

Een rol van microtubuli in synapsen en synaptische plasticiteit

J.A.van den Beek, V.A.Buijs, T.Dijs, J.L.Monster, L. Stolk en A.J.C.de Swart

Oktober 2012

Inhoud

Samenvatting	p. 1
Introductie	p. 2
1. Microtubuli in de presynaps	p. 4
2. Microtubuli in de postsynaps en dendritische spines	p. 7
2.1 Gaan microtubuli de dendritische spines in?	p. 7
2.2 Wat voor effect hebben microtubuli in dendritische spines?	p. 9
2.3 Wat voor effect heeft LTD-inductie op microtubuli in de dendrieten?	p.20
3. Synaptisch transport langs microtubuli	p.27
3.1 Kinesines	p.27
3.2 KIF1B β	p.28
3.3 Neuroplasticiteit	p.36
4. Conclusie	p.37
Referenties	p.38

Samenvatting

Er is momenteel veel onderzoek naar microtubuli in synapsen. Hier geven wij een overzicht van wat er inmiddels bekend is als het gaat om de aanwezigheid en de functie van microtubuli in presynapsen, postsynapsen en synaptisch transport. Het blijkt dat in presynapsen nog geen belangrijke functie van microtubuli gevonden is, in tegenstelling tot de functie van microtubuli in synapsen. Postsynaptisch is er recent veel onderzoek gedaan naar microtubuli in spines. Deze blijken een belangrijke rol te vervullen bij synaptische plasticiteit. Ook wordt hier ingegaan op een belangrijk eiwit in synaptisch transport, namelijk het motoreiwit KIF1B β , dat van belang lijkt bij het vervoeren van CaM- en Arf-mRNA, eiwitten die een rol spelen bij synaptische plasticiteit. Al met al lijken microtubuli dus een niet te onderschatten rol te spelen bij synapsen en synaptische plasticiteit.

Introductie

Microtubuli zijn een van de drie hoofdcomponenten van het cytoskelet. Het zijn lange, moeilijk buigzame draden, opgebouwd uit een polymeer van tubuline-dimeren. Microtubuli zorgen met name voor de localisatie van organellen in de cel en langs microtubuli kan er transport plaatsvinden met behulp van motoreiwitten. In een cel als een neuron speelt het cytoskelet een zeer grote rol. Niet alleen moet de cel een zeer specifieke vorm behouden, ook moeten organellen op de juiste plek aanwezig zijn en zal er heel veel vervoer door de hele cel heen zijn. Microtubuli spelen in neuronen een zeer belangrijke rol in deze processen.

Naar de rol van microtubuli in synapsen wordt op dit moment veel onderzoek gedaan. Synapsen zijn de structuren van de cel waar het actiepotentiaal van de ene cel over wordt gedragen naar de volgende met chemische signalering met behulp van neurotransmitters. Hiervoor moeten zowel in de presynaps (de structuur die het signaal doorgeeft) als in de postsynaps (de structuur waar het signaal binnenkomt) veel componenten aanwezig zijn, zoals receptoren die de neurotransmitters kunnen ontvangen, of synaptische blaasjes die neurotransmitters bevatten en kunnen uitscheiden. Voor al dit transport worden microtubuli gebruikt.

Het blijkt dat neuronale contacten geen statisch, maar juist erg dynamisch systeem zijn. Verschillende inputs kunnen effect hebben op de morfologie van de verschillende synaptische structuren. De postsynaps van excitatorische synapsen blijkt vaak een soort uitstulping op de dendriet te zijn, ook wel dendritische spine genaamd. Verschillende types stimulering van de synaps kunnen leiden tot veranderende hoeveelheden receptoren in de postsynaps. Deze effecten worden ook wel Long term Potentiation (LTP) en Long Term Depression (LTD) genoemd, en zijn onderdeel van synaptische plasticiteit.

Om te begrijpen hoe microtubuli een rol kunnen spelen deze synaptische plasticiteit, is het handig om eerst te weten wat synaptische plasticiteit inhoudt. In het zenuwstelsel komen verschillende synapsen voor, exciterende en inhiberende. De exciterende synapsen bevinden zich meestal op spines. Eén vorm van veel voorkomende excitatorische synapsen zijn synapsen die signalen doorgeven door middel van de neurotransmitter Glutamaat. Glutamaat werkt op twee receptoren op de postsynaps, namelijk op de AMPA-receptor (AMPA) en op de NMDA-receptor (NMDAR). Naast deze twee zijn er nog meer glutamaatreceptoren, maar die spelen bij het bekendste mechanisme van synaptische plasticiteit en de mogelijke rol van microtubuli bij synaptische plasticiteit voor zover bekend geen rol. AMPAR is een receptor die, als glutamaat of een andere agonist (bijvoorbeeld AMPA) bindt, Na^+ doorlaat. NMDAR is een ionotropische (iondoorlatende) receptor die na binding van glutamaat of een agonist (bijvoorbeeld NMDA), Ca^{2+} kan doorlaten. Hiervoor is echter eerst enige mate van depolarisatie van het membraan nodig, zodat een Mg^{2+} blokkade in de NMDAR verwijderd kan worden. Hiervoor is het dus handig als bijvoorbeeld één synaps meerdere malen vuurt, of in de directe omgeving meer synaptische activiteit is.

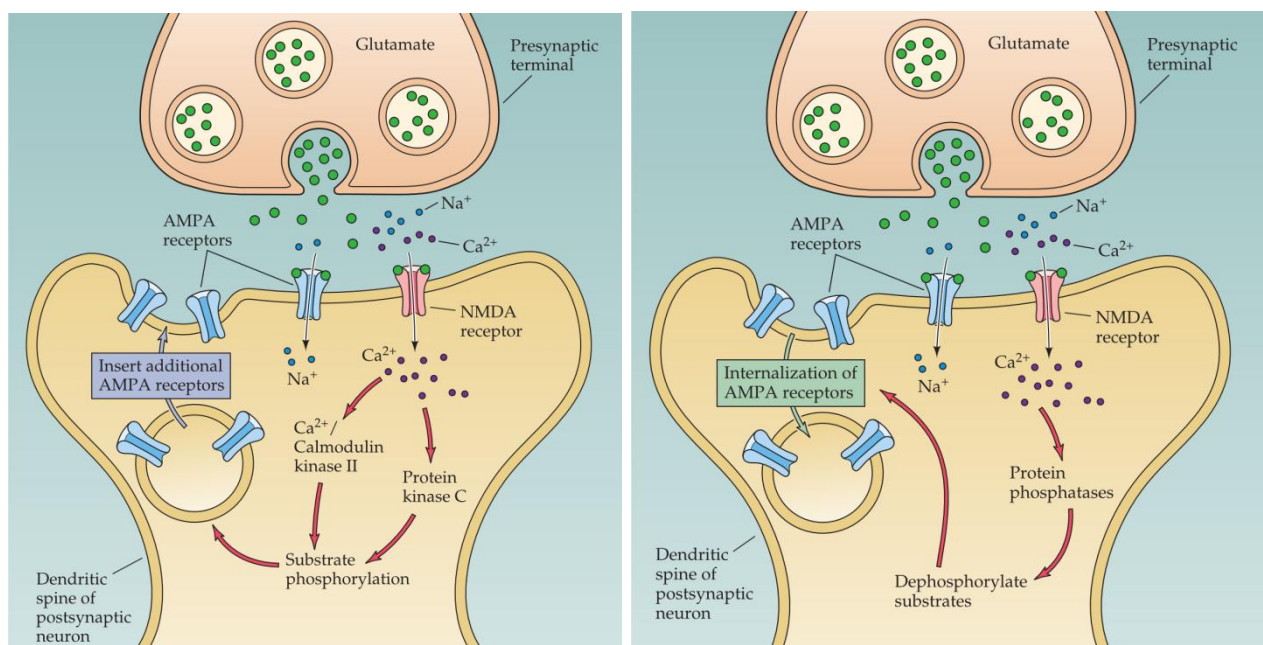
Long Term Potentiation (LTP), een effect wat leidt tot een versterkte 'band' tussen presynaps en postsynaps, kan geïnduceerd worden door een hoogfrequente stimulatie van de presynaps. Hierdoor wordt de AMPA-receptor geopend, en wordt door de flux van Na^+ de postsynaptische membraan gedepolariseerd. Dit kan zorgen voor opening van de NMDAR die zo Ca^{2+} kan doorlaten. Door de hoogfrequente stimulatie wordt er snel veel Ca^{2+} in de cel gelaten, wat zorgt voor een pathway, die waarschijnlijk via Calmoduline kinase II (CaMKII) en Protein Kinase C voor fosforylatie van bepaalde substraten zorgen, waardoor uiteindelijk extra AMPA-receptoren in het membraan gevoegd worden (*figuur 1-1, links*). Hierdoor reageert een synaps dus voor langere tijd sterker op eenzelfde signaal.

Long Term Depression (LTD) vindt plaats als een excitatorische glutamaatsynaps laagfrequent gestimuleerd wordt (ongeveer 1 Hz). Hierbij vindt, naast AMPAR-activatie, ook de acti-

vatie van de NMDA-receptor plaats, waardoor Mg^{2+} uit de NMDAR verwijderd wordt en Ca^{2+} de cel in kan stromen. Deze influx vindt echter langzamer plaats dan de Ca^{2+} -influx bij LTP, waardoor andere pathways in gang worden gezet. Deze pathways, die vermoedelijk via defosforylatie van substraten werken, zorgen voor uiteindelijke internalisatie van AMPA-receptoren (figuur I-1, rechts). Deze afname van AMPAR in de postsynaptische membraan zorgt dus voor een afgenomen reactie van de postsynaps op en presynaptisch signaal.

Op de lange termijn zijn er, met name bij LTP, extra AMPA-receptoren nodig op de spines. Deze AMPA-receptoren zijn afkomstig van gentranscriptie en translatie, en moeten dus op enige manier vanuit het cellichaam naar de synaps vervoerd worden. Hierbij spelen de groei van microtubuli en het transport via microtubuli een belangrijke rol. In dit essay zullen wij kijken naar de rol die microtubuli hebben in de pre- en postsynaps, het transport er naar toe en wat dit uiteindelijk voor effect kan hebben op de neuroplasticiteit.

Naar informatie uit Neuroscience, 5th edition, Purves et al, 2012, chapter 8, synaptic plasticity, en naar informatie uit The Cell, 5th edition, Alberts et al., 2008, chapter 16, the cytoskeleton.



Figuur I-1. Links: LTP wordt geïnduceerd door een hoogfrequente synapsstimulatie. Hierdoor worden AMPA-receptoren en NMDA-receptoren geopend, wat leidt tot een cytoplasmatische verhoging van Ca^{2+} . Dit heeft via verschillende pathways effect op de toevoeging van extra AMPA-receptoren op de celmembraan. Rechts: LTD wordt geïnduceerd door een laagfrequente synapsstimulatie. Via interne defosforylatie worden AMPA-receptoren geïnternaliseerd. Bron: Naar Neuroscience, 3th edition, Purves et al., 2004.

1. Microtubuli in de presynaps

De ontwikkeling van de presynaps blijkt een nog vrij onbekend onderwerp te zijn. Omdat er zo weinig over bekend is kan er weinig worden gezegd over een eventuele rol van microtubuli in het vormen van de presynaps. Het staat echter wel vast dat microtubuli een rol spelen in het vormen van boutons in *Drosophila*. Een bouton is een knopvormige aanzet van een axon. Deze eindigt in een synaps in relatie met een neuron, of, zoals in de hieronder besproken artikelen, in relatie met een spier in een *Neuromuscular Junction* (NMJ).

Meerdere eiwitten zijn ontdekt die rol spelen in het ontwikkelen van boutons met behulp van microtubuli in *Drosophila*. Een van die eiwitten is wingless. Wingless is deel van een pathway die een rol speelt in het ontwikkelen van synapsen. In een artikel van Claudia Miech *et al.* (2008) werd gekeken naar de rol van wingless in synapsontwikkeling. Dat werd onder andere gedaan met behulp van mutanten.

Nu is bekend dat in *wg* (het gen voor wingless) mutanten de regulatie van microtubuli gestoord is. Loops van microtubuli die ontstaan onder de invloed van futsch worden namelijk niet gevormd in *wg* mutanten doordat futsch niet goed verdeeld is. De microtubuli zijn hier ongebundeld in plaats van in een loop. Er werd onderzocht of in *arr* (arrow) mutanten ook sprake is van een andere verdeling van futsch. Futsch is een eiwit dat in *Drosophila* microtubuli bundelt door bindingen te vormen tussen de microtubuli. Het is het *Drosophila*-equivalent van MAP, een eiwit dat in andere hoofdstukken nog ter sprake zal komen.

In *figuur 1.1* is de verdeling van de futsch te zien in de boutons. Futsch is bij a, d, i en l in het paars weergegeven en in de rest in het wit. Het merkwaardige is dat bij arrowmutanten de verdeling van futsch in kleine boutons normaal is maar in grote boutons juist gestoord is.

De gestoorde verdeling van futsch in de boutons is echter te herstellen door expressie van *arrow* in de spiercellen van de NMJ. Het is dus vrij zeker dat *arrow* in ieder geval een rol speelt in de verdeling van futsch in grote boutons.

Het muteren van verschillende genen die betrokken zijn bij het vormen van boutons blijkt effect te hebben op de synaptische ontwikkeling en in dit proces lijken microtubuli een rol te spelen. Het blijkt dus dat in *Drosophila* microtubuli een effect hebben op het ontwikkelen van boutons. Dit proces is vergelijkbaar met het ontwikkelen van axonen, dus wellicht spelen microtubuli ook een rol in het vormen van axonen.

Nu zijn er meer eiwitten die een rol spelen in het vormen van boutons in *Drosophila*.

Het eiwit aPKC speelt een rol in het vormen van boutons in *Drosophila*. aPKC staat voor atypical protein kinase C. Het is een kinase dat op een andere manier wordt geactiveerd dan de meeste kinases. Het eiwit vormt een complex met twee andere eiwitten Par3 en Par6. Van dit complex is bekend dat het een rol speelt in het polariseren van cellen. Daar synapsen onderdeel van gepolariseerde cellen zijn werd gekeken of aPKC een rol speelt in synapsvorming.

In het onderzoek van Ruiz-Canada *et al.* (2004) werd gekeken waar aPKC voorkwam met behulp van fluorescente antilichamen tegen aPKC. HRP werd weer gebruikt om cellen zichtbaar te maken. Ook werden de microtubuli gekleurd met antilichamen tegen tubuline en werd gekeken naar de verdeling van futsch.

Het blijkt dat aPKC zowel post- als presynaptisch voorkomt, samen met tubuline en futsch.

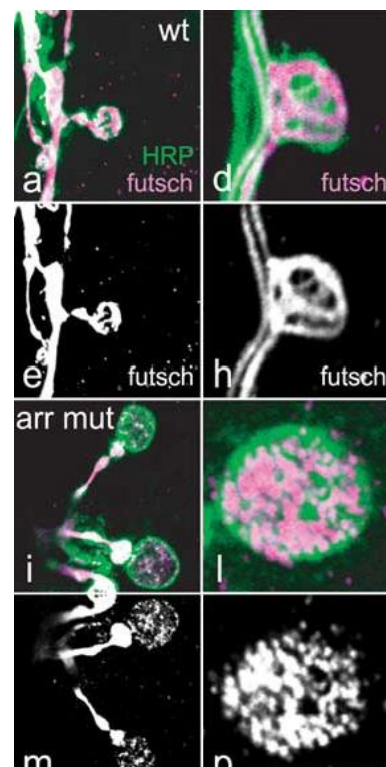


Fig 1.1: De lokalisatie van futsch in wildtypes (a,d,e,h) en in *arrow*-mutanten (i,l,m,p). Het is te zien dat in de *arrow*mutant de verdeling van futsch gestoord is en niet gekoppeld aan de microtubuli. Naar Claudia Miech *et al.*, 2008.

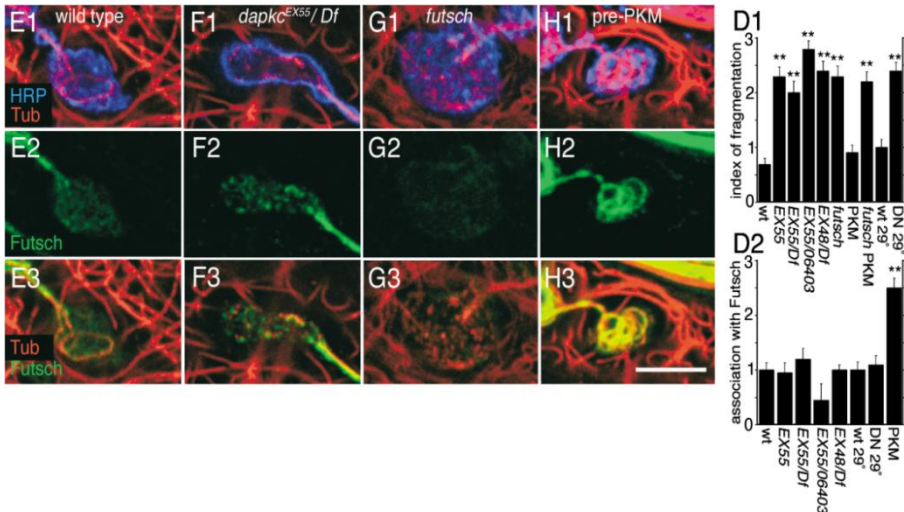
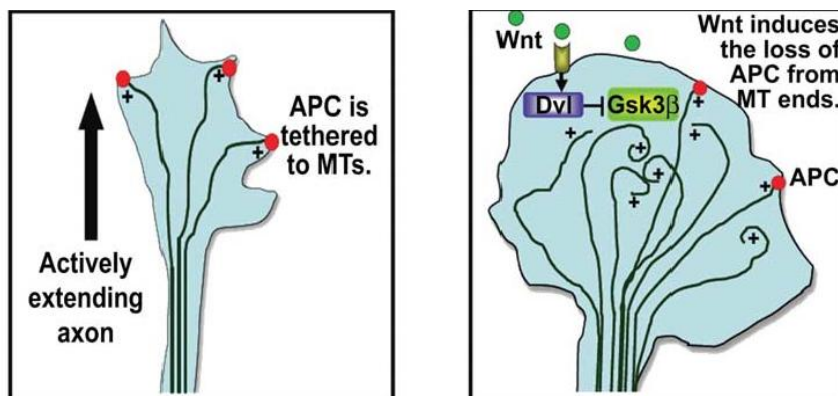


Fig 1.2: de verdeling van tubuline en futsch is te zien bij het wild type (E1-E2), bij een hypomorfe mutant (F1-F3), een *futsch* mutant (G1-G3) en een mutant waarbij aPKC altijd aanstaat (H1-H2). In D1 is de mate van fragmentatie te zien en in D2 de associatie met Futsch. Naar Catalina Ruiz-Canada et al., 2004

Vervolgens werd gekeken naar de verdeling van microtubuli en futsch bij mutanten. In *figuur 1. 2* zijn opnames van een fluorescentiemicroscop te zien. In E1-3 is het wildtype te zien. In F1-3 een hypomorfe (loss of function) mutant, in G1-3 is een *futsch* mutant te zien en in H1-3 een pre-PKM mutant, bij deze mutant staat het aPKC complex in de presynaps altijd aan. In D1 is de fragmentatie-index te zien voor elke mutant, ofwel hoe zeer de microtubuli zijn gefragmenteerd. In D2 is de mate van associatie van microtubuli met futsch.

Het wildtype heeft een duidelijk zichtbare loop en futsch zit rond tubuline in de bouton. Bij de hypomorfe mutant is te zien dat de microtubuli veel meer gefragmenteerd zijn. Futsch is minder diffuus aanwezig. Bij de *futsch* mutant zijn de microtubuli gefragmenteerd, futsch is uiteraard nauwelijks aanwezig. Bij de pre-PKM mutant zijn meer microtubuli aanwezig dan bij het wildtype en de hypomorfe mutant. Deze resultaten suggereren dat aPKC een stabiliserende werking heeft op de microtubuli.

In een ander onderzoek door Purro *et al.* in 2008 werd een rol gevonden van microtubuli in het vormen van axonen in zoogdieren. Dit had opnieuw te maken met wingless, in dit geval het eiwit Wnt3a, een eiwit in de pathway van wingless. Wnt3a receptoren op synapsen worden geactiveerd. Hierdoor wordt het eiwit dishevelled (Dvl.) geactiveerd dat de transcriptie van Gsk3 β remt, een kinase. Daarnaast zorgt Dvl. voor een accumulatie van β -catenine. Dit zorgt ervoor dat APC loslaat van de plusuiteindes van microtubuli, zoals te zien in de figuur hiernaast. Het APC eiwit is een eiwit dat microtubuli bindt aan het membraan van cellen. APC staat voor Adenomatous Polypsosis Coli, een vorm van darmkanker. APC laat los van de uiteindes van de microtubuli onder invloed van wingless waardoor de microtubuli kunnen lopen.



Figuur 1.3: In de figuur is te zien hoe microtubuli (MT's) worden verankerd aan APC's en hoe wingless dit beïnvloedt. Naar Purro et al., 2008.

Dit is nogmaals weergegeven in *figuur 1.3*. Het loslaten van microtubuli van APC's zorgt uiteindelijk voor een grotere growth cone en dus een sneller groeiend axon. Een growth cone is een kegelvormige structuur aan het uiteinde van een axon dat bestaat uit een kegel van actine met daarachter microtubuli die stoffen vervoeren.

Het artikel bevestigt dat microtubuli een rol spelen in axonen. Dit suggereert ook dat de processen in boutons en axonen vergelijkbaar zijn.

Microtubuli spelen dus een rol in het vormen van axonen, maar ook in het vormen van boutons in *Drosophila*. De microtubuli staan onder invloed van verschillende eiwitten die ze kunnen stabiliseren of destabiliseren en dit heeft invloed op de morfologie en ontwikkeling van axonen, boutons en uiteindelijk ook synapsen. Direct effect van microtubuli op presynapsen is echter nog niet aangetoond.

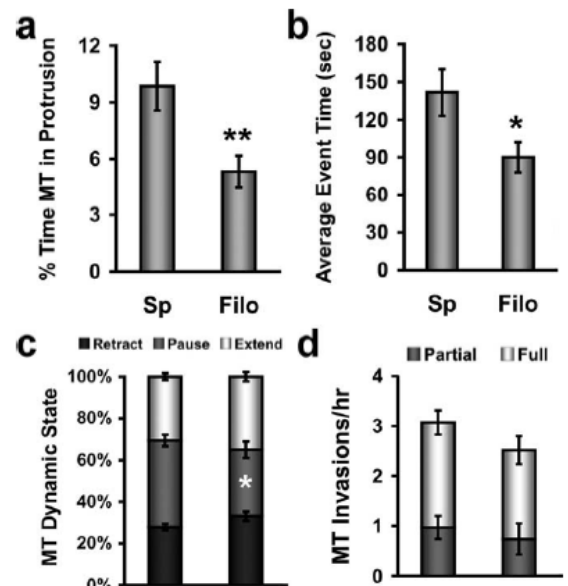
2. Microtubuli in de postsynaps en dendritische spines

2.1 Gaan microtubuli de dendritische spines in?

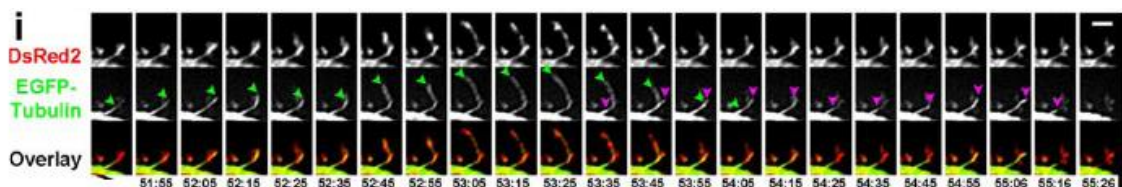
De eventuele aanwezigheid van microtubuli in de dendritische spines is onderzocht door Hu *et al* (2008). Zij hebben ontdekt dat microtubule bestaan in dendritische spines en dat ze snel en tijdelijk in dendritische protrusies (uitstulpsels op een dendriet zoals spines of filopodia) polymeriseren gedurende de hele levensduur van corticale en hippocampale neuronen. Dit was het eerste onderzoek dat duidelijk liet zien dat microtubuli binnendringen in dendrieten. Er is dit onderzoek nog meer gebleken over het moment waarop dit gebeurt en er is gespeculeerd over de functie van microtubule in dendrieten.

Over de functie van microtubuli in dendritische protrusies valt iets meer te zeggen als je weet in wat voor protrusies ze binnendringen. Ze zijn ontdekt in dendritische spines en filopodia, en bleken het meest en het langst aanwezig zijn in dendritische spines. De onderzoekers kwamen tot de conclusie dat de reden dat microtubuli langer in spines zitten is dat ze daar langer pauzeren (dus niet groeien of krimpen) dan in filopodia (Figuur 2.1.1) De resultaten suggereren dat microtubuli dus een functie hebben in de spines, maar dit sluit niet uit dat microtubuli door binnen te dringen in filopodia kunnen zorgen voor het veranderen van filopodia naar spines (Hayashi and Majewska, 2005; Alvarez and Sabatini, 2007; Bourne and Harris, 2007; Harms and Dunaevsky, 2007).

Microtubuli dringen telkens een paar seconden binnen in een protrusie en depolymeriseren er vervolgens weer uit. De onderzochte cellen zijn een uur lang bekeken en er is ontdekt dat op moment dat de tijd werd stilgezet en gekeken werd naar de hoeveelheid protrusies die binnengedrongen zijn, maar een klein percentage van de protrusies een microtubule bevatten. Als er echter gekeken werd naar het hele uur waren bijna alle protru-



Figuur 2.1.1, microtubuli blijven langer en pauzeren langer in spines dan in stabiele filopodia. **A:** Meting van percentage van de tijd dat een microtubule in een spine en in een filopodia. **B:** Gemiddelde tijd dat een spine en een filopodia binnengedrongen worden door een microtubule. **C:** Percentage van de tijd waarin microtubuli in spines en filopodia korter worden, langer worden of pauzeren. **D:** Aantal keren dat een spine of filopodia wordt gedeeltelijk of geheel wordt binnengedrongen door een microtubule in een uur (Naar Hu *et al.*, 2008).



Figuur 2.1.2: Time-lapse van een stukje dendriet met protrusie in het vierkantje, het rode en het paarse pijltje geven de plus-tip van een microtubule aan. De tijd in minuten staat onder de time Lapse aangegeven. Twee microtubuli kunnen een spine binnendringen en daar een transient spine-head protrusion (tSHP) induceren. De eerste microtubule die binnendringt (groene pijltje) in de spine zorgt voor een tSHP (52:45–53:55 minuten). Op moment dat de tweede microtubule (paarse pijltje) binnendringt in de spine depolymeriseert de eerste weer (53:35–55:06 minuten) (Naar Hu *et al.*, 2008).

sies meerdere keren een aantal minuten binnengedrongen door een microtubule (*Figuur 2.1.2*). Het is ook belangrijk om te weten dat microtubuli soms zorgen voor een morfologische verandering door middel van een Transiënt Spine-head Protrusion (tSHP), zoals te zien in *figuur 2.1.2*. Als de microtubule verder gaat dan het uiteinde van een protrusie en de protrusie dus als het ware uitrekt spreek je van een tSHP.

Er is ook aangetoond dat microtubuli meer spines binnendringen als synaptische activiteit globaal geactiveerd wordt door KCl, waardoor LTP (uitgelegd in de introductie) wordt geïnduceerd. Door toevoeging van KCl drongen microtubule langer en meer dan twee keer zo vaak binnen in protrusies.

Microtubule in dendritische protrusies hebben waarschijnlijk een functie anders zou het aantal microtubule hierin niet verhogen bij meer activiteit. Er wordt gespeculeerd dat het tijdelijke binnendringen van microtubuli zou kunnen duiden op een functie bij het afleveren van materiaal aan ontwikkelende en ontwikkelde dendritische spines. Het is namelijk al bekend dat microtubule materiaal transporteren van het cel-lichaam naar perifere processen. Er is ook bewezen dat microtubuli spines binnengaan van distale en proximale kant, wat er op duidt dat transport van materiaal van zowel andere spines en het cellichaam naar de doelspine kan worden getransporteerd.

2.2 Wat voor effect hebben microtubuli in dendritische spines?

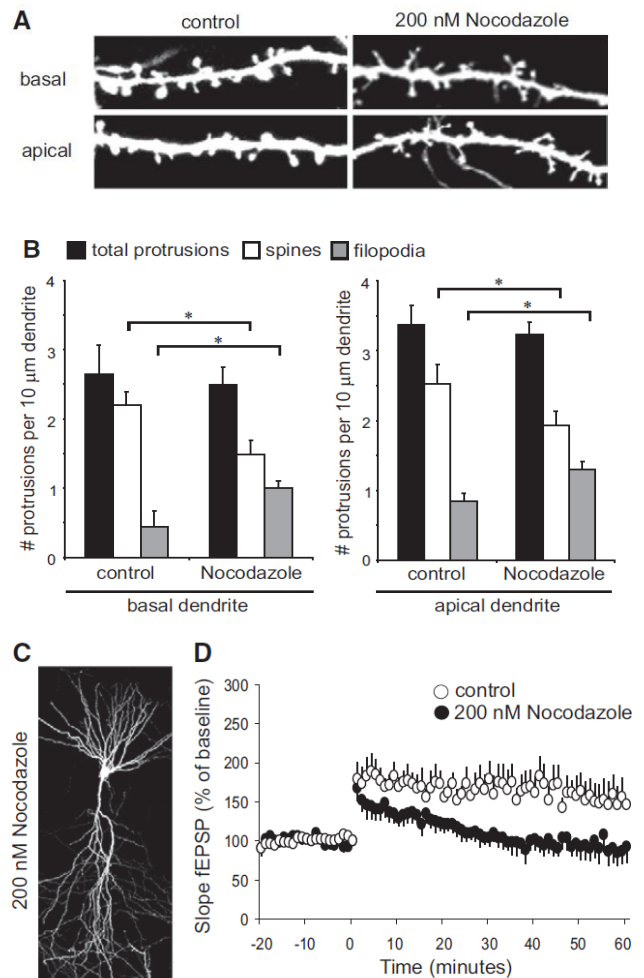
Er zijn meerdere onderzoeken uitgevoerd om erachter te komen wat voor effect MTs hebben in dendritische spines. Zo hebben *Jaworski et al* verschillende onderzoeken uitgevoerd. [Jaworski et al]

Dynamische microtubuli hebben effect op de vorm en plasticiteit van dendritische spines

Allereerst is uitgezocht of MTs daadwerkelijk effect hebben op de morfologie en plasticiteit van spines. Daarvoor is nocodazole toegevoegd aan cellen van de hippocampus van jonge ratten. Deze stof inhibeert de dynamische activiteit van MTs en zorgt ervoor dat EB3 niet kan binden. Cellen werden getransfecteerd met GFP (gekoppeld aan metaal met daaraan een plasmide) om te celstructuur zichtbaar te maken, en vervolgens 4 uur lang met nocodazole behandeld. Hierna werd er gekeken of de vorm van de spines veranderd was.

Er is een duidelijk verschil zichtbaar tussen de controle en de behandelde cellen. In de behandelde cellen nam het aantal spines af en ontstonden er juist filopodia-achtige structuren (zie fig. 2.2.1A). Het totaal aantal protrusies (uitsteeksels op de dendriet zoals spines, filopodia, etc) nam echter niet af (fig. 2.2.1B). De dendriet-breedte, omtrek of lengte nam ook niet af (zie fig. 2.2.1C). Hieruit kan geconcludeerd worden dat MTs effect hebben op de vorm van dendritische spines.

Verder is er gekeken naar de plasticiteit van de spines. Hiervoor is gekeken naar de synaptische respons van spines die wel of niet met nocodazole behandeld waren. Men heeft high-frequentie stimulation toegepast op neuronen, waarvan sommigen tot 2 uur behandeld waren met nocodazole. Hoe langer de cellen behandeld waren met nocodazole, hoe slechter ze zich konden aanpassen aan high-frequentie stimulation (zie fig. 2.2.1D). Na 2 uur behandeling met nocodazole pasten de cellen zich nagenoeg niet aan. Hieruit kan geconcludeerd worden dat MTs een positief effect hebben op de plasticiteit van dendritische spines.



Figuur 2.2.1.

(A) Representatieve afbeeldingen van basale en apicale CA1 pyramidale neuronen van de hippocampus. Genomen van p7 ratten, getransfecteerd met GFP en 4 uur lang behandeld met 200 nM Nocodazole.

(B) Kwantificatie van het aantal protrusies per μm apicale of basale neuron behandeld als in (A). Het histogram laat het gemiddelde zien ± SEM (standard error of mean), *p < 0.05.

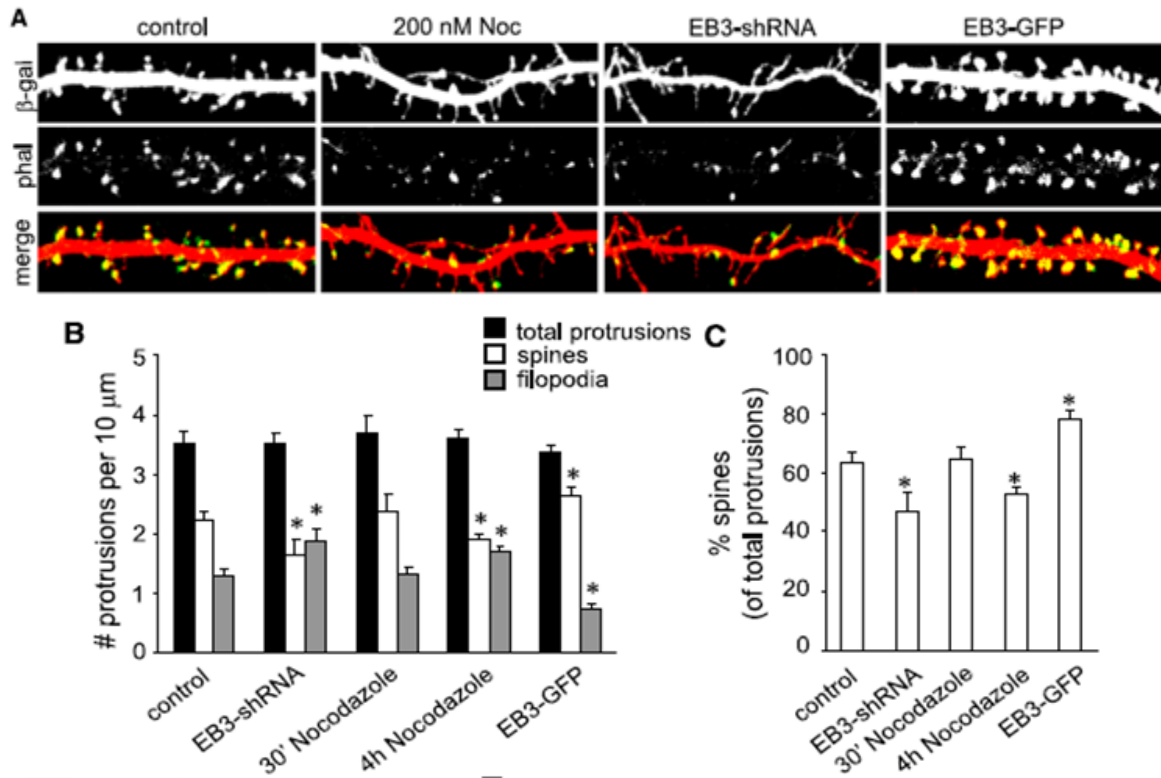
(C) Representatieve afbeelding van een neuron gelijk aan die in (A).

(D) Hippocampal LTP geïnduceerd door high-frequentie stimulation. Muizen hippocampal slices zijn behandeld met vehicle (controle) of 200 nM nocodazole gedurende 1 uur voor en gedurende de meting. Vervolgens zijn de fEPSPs gemeten.

EB3 depletie leidt tot een afname van spines

Het effect van Nocodazole kan wellicht toegeschreven worden aan het feit dat EB3 niet meer bindt aan de +tip van microtubuli. Om dat te onderzoeken is RNA interferentie (RNAi) gebruikt om het EB3 van de cel te onderdrukken. Het effect van transfectie met EB3-shRNA is gelijk aan dat van een nocodazole behandeling: het aantal spines neemt af en het aantal filopodia-achtige structuren neemt toe (zie fig. 2.2.2A-B).

Bij overexpressie van EB3-GFP nam het aantal spines juist toe en het aantal filopodia-achtige structuren af (zie fig 2.2.2A-B). Als deze met EB3-GFP behandelde cellen vervolgens behandeld werden met nocodazole verdwenen alle spines weer, wat erop duidt dat de binding van EB3 aan MTs noodzakelijk is voor het groeien van MTs.



Figuur 2.2.2A-C

(A) Zeer vergrootte afbeeldingen van dendrieten van neuronen van de hippocampus, getransfecteerd op DIV 13 voor 4 dagen met de controle pSuper vector, EB3-shRNA, EB3-GFP of 4 uur lang behandeld met 200 nM nocodazole. Gelabeld met Phalloidin-A594 en co-getransfecteerd β -gal (rood) om de neuronale morfologie zichtbaar te maken.

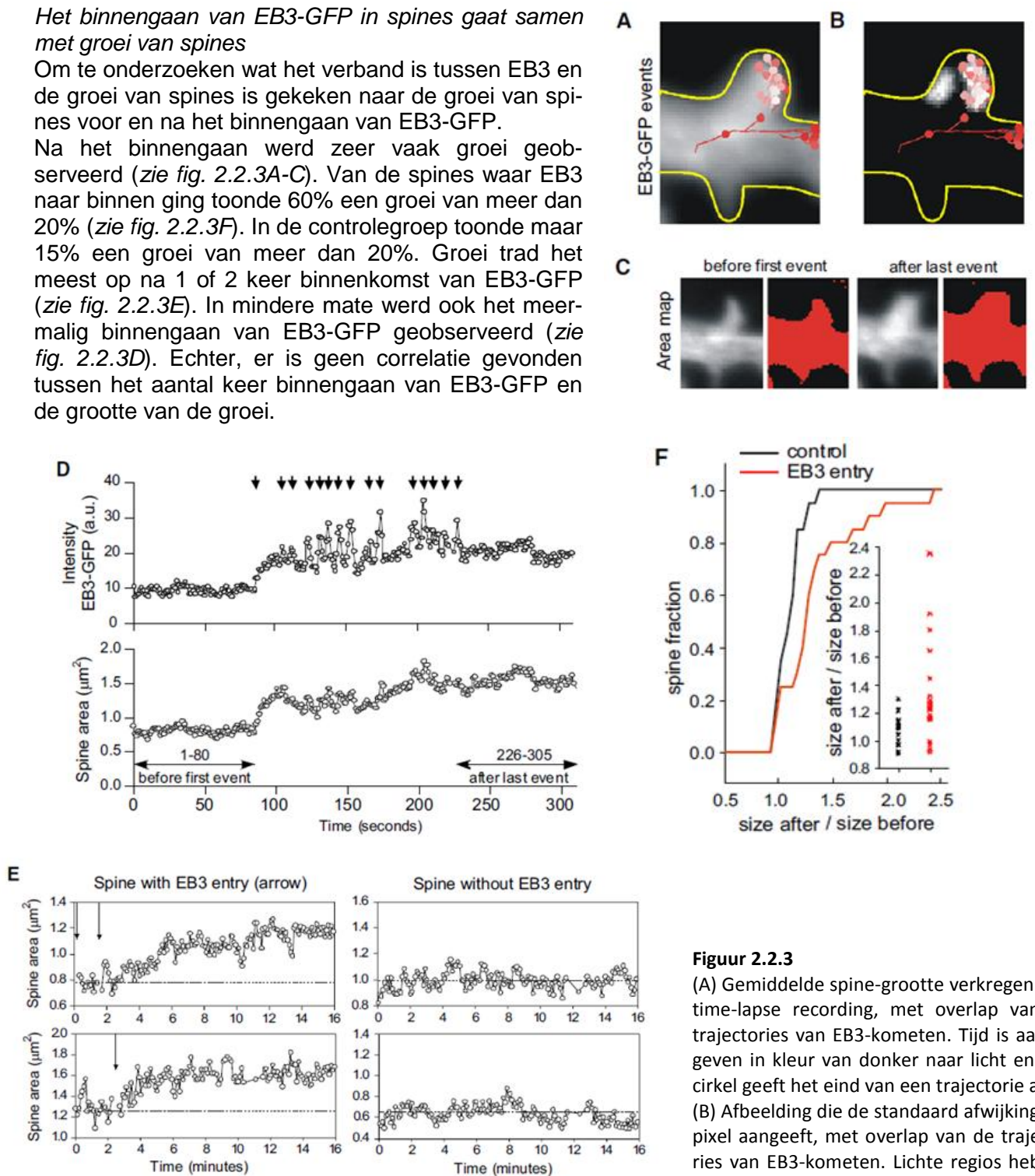
(B) Kwantificatie van het aantal protrusies per 10 μm dendriet van neuronen van de hippocampus behandeld als in (A) of 30 minuten behandeld met 200nM nocodazole.

(C) Het percentage spines van neuronen van de hippocampus behandeld als in (B).

Het binnengaan van EB3-GFP in spines gaat samen met groei van spines

Om te onderzoeken wat het verband is tussen EB3 en de groei van spines is gekeken naar de groei van spines voor en na het binnengaan van EB3-GFP.

Na het binnengaan werd zeer vaak groei geobserveerd (zie fig. 2.2.3A-C). Van de spines waar EB3 naar binnen ging toonde 60% een groei van meer dan 20% (zie fig. 2.2.3F). In de controlegroep toonde maar 15% een groei van meer dan 20%. Groei trad het meest op na 1 of 2 keer binnenkomst van EB3-GFP (zie fig. 2.2.3E). In mindere mate werd ook het meermalig binnengaan van EB3-GFP geobserveerd (zie fig. 2.2.3D). Echter, er is geen correlatie gevonden tussen het aantal keer binnengaan van EB3-GFP en de grootte van de groei.



Figuur 2.2.3

(A) Gemiddelde spine-grootte verkregen met time-lapse recording, met overlap van de trajectories van EB3-kometen. Tijd is aangegeven in kleur van donker naar licht en een cirkel geeft het eind van een trajectorie aan. (B) Afbeelding die de standaard afwijking per pixel aangeeft, met overlap van de trajectories van EB3-kometen. Lichte regio's hebben variërende intensiteiten

door bewegende EB3-kometen of groei van de spine.

(C) Kwantitatieve veranderingen in spinegrootte. De gemiddelde spine grootte 80 frames voor/na het eerste/laatste binnengaan van EB3-komeet.

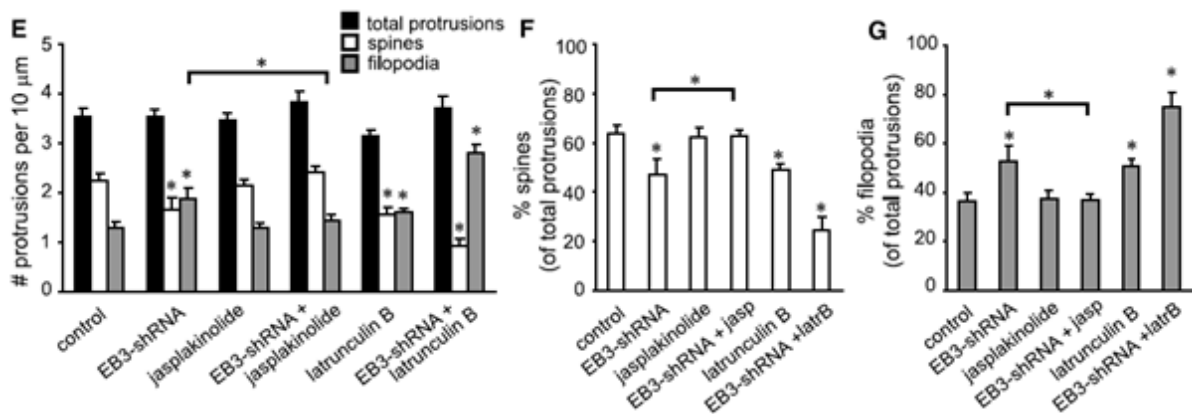
(D) Tijdslijn van totale intensiteit (bovenste paneel) of grootte (onderste paneel) van spines voor 300 sec. Er is elke seconde een foto gemaakt. Pijlen geven de binnenkomst van EB3-kometen aan.

(E) Voorbeelden van spine groei na de binnenkomst van een EB3-komeet. Representatieve tijdslijnen met (links) of zonder (rechts) binnenkomst van een EB3-komeet voor 16 minuten. Een pijl geeft binnenkomst van een EB3-komeet aan. Er is elke 2 seconden een foto gemaakt. Van elke drie opeenvolgende beelden is het gemiddelde genomen om een beter overzicht te creëren.

EB3 reguleert de dynamiek van actine in spines.

Nu is de vraag natuurlijk: via welk mechanisme heeft EB3 effect op de spines? In veel systemen reguleren +TIPs het modelleren van actine. Actine bestaat uit lange filamenten (F-Actine) die zeer dynamisch zijn. Deze filamenten bestaan uit monomeren (G-Actine). Het aan of afbouwen van G-actine zorgt voor het groeien en krimpen van de filamenten. Bepaalde stoffen kunnen hier invloed op hebben. Zo zorgt latrunculin B ervoor dat er meer G-actine (in verhouding tot F-actine) is, terwijl jasplakinolide ervoor zorgt dat er in verhouding meer F-actine is.

Om te onderzoeken of EB3 de dynamiek van actine in spines reguleert (en dus de vorm van spines), zijn controlecellen en EB3-knockdown cellen behandeld met de twee eerder genoemde stoffen. Cellen die getransfecteerd waren met EB3-shRNA en behandeld werden met latrunculin B toonden een sterke afname in het aantal spines en een toename in het aantal filopodia-achtige structuren (zie fig. 2.2.4E-G). Dit effect was minder sterk zichtbaar bij EB3-knockdown cellen zonder behandeling met latrunculin B en controle cellen. EB3-knockdown cellen die behandeld werden met jasplakinolide kregen juist weer meer spines en minder filopodia-achtige structuren vergeleken met onbehandelde EB3-knockdown cellen. Een toename van F-actine zorgt dus voor herstel van het effect van EB3-knockdown, terwijl een afname van F-actine zorgt voor hetzelfde effect als een EB3-knockdown. Dit duidt erop dat EB3 normaal gesproken effect heeft op de dynamiek van actine in spines, en zo ook wellicht op de vorm van de spines.



Figuur 2.2.2E-G

(E) Kwantificatie van het aantal protrusies per 10 μm van dendrieten van neuronen van de hippocampus, getransfecteerd op DIV13 met controle pSuper vector of EB2-shRNA, en onbehandeld of behandeld met of 10 μM Jasplakinolide of met 10 μM Latrunculing B voor 2 uur.

(F en G) Het percentage spines (F) en filopodia (G) in neuronen van de hippocampus getransfecteerd en behandeld als in (E).

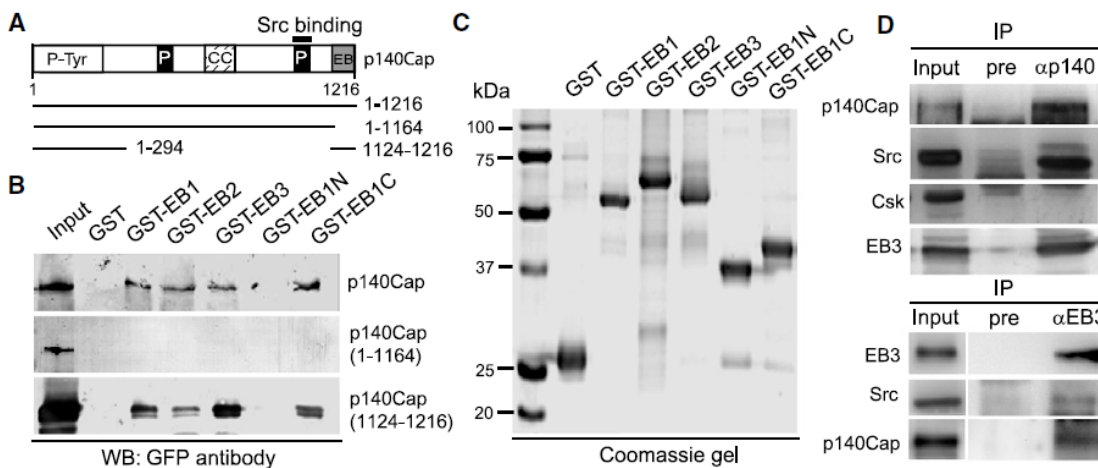
Nu rijst echter de vraag hoe EB3 effect heeft op actine. Om dit de onderzoeken is er gezocht naar eiwitten die binden aan EB3 met behulp van een glutathione S-transferase (GST) pull-down assay met extracten van neuronen van de hippocampus (DIV 21). Uit dit onderzoek kwamen veel +TIP bindende eiwitten. Echter, als verrassend eiwit werd p140Cap gevonden.

P140Cap en EB3

P140Cap is een src-bindend eiwit dat onder andere actine reguleert. Aan het gebruikte p140Cap is aan de N-terminus GFP geplaatst zodat het eiwit gevolgt kan worden op gel. Om de binding tussen EB3 en p140Cap te bevestigen en zeker te stellen dat het niet om binding met GFP gaat zijn pull down assays uitgevoerd met extracten van cellen die alleen GFP of GFP-p140Cap aanmaakten en verschillende leden van de EB familie. Hieruit kwam dat GFP niet bindt aan GST of EB, maar dat p140Cap slechts bindt aan EB.

Om uit te vinden welke onderdelen van p140Cap en EB binden, zijn meerdere pull-down assays uitgevoerd met verschillende leden uit de EB familie (EB1, EB2, EB3), verschillende onderdelen van de EB familie (N-terminus en C-terminus), en verschillende vormen van p140Cap (zie fig. 2.2.4A).

In figuur 2.2.5B is te zien dat p140Cap bindt aan alle leden van de EB familie en aan de aparte C-terminus, maar niet aan GST en ook niet aan de N-terminus van EB. Dit duidt erop dat p140Cap bindt aan de C-terminus van EB. Verder is te zien dat het deel van p140Cap van aminozuur 1 tot 1164 nergens aan bindt, terwijl aminozuur 1124 tot 1216 overal aan bindt waar ook het normale p140Cap aan bindt. Dit duidt erop dat het EB-bindingsdomein van p140Cap op de aminozuren van nummer 1124 tot 1216 ligt (zie fig. 2.2.4B-C). Om zeker te stellen dat p140Cap en EB3 ook binden onder fysiologische omstandigheden, is coimmunoprecipitatie uitgevoerd (zie fig. 2.2.4D). Hieruit bleek dat deze twee stoffen inderdaad binden, en dat p140Cap ook kan binden met src-kinase (zoals verwacht).



Figuur 2.2.4A-D

(A) Diagram van de p140Cap structuur en mutante constructen. GFP is aan de N-terminus gekoppeld. P-Tyr, een strook gefosforyleerde tyrosine residuen; P, proline rijk domein; CC, coiled coil; EB, minimaal EB-bindend domein. Het tweede proline rijke domein bindt Src.

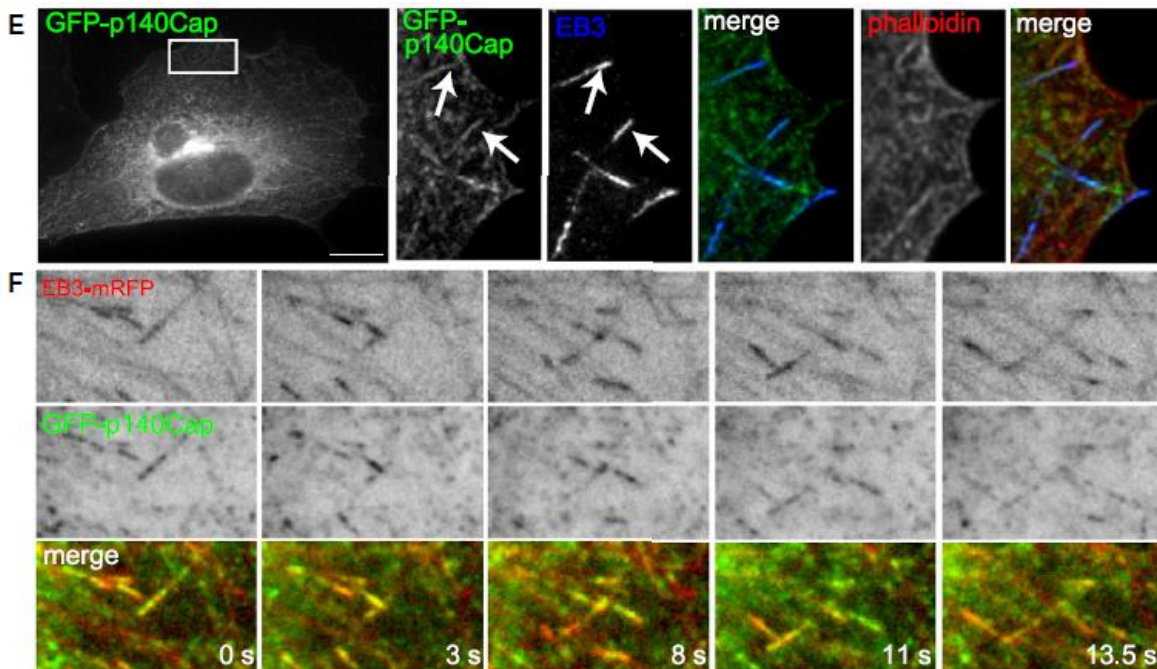
(B) GST pull-down assay met de aangegeven GST fusies en extracten van HEK293 cellen die overexpressie van een van de volgende eiwitten vertoonden: GFP-p140Cap, GFP-p140Cap(1-1164), of GFP-p140Cap(1124-1216). GFP fusies werden gedetecteerd m.b.v. western blotting met antilichamen tegen GFP.

(C) Gels gekleurd met Coomassie voor de GST fusies.

(D) Immunoprecipitatie van ruwe muizen synaptosomen met anti-p140Cap of anti-EB3 antilichamen en pre-immuun serum als negatieve controle. Drie milligram van de synaptosomale fractie (input: 50 µg) is geimmunoprecipiteerd en m.b.v. western blotting voor de aangegeven eiwitten geanalyseerd.

Om te localisatie van p140Cap te onderzoeken in niet-neuronale cellen zijn cellen getransfecteerd met GFP-p140Cap (groen), of gekleurd voor endogeen EB3 (blauw) of F-actine (rood). In *fig 2.2.4E* is te zien dat GFP-p140cap zich verspreid door het cytoplasma. Ook is colokalisatie met EB3 te zien in komeet-achtige structuren, wat duidt op groeiende MT-uiteinden. Als laatste is een lichte colokalisatie met actine te zien.

Om te bevestigen dat p140Cap een interactie aan gaat met groeiende MT-uiteinden is een simultaneous dual color live imaging uitgevoerd met GFP-p140cap en EB3-mRFP (*zie fig 2.2.4F*). GFP-p140Cap colokaliseerde met EB3-mRFP in komeetachtigestructuren, wat erop duidt dat p140cap zich kan gedragen als +TIP.



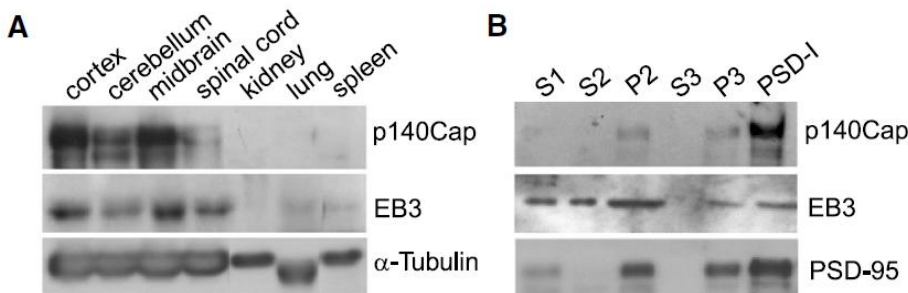
Figuur 2.2.4E,F

(E) COS-7 cellen zijn getransfecteerd met GFP-p140Cap (groen), gefixeerd met methanol, en gekleurd voor endogeen EB3 (blauw) of F-actine m.b.v. phalloidine-A594 (rood). De rechthoeken rechts geven een vergroting van het omliggende vierkantje in de linker rechthoek. De schalingslijn is 10 μm .

(F) Gelijktijdige beelden van GFP-p140Cap en EB3-mRFP in getransfecteerde MRC5-SV cellen. De afbeeldingen volgen elkaar op in tijd. Tijdsindicatie is in de merge gegeven.

In neuronen van de hippocampus lokaliseert p140Cap in synapsen

Met behulp van een Western Blot is aangetoond dat EB3 en p140cap voornamelijk voorkomen in het centrale zenuwstelsel en in de hersenen (*zie fig 2.2.5A*). Met behulp van een immunoblot werd gekeken naar de localisatie van p140cap is de Post Synaptic Density (PSD). Hierin is te zien dat p140cap mooi localiseert bij de PSD (*zie fig. 2.2.5B*).

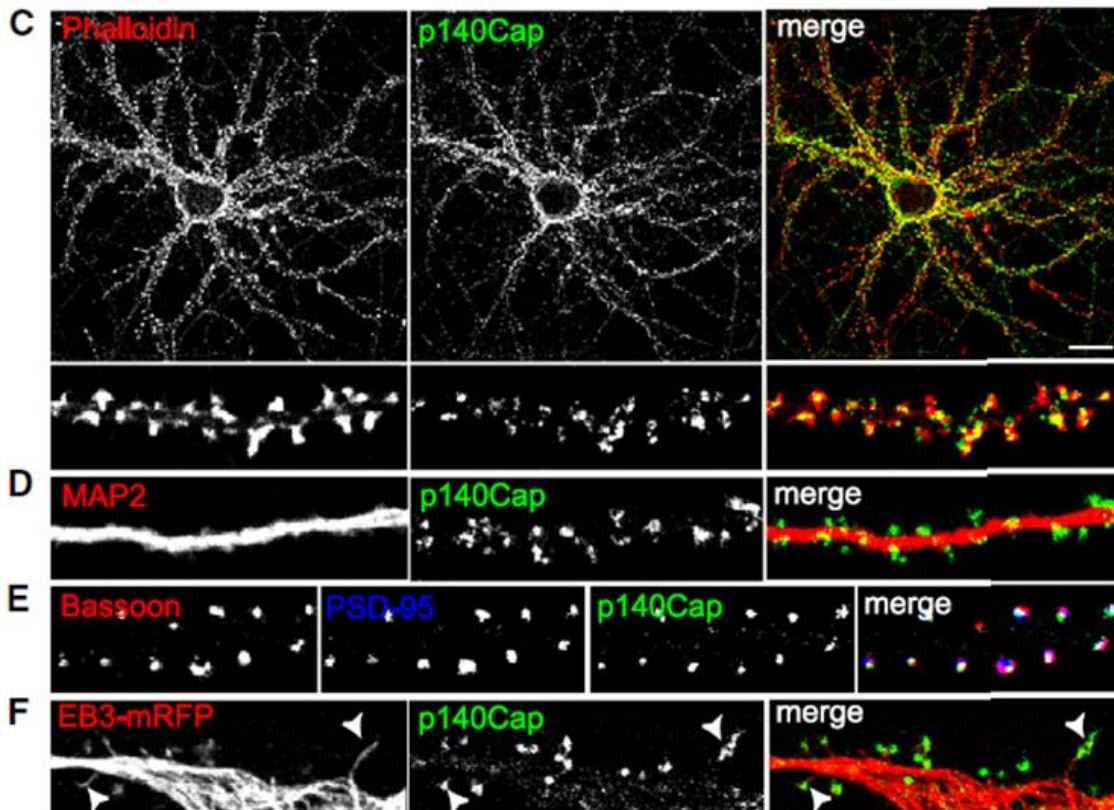


Figuur 2.2.5A-B

(A) Weefsel expressie van p140Cap. Muizen weefsel homogenates zijn geanalyseerd met SDS-PAGE en immunoblotting waarbij anti-p140Cap en anti-EB3 antilichamen gebruikt zijn. A-tubuline is gebruikt als ladingscontrole.

(B) Verrijking van p140Cap in de PSD fractie. Neuronen van de hippocampus zijn gehomogeniseerd op DIV21, gefractioneerd door differentiële centrifugatie, en geanalyseerd met immunoblotting waarbij anti-p140Cap, anti-EB3 en anti-PSD-95 antilichamen gebruikt zijn.

Met behulp van immunofluorescente kleuring is op verschillende manieren gekeken naar de lokalisatie van p140Cap en verschillende andere eiwitten (zie fig. 2.2.5C-F). In fig. 2.2.6C is te zien dat p140Cap colocaliseert met F-actine-rijke dendritische spines. Het p140Cap kwam niet alleen maar voor in het 'hoofd' van de spine, maar ook in de 'nek'. In fig. 2.2.6D is de zien dat p140Cap bijna niet voorkomt in de shaft van de dendriet, en dus niet colocaliseert met MAP2. In fig. 2.2.6E is gekleurd op een presynaptisch eiwit (bassoon) en een eiwit dat voorkomt in de PSD (PSD-95). Er was veel overlap tussen p140Cap en deze twee eiwitten. In fig. 2.2.6F is verrassend weinig overlap tussen EB3 en p140Cap te zien. Echter, er is wel enkele overlap tussen deze twee eiwitten te observeren in de spines. Alle bovenstaande observeringen geven aan dat p140Cap voornamelijk voorkomt in en rondom synapsen.



Figuur 2.2.5C-F

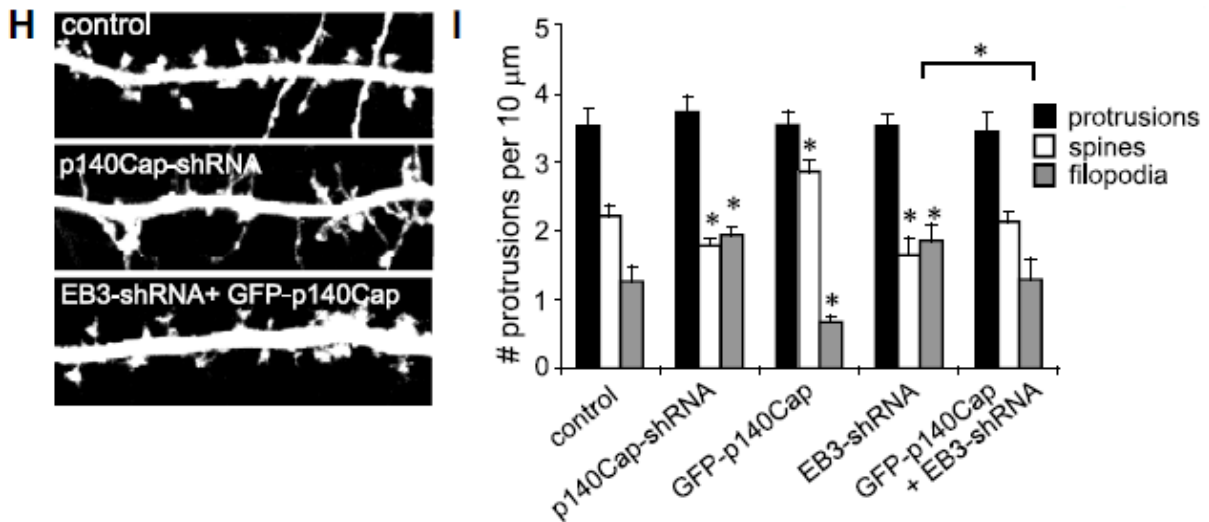
(C) Representatieve beelden van neuronen van de hippocampus van ratten (DIV17), gelabeld met konijnen anti-p140Cap antilichamen (groen) en phalloidin-A594 (rood) om F-actine de visualiseren. Dendritische segmenten (onderste panelen) zijn vergroot om de colocalisatie van p140Cap en F-actine in spines te laten zien. Schalingslijn is 10 μ m.

(D) Dendrieten van de hippocampus gelabeld met konijnen anti-p140Cap antilichaam (groen) en muizen anti-MAP2 (rood).

(E) Dendrieten van de hippocampus driedubbel gelabeld met konijnen anti-p140Cap antilichaam (groen), cavia anti-PSD-95 antilichaam (blauw), en muizen anti-Bassoon (rood).

(F) Neuronen van de hippocampus getransfecteerd op DIV13 met EB3-mRFP en gelabeld met muizen anti-p140Cap (rood). Een pijl indiceert colocalisatie tussen p140Cap en EB3-mRFP.

In afwezigheid van p140Cap wordt een vermindering in de hoeveelheid spines geobserveerd. Als p140Cap voorkomt in dendritische spines, heeft het dan ook invloed op de morfologie? Om dit te onderzoeken zijn door middel van RNAi knockdown cellen gemaakt die geen endogeen p140Cap tot expressie brachten. In de knockdown cellen werd een verlies van spines geobserveerd, er ontstonden meer filopodia-achtige structuren, maar de totale hoeveelheid protrusies veranderde niet (zie fig. 2.2.5H-I). Dit is hetzelfde als bij de EB3-knockdown cellen. Overexpressie van GFP-p140Cap had een tegenovergesteld effect: er ontstonden juist meer spines en er verdwenen filopodia-achtige structuren. Deze waarnemingen duiden erop dat p140Cap invloed heeft op de stabiliteit van spines.



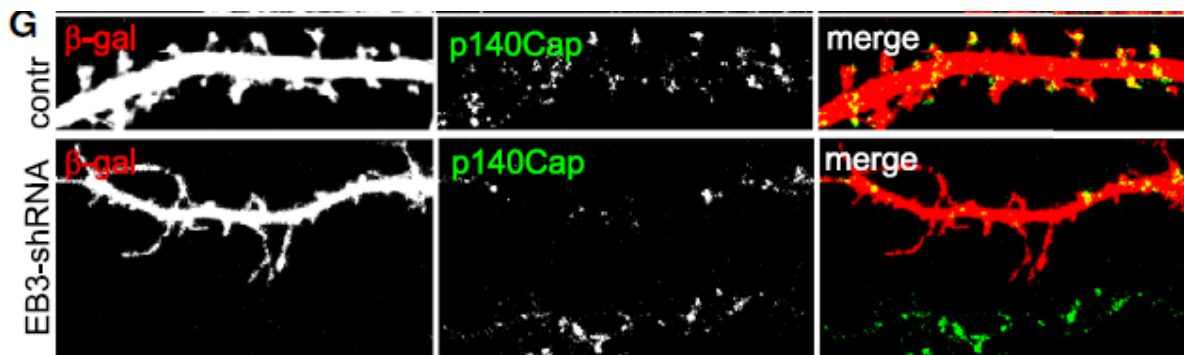
Figuur 2.2.5H-I

(H) Representatieve beelden van neuronen van de hippocampus getransfecteerd op DIV13 met controle pSuper vector, p140Cap-shRNA, of EB3-shRNA en GFP-p140Cap en gekleurd op gecotransfecteerd β -gal om de neuronale morfologie zichtbaar te maken.

(I) Kwantificatie van het aantal protrusies per 10 μ m dendriet van neuronen van de hippocampus, getransfecteerd op DIV13 met controle pSuper vector, p140Cap-shRNA, GFP-p140Cap, EB3-shRNA of een combinatie van GFP-p140Cap en EB3-shRNA. De Error Bars geven de SEM, * $p < 0,05$.

EB3 en p140Cap werken samen om de morfologie van spines te reguleren

Aangezien EB3 en p140Cap kunnen binden en dezelfde effecten als gevolg hebben, werken ze wellicht allebei in hetzelfde pathway. Om dit te onderzoeken is de lokalisatie van p140Cap bekeken in neuronen die geen EB3 meer bevatten. 4 dagen nadat neuronen getransfecteerd waren met EB3-shRNA was de lokalisatie van p140Cap in de spines aanzienlijk verminderd (zie fig 2.2.5G).

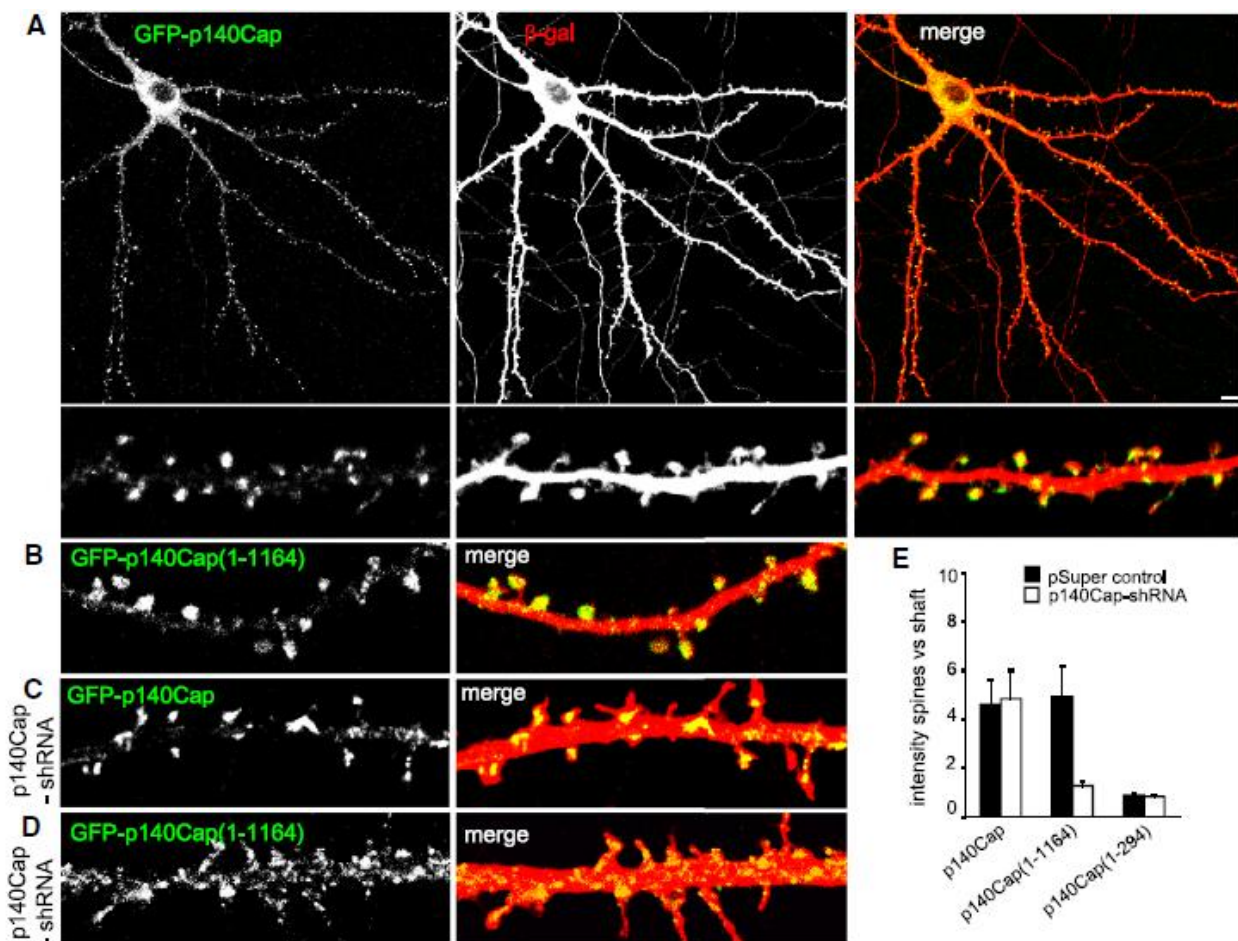


Figuur 2.2.5G

(G) Representatieve beelden van neuronen van de hippocampus, getransfecteerd op DIV 13 met controle pSuper vector of EB3-shRNA en dubbel gelabeld met anti-p140Cap (groen) en gecotransfecteerd β -gal (rood).

Om te onderzoeken hoe EB3 de lokalisatie van p140Cap reguleert, is gekeken of p140Cap zijn EB3-bindende domein nodig heeft om te kunnen lokaliseren. Cellen zijn getransfecteerd met: p140Cap van volle lengte, p140Cap dat het EB3-bindend domein mist (1-1164), en p140Cap dat zowel het EB3-bindend domein als het Src-bindend domein mist (1-194). Alleen het p140Cap(1-194) verloor lokalisatie in de spines, het p140Cap(1-1164) lokaliseerde nog net zo efficiënt in spines als het p140Cap van volle lengte (zie fig. 2.2.6A-E). Echter, p140Cap heeft een coiled-coil in het midden van zijn structuur zitten en kan wellicht met zichzelf een binding aangaan, waardoor een endogeen p140Cap het exogeen p140Cap zou kunnen stabiliseren.

Om dit te onderzoeken zijn neuronen gecotransfecteerd met p140Cap-shRNA en GFP-p140Cap(1-1164) of GFP-p140Cap van volle lengte. Na 4 dagen was te zien dat de lokalisatie van p140Cap(1-1164) in de spines significant was verminderd vergeleken met het p140Cap van volle lengte (zie fig 2.2.6A-E).

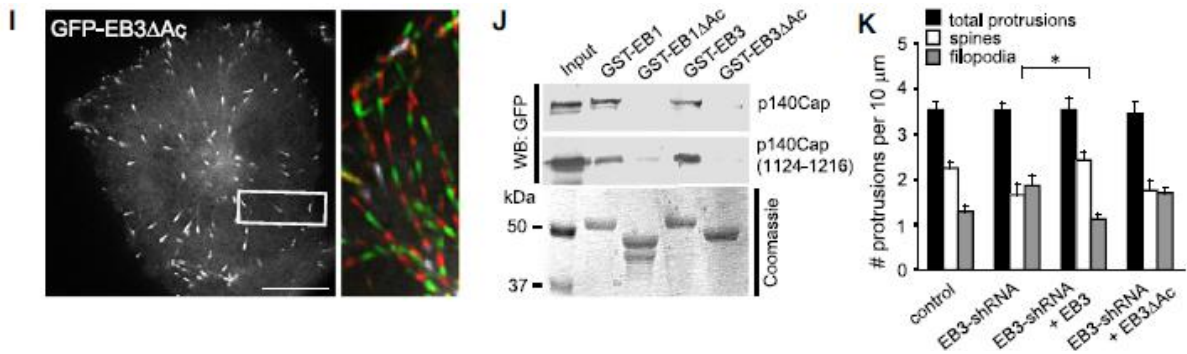


Figuur 2.2.6A-E

(A-D) Representatieve beelden van neuronen van de hippocampus gecotransfecteerd op DIV13 met GFP-p140Cap van volle lengte of GFP-p140Cap(1-1164) met controle pSuper vector (A en B) of p140Cap-shRNA (C en D) en gelabeld met gecotransfecteerd β-gal (rood). Dendritische segmenten zijn vergroot om de distributie van p140Cap te laten zien. Schalingslijn is 10 μm.

(E) Kwantificatie van GFP-p140Cap lokalisatie in spines. De nummers geven de ratio van fluorescentie intensiteit in spines vergeleken met dat in dendritische shafts van elk aangegeven p140Cap construct met pSuper controle vector of p140Cap-shRNA, als index van spine lokalisatie.

Om specifiek te kijken naar de interactie tussen EB3 en p140Cap is de EB3-bindende C-terminus van p140Cap (1124-1216) overexpressed. Er was een duidelijke vermindering in het aantal spines zichtbaar. Daarbij komt dat een EB3-construct (GFP-EB3 Δ Ac) dat p140Cap niet kan binden (zie fig. 2.2.6J) maar wel MT plus-uiteinden (zie figuur 2.2.6I) het effect van overexpressie van p140Cap(1124-1216) niet kan herstellen, terwijl EB3 van volle lengte dit wel kan (zie fig. 2.2.6K). Al deze data bij elkaar duidt erop dat de interactie tussen EB3 en p140Cap nodig is voor de regulatie van de morfologie van spines.



Figuur 2.2.6I-K

(I) CHO cellen, getransfecteerd met GFP-EB3 Δ Ac en zichtbaar gemaakt elke 500 ms. De GFP-EB3 Δ Ac positieve groeiende MT-uiteindes zijn in kleur gecodeerd voor elk 5^{de} frame (2,5s). Het eerste frame is weergegeven in wit, en elk opeenvolgend 5^{de} frame is om en om rood en groen gekleurd in de vergroting. Schalingslijn is 10 μ m.

(J) GST pull-down assay met de geïndiceerde GST-fusies en extracten van HEK293 cellen die overexpressie van GFP-p140Cap en GFP-p140Cap(1124-1216) vertonen. GFP fusies zijn gedetecteerd met western blotting met antilichamen tegen GFP. Coomassie-gekleurde gel voor GST fusies.

(K) Kwantificatie van het aantal protrusies per 10 μ m dendriet van neuronen van de hippocampus, getransfecteerd op DIV13 met een lege vector (controle), enkel EB3-shRNA, of EB3-shRNA met EB3 of EB3 Δ Ac.

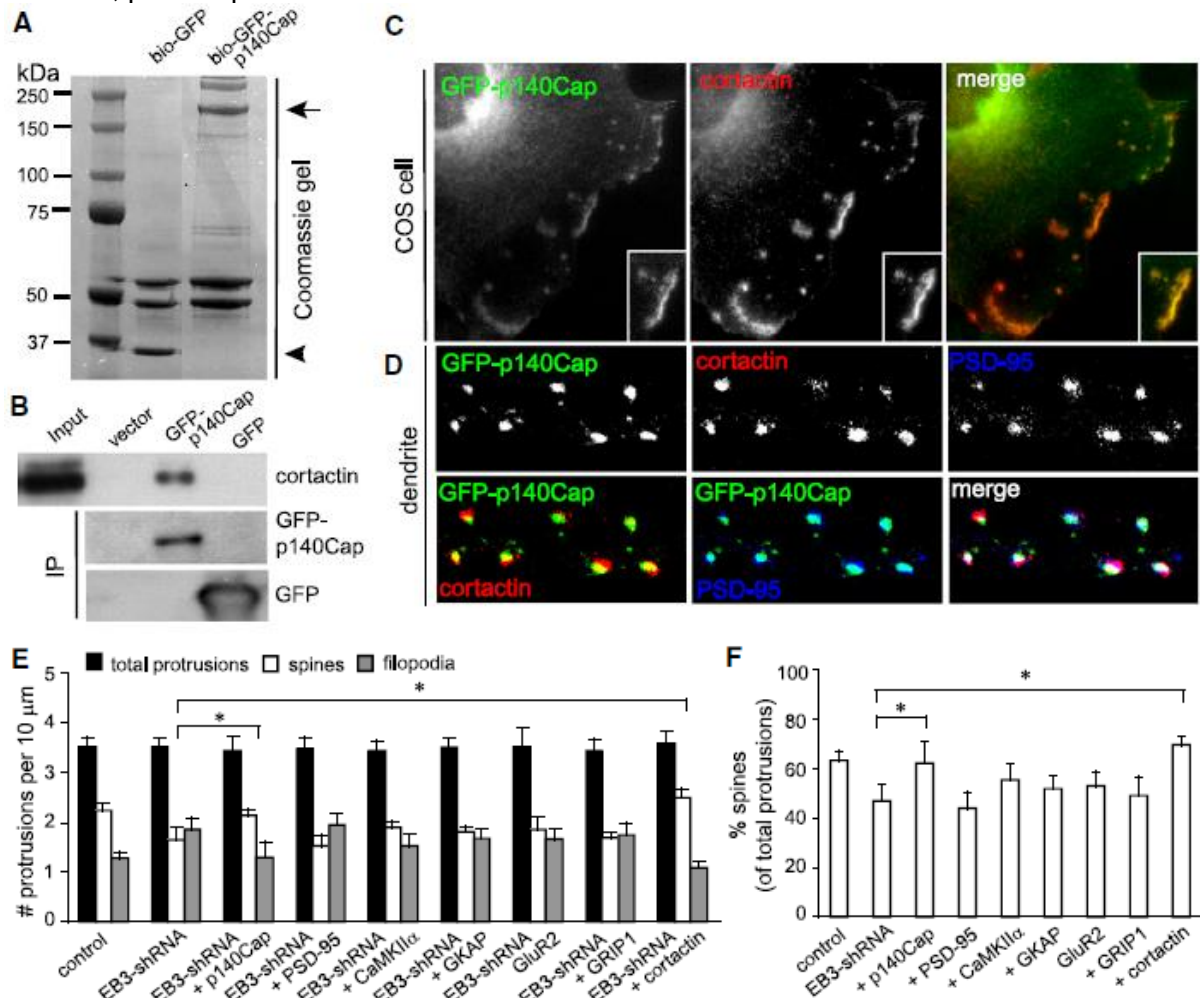
Vervolgens is gekeken of p140Cap up- of downstream van EB3 de morfologie van de spines reguleert. Overexpressie van p140Cap in neuronen zonder EB3 leidt tot herstel (zie fig. 2.2.5H-I), terwijl overexpressie van EB3 in cellen zonder p140Cap niet tot herstel leidt. Dit duidt erop dat EB3 de lokalisatie van p140Cap reguleert, en dat p140Cap vervolgens de morfologie van de spines reguleert.

P140Cap bindt aan Cortactin

EB3 en/of 140Cap doet kennelijk iets met het actine cytoskelet. Om uit te zoeken hoe, is er gezocht naar bindingspartners van p140Cap met behulp van een pull-down assay gecombineerd met massa spectrometrie. Hierbij werden p140Cap met biotin en GFP eraan vast (bio-GFP-p140Cap) en GFP-p140Cap gebruikt die werden geïsoleerd met behulp van streptavidine-kralen (avidin en biotin binden zeer sterk) (zie fig 2.2.7A). Met behulp van massa spectrometrie analyse zijn zeer veel actine-bindende eiwitten gevonden, waaronder Cortactin. Opvallend was dat alle gevonden actine-bindende eiwitten in eerdere onderzoeken een interactie aan gingen met Cortactin. Het lijkt er dus op dat p140Cap een interactie aangaat met een cortactine-bevattend eiwitcomplex. De interactie tussen p140Cap en Cortactin is bevestigd door middel van immunoprecipitatie experimenten (zie fig. 2.2.7B).

Cortactin is een F-actine bindend eiwit dat betrokken is bij het stabiliseren en vertakken van F-actine en dat zich lokaliseert in dendritische spines in cellen van de hippocampus [Hering en Sheng, 2003]. Expressie van GFP-p140Cap liet colocalisatie met Cortactin zien in COS-7 cellen (zie fig. 2.2.7C) en in dendritische spines die PSD-95 positief waren (zie fig. 2.2.7D). Ook is al aangetoond door Hering en Sheng dat een verlies van cortactin leidt tot vermindering van F-actine en een verlies van spines.

Ook is onderzocht of cortactin de spine morfologie upstream of downstream van EB3 reguleert (zie fig. 2.2.7E-F). Overexpressie van cortactin leidt tot herstel van de gevolgen van EB3-knockdown, net als overexpressie van p140Cap. De overexpressie van andere belangrijke postsynaptische eiwitten had geen herstel tot gevolg. Deze bevindingen laten zien dat cortactin specifiek het EB3-knockdown fenotype kan herstellen en het versterkt de link tussen EB3, p140Cap en actine.



Figuur 2.2.7

(A) Streptavidin pull-down assay zijn uitgevoerd met lysates van HeLa cellen die bio-GFP-p140Cap of bio-GFP samen met BirA expressen. Eiwitten die gebonden waren aan streptavidin-kralen zijn geanalyseerd op coomassiegel. De pijlen geven bio-GFP-p140Cap (boven) en bio-GFP (onder) aan.

(B) Immunoprecipitaties van extracten van HeLa cellen, getransfecteerd met de aangegeven constructen en geprobeerd voor cortactin.

(C) COS-7 cellen zijn getransfecteerd met GFP-p140Cap, formaldehyde gefixeerd en gekleurd voor endogeen cortactin (rood). De kleine vierkantjes geven vergrotingen van colocalisatie van p140Cap en cortactin.

(D) Dendrieten van neuronen van de hippocampus driedubbel gelabeld voor getransfecteerd GFP-p140Cap (groen), konijnen anti-cortactin (rood) en cavia anti-PSD-95 antilichaam (blauw).

(E) Kwantificatie van het aantal protrusies per 10 μm dendriet in neuronen van de hippocampus, getransfecteerd op DIV 13 met controle pSuper vector, EB3-shRNA, of EB3-shRNA met de aangegeven constructen.

(F) Percentage spines van neuronen van de hippocampus getransfecteerd met dezelfde constructen als in (E).

2.3 Wat voor effect heeft LTD-inductie op microtubuli in de dendrieten?

Er is in voorgaande onderzoeken bewezen dat Long-term potentiation (LTP) en Long term Depression (LTD) sterke effecten hebben op de opbouw en afbraak van actinefilamenten. Een LTP zorgt voor polymerisatie van actinefilamenten en zo voor spinevergroting (Matsuzaki *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2004; naar Kapitein *et al.*, (2011)). Een LTD zorgt daarentegen voor depolymerisatie van actinefilamenten waardoor spines minder groot worden (Okamoto *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004; naar Kapitein *et al.*, (2011)).

Er wordt door Kapitein *et al* (2011) specifiek gekeken naar de rol van LTD bij microtubuli en op bijbehorende eiwitten in postsynaptische signaleringsmechanismen. De rol van LTD bij spineplasticiteit via microtubuli is namelijk grotendeels ononderzocht.

Het is al bewezen dat microtubuli aanwezig zijn in dendritische spines en dendrieten in het algemeen (Hu *et al.*, 2008) (Jaworski *et al.*, 2008; Conde and Caceres, 2009; Hoogenraad and Bradke, 2009; naar Kapitein *et al.*, (2011)) en dat MAP2 in de lengte bindt aan microtubuli en zo invloed heeft op microtubuli-stabiliteit.

De vraag is dus hoe LTD effect heeft op spineplasticiteit en morfologie. Kapitein *et al.* (2011) hebben gevonden dat het induceren van LTD, in twee fases effect heeft op het microtubuli-stimulerende, +-tip bindende EB3, een snelle fase en een langzame fase.

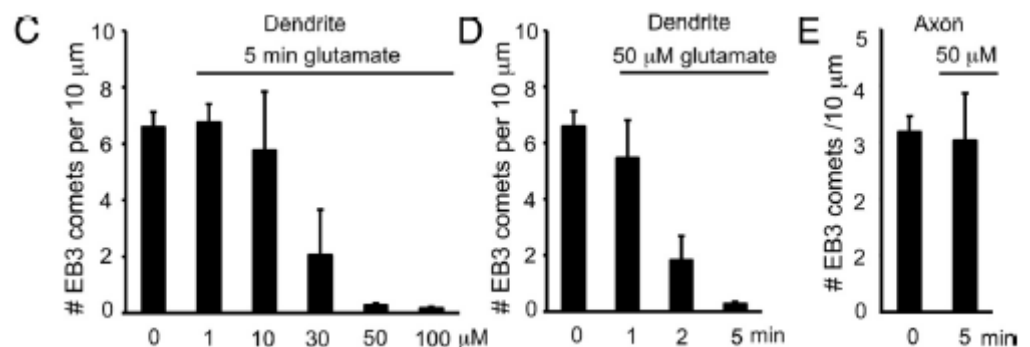
Snelle fase van EB3-relokalisatie door NMDA-activatie

Bij de snelle fase spelen EB3-kometen een grote rol. Een EB3-komeet is een clustering van het eiwit EB3, wat een belangrijk +-tip bindend microtubule-eiwit is.

Bij de snelle fase van EB3 relokalisatie verdwijnen de EB3-kometen van de +-Tips van de microtubuli onder invloed van glutamaattoevoeging, en blijken ze zich in het cytoplasma te verdelen.

Bij deze herverdeling is het zo dat de totale concentratie van EB3 voor en na behandeling van de cellen met glutamaat niet verandert, dit is onderzocht met behulp van een immunoblot-analyse waarbij gekeken is naar concentratie van EB3 bij verschillende hoeveelheden glutamaat en op verschillende tijdstippen en op een tijdstip maar bij verschillende concentraties glutamaat.

Er is ontdekt dat de activatie van een NMDA-receptor door stimulatie van glutamaat datgene is wat zorgt voor de herverdeling van EB3 en niet een andere receptor. Dit is bewezen door een antagonist, een stof die een receptor blokkeert, toe te voegen aan de cellen. Ze hebben de NMDA-receptor geblokkeerd met een antagonist en de rest niet, wat zorgde voor een heel sterke afname in herverdeling van EB3, en dus het effect van glutamaat op EB3 blokkeerde. Er is ook onderzocht of het gaat om een NMDA -receptor met NR2A of NR2B subeenheid. Door een RNA-interferentie experiment uit te voeren waarbij één van de twee subeenheden wordt uitgeschakeld is uitgevonden om welke NMDA-receptor gaat. Het blokkeren van NR2B-bevattende NMDA-receptoren blokkeerde gluta-



Figuur 2.3.1, C: Hier is de hoeveelheid EB3-kometen per 10 μm te zien bij verschillende concentraties van glutamaat 5 minuten na het toevoegen hiervan. **D:** Het aantal EB3-kometen per 10 μm op verschillende tijdstippen na het toevoegen van 50 μM glutamaat. **E:** Het aantal EB3-kometen in de axon per 10 μm bij 0 en 5 minuten na het toevoegen van 50 μM glutamaat (Naar Kapitein *et al.*, 2011).

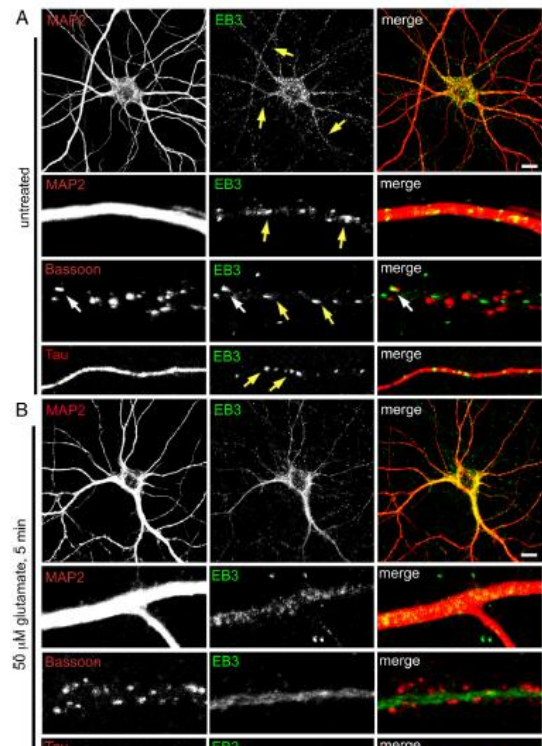
maat-afhankelijke EB3-redistributie. NR2-B-bevattende glutamaatreceptoren blijken dus van belang te zijn bij de EB3 redistributie na glutamaattoevoeging.

De afname van het aantal EB3-kometen wordt gemeten door de onderzochte cellen 5 minuten te behandelen met 50µM glutamaat (Figuur 2.3.1 D). In figuur 2.3.2 hieronder is het effect van glutamaat te zien, zonder toevoeging van deze stof zie je de EB3-kometen als allemaal kleine bolletjes en met toevoeging van glutamaat zijn bolletjes voor het oog allemaal weg en wordt het een waas van de stof zonder clustering. Dit is een proces dat 1-2 minuten duurt vanaf het moment dat de NMDA-receptor gestimuleerd wordt (Figuur 2.3.1 D). De onderzoekers hebben ook aangetoond dat het effect van glutamaat geen toxische reactie heeft uitgelokt, dus de herverdeling van EB3 over de hele cel is een normale reactie van het neuron (Faddis et al., 1997; Hoskison et al., 2007). Er is ook nog gekeken naar het effect van LTP op de herverdeling van EB3 en dat werd verwezenlijkt door glycine/KCl of bicuculline toe te voegen (een chemische LTD inducer), dit had echter geen effect op de EB3 komeet binding aan de microtubule.

De plek van herverdeling is ook duidelijk, NMDA-receptor stimulatie heeft effect in de dendrieten, en niet in de axonen, hier kun je uit concluderen dat chemische LTD alleen effect heeft op het microtubulinetwerk in dendrieten.

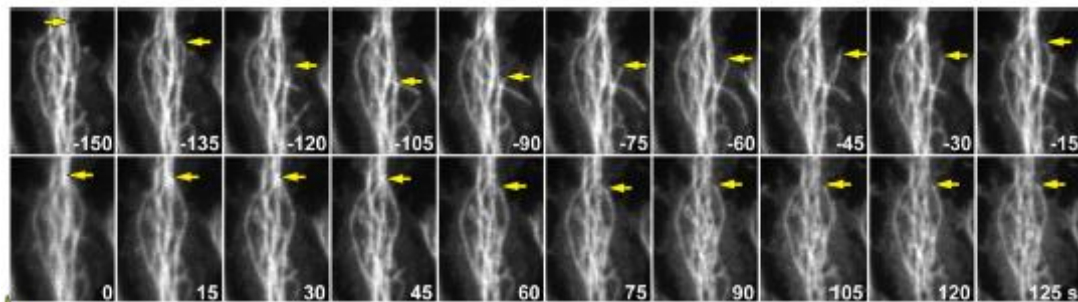
De onderzoekers hebben gespeculeerd dat het verdwijnen van de EB3-kometen een gevolg is van het stoppen van groeien van de microtubuli door activatie van de NMDA-receptor.

Het feit dat de EB3 kometen zelf niet zorgen voor het stoppen van de groei van microtubuli, geeft gelijk een vervolg vraag, namelijk: wat zorgt na stimulatie van een NMDA receptor voor het stoppen van de groei, waardoor vervolgens EB3 loslaat van de +-tips van de microtubuli? Het is bekend dat een NMDA-receptor, door binding met ligand, Ca²⁺ van de synaptische spleet naar het cytoplasma van de cel doorlaat. Om te testen wat de rol van Ca²⁺ is bij inhiberen van de microtubule groei, hebben Kapitein *et al* (2011) BAPTA-AM toegevoegd aan een groep cellen. BAPTA-AM bindt aan Ca²⁺ zodat deze moleculen niet meer kunnen fungeren als second messenger. Het gevolg is dat het NMDA-effect werd geblokkeerd, Ca²⁺ heeft dus betrekking bij de herverdeling van EB3. Het is ook aannemelijk dat het de stof zorgt voor de stop van de microtubulegroei omdat uit andere onderzoeken blijkt dat Ca²⁺ direct effect heeft op microtubulopolymerisatie. (Fuller and Brinkley, 1976; Schliwa, 1976; naar Kapitein *et al*, 2011) Een lage concentratie Ca²⁺ zorgt voor microtubule polymerisatie en een grote hoeveelheid Ca²⁺ zorgt er voor dat microtubuli depolymeriseren (Fuller and Brinkley, 1976; Schliwa, 1976; naar Kapitein *et al*, 2011). Dit zou dan via door Ca²⁺ geactiveerde Cal-



Figuur 2.3.2, A: Verschillende delen van neuronen die niet zijn behandeld met glutamaat. In het groen is een anti-EB3 antilichaam te zien, in het rood een anti-MAP2 antilichaam en ze zijn samen te zien in kleur in de derde kolom. In de onderste drie rijen zijn ingezoomde delen van de bovenste rij te zien. MAP2 in dendriten, tau in axonen en dichtbij de synapsen in bassoon. **B:** Hier zijn dezelfde delen als in A te zien met dezelfde antilichamen maar dan 5 minuten na toevoeging van 50 µM glutamaat. Het laat dus zien dat in dendrieten en vlak bij de synapsen EB3-kometen verdwijnen na toevoeging van 50 µM glutamaat. Bij de axonen (gekleurd met Tau) verdwijnen er echter geen EB3-kometen (Naar Kapitein *et al.*, 2011).

moduline kunnen gaan. Calmoduline is een calciumafhankelijke regulator van microtubulemontage (Marcum *et al.*, 1978; Schliwa *et al.*, 1981; Lee and Wolff, 1982; Deery *et al.*, 1984; naar Kapitein *et al.*, (2011)).



Figuur 2.3.3: het pijltje geeft hier de plus-tip van een microtubule weer en op $t=0$ wordt 100 μM NMDA toegevoegd. Van seconde -150 tot seconde 0 is te zien dat de microtubule, met het gele pijltje aangegeven, beweegt. De plus-tip die met het pijltje wordt aangegeven lijkt namelijk eerst in te krimpen tot een bepaald punt (seconde -90) en wordt vervolgens weer langer (tot seconde 0). Op seconde 0 komt het glutamaat erbij en wordt waargenomen dat de microtubule iets krimpt en vervolgens stil blijft staan tot het laatste meetpunt (seconde 125) (Naar Kapitein *et al.*, 2011).

Het effect van door NMDA en glutamaat geïnduceerde activatie van een NMDA-receptor is of een krimp van microtubuli of stilstaande microtubuli-eindes (Figuur 2.3.3).

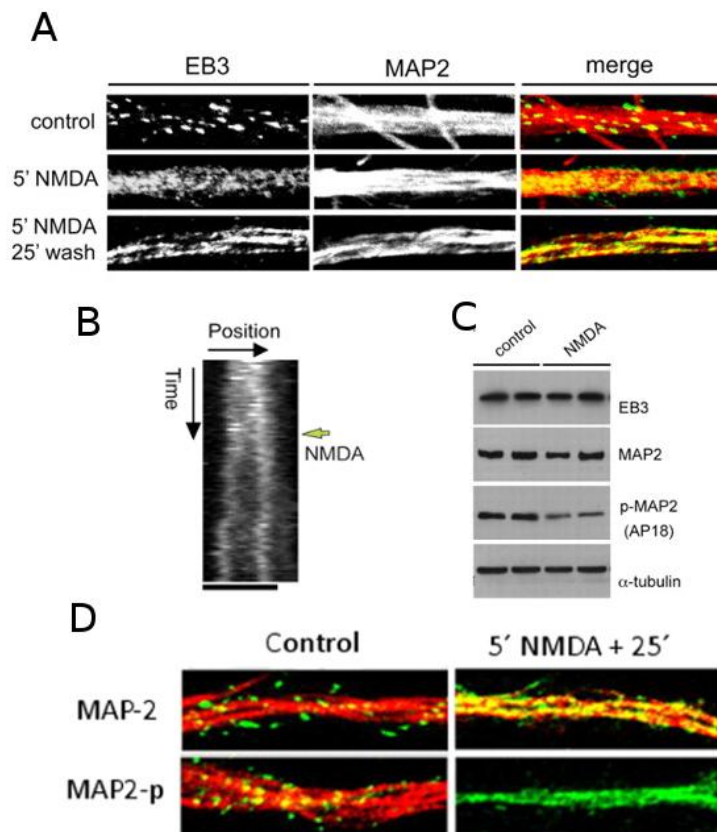
Als er lokaal NMDA aan een dendriet wordt toegevoegd, zie je lokaal de EB3-kometen verdwijnen. Dit blijkt echter maar tijdelijk te zijn, aangezien de verplaatsing van EB3 na ongeveer 1 minuut weer terug is op controleniveau. Locale NMDA-receptor-stimulatie kan dus een tijdelijk effect hebben op microtubuli-dynamiek die naast de plek van directe invloed door Ca^{2+} ligt.

Langzame fase van EB3 relokalisatie door NMDA activatie

Het blijkt dat de EB3-comets verdwijnen kort na de activatie van een synaps met NMDA en EB3 verspreid is in het cytosol ongeveer 5 minuten na NMDA toevoeging. Echter, ongeveer 10 minuten na het wegwassen van het NMDA is het EB3 in lange en dikke bundels in de dendriet, langs MAP2 microtubuli te vinden te zijn (figuur 2.3.4). In figuur 2.3.4B is te zien dat waar EB3 zich eerst nog diffuus over de ruimte bevindt, zich het na loop van tijd in bundels gaat ordenen. Dit is de langzame respons van EB3 op NMDA-stimulatie.

Bekend is al dat na NMDA-stimulatie zich actinebundels vormen in de dendritische schaft (Hering en Sheng, 2003, naar Kapitein *et al.*, 2011), maar het door NMDA verspreide EB3 bleek zich te colocaliseren met microtubuli, om specifiek te zijn, de MAP2-positieve microtubuli (figuur 2.3.4 D, bovenste panels). Uit een western blot van eiwitten uit hippocampale neuronen bleek dat MAP2 fosforylatie afnam af door NMDA toevoeging (figuur 2.3.4 C). EB3 kon alleen binden aan gedefosforyleerde MAP2, wat te zien is aan het gebrek aan kleuring voor gefosforyleerde MAP2. Deze kleuring is afwezig na binding van EB3 aan MAP2 (figuur 2.3.4 D, onderste panels). Hieruit kan de conclusie getrokken worden dat NMDA leidt tot het defosforyleren van MAP2, waardoor deze EB3 recruteert. De vragen komen dan op waarom en hoe EB3 door MAP2 gerecruteerd worden. Kapitein *et al.* speculeren dat het wegvangen van EB3 uit de dendritische schaft ervoor zorgt dat EB3 niet meer kan binden aan de +TIPs van de microtubuli, waardoor deze niet meer kunnen groeien en zo dus geen spines meer kunnen behouden. Een andere reden zou kunnen zijn dat het binden van EB3 aan microtubuli leidt tot een bepaalde signaaltransductieroute (Kapitein *et al.*, 2011).

Om te onderzoeken hoe EB3 aan MAP2 bindt, hebben de onderzoekers verschillende GST-pulldown experimenten gedaan. Hierbij fuseerden Kapitein *et al.* een Glutathione S-transferase (GST) eiwit met het EB3 eiwit, om vervolgens via een pulldown assay te kijken met welke eiwitten EB3 interacteerde. Het bleek dat EB3 een directe interactie aanging met MAP2, omdat MAP2-GFP gevonden werd bij de pulldown assay met GST-EB3, maar niet

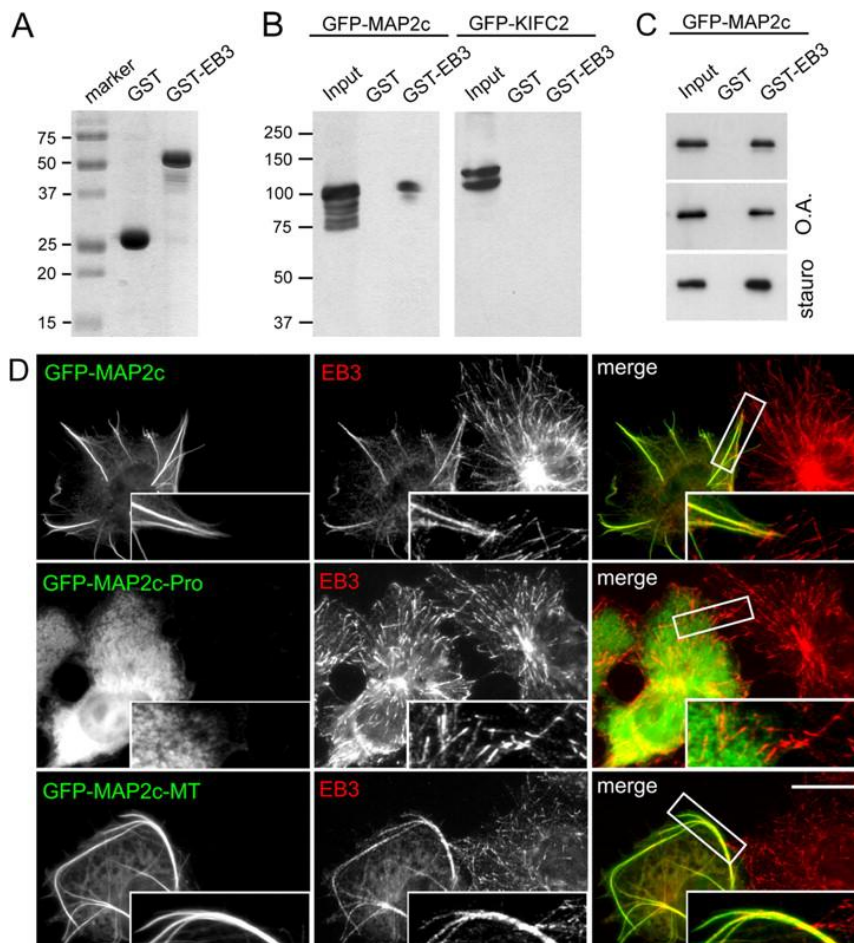


Figuur 2.3.4 A: 5 minuten na NMDA toevoeging is te zien dat EB3 (groen) zich diffuus door het cytoplasma bevindt. 25 minuten na wegwassen bevindt het EB3 zich echter in bundels langs de microtubuli (rood: MAP2). **B:** Waar het EB3 zich eerst diffuus door de ruimte bevindt, is na NMDA toevoeging een duidelijke ordening in bundels te zien. **C:** Na toevoeging van NMDA is duidelijk te zien dat de hoeveelheid gefosforyleerd MAP2 (p-MAP2 (AP18)) afneemt. MAP2 in zijn geheel neemt echter niet af. **D:** Te zien is dat bij bundeling van EB3 (groen) MAP2 wel colocaliseert na NMDA-toevoeging (rood, bovenste 2 panels), maar gedefosforyleerd MAP2 (MAP2-p) niet te vinden is bij EB3-bundels. (onderste panel, MAP2-p rood, EB3 groen). (Naar Kapitein *et al.*, 2011)

met een pulldownassay met alleen GST (Figuur 2.3.5. B). Dit is te zien aan het bandje van ongeveer 100 kD in *figuur 2.3.5B*, wat mist bij pulldown met GST alleen of met een ander microtubulibindend eiwit zoals KIFC2. Als staurosporine, een stof die ATP wegvangt en dus kan zorgen voor defosforylatie van MAP2, toegevoegd wordt, is MAP2 nog sterker terug te zien in de GST-EB3 pulldown (*Figuur 2.3.5C*). Ook bleek EB3 niet aan andere types microtubuli te binden. Om te achterhalen of EB3 aan het N-domein (pro-domein) of het microtubulibindende C-domein (MT-domein) van MAP2 bindt, zijn deletievarianten van MAP2-GFP onderzocht op colocalisatie met EB3 (*Figuur 2.3.5D*). Hieruit bleek dat het EB3 bindt aan het C-domein van MAP2. Bij een deletievariant met alleen het prodomein is namelijk geen colocalisatie met EB3 te zien, maar bij het microtubulibindende (MT), C-terminale domein is wel een duidelijke colocalisatie met EB3 te zien. Een GST-pulldownassay bevestigde deze bevindingen (*Figuur 2.3.5 E*)

EB3 heeft een +tip bindend N-domein en een C-terminus bestaande uit een zure dimere structuur met vier α -helices, waarvan bekend is dat het aan EB3partners bindt (Akhmanova en Steinmetz, 2008; Hoogenraad en Akhmanova, 2010; naar Kapitein *et al.*, 2011) Omdat de C-terminus van MAP2 rijk is aan basische aminozuren, hebben Kapitein *et al.* onderzocht of een EB variant waarin het C-terminale zure domein weg was, ook MAP2 meenam bij de pulldownassay (*Figuur 2.3.6A*). Dit bleek niet het geval te zijn, zoals te zien is aan het feit dat het GFP-MAP2c bandje ontbreekt bij *figuur 2.3.6A*. De zekerheid dat EB3 met zijn C-kant bindt aan MAP2, werd gegeven doordat EB3 zonder

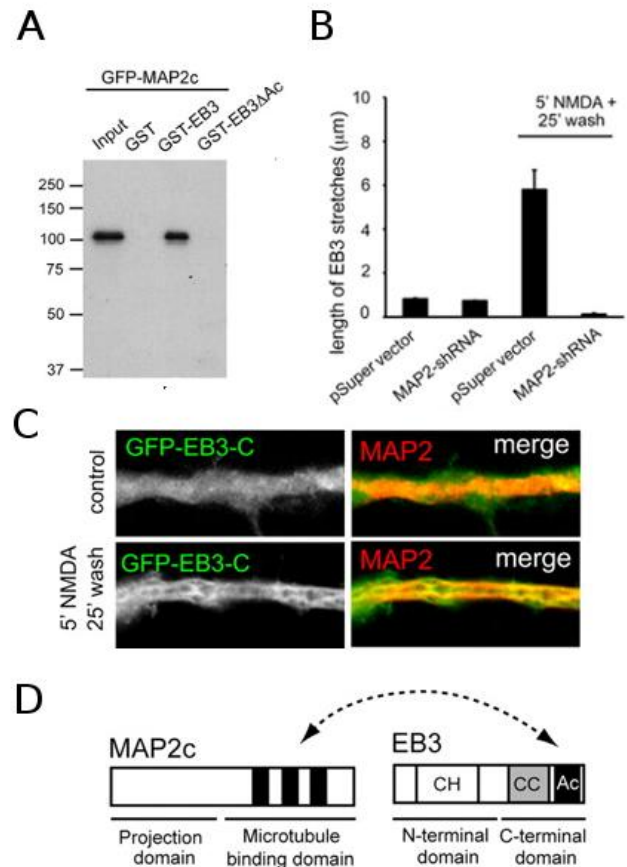
Figuur 2.3.5 A: GST-EB3 weegt ongeveer 50 kD. **B:** In een GST pulldownassay is te zien is dat GFP-MAP2c bindt aan GSTEB3, maar niet aan GST alleen. GFPKIFC2 bindt niet aan GST-EB3. **C:** te zien is dat toevoeging van staurosporine zorgt voor meer binding van GFP-MAP2c aan GST-EB3 dan controles. **D:** Te zien is dat GFP-MAP2c (groen, bovenste panels) colocaliseert met EB3 (rood). GFP-MAP2c-Pro (groen, middelste panels), bestaande uit slechts het N-terminale domein, colocaliseert niet met EB3 (rood). GFP-MAP2c-MT (groen, onderste panels), het C-terminale microtubulibindende domein, colocaliseert wel met EB3 (rood). **E:** In een GST pulldownassay is te zien dat GFP-MAP2c-Pro niet bindt aan GST-EB3, maar GFP-MAP2c-MT wel. Afbeeldingen naar Kapitein *et al.*, 2011.

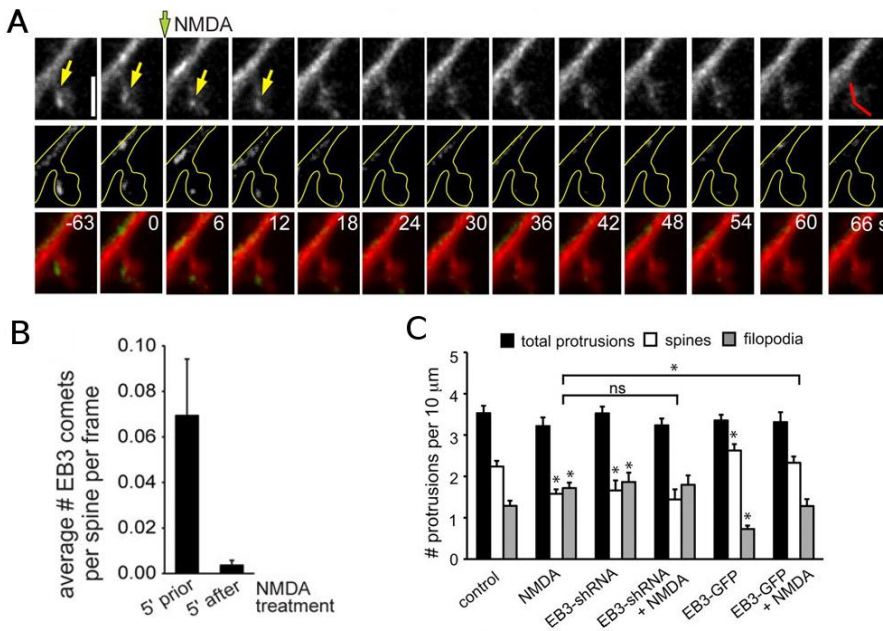


Figuur 2.3.6 A: Te zien is dat GFP-MAP2c niet neerkomt met GST-EB3ΔAc, maar wel met GST-EB3 alleen. **B** Toevoeging van MAP2-shRNA leidt tot een enorme afname van EB3-stretches na NMDA-toevoeging. **C:** GFP-EB3-C (groen), mist het microtubulubindende N-terminale domein, maar bindt na 5 minuten NMDA-stimulatie en 25 minuten na wegwassing wel aan MAP2-positieve microtubuli (rood). **D:** Schematisch overzicht van de domeinen van MAP2c en EB3. Te zien is dat het Microtubulubindend domein van MAP2c aan het C-terminale, zure domein van EB3 bindt. Naar afbeeldingen van Kapitein *et al.* 2011)

het +TIPbindende N-domein wel na NMDA-stimulatie bond aan de microtubuli (*Figuur 2.3.6 C*). Dus, het C-domein van EB3 is nodig en voldoende voor binding van EB3 aan gedefosforyleerd MAP2. Ook bleek een gebrek aan MAP2 te voorkomen dat EB3 bindt aan de microtubuli, de lengte van de EB3 stretches 25 minuten na NMDA-toevoeging blijkt zeer kort bij toevoeging van MAP2-shRNA, een stof die ervoor zorgt dat MAP2mRNA niet getransleert kan worden en MAP2 dus niet aanwezig is (*Figuur 2.3.6B*). De bevinding dat EB3 met zijn C-terminus bindt aan een gedefosforyliseerd eiwit, is in overeenstemming met andere bevindingen (Akhmanova en Steinmetz, 2008).

Uit het onderzoek van Jaworski *et al.* (2009) is gebleken dat EB3-comets soms de spine ingaan en daar spinegroei kunnen induceren. Het blijkt dat bij NMDA-toevoeging deze binnenkomst verhinderd wordt, waarschijnlijk omdat de meeste microtubuli stoppen met groeien. Dit blijkt uit het feit dat er bijna geen EB3-kometen meer te zien zijn in de spines na NMDA-toevoeging (*Figuur 2.3.7 A, B*). Ook bleek in dit geval dat NMDA-toevoeging effect had op de hoeveelheid spines in de dendriet, deze namen af, en het aantal filopodia (dunne, sliertige uitsteeksels aan de dendriet) nam toe (*Figuur 2.3.7 K*). Het bleek dat EB3-knockdown door EB3-shRNA hetzelfde effect had op spines, en dat NMDA-toevoeging dat niet nog weer vergde, er waren namelijk in verhouding evenveel spines en filopodia te zien bij zowel EB3-shRNA als bij EB3-shRNA samen met NMDA. Het is dus erg aannemelijk dat de reductie van spines door LTD-simulatie met NMDA, gaat via EB3-activiteit. Zoals Jaworski *et al.* (2009) al aangetoond hadden geeft een overexpressie van EB3-GFP meer microtubuli in de spines (*figuur 2.3.7 C*). Uit het onderzoek Kapitein *et al.* (2011) blijkt dat als er microtubuli in de spines zitten, geïnduceerde LTD met NMDA geen effect meer heeft op de hoeveelheid spines. Dit is te zien aan het feit dat bij overexpressie van EB3-GFP, wat zorgt voor microtubuli in de spines, NMDA geen effect meer heeft op de verhouding spines/filopodia (*Figuur 2.3.7 C*). LTD lijkt dus alleen effect te hebben op spines waar geen microtubuli inzitten, en de algehele stop van microtubuli in de omgeving kan gelinkt zijn met de zogenaamde geclusterde plasticiteit (Govindarajan *et al.*, 2006; naar Kapitein *et al.*, 2011), wat betekent dat als één spine LTD ondergaat, de omliggende spines op dezelfde dendriettak, ook gevoeliger zijn voor LTD.



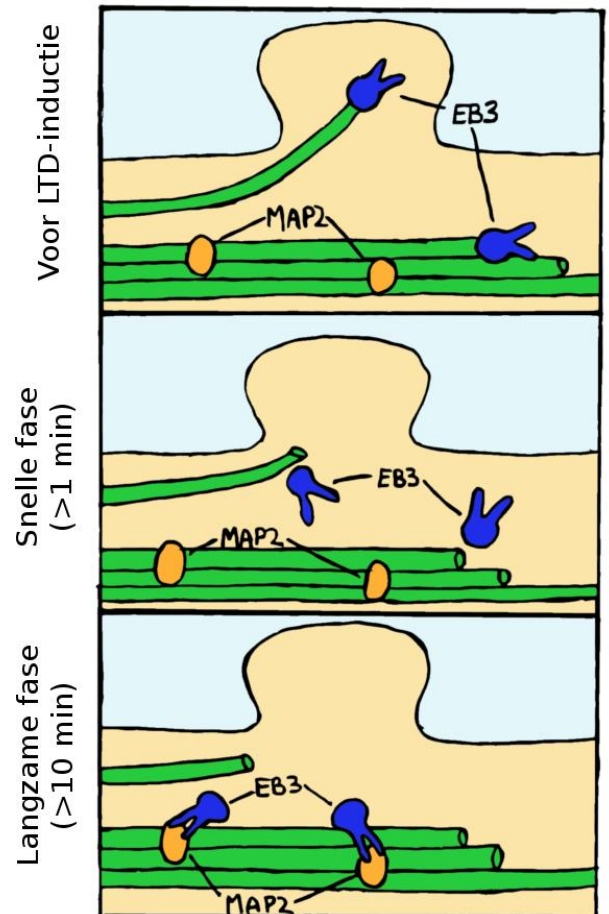


Figuur 2.3.7 A: Te zien is dat na NMDA toevoeging nauwelijks meer microtubuli (te zien door EB3-kometen) de spines in gaan. **B:** De gemiddelde hoeveelheid EB3-kometen per spine neemt af na NMDA-toevoeging. **C:** Effect van verschillende behandelingen op de verhouding spines:filopodia. Te zien is dat NMDA, EB3-shRNA en de combinatie daarvan hetzelfde, spinereducerende effect hebben. EB3-GFP overexpressie leidt tot relatief meer spines, en dit effect kan tenietgedaan worden door NMDA-toevoeging. (Naar Kapitein *et al.*, 2011)

Conclusie

Het blijkt dus dat chemische LTD-inductie via de NR2B-subeenheid van de NMDA-receptor (NMDAR) werkt. Bij voldoende stimulatie kan NMDAR Ca^{2+} doorlaten, wat EB3 kometen doet verdwijnen en microtubuli depolymeriseert, enkele minuten na LTD-inductie. Dit is de snelle respons van EB3 op NMDAR-activatie. De langzame fase van NMDAR-activatie is dat MAP2 defosforyleert, waardoor EB3 met zijn uit vier α helixes bestaande C-terminus aan MAP2 bindt. Waarvoor dit dient is nog onbekend, alhoewel Kapitein *et al* (2011) speculeren dat er twee opties zijn. Het binden van EB3 aan MAP2 zou enerzijds kunnen dienen voor het wegvangen van EB3 uit het cytosol, zodat deze niet meer aan microtubuli-TIPs kan binden en hiermee microtubuligroei kan promoten door catastrofes te verhinderen. Anderzijds zou het kunnen dienen voor een bepaalde, nog onbekende signaaltransduceroute die de morfologische veranderingen van LTD tot stand brengt. Via E3B kan zo het korte signaal van het door de NMDA receptor verhoogde Ca^{2+} verlengd worden in een signaal dat langer aanhoudt aan de MAP2 aan de microtubuli, en kan het dus zijn dat EB3 een belangrijke rol speelt in synaptische plasticiteit. Een overzicht van de snelle en langzame fase is te zien in *Figuur 2.3.8*.

Echter, om synaptische plasticiteit plaats te laten vinden, zijn veel eiwitten nodig in de synaps. Deze worden daarheen getransporteert langs de microtubuli, dit mechanisme wordt in het volgende hoofdstuk verder besproken.



Figuur 2.3.8 EB3 is vóór LTD-inductie gebonden aan de plusuiteinden van microtubuli (hier de rechterzijde van microtubuli). Snel na LTD-inductie laat EB3 los van de microtubuli, en bevindt het zich vrij in het cytosol (tweede panel). Na enige tijd bindt EB3 zich aan gedefosforyleriseerd MAP2 (onderste panel). In deze figuur zijn slechts 2 EB3-moleculen weergegeven, en dus geen EB3-kometen. Figuur gemaakt door L. Stolk.

3. Synaptisch transport langs microtubuli

3.1 Kinesine

Transport over microtubuli vindt plaats door middel van motoreiwitten. Dit zijn eiwitten die over de microtubuli zich kunnen verplaatsen en een cargo mee kunnen dragen. Over het algemeen verplaatsen motoreiwitten vesicles door de cel. Een voorbeeld van een dergelijk motoreiwit is kinesine.

Kinesine is een eiwit dat meerdere vormen kent. De meest voorkomende vorm is te zien in *Figuur 3.1*.

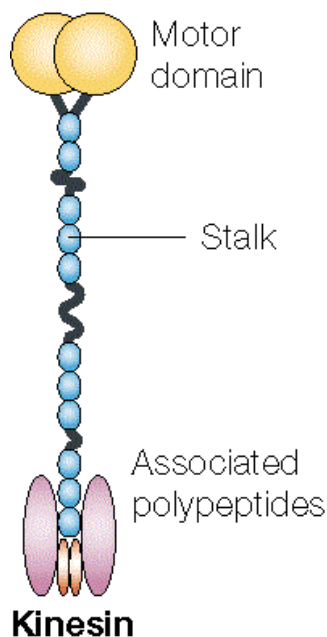


Fig 3.1: Een schematische weergave van de meest voorkomende soort kinesine. Het motordomein is over het algemeen een dimeer. Dit is de heavy chain. De light chain omvat de geassocieerde polypeptiden die binden aan de cargo.

Naar Günther Woehlke et al., 2000.

(bron:http://www.nature.com/nrm/journal/v1/n1/fig_tab/nrm1000_050a_F1.html)

Het eiwit bestaat uit een motordomein, een steel en een groep polypeptiden aan het uiteinde waaraan de cargo vastzit. Het motordomein bestaat over het algemeen uit een dimeer. Dit is de heavy chain van het eiwit. De light chain omvat de polypeptiden aan het andere uiteinde. De heavy chains en de light chains zijn variabel in kinesine en dit gegeven zorgt ervoor dat er verschillende soorten kinesines zijn die verschillende functies invullen in intracellulair transport. Kinesine vormt een superfamilie met tenminste 14 verschillende families van kinesines. Deze families zullen nu kort worden besproken.

De meeste soorten kinesines in de superfamilie hebben het motorgedeelte van het eiwit aan de N-terminus zitten. Deze kinesines lopen van het min-uiteinde van microtubuli naar het plus-uiteinde van de microtubuli. Een andere familie van kinesines heeft echter het motorgedeelte aan de C-terminus zitten. Dit heeft een interessant gevolg, namelijk dat de kinesines met het motorgedeelte aan C-terminus juist de andere kant oplopen, dus van plus naar min.

Er zijn ook kinesines die in de heavy chain van het eiwit een zogeheten coiled-coil sequence missen. Het gevolg hiervan is dat deze kinesines als een monomeer functioneren in plaats van een dimeer.

Weer andere soorten kinesines vormen homodimeren en weer andere zijn heterodimeren. Een andere interessante familie van kinesine is de kinesin-5 family. Deze kinesines hebben een bipolaire motor. Deze motor kan twee microtubuli langs elkaar heen laten schuiven zoals myosine II kan doen met actinefilamenten. (The Cell, Alberts et al.)

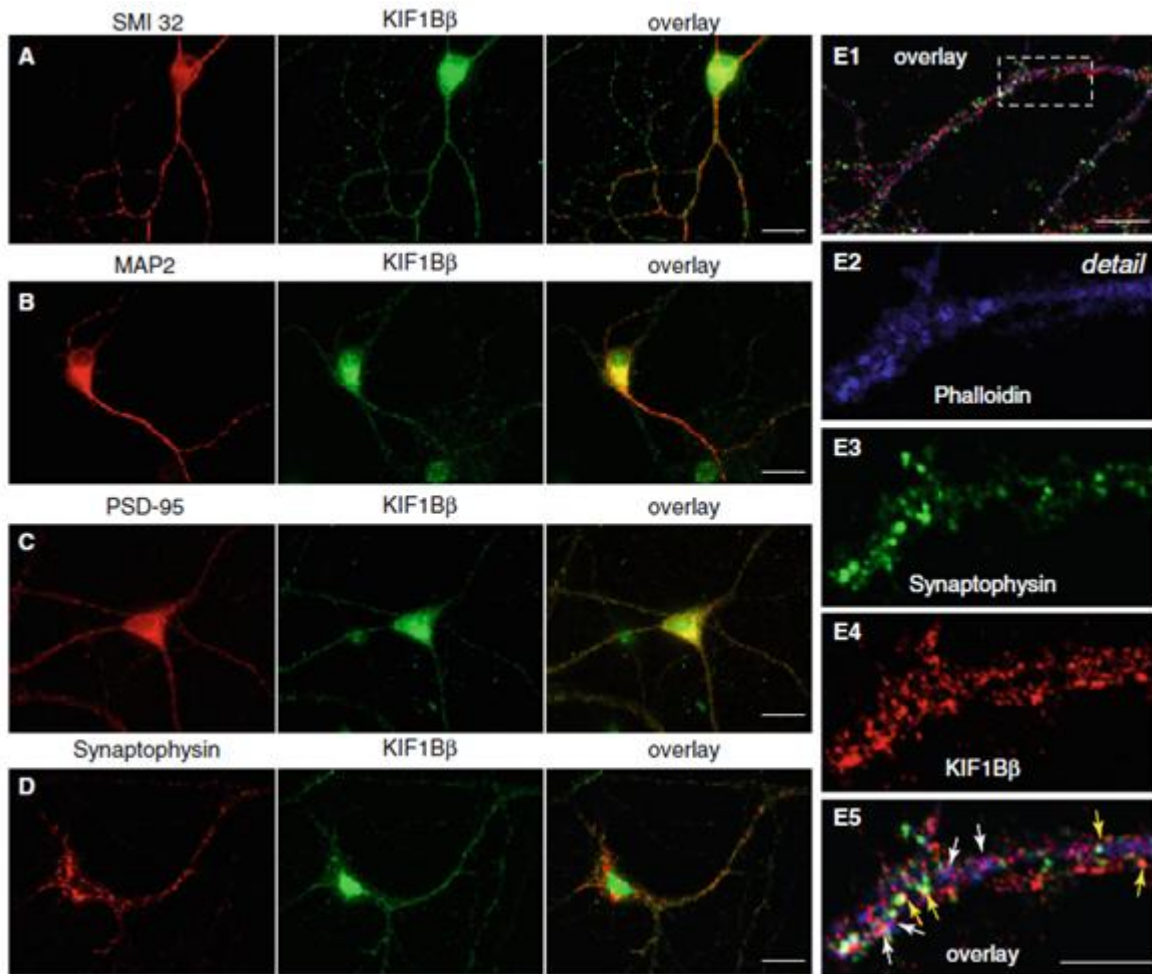
Er zijn veel soorten kinesines waarvan een paar een rol spelen in synaptisch transport. Een van die soorten kinesines zal nu worden besproken.

3.2 KIF1B β

Om de verdere rol van motoreiwitten in synaptisch transport en activiteit uit te lichten, wordt, als voorbeeld van een motoreiwit betrokken bij synaptisch transport, KIF1B β behandeld. KIF1B β is een motoreiwit dat veel in neuronale cellen te vinden is, en ziektes als MS en sporadische ALS worden in verband gebracht met mutaties in het gen coderend voor het eiwit. Van KIF1B β zijn momenteel 6 isoformen bekend. In *C. elegans* is al aangetoond dat de KIF1B β homoloog, UNC-104, nodig is voor het transport van synaptische precursor vesicles. Ook KIF1B α bestaat, deze is geassocieerd met post-synaptische eiwitten en met synaptische scaffold eiwitten.

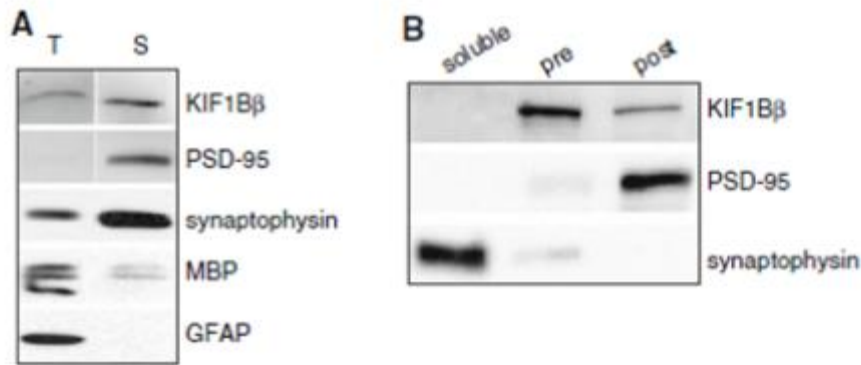
Meerdere uitgebreide onderzoeken zijn gedaan naar de rol van KIF1B β bij het transport van synaptische vesicles in zoogdieren. Er zijn verschillende technieken waarmee een interactie tussen een motoreiwit en zijn cargo, zoals KIF1B β en synaptische vesicles, aangetoond kan worden. Onder andere fluorescentiemicroscopie (met antilichamen of GFP-fusie eiwitten), yeast two-hybrid system, immunoprecipitatie en western blotting zijn in onderzoeken gebruikt om de rol van KIF1B β in vesiculair transport te bepalen.

Een zeer recent onderzoek van Charalambous *et al.* heeft fluorescentiemicroscopie gebruikt om aan te tonen dat KIF1B β gelocaliseerd is in de pre- en postsynaptische structuren, en dat er waarschijnlijk een interactie is tussen KIF1B β en microtubuli en KIF1B β en synaptische vesicles. In een celkweek van neuronen kan er met een antilichaam voor KIF1B β (anti-KIF1B β), met daaraan een fluorescerend eiwit, KIF1B β gelokaliseerd worden door de cellen te bekijken met een fluorescentiemicroscopie. Door dit ook te doen met anti-SMI 32 (een eiwit dat zich in motorneuronen bevindt), anti-MAP2 (een dendritische microtubulimarker), anti-PSD-95 (een postsynaptische marker) en anti-Synaptophysin (een presynaptisch vesicle-eiwit), kan er overlap worden aangetoond tussen KIF1B β en de genoemde eiwitten. Wanneer groen en rood overlappen, is dit te zien als geel. In figuur 1 zijn de resultaten hiervan weergegeven. Te zien is dat er overlap is tussen KIF1B β en SMI-32, niet alleen in het cell lichaam maar ook zijn punten van overlap op de axonen en dendrieten te zien. Dit betekent dat er inderdaad KIF1B β is in de motorneuronen (zie figuur 3.2A). Ook is er overlap op de axonen en dendrieten te zien tussen microtubulimarker MAP-2 en KIF1B β , wat de interactie tussen KIF1B β en microtubuli bevestigt (zie figuur 3.2B). Op dendrieten is de postsynaptische marker PSD-95 gekleurd. Hierbij zijn opnieuw punten te zien waarop de marker KIF1B β samen vallen, wat aangeeft dat KIF1B β zich in post-synaptische structuren bevindt (zie figuur 3.2C). De overlap met de presynaptische vesiclemarker Synaptophysin (zie figuur 3.2D) suggereert dat KIF1B β zich in presynapsen bevindt en een interactie aangaat met presynaptische vesicles. In figuur 3.2E is een uitvergroting te zien van een dendriet met opnieuw immunomarkers. In figuur 3.2E2 is Phalloidin getagd, wat F-actine in dendritische spines highlight. Tussen deze, synaptophysin en KIF1B β is in 3.2E5 opnieuw overlap te zien. Bij de gele pijlen zijn duidelijk kleine gele bolletjes te zien, welke aangeven dat KIF1B β zich bevindt in presynapsen, bij de witte pijlen zijn paarse bolletjes te zien (blauw en rood wordt paars), waarbij dus KIF1B β in dendritische spines gelocaliseerd is.



figuur 3.2: Fluorescentiemicroscopie met behulp van antilichamen. In A, B, C en D; de overlap tussen KIF1B β en een aantal neuronale en synaptische eiwitten. In E; een close-up met overlap tussen verschillende neuronale markers en KIF1B β .

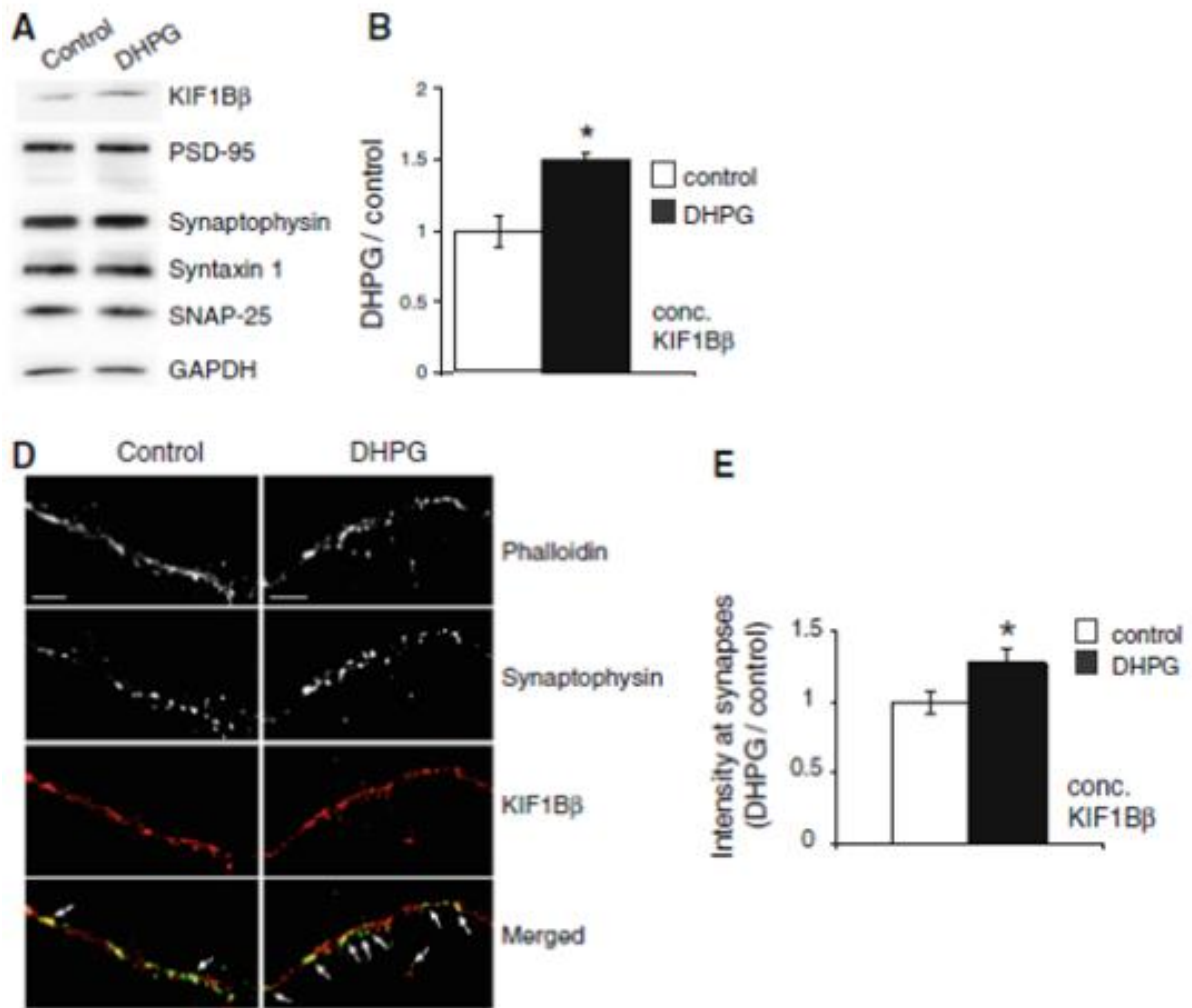
Een andere manier om vast te stellen dat KIF1B β in hogere concentraties aanwezig is in synaptische structuren, is om homogene monsters van hersenen te vergelijken met monsters van synaptoneurosomen: gepurificeerde pre- en postsynaptische structuren. Met een Western blot kunnen vervolgens de verschillende concentraties van KIF1B β worden vergeleken. In figuur 3.3A is te zien dat KIF1B β in hogere concentraties aanwezig is in synaptoneurosomen (S) dan in een homogeen monster van een brein (T). Ter controle is ook gekeken naar PSD-95, synaptophysin, en de niet-neuronale eiwitten MBP en GFAP. Vervolgens is de synaptoneurosoom gefractioneerd tot een oplosbaar monster, een presynaptisch monster en een postsynaptisch monster. Zoals verwacht is PSD-95 te vinden in het monster van de postsynaps, aangezien het gebonden is aan het cytoskelet in de postsynaps. Synaptophysin is oplosbaar, omdat het geassocieerd is met vesicles. KIF1B β blijkt zowel in de pre- als postsynaps voor te komen, maar is niet opgelost. Dit suggereert opnieuw dat KIF1B β is gebonden, waarschijnlijk aan microtubuli, figuur 3.3B.



figuur 3.3: **A;** Western blots van breinmonsters en synaptoneurosomen. De concentratie KIF1B β is hoger in de synaptoneurosomen. **B;** een Western blot van gepurificeerde pre- en postsynaptische structuren en opgeloste eiwitten. KIF1B β zit in de pre- en postsynaps, maar komt niet opgelost voor.

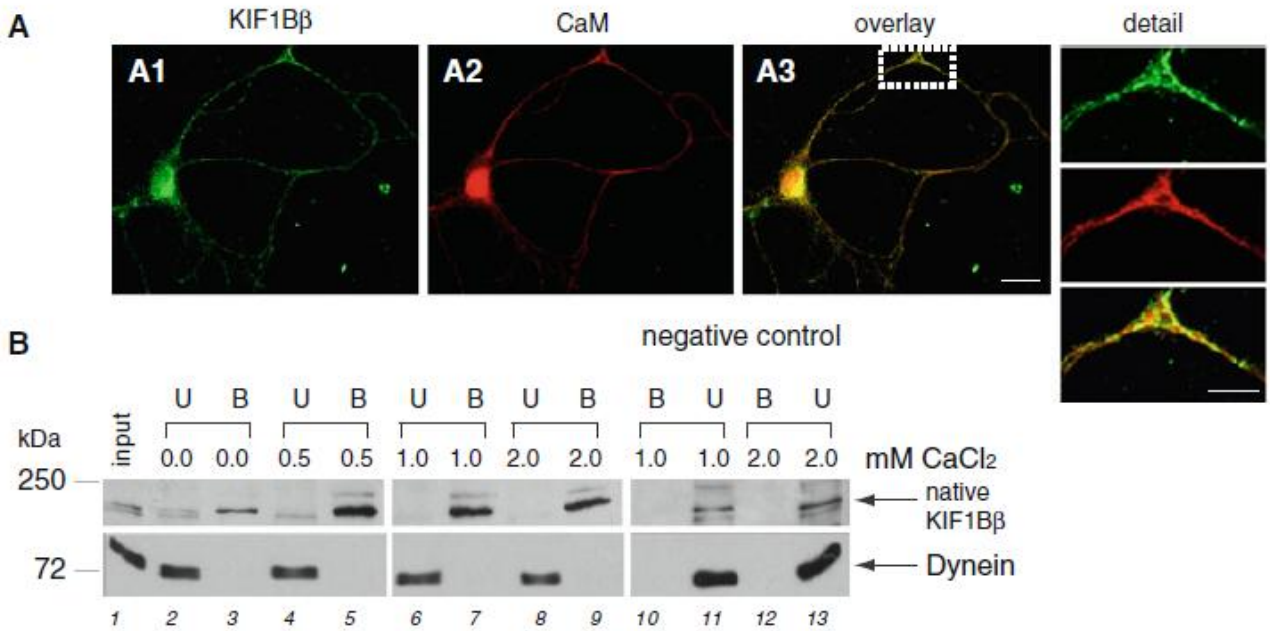
Omdat KIF1B β veelal voorkomt in synaptische structuren is er onderzoek gedaan naar de vraag of KIF1B β meer in actieve synapsen voorkomt. Dit is onderzocht met behulp van kwantitatieve Western blotting van synaptoneurosomen. Ook is immunofluorescentie op levende neuronen uitgevoerd. In beide gevallen is de synaps gestimuleerd door DHPG gedurende 5 minuten (en in het geval van een Western blot vervolgens gefixeerd) en vervolgens gekeken naar KIF1B β concentraties en naar de concentraties van andere eiwitten. Uit de immunoblot (zie figuur 3.4A) bleek dat alleen de concentratie KIF1B β significant toenam (zie figuur 3.4B), andere synaptische eiwitten niet. Ook met de fluorescentiemicroscoop is gekeken naar KIF1B β en pre- en postsynaptische markers (zie figuur 3.4D). Met behulp van een algoritme (Manders' coefficient) is na stimulatie met DHPG berekend hoeveel overlap er was, deze bleek significant toe te zijn genomen (zie figuur 3.4E). Ook bij andere stimulators nam de concentratie KIF1B β significant toe. Hieruit kan geconcludeerd worden dat bij stimulatie van een neuron, de concentratie KIF1B β in de synapsen stijgt. Omdat de cel maar 5 minuten gestimuleerd is, is het onwaarschijnlijk dat dit door transcriptie komt, maar zal KIF1B β gerecrueteerd worden.

Om meer te weten te komen over het belang van activatie-afhankelijke lokalisatie van KIF1B β in de synapsen, is gekeken of KIF1B β een interactie aangaat met andere eiwitten. Het yeast two-hybrid system (box) is gebruikt om een screening te doen van een humane cDNA-bank van het brein. Hieruit kwamen 54 positieve fusies, waarvan er 25 codeerden voor het CALM1 gen, 21 voor het CALM2 gen en 8 voor het CALM3 gen. De genen liggen op verschillende chromosomen, maar ze coderen allemaal voor hetzelfde eiwit: Calmoduline (CaM). CaM is een calcium-afhankelijk eiwit dat andere eiwitten kan activeren wanneer hij calcium gebonden heeft.



Figuur 3.4: Effect van neuronactiviteit op KIF1B β -concentraties in de synaps. In **A**, **B** en **E** is het zichtbaar dat er een significant verschil is tussen activatie en controle. **D**; ondersteunende fluorescentiemicroscopie. **C**; Effect van activatie op andere synaptische eiwitten. **F**; effect van activatie met verschillende stoffen.

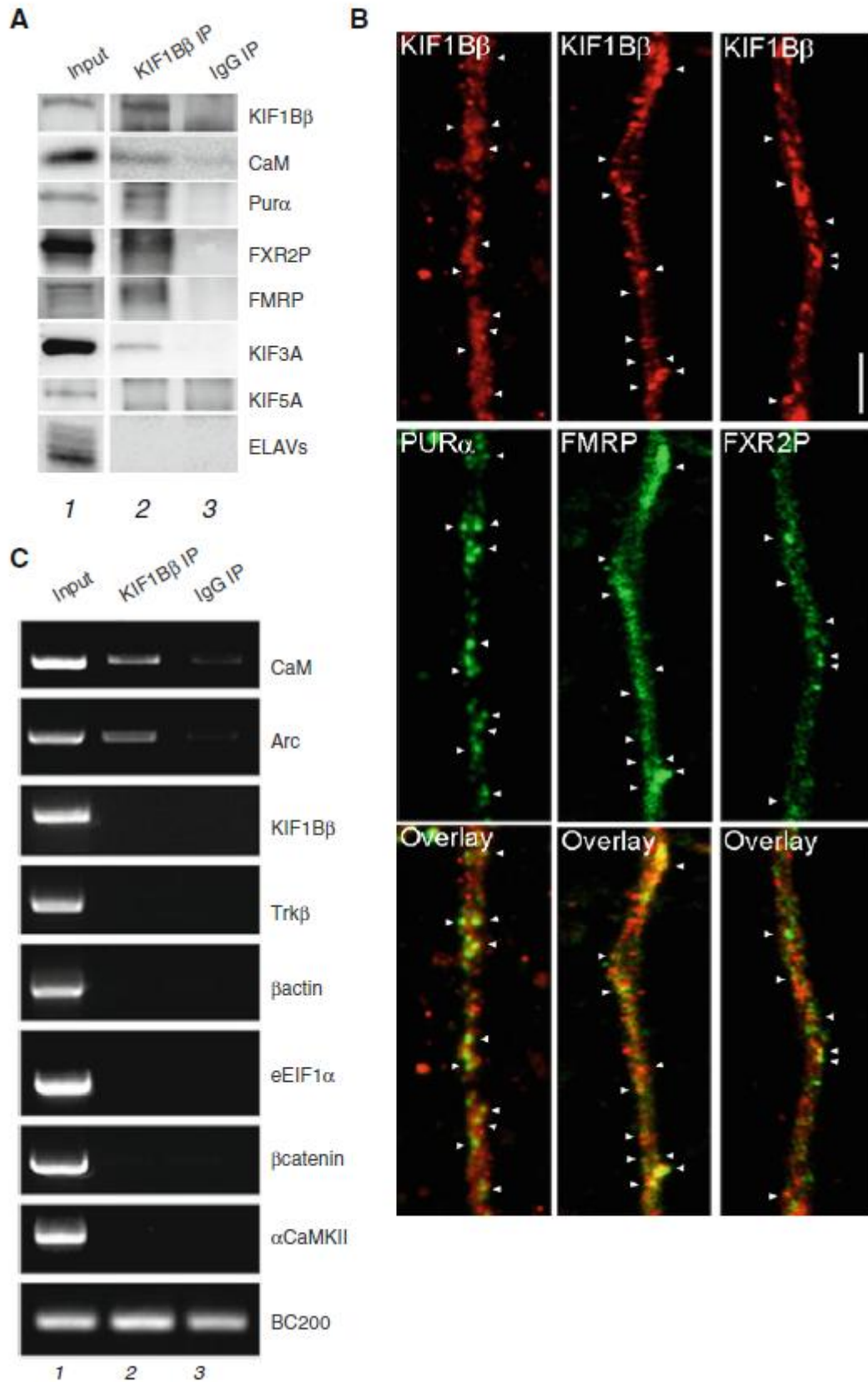
Om te kijken of er inderdaad een interactie is tussen CaM en KIF1B β , is opnieuw gebruik gemaakt van fluorescentiemicroscopie. Uit de resultaten bleek dat de lokalisatie van CaM en KIF1B β grotendeels overeen komt (zie figuur 3.5A). Om met zekerheid te kunnen stellen dat er sprake is van een interactie, is een pull-down assay gedaan. Hierbij is gekeken naar de hechting van CaM aan KIF1B β bij verschillende concentraties Ca²⁺. De fractie die door de assay heen is gelopen (U) en de fractie die is gehecht (B) zijn beide geanalyseerd met een Western blot. Dynein is gebruikt om te controleren of er in alle slotjes evenveel eiwit gebruikt is. De resultaten van dit experiment zijn verwerkt in figuur 3.5B. Hierbij is duidelijk te zien dat KIF1B β gebonden is bij hogere calciumconcentraties. In de negatieve controle, waar alleen de Sapharosebeads aanwezig waren, vond geen binding plaats. Dit bevestigt dus dat KIF1B β aan CaM bindt, met een betere binding bij hogere calciumconcentraties.



Figuur 3.5: Interactie tussen CaM en KIF1B β . A; fluorescentiemicroscopie met behulp van antilichamen. B; western blots van pull-down essays met CaM gebonden aan sapharose beads. U is unbound, B is Bound.

De interactie tussen CaM en KIF1B β geeft een verklaring voor de activiteit afhankelijke mobilisatie van KIF1B β , omdat CaM-activiteit afhankelijk is van calcium. Calciumconcentraties stijgen namelijk bij synaptische signalering, zoals eerder verteld in de inleiding, omdat een actiepotentiaal de celmembraan depolariseert, wat in de synaps leidt tot influx van calcium door opening van voltage-afhankelijke ionkanalen. Nu het duidelijk is dat KIF1B β activatie-afhankelijk wordt aangestuurd door CaM, is de volgende vraag of KIF1B β nog andere cargo dan vesicles transporteert.

Om te achterhalen welke moleculen en structuren KIF1B β nog meer vervoert, is een immunoprecipitatie van KIF1B β uit het brein van een muis. Een western blot van deze immunoprecipitatie liet zien dat verschillende eiwitten ook waren gebonden aan KIF1B β , direct of indirect. Door de onderzoekers werd vermoed dat KIF1B β wel een rol zou kunnen spelen in het transport van mRNP's, omdat sommige motoreiwitten van de KIF5 subfamilie dit ook doen. Daarom is in de Western blot gebruikt gemaakt van probes voor eiwitten die interacties aan kunnen gaan met mRNA. Hieruit kwam naar voren dat er een interactie is tussen KIF1B β en drie eiwitten die bekend staan als mRNA-bindende eiwitten: Pura (purine-rich element binding protein alpha), FXR2P (fragile X mental retardation protein) en FMRP (fragile X related protein 2) (zie figuur 3.6A). Dit werd bevestigd met fluorescentiemicroscopie (zie figuur 3.6B). Ook werden CaM en KIF3A gevonden, maar KIF5 niet (zie figuur 3.6A). Van KIF5 is het bekend dat dit eiwit een mRNP-complex vormt met onder andere ELAV's, welke ook niet aan werden getroffen in de immunoprecipitatie. Het gaat hier dus om een nieuw complex dat mogelijk mRNP's vervoert.



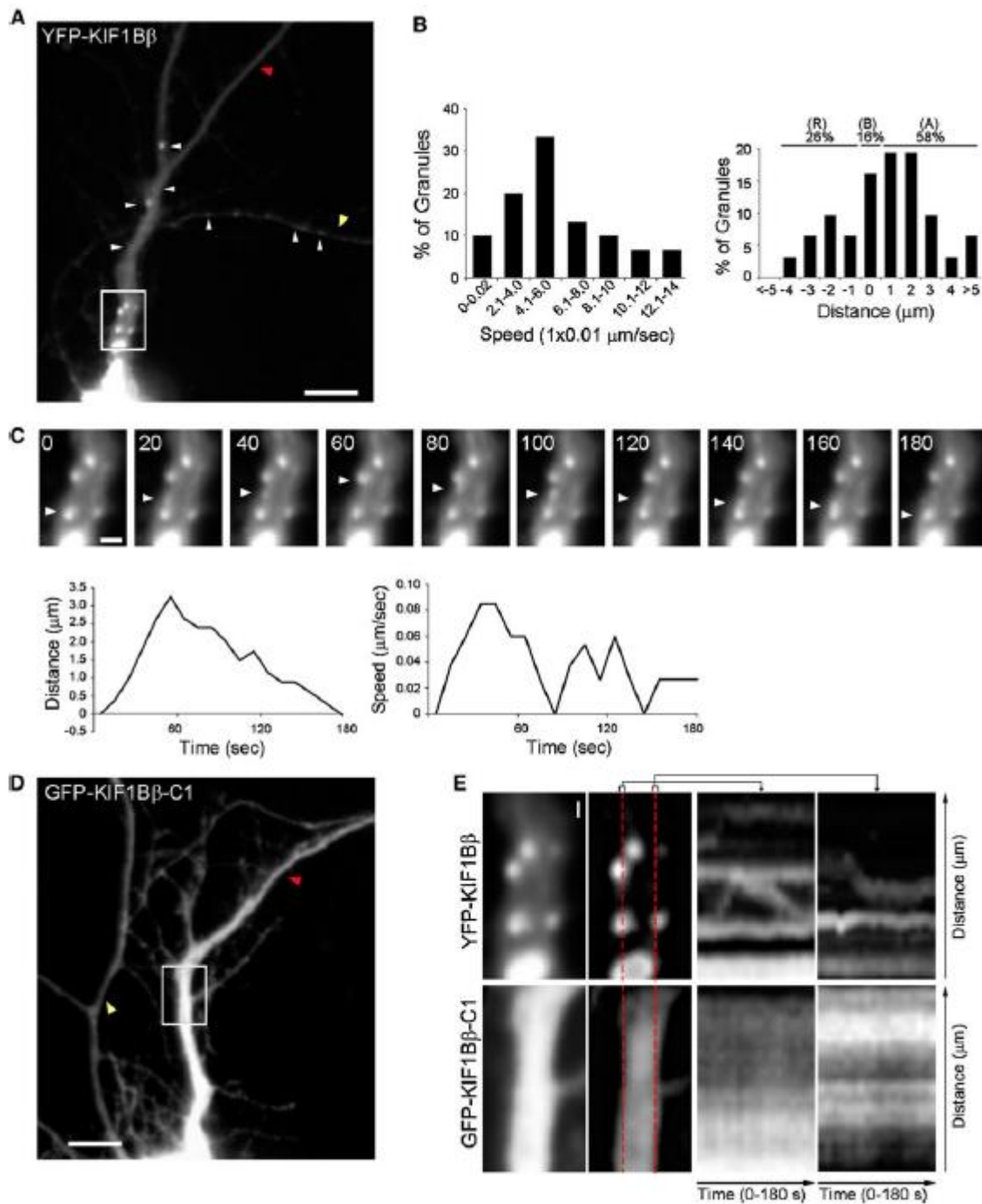
figuur 3.6: **A;** de western blot van een immunoprecipitatie op KIF1Bβ in het brein van een muis. Verschillende neuronale eiwitten binden of vormen een complex met KIF1Bβ. **B;** ondersteuning van de interactie van bepaalde eiwitten door het aantonen van overlap met fluorescentiemicroscopie. **C;** Northern blot van dezelfde immunoprecipitatie. mRNA van CaM en Arc komen in een complex met KIF1Bβ voor.

Om te kijken of en welke mRNA's dit nieuwe complex met KIF1B β zou kunnen vervoeren, is er een RT-PCR in combinatie met een Southern blot uitgevoerd op het KIF1B β -immunoprecipiteerde complex. Hieruit kwamen twee mRNA's naar voren: *Arc* en *CaM* mRNA. In het stuk over neuroplasticiteit gaan we verder in op de mogelijke neuroplastische functies.

Om te controleren of er daadwerkelijk transport plaats vindt en of KIF1B β hiervoor verantwoordelijk is, is er een construct gemaakt van KIF1B β en GFP. Vervolgens is met microscopie het verloop van het fluorescentiepatroon in neuronen gevolgd over een bepaalde tijd. Te zien was dat er granules gevormd werden in zowel axonen als dendrieten, in figuur 3.7A is een opname van een dendriet te zien. De snelheid en afstand die de granules in dendrieten afgelegd hebben is gemeten, hierbij kwam naar voren dat de snelheid waarmee het transport plaatsvond (gemiddeld 0,060 $\mu\text{m/s}$) ongeveer overeen kwam met eerder waargenomen snelheden van mRNA transport. Het meeste transport was in anterograde richting, ofwel richting de synapsen (zie figuur 3.7B). In figuur 3.7C is een voorbeeld te zien van een granule gevolgd in de tijd, met daaronder een afstand/tijd grafiek en een snelheid/tijd grafiek. De resultaten kunnen verklaard worden met het feit dat in dendrieten microtubuli beide kanten op georiënteerd zijn, en dat er competitie is voor transport met andere motoreiwitten. Dit is opnieuw consistent met onderzoeken naar ander mRNP transport.

Het zou natuurlijk zo kunnen zijn dat KIF1B β meelift op een cargo van een ander motoreiwit, zoals KIF3A, waarvan eerder is gevonden dat het ook deel is van het KIF1B β -mRNP complex. Om dit te weerleggen, is er een construct gemaakt van GFP-KIF1B β dat het motordomein mist (GFP-KIF1B β -C1). Wanneer weer wordt gekeken naar levende neuronen met dit construct, blijkt de granulevorming compleet te zijn vervallen (zie figuur 3.7D). In figuur 3.7E is in de meest linkse foto een close-up te zien van een aantal granules, vervolgens is de in de figuur één naar rechts twee doorsnedes gemaakt. Het fluorescentiepatroon is bijgehouden gedurende 180 seconden, te zien in de twee foto's ernaast. Zonder motordomein blijft dit volledig constant, terwijl met motordomein een fluctuatie te zien is. Deze resultaten tonen aan dat de granulevorming en het transport volledig afhankelijk zijn van (het motordomein van) KIF1B β .

Concluderend kan dus gesteld worden dat KIF1B β een motoreiwit is dat betrokken is bij transport van synaptische vesicles, en in zowel pre- als postsynaptische structuren terug te vinden is. De rekrutering van KIF1B β is afhankelijk van de activatie van het neuron, dit komt doordat KIF1B β kan binden met CaM, welke calciumafhankelijk is. KIF1B β gaat ook een interactie aan met meerdere mRNA-bindende eiwitten en mRNA zelf, om zo een mRNP-complex te vormen. Hierin worden *Arc* en *CaM* mRNA vervoerd naar de synapsen., zowel in de dendrieten als in axonen. Dit transport is volledig afhankelijk van KIF1B β . Maar wat is het precieze effect van deze rekrutering van mRNA? (Charalambous et al. 2012)



figuur 3.7: A, B en C; beweging van KIF1B β -complexen gevolgd met fluorescentiemicroscopie en de bijbehorende plots. D en E; fluorescentiemicroscopie van een neuron dat KIF1B β zonder motordomein heeft. Er is geen granulevorming of transport meer.

3.3 Neuroplasticiteit

Omdat er in voorgaand onderzoek is gebleken dat KIF1B β naar actieve synapsen wordt verplaatst en associeert met mRNA's van *Arc* en *CaM*, is er een grote kans dat KIF1B β betrokken is bij synaptische plasticiteit.

Het transport van *CaM* mRNA leidt logischerwijs tot een verhoogde concentratie CaM eiwit in synapsen. CaM is belangrijk voor het functioneren van de synaps, het is namelijk betrokken bij calciumafhankelijke activatie van eiwitten betrokken bij synaptische signalering. Daarom is het goed denkbaar dat, door de functie van CaM, de rekrutering van KIF1B β de synapsactiviteit bevordert. Hiernaast kan verhoogde concentraties CaM in de synaps ervoor zorgen dat er meer KIF1B β wordt gerekruteerd, aangezien ook KIF1B β afhankelijk is van CaM. Dit kan goed leiden tot een positieve-feedback loop. Dit suggereert dat rekrutering van KIF1B β naar een synaps kan leiden tot een verhoogde activiteit van die synaps, oftewel neuroplasticiteit. (Charalambous et al. 2012)

Ook het *Arc* mRNA dat wordt getransporteerd, suggereert een indirecte neuroplastische werking van KIF1B β . *Arc* heeft namelijk een rol in LTD, LTP en homeostatische plasticiteit. *Arc* kan een interactie met dynamin en endophilin aangaan, welke samen (indirect) zorgen voor endocytosis van AMPA receptoren. Het precieze mechanisme hiervan is nog onbekend. LTD kan ook worden geïnduceerd door stimulatie van mGluR, een glutamaatreceptor. mGluR kan na stimulatie via een pathway de translatie van *Arc* bevorderen, om op deze manier een effect te hebben op de endocytose van AMPAR om zo LTD te stimuleren. Uit onderzoeken is gebleken dat *Arc* ook een interactie aan kan met F-actine. Dit is geen directe interactie, er zullen waarschijnlijk andere eiwitten bij betrokken zijn. Uit latere onderzoeken bleek dat *Arc* een rol speelt in fosforylatie van cofilin, een eiwit dat F-actine depolymeriseert. Door deze fosforylatie gebeurt dit niet meer, en dus stimuleert *Arc* F-actine. Zoals eerder gezegd consolideert dit de LTP van de synaps.

Dit zijn slechts twee voorbeelden van de invloed van *Arc* op neuroplasticiteit. *Arc* is dus een eiwit dat op verschillende manieren bij kan dragen aan neuroplasticiteit, afhankelijk van de andere eiwitten aanwezig in de synaps. Omdat KIF1B β ook activiteitafhankelijk is, kan deze een rol spelen bij deze neuroplastische werking van *Arc*. De precieze rol van KIF1B β in neuroplasticiteit is nog niet bekend, er zal nog verder onderzoek naar gedaan moeten worden. (Bramham et al. 2008)

4. Conclusie

Microtubuli lijken geen rol te spelen in de presynaps voor zover bekend is. Het staat echter wel vast dat de microtubuli regulatie een rol speelt in het vormen van boutons (het equivalent van axonen) in *Drosophila*. Het blijkt dat eiwitten zoals aPKC en wingless via andere eiwitten de microtubuli kunnen reguleren. De regulatie hangt samen met een veranderde morfologie van boutons.

Ook is gebleken dat microtubuli regulatie een rol speelt in het vormen van axonen. Microtubuli die lopen zorgen voor het ontstaan van een grotere growth cone en hierdoor groeien axonen veel sneller.

Microtubuli spelen wel een belangrijke rol in de postsynaps. Dat microtubuli dendritische spines ingaan is onder andere aangetoond door Hu *et al.* (2008). Het blijkt dat microtubuli bij verhoogde activiteit van een neuron in meerdere mate binnendringen in spines en filopodia. Dit gebeurt iedere keer tijdelijk, waardoor gespeculeerd wordt dat microtubuli een functie hebben bij transport. Er is ook bewezen dat microtubuli spines binnengaan van distale en proximale kant, wat er op duidt dat transport van materiaal van zowel andere spines en het cellichaam naar de doelspine kan worden getransporteerd.

Nadat bekend werd dat de microtubuli binnendringen in dendritische spines is meer onderzoek gedaan naar de regulatiesystemen van het lichaam om te zorgen voor meer of minder microtubuli in de spines. Het blijkt dat LTD-inductie effect heeft op de microtubuli en het microtubuli +TIPbindende eiwit EB3. Dit gaat in een snelle en een langzame fase na LTD-inductie (Kapitein *et al.*, 2011). In de snelle fase, ongeveer 1 minuut na LTD-inductie, laten de EB3 eiwitten los van de plusuiteinden van de microtubuli, en verdelen ze zich homogeen in het cytosol. Echter, zo'n 10 minuten na LTD-inductie binden de EB3 eiwitten aan MAP2, een microtubuli bindend eiwit dat zich langs microtubulebundels bevindt en deze stabiliseert. Een reden hiervoor zou kunnen zijn dat de microtubuli niet meer kunnen groeien door een gebrek aan +TIPgebonden EB3, en hierdoor geen belangrijke eiwitten en andere moleculen meer naar de spine kunnen brengen. Hierdoor kan de spine niet groeien. Via nog onbekende pathways zullen na LTD spines zelfs kleiner worden.

Bepaalde motoreiwitten zijn betrokken bij transport naar de synapsen. Een voorbeeld hiervan is KIF1B β . KIF1B β transporteert synaptische vesicles en mRNP complexen naar synapsen. Het motoreiwit is activiteitafhankelijk door de interactie met CaM. Door deze activiteitafhankelijkheid en doordat het CaM en Arf mRNA transporteert, kan KIF1B β een rol hebben in neuroplasticiteit. Zo kan CaM een positieve feedbackloop veroorzaken, terwijl Arf meerdere functies in neuroplasticiteit kan hebben, zowel in LTP als LTD.

Microtubuli spelen dus een belangrijke rol bij synapsen, met name als het gaat om synaptische plasticiteit. Hoe dit systeem werkt is echter momenteel een belangrijk onderzoeksg gebied, en over de precieze functionering van microtubuli bij het vormen van en transporteren van eiwitten naar synapsen, zal de komende jaren veel bekend worden. Over de functie van microtubuli in presynapsen is echter weinig bekend, en de vraag is dan ook of microtubuli bij de presynaps een rol van betekenis spelen.

Referenties

Artikelen

Direct gerefereerde artikelen:

- Akhmanova A, Steinmetz MO, 2008, *Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips*. Nat Rev Mol Cell Biol 9:309–322.
- Cataline Ruiz-Canada, James Ashley, Stephanie Moeckel-Cole, Eric Drier, Jerry Yin and Vivian Budnik, *New synaptic bouton formation is disrupted by misregulation of microtubule stability in aPKC mutants* – Neuron, Vol. 42, 567-580, 2004
- Clive R. Bramham, Paul F. Worley, Melissa J. Moore, and John F. Guzowski - *The Immediate Early Gene Arc/Arg3.1: Regulation, Mechanisms, and Function* - The Journal of Neuroscience, November 12, 2008 • 28(46):11760 –11767
- Despina C. Charalambous, Emanuela Pasciuto, Valentina Mercaldo, Pietro Pilo Boyl, Sebastian Munck, Claudia Bagni, Niovi Santama - *KIF1Bb transports dendritically localized mRNPs in neurons and is recruited to synapses in an activity-dependent manner* - Cell Mol Life Sci. 2012 Sep 4.
- Govindarajan A, Kelleher RJ, Tonegawa S, 2006, *A clustered plasticity model of long-term memory engrams*. Nat Rev Neurosci 7:575–583
- Kapitein L. C, Yau K.W., Montenegro Gouveia S., van der Zwan W.A, Wulf P. S., Keijzer N., Demmers J., Jaworski J., Akhmanova A., Hoogenraad C. C., *NMDA Receptor Activation Suppresses Microtubule Growth and Spine Entry*, 2011, The Journal of Neuroscience, pp 8194-8209
- Claudia Miech, Hans-Ulrich Pauer, Xi He and Thomas L. Schwartz, *Presynaptic local signaling by a canonical wntless pathway regulates development of the Drosophila neuromuscular junction* – The Journal of Neuroscience, October 22, 2008, The Journal of Neuroscience, October 22, 2008 • 28(43):10875–10884
- Silvia A. Purro, Lorenza Ciani, Monica Hoyos-Flight, Eleanna Stamatakou, Eliza Siomou and Patricia C. Salinas, *Wnt regulates axon behaviour through changes in microtubule growth directionality: a new role for adenomatous polyposis coli* – The Journal of Neuroscience, August 20, 2008 • 28(34):8644–8654
- Xindao Hu, Chris Viesselmann, Sookin Nam, Elliott Merriam and Erik W. Dent, *Activity-Dependent Dynamic Microtubule Invasion of Dendritic Spines*, The Journal of Neuroscience, December 3, 2008 • 28(49):13094 –13105

Websites

Figuur Kinesine: http://www.nature.com/nrm/journal/v1/n1/fig_tab/nrm1000_050a_F1.html (geraadpleegd oktober 2012)

Boeken

- Neuroscience, 5th edition, Purves *et al.*, 2012, *chapter 8, synaptic plasticity*.
- The Cell, 5th edition, Alberts *et al.*, 2008, *chapter 16, the cytoskeleton*.