

Samenvatting

Regulatie van de instandhouding van spines in de adulte visuele cortex van de muis door TrkB signalering

De rol van TrkB/BDNF-signalering in de ontwikkelende en onvolwassen hersenen is veelzijdig. Het is echter moeilijk gebleken de effecten van BDNF te bestuderen in de intacte volwassen hersenen, zonder de ontwikkeling van de hersenen te beïnvloeden. Het is onduidelijk of afzonderlijke hersengebieden in verschillende mate gevoelig zijn voor TrkB-signalering in het volwassen brein. Dit proefschrift heeft als doel de rol van TrkB-signalering in volwassen corticale plasticiteit te verhelderen en de volgende vragen te beantwoorden.

Wat zijn de structurele en functionele gevolgen van het inhiberen van TrkB-signalering in de adulte cortex? Zijn deze effecten anders in een vergelijkbaar celtype in een ander hersengebied? Kunnen de pre- en postsynaptische effecten van TrkB-signalering van elkaar worden onderscheiden? Fungeert TrkB-signalering als competitief substraat voor corticale plasticiteit? Wat zijn de mechanismes die deze effecten tot stand brengen?

Vanwege het gebrek aan geschikte methodes om deze vragen te beantwoorden moest een nieuwe benadering worden ontwikkeld om deze problemen te omzeilen. **Hoofdstuk 2** behandelt de productie en analyse van een nieuw transgeen muizenmodel waarin membraan-gebonden groen fluorescent eiwit (enhanced green fluorescent protein; EGFP-F) tot expressie wordt gebracht in individuele hersencellen. De transgenexpressie begint op een leeftijd van 6 weken in individuele excitatoire neuronen in de

neocortex en hippocampus, volgens een patroon dat lijkt op een Golgi-kleuring. De EGFP-F expressieniveaus zijn hoog genoeg om acute en chronische *in vivo* imaging uit te voeren van laag II/III pyramidaalcellen van de adulte visuele cortex. In dit muismodel kunnen verschillende transgenen tot expressie worden gebracht in dezelfde individuele neuronen wat de morfologische en functionele analyse van de effecten van verschillende eiwitten mogelijk zal maken.

In **Hoofdstuk 3** is virus-gemedieerde expressie van Cre gebruikt om de flexibiliteit te vergroten van deze Cre-lox recombinitie benadering, zodat genexpressie temporeel en spatieel gereguleerd kan worden. We hebben van twee verschillende virus-systemen gebruik gemaakt om Cre stereotactisch toe te dienen en expressie van β -galactosidase in R26R Cre-reporter muizen tot stand te brengen: adeno-geassocieerd virus (AAV) en lentivirus. Cre-recombinatie was detecteerbaar in de eerste week na de transductie, en het expressiepatroon is vergelijkbaar met beide virussen. De virale transductie was stabiel en zonder waarneembare toxische effecten.

In **Hoofdstuk 4** hebben we dit een vervolg gegeven door mozaïeke expressie van een Cre-afhankelijk functioneel eiwit, de dominant negatieve vorm van de TrkB receptor, TrkB.T1, gefuseerd met EGFP (TrkB.T1-EGFP). Dit maakt het mogelijk de individuele neuronen waarin TrkB-signalering was geïnhibeerd te visualiseren. Neuronen in laag II/III van de primaire visuele cortex (V1), die TrkB.T1-EGFP tot expressie brengen, hebben minder mature spines maar een toename van het aantal immature spines en filopodia vergeleken met neuronen die alleen EGFP-F tot expressie brengen. Amplitude en frequentie van miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) zijn ook gereduceerd in deze neuronen. De

afname van de grootte van de kop van mature spines geeft aan dat postsynaptische TrkB-signalering essentieel is voor het in stand houden van spines in de adulte primaire visuele cortex. Zulke morfologische en electrofysiologische veranderingen worden echter niet waargenomen in het adulte hippocampale gebied CA1. Dit suggereert dat in verschillende hersengebieden verschillende mechanismes verantwoordelijk zijn voor het in stand houden van synapsen.

In **Hoofdstuk 5** hebben we TrkB.T1-EGFP tot expressie gebracht in alle pyramidaal neuronen in V1 door gebruik te maken van een muis die Cre breed tot expressie brengt. In vergelijking met de muis waarin alleen EGFP-F breed tot expressie komt, laten neuron die TrkB.T1-EGFP tot expressie brengen geen verschillen zien in spinedichtheden of spinetype. Er is geen verandering in de amplitude en frequentie van de mEPSCs. De gemiddelde omvang van de spine kop is ook vergelijkbaar, wat erop wijst dat het gelijktijd remmen van TrkB-signalering in een groot deel van de pyramidaalcellen geen effect heeft op het in stand houden van de morfologie van spines of de efficiëntie van excitatoire synaptische verbindingen. Echter, inhibitoire input naar deze neuronen is verminderd, wat wordt gekenmerkt door een vermindering van het aantal parvalbumine-positieve puncta rondom het cellichaam van pyramidaalcellen. De grootte en intensiteit van deze puncta, en de frequentie van inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs) zijn ook beide verminderd.

Onze hypothese is dat de instandhouding van synapsen door postsynaptische TrkB-signalering een competitief proces is, gecontroleerd door het inhibitoire systeem. Populatieactiviteit lijkt een cruciale determinant voor de totale hoeveelheid inhibitie die de excitatoire cellen krijgen. Als TrkB-

signalering in een enkel neuron verminderd is, dan is excitatie alleen in deze cel verminderd en heeft het geen effect op netwerkactiviteit en zodoende ook niet op de totale inhibitie. Echter, wanneer TrkB-signalering wordt verminderd in een groot deel van de neuronen in V1, dan vermindert de populatieactiviteit ook, waardoor een negatieve feedback van de inhibitoire input wordt veroorzaakt. Hierdoor wordt verlies van excitatoire synaptische contacten vermeden.

Concluderend -

- De gegenereerde transgene muizen kunnen mozaïeke expressie van transgenen tot stand brengen in de adulte voorhersenen, zonder de ontwikkeling of omgeving van de neuronen te beïnvloeden.
- Meerdere Cre-afhankelijke transgenen kunnen tot expressie worden gebracht in hetzelfde individuele neuron van de adulte cortex, om gen-interactie studies mogelijk te maken.
- Postsynaptische TrkB-signalering reguleert de instandhouding van synapsen in beide richtingen in de adulte visuele cortex, maar niet in het hippocampale gebied CA1.
- Instandhouding van synapsen door TrkB-signalering is een competitief proces gereguleerd door inhibitoire input, die op zijn beurt getriggerd wordt door populatieactiviteit.

Het bepalen van de rol van pre- en postsynaptische effecten van TrkB in thalamocorticale synapsen, en het bestuderen van dynamische veranderingen tijdens synapsformatie en -instandhouding door middel van *in vivo* imaging zouden nuttige toegevoegde studies zijn.

