



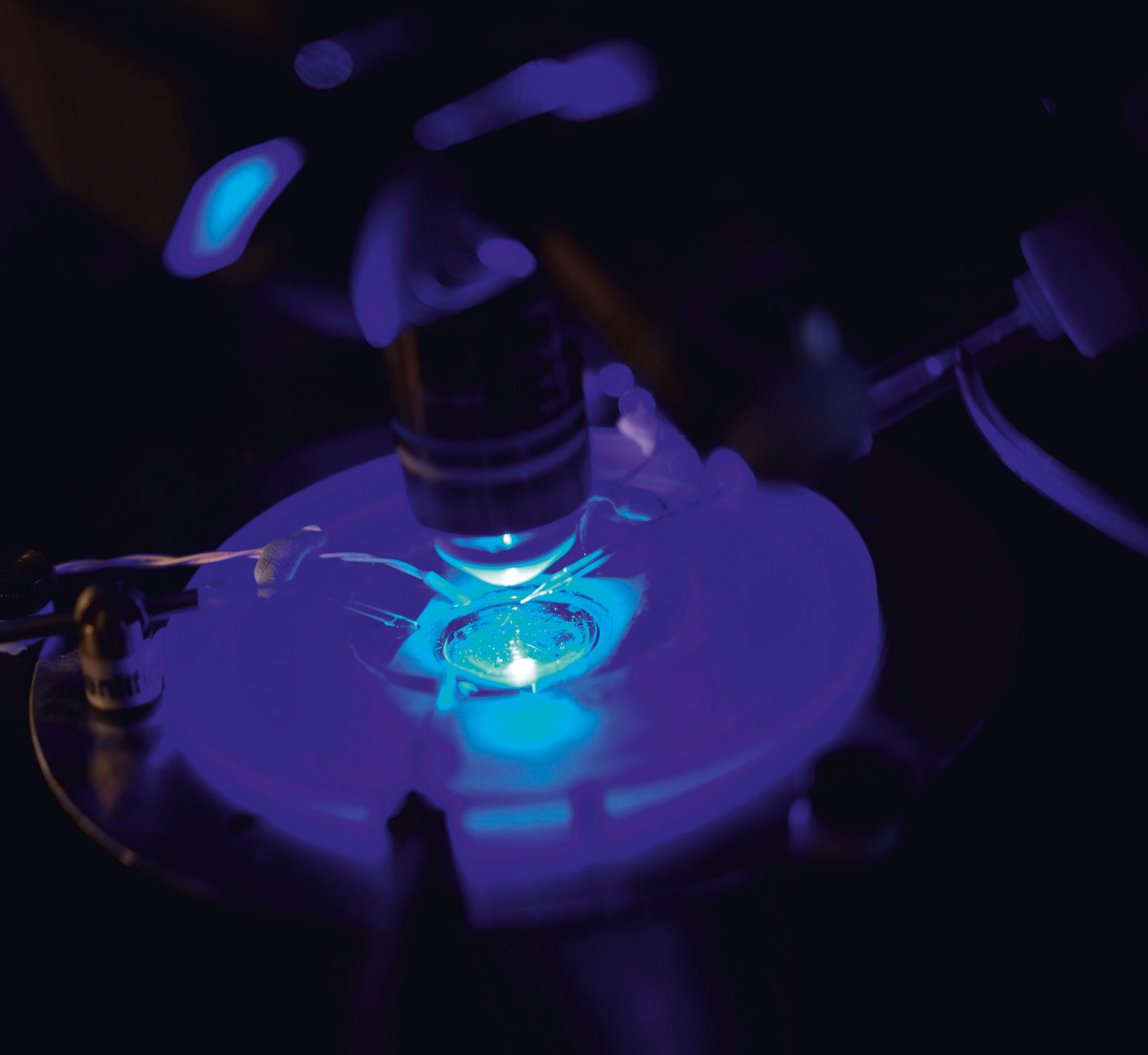
Hjärnan är ett livsviktigt organ som kontrollerar kroppsfunktioner såsom sinnen och rörelser. Här finns ett mycket komplext nätverk av elektriska signaler i en perfekt balans mellan stimulans och hämning (excitation och inhibition). För att denna balans ska fungera krävs små modulerande nervceller, så kallade interneuron. Om dessa celler inte fungerar, eller om de förloras helt, blir balansen rubbad – vilket kan leda till neurologiska sjukdomar såsom till exempel schizofreni, epilepsi eller autismspektrumstörningar – sjukdomar som i dag utgör globala hälsoproblem. Det finns för närvarande inget botemedel mot sådana hjärnsjukdomar – och behandlingen kräver ofta en kombination olika typer av terapier. Men tänk om man skulle kunde ersätta de förlorade eller skadade interneuroner direkt i patientens hjärna och därigenom återställa hjärnans balans?

I vår forskargrupp undersöker vi frågan närmare med hjälp av *direkt omprogrammering*, en teknik där en cell, till exempel en stödjecell eller hudcell kan omvandlas till en nervcell genom överuttryck av specifika nervcellsgener (genom transkriptionsfaktorer). Omvandlingen sker utan att passera stamcellsstadiet och är därför en relativt snabb process och minskar också risken för tumörbildning eftersom den undviker den omogna cellens okontrollerade delning. Av dessa skäl är det möjligt att direkt omprogrammera celler inne i den levande hjärnan och på så sätt skapa patientspecifika nervceller direkt på plats.

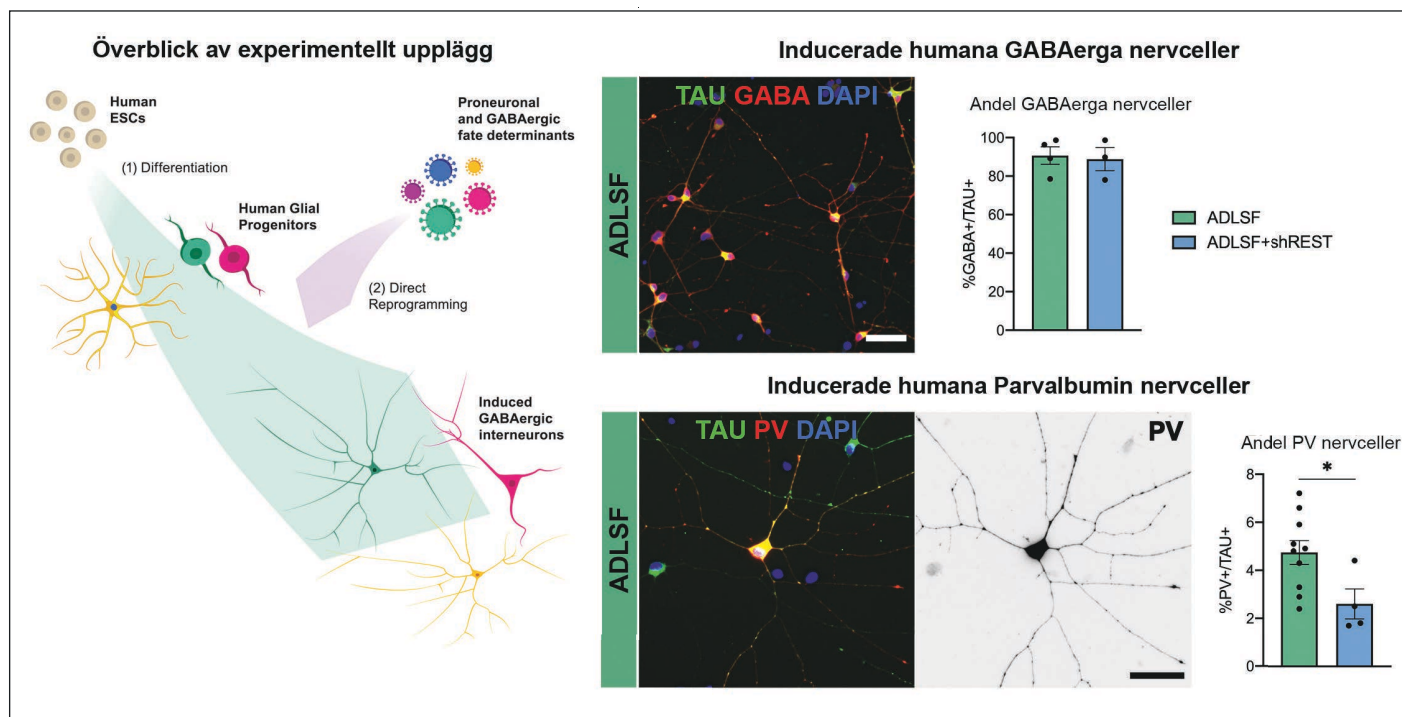
Vårt team har med direkt omprogrammering lyckats omvandla stödjeceller, så kallade gliaceller, till interneuron genom att injicera nervcellsgener i modifierade virus till mus-hjärnan.¹ Direkt i den levande mushjärnan genererades då interneuron av en viss typ, så kallade parvalbuminuttryck-

” Omvandlingen sker utan att passera stamcellsstadiet och är därför en relativt snabb process och minskar också risken för tumörbildning eftersom den undviker den omogna cellens okontrollerade delning.

Bild 1: Med hjälp av patch-clamp-elektrofysiologi fångas nervcellerna med elektroder för att mäta nervcellsfunktionen.



Kan **omprogrammerade**
interneuron hjälpa
neurologiska sjukdomar
i framtiden?



Figur 2. **Omprogrammering av humana gliaceller till interneuron.** Humana embryonala stamceller differentierades först till humana gliaceller. Dessa behandlas/transfektas sedan med nervcellsgener och gener som är involverade i GABA-erga nervcellers utveckling i modifierade viruspartiklar och omprogrammeras till GABA-erga interneuron. De inducerade cellerna hade efter 26 dagars omprogrammeringsprotokoll börjat uttrycka nervcellsgener som tau och även GABA i 90 procent av nervcellerna med ADLSF-genkombinationen (liknande genererades med annan genkombination). En del av de inducerade nervcellerna (tau+) uttryckte parvalbumin. Nervcellerna visade en mycket komplex nervcellsmorfologi efter bara 26 dagar men antalet celler var fortfarande lågt (5 procent av tau+ nervcellerna). Elektrofysiologiska mätningar av de fluorescerande nervcellerna visade nervcellsspecifik funktion, som aktionspotentialer vid 4 och 8 veckor efter omprogrammeringen. Inducerade nervceller visade synaptiska kontakter i små nedåtgående strömmar över cellmembranet i vanlig buffert (artificiell cerebrospinalvätska). När vi tillsatte GABA-antagonist till bufferten blockerades strömmarna vilket tyder på att den synaptiska signaleringen var GABA-erg.

ande interneuron. Dessa utgör en stor grupp av interneuron som tros spela särskilt viktig roll i hjärnans plasticitet och har visat sig vara involverade i till exempel psykiska sjukdomar vilket gör dem extra intressanta att forska vidare på. Parvalbumin-interneuron är dessutom vanligtvis mycket svåra att framställa i labbet, till exempel från stamceller.

Men i vår studie verkade parvalbumincellerna bildas oberoende av vilka nervcellsgener vi injicerade i musen vilket kan tyda på att gliacellerna där har en särskild fallenhet att omvandlas till dessa interneuron.¹ Både gliaceller och interneuron utvecklas intressant nog från samma tidiga hjärnstruktur i fosterutvecklingen.

KAN NYA NERVCELLER FUNGERA I HJÄRNAN?

Vi har valt att gå vidare med projektet för att ta reda på hur väl de nyskapade interneuronerna elektriskt fungerar, kopplar och integreras i hjärnans nätverk med hjälp av patch-clamp-elektrofysiologi [Bild 1]. Här används små elektroder som fångar eller "patchar" nervcellerna och mäter den enskilda nervcellens funktion och kopplingar. För att kunna identifiera de nya omprogrammerade nervcellerna bland alla andra nervceller i till exempel musvävnaden, används en fluorescerande markör som börjar uttryckas i nervcellsomvandlingen.² Om en omprogrammerad cell fungerar som en nervcell har man inte bara påvisat en lyckad omprogrammering;

man har också fått information som kan särskilja de olika nervcellstyperna, såsom deras specifika fjäringmönster som nervceller elektriskt signalerar med.²

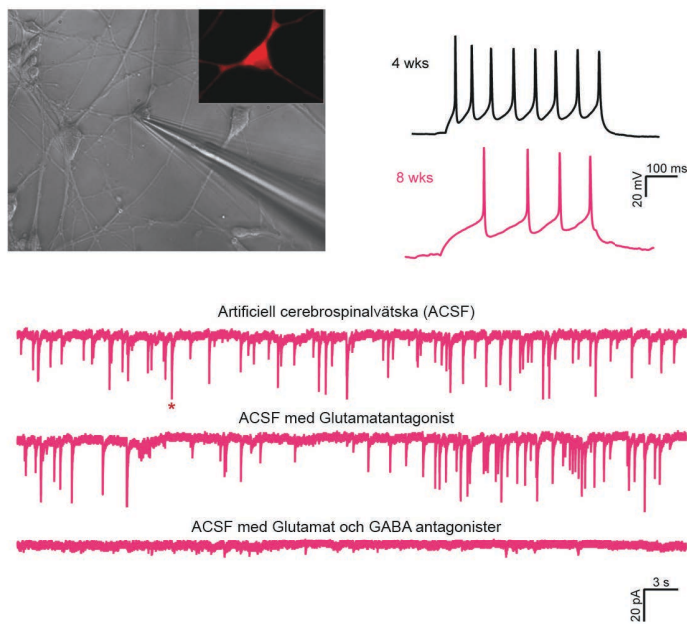
Så i korthet fångar vi grönt fluorescerande interneuron i mushjärnan som omvandlats från gliaceller och mäter den elektriska funktionen på dem. Det hela är lite "science fiction" kan vi medge, men visar ändå möjligheten för tekniken att fungera i den levande hjärnan.

Att mäta hur de nya nervcellerna integreras och synaptiskt kontakter celler i sin omgivning är aspekter som är mycket viktiga om man vill återställa hjärnans nätverk vid en neurologisk sjukdom. Därför har vi valt att nyska oss på detta, även om tekniken tar flera år att lära sig och involverar avancerad och dyr utrustning. Just nu kombinerar vi tekniken med sekvenseringsmetoder och tredimensionella mätningar vilket kommer att ge oss viktig information om de omprogrammerade nervcellerna, även ner på encellsnivå. Då kan vi verkligen jämföra dem med de endogena/naturliga nervcellerna och se hur mycket och vad som skiljer dem åt.

EN FRAMTIDA BEHANDLING MED INTERNEURON?

Hjärnans gliaceller lämpar sig särskilt bra för omprogrammering bland annat eftersom de har en egen regenerativ kapacitet, vilket innebär att även om en del av dem omvandlas till interneuron kommer de återstående cellerna att ersätta

Elektrofysiologisk profil av GABAerga nervceller



de omvandlade gliacellerna. Gliaceller är också jämnt utspridda i hjärnans olika strukturer vilket gör det möjligt att omprogrammera nervceller i olika strukturer av hjärnan som kan vara intressanta för olika sjukdomar. Frågan är om även *mänskliga* gliaceller kan omprogrammeras till interneuron?

För att undersöka detta behövs tillgång till mänskliga gliaceller, men dessa utvecklas sent i fosterutvecklingen vilket gör tillgången till sådant humant material mycket begränsad. För att lösa problemet har vi i vårt team tagit nytta av mänskliga embryonala stamceller som utvecklats till gliaceller enligt särskilt protokoll.^{3,4}

I en ny studie har vi testat de *humana* gliacellerna för omprogrammering till interneuron genom att överuttrycka nervcellsgener och gener som är involverade i GABA-erga nervcellers utveckling i en särskild gen-cocktail [ADLSF i Figur 2].⁵ Våra resultat visade att de mänskliga gliacellerna (som ursprungligen härstammade från stamceller) kunde omprogrammeras till GABA-erga nervceller och uttrycka typiska nervcellsmarkörer som tau tillsammans med GABA (hämmande signalsubstans som uttrycks av GABA-erga nervceller). Vi provade olika genkombinationer och såg att en viss genkombination var bättre än den andra (ADLSF). Hela 90 procent av de omprogrammerade cellerna uttryckte GABA, vilket visade en hög produktion av GABA-erga nervceller [Figur 2]. En del av nervcellerna uttryckte även parvalbumin, men även andra subtypspecifika proteiner som calbindin vilket tyder på att olika subtyper av interneuron bildades.⁵ Intressant nog, visade nervcellerna en oväntad komplex nervcellsmorfologi redan en månad efter omprogramme-



DANIELLA RYLANDER OTTOSSON
Biträdande universitetslektor, gruppledare,
Regenerativ neurofysiologi, Lunds universitet
daniella.ottosson@med.lu.se

ring, något som annars tar betydligt längre tid för till exempel stamcellsderiverade nervceller [Figur 2].

Elektrofysiologiska mätningar av de fluorescerande nervcellerna i cellkulturerna visade att cellerna kunde skapa aktionspotentialer, vilket tyder på en lyckad nervcellsomvandling. Däremot verkade de inte vara kapabla att skapa fler och tätare aktionspotentialer med tiden, som en parvalbumin-nervcell karakteristiskt gör. Troligen behöver dessa nervceller mogna i en mer naturlig *in vivo*-miljö för att utveckla sina synaptiska kontakter och nödvändiga jonkanaler som krävs för att mogna fullt ut. Nervcellerna kunde i alla fall motta synaptiska inhibitoriska signaler (i form av små elektriska strömmar över membranet) från de omgivande cellerna i kulturen, signaler som totalt uteblev när GABA-antagonist tillsettes [Se rosa linje i Figur 2].

SLUTSATS

Våra resultat visar att mänskliga gliaceller framtagna från en unik stamcellsmodell framgångsrikt kan omprogrammeras till GABA-erga interneuron, uttrycka subtypspecifika interneuronmarkörer såsom parvalbumin och utveckla en komplex nervcellsmorfologi. Detta visar på möjligheten att skapa nya GABA-erga interneuron från ett förnybart *in vitro*-system och kan utgöra en bas för vidareutveckling av cellterapi för interneuronpatologier.

Om dessa mänskliga interneuronen kan fungera likt hjärnans egna interneuron och återställa en felaktig signalering vid sjukdomstillstånd, återstår att se. Men visst skulle det utgöra en spännande framtida cellterapi för neurologiska sjukdomar, en terapi som till och med kan skapas på plats i patientens hjärna.

REFERENSER

1. Pereira M, Birtele M, Shrigley S, Benitez JA, Hedlund E, Parmar M, and Ottosson DR. Direct Reprogramming of Resident NG2 Glia into Neurons with Properties of Fast-Spiking Parvalbumin-Containing Interneurons. *Stem Cell Reports* 2017; 9(3): 742-751.
2. Pereira M, Birtele M, and Rylander Ottosson D. In Vivo Direct Reprogramming of Resident Glial Cells into Interneurons by Intracerebral Injection of Viral Vectors. *J Vis Exp* 2019; (148).
3. Wang S, J. Bates J, Li X, Schanz S, Chandler-Militello D, Levine C, Maherali N, Studer L, Hochedlinger K, Windrem M, and Goldman SA. Human iPSC-derived oligodendrocyte progenitor cells can myelinate and rescue a mouse model of congenital hypomyelination. *Cell Stem Cell* 2013; 12(2): 252-64.
4. Nolbrant S, Giacomoni J, Hoban DB, Bruzelius A, Birtele M, Chandler-Militello D, Pereira M, Ottosson DR, Goldman SA, and Parmar M. Direct Reprogramming of Human Fetal- and Stem Cell-Derived Glial Progenitor Cells into Midbrain Dopaminergic Neurons. *Stem Cell Reports* 2020; 15(4): 869-882.
5. Giacomoni J, Bruzelius A, Stamouli CA, and Rylander Ottosson D. Direct Conversion of Human Stem Cell-Derived Glial Progenitor Cells into GABAergic Interneurons. *Cells* 2020; 9(11).



JESSICA GIACOMONI
Doktorand, Utvecklings- och regenerativ
neurobiologi, Lunds universitet
jessica.giacomoni@med.lu.se