

VU Research Portal

Molecular mechanisms of neuronal dense core vesicle release

van de Bospoort, R.

2013

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

van de Bospoort, R. (2013). *Molecular mechanisms of neuronal dense core vesicle release*. [, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Moleculaire mechanismen van neuronale dense core vesikel afgifte

De communicatie tussen zenuwcellen in de hersenen wordt gereguleerd door de afgifte van bepaalde stoffen. De bekendste zijn de neurotransmitters, die ervoor zorgen dat een elektrisch signaal wordt doorgegeven over de ruimte tussen twee zenuwcellen in (de synapse). Naast de gereguleerde afgifte van neurotransmitters uit synaptische blaasjes vindt er ook gereguleerde afgifte plaats van neuropeptides die in grote granules verpakt worden. Deze neuropeptides worden zo gecondenseerd verpakt dat in electronenmicroscopie de granules een dichte kern lijken te hebben, vandaar de naam dense core vesicles. Er zijn veel verschillende klassen van neuropeptides die allemaal hun eigen specifieke rol hebben in de hersenen. Als de neuropeptide BDNF wordt afgegeven in de ene cel kan dit de fusie van synaptische blaasjes beïnvloeden in een andere cel. Zo kan de activiteit van cellen op elkaar afgestemd worden. Andere neuropeptides zoals Semaphorine 3a kunnen een negatieve invloed uitoefenen op de groei van uitlopers van andere cellen. Zo zijn er nog tal van verschillende functies te noemen voor neuropeptides, maar wat duidelijk is, is dat ze een belangrijke rol hebben in het aansturen van zenuwcellen.

Beiden soorten blaasjes worden gereguleerd afgegeven in reactie op calcium wat de cel inkomt na stimulatie. Voor synaptische blaasjes zijn veel eiwitten bekend die dit proces van fusie met de membraan reguleren, maar voor granules in de centrale zenuwcellen van zoogdieren zijn deze vrijwel geheel onbekend. Granules kunnen ook op meerdere plaatsen fuseren en niet alleen aan het synaptische membraan zoals synaptische blaasjes. De vraag rijst of deze verschillende typen blaasjes dezelfde eiwitten gebruiken om te fuseren met de membraan. Daarom onderzoeken we in dit proefschrift het effect van deletie van de verschillende eiwitten die essentieel zijn voor de fusie van synaptische blaasjes op de fusie van de granules in centrale zenuwcellen van de muis.

In **Hoofdstuk 1** van dit proefschrift wordt het belang van de neuropeptide granules uiteengezet. Eerst worden de verschillende typen blaasjes besproken waarna dieper wordt ingegaan op gereguleerde afgifte in de hersenen. Vervolgens wordt uitgelegd waar deze granules zich bevinden in het lichaam, wat voor verschillende neuropeptides ze kunnen bevatten en het effect van deze neuropeptides in het centrale zenuwstelsel. Ook wordt beschreven hoe granule afgifte tot nu toe bestudeerd is in verschillende model systemen. Het verschil tussen synaptische blaasjes en granules wordt besproken, waarbij gekeken wordt naar wat er op dit moment bekend is over de rol van de verschillende eiwitten in het fusie proces van beiden soorten blaasjes.

In **Hoofdstuk 2** wordt de rol van het 'priming'-eiwit munc13 in de afgifte van granules bestudeerd. Priming eiwitten zorgen ervoor dat granules klaargemaakt worden voor fusie met de membraan. Dit eiwit is essentieel voor de afgifte van synaptische blaasjes, maar de rol van dit eiwit in de afgifte van neuronale granules is onbekend. Er wordt hier onderscheid gemaakt tussen afgifte in synapsen of daarbuiten (extra-synaptisch) met behulp van een live marker voor synapsen. Door gebruik te maken van een neuropeptide gekoppeld aan een pH-gevoelige fluorescente marker, zijn alleen de granules die fuseren met de membraan zichtbaar. Voor elke fusie wordt de timing, locatie en intensiteit bepaald, wat ons veel informatie oplevert over de wijze waarop granules worden afgegeven. Controle cellen (wildtype) laten zien dat granules bij voorkeur op synaptische locaties fuseren. Deletie van het eiwit munc13-1 laat zien dat er minder granules fuseren met de membraan, maar ook dat de voorkeur voor synaptische locaties verdwijnt. Overexpressie van dit eiwit bevestigt dit en laat zien dat er nu meer afgifte

plaatsvindt buiten synaptische locaties. Munc13 is dus een belangrijk eiwit bij het bepalen van de locatie van de fusie van granules in zenuwcellen.

In **Hoofdstuk 3** wordt een ander priming eiwit besproken, CAPS, wat eenzelfde domein heeft als Munc13 en ook een essentieel eiwit is in fusie van synaptische blaasjes. Dit eiwit is ook betrokken bij de fusie van granules in cellen van de bijnier of de pancreas, maar de rol van dit eiwit is in zenuwcellen nog onduidelijk. Een andere studie laat zien dat de verminderde afgifte van catecholamines vanuit de bijnier kan liggen aan het laden van deze granules. Door gebruik te maken van muizen met een deletie voor beide isovormen van CAPS (CAPS-1/2), laten we zien dat CAPS belangrijk is voor de afgifte van granules in het centrale zenuwstelsel. Het laden van neuropeptides in deze granules was onveranderd in deze cellen. Het effect van CAPS of fusie is onafhankelijk van de locatie en laat zien dat CAPS waarschijnlijk als een meer algemene factor betrokken is bij de fusie van granules.

In **Hoofdstuk 4** bestuderen we het eiwit munc18-1 wat essentieel is in de fusie van synaptische blaasjes. Dit eiwit is betrokken bij het stabiliseren van het SNARE complex. Omdat de zenuwcellen van muizen met een munc18-1 deletie niet langer dan vier dagen in kweek kunnen overleven, hebben we het effect van munc18-1 deletie onderzocht in jonge, zich ontwikkelende zenuwcellen. Daarvoor hebben we eerst gekeken hoe de afgifte van granules verschilt tussen jonge zenuwcellen en adulte zenuwcellen. Jonge zenuwcellen fuseren minder vesicles, maar hebben in totaal ook minder vesicles. Wel is het duidelijk dat de afgifte van granules hier niet zo precies samenvalt met de stimulatie als in adulte zenuwcellen. Deletie van munc18-1 in jonge zenuwcellen laat zien dat fusie van granules kan plaatsvinden zonder dit eiwit. Daarnaast laat overexpressie van dit eiwit in adulte zenuwcellen zien, dat meer munc18-1 niet resulteert in toegenomen fusie van granules. Jonge zenuwcellen maken waarschijnlijk gebruik van een andere isovorm van munc18, zoals bijvoorbeeld munc18-2. Adulte zenuwcellen maken mogelijk wel gebruik van munc18-1.

In **Hoofdstuk 5** wordt de rol van de verschillende eiwitten van het SNARE complex onderzocht. De binding van een eiwit op de membraan van het blaasje samen met de twee eiwitten op de plasma membraan zorgt voor de kracht die nodig is om deze twee membrane te fuseren. Voor de fusie van synaptische blaasjes bestaat dit SNARE complex uit de eiwitten syntaxin-1, VAMP2 en SNAP25. De neurotoxines botulinum toxin C en tetanus toxin knippen respectievelijk syntaxin-1/2/3 en VAMP2, wat ervoor zorgt dat de eiwitten niet meer kunnen binden in het SNARE complex. Eén van de isovormen van syntaxin-1/2/3 is betrokken bij de fusie van granules. Na het knippen van het eiwit VAMP daarentegen is er minder en vertraagde afgifte van granules, wat suggereert dat andere isovormen van VAMP kunnen participeren in fusie van granules. De rol van SNAP25 is onderzocht in muizen met een deletie van dit gen. Het merendeel (98%) van deze cellen leeft niet langer dan vier dagen in kweek, terwijl 2% dit wel overleefd. In beide cel populaties is de afgifte van granules niet veranderd vergeleken met controle cellen, wat laat zien dat ook hier een andere isovorm betrokken kan zijn in de afgifte van granules. Deze data laat zien dat granules waarschijnlijk gebruik kunnen maken van twee verschillende soorten SNARE complexen. De verschillende ontwikkelingsstadia van zenuwcellen, van uitgroeiende zenuwcellen tot zenuwcellen in een netwerk in contact met andere zenuwcellen, zouden daarbij bepalend kunnen zijn.

Hoofdstuk 6 concentreert zich op de calcium regulerende eiwitten betrokken bij fusie. Synaptische blaasjes worden tegelijkertijd afgegeven na stimulatie die een krachtige calcium

influx teweegbrengt. Hiervoor is het eiwit synaptotagmin-1 belangrijk dat een lage affiniteit heeft voor calcium en zich op de membraan van synaptische blaasjes bevindt. De afgifte van granules vindt pas plaats na herhaalde stimulatie en is daarom mogelijk anders gereguleerd. Dit hoofdstuk onderzoekt het effect van deletie van het eiwit Doc2 (a/b) en synaptotagmin-1. Doc2 eiwitten zijn betrokken bij spontane afgifte van synaptische blaasjes, bevinden zich in het cytoplasma en hebben een hoge affiniteit voor calcium. Deze verschillende eigenschappen van Doc2 en synaptotagmin bieden de mogelijkheid om te onderzoeken welke eigenschappen van een calcium sensor belangrijk zijn voor de fusie van granules. Deletie van synaptotagmin-1 heeft geen effect op de fusie van granules, terwijl deletie van beide Doc2 eiwitten (Doc2a/b) de afgifte van granules met ~60% reduceert. De localisatie van granules lijkt ook beïnvloed door de deletie van Doc2 eiwitten, zoals we eerder hebben gezien voor het eiwit munc13. Het is in dit opzicht ook interessant dat Doc2 en munc13 aan elkaar binden. Dit complex zou een rol kunnen hebben in het creëren van fusie plekken voor granules op de plasma membraan.

Hoofdstuk 7 plaatst de resultaten van de verschillende hoofdstukken in een breder perspectief en probeert hierbij een model te uit een te zetten van hoe de fusie van granules plaatsvindt in de zenuwcellen van zoogdieren. De resultaten in de verschillende hoofdstukken laten zien dat tijdens de ontwikkeling van zenuwcellen mogelijk verschillende SNARE fusie complexen worden gebruikt. Dit zou te maken kunnen hebben met het feit dat zenuwcellen zich tijdens hun ontwikkeling steeds meer specialiseren. Zo ontstaat er een dendritische boom om signalen op te vangen en een axon dat signalen weer doorgeeft naar de volgende cel. De verschillende complexen zouden kunnen zijn ontstaan door deze specialistische ontwikkeling. Daarnaast denken we dat het aanvoeren van granules anders verloopt dan in andere typen cellen. Granules in zenuwcellen bewegen heen en weer door de cel over een soort kabels en moeten hiervan loskomen om te kunnen fuseren. Wij denken dat munc13 en Doc2 hierbij betrokken kunnen zijn, omdat deze ook bepalend bleken voor de locatie van fusie. Ook zijn er vragen nog onbeantwoord, zoals hoe een cel verschil maakt tussen de granules die verschillende neuropeptides bevatten, of hoe een granule los komt van zo'n kabel en vrij is om te fuseren. Vervolgonderzoek zal er dan ook op gericht zijn deze vragen te beantwoorden om zo meer begrip te krijgen van de regulatie van granule afgifte in het brein van zoogdieren.