>1</sup> Motorneuron har en förhållandevis stor cellkropp i det centrala nervsystemet men då axonet kan vara så långt utgör detta upp till 98 procent av volymen av cellen. Det stora avståndet mellan motorneurons cellkropp och dess kontakt (synapsen) med muskel innebär att axonet måste innehålla en mikromiljö som självständigt



Figur 1. Motorneuron med axon.

från cellkroppen ut i axonet i en hastighet av cirka 0,1–10 mm per dag<sup>2</sup> och således inte ensamt kan upprätthålla axonets och synapsens dynamik.

fektiva terapier för ALS. Majoriteten (ungefär 90 procent) av alla ALS-fall förefaller sporadiskt uppkomna, och man kan således inte i förväg förutsäga vem som kommer att drabbas. I cirka 10 procent av fallen är ALS tydligt nedärvt och då på grund av mutationer i olika gener med distinkta funktioner såsom till exempel superoxid dismutas 1 (SOD1), de DNA- och RNA-bindande proteinerna TDP-43 och FUS samt i C9ORF72.<sup>3</sup> Varför mutationer i dessa gener, vilka i de flesta fall är aktiva i alla celler i kroppen, leder till förlust av just motorneuron är något som fortfarande inte är tydligt trots intensiv forskning. Påtagligt är att många processer i cellen påverkas vid ALS, allt ifrån vilka gener i DNA som aktiveras och bildar RNA, hur proteiner och RNA processas, transporteras och bryts ned, hur energiproduktionen i cellen regleras och hur DNA repareras vid skada etc.<sup>4</sup>

#### KONTAKTEN MELLAN MUSKEL OCH MOTORAXONET FÖRSTÖRS FÖRST

När motorneuron progressivt dör (degenererar) i ALS så sker detta på ett mycket specifikt sätt; kontakten (synapsen) mellan motorneuron och muskel är den som synligt förstörs först, långt innan cellkroppen i nervsystemet försvinner (eller visar tydliga tecken på påverkan). Axonet släpper således taget om muskeln och degenererar utifrån och in. Exakt hur det går till när dessa livsviktiga synapser förstörs vet man ännu inte, men vi och andra har visat att denna patologiska process styrs från själva motorneuronet (och inte från muskeln).<sup>5</sup> När muskeln inte längre har någon kontakt med nervcellen förtvinar denna.<sup>1</sup> Processen ser likadan ut i familjärt nedärvd ALS och i sporadiskt uppkommen sjuk-

## att studera tidiga

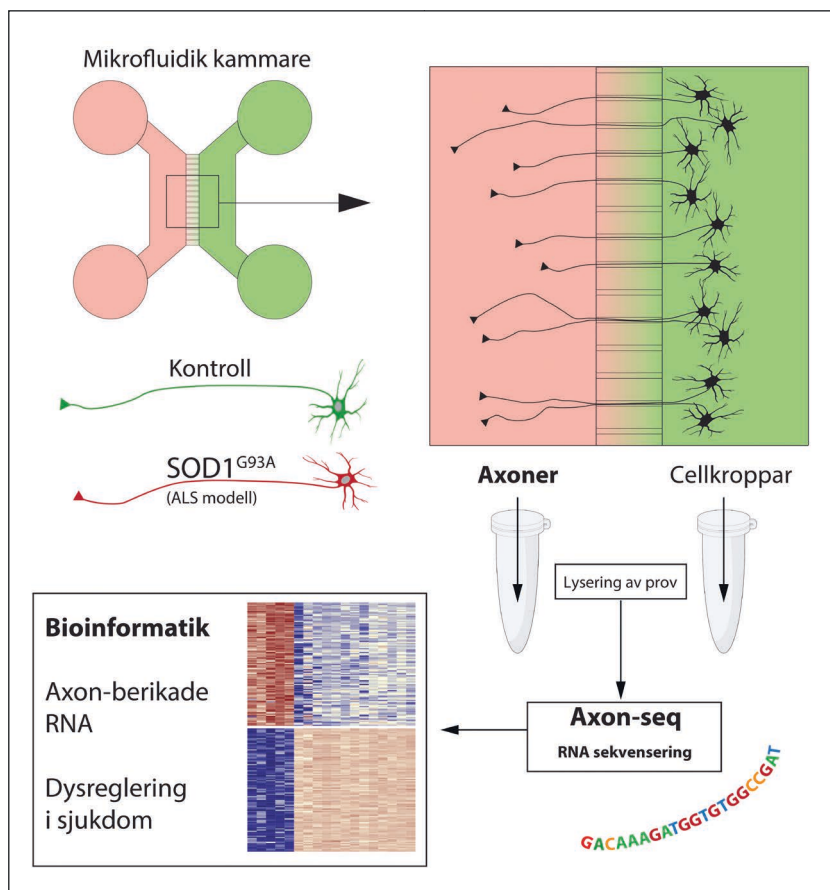
”Motorneuron har en förhållandevis stor cellkropp i det centrala nervsystemet men då axonet kan vara så långt utgör detta upp till 98 procent av volymen av cellen.”

kan reagera på signaler från sin omgivning till exempel från muskelceller. Detta speciellt då vesiklar som transporterar proteiner och ribonukleinsyra (RNA, den budbärarmolekyl som bär genetisk information från DNA) färdas långsamt

#### MOTORNEURON DÖR I ALS

I den dödliga sjukdomen amyotrofisk lateral skleros (ALS) är det just motorneuronen som förloras, vilket leder till muskelförtvinning, svaghet och förlamning hos patienterna. Det finns inga ef-





Figur 2. Schematisk beskrivning av Axon-seq.

”Detta gör att vi forskare hyser förhoppning om att man genom studier av familjär ALS och mutationer som förorsakar denna kan få en förståelse för alla fall av ALS, även där vi inte känner till orsaken till sjukdomens uppkomst.”

dom. Detta gör att vi forskare hyser förhoppning om att man genom studier av familjär ALS och mutationer som förorsakar denna kan få en förståelse för alla fall av ALS, även där vi inte känner till orsaken till sjukdomens uppkomst. Frågan är då fortfarande varför just motorneuron dör i ALS? Från studier på både mus och människa har det visats att flera celltyper i nervsystemet blir aktiverade och aggressiva i ALS och är inblandade i sjukdomsförloppet, bland annat så kallade astrocyter, mikroglia-celler och oligodendrocyter. De är alla stödceller i nervsystemet som är mycket viktiga för att bland annat tillgodose nervcellers energibehov, modulerande av de-

ras kontakter och signaler med andra nervceller.<sup>4</sup> Dock är det tydligt från genetiska studier på möss att tidiga förändringar inne i just själva motorneuronen styr intitering av sjukdomen.<sup>6</sup>

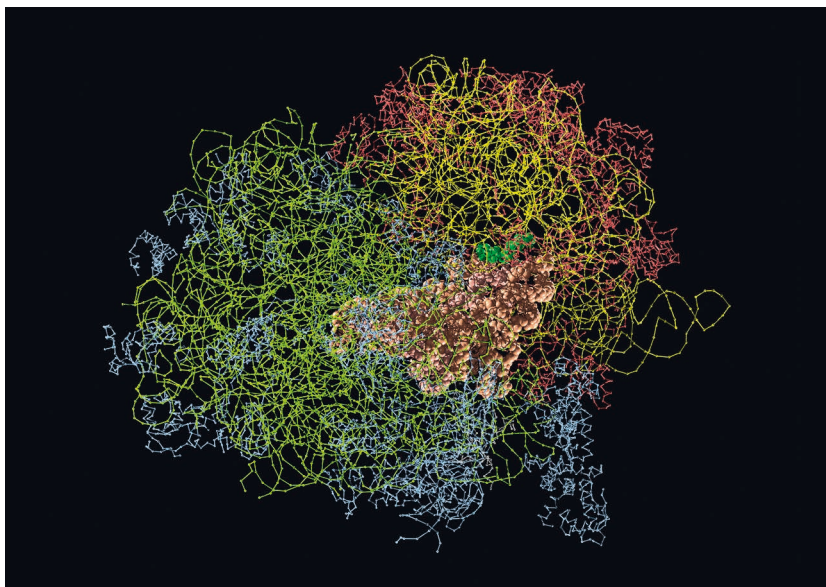
#### RNA SPEGLAR EN CELLS FUNKTION OCH ALLMÄNTILLSTÅND

Vad är det då som händer inne i motorneuronen som gör att sjukdomsprocessen påbörjas där? För att kunna förstå detta kan man studera förekomsten av RNA. RNA speglar vilka gener som är aktiva och därmed en cells funktion och allmäntillstånd. Nya tekniker som RNA-sekvensering på enskilda celler håller på att revolutionera identifiering-

en av olika celltyper i kroppen (<https://www.humancellatlas.org/>) och kan ge oss en stor förståelse för vilka celltyper som finns, vad som gör dem unika och hur olika organ byggs upp. Dock har sådana studier ett stort fokus på själva cellkroppen där arvsmassan finns och utskott hos nervceller såsom axoner och dendriter inkluderas inte i analysen. Detta kan var helt fullgott för många celltyper, men inte för motorneuron där själva axonet utgör den absoluta huvuddelen av cellens volym och där händelser i det distala axonet inte alltid avspeglas i cellkroppen. Man vet nu att det finns en buffert av RNA ute i axonet och synapsen och att detta lokalt kan bilda proteiner och utföra funktioner.<sup>7</sup> Det har dock varit relativt okänt vilka RNA som finns ute i axonet, då mängden RNA där är relativt liten och därmed varit mycket svår att studera.

#### AXON-SEQ, EN HÖGTEKNOLOGISK METOD SOM IDENTIFIERAR RNA I AXONER

För att få en djupare insikt i tidiga sjukdomsmekanismer som drabbar motorneuron i ALS bestämde vi oss för att undersöka vilka RNA som finns i ett normalt motoraxon samt vid introduktion av en ALS-orsakande genmutation.<sup>8</sup> För att kunna studera detta i detalj odlade vi motorneuron deriverade från stamceller i speciella mikrofluidikkammarer<sup>9</sup> där man kan separera axoner från deras cellkroppar. Här processade vi sedan proverna på ett unikt sätt så att vi kunde studera alla RNA i axoner genom så kallad RNA-sekvensering. Metoden vi utvecklade, Axon-seq, är relativt billig, enkel och mycket känslig och vi har beskrivit den i detalj i vår studie så att den ska kunna användas av andra intresserade forskare [Figur 2].<sup>8</sup> Tidigare metoder som har försökt att analysera axonala RNA har haft problem med kontaminering, ”nedsmutsning”, av axonalt material med cellkroppens RNA. Det räcker med att en enda cellkropp kommer med i undersökningsmaterialet för att det ska bli kraftigt kontaminerat. I vår metodik inkluderade vi en effektiv bioinformatisk analys, där vi tittade på antalet gener som detekteras i materialet. På detta sätt kan vi enkelt exkludera axonala prover som har ett alldeles för stort antal



”På detta sätt kan vi enkelt exkludera axonala prover som har ett alldeles för stort antal gener och därmed är uppenbart kontaminerade av cellkroppens RNA.”

gener och därmed är uppenbart kontaminerade av cellkroppens RNA. Denna process är mycket enkel och effektiv att applicera och ger ett tydligt svar.

#### ALS PÅVERKAR RNA-INNEHÅLLET I AXONER

Vår analys av framrenade axonprover visade att transkriptomet, alltså RNA-profilen, i axonet skiljer sig markant från cellkroppens, vilket är ett nytt fynd. Vi fann att motoraxonet har en stor pool av RNA dedikerade till lokal energiproduktion samt för att bygga ribosomer, vilka är cellens proteinfabriker. Vi fann också att axoner har en unik uppsättning av RNA som kodar för så kallade transkriptionsfaktorer, vilka vi tror kan ha viktiga funktioner i kommunikation mellan cellkroppen och axonet.<sup>8</sup> När vi undersökte motoraxon som innehöll muterat SOD1, vilket orsakar ALS, såg vi att RNA-profilen skilde sig åt från den som återfanns i utskott från friska celler. Vi såg här att flera gener som är dysreglerade i ALS är viktiga för att axonet ska fungera normalt och ha kontakt med muskeln, till exempel Neuropilin 1, Debrin

1 och den ALS-orsakande genen Nefl. Några av dessa gener skulle kunna vara möjliga mål för framtida behandlingar för att försöka stärka synapsen mellan motorneuron och muskel samt bibehålla motoraxonet intakt. I framtida funktionella studier kommer vi att undersöka hur modulering av dessa faktorer påverkar just motoraxonets kontakt med muskel.

Forskningen är finansierad av Vetenskapsrådet, EU Joint Programme in Neurodegenerative Diseases (JPND), det strategiska forskningsområdet neurovetenskap vid Karolinska Institutet (StratNeuro), Birgit Backmarks donation till ALS-forskning vid Karolinska Institutet till minne av Nils och Hans Backmark, Åhlén-stiftelsen, Ulla-Carin Lindquists stiftelse för ALS-forskning, Magnus Bergvalls stiftelse, Svenska Sällskapet för Medicinsk Forskning samt Hjärnfonden.

*Figur 2 är en modifiering av den grafiska abstrakt som ingick i referens 8 vilken har ritats av Mattias Karlen och Jik Nijssen.*

#### REFERENSER:

1. Nijssen J, Comley LH and Hedlund E. Motor neuron vulnerability and resistance in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica* 2017; 133:863-885.
2. Lasek RJ, Garner JA and Brady ST. Axonal transport of the cytoplasmic matrix. *Journal of Cell Biology* 1984; 99:212s-221s.
3. Renton AE, Chio A and Traynor BJ. State of play in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Neuroscience* 2014; 17:17-23.
4. Taylor JP, Brown RH Jr and Cleveland DW. Decoding ALS: from genes to mechanisms. *Nature* 2016; 539:197-206.
5. Comley LH, Nijssen J, Frost-Nylen J and Hedlund E. Cross disease comparison of amyotrophic lateral sclerosis and spinal muscular atrophy reveals conservation of selective vulnerability but differential neuromuscular junction pathology. *Journal of Comparative Neurology* 2016; 524:1424-1442.
6. Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G and Cleveland DW. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 2006; 312:1389-1392.
7. Rangaraju V, Tom Dieck S and Schuman EM. Local translation in the neuronal compartments: how local is local? *EMBO Reports* 2017; 5:693-711.
8. Nijssen J, Aguila Benitez J, Hoogstraten R, Kee N and Hedlund E. Axon-seq decodes the motor axon transcriptome and its modulation in response to ALS. *Stem Cell Reports* 2018; 11:1565-1578.
9. Taylor AM, Blurton-Jones M, Rhee SW, Cribbs DH, Cotman CW and Jeon NL. A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nature Methods* 2005; 2:599-605.



**EVA HEDLUND**  
Docent, Institutionen för neurovetenskap, Karolinska Institutet  
eva.hedlund@ki.se

Foto: ULF SIRBORN, Bildmakarna på KI