

## De rol van fosforylering van synaptische componenten in epileptogenese

P.N.E. DE GRAAN, L.H. SCHRAMA  
EN W.H. GISPEN\*

Sinds 1980 wordt met de steun van de Commissie Landelijk Epilepsie Onderzoek in een multidisciplinaire werkgroep van onderzoekers van de Rijksuniversiteit Utrecht en de Universiteit van Amsterdam fundamenteel onderzoek verricht naar de moleculaire gebeurtenissen, die ten grondslag liggen aan het ontstaan van epilepsie. Het neurochemische onderzoek wordt verricht door de afdeling Moleculaire Neurobiologie van het Interfacultair Instituut Moleculaire Biologie en het Rudolf Magnus Instituut voor Farmacologie te Utrecht. Het neurofysiologische onderdeel wordt uitgevoerd door de vakgroep Algemene Dierkunde in Amsterdam.

De doelstelling van het onderzoek is na te gaan welke neurochemische processen ten grondslag liggen aan de elektrofysiologisch waarneembare veranderingen tijdens het ontstaan van epilepsie (epileptogenese). Het onderzoek richt zich op de veranderingen die plaatsvinden in de chemische communicatie tussen zenuwcellen, de neurotransmissie. In de chemische synaps worden boodschapper moleculen (transmitters) uitgestort wanneer de pre-synaptische cel vuurt. Door diffusie in de synaptische spleet bereiken de transmitter moleculen de membraan van de post-synaptische cel. Binding aan specifieke transmitterreceptoren aldaar leidt tot een verhoging of verlaging van de prikkelbaarheid van de post-synaptische cel. Veel stappen in de neurotransmissie zijn nog onopgehelderd. Ons onderzoek houdt zich bezig met de veranderingen in de synaptische membraan tijdens epileptogenese en richt zich met name op de mogelijke rol die de fosforylering van membraaneiwitten en -lipiden daarbij speelt.

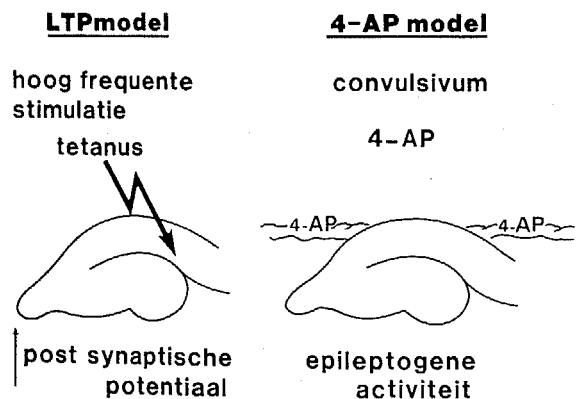
Hersenweefsel is zeer rijk aan de enzymen betrokken bij fosforyleringsprocessen. Binnen dit orgaan wordt de hoogste activiteit van deze enzymen aangetroffen in de synaptische membraan. Uit een groot aantal publikaties, beginnend bij het baanbrekende werk van Heald (1957), maar vooral door het werk van de groep van Greengard (VS), Rodnight (UK) en Kandel (VS), is duidelijk geworden dat het cyclische proces van fosforylering en de defosforylering van eiwitten een belangrijke rol speelt bij de neurotransmissie. Verondersteld wordt dat fosforylering van een eiwit resulteert in een verandering in zijn ruimtelijke structuur en dus in zijn functie. Is het betreffende membraaneiwit een enzym, dan kan door de fosforylering de (katalytische) activiteit worden gereguleerd. Betreft het een structureel membraaneiwit



P.N.E. de Graan

dan kan de verandering in de fosforyleringsgraad gepaard gaan met een specifieke verandering in de doorlaatbaarheid van de membraan voor ionen.

Om de rol van fosforyleringsprocessen in de synaptische membraan tijdens de epileptogenese te bestuderen wordt gebruik gemaakt van experimentele modellen voor epilepsie (figuur 1). Bekend is dat in plakjes van hersenweefsel (hippocampusplakjes) de synaptische transmissie op normale wijze gehandhaafd blijft. Deze preparaten hebben als voordeel boven het intacte proefdier dat ze uitstekend elektrisch en chemisch manipuleerbaar zijn. Met een korte hoogfrequente, elektrische stimulatie (tetanus) van een zenuwbaan in het hippocampusplakje, kan een soms uren-durende toename in de synaptische activiteit worden opgewekt. Dit fenomeen wordt 'lange-termijn potentiatie' (LTP) genoemd en is nauw verwant



Figuur 1. Experimentele modellen voor epilepsie. Het lange-termijn potentiatiemodel (LTP model) en het 4-aminopyridinemodel (4-AP model) in de hippocampusplak.

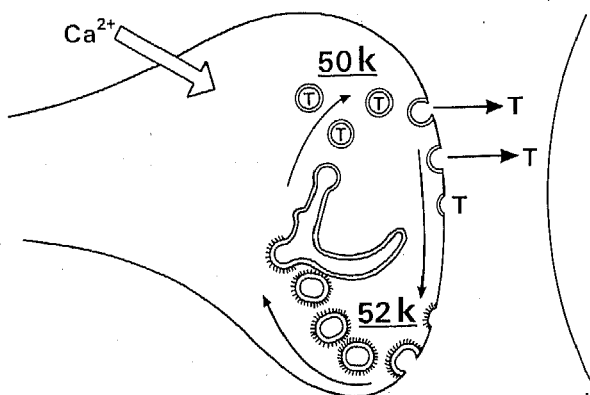
\* Dr. P.N.E. de Graaf, L.H. Schrama en W.H. Gispen, Afdeling moleculaire neurobiologie, Instituut voor Moleculaire biologie en Rudolf Magnus Instituut voor Farmacologie, Rijksuniversiteit Utrecht.

Trefwoorden: neurotransmitters  
(eiwit)fosforylering

met epileptogene verschijnselen. Gebleken is namelijk dat dagelijkse toediening van een korte tetanus in de hersenen van een proefdier kan leiden tot het ontstaan van na-ontladingen, dat wil zeggen langdurige spontane activiteit van de zenuwnetwerken. Uiteindelijk leidt de dagelijkse toediening van een tetanus in het intacte dier tot convulsie. Dit proces wordt het 'kindling' model van epilepsie genoemd. Een andere manier om elektrofysiologische veranderingen in hippocampusplakjes op te wekken, die sterk lijken op die welke optreden in de hersenen tijdens epileptische aanvallen bij de mens, is de behandeling met convulsiva (stoffen die bij dieren epileptische aanvallen veroorzaken).

Om te onderzoeken of de toediening van een tetanus aan een bepaalde zenuwbundel in het hippocampusplakje, naast LTP, ook langdurige veranderingen in de fosforylering van membraaneiwitten opwekt, werd uit ieder plakje een subcellulaire fractie geïsoleerd die verrijkt is aan synaptische plasmamembranen en mitochondria. In deze fractie werden ten minste 2 eiwitten gevonden die een verhoogde fosforylering vertonen na tetanische stimulatie. Het ene eiwit heeft een geschat moleculair gewicht van 52.000 dalton, vandaar dat het 52K eiwit genoemd wordt. Dit eiwit komt niet in de mitochondria voor, maar voornamelijk in synaptische plasmamembranen en de membranen van een speciaal type in de synaps voorkomende organellen (blaasjes). Door uit rattenhersen die speciale blaasjes te isoleren, was het mogelijk met behulp van verschillende biochemische methodes aan te tonen dat het 52K eiwit in SPM en in die speciale blaasjes identiek is. Vermoed wordt dat de fosforylering van het 52K eiwit een regulerende rol speelt bij de recycling van de synaptische plasmamembraan (figuur 2). Een verhoogde recycling zou nodig zijn bij een verhoogde neurotransmissie, zoals die optreedt na stimulatie.

Het tweede eiwit, waarvan de fosforyleringsgraad beïnvloed wordt door tetanische stimulatie, heeft een geschat moleculair gewicht van 48 kDa en wordt B-50 genoemd. Dit eiwit is specifiek voor zenuwweefsel en komt vrijwel alleen voor in de presynaptische



Figuur 2. Schematische weergave van de mogelijke rol van het 50K en het 52K eiwit in de synaptische transmissie (T) = neurotransmitter.

zenuwuiteinden. De fosforylering van dit eiwit wordt geremd onder invloed van het gedragsactieve peptidhormoon adrenocorticotroop hormoon (ACTH). De fosforylering van dit membraaneiwit speelt waarschijnlijk een belangrijke rol bij het moduleren van de afbraak van een bijzondere klasse membraanlipiden, de polyfosfoinositiden (PPI) welke een fosforyleerbare suikergroep bevatten. De afbraak van deze PPI wordt bijvoorbeeld geïnduceerd wanneer de transmitter acetylcholine zijn receptor op de synaptische membraan activeert. De afbraakproducten op hun beurt vervullen in de cel de rol van zgn. tweedeboodschapper moleculen: zij zorgen voor het doorgeven van het signaal in de cel. Een van de afbraakproducten bevordert het vrijmaken van calciumionen uit intracellulaire opslagplaatsen, waardoor de hoeveelheid vrij calcium in het cytoplasma stijgt. Een dergelijke verhoging van calciumconcentratie lijkt een essentiële rol te spelen in het fenomeen LTP, maar ook in het proces van epileptogenese. Inderdaad hebben wij aanwijzingen gevonden dat toediening van een tetanus leidt tot een verhoogde PPI-afbraak. De rol van calcium in LTP blijkt uit het feit dat geen LTP opgewekt kan worden als men hippocampusplakjes tetaniseert in afwezigheid van calcium in het medium, of uit het uitblijven van LTP na tetanisatie als tevoren een calcium-bindende stof in de cel is geïnjecteerd.

Na behandeling van hippocampusplakjes met een convulsivum (4-aminopyridine) worden ook veranderingen in de fosforyleringsgraad van synaptische membraaneiwitten gevonden. Naast veranderingen in de B-50 fosforylering valt in dit experimentele model voor epilepsie de toename in de fosforylering van een eiwit met een geschat moleculair gewicht van 50 kDa (50K eiwit) op. Deze toename in 50K fosforylering is sterk afhankelijk van de concentratie 4-aminopyridine die tijdens de incubatie gebruikt wordt. De concentraties die de 50K fosforylering beïnvloeden, geven ook duidelijke, elektrofysiologische waarneembare epileptiforme activiteit te zien. Nader neurochemisch onderzoek heeft geleid tot de karakterisering van het 50K eiwit. Het 50K eiwit is een onderdeel van een enzymcomplex dat membraaneiwitten fosforyleert en waarvan de activiteit gereguleerd wordt door calciumionen en het calciumbindende eiwit calmoduline. Dit enzymcomplex speelt waarschijnlijk een belangrijke rol bij de fusie van transmitter-bevattende blaasjes met de presynaptische membraan (figuur 2), een proces waarbij calciumionen verondersteld worden een belangrijke rol te spelen.

Ook in andere experimentele modellen voor epilepsie zijn, door Amerikaanse onderzoekers en door ons, soortgelijke veranderingen gevonden in de fosforyleringsgraad van synaptische eiwitten. Onze resultaten tonen aan dat langdurige veranderingen in de elektrische activiteit van neuronen gepaard gaan met veranderingen in de fosforyleringsgraad van bepaalde synaptische eiwitten. Wat precies de functie is van deze eiwitten en welke rol de fosforylering van deze eiwitten speelt in de epileptogenese is onderwerp van verder onderzoek. Hoewel deze studies het

moleculaire mechanisme dat ten grondslag ligt aan de epileptogenese nog geenszins opgehelderd hebben, werpt het onderzoek toch nieuw licht op het ontstaan van epileptische ontladingen op membraaniveau. De in dit onderzoek gebruikte experimentele modellen voor epilepsie zijn uitermate geschikt voor het bestuderen van de werking van bestaande anti-epileptica. Met dit onderzoek hopen we een bijdrage te leveren aan de ontwikkeling van nieuwe anti-epileptica.

## Relevante overzichtsliteratuur

- <sup>1</sup> Lopes da Silva FH, Bär PR, Tielen AM, Gispen WH. Changes in membrane phosphorylation correlated with longlasting potentiation in rat hippocampal slices. *Progress in Brain Res* 1982; 56: 339-47.
- <sup>2</sup> Graan PNE de, Lopes da Silva FH, Gispen WH. The role of hippocampal phosphoproteins in long-term potentiation. In: Isaacson RL, Pribram KH, eds. *The Hippocampus*. New York: Plenum Press, 1985.

## Het kindling model voor epilepsie van de hippocampus in de rat: elektrofysiologie en gedrag

Kindling is, zoals in 1967 het eerst is beschreven door Goddard, het aanbrengen van een epileptogeen focus door met regelmatige tussentijden een kortduurende serie van snel opeenvolgende stimuli (tetanus) toe te dienen.

In het kort zal hier ingegaan worden op twee problemen die we met betrekking tot het kindling model hebben onderzocht.

1. welke elektrofysiologische veranderingen vinden er tijdens het ontstaan van het focus plaats?
2. kan het kindling procédé, behalve voor motorische aanvallen, ook gebruikt worden voor onderzoek naar interictale gedragsstoornissen?

### Elektrofysiologische processen die ten grondslag liggen aan de epileptogenese door kindling

Het kindling proces wordt door ons bestudeerd in de hippocampus omdat 1) door de gelaagde structuur het mogelijk is de oorsprong van de veldpotentialen nauwkeurig te lokaliseren en 2) er veel bekend is over de cellen die voorkomen in de hippocampus<sup>2, 10, 22</sup> en het netwerk dat ze vormen.<sup>12, 24, 25</sup>

Onder pentobarbitalanesthesie werden bij ratten roestvrij stalen elektroden (diameter 100  $\mu$ ) in het CA1 gebied van de dorsale hippocampus geïnplan-teerd. Via deze chronisch verblijvende elektroden werden de Schaffer-collateralen in dit gebied gestimuleerd terwijl de respons werd afgeleid van de piramidecellen hierin. Hiermee werd een week na de operatie begonnen.

De signalen werden opgenomen en verwerkt met een microcomputer. Totdat een gegeneraliseerde aanval optrad werd dagelijks twee tot drie keer een tetanus toegediend die bestond uit 50 prikkels in 1 seconde, elk met een duur van 0,2 ms en een stroomsterkte gelijk aan de helft van de sterkte van één prikkel die net een maximale respons opleverde. Na afloop van een experiment werd de exacte positie van de elektrodes histologisch vastgesteld.



F.H. LOPES DA SILVA\*

Om de prikkelbaarheid van het netwerk te meten in en rond het epileptogene focus dat zich langzaam vormt (zoals o.a. blijkt uit het steeds langer worden van de na-ontlading die direct na de tetanus optreedt),<sup>24</sup> is de methode van de 'dubbel puls'-stimulatie gebruikt.<sup>4</sup> De resultaten hiervan zijn weergegeven in figuur 1; sessie 1 is voordat met kindling is begonnen, sessie 9 en 17 zijn respectievelijk halverwege en aan het eind van de kindling procedure. We zien het volgende gebeuren: de responsie op de eerste stimulus bestaat eerst uit een negatieve uitwijking die groter is voor sterkere stimuli. Dit is de EPSP (Exciterende Post Synaptische Potentiaal) die ontstaat op het niveau van de synapsen gevormd door de Schaffer-collateralen en de apicale dendrieten van de piramidecellen.<sup>13</sup> Tijdens het kindling proces worden de amplitude en de duur van deze negativiteit groter. Dit zou kunnen komen door een grotere efficiëntie en/of een vermindering van de feed-forward inhibitie. Na deze negatieve uitwijking komt, bij voldoende stimulatie, een positieve golf precies op het moment dat intracellulair de vroege IPSP behorende bij de recurrente inhibitie gemeten kan worden.<sup>10</sup> Deze positieve golf verdwijnt en wordt zelfs negatief in de loop van het kindling proces.

De tweede responsie heeft in principe dezelfde vorm als de eerste. Voor zwakke stimuli treedt er echter fa-

\* Prof. dr. F.H. Lopes da Silva, Vakgroep algemene dierkunde, Universiteit van Amsterdam.

Trefwoorden: dierexperimenteel onderzoek  
kindling