



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Microtubule associated proteins and plasticity in the developing and diseased brain

Boekhoorn, K.

Publication date
2006

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Boekhoorn, K. (2006). *Microtubule associated proteins and plasticity in the developing and diseased brain*. [Thesis, fully internal, Universiteit van Amsterdam].

General rights

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Voor een groot aantal orgaanfuncties is de karakteristieke vorm van individuele cellen van essentieel belang. Hersencellen, ofwel neuronen, hebben lange uitlopers die contact maken met andere cellen, waardoor elektrische signalen van de ene cel naar de andere kunnen worden doorgegeven. De meeste neuronen hebben vele wijdvertakte "antennes" genaamd dendrietten, die signalen ontvangen, maar ze hebben maar een uitloper die signalen verzendt, het axon. Deze specifieke morfologie vereist aanpassingen van het cytoskelet, het cellulaire geraamte. Dit geraamte bestaat onder meer uit lange stevige microtubuli (MT), polymeren van tubuline subunits. Deze zijn essentieel om een cel vorm en stevigheid te geven maar ze zijn ook betrokken in bijvoorbeeld het transport van eiwitten. In plaats van statisch zijn deze MT juist zeer dynamische eenheden, constant onderhevig aan groei en afbraak.

De eisen die aan het cytoskelet gesteld worden zijn afhankelijk van de staat waarin een cel zich verkeert; terwijl volwassen cellen gebaat zijn bij een stevig, onvervormbaar geraamte, hebben delende, groeiende en migrerende cellen juist een cytoskelet nodig dat flexibel is en snel kan groeien en krimpen. De eisen waaraan het cytoskelet van neuronen moet voldoen zijn dus anders in het zich ontwikkelende brein dan in een volwassen brein. Er zijn echter ook in het volwassen brein situaties denkbaar waarin morfologische plasticiteit wordt vereist van neuronen. Bijvoorbeeld tijdens leerprocessen worden contacten tussen neuronen versterkt. Een manier waarop men denkt dat dit kan plaats vinden is bijvoorbeeld door groei van dendrietten en dus ook van MTs.

Om aan deze veranderende eisen aan het cytoskelet te kunnen voldoen zijn allerlei adaptaties aan MT mogelijk. Een daarvan is het binden van MT geassocieerde eiwitten (MAPs), waardoor MT steviger worden en polymerisatie (en dus MT groei) wordt gestimuleerd. Leden van de MAP familie van eiwitten worden gekenmerkt door een of meerdere MT bindende domeinen. De affiniteit van MAPs voor MT, en daarmee dus hun stabiliserende werking, kan op verschillende manieren worden gereguleerd. Door alternatieve splicing kan het aantal MT bindende domeinen worden aangepast, over het algemeen geldt dat hoe meer MT bindende domeinen het eiwit heeft, hoe beter MT worden gestabiliseerd. MAP binding aan MT wordt negatief beïnvloed door fosforylatie van de MAP, waardoor het MT bindende domein a.h.w. wordt afgeschermd van de MT. Een groot aantal MAPs is specifiek voor het brein. Sommige van deze eiwitten zijn lang bekend en veelvuldig bestudeerd, zoals bijvoorbeeld het eiwit tau, dat een belangrijke rol speelt in de ziekte van Alzheimer (AD). De laatste jaren zijn er ook een fors aantal nieuwe leden van deze familie ontdekt, zoals bijvoorbeeld doublecortin (DCX), dat een belangrijke rol speelt in de ontwikkelingsstoornis lissencephalie, gekenmerkt door mentale retardatie en epilepsie.

In dit proefschrift is geprobeerd de rol te achterhalen van twee specifieke MAPs; tau en doublecortin-like (DCL), in morfologische veranderingen van neuronen. We hebben ons gericht op plastische processen tijdens de ontwikkeling, zoals celdeling, groei en migratie, maar ook op veranderingen in het volwassen brein, zoals tijdens leerprocessen en ziekte.

DCX is een recent ontdekte MAP die onder andere hoog tot expressie komt in de embryonale cerebrale cortex. Het is van belang voor de migratie van pasgeboren voorlopers van neuronen van de ventriculaire zone (VZ) naar hun eindbestemming in de corticale plaat (CP). Mutaties in het DCX gen leiden tot een ernstige verstoring van dit migratieproces wat in mensen leidt tot het zogenaamde double cortex syndroom. Doordat cellen niet naar de juiste locatie in de cortex migreren ontstaat er een tweede band van cellen net onder de cortex. Nog recenter is er een gen ontdekt met grote homologie, het zogenaamde doublecortin-camkinase-like (DCLK) gen. Een van de eiwitten die van dit gen afgelezen wordt is doublecortin-like (DCL). Dit eiwit lijkt van belang te zijn voor zowel deling van neuronale voorlopers (de radial glia) als de groei van hun radiale uitlopers. In het **addendum** van dit proefschrift wordt de functie van DCL uitgebreid beschreven.

Hoewel de functie van de DCX en DCLK genen dus op zijn minst gedeeltelijk overlappend is zijn er ook belangrijke verschillen. Zo is DCX niet betrokken in celdeling. Om deze verschillen duidelijker in kaart te brengen hebben we in **hoofdstuk 2** spatiotemporele expressie van de eiwitten DCX en DCL tijdens de embryonale ontwikkeling van de muis met elkaar vergeleken. Dit bracht aan het licht dat DCL al op E9 hoog tot expressie komt en af neemt vanaf E13. DCX daarentegen, is pas vanaf E10/11 zeer beperkt aanwezig, van E13 tot E17 is het zeer prominent aanwezig. Vóór E13 was ook de spatiele expressie van DCL sterk afwijkend van die van DCX. Terwijl DCL hoog tot expressie komt in de VZ en de CP, wordt DCX specifiek tot expressie gebracht in de CP. Na E13 worden DCX en DCL beiden tot expressie gebracht in zowel de CP als de intermediate zone (de laag tussen de CP en de VZ). Zowel de vroege expressie van DCL alsmede de locatie in de VZ, waar juist in deze vroege periode veel neurogenese plaats vindt, duiden op een belangrijke rol van DCL in neurogenese.

Wellicht de meest bekende MAP is het eiwit "tau", wat uitgebreid bestudeerd is en wordt in verband met zijn betrokkenheid in AD. Het tau gen bevat 4 MT-bindende domeinen. Door alternatieve splicing kunnen eiwitproducten met 3 of 4 MT-bindende domeinen worden gevormd (tau-3R en tau-4R). Tau-3R heeft een lagere affiniteit voor MT dan tau-4R. Tijdens de ontwikkeling van het muizenbrein worden vooral tau-3R producten gevormd, in de 2^e week na de geboorte vindt een omslag plaats van de expressie van tau-3R naar tau-4R. De 2^e postnatale week is een belangrijke fase voor de ontwikkeling van de hippocampus, een belangrijk gebied voor leren en geheugen wat is aangedaan in AD. In tegenstelling tot de meeste andere hersengebieden, die gevormd worden voor de geboorte, worden de meeste cellen van de dentate gyrus (DG) van de hippocampus in de eerste

twee weken na de geboorte gevormd. Na deze 2^e week neemt neurogenese snel af, terwijl groei en migratie nog wat langer door gaan. Het is aannemelijk dat de verschillende tau isovormen een belangrijke rol spelen in de ontwikkeling van de hippocampus.

Inderdaad is door Kristina Sennvick aangetoond dat tau deletie in primaire hippocampale celcultures leidt tot toename in celdeling, terwijl neuronale differentiatie en de groei van uitlopers vertraagd werd. Door in deze cultures zonder tau de 4R isovorm tot expressie te brengen, kunnen al deze veranderingen worden opgeheven. Expressie van tau-3R daarentegen kan alleen de uitgroei van uitlopers gedeeltelijk normaliseren, terwijl het geen remmend effect heeft op celdeling of een stimulerend effect op neuronale differentiatie. Dit wijst er dus op dat tau-4R een veel groter effect heeft op de maturatie van neuronen dan tau-3R. Om te bestuderen wat het effect is van de verschillende isovormen in het intacte brein hebben we in **hoofdstuk 3** gebruik gemaakt van het zogenaamde tau knock-out/ knock-in (tau-KOKI) model. In dit model komt geen tau-3R tot expressie terwijl tau-4R alleen aanwezig is vanaf de 2^e postnatale week. In de hippocampus blijkt de expressie van tau-4R erg laag in KOKI's. De gereduceerde expressie van tau-4R was geassocieerd met een toename in celdeling in DG in de 2^e postnatale week, 8 weken na de geboorte was de geboorte van nieuwe cellen vergelijkbaar met controle muizen. De transiënte toename in celdeling leidt tot de productie van meer neuronen en dus tot een grotere hippocampus. Dendrietbomen van deze cellen zijn op 8 weken echter wel kleiner dan die van controles. Blijkbaar heeft tau-4R alleen een remmend effect op celdeling in de ontwikkeling terwijl het stimulerende effect op de groei van uitlopers tot uiting komt op een leeftijd van twee maanden. Deze morfologische verandering in de KOKI hippocampus hebben een positief effect op het gedrag van de muis in de object recognition test (ORT), een test voor geheugen, maar zijn niet gerelateerd aan veranderingen in LTP in de hippocampus.

De affiniteit van tau voor MT wordt niet alleen beïnvloed door alternatieve splicing, ook fosforylatie reduceert de affiniteit van tau voor MT. Tau fosforylatie is hoog tijdens de ontwikkeling, waar het geassocieerd is met celdeling, maar laag in volwassen hersenen. Echter in AD en in frontotemporale dementie (FTD, een familiäre dementie veroorzaakt door mutaties in het tau gen), is tau gehyperfosforyleerd. Dit betekent dat tau meer gefosforyleerd is dan tijdens de ontwikkeling. Dit gehyperfosforyleerde tau accumuleert in zieke cellen, genaamd "tangles". Men vermoedt dat hyperfosforylatie van belang is voor de geheugen verlies in AD en FTD.

Om dit te testen hebben we in **hoofdstuk 4** gebruik gemaakt van tau transgene muizen met de FTD mutatie P301L. Deze muizen vertonen FTD karakteristieken zoals axonopatie en toenemende geheugendefecten parallel aan toenemende tau hyperfosforylatie. Als deze dieren worden getest in de ORT op een leeftijd van twee maanden, voordat hyperfosforylatie optreedt, blijkt verrassend genoeg dat ze beter leren dan controle dieren. Ook LTP is toegenomen in de DG van jonge P301L muizen. Deze veranderingen waren onafhankelijk van morfologische veranderingen

zoals neurogenese en de grootte van de dendrietboom. Deze resultaten laten in de eerste plaats zien dat tau mutaties op zich niet leiden tot geheugendefecten, in dit geval blijkt de mutatie op zich juist gunstig is voor het leervermogen van de muis. Het is dan ook aannemelijk dat tau hyperfosforylatie een belangrijke rol speelt in geheugenproblemen in FTD. Een tweede belangrijke conclusie die aan deze resultaten kan worden verbonden is dat tau een belangrijke rol speelt in processen die ten grondslag liggen aan geheugen formatie, en dat dit niet gerelateerd is aan morfologische veranderingen. Op deze manier heeft tau dus duidelijk meer functies dan "alleen" maar het onderhouden of aanpassen van cellulaire morfologie.

In hoofdstuk 3 hebben we laten zien dat tau effect heeft op neurogenese tijdens de ontwikkeling. Hoewel op veel kleinere schaal, vindt neurogenese ook plaats in de volwassen DG. Aangezien ook schade aan de hippocampus invloed heeft op neurogenese is het mogelijk dat neurogenese is veranderd in AD. Daarom hebben we in **hoofdstuk 5** veranderingen in proliferatie bestudeerd in een preseniel cohort van AD patiënten. Expressie van de proliferatiemarker Ki-67 was toegenomen in de AD hippocampus. Dit verschil kan worden toegedicht aan een toename in proliferatie in de vasculatuur en in regionen waar zich relatief veel glia bevinden. Gebaseerd op deze resultaten en in combinatie met markers voor glia, jonge neuronen en de vasculatuur concluderen we dat neurogenese niet is toegenomen in dit cohort van AD patiënten, maar dat proliferatie in bloedvaten en glia weldegelijk is veranderd.

MAPs worden gezien als MT stabilisators. Recent onderzoek zoals ook beschreven in dit proefschrift laat zien dat als zodanig MAPs een belangrijke rol spelen in plastische processen zoals deling, groei, migratie, en leren en geheugen. Hoewel veel MAPs en hun verschillende isovormen overlappende functies hebben is het aannemelijk dat verschillen in expressiepatronen, het aantal MT-bindende domeinen en mogelijkheden voor fosforylatie representatief zijn voor verschillende MAP functies. Zo laten we bijvoorbeeld zien dat de tau-3R en tau-4R verschillende functies hebben in de ontwikkeling. Ook de nauw gerelateerde eiwitten DCX en DCL hebben een verschillend expressiepatroon dat gerelateerd is aan hun verschillende functies. Hiermee hebben we laten zien dat ook subtiele verschillen in MAPs en MAP isovormen zeer relevant zijn voor hun functioneren. Door deze functionele verschillen in kaart te brengen ontstaat ook een beter inzicht in de processen waarin MAPs betrokken zijn.