

Samenvatting

Leren en geheugen zijn essentieel voor het dagelijks functioneren van dieren. De hippocampus is een hersengebied dat een belangrijke rol speelt bij bepaalde vormen van leren en geheugen. Hier wordt nieuw geleerde informatie gestabiliseerd door aanpassingen in de sterkte van neuronale contacten, genaamd synapsen. Dit staat bekend als synaptische plasticiteit en kan aan beide kanten (pre- of post-) van de synaps tot aanpassingen leiden. Synaptische plasticiteit kan zowel de afgifte (pre) of reactie (post) beïnvloeden op neurotransmitters, de signaalstoffen waarmee neuronen communiceren. De belangrijkste doelstelling van dit proefschrift was om de effecten te onderzoeken van veranderde neurotransmissie in de hippocampus op de moleculaire mechanismen gerelateerd aan geheugenvorming. Voor presynaptische plasticiteit werd dit onderzocht met behulp van verschillende muizen stammen, waaronder die die een *gain-of-function* mutatie in het Cav2.1 calciumkanaal tot expressie brachten. Daarnaast werd genexpressie onderzocht tijdens normale en farmacologisch verstoorde reconsolidatie van herinneringen. Reconsolidatie is het opnieuw stabiliseren van een teruggehaalde herinnering, waarbij de sterkte en de inhoud van de herinnering worden bijgewerkt. Kennis over de moleculaire mechanismen van reconsolidatie kan mogelijk therapeutische aangrijpingspunten geven voor de behandeling van angststoornissen. De studies in dit proefschrift dragen bij aan de kennis over de impact van genetisch of moleculair veranderde neurotransmissie op het geheugen.

In **hoofdstuk 2** werden verschillen bestudeerd in synaptische samenstelling en functie tussen de C57BL/6J (C57) en DBA/2J (DBA) stammen. Er werd voor deze muizen stammen gekozen omdat DBA muizen minder goed presteren in geheugentesten vergeleken met C57 muizen. Om te begrijpen waarom de stammen verschillen in cognitieve functies, hebben we in de hippocampus de eiwitsamenstelling, de structuur en functioneren van synapsen onderzocht. Hippocampi van DBA muizen bleken een verminderde hoeveelheid te hebben van presynaptische eiwitten die essentieel zijn voor de regulatie van neurotransmitter afgifte. Bovendien werd een significante vermindering gevonden van het aantal synaptische neurotransmitter-bevattende blaasjes in DBA ten opzichte van C57. Ook in het elektrisch functioneren van synapsen was een verminderde plasticiteit te zien bij DBA muizen. Onze gegevens suggereren een gecompromitteerd presynaptisch fenotype in muizen van de DBA stam, waarbij plasticiteit negatief beïnvloed wordt. Dit fenotype kan, in combinatie met in de literatuur beschreven postsynaptische gebreken, ten grondslag liggen aan het verminderd presteren in geheugentaken door DBA muizen.

In de **hoofdstukken 3-5** werden de effecten onderzocht van verhoogde neurotransmissie op aspecten van hippocampus-afhankelijk leren en geheugen. Daartoe werden muizen onderzocht met verschillende familiale hemiplegische migraine type 1 (FHM1) knock-in missense mutaties (R192Q en S218L) in het *CACNA1A* gen dat codeert voor een onderdeel van spannings-afhankelijke Cav2.1 calciumkanalen codeert. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat FHM1-mutaties de functie van die calciumkanalen versterkt, wat leidt tot een verhoogde neurotransmissie in de hersenschors. FHM1 is een monogene vorm van migraine met aura, waarbij een voorbijgaande hemiplegie optreedt tijdens de aura-fase van een migraine-aanval. De ernst van FHM1 symptomen, zowel bij patiënten als muizen, verschilt tussen de twee mutaties: de R192Q-mutatie veroorzaakt 'pure' hemiplegische migraine, terwijl de S218L-mutatie is geassocieerd met een complex fenotype van hemiplegische migraine, ataxie, epileptische aanvallen, en (soms fataal) hersenoedeem na een mild hoofdtrauma.

In **hoofdstuk 3** is gezocht naar een verklaring voor cognitieve en geheugenproblemen die bij patiënten met familiale hemiplegische migraine (FHM) zijn geobserveerd, door het vergelijken van prestaties in geheugentaken, neurotransmissie en plasticiteit in de hippocampus van FHM1 mutante en wild-type muizen. Stimulerende neurotransmissie, inductie en behoud van lange-termijn potentiatie (plasticiteit waarbij een langdurige versterking van neuronale connecties optreedt) waren verhoogd in R192Q muizen. Echter, in de literatuur wordt een verlaagde lange-termijn potentiatie veelal geassocieerd met een verminderd geheugen. Verrassend genoeg was, ondanks de verhoogde lange-termijn potentiatie, het vermogen tot leren en -geheugen significant verminderd in FHM1 muizen. Onze gegevens suggereren dat abnormaal toegenomen plasticiteit net zo ongunstig kan zijn voor efficiënt leren als verminderde plasticiteit. Verhoogde neuronale prikkelbaarheid draagt mogelijk niet alleen bij aan de gevoeligheid voor migraine-aanvallen, maar kan ook de cognitieve functie beïnvloeden.

Hoofdstuk 4 gaat dieper in op de mate van afwijkingen in cognitief functioneren en gedrag in FHM1muizen. Gedragstypen werden bepaald met behulp van geautomatiseerde thuislooptesten en conventionele geheugen- en angsttesten. Beide FHM1 mutanten toonden een verminderd geheugen in *contextual fear conditioning*, een test die afhankelijk is van intacte functie van de hippocampus. Homozygote S218 mutante muizen vertoonden tevens een ernstiger fenotype met verschillende cognitieve en gedragsmatige symptomen, in vergelijking met

heterozygote dieren van de S218L stam en homozygote dieren van de R192Q stam. Deze resultaten zijn in overeenstemming met de grootte van de *gain-of-function* effecten van de spannings-afhankelijke Cav2.1 calciumkanalen en klinische fenotypen van patiënten met deze mutaties.

In **hoofdstuk 5** werden de onderliggende moleculaire mechanismen van disfunctie in de hippocampus van FHM1 mutanten geanalyseerd. Genexpressie in hippocampi van FHM1 mutante muizen werd bepaald met behulp van deep *serial analysis of gene expression by next-generation sequencing* (deepSAGE-seq). Al werd een set van genen geïdentificeerd met een veranderde gen expressie, die toe te schrijven is aan de 129/Ola-stam achtergrond rondom het gemuteerde calciumkanaal gen, konden veranderingen in expressieniveau niet worden gevalideerd met behulp van qPCR experimenten in dezelfde reeks monsters. Onze resultaten geven aan dat op celniveau slechts kleine veranderingen in transcriptie optreden.

In **hoofdstuk 6** werden de mechanismen onderzocht die geactiveerd worden tijdens reconsolidatie van geheugen in de hippocampus. Hierbij werd gekeken naar reconsolidatie die normaal verliep en waarbij de initiële plasticiteit in neurotransmissie werd verstoord. Onlangs opgehaalde herinneringen worden labiel en vereisen een reconsolidatieproces om opnieuw te stabiliseren en te blijven bestaan. Dit proces wordt geregeld door verschillende moleculaire veranderingen die de synaptische sterkte beïnvloeden. Eén van de belangrijkste stappen bij dit proces is endocytose van GluA2-bevattende AMPA-receptoren. Met behulp van *cap analysis of gene expression by next generation sequencing* (CAGE-seq), bestudeerden we de genexpressie veranderingen in de hippocampus vroeg (30 minuten) en laat (6 uur) tijdens reconsolidatie in twee sets experimenten. In het eerste experiment werd gekeken naar reconsolidatie van aversieve ten opzichte van neutrale herinneringen. Tijdens de vroege fase van reconsolidatie van aversieve herinneringen bleken veranderingen in expressie geassocieerd met verhogingen in genen met transcriptiefactor activiteit, proteïne fosfatases en eiwitten die aan ubiquitine ligase binden. Tijdens de late fase van aversieve reconsolidatie waren veranderingen in genexpressie geassocieerd met aanpassingen in synaptische sterkte, zoals regulering van transportkanalen en glutamaatreceptoren. In het tweede experiment werd AMPA-receptor endocytose geremd tijdens reconsolidatie van aversieve herinneringen en waren de veranderingen in genexpressie minder prominent als in het eerste experiment. Remming van het transport van AMPA-receptor tijdens de reconsolidatie leidde

tot de expressie van microRNA 207 (*Mir207*) op het vroege tijdstip. Blijkbaar activeert reconsolidatie van aversieve herinneringen, in vergelijking met neutrale herinneringen, specifieke transcriptionele programma's op bepaalde tijdstippen. Dit is het eerste onderzoek dat veranderingen beschrijft in het genexpressie profiel, op verschillende momenten tijdens de reconsolidatie van herinneringen.

In **hoofdstuk 7** worden de implicaties van bevindingen uit de bovenstaande experimentele hoofdstukken besproken en suggesties gedaan voor toekomstig onderzoek naar deze onderwerpen. Met het onderzoek in muizenstammen en mutante muizen, hebben we een effect aangetoond van veranderingen in moleculaire functie op het vermogen tot leren en geheugenvorming. Een veranderd basaal niveau of activiteit van eiwitten die neurotransmissie positief of negatief beïnvloeden, was geassocieerd met een negatief effect op cognitief functioneren. Deze bevindingen valideren het belang van moleculaire mechanismen die de presynaptische functie beïnvloeden, op synaptische plasticiteit belangrijk voor geheugenvorming.