

University of Groningen

## Sorting and trafficking of proteins in oligodendrocytes during myelin membrane biogenesis

Klunder, Lammert

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2007

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Klunder, L. (2007). *Sorting and trafficking of proteins in oligodendrocytes during myelin membrane biogenesis*. s.n.

### Copyright

Other than for strictly personal use, 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), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

### 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.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

# *Chapter 7*

*Nederlandse samenvatting*

### Nederlandse samenvatting

Veel mensen kennen in hun omgeving wel iemand die lijdt aan multiple sclerose (MS). Het is een ernstige ziekte met een grillig verloop, waarbij perioden met relatief goede gezondheid worden afgewisseld met terugvallen. MS kan zowel tot stoornissen in de zintuigwaarneming als tot bewegingsproblemen leiden. Omdat bij de laatst genoemde problemen spierfuncties uitvallen wordt wel gedacht dat MS een spierziekte is. MS is echter een aandoening aan de zenuwen. Spieren worden aangestuurd door signalen (impulsen) vanuit de hersenen. Deze impulsen lopen via zogenaamde axonen, dat wil zeggen relatief lange uitlopers, die ontspruiten aan het cellichaam van zenuwcellen. Om het doorgeven van impulsen efficiënt te laten verlopen zijn axonen omgeven door een isolerende laag van specifieke eiwitten en lipiden. Deze isolerende laag wordt de 'myelineschede' genoemd. Bij MS treden ontstekingen en beschadigingen in hersenen en ruggenmerg op, gekenmerkt door het voortdurend ontstaan en verdwijnen van ontstekingshaarden waarbinnen myeline afgebroken wordt (demyelinisatie). Zonder de isolerende laag om de axonen neemt de efficiëntie van het doorgeven van impulsen drastisch af en lopen de signalen van ieder axon in een zenuwbundel ongelijk.

Tot op heden is de precieze oorzaak voor het ontstaan van MS nog niet bekend. Mogelijkerwijs spelen (virus)infecties, geografische en omgevings-, genetische en immunologische factoren een belangrijke rol. In de hersenvloeistof van een groot aantal MS patiënten zijn antistoffen tegen virussen aangetroffen. Dit is een aanwijzing dat een virusinfectie betrokken zou kunnen zijn bij het ontstaan van MS. Er is echter nog geen MS-veroorzakend virus ontdekt. Een andere mogelijke oorzaak van MS is een auto-immuunreactie. Hierbij is het immuunsysteem op een dusdanige manier verstoord dat het onderscheid tussen "lichaamseigen" en "lichaamsvreemd" niet goed gemaakt kan worden. Het lichaam vormt dan antistoffen tegen eigen lichaamsweefsel (in het geval van MS antistoffen tegen myeline). Deze "auto-immuuntheorie" is vooral gebaseerd op de resultaten van het proefdiermodel van MS: experimentele auto-immuun encephalomyelitis (EAE). Dit is een auto-immuunziekte die op MS lijkt en die is teweeggebracht in genetisch ontvankelijke onderzoeksdieren.

Om de effecten van MS te kunnen verminderen, wordt gewerkt aan de ontwikkeling van therapieën die de aanmaak van nieuwe myeline stimuleren en daarmee de remyelinisatie (herstel van schade aan myeline) van axonen bewerkstelligen. Daartoe

is een gedetailleerde kennis nodig over hoe myeline wordt gevormd en over de manier waarop de myelinevorming kan worden bevorderd.

In hersenen en ruggemerg wordt de myelineschede geproduceerd door oligodendrocyten. Oligodendrocyten zijn een bepaald type zenuwcellen, die vanuit een groot aantal uitlopers een uniek type membraan maken (de myeline *sheet*). Zodra de uitlopers van de oligodendrocyten een axon vinden, worden er membranen gevormd die zich dan een aantal malen strak om de axonen wikkelen waardoor er een myelineschede ontstaat. De myelineschede heeft een unieke samenstelling en bevat een aantal specifieke myeline-eiwitten en -lipiden. De belangrijkste myeline-eiwitten zijn het proteolipid protein (PLP), myelin basic protein (MBP) en myelin associated glycoprotein (MAG). Belangrijke lipiden zijn de glycosfingolipiden (GSL) galactosylceramide en sulfatide. Zonder deze componenten kan er geen functionele myelineschede bestaan.

Goed beschouwd bestaat de wand of celmembraan van een oligodendrocyt uit twee delen met elk hun eigen functie, namelijk het plasmamembraan en de myeline *sheet*. Cellen met twee functioneel verschillende membraandelen worden ook wel gepolariseerde cellen genoemd. De twee verschillende membraandelen van gepolariseerde epitheelcellen worden aangeduid met de termen apicaal en basolateraal. Het transport van eiwitten en lipiden naar deze verschillende typen membranen vindt plaats via aparte transportroutes binnen de cel.

De apicale membranen van epitheelcellen zijn rijk aan GSL, de basolaterale membranen niet. Dat de myelineschede ook een hoge concentratie aan GSL bevat doet dit membraan heel sterk lijken op een zogenaamd apicaal-type membraan. In eerder uitgevoerd onderzoek is het gepolariseerde karakter van oligodendrocyten onderzocht. In dit onderzoek is o.a. bestudeerd of in oligodendrocyten ook apicale en basolaterale membranen en de daarbij behorende transportroutes voorkomen. Dit blijkt inderdaad het geval te zijn, maar op een andere manier dan verwacht. Ondanks de grote hoeveelheid GSL in de myeline *sheet* blijkt dit membraan niet apicaal van karakter te zijn. Ook het vervoer van myeline-eiwitten er naar toe gaat eerder via een basolateraal dan via een apicaal mechanisme.

Dit proefschrift is erop gericht om meer inzicht te krijgen in de wijze waarop oligodendrocyten de myeline-eiwitten en -lipiden naar de myelineschede dirigeren. Er is gekeken naar de rol van specifieke moleculen die betrokken zijn bij de sortering en het transport van myeline-specifieke bestanddelen naar de myeline *sheet*. Het onderzoek is

uitgevoerd met in kweek gebrachte oligodendrocyten, waarbij in de kweek geen neuronen en dus geen axonen aanwezig zijn. Dit heeft tot gevolg dat er geen echte myelineschede wordt gevormd. Er ontstaan echter wel uitlopers, waardoor er na enkele dagen een meer uitgespreid myeline vel of *sheet* ontstaat. In deze *sheet* bevinden zich alle componenten (eiwitten en lipiden) die in aanwezigheid van zenuwcellen naar de myelineschede zouden worden getransporteerd. De myeline-eiwitten en -lipiden komen volgens hetzelfde ontwikkelingspatroon tot expressie als in oligodendrocyten die zich in het centrale zenuwstelsel bevinden.

In *hoofdstuk 2* is het basolaterale karakter van myeline nader onderzocht. Hierbij is gebruik gemaakt van de apicale en basolaterale markereiwitten, HA en VSV G. Deze eiwitten komen van nature niet voor in oligodendrocyten, maar zijn met behulp van een retroviraal expressie-systeem in jonge delende oligodendrocyten tot expressie gebracht. In gepolariseerde epitheelcellen is de aanwezigheid van het aminozuur tyrosine in het C-terminale gedeelte van glycoproteïnen een belangrijk intramoleculair signaal voor basolateraal transport. Om te bepalen of de verandering van slechts één aminozuur in een eiwit voldoende kan zijn om het transport te beïnvloeden, zijn tyrosine-mutaties aangebracht in HA en VSV G. Uit het expressiepatroon van de mutanteiwitten bleek dat de aanwezigheid van een tyrosine in het C-terminale deel van HA, voldoende was om eiwitten naar de myeline *sheet* te dirigeren. Verwijdering van de tyrosine uit het C-terminale gedeelte van VSV G zorgde ervoor dat VSV G niet meer naar de myeline *sheet* getransporteerd kon worden. Deze waarnemingen ondersteunen het concept dat de myeline *sheet* typische basolaterale eigenschappen vertoont en dat het transport naar de *sheet* dus mogelijk gestuurd wordt door typische basolaterale signalen in de myeline-eiwitten. Deze laatste veronderstelling wordt inderdaad ondersteund door experimenten waarbij proteïnkinaase C activiteit werd geactiveerd en als gevolg daarvan het transport van VSV G en het myeline-eiwit PLP naar de myeline *sheet* werd geremd. Een dergelijk proteïnkinaase C gereguleerd basolateraal transport is eerder in gepolariseerde epitheliale cellen aangetoond.

In *hoofdstuk 3* is de functie van endogene membraanfusie-eiwitten, syntaxin 3 en 4, in de polariteit van oligodendrocyten beschreven. Syntaxin 3 is voornamelijk intracellulair en in het plasmamembraan van oligodendrocyten gelokaliseerd, terwijl syntaxin 4 voornamelijk in de myeline *sheet* voorkomt. Tevens is gebleken dat steeds meer syntaxin 4 tot expressie komt naarmate de oligodendrocyten zich ontwikkelen tot volwassen

myeliniserende cellen, terwijl gedurende dit ontwikkelingsproces de hoeveelheid syntaxin 3 constant blijft. Om de rol van syntaxin 3 en 4 bij transport van myeline-eiwitten naar de myeline *sheet* te kunnen bestuderen, zijn deze eiwitten zijn tot (over) expressie gebracht in oligodendrocyten. Overexpressie van syntaxin 3 heeft geen effect op localisatie van de myeline-eiwitten CNP, MAG en MBP, maar blokkeert het transport van PLP naar de myeline *sheet*. Overexpressie van syntaxin 4 heeft geen effect op de myeline-eiwitten CNP, MAG en PLP, maar resulteert wel in een sterke afname van de expressie van MBP. In tegenstelling tot de andere myeline-eiwitten, wordt MBP niet als eiwit naar de myeline *sheet* getransporteerd, maar in de vorm van mRNA waarbij het pas tot expressie komt als het op de plaats van bestemming is gearriveerd. Voor het eerst tonen wij aan in hoofdstuk 3 dat syntaxin 4 wellicht een rol kan spelen bij het transport van MBP mRNA.

In *hoofdstuk 4* is het transport van het myeline specifieke eiwit PLP nader bestudeerd. Door middel van *pulse-chase*, biotinylering en "detergens-oplosbaarheid" experimenten wordt het volgende transport model voor dit eiwit voorgesteld: direct na de synthese wordt PLP opgenomen in een Triton X-100-resistente lipide-omgeving (vesikel voor transport) en naar de plasmamembraan getransporteerd. Sulfatide speelt een belangrijke rol in dit proces. Vervolgens wordt daar de samenstelling van de lipiden rondom PLP aangepast en wordt het eiwit in een Triton X-100 oplosbaar vesikel weer intracellulair opgenomen waarna het naar de myeline *sheet* wordt getransporteerd. Aanvullende experimenten tonen aan dat voor de eerste stap van het transport naar de plasma membraan waarschijnlijk sulfatide nodig is. In deze stap is gebleken dat syntaxin 3, eerder beschreven in hoofdstuk 3, betrokken is bij de "docking" van de Triton X-100 resistente transport vesikels aan de plasmamembraan.

In *hoofdstuk 5* is de rol van het eiwit MAL bij de regulering van het transport van PLP bestudeerd. In epitheelcellen is MAL betrokken bij apicaal transport. By analyse van de eiwitsamenstelling van de myeline *sheet* is tevens gebleken dat MAL, samen met MBP en PLP, aanwezig is in het compacte deel van myeline. Om te bepalen of MAL ook betrokken is bij het transport van myeline-eiwitten, is MAL met een fluorescent label (GFP-MAL) tot expressie gebracht in oligodendrocyten. Expressie van GFP-MAL heeft geen effect op de proliferatie en differentiatie van oligodendrocyten. Ook heeft overexpressie van MAL geen effect op het transport van de myeline-eiwitten CNP, MAG en MBP. Daarentegen zien we onder deze omstandigheden een sterke daling van de expressie van PLP en ophoping van het eiwit in het cellichaam. Dat wil zeggen, dat transport van

PLP naar de *sheet* is geblokkeerd. Deze resultaten wijzen er dus op dat MAL mogelijk een rol speelt bij het tweede deel van het PLP-transport: transport van de plasmamembraan naar de myeline *sheet*.

### Toekomst

In dit proefschrift zijn regulerende factoren beschreven die betrokken zijn bij het transport van specifieke eiwitten naar en daarmee de vorming van de myeline sheet. Alhoewel een aantal van deze factoren konden worden gekarakteriseerd en hun betrokkenheid gedefinieerd, is er desalniettemin nog (veel) aanvullend onderzoek nodig om een duidelijk beeld te krijgen hoe de verschillende eiwitten gesorteerd en naar het myeline getransporteerd worden. In hoofdstuk 2 hebben we laten zien dat basolateraal transport in oligodendrocyten afhankelijk is van een tyrosine-sigitaal in het C-terminale membraan gedeelte van modeleiwitten. Verder onderzoek zal moeten aantonen of dergelijke intramoleculaire signalen ook een rol spelen bij het transport van myeline specifieke eiwitten, met name MAG and PLP, die respectievelijk tyrosines en dileucines bevatten. Verder is de regulering van het transport van het myeline-eiwit PLP tijdens de myelinevorming een onderwerp dat nader onderzoek vraagt. Het is interessant om de rol van syntaxin 3 en mogelijke 'omgevingsfactoren' betrokken bij het PLP transport in meer detail te onderzoeken. Ook is vervolgonderzoek nodig om de specifieke rol van syntaxin 3 and syntaxin 4 in de regulatie van sortering en transport van myeline-eiwitten, met name PLP en MBP, op te helderen. Hierbij dient ook nadrukkelijk de rol van de myeline-lipiden, galactosylceramide en sulfatide, op de sortering en transport van de myeline eiwitten te worden betrokken.

Verondersteld mag worden dat deze kennis meer inzicht zal geven over de manier waarop het myeline wordt gevormd en hoe dit proces kan worden bevorderd. Deze inzichten zullen bijdragen aan het ontwikkelen van therapieën die mogelijk een demyeliniserende ziekte als MS kunnen remmen en/of genezen.