

Belönas för basal forskning om hjärnans kemiska signalöverföring

Arvid Carlssons, Paul Greengards och Eric Kandels upptäckter har i grunden förändrat vår syn på nervsystemets funktion och dess betydelse för beteendets styrning, inläringens mekanismer samt förståelsen av de neuropsykiatriska sjukdomarnas orsaker och hur dessa kan behandlas med läkemedel. Upp-täckterna är i ett historiskt perspektiv grundläggande för den biologiska psykiatrins genombrott och är av central betydelse för den moderna läkemedels-utvecklingen inom CNS-området.

Människans hjärna är tveklöst det mest komplexa av alla biologiska system vi känner och består av omkring 100 miljarder nervceller. Vi vet idag att dessa kommunicerar med varandra genom elektriska och kemiska impulser och, ytterst sett, styr allt från t ex språklig kommunikation, matematiska och musikaliska aktiviteter, stämningssläge, motivation och inläring, till rent motoriska färdigheter från de enklaste till de mest avancerade beteenden. Vid 1990-talets början proklamerade den amerikanska kongressen detta årtionde såsom »The decade of the brain» som ett stöd för, och erkännande av, hjärnforskningens enorma betydelse och potential när det gäller behandlingen av några av de svåraste, mest invalidiserande och för samhället och individen mest kostsamma sjukdomar vi känner. Trots all förvärvad kunskap inom området vet vi dock ännu ganska litet om det oändligt komplicerade centrala nervsystemets funktion och specifika roll i relation till olika beteenden och mentala processer, för att inte nämna de neurologiska och

psykiska sjukdomarna. Likväl har vi på avgörande punkter under de senaste decennierna nått närmast häpnadsväckande långt vid beaktande av problemets komplexitet. Detta är till mycket stor del de nu utsedda Nobelpristagarnas förtjänst. De har var för sig valt olika utgångspunkter för sin forskning men har tillsammans gett oss en helt ny bild av nervsystemets funktion, plasticitet och betydelse för hjärnans sjukdomar och deras behandling.

Signalöverföringen mellan nervceller är i huvudsak kemisk och sker framför allt vid de speciella kontaktpunkter som den berömda neurohistologen och Nobelpristagaren Santiago Ramon y Cajal vid förra sekelskiftet måleriskt kallade »protoplasmic kisses» och för vilka fysiologen sir Charles Scott Sherrington senare myntade termen »synaps». Dessa kopplingsställen är fenomenalt många, bara i storhjärnebarken finns kanske 400 triljoner synaps! Varje synaps är ett veritabelt underverk i form av ett ytterst sinnrikt, miniatyriserat kemiskt kommunikationssystem, som är kapabelt att överföra information av olika slag med mycket hög hastighet och med inbyggda aktivitetsberoende och självreglerande styrmekanismer. Minnets minsta beståndsdelar utgörs av kemiska och strukturella förändringar i de enskilda synapserna. En synaps som blir kraftigt aktiverad kan t ex förstöras, medan en som inte används kan tillbakabildas helt och hållet. En av pristagarna, Eric Kandel, har hjälpt oss att förstå denna synapsernas dynamik och har visat att även strukturella förändringar kan ske relativt snabbt, något som visar hur insiktsfull Ramon y Cajal var när han liknade neuronens kontakter vid kyssar.

ARVID CARLSSON

Arvid Carlsson belönas för sin upptäckt av dopaminets funktion som signalsubstans i hjärnan och dess betydelse för kontroll av våra rörelser, upptäckter som ledde till insikten att Parkinsons sjukdom orsakas av dopaminbrist i vissa delar av hjärnan och utvecklingen av ett effektivt läkemedel, dvs L-dopa, mot denna sjukdom. Carlsson var också den

Sammanfattat

- De upptäckter för vilka årets pristagare belönas rör kemiska skeenden i synapserna:
- identifieringen av en synnerligen viktig signalsubstans i hjärnan, dopamin, och dess kliniska betydelse vid parkinsonism och behandlingen av schizofreni (Arvid Carlsson)
- de mångskiftande kemiska skeenden som blir följden av bindning av dopamin och andra signalsubstanser med likartat verknings sätt till receptorer (Paul Greengard)
- de förändringar, inklusive ändrad genaktivitet, som utgör grunden för uppkomst och vidmakthållande av minnen (Eric Kandel).

förste att påvisa dopaminets involvering i verkningsmekanismerna för läkemedel mot schizofreni.

Arvid Carlsson kom att i mycket hög grad stimulera den vetenskapliga omvälvning inom det neuropsykiatriska området som startade i mitten av 1950-talet. Då var begreppet kemisk neurotransmission inte allmänt accepterat som ett sätt för hjärnans nervceller att kommunicera med varandra. Många ansåg att det i centrala nervsystemet framförallt förelåg sk elektrisk transmission mellan neuronerna, och kunskapen om signalsubstansernas betydelse för exempelvis psykiska sjukdomar var i allt väsentligt obefintlig. Genom introduktionen av klorpromazin i behandlingen av schizofreni under 1950-talets första år började en revolution inom psykiatri. Något drygt år senare påvisade den amerikanske psykiatern Nathan Kline för första gången i västerlandet den antipsykotiska effekten av reserpin, något som renderade honom det prestigefyllda Laskerpriset. Verkningsmekanismerna för dessa läkemedel och underlaget för deras mycket påtagliga,

Författare

STEN GRILLNER

professor i fysiologi, institutionen för neurovetenskap

LARS OLSON

professor i neurobiologi, institutionen för neurovetenskap

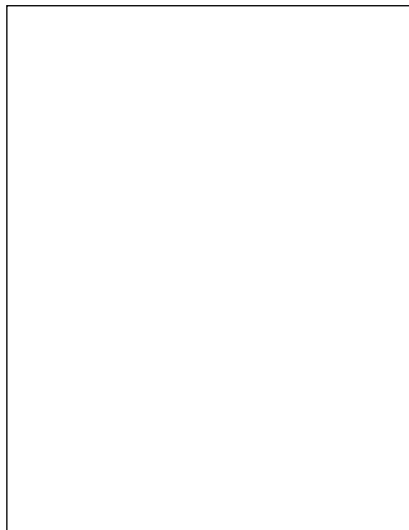
TORGNY SVENSSON

professor i farmakologi, institutionen för fysiologi och farmakologi; samtliga vid Karolinska institutet, Stockholm.



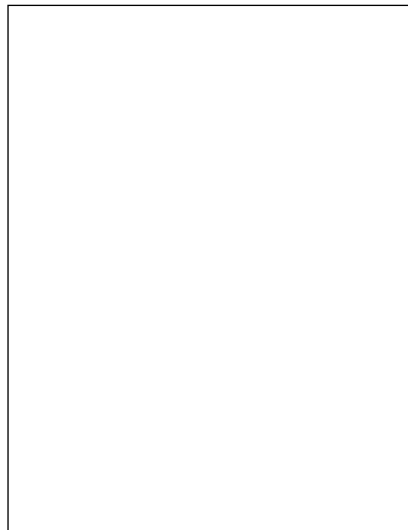
Eric R Kandel

Eric R Kandel (född 1929 i Wien) kom till USA som nioåring, blev BA vid Harvard College 1952, MD 1956 vid New York University. Samtidigt med specialistutbildningen i psykiatri forskade han inom grundläggande neurofysiologi kopplad till cellulära mekanismer för inlärning. Han var 1965–1974 associate och full professor vid Departments of Physiology and Psychiatry vid New York University och är sedan 1974 professor och chef för Center for Neurobiology and Behavior vid Columbia University, New York, och sedan 1984 även senior investigator vid Howard Hughes Medical Institute. Han är medlem i National Academy sedan 1974 och har belönats med en rad utmärkelser inklusive Laskerpriset 1983. Han har (med sina kolleger Schwartz och Jessell) skrivit den internationellt helt dominerande moderna läroboken i neurovetenskap.



Paul Greengard

Paul Greengard är född 1925, blev BA 1948 i fysik och matematik och PhD 1953 i neurofysiologi vid Johns Hopkins. Han tillbringade fem år i England som postdoc-stipendiat 1953–1957 och blev sedan chef för Geigy Research Laboratories, Ardsley, New York (1959–1967). Greengard upprätthöll en professur i farmakologi vid Yale 1968–1983 och är sedan 1983 professor vid Rockefelleruniversitetet, New York. Han är medlem av National Academy of Sciences och har mottagit ett stort antal vetenskapliga pris och andra hedersbetygelser. Greengard är vidare medlem av en rad kvalificerade »advisory boards», bl a vid Howard Hughes Medical Institute och NIMH. Greengard tillhör de mest citerade forskarna inom det biomedicinska forskningsfältet.



Arvid Carlsson

Per Arvid Emil Carlsson (född 1923 i Uppsala) erhöll sin läkarutbildning och medicine doktorsgrad (1951) i Lund. Efter klinisk tjänstgöring i invärtesmedicin fortsatte Carlsson sin forskarkarriär som docent och biträdande professor (1956) vid farmakologiska institutionen i Lund och utnämndes till professor i farmakologi vid medicinska fakulteten, Göteborgs universitet, 1959, där han sedan 1989 aktivt fortsatt sin forskargärning som emeritus. Arvid Carlsson är sedan 1975 medlem i Kungliga Vetenskapsakademien och, sedan 1996, i The Institute of Medicine, National Academy of Sciences, USA, och har erhållit en lång rad internationella priser och utmärkelser, tex Anna-Monica Stiftungs 1st Prize 1975 och det mycket prestigefyllda Japan Prize in Psychology and Psychiatry 1994. Han är också innehavare av fyra hedersdoktorat.

parkinsonliknande biverkningar var emellertid fullständigt okända. Någon effektiv behandling mot Parkinsons sjukdom fanns inte tillgänglig, och kunskapen om dess orsaker i hjärnan var diminutiv. På alla dessa punkter har Arvid Carlssons forskningsinsatser i avgörande grad utökat vår kunskap och samtidigt förbättrat behandlingsmöjligheterna för miljoner sjuka patienter inom såväl neurologins som psykiatrins område.

Vid femtioalets mitt genomgick läkemedelsforskningen en snabb utveckling då nya känsliga metoder introducerades för analys av läkemedel och deras metaboliter liksom av kroppsegna substanser. Ett ledande centrum i utvecklingen var Bernhard B Brodies laboratorium vid NIH i Bethesda, USA, där Carlsson befann sig som gästforskare under fem månader 1955/56. Brodie var intresserad av psykofarmakologiska

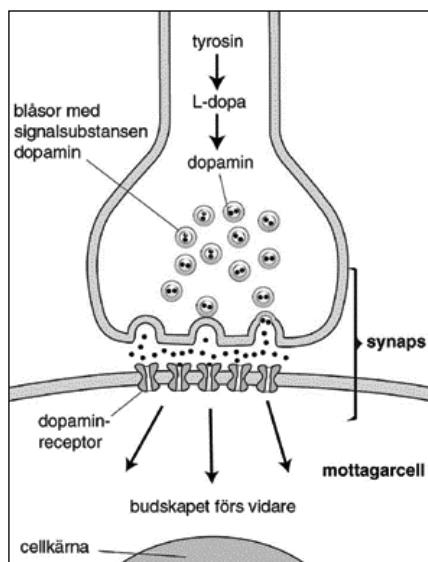
frågeställningar, och med hjälp av ny teknik, spektrofotofluorometri, kunde man t ex analysera biogena aminer som noradrenalin och serotonin, som båda demonstrerats i hjärnan. Särskilt serotonin tilldrog sig Brodies intresse, då bl a LSD tidigare hade visats interagera med serotonin. Man studerade också det då så aktuella reserpinets biologiska effekter. Brodie drog slutsatsen att reserpin verkade genom massiv uttömning av serotonin med överaktivitet som följd.

Carlsson ville dock också studera effekter av reserpin på noradrenalin, något som Brodie var ointresserad av, varför Carlsson vid hemkomsten till Lund som nyutnämnd biträdande professor i farmakologi tog kontakt med Nils-Åke Hillarp, biträdande professor i histologi och en världsauktoritet på det autonoma nervsystemet, för att undersöka frågan med hjälp av den nya tekniken. Man

fann att reserpin orsakade en uttömning av både adrenalin och noradrenalin i en rad vävnader, inklusive hjärnan, och att stimulation av sympatikus efter reserpinförbehandling inte längre frisatte noradrenalin, något som kunde förklara den antihypertensiva effekten. Carlsson fortsatte sedan med att studera reserpinets effekter i hjärnan och kom under en följd av år att göra några av de mest betydelsefulla upptäckterna inom hjärnforskningen under 1900-talet.

Signalsubstansen dopamin och L-dopa vid Parkinsons sjukdom

För att klargöra reserpinets verkningsmekanism i hjärnan, en fråga av central betydelse inom schizofreniforskningen vid denna tidpunkt mot bakgrund av Nathan Klines tidigare kliniska iakttagelser, gav Carlsson och medarbetare reserpin till försöksdjur, dvs möss och kaniner, följt av L-dopa,



Figur 1. Signalöverföring med hjälp av dopamin. Dopamin bildas från aminosyran tyrosin via L-dopa. När en nervimpuls når nervändslutet frisätts dopamin från synapsblåsor genom exocytos. Signalsubstansen binds till dopaminreceptorer, vilket leder till en kaskad av intracellulära händelser karakteriserade av Greengard (se Figur 2).

en prekursor till noradrenalin, i avsikt att återställa bristen på denna signalsubstans som man tidigare observerat. L-dopa visades inte bara utöva en centralstimulerande effekt i sig utan också effektivt motverka den sederande och akinetiska effekten av reserpin. Carlsson visade också att prekursorer till serotonin, dvs 5-hydroxytryptofan, i motsats till L-dopa inte motverkade reserpinets kraftigt sederande och motorikhämmande effekter, varför Brodies hypotes att reserpineffekten var kopplad till uttömningen av serotonin i hjärnan kunde avfärdas. Eftersom förbehandling med en monoaminoxidashämmare, som hämmar nedbrytningen av bildade aminer men i sig inte förmår motverka reserpinsyndromet, potentierte L-dopa-effekten, erhöles ytterligare stöd för att L-dopas effekter medierades genom en sorts amin i hjärnan.

I en kompletterande rapport året efter påvisade Carlsson, med hjälp av en på hans laboratorium nyutvecklade, specifik och känslig analysmetod för dopamin (3-hydroxytyramin), höga koncentrationer av dopamin i hjärnan hos försöksdjur, dvs ungefär lika höga som av noradrenalin, vilket talade emot att dopamin enbart tjänade som prekursor till noradrenalin i hjärnan – den då förhärskande uppfattningen. I samma rapport visades också för första gången att reserpin förorsakade en massiv uttömning av dopamin i hjärnan. Slutligen visade Carlsson att L-dopabehandling inte bara motverkade reserpinets sederande och akinetiska effekt utan också samtidigt återställde dopaminhalten i

hjärnan, trots att noradrenalinbristen kvarstod. Man fann också att både motorik- och dopaminrestitutionen i hjärnan potentiades av samtidig behandling med monoaminoxidashämmare.

Dessa resultat visade således att dopamin normalt förekommer i hjärnan i ansevärliga koncentrationer och sannolikt är en endogen agonist i sig själv, oberoende av noradrenalin, med betydelse för beteendekontroll och motorik. Carlsson och medarbetare fick ytterligare stöd för sin hypotes när man strax därpå fann helt olika distribution av dopamin respektive noradrenalin i hjärnan, med dopaminet koncentrerat till de basala ganglierna. Han noterade också de påtagliga likheterna mellan reserpinets motorikhämmande effekter och de typiska symtomen vid Parkinsons sjukdom och drog slutsatsen att de parkinsonlika effekterna av reserpinet berodde på dopaminbrist i de basala ganglierna, parkinsonsymtom som således kunde avhjälpas med L-dopabehandling. Carlsson konkluderade således att dopamin är implicerat i kontrollen av extrapyramidala motoriska funktioner. Dessa resultat och slutsatser låg till grund för åtföljande undersökningar av dopamins roll vid Parkinsons sjukdom liksom den ungefär ett decennium senare introducerade behandlingen med L-dopa, som innebar den första effektiva terapin mot denna vanliga och gravt invalidiserande neurologiska sjukdom.

Antipsykotiska läkemedel och dopaminerg blockad

Klorpromazin introducerades 1953. Detta var resultatet av en slump snarare än en konsekvens av rationell läkemedelsutveckling, då man vid tidpunkten ifråga saknade kunskap om såväl etiologi som patogenes vid schizofreni. Verkningsmekanismen för klorpromazin, liksom för andra typiska antipsykotika som introducerades, förblev således helt okänd under ett decennium efter dess introduktion. 1963 publicerade dock Carlsson och Lindqvist ett arbete som i ett slag förändrade hela forskningsfältet. Carlsson studerade klorpromazin och haloperidol, ett antipsykotiskt läkemedel av en annan kemisk struktur än klorpromazin, och analyserade effekterna på katekolaminnivåer och metaboliter i hjärnan. I arbetet inkluderades även prometazin, ett antihistamin som kemiskt liknar klorpromazin men som saknar antipsykotisk verkan. Carlsson upptäckte för första gången ett samband mellan den kliniska effekten hos de antipsykotiska läkemedlen och deras effekt på identifierade transmittersystem i hjärnan. Hans tolkning av resultaten ter sig i efterskott närmast genial: att ökningen i transmittersättning orsakades av receptor-

blockad, dvs blockad av noradrenerga och dopaminerga receptorer i hjärnan, som i sin tur via en återkopplingsmekanism aktiverar monoaminneuronen. Varje led i denna tolkning har sedermera konfirmerats i otaliga studier såväl experimentellt som kliniskt. Bakgrunden till Carlssons slutsats var att de antipsykotiska läkemedlen framkallade i stort sett samma beteendeeffekter som reserpin, vilka han tidigare funnit relaterade till dopaminbrist i hjärnan. Problemet var att varken klorpromazin eller haloperidol orsakade någon förändring i dopaminhalten i hjärnan – endast metabolitnivåerna ändrades, dvs ökade. Carlsson drog då den helt korrekta slutsatsen att blockad av receptoreorna måste vara förklaringen till de nya antipsykosmedlens effekter på transmittersättning och djurbeteende.

Genom sina upptäckter gjorde Carlsson sannolikt att antipsykotiska läkemedel av flera olika slag, vilka i engelskspråkig litteratur vid denna tidpunkt benämndes »major tranquilizers» på grund av deras påtagliga beteendehämmande och akinetiska effekter, hade en gemensam verkan i hjärnan, dvs blockad av dopaminerg neurotransmission. Man vet nu att även andra mekanismer är av betydelse för att uppnå en antipsykotisk effekt, men än idag har alla på kliniken använda antipsykotiska läkemedel en gemensam nämnare i att de, ehuru i olika grad, blockerar dopaminerg transmission i hjärnan. Carlssons ursprungliga upptäckter har stimulerat den farmakologiska och farmaceutiska utvecklingen och den biologiska schizofreniforskningen genom fyra decennier och utgör utan tvivel en milstolpe i psykofarmakologins och den biologiskt orienterade psykiatris historia.

Första selektiva serotoninåterupptagshämmaren – zimelidin

Carlsson bidrog under hela sextiotalet kraftfullt till den alltmer fördjupade förståelsen av den monoaminerga synaptiska transmissionsprocessen. Mot slutet av årtiondet gjorde han ytterligare en avgörande insats i psykofarmakologins historia genom att initiera utvecklingen av den första selektiva serotoninåterupptagshämmaren, zimelidin, för behandling av depression.

Carlsson startade från iakttagelsen att ett flertal tricykliska antidepressiva farmaka, förutom att blockera den noradrenerga återupptagsmekanismen i hjärnan, som var den då dominerande teorin för deras verkningsmekanism, också blockerade serotoninåterupptaget. Det var dock inte möjligt att härigenom dra slutsatsen att denna mekanism i sig gav upphov till en antidepressiv effekt. I åtföljande studier av en serie antihistaminer och analgetika upptäckte

Carlsson och Lindqvist att vissa av dessa var potenta men oselektiva serotonin-återupptagshämmare, något som var väsentligt då dessa farmaka saknade den för de tricykliska antidepressiva så typiska polycykliska kemiska strukturen. Carlsson började därför tillsammans med Hans Corrodi, kemist vid Hässle/Astra, att mot denna bakgrund utveckla en selektiv serotoninåterupptagshämmare, dvs utan nämnvärd effekt på noradrenalinupptaget. Resultatet blev zimelidin (publicerat 1972), som också saknade de antikolinerga effekterna och den för de tricykliska antidepressiva så förödande hjärntoxiciteten.

Zimelidin visades ha en utmärkt antidepressiv effekt, även om det så småningom fick dras in på grund av helt oväntade toxiska biverkningar. Principens terapeutiska värde har dock validerats bortom varje tvivel under de senaste 25 åren, då selektiva serotoninåterupptagshämmare av olika slag kommit att dominera depressionsbehandlingen. Denna typ av psykofarmaka har också, i sin tur, stimulerat undersökningar av serotoninets betydelse i hjärnan vid andra sjukdomstillstånd än depression och medfört förbättrad terapi t ex vid obsessiva och kompulsiva sjukdomstillstånd och har under senare år hört till världens mest använda läkemedel.

Översiktsreferenser

- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T. 3,4-Dihydroxy phenylalanine and 5 hydroxy tryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 1957; 180: 1200.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T, Waldeck B. On the presence of 3-hydroxy tyramine in brain. *Science* 1958; 127: 471.
- Carlsson A. The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol Rev* II 1959; 490-3.
- Carlsson A, Lindqvist M. Effect of chlorpromazine or haloperidol on the formation of 3-methoxy tyramine and normetanephrine in mouse brain. *Acta Pharmacol et Toxicol* 1963; 20: 140-4.
- Carlsson A, Corrodi H, Fuxe K, Hökfelt T. Effect of antidepressant drugs on the depletion of interneuronal brain 5 hydroxy tryptamine stores caused by 4 methyl-L-ethyl meta tyramine. *Eur J Pharmacol* 1969; 5: 357-66.
- Kehr W, Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T, Atack CJ. Evidence for a receptor-mediated feedback control of striatal tyrosine hydroxylase activity. *J Pharm Pharmacol* 1972; 24: 744-7.

PAUL GREENGARD

När signalsubstanser frisätts vid synapsen kan detta leda till en lång rad olika effekter. Dessa kan indelas i två huvudgrupper: de mycket snabba, som uppstår inom ett antal millisekunder, och de »långsamma», med effekter som

sätter in efter sekunder och längre tider. Signalsubstanser såsom acetylkolin, glutamat, GABA och glycin kan direkt bindas till ligandstyrda jonkanaler, som omedelbart ändrar sin genomsläpplighet för bestämda joner. Beroende på vilken typ av jonselektivitet den aktuella jonkanalen har, leder detta i sin tur till excitation eller inhibition.

Dopamin, liksom noradrenalin, serotonin (5-HT) och olika peptider verkar genom en annan typ av transduktionsmekanism, som efter viss fördröjning kan leda till långvariga förändringar av den postsynaptiska cellens funktion, via aktivering av receptorer och G-proteiner, cykliska nukleotider, proteinkinaser och specifik fosforylering av olika substratproteiner. Dessa kan utgöras av olika membranbundna proteiner, såsom spännings- eller ligandstyrda jonkanaler, och av andra intracellulära proteiner som även via effekter på genexpression i sin tur kan leda till en upp- eller nedreglering av syntes av andra proteiner. Greengard har inom området långsam neurotransmission bidragit med banbrytande upptäckter och under decennier lett utvecklingen inom detta forskningsfält.

Fosforylering via modulerande transmittorer

Verknings sättet hos modulerande transmittorer var ännu vid 1960-talets slut inte klarlagda. I och med att Greengard 1968 påvisade förekomsten av ett cAMP-beroende proteinkinase i hjärnan kunde en indirekt koppling mellan transmittorer och proteinfosforylering göras. Bloom och medarbetare visade även att cAMP och noradrenalin har snarlika effekter på retbarheten i purkinjeceller i cerebellum. På basen av dessa studier var det dock inte möjligt att avgöra på vilket sätt bindningen av transmittor var relaterad till aktiveringen av kinas, och vilka celltyper som var involverade.

I en serie banbrytande arbeten, innefattande såväl fysiologiska och biokemiska som ultrastrukturella tekniker, har Greengard steg för steg klarlagt den initiala delen av transduktionsmekanismen. Han har visat att aktionspotentialaktivitet i preganglionära trådar inducerar en ökning av cAMP-halten i i sympatiskt halsganglion. Effekten kunde reduceras med kolinerga antagonister, och cAMP-nivåerna påverkades endast i synapsinnehållande regioner. Härmed hade Greengard lyckats knyta cAMP-bildningen till den synaptiska transmissionen, närmare bestämt till synapsens postsynaptiska del. Direkta belägg för det sistnämnda erhöll Greengard i en histokemisk studie på hjärnbark, där cAMP-fosfodiesteras lokaliserades i anslutning till det postsynap-

tiska membranet i synapsen. Han fortsatte därefter att analysera kopplingen mellan transmittorreceptorer och adenylatcyklas och visade att dopamin inducerar en cAMP-stegring i intakta ganglier, som kan inhiberas av vissa katekolaminantagonister. Därefter homogeniserades gangliet, och dopamin visades fortfarande ha denna effekt, ett fynd som i all sin enkelhet påvisar en koppling mellan DA-receptorn och cykaset i frånvaro av de potentiella kaskadsystem som finns i det intakta neuronet. Analysen fördes nu vidare på hjärnvävnad, där en motsvarande dopaminspecifik adenylatcyklasaktivitet påvisades i homogenat från N caudatus. En cAMP-ökning har även visats kunna induceras av olika receptorer av dopaminerg respektive adrenerg typ. Greengard visade även att oktopamin, serotonin och histamin kan aktivera adenylatcyklas via specifika receptorer.

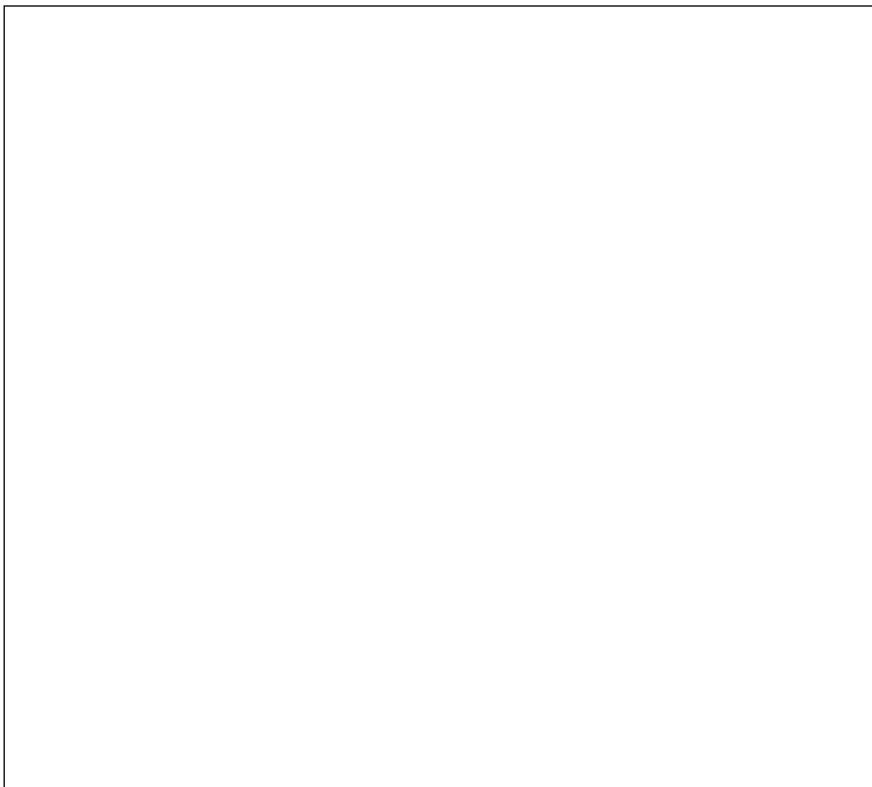
Greengard dominerade fältet under denna period, och arbeten från andra laboratorier är i huvudsak av bekräftande natur. Han kan således tillskrivas upptäckten av den typ av neuronal signalöverföring där en modulerande transmittor binder till en postsynaptisk receptor kopplad till adenylatcyklas. Därtill var han även först att påvisa nästa länk i kedjan, cAMP-beroende proteinkinase i hjärnan.

Ytterligare en länk i denna kedja upptäckte Greengard betydligt senare då han visade att (dopamin-)receptor-medierad fosforylering kunde reglera aktiviteten hos fosfoproteinet DARPP-32, som i sin tur påverkar proteinfosfatase I, som därefter defosforylerar Na-K-ATPas-P (dvs Na⁺-K⁺-pumpen). Detta innebär en reglering av cellens membranpotential – vid hög Na-K-ATPasaktivitet blir cellen hyperpolariserad (inhiberad) och okänslig för andra synaptiska signaler. Detta kan ses som en ny typ av kontrollmekanism för långtidsreglering av en cell eller cellgrupps retbarhet i ett neuronsystem. Det har också visat sig att DARPP-32 och relaterade fosfoproteiner aktiveras av såväl dopamin som Ca²⁺-inträde (från olika källor) och Ca²⁺/CaM-kinase, som i sin tur påverkas av ett flertal transmittorer. Genom att framställa möss hos vilka genen för DARPP-32 är inaktiverad, har Greengard och medarbetare erhållit ytterligare bevis för den stora betydelse som dopamin och DARPP-32 har för beteende och för effekter av såväl narkotika som antipsykotiska läkemedel.

Fosforylering via depolarisering och kalciuminflöde

Greengards nästa betydande upptäckt rörde aktiveringen av proteinkinase via kalciuminflöde till följd av membrandepolarisering. Spänningsreglera-

ANNONS



Figur 2. DARPP-32 och proteinfosfas 1 spelar en central roll i signaltransduktionen hos dopaminkänsliga neuron. Cellens fysiologiska tillstånd beror av vilken balans som råder mellan proteinkinaser och proteinfosfater. Bilden exemplifierar hur en rad olika naturligt förekommande signalmolekyler, antipsykotiska läkemedel och narkotika av kokain-, amfetamin- och opiattyp utövar sina effekter via DARPP-32, som därmed integrerar olika stimuli och via PP-1 orsakar cellulära svar. Gröna pilar indikerar aktivering, röda pilar inaktivering. I bilden illustreras skeenden då DARPP-32 fosforyleras av proteinkinasa A på aminosyrares-ten treonin i position 34. Det sålunda fosforyle-

rade DARPP-32 blir en hämmare av proteinfosfas 1. Reglerproteinet kan emellertid även fosforyleras på aminosyrares-ten treonin i position 75 av det cyklinberoende kinaset Cdk5 (bilden visar inte denna situation), vilket förvandlar DARPP-32 till en hämmare av PKA i stället. En signalkaskad löper hela vägen in i cellens kärna där proteinet CREB kan aktiveras genom fosforylering och då bindas till speciella DNA-sekvenser för att påverka transkription av en rad olika gener varav vissa själva är transkriptionsfaktorer medan andra har direkta effekter utanför cellkärnan.

Källa: Greengard, Allen och Nairn. *Neuron* 1999; 23: 435-47.

de kalciumkanaler hade påvisats och karakteriserats under 1960-talet. Nobelpristagaren Katz och medarbetare påvisade att kalciuminflöde alltid föregår transmitterfrisättning. Fram till 1977 kände man dock inte till någon molekyllär verkningsmekanism för kalcium i nervsystemet. I ett arbete från 1977 använde Greengard synaptosomer (en sorts preparation av synapser) från hjärna för att påvisa fosforylering av vissa neuronala proteiner, bl a det av honom själv tidigare upptäckta protein I (sedermera känt som synapsin). Depolarisering i närvaro av kalcium leder till fosforylering av protein I och ett flertal andra proteiner. Den kalciuminducerade fosforyleringen skedde på en annan plats än den av Greengard tidigare påvisade cAMP-beroende fosforyleringen, vilket därmed visade en molekyllär konvergens mellan skilda transduktions-system. Greengard upptäckte därefter även kalcium-kalmodulinberoende proteinkinasa i hjärna, och i en rad föl-

jande arbeten karakteriserades och re-nades olika subtyper av CAM-kinaser.

Förutom de två ovan diskuterade systemen lade Greengard även grunden till kunskapen om cGMP-kinassystemet. Redan 1970 upptäckte han cGMP-beroende proteinkinasa. Han beskrev senare kopplingen mellan kalciuminflöde och induktion av cGMP-bildning och identifierade ett substrat för cGMP-beroende proteinkinasa i nervsystemet.

Nervcellsaktivitet och proteinfosforylering av jonkanaler

Vid 1980-talets början var det helt uppenbart att proteinfosforylering intar en dominerande plats i signaltransduktionen i neuron. En mångfald substratproteiner hade påvisats under 1970-talet. Fortfarande hade dock ingen visat att en aktivering av proteinkinaser kunde ge upphov till förändringar av den neuronala aktiviteten. Greengard etablerade nu samarbete med Strumwasser och Kaszmarek och med Kan-

del. I mikroinjektionsstudier, utförda på *Aplysia*-neuron, där det är möjligt att injicera direkt in i enskilda neurondelar, visades att den katalytiska subenheten av cAMP-beroende proteinkinasa påverkar jonkanalsaktiviteten i enskilda neuron. Man finner en ökning av en kalciumström, en minskning av en kaliumström och en ökning av transmitterfrisättningen.

Ännu hade den sista länken i kedjan dock inte slutits – påvisandet av en funktionell effekt av fosforylering i ett specifikt kanalprotein. Återigen kom Greengard att spela en betydelsefull roll då han visade att fosforylering av specifika subenheter i acetylkolinreceptorn ökar desensitiseringsen av receptorn.

Under slutet av 1980-talet och under 1990-talet följde sedan en rad rapporter från många laboratorier, inklusive Greengards, där fosforylering visas påverka funktionen hos olika transmitterstyrda (glutamat, GABA, glycin) och spänningsreglerade jonkanaler (Na-, K-, Ca-kanaler). Området fosforylering-neuronal aktivitetsreglering har sett en närmast explosiv tillväxt. Till detta har tillgången till patch-clampmetodik i kombination med kloningen av kanalproteinerna bidragit. Idag är fosforyleringseffekterna så väletablerade att exempelvis en beskrivning av ett kanalprotein som inte moduleras genom fosforylering sannolikt väcker större uppseende än ett som gör det. Ett stort antal grupper har bidragit till denna kunskapsutveckling, men Greengard har gjort de initiala upptäckterna och lett utvecklingen.

Översiktsreferenser

- Greengard P. Possible role for cyclic nucleotides and phosphorylated membrane proteins in postsynaptic actions of neurotransmitters [review]. *Nature* 1976; 260: 101-8.
- Greengard P. Phosphorylated proteins as physiological effectors [review]. *Science* 1978; 199: 146-52.
- Nestler EJ, Greengard P. Protein phosphorylation in the brain [review]. *Nature* 1983; 305: 583-8.
- Fienberg AA, Hiroi N, Mermelstein PG, Song W, Snyder GL, Nishi A et al. DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science* 1998; 281: 838-42.
- Greengard P, Allen PB, Nairn AC. Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade [review]. *Neuron* 1999; 23: 435-7.

ERIC R KANDEL

Kandel belönas för sina upptäckter av hur synapsers funktion förändras i samband med inlärning. Här ges en kortfattad bakgrund till Kandels forskning, en summering av huvudpunkterna

i hans tidigare arbeten och en redogörelse för de molekylära mekanismer som är kopplade till långvariga förändringar av synaptisk funktion och långtidsminnet, dvs så kallad synaptisk plasticitet.

Nervsystemets förmåga att lagra och representera olika typer av minnesbilder, och att återkalla dessa engram till medvetna bilder, är fortfarande endast i ringa grad förstådd. När Kandel började sin forskning hade han analysen av denna typ av minnesmekanismer i fokus. Han har i en av de mest konsekventa forskningsinsatserna inom nutida neurobiologi bidragit till att visa hur en synapsfunktion kan förändras i samband med såväl korttidsminne (minuter, timmar) som långtidsminne (dagar). Förändringen av den enskilda synapsens funktion utgör den minsta byggsten (process) som möjliggör att en minnesbild skapas i hjärnans neuronala nätverk. Kandel insåg redan i slutet av femtiotalet att en förståelse av minnet krävde kunskap på cell- och synapsnivå.

Vid denna tidpunkt var kunskapen och koncepten om hjärnans minnesfunktioner och vilka cellulära mekanismer som kunde tänkas spela roll primitiva och inte sällan till och med mystifierande. Olika enklare typer av minnesfunktioner hade definierats betendemässigt som (1) sk habituering, (upprepade stimulering ger en långvarig nedreglering av ett svar på tex en sensorisk stimulering), (2) sensitisering (motsatsen till habituering), (3) associativt minne av typen klassisk betingning (jämför Pavlovs hund: relationen klockringning-föda-salivering), (4) associativt minne av typen operant betingning (när man belönar en handling som djuret självt initierar och därigenom möjliggör för djuret att associera handlingen med en viss typ av belöning). Minnesforskarna hade i viss detalj betendemässigt beskrivit regelverket kring dessa olika enkla minnestyper och visat att de förekommer i likartad form i större delen av djurriket såväl hos olika evertebrater som hos vertebrater. Man hade däremot ringa eller ingen uppfattning om vilka neuronala mekanismer som ansvarade för dessa funktioner. Vad gäller de mer komplexa minnesfunktioner som vi i dagligt tal kallar minne, var kunskapen än mer begränsad. Man visste att skador av vissa delar av CNS, som tex hippocampus, gav upphov till en nedsatt förmåga att lagra nya minnesbilder.

Efter inledande studier av egenskaper hos nervceller i hippocampus insåg Kandel att studier av minnesfunktioner i CNS hos högre vertebrater knappast var en framkomlig väg om man ville förstå det neuronala underlaget för minnet i termer av synapser och nervceller.

Han valde då en försöksmodell, *Aplysia californica*, en havssnigel med stora nervceller, som tidigare utnyttjats av andra forskare, bl a Tauc i Paris, hos vilken Kandel tillbringade ett år som gästforskare och lärde sig preparatet.

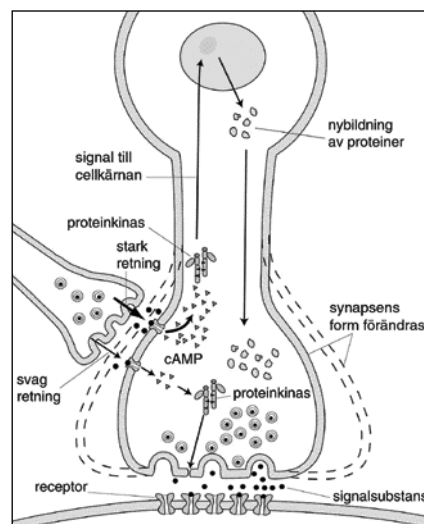
Synaptisk plasticitet vid korttidsminne

En enkel reflex, gälskyddsreflexen, kunde utlösas på ett enkelt och reproducerbart sätt och dessutom förelåg de ovan nämnda enkla minnesformerna habituering, sensitisering och klassisk betingning. Han visar även att man kan utlösa förändringar som motsvarar dels ett korttidsminne och som står kvar i timmar och inte kräver proteinsyntes, dels en form av långtidsminne (>24 timmar) som kräver medverkan av cellkärnan och genexpression.

Han kartlade sedan vilka nervceller som aktiveras i gälskyddsreflexen och deras synaptiska förbindelser. Han visade bl a att de sensoriska neuronerna även hade en monosynaptisk förbindelse med direkt synaptisk excitation (EPSP). Denna monosynaptiska EPSP från sensoriska neuron till motorneuron ökade vid sensitisering och klassisk betingning och minskade vid habituering. Här fanns således en direkt korrelation mellan synapsstyrka och minnesfunktion och en specifik synaps att studera.

Denna synaps utnyttjades sedan i den fortsatta analysen och han visade att korttidsförändringar i synapsfunktion (timmar) framförallt beror på att mängden frisatt transmitter påverkas genom en presynaptisk modulering utlöst av 5-HT och vissa peptider.

5-HT visades verka genom cAMP, cAMP-beroende proteinkinasa A (PKA) och fosforylering av bl a en kaliumkanal i den presynaptiska terminalen (samarbete med Greengard). Effekten av fosforylering av denna 5-HT-reglerade K^+ -kanal var att dessa K^+ -kanaler inte i lika hög grad aktiveras under tex aktionspotentialen. Detta innebär att aktionspotentialen förlängs, eftersom K^+ -kanalaktiveringen är av vikt för repolariseringen av aktionspotentialen tillbaka till vilomembranpotential. Detta innebär i sin tur att de spänningsreglerade Ca^{2+} -kanaler som öppnas under aktionspotentialen kommer att stå öppna under en längre period, att fler Ca^{2+} -joner kan passera in i cellen och att den intracellulära Ca^{2+} -nivån under en period efter aktionspotentialen kommer att vara förhöjd (Ca^{2+} -inträdet under aktionspotentialen utlöser frisättning av transmitter med en latens av mindre än 0,001 s). Han visar även att 5-HT-aktiveringen av PKA kraftigt potentialer (via kalmodulin) vid närvaro av en ökad Ca^{2+} -nivå och att detta proteinkinasa av PKA-typ även är kalciumberoende.



Figur 3. Molekylära förändringar i synapserna skapar korttidsminne och långtidsminne. Schematisk beskrivning av synaps från havssnigeln *Aplysia*.

Detta är i sin tur av betydelse, eftersom en samtidighet mellan 5-HT-aktivering och aktionspotential krävdes för att den plastiska förändringen av synapsfunktionen skulle inträda. Ett sådant kritiskt tidsintervall är ett viktigt element i kontrollmekanismen. Förutom K^+ -kanalfosforyleringen utreddes även andra kompletterande mekanismer för facilitering respektive reduktion av den synaptiska potentialen. Tillsammans med Schwartz visade han även på de molekylära mekanismer som utnyttjas för att vidmakthålla en hög PKA-nivå.

Tillsammans med Schacher visade han sedan att den sensoriska nervcellen och motorneuronet även kunde överleva i cellkultur och att det sensoriska neuronet då bildar synapser med motorneuronet. Detta tekniskt viktiga förhållande gav nya möjligheter till en än mer penetrerande analys. Man kunde registrera från pre- och postsynaptiska celler under lång tid och följa utvecklingen av en synapsfunktion. Man visade här att en kortvarig 5-HT-applikation förstärker synapsfunktionen som vid korttidsminnet, men att fem på varandra följande korta 5-HT-applikationer ledde till en långvarig (>24 timmar) potentiering av synapsfunktionen. Man hade således en cellulär modell för långtidsminnet, bestående av två celler i kultur. Detta förhållande har markant underlättat den fortsatta analys av långtidsförändringar av synapsfunktionen som genomförts av Kandel och medarbetare.

Synaptisk plasticitet vid långtidsminne

I motsats till korttidsförändringarna (timmar) kräver en långtidspotentialer av synaptisk funktion (>24 timmar) genexpression. En kort konsolideringsperiod följs av transkription, något som

tidigt visades med hjälp av olika synteshämmare och som nu detaljstuderats. Man visade morfologiskt att det sker en tillväxt i synapsregionen mellan sensoriskt neuron och motorneuron med bildande av nya utskott, varikositeter och aktiva zoner. Detta visades först i intakta ganglier men sedan och mer elegant i kultur med synapser mellan sensoriskt neuron och motorneuron, i vilken samma synaps studerades före och efter långtidspotentiering inducerad med fem på varandra följande extracellulära 5-HT-pulser. En enstaka 5-HT-puls ger inte långtidspotentiering men väl ovan nämnda cAMP-PKA-medierade korttidsfacilitering av synaptisk transmission. Långtidsfaciliteringen kräver således proteinsyntes och en signal från 5-HT-receptorer till cellkärnan.

Kandel visade i en serie arbeten att även dessa effekter medieras av samma signalsystem, cAMP-PKA. I samarbete med Roger Tsien och med nya cellulära avbildningstekniker för den katalytiska och regulatoriska PKA-subenheten studerades i realtid i den enskilda cellen när cAMP-påverkan leder till att PKA dissocieras och den katalytiska subenheten blir fri.

Vid den typ av 5-HT-stimulering som ger upphov till korttidsplasticitet (timmar) är cAMP-effekterna begränsade främst till dendriter och synapsregionen, och ingen aktivitet finns i cellkärnan. Med den mer långvariga 5-HT-exponeringen, som leder till långtidsplasticitet, passerar den katalytiska PKA-subenheten genom porerna i kärnmembranet, vilket leder till ett långvarigt uttryck av denna i cellkärnan. Komplexet av regulatorisk och katalytisk PKA-enhet, däremot, passerar inte genom dessa kärnmembranporer.

Aplysia har liksom vertebrater s k CREB-protein i cellkärnan (cAMP-responsive element-binding protein), som fosforyleras av PKA och i den fosforylerade formen aktiverar ett speciellt CRE-lokus (cAMP-responsive element). I en serie arbeten karakteriseras Aplysias CREB-protein, vilket fosforyleras av PKA. Detta mellansteg måste sedan aktiveras för att långtidsplasticitet av synapsfunktionen skall uppkomma. Man har här visat att samma initiala signalsystem över cAMP och PKA utnyttjas för både lång- och korttidsplasticitet med en fosforylering av olika substratproteiner (CREB i cellkärnan respektive K-jonkanaler i synapsregionen). Långtidsplasticiteten kräver emellertid en kraftigare 5-HT-cAMP-PKA-aktivering.

CREB aktiverar sedan dels (1) en effektorgen som leder till syntes av ubiquitinhydroxylas, som deaktiverar den regulatoriska PKA-subenheten och gör att den höga nivån av katalytisk PKA-

subenhet bevaras flera timmar, dels (2) en transkriptionsfaktor av C/EBP-typ (CCAAT-enhancer binding protein). Denna form av Aplysia-C/EBP klonades och beskrevs i detalj, och man visade att aktiveringen av den är avgörande för uppkomsten av långtidsplasticitet. Detta visades på såväl translations- som transkriptionsnivå. Man visade då även att antisensprober blockerar långtidsplasticitet medan sensprober har en faciliterande effekt. En blockad av denna gens expression förhindrar helt »långtidsminnet» men påverkar däremot inte korttidsplasticiteten. Denna »immediate-early gene» kan liknas vid en molekylär strömbrytare. När den aktiveras utlöses en kaskad av olika förändringar.

Man har visat att expressionen av ett sextontal proteiner förändras. Sex av dessa har klonats och beskrivits i viss detalj. Expressionen av sex minskar medan den ökar för ett tiotal. Fyra av de proteiner som minskar sin expression är glykoproteiner av »cell-adhesion-molecules»(CAM)-typ och liknar speciellt den typ av CAM som beskrivits i vertebratnervsystemet som N-CAM. N-CAM har till funktion att förankra cellmembranet till närliggande cellmembran och fixerar relationen mellan delar av enstaka celler. Kandel visade att expressionen av Aplysia-N-CAM minskar drastiskt redan några timmar efter en 5-HT-initiering av kedjan »5-HT-cAMP-PKA-CREB-C/EBP...». Lika viktigt som att expressionen av N-CAM minskar är att en endocytos initieras, som förflyttar N-CAM-molekyler från cellmembranet in i cellen. I och med att N-CAM-molekylernas antal minskar, blir cellmembranen fria att öka sin yta i synapsregionen, bilda nya varikositeter etc. Som del av detta program uppstår ett ökat antal »coated pits» och »coated vesicles» och en ökning av den lätta kedjan av klatrinmolekylen. Denna tillväxt (se ovan) av synapsregionen sker under den period som N-CAM inte uttrycks. När N-CAM sedan åter syntetiseras fryses åter det »mikroanatomiska» förhållandet i synapsregionen, med en ny och förstörd synaps som resultat. Ett av de proteiner som får ett ökat uttryck är klatrin av Aplysia-typ, som har betydelse för bl a endocytosen. Det är uppenbart att ett tillskott av nytt cellmembran och specifika synapsproteiner även måste ske.

När det gäller däggdjur har intresset för plasticitet i synapser i hippocampus varit mycket stort under det senaste decenniet. Ett stort antal ledande laboratorier har studerat den s k långtidspotentieringen (LTP), som för övrigt först beskrevs i Per Andersens laboratorium i Oslo. Intresset för LTP har främst varit inriktat på korttidsplasticitet (minuter till timmar). Fosforylering är även här

en viktig mekanism. Såväl pre- som postsynaptiska plasticitetsmekanismer kan påvisas. Förhållandena är tekniskt betydligt mer komplicerade än i Aplysia. Trots detta har man kunnat karakterisera en grupp av olika cellulära mekanismer som är av betydelse i olika kortikala synapser. Under 1990-talet har Eric Kandel arbetat med inlärning och i samband därmed bearbetat långtidsminne med bl a transgen teknik och kunnat visa att om man slår ut de mekanismer som hos Aplysia utnyttjas för långtidsminnet får man även hos mus oförmåga till inlärning. Detta är nu ett omfattande forskningsprogram.

Slutligen skall konstateras att Kandel under denna tid har behållit sin anknytning till psykiatri och dess biologiska bas. Han skrev år 1999 en mycket uppmärksam översikt med titeln: »Biology and the future of psychoanalysis: a new intellectual framework for psychiatry» i American Journal of Psychiatry.

Översiktsreferenser

- Abel T, Martin KC, Bartsch D, Kandel ER. Memory suppressor genes: inhibitory constraints on the storage of long-term memory [review]. *Science* 1998; 279(5349): 338-41.
- Alberini CM, Ghirardi M, Metz R, Kandel ER. C/EBP is an immediate-early gene required for the consolidation of long-term facilitation in Aplysia. *Cell* 1994; 76(6): 1099-114.
- Bailey CH, Bartsch D, Kandel ER. Toward a molecular definition of long-term memory storage [review]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(24): 13445-52.
- Bailey CH, Chen M, Keller F, Kandel ER. Serotonin-mediated endocytosis of apCAM: an early step of learning-related synaptic growth in Aplysia. *Science* 1992; 256(5057): 645-9.
- Bailey CH, Kandel ER. Structural changes accompanying memory storage. *Annu Rev Physiol* 1993; 55: 397-426.
- Casadio A, Martin KC, Giustetto M, Zhu H, Chen M, Bartsch D et al. A transient, neuron-wide form of CREB-mediated long-term facilitation can be stabilized at specific synapses by local protein synthesis. *Cell* 1999; 99(2): 221-37.
- Clark GA, Kandel ER. Induction of long-term facilitation in Aplysia sensory neurons by local application of serotonin to remote synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(23): 11411-5.
- Kandel ER. Biology and the future of psychoanalysis: a new intellectual framework for psychiatry revisited [review]. *Am J Psychiatry* 1999; 156(4): 505-24.
- Kandel ER, Hawkins RD. The biological basis of learning and individuality. *Sci Am* 1992; 267(3): 78-86.
- Martin KC, Casadio A, Zhu H, E Y, Rose JC, Chen M, Bailey CH, Kandel ER. Synapse-specific, long-term facilitation of aplysia sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage. *Cell* 1997; 91(7): 927-38.
- Martin KC, Michael D, Rose JC, Barad M, Casadio A, Zhu H, Kandel ER. MAP kinase translocates into the nucleus of the presynaptic cell and is required for long-term facilitation in Aplysia. *Neuron* 1997; 18(6): 899-912.