

## Samenvatting in het Nederlands

### Algemeen

Een goed functionerend zenuwstelsel is van essentieel belang voor ons dagelijkse, bewuste en onbewuste handelen en denken. Het functioneren van het zenuwstelsel is afhankelijk van goede en efficiënte communicatie tussen zenuwcellen, ook wel neuronen genoemd. Om te kunnen communiceren, bezitten neuronen synapsen. De synaps verbindt de presynaptische, informatie versturende cel met de postsynaptische, informatie ontvangende cel. Om een signaal te kunnen afgeven, bevat het presynaptische neuron blaasjes gevuld met een signaalstof (= neurotransmitter). Als de presynaptische cel wordt geactiveerd, worden de blaasjes gelegeerd in de synaptische spleet, een proces dat exocytose wordt genoemd. De neurotransmitters bereiken vervolgens de postsynaptische cel en binden daar aan postsynaptische receptoren om zo een postsynaptische respons te initiëren. Als het functioneren van het presynaptische of van het postsynaptische neuron is verstoord, bijvoorbeeld door chemicaliën, heeft dat invloed op de signaaloverdracht (= neurotransmissie) en uiteindelijk ook op ons functioneren of op onze gezondheid.

Exocytose van neurotransmitter-bevattende blaasjes treedt op als de intracellulaire calciumconcentratie in het presynaptische neuron sterk toeneemt. Exocytose duurt maar een paar milliseconden en is dus een extreem snel proces. Er zijn echter nog veel andere processen die zich in het presynaptische neuron afspelen voordat exocytose op kan treden. Zo moeten de blaasjes allereerst worden gevuld met neurotransmitters, waarna ze naar gespecialiseerde afgifteplaatsen worden getransporteerd. Op die afgifteplaatsen worden de blaasjes min of meer verankerd aan de celmembraan door interactie met een groep gespecialiseerde eiwitten ("docking"). Vervolgens worden de blaasjes "op scherp gezet" door weer andere eiwitten ("priming") en zijn ze klaar om geëxocytoteerd te worden. Exocytose wordt gevolgd door endocytose, waarbij het inmiddels lege blaasje weer wordt opgenomen door de presynaptische cel. Het lege blaasje wordt vervolgens naar het inwendige van de cel getransporteerd, waar het weer kan worden gevuld met neurotransmitters. Deze cyclus van processen ("the vesicle cycle") wordt geïnitieerd en gecoördineerd door unieke interacties tussen een groot aantal gespecialiseerde eiwitten. Een lichte verstoring van slechts één van deze interacties kan al voldoende zijn om neurotransmissie te beïnvloeden.

Van oudsher is de signaaloverdracht tussen neuronen, en de eventuele modulatie daarvan door toxische (= giftige) en/of lichaamseigen stoffen, bestudeerd d.m.v. experimenten waarbij werd gekeken naar de postsynaptische respons. Door recente wetenschappelijke ontwikkelingen is het nu ook mogelijk om de afgifte van neurotransmitter-bevattende blaasjes in het presynaptische neuron te onderzoeken. Met de nieuwste elektrochemische technieken, zoals microelectrode amperometrie, is het bijvoorbeeld mogelijk om op het niveau van één enkele cel te kijken naar de afgifte van neurotransmitter uit individuele blaasjes. Door deze technieken is onze kennis over de presynaptische mechanismen van neurotransmissie sterk toegenomen. Echter, tot nu toe zijn deze technieken niet of nauwelijks toegepast om te onderzoeken of, en hoe, toxische en/of lichaamseigen stoffen presynaptische processen moduleren, terwijl wel bekend is dat diezelfde stoffen de neurotransmitter niveaus in de hersenen kunnen veranderen.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift had als doel het inzicht te vergroten in de mechanismen verantwoordelijk voor de modulatie van exocytose door toxische en/of lichaamseigen stoffen. Om dat doel te bereiken is gebruik gemaakt van amperometrie, op dit moment de gevoeligste techniek om exocytose van individuele cellen te meten. Deze techniek is geschikt om naast het aantal afgegeven blaasjes ook de hoeveelheid neurotransmitter die per blaasje is vrijgekomen te bepalen, en dat met milliseconde resolutie en een detectiegrens van ~15 zeptomol, ofwel ~9000 moleculen! Aangezien het meten van presynaptische modulatie van neurotransmissie in het zenuwstelsel erg complex is, werd bij het onderzoek gebruik gemaakt van een modelsysteem. Het gebruikte modelsysteem is een cellijn die oorspronkelijk is geïsoleerd uit een bijniertumor in een rat, de phaeochromocytoma PC12 cellijn. Deze makkelijk te kweken cellen worden al jaren gebruikt voor allerlei soorten onderzoek. Er is daardoor veel bekend over op de celmembraan aanwezige receptoren en over intracellulaire enzymen en processen. Na differentiatie met het hormoon dexamethason lijken PC12 cellen sterk op neuroendocriene bijniemergcellen en zijn ze in staat om gedurende stimulatie grote hoeveelheden catecholamine-bevattende blaasjes af te geven. Naast  $\text{Ca}^{2+}$ -afhankelijke exocytose vertonen de PC12 cellen ook endocytose, net als de neuronen in ons zenuwstelsel. Verondersteld wordt dat exocytose en de modulatie daarvan in PC12 cellen grote overeenkomsten vertoont met exocytose en de modulatie daarvan in neuronen. De combinatie van amperometrie en PC12 cellen bleek bijzonder geschikt om de modulatie van exocytose door toxische en/of lichaamseigen stoffen te bestuderen.

### **Exocytose van catecholamine-bevattende blaasjes in PC12 cellen**

Hoofdstuk 2 geeft een gedetailleerde beschrijving van vesiculaire catecholamine afgifte (= exocytose) in ongedifferentieerde PC12 cellen gemeten met amperometrie. De resultaten dienen als karakterisering van het modelsysteem zoals dat gebruikt is in latere experimenten. Op grond van de resultaten kan worden geconcludeerd dat PC12 cellen exocytose vertonen na stimulatie met “hoog  $K^+$  medium” (= depolarisatie). Het percentage responsieve cellen, net als het aantal blaasjes dat per cel wordt afgegeven, is echter gelimiteerd. Deze limitatie blijft gehandhaafd na het opladen van cellen met L-DOPA, een grondstof voor catecholaminen. De resultaten suggereren dat de limitatie niet wordt veroorzaakt door een beperkte beschikbaarheid van catecholaminen, maar doordat de zogenaamde “vesicle cycle” traag verloopt. Bovendien tonen de resultaten aan dat de blaasjes niet afkomstig zijn van één homogene groep van blaasjes, maar uit tenminste 2 verschillende groepen die op basis van hoeveelheid catecholamine per blaasje kunnen worden onderscheiden. Aanvullende experimenten (Hoofdstuk 2, appendix) tonen aan dat exocytose  $Ca^{2+}$ -afhankelijk is.  $Ca^{2+}$  komt de cel binnen tijdens depolarisatie via “high voltage-activated”  $Ca^{2+}$  kanalen. Deze kanalen inactiveren langzaam gedurende een aanhoudende depolarisatie, wat ertoe leidt dat er uiteindelijk geen  $Ca^{2+}$  meer de cel in komt en exocytose ophoudt.

Een vereiste voor neurotoxicologisch onderzoek naar exocytose en de modulatie daarvan is een modelsysteem dat in staat is om relatief grote hoeveelheden blaasjes af te geven gedurende stimulatie. In dexamethason-gedifferentieerde PC12 cellen (Hoofdstuk 3 - 6) is het percentage responsieve cellen en het aantal blaasjes dat per cel kan worden afgegeven toegenomen. Verder is in dexamethason-gedifferentieerde cellen de detectie van vesiculaire catecholamine afgifte vergemakkelijkt doordat de hoeveelheid catecholamine die per blaasje wordt afgegeven, is toegenomen. Tenslotte zijn de afgeven blaasjes afkomstig uit een meer homogene groep blaasjes en op grond van de hoeveelheid catecholamine per blaasje zijn er geen duidelijk onderscheidbare groepen blaasjes binnen één cel. Deze kenmerken maken de dexamethason-gedifferentieerde PC12 cel tot een geschikt modelsysteem om de presynaptische mechanismen van neurotransmissie te onderzoeken en om de effecten van verschillende toxische en/of lichaamseigen stoffen in aanzienlijk detail te bestuderen.

### **Effecten van $Pb^{2+}$ op exocytose**

Hoofdstuk 3 beschrijft de effecten van  $Pb^{2+}$  op exocytose in intacte en in ionomycine-gepermeabiliseerde (= poreus gemaakte) PC12 cellen. Deze gepermeabiliseerde cellen zijn bijzonder geschikt om intracellulaire effecten van metaalionen te onderzoeken, omdat de ionen makkelijk de poreuze cel in kunnen zonder daarbij te worden gehinderd door de celmembraan. De resultaten tonen aan dat  $Pb^{2+}$  in staat is om  $Ca^{2+}$ -onafhankelijke exocytose te veroorzaken via een direct intracellulair effect op niet nader omschreven processen die zijn betrokken bij exocytose. Dit effect treedt in gepermeabiliseerde cellen al op bij een extracellulaire  $Pb^{2+}$  concentratie van 30 nM. In vergelijking met  $Ca^{2+}$ -geïnduceerde exocytose is  $Pb^{2+}$ -geïnduceerde exocytose sterk vertraagd. Als de externe  $Pb^{2+}$  concentratie toeneemt, neemt de frequentie waarmee catecholamine-bevattende blaasjes worden afgegeven toe en is  $Pb^{2+}$ -geïnduceerde exocytose minder vertraagd. Als de concentratie  $Pb^{2+}$  nog verder wordt opgehoogd tot  $\sim 10 \mu M$ , treedt inhibitie van exocytose op. Dit geeft aan dat  $Pb^{2+}$  op ten minste twee processen aangrijpt. De combinatie van amperometrische data met data uit confocale laser scanning microscopie experimenten met de fluorescente kleurstof indo-1 toont aan dat PC12 cellen een aanzienlijke  $Pb^{2+}$  buffer capaciteit hebben. Een gedeeltelijke verzadiging van deze hoge affiniteit buffer met  $Pb^{2+}$  is voldoende om exocytose te veroorzaken.

Hoofdstuk 4 beschrijft de effecten van modulatie van verschillende cruciale eiwitten betrokken bij exocytose in een poging de mechanismen verantwoordelijk voor  $Pb^{2+}$ - en depolarisatie-geïnduceerde exocytose te identificeren. De resultaten tonen aan dat modulatie van protein kinase C (PKC), calcineurine, calmoduline en  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II (CaM kinase II) in staat is exocytose te beïnvloeden. Synaptotagmine beïnvloedt  $Pb^{2+}$ - en depolarisatie-geïnduceerde exocytose in dezelfde mate, wat aangeeft dat synaptotagmine in beide typen exocytose eenzelfde, waarschijnlijk essentiële, functie vervult. Een toename van intracellulaire fosforylering via modulatie van PKC en calcineurine zorgt voor een toename van de frequentie van basale exocytose, terwijl PKC en calcineurine geen, of slechts een ondergeschikte, rol lijken te spelen bij  $Pb^{2+}$ -geïnduceerde exocytose. Dit is opmerkelijk aangezien PKC activatie leidt tot exocytose en PKC al bij zeer lage concentraties  $Pb^{2+}$  kan worden geactiveerd. De resultaten geven verder aan dat  $Pb^{2+}$ -geïnduceerde exocytose vooral wordt gemoduleerd door calmoduline en CaM kinase II. Hoewel nog niet bekend is of  $Pb^{2+}$  CaM kinase II kan activeren, is wel aangetoond dat CaM kinase II in staat is om v-SNAREs, t-SNAREs, synapsine en synaptotagmine te fosforyleren. Aangezien CaM kinase II activatie tevens leidt tot een toename van het aantal blaasjes dat kan worden afgegeven, is het zeer goed mogelijk dat de interactie tussen  $Pb^{2+}$  en CaM kinase II de cruciale gebeurtenis is die uiteindelijk resulteert in de waargenomen neurotransmitter afgifte.

Aangezien lage concentraties  $Pb^{2+}$  exocytose veroorzaken, terwijl hoge concentraties  $Pb^{2+}$  exocytose inhiberen, interacteert  $Pb^{2+}$  waarschijnlijk met meerdere, voor exocytose relevante, intracellulaire aangrijpingspunten. Inhibitie van exocytose door hoge concentraties intracellulair  $Ca^{2+}$  is niet waargenomen. Een ander verschil tussen  $Pb^{2+}$ -geïnduceerde en  $Ca^{2+}$ -geïnduceerde exocytose, naast het feit dat ze door verschillende mechanismen worden gemoduleerd, is dat  $Pb^{2+}$ -geïnduceerde exocytose vertraagd optreedt.

De neurotoxiciteit van  $Pb^{2+}$  hangt af van de beschikbaarheid van  $Pb^{2+}$ . De beschikbaarheid van  $Pb^{2+}$  wordt niet alleen bepaald door de vrije concentratie  $Pb^{2+}$ , maar ook door de hoeveelheid resterend extracellulair  $Pb^{2+}$  en de affiniteit waarmee het is gebonden. Een relatief laag  $Pb^{2+}$  niveau kan voldoende zijn om te resulteren in intracellulaire  $Pb^{2+}$  accumulatie in neuronen, mits de affiniteit van de intracellulaire buffer voor  $Pb^{2+}$  hoger is dan de affiniteit van de andere in het lichaam aanwezige buffers. Zodra er een kritische hoeveelheid  $Pb^{2+}$  intracellulair is geaccumuleerd, zal  $Pb^{2+}$ -geïnduceerde exocytose optreden. Dit duidt erop dat er eigenlijk geen veilige drempelconcentratie is vast te stellen voor bijvoorbeeld de concentratie van  $Pb^{2+}$  in bloed.

### **Effecten van toluen op exocytose**

Hoofdstuk 5 beschrijft de effecten van het neurotoxische oplosmiddel toluen op exocytose. De resultaten tonen aan dat toluen de frequentie van basale exocytose verhoogt. Dit effect is concentratie-afhankelijk en wordt veroorzaakt door een toename in de intracellulaire  $Ca^{2+}$  concentratie. De depolarisatie-geïnduceerde exocytose en de basale processen die normaal gesproken essentieel zijn voor exocytose worden niet beïnvloed door toluen. De toename in de frequentie van basale exocytose treedt op bij neurotoxicologisch relevante concentraties en wordt veroorzaakt door influx van extracellulair  $Ca^{2+}$  door spanningsafhankelijke  $Ca^{2+}$  kanalen. Aangezien toluen de intracellulaire  $Ca^{2+}$  concentratie verhoogt, is het aannemelijk dat de effecten niet beperkt blijven tot de exocytose van catecholamine-bevattende blaasjes, maar dat toluen ook afgifte van andere typen neurotransmitters kan veroorzaken.

### **Effecten van PCBs op exocytose**

Hoofdstuk 6 beschrijft de effecten van drie geselecteerde polygechlorineerde bifenylen (PCBs) op exocytose. De resultaten laten zien dat acute (<15 minuten) blootstelling aan lage concentraties PCB 4 (10  $\mu\text{M}$ ) en PCB 126 (5  $\mu\text{M}$ ) de basale frequentie van exocytose verhoogt. Dit effect is afwezig bij hogere concentraties en ook tijdens blootstelling aan PCB 128 (5 - 25  $\mu\text{M}$ ). Acute blootstelling aan deze PCBs heeft geen effecten op de hoeveelheid afgegeven catecholamine per blaasje en slechts marginale effecten op depolarisatie-geïnduceerde exocytose. Subchronische (3 dagen) blootstelling aan lage concentraties van deze PCBs heeft geen effect op de hoeveelheid afgegeven catecholamine per blaasje en ook niet op depolarisatie-geïnduceerde exocytose. De eerder gevonden effecten op populaties PC12 cellen na subchronische blootstelling aan PCBs, kunnen niet worden verklaard door enkel de geringe toename in exocytose die wordt waargenomen tijdens acute blootstelling aan lage concentraties PCBs. Bovendien zijn de concentraties PCBs die een verhoging van de basale frequentie van exocytose veroorzaken, schijnbaar zonder effect op tyrosine hydroxylase activiteit en dopamine transport. Er zijn dus nog veel vragen omtrent de werkingsmechanismen van PCBs.

Uit de in dit proefschrift beschreven resultaten blijkt dat lichaamsvreemde, toxische stoffen in staat zijn om exocytose te beïnvloeden. Hetzelfde geldt voor enkele lichaamseigen, intracellulaire eiwitten, zoals PKC, CaM kinase II, calcineurine en calmoduline. Op dit moment is voor geen van deze stoffen het exacte presynaptische werkingsmechanisme bekend. Op grond van andere onderzoeken is al wel duidelijk geworden dat veranderingen in de extracellulaire niveaus van catecholaminen de ontwikkeling en het normale functioneren van ons zenuwstelsel beïnvloeden. Dit geldt met name voor dopamine, maar ook voor andere typen neurotransmitters, zoals glutamaat. De grootste uitdaging is waarschijnlijk het vertalen van de beschreven *in vitro* effecten op exocytose in PC12 cellen naar functionele consequenties voor neurotransmissie in het algemeen en voor het functioneren van het zenuwstelsel *in vivo*.