



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Photoperiodic encoding by the neuronal network of the suprachiasmatic nucleus

Leest, H.T. van der

Citation

Leest, H. T. van der. (2010, November 3). *Photoperiodic encoding by the neuronal network of the suprachiasmatic nucleus*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/16100>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/16100>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

NEDERLANDSE SAMENVATTING

In hoofdstuk 1 van dit proefschrift wordt een algemene inleiding gegeven op de biologische klok van zoogdieren. De biologische klok van zoogdieren, welke 24-uurs ritmen in het lichaam aanstuurt, ligt aan de onderzijde van het voorste deel van de hersenen, in de suprachiasmatische kernen (SCN) van de hypothalamus. De SCN is een gepaarde structuur, dat wil zeggen dat er aan beide zijden van de hersenen een gespiegeld evenbeeld aanwezig is. Iedere kern bestaat uit ongeveer 10,000 neuronen. De SCN genereert circadiane ritmen, wat betekent ritmen van ongeveer (circa) een dag (dies). De SCN ontvangt informatie over de lichtomstandigheden uit de omgeving, via een directe verbinding vanaf het oog, de zogenaamde retinohypothalamic tract (RHT). De circadiane ritmen worden zelfstandig door de SCN geproduceerd en zijn een gevolg van een moleculaire klok welke met de omgeving gelijk gezet kan worden door de invloed van licht.

Op verschillende circadiane fasen, ofwel tijdstippen in de 24-uurs cyclus, heeft licht verschillende fase-verschuivende effecten die kunnen worden samengevat in een fase respons curve (PRC). In nachtdieren veroorzaakt een lichtpuls in de vroege nacht een vertraging van het ritme, zodat het dier de dag volgend op de lichtpuls

op een later tijdstip actief zal worden (delay). Licht aan het einde van de nacht zorgt ervoor dat het ritme vooruit schuift, waardoor het dier de volgende dag eerder actief zal worden (advance). Deze kenmerken van de biologische klok zijn intrinsiek aan de SCN en blijven aanwezig in een *in vitro* preparaat.

In hoofdstuk 2 van dit proefschrift onderzochten we de effecten van het tijdstip waarop het hersenplakje werd geprepareerd. Wij keken hierbij naar de fase van het elektrische activiteits-ritme in de SCN. We prepareerden hersenplakjes uit met daarin de SCN en maakten een opname van de elektrische activiteit in de SCN. Het hersenplakje werd in leven gehouden in een laminaire flowkamer die werd doorstroomd met zuurstofrijke kunstmatige hersenvloeistof (ACSF). Met twee elektroden werd de elektrische activiteit van meerdere cellen tegelijkertijd gemeten. We vonden dat de biologische klok in deze hersenplakjes circadiane ritmen in elektrische activiteit lieten zien. Er was hoge elektrische activiteit tijdens de dag en lage activiteit in de nacht van het dier. We vonden dat de timing en de golfvorm van het ritme worden bepaald door de licht-donker cyclus van het dier, en niet worden beïnvloed door het tijdstip waarop de hersenplakjes werden uitgearbeid. Deze bevinding is van belang voor het onderzoek aan de biologische klok, omdat de fase van het ritme bij het uitprepareren niet altijd bekend is. De robuustheid van het ritme en de golfvorm van het ritme is van bijzonder belang in het onderzoek naar seizoensgebonden ritmes, waarbij veranderingen in de golfvorm van de elektrische activiteit te verwachten zijn. Doordat de gemeten ritmes in het preparaat niet afhankelijk zijn van het moment waarop de plakjes werden geprepareerd, is de gemeten activiteit dus het gevolg van het ritme van de biologische klok. Hieruit blijkt dat deze techniek een waardevol en betrouwbaar hulpmiddel is om de fase en golfvorm van circadiane ritmen *ex vivo* te onderzoeken.

In hoofdstuk 3 gebruikten we hetzelfde preparaat als hierboven beschreven. We maakten opnames van de extracellulaire elektrische

activiteit van meerdere neuronen. Hierbij werd het tijdstip, de grootte en de vorm van de elektrische pulsen (actiepotentialen), die een vooraf ingestelde drempel overschreden, opgenomen. Voor de standaard metingen, waarbij er pulsen werden geteld van een grote groep neuronen (multi-unit), vonden we dat de elektrische activiteit hoog was tijdens de subjectieve dag en laag tijdens de subjectieve nacht, met een zeer lage variabiliteit in timing. Voor kleinere groepen cellen (populaties), vonden we een grote variabiliteit in de timing van de maximale activiteit. Daarnaast vonden we dat kleine groepen cellen samen (subpopulaties), die bestaan uit ongeveer 3 neuronen die dicht bij elkaar liggen, veel sterker gesynchroniseerd zijn over de 24-uurs cyclus dan kan worden verklaard door willekeurige timing. Bovendien hebben we vastgesteld dat de elektrische activiteit van een enkele cel in de SCN, veel korter actief is dan het totaal van de cellen in de SCN. Uit deze gegevens samen konden we vaststellen dat de golfvorm van het elektrische activiteitsritme in de SCN wordt bepaald door een gestuurd samenspel van de neuronen in de SCN.

De duur van het daglicht heeft een duidelijke invloed op het gedrag en de fysiologie van dieren en bij sommige soorten induceert een korte daglengte zelfs winterslaap. Het verschil in daglengte tussen zomer en winter brengt veranderingen teweeg in het elektrische activiteitsritme van de SCN. Het vastleggen van deze daglengte-veranderingen in het ritme van de SCN zou kunnen berusten op een verschil in fase van de activiteitspieken van kleine groepen neuronen. Wij hebben de elektrische activiteit in de SCN in hersenplakjes opgenomen van dieren die onder een lange of een korte daglengte werden gehuisvest. We vonden dat de lengte van de dag een verandering teweegbrengt in het elektrische activiteitsritme in de SCN. In een korte dag vonden we smalle pieken en in een lange dag vonden we brede pieken in elektrische activiteit.

Onze hypothese is dat in korte dagen, zoals in de winter, de activiteitsfase van de neuronen verdeeld is over de korte licht periode. Doordat de activiteit van de neuronen overlapt heeft de totale populatie een output met een smalle, hoge amplitude piek. In lange

zomer dagen is de activiteitsfase van de neuronen meer verspreid over de subjectieve dag vanwege de langere duur van het licht. Dit resulteert in een lager aantal neuronen dat op hetzelfde moment actief is en geeft daarmee een brede, lage amplitude piek. Om deze hypothese te toetsen, hebben we de activiteit van vele neuronen samen gesimuleerd. We verdeelden activiteitsprofielen van een enkel neuron over de lengte van de lichtperiode met een lineaire verdeling. De uitkomsten van de simulaties leken sterk op de experimentele resultaten. Dit laat zien, dat het verschil in de timing van de neuronale activiteit inderdaad een mechanisme is waarmee de daglengte kan worden weergegeven en vastgehouden (gecodeerd) in de SCN.

In hoofdstuk 4 hebben we onze hypothese van het mechanisme voor daglengte codering door de SCN experimenteel getoetst. Muizen zijn nachtdieren en hun loopwiel activiteit vindt plaats in het donkere gedeelte van de 24-uurs licht donker cyclus. De muizen vertoonden een aanpassing in de lengte van loopwiel activiteit, die de duur van het donker volgde. Dit betekent een lange activiteitsperiode in korte daglengte en een korte duur van loopwiel activiteit in lange daglengte. Vervolgens registreerden we de elektrische activiteit in de SCN in vrij bewegende muizen en vonden dat de daglengte tot uiting komt in de duur van de verhoogde elektrische activiteit in de SCN. In constant donker, in de afwezigheid van licht, bleef de vorm van de activiteitspieken in de SCN gelijk, met een smalle multi-unit elektrische activiteit piek in de dieren van korte daglengte en brede activiteitspieken in de SCN van dieren op lange dag. Hieruit blijkt dat de daglengte aanpassing gecodeerd is in de SCN.

Hierna onderzochten we de SCN van muizen uit lange en korte daglengte *in vitro* en registreerden de elektrische activiteit in de SCN. Van de elektrische activiteit werd het tijdstip en de grootte van de actiepotentialen opgeslagen. In de SCN van muizen die werden gehouden op verschillende daglengten, vonden we dat de breedte van

de multi-unit piek consequent breed was in lange dag en smal in korte daglengte.

Om het onderliggende mechanisme te onderzoeken waarmee de SCN in staat is om de vorm van het elektrische activiteitsritme te veranderen in reactie op daglengte, voerden we een subpopulatie analyse uit. Actiepotentialen met een verschillende amplitude werden geselecteerd door de selectiedrempel aan te passen. Hierdoor kan het aantal neuronen dat bijdraagt aan de elektrische activiteitsritmen worden beperkt. Dit resulteert in een kleinere populatie van neuronen waarvan de activiteit wordt opgenomen. We vonden dat in kleine populaties van neuronen de timing van de activiteit zeer gesynchroniseerd was in de smalle multi-unit pieken in de SCN van korte daglengte. Daartegenover vertoonden de subpopulaties een brede verdeling van hun activiteitspieken in plakken van lange daglengte. In deze experimenten hebben wij tevens de vorm en het tijdstip van actiepotentialen opgeslagen. Uit deze gegevens hebben wij de elektrische activiteit van enkele neuronen geëxtraheerd. Wij vonden dat de vorm en de duur van de elektrische activiteit van een enkel neuron niet verschillend waren tussen beide daglengtes. Gebaseerd op deze resultaten, konden we een schatting van de populatiegrootte versus piekbreedte maken. We vonden dat in beide daglengten de breedte van de activiteitspiek van gemiddeld 50 neuronen al goed is voor 75% van de totale piekbreedte in de grote populatie. Dit toont aan dat een klein aantal neuronen al veel informatie kan geven over de daglengte door een verdeling van de tijdstippen waarop de neuronen actief worden.

In hoofdstuk 5 onderzochten we de fase verschuivende effecten van licht in relatie tot de daglengte. We vonden dat verschuivingen in het loopwielritme bij muizen in lange daglengte na een lichtpuls beduidend kleiner waren dan bij dieren in korte daglengte. De kleine verschuivingen in lange dag zouden kunnen worden veroorzaakt door een verminderde gevoeligheid voor het licht, als gevolg van de langere blootstelling aan licht overdag. Om voor de blootstelling te corrigeren

hebben wij de hoeveelheid fotonen (lichtdeeltjes) aangepast zodat de dieren in een korte dag per dag evenveel fotonen ontvingen als dieren van een lange dag. Wij vonden dat, ondanks de hogere blootstelling aan licht, de dieren in korte daglengte niet minder verschoven dan de controle groep in korte daglengte. Dit geeft aan dat het ontbreken van grote fase verschuivingen in lange daglengte niet veroorzaakt wordt door een verminderde gevoeligheid voor licht.

Om te onderzoeken wat de rol van de SCN is in de mate van verschuiven in verschillende daglengten hebben wij hersenplakjes van muizen uit lange en korte daglengte geprepareerd en registreerden de elektrische activiteit in de SCN. Wij voegden NMDA toe om de fase verschuivende effecten van het licht na te bootsen. *In vitro* waren er grote fase-verschuivingen in de SCN van muizen van een korte dag lengte. In de SCN van muizen die op een lange daglengte werden gehouden waren er geen significante verschuivingen, in overeenstemming met de gedragsgegevens. Om het achterliggende mechanisme te onderzoeken voerden we een analyse van de amplitude van het ritme uit. We vonden dat de amplitude van de elektrische activiteits-ritmen van verschillende daglengtes op ieder niveau verschillend was. De oorzaak van de grotere amplitude van het ritme in korte daglengte, is een groter aantal cellen dat tegelijkertijd actief is, zoals beschreven in hoofdstuk 4. Dat een ritme met een hoge amplitude meer verschuift dan een ritme met een lage amplitude is in strijd met voorspellingen gebaseerd op limiet cyclus oscillatoren. Hierbij wordt een ritme voorgesteld als een circulaire vorm en de amplitude van het ritme wordt weergegeven door straal van de cirkel. In deze limiet cyclus oscillatoren zijn ritmes met een hoge amplitude minder gevoelig voor een fase verschuiving stimulus dan lage amplitude ritmes, doordat de grootte van de stimulus ten opzichte van de straal van de cirkel bepalend is voor de verstoring van de cyclus. Onze resultaten tonen echter het tegenovergestelde aan: Hoge amplitude ritmen hebben grote fase verschuivingen en lage amplitude ritmen hebben kleine verschuivingen.

We voerden simulaties uit om deze paradoxale resultaten in meer detail te onderzoeken. Hierbij onderzochten we verschillende vormen die de fase-verschuivende effecten van licht op de activiteit van een enkele cel in de SCN kan hebben, een zogenaamde “single-unit PRC”. Deze single-unit PRCs verdeelden wij vervolgens over de 24-uurs cyclus met een verdeling zoals we die hebben gevonden in subpopulaties van SCN neuronen (hoofdstuk 4). De fase verschuivingsreactie van de SCN als geheel kon worden berekend door de som te nemen van de single-unit PRCs. Uit deze simulaties bleek dat een brede verdeling over de 24-uurs cyclus een lage amplitude PRC met kleine verschuivingen geeft, terwijl een smalle verdeling resulteert in een hoge amplitude PRC, ongeacht de vorm van de single-unit PRC, in overeenstemming met de resultaten van de gedrags- en *in vitro*-proeven. Dit laat zien dat de limiet cyclus theorie niet van toepassing is op systemen waarin meerdere oscillatoren aanwezig zijn, en dat het neuronale netwerk van de SCN nieuwe organisatie niveaus geeft door synchronisatie tussen de pacemaker neuronen.

