

Kontroll av transkriptionell stabilitet är avgörande för identitet och funktion i **serotonerga och dopaminerga** nervceller

Vid Parkinsons sjukdom minskar halterna av signalsubstansen dopamin på grund av att en specifik nervcellstyp i mitthjärnan som producerar dopamin degenererar och dör. Bristen på dopamin i målområdet får till följd att patienten drabbas av progressiv försämring av motoriska funktioner. Trots intensiva forskningsinsatser så är den underliggande orsaken till de dopaminerga nervcellernas död inte klarlagd. Dessutom är den absoluta majoriteten av fallen av Parkinsons sjukdom sporadiska, det vill säga det finns ingen tydlig enskild mutation/orsak som driver sjukdomen, varför det är viktigt att förstå om störningar i genregleringen kan vara en bidragande faktor. Läs mer i denna artikel av **Johan Holmberg**, professor vid Institutionen för molekylärbiologi, Umeå universitet.

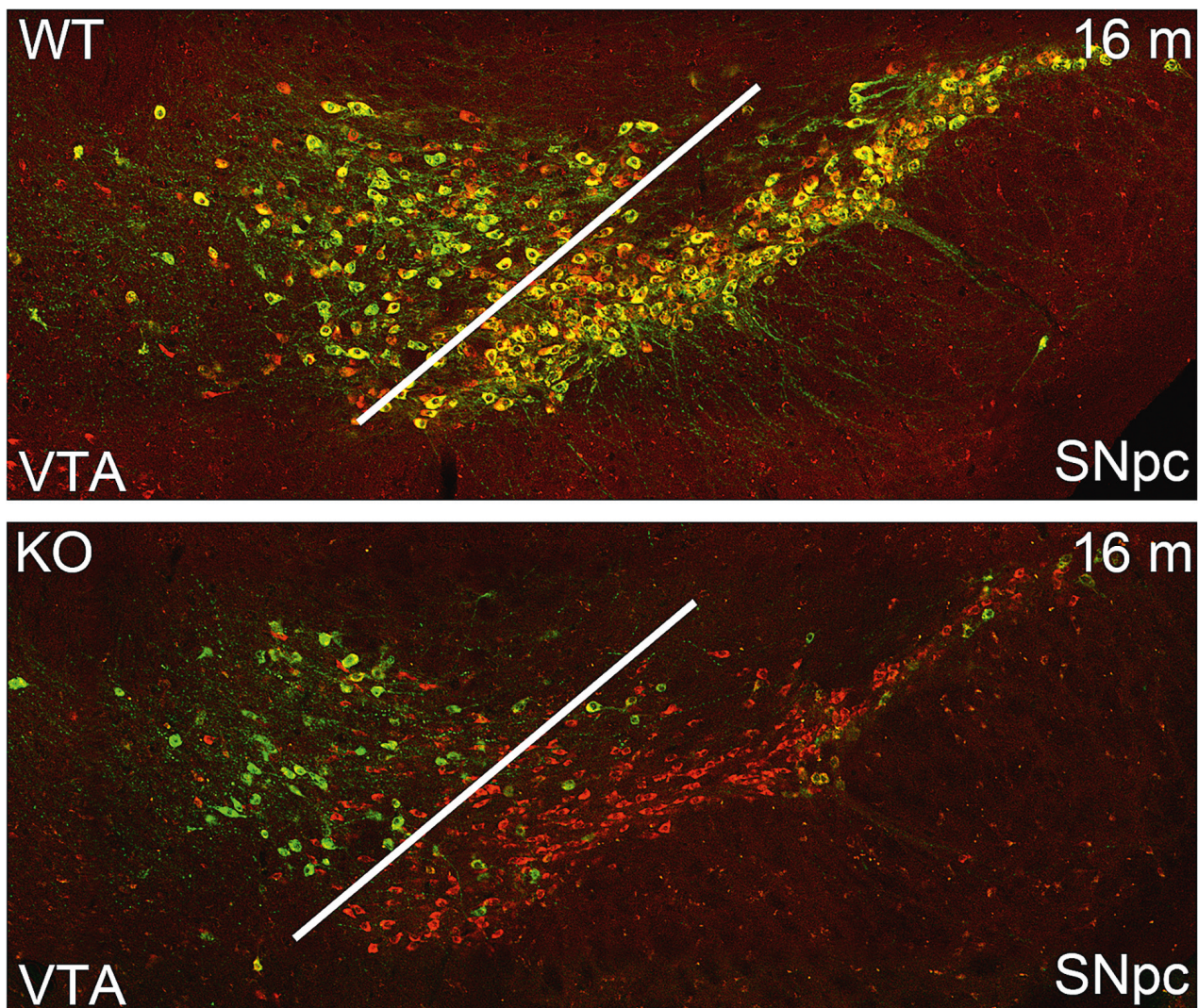




När vi föds har våra nervceller redan bildats och specialiserat sig till de olika typer av nervceller som finns i den mänskliga hjärnan. Intensiv forskning har givit en tämligen god insikt i hur det går till när cellerna går från stamceller till specialiserade och mogna nervceller som inte längre har kvar förmågan till celldelning eller till att ge upphov till andra celltyper. Den här processen kallas för differentiering och är till stor del styrd av olika genprogram som slås på eller av vid rätt tidpunkt. Trots att man känner till en hel del om dessa genprogram så är kunskapen om vad som bibehåller nervcellens identitet över tidsperioder som sträcker sig över hela våra liv rudimentär. Förutom att vissa genprogram måste vara påslagna så måste även gener som reglerar andra celltyper vara permanent tystade för att cellens identitet skall vara intakt. Vår forskning har inriktat sig på just tystandet av genprogram (genrepression) som styr andra celltyper eller egenskaper hos stamceller.



Vår forskning har inriktat sig på just tystandet av genprogram (genrepression) som styr andra celltyper eller egenskaper hos stamceller.



Figur 1. Reducerade nivåer av tyrosin hydroxylas (TH) i dopamineriga nervceller i mitthjärnan hos 16 månader gamla möss där PRC2-komplexet är inaktiverat.

En mekanism för att bibehålla redan etablerade mönster av genuttryck som byggde på genrepression upptäcktes på sjuttioalet i bananflugan (*Drosophila melanogaster*). Mekanismen är beroende av ett proteinkomplex som i däggdjur kallas för Polycomb repressor complex 2 (PRC2). Ett av de proteiner som är nödvändiga för att proteinkomplexet skall fungera förkortas med EED och kodas av genen med samma namn, *Eed*. För att undersöka om permanent tystande av gener i differentierade dopaminceller är beroende av just PRC2 och ifall det-

ta tystande är av avgörande betydelse för cellernas dopaminerga identitet så skapade vi en musmutant vari genen *Eed* är bortklippt just i dessa celler.

TYSTADE GENER MINSKADE MÄNGDEN DOPAMIN

Tystandet av gener via PRC2 är kopplat till dess kapacitet att etablera kemiska modifieringar, kallade H3K27me3, längs med DNA-kedjan. Höga nivåer av H3K27me3 vid början av gen minskar sannolikheten att genen skall uttryckas. När vi genom att tagit bort *Eed* lyckats inaktivera PRC2-komplexets förmåga att bibehålla nivåerna av H3K27me3 i dopamincellerna så hände till att börja med inte mycket. Efter fyra månader fanns ungefär en tredjedel av H3K27me3-modifieringen kvar och endast ett litet antal tidigare tysta-

de gener hade slagits på men varken cellernas identitet eller funktion var påverkade. När vi analyserade dopamincellerna efter åtta månader var effekten tydligare. Dels kunde vi se att all H3K27me3 försvunnit, dels var nu flera hundra gener reaktiverade men vi kunde också se att ett betydande antal gener hade nedreglerats väsentligt. Just detta var något förvånande då vi tar bort en slags broms från ett antal tysta gener som då blir reaktiverade och uttrycks i högre nivåer men samtidigt bromsas uttrycket av ett antal andra gener ned. När vi tittade närmare på vilka gener det var som nedreglerats i dopamincellerna hos *Eed*-mutanterna så såg vi att många av dessa gener är viktiga för dopamincellers identitet och funktion. Som exempel kan nämnas transkriptionsfaktorn *Engrailed 1* samt



Vid fyra månader skiljde sig inte mutanter från vildtypsmöss, men vid åtta månader så var det en märkbar minskning av hur mycket mössen rörde på sig.

Th som kodar för tyrosin hydroxylas (TH), ett enzym som är avgörande för produktionen av dopamin. När vi sedan färgade med antikroppar för TH både i mitthjärnan där dopamincellernas cellkroppar befinner sig och deras målområde i striatum så var det tydligt att proteinnivåerna sjunkit avsevärt [Figur 1]. Vi följde upp detta med att mäta nivåerna av dopamin i båda dessa områden, vilket tydligt visade kraftigt reducerade nivåer av dopamin och associerade metaboliter i musmutanter som saknade EED. Vi analyserade även dopamincellerna med avseende på elektrofysiologiska parametrar och det var tydligt att dopamincellerna hos mutanterna skiljde sig från dopaminceller hos möss vari *Eed*-genen var intakt (så kallade vildtypsmöss).

EFFEKTER PÅ MOTORISKA FUNKTIONER OCH BELÖNINGSSYSTEMET

Med tanke på dessa resultat ville vi undersöka om mössens beteende förändrades vid förlust av *Eed* i dopamincellerna. Det var ingenting i mössens generella hälsostatus som skvallrade om att något var på tok. Men när vi genomförde ett antal beteendetester utformade för att upptäcka skillnader i motorisk funktion så fick vi tydliga resultat. Vid fyra månader skiljde sig inte mutanter från vildtypsmöss, men vid åtta månader så var det en märkbar minskning av hur mycket mössen rörde på sig. Dessutom hade de problem med att ställa sig på bakbenen samt att initiera nya rörelsesekvenser som kräver mer avancerad koordination. Vid sexton månaders ålder var skillnaderna ännu tydligare.

Dopaminsystemet styr inte bara motoriska funktioner utan även belöningssystemet. De euforiska effekterna av kokain och

amfetamin beror till stor del på aktivering av just dopaminsystemet. För att utröna om även belöningssystemet var påverkat hos musmutanterna så gav vi dem kokain och testade om de var benägna att välja att återkomma till just det ställe som de fått kokain vid, något som möss brukar göra. Till vår förvåning såg vi att mutanterna beteddes sig som sina vildtypssyskon, det vill säga de återvände gladeligen till det utrymme där de lärt sig att de kunde få kokain. Således verkar det som att den del av dopaminsystemet som styr belöning och eufori var intakt hos de mutanta mössen.

Skillnaden i effekt på dessa olika aspekter av dopaminsystemet fick oss att titta närmare på de olika grupper av dopaminceller som finns i mitthjärnan. Man kan grovt dela in dem i de celler som ligger närmast hjärnans mittlinje i ett område som heter ventral tegmental area, och de som ligger längre ut i hjärnan, i substantia nigra. De celler som utgör populationen i substantia nigra styr framför allt motoriska funktioner och det är just dessa som degenererar vid Parkinsons sjukdom. Dopamincellerna i ventral tegmental area anses ha mer inflytande över belöningssystemet. När vi med encells-sekvensering analyserade genuttrycket i mutanterna så kunde vi se en tydlig skillnad mellan dessa två populationer. Dopamincellerna i substantia nigra uppvisade betydligt större skillnader både i uppreglerade och nedreglerade gener jämfört med dopaminceller i ventral tegmental area. Vi tror att dessa

skillnader kan förklara att mössens motorik är påverkad men att deras belöningssystem verkar vara tämligen

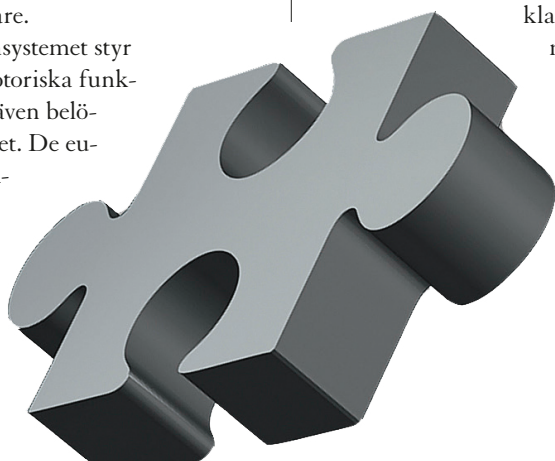
intakt. Vad som är en större gåta är varför det är en sådan skillnad i hur dopaminceller i substantia nigra och ventral tegmental area reagerar på förlust av *Eed* och H3K27me3. Varför är samma celler som selektivt degenererar och dör vid Parkinsons sjukdom också känsligare för förlust av genrepression? Vi kan ännu inte svara på denna fråga men vi vill gärna undersöka den i vår fortsatta forskning.

För att förstå om en annan nervcellstyp var lika beroende av PRC2-driven genrepression så skapade vi även möss som var mutanta för *Eed* i differentierade serotonerga nervceller. Även i dessa nervceller så iakttog vi en progressiv förändring av genuttrycket liknande den vi sett i dopamincellerna. I de serotonerga cellerna var det samma typ av tidigare tystade gener som aktiverades. Intressant var att de gener som nedreglerades motsvarade vad vi sett i de dopaminerga nervcellerna, det vill säga gener som är nödvändiga för serotonerga nervcellers identitet och funktion. När vi sedan följde upp med studier av beteenden som är avhängiga intakt serotonerg funktion så såg vi tydliga störningar hos musmutanterna. Sammanfattningsvis är effekten av att störa ut förmågan att hålla gener nedstängda likartad i serotonerga och dopaminerga nervceller. Båda celltyper förlorar sin identitet och delar av sin funktion vilket får till följd att mössen uppvisar avvikelser i beteenden som är snarlika vissa symtom som syns vid olika patologiska tillstånd, till exempel vid Parkinsons sjukdom.

FORTSATT FORSKNING BEHÖVS

Vår studie utgick från en grundvetenskaplig frågeställning men ledde oss också till en del insikter som kan vara av betydelse för att bättre förstå hur regleringen av genuttryck styr sjukdomstillstånd som är associerade med det dopaminerga eller serotonerga systemet, såsom Parkinsons sjukdom eller sjukdomar som är associerade med humöret, så kallade mood disorders.

Vid förlust av *Eed* i dopaminerga celler sker det en långsam förlust av H3K27me3 följt av en progressiv effekt på genuttrycket som även är associerad med förlust av motorisk förmåga vilket blir ännu tydligare vid sexton





månaders ålder. Med tanke på de väldigt låga nivåer som finns kvar av dopamin i det striatala målområdet så borde dock djuren vara betydligt mer påverkade än vad vi ser.

En potentiell orsak till djurens ganska modesta fenotyp är att den smygande och utdragna effekten av *Eed* ger mössens hjärna tid att kompensera för bortfallet av dopamin. Just sådana kompensatoriska mekanismer tros spela en stor roll även vid Parkinsons sjukdom där symptom ofta uppstår långt efter att majo-



riteten av dopaminerga celler i substantia nigra har degenererat. Vad dessa kompensatoriska mekanismer består i är inte klarlagt. Vi ämnar nu använda vår musmodell för att med analys av genuttryck på enskild nervcellsnivå vid olika tidpunkter i målområdena i dor-

sala striatum och nucleus accumbens belysa hur nervceller i dessa målområden anpassar sig till de låga nivåerna av dopamin.

Studier har visat att även serotonerga nervceller är påverkade hos patienter med Parkinsons sjukdom. Bland annat finns det studier som visar att serotoninnivåerna sjunker innan utvecklandet av motor-

symtom hos patienter med en ärftlig form av Parkinsons sjukdom. Dessutom bidrar förändringar i serotonin-systemet till icke-motoriska symptom som drabbar personen med Parkinsons sjukdom, till exempel sömnstörningar, depression och hallucinationer. Vi hoppas genom att kombinera våra två musmutanter kunna undersöka i vilken mån det serotonerga systemet är inblandat i att kompensera för låga dopaminnivåer vid olika tidpunkter.



JOHAN HOLMBERG

Professor vid
Institutionen för
molekylärbiologi,
Umeå universitet
johan.holmberg02@umu.se