

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/33399> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Farajnia, S.

Title: Neuroplasticity in the mammalian clock : the effect of aging and seasons

Issue Date: 2015-06-18

SAMENVATTING

Vele organismen, van eencelligen tot en met de mens, hebben een intern tijd systeem ontwikkeld dat hen in staat stelt adequaat om te kunnen gaan met dagelijkse schommelingen van de omgeving en de cycli van de seizoenen. In zoogdieren is een centrale circadiaanse (circa=ongeveer; dia= een dag) klok aanwezig welke het ritme in gedrag en fysiologie controleert over een periode van ongeveer 24 uur. Deze centrale klok is gelokaliseerd in the suprachiasmatische nuclei (SCN) welke gelegen is in de anterieur hypothalamus. De SCN bestaat uit ongeveer 20.000 zenuwcellen welke boven het optisch chiasme gelegen zijn en aan de beide zijanten van het onderste gedeelte van het derde ventrikel. Om de SCN als een betrouwbare tijd waarnemer te laten fungeren is het nodig om het circadiaanse ritme te synchroniseren met omgevingscycli van precies 24 uur. De belangrijkste aanwijzing uit de omgeving voor precieze synchronisatie (ook wel zeitgeber genoemd) is licht dat opgevangen en verwerkt wordt door gespecialiseerde ganglion cellen in de retina welke direct naar de SCN projecteren via zenuwbanen, de zogenaamde retinohypothalamus tract (RHT). De meeste SCN neuronen zijn zelfstandige oscillerende cellen welke een autonoom ritme in frequentie van actiepotentialen vertonen welke een piek hebben in het midden van de dag. SCN neuronen vormen een netwerk van gekoppelde cellen welke tezamen een sterk ritme van elektrische activiteit met een grote amplitude vertonen dat gekoppeld is aan een ritme van neurohormoon afgifte welke fungeren als output signaal. Het door de SCN gegenereerd signaal wordt doorgegeven naar zogenaamde perifere oscillatoren in ander hersengebieden en organen waardoor de timing van vele fysiologische functies en gedrag optimaal kunnen worden aangepast aan de omgeving. Vele studies duiden erop dat elektrische activiteit de output van de SCN bepaalt. Het ritme van elektrische activiteit in de SCN komt voort uit circadiaans gecontroleerde ion-geleiding welke cel prikkelbaarheid en actie potentialen reguleert. De vorm van de elektrische golven van de SCN output verandert gedurende de seizoenen en naar mate er veroudering optreedt. In het geval van seizoens-aanpassingen zal het SCN signaal de daglengte coderen en deze seizoens-informatie verspreiden. Bij veroudering echter zullen er non-reversibele veranderingen optreden welke resulteren in een verlaging van de amplitude van het signaal. Waarschijnlijk leidt deze verlaging tot verlies van controle om het ritme van perifere oscillatoren op peil te houden. In dit proefschrift zijn de mogelijke cellulaire en inter-neuronale mechanismen welke ten grondslag liggen aan de vorm van de golven van het circadiaanse ritme van elektrische activiteit in de SCN met verschillende technieken onderzocht.

In **hoofdstuk 2** wordt een samenvatting gegeven over de huidige stand van zaken over wat wij weten van het effect van ouder worden op het functioneren van de SCN. Ouderen in onze huidige moderne maatschappij lijden aan leeftijds-gerelateerde ziekten welke hun hersen functies, hun gedrag en hun sociale leven beïnvloeden. Veroudering verslechtert ook het circadiaanse ritme van vele fysiologische functies

zoals de slaap-waak cyclus en verstoort het juiste functioneren van de SCN. Recent is veel data gepubliceerd dat laat zien dat het goede functioneren van de centrale klok belangrijk is een goede mentale en fysieke gezondheid. Verouderings-gerelateerde tekortkomingen in de centrale klok kunnen daarom gezondheidsproblemen bij ouderen verergeren en verbetering van de klok functie kan bijdragen aan het gezond ouder worden. Het minder functioneren van een ouder wordende klok is in diverse studies aangetoond maar de onderliggende mechanismen zijn grotendeels onbekend. In hoofdstuk 3 laat een longitudinale studie zien dat muizen welke beweging hebben gehad –zij hadden toegang tot een loopwiel in de kooi- een ander patroon laten zien van bewegingsactiviteit wat betreft duur van de periode en fragmentatie van de activiteit. Vervolgens is onderzocht of de SCN betrokken is bij deze activiteits-veranderingen door middel van multiunit opnames van de elektrische activiteit in de SCN van jonge muizen (3-6 maanden) en van oude muizen (ouder dan 24 maanden). De verdeling van elektrische activiteit was sterk verstoord in een populatie van SCN neuronen welke actief zijn in de nacht welke in anti-fase zijn met de voornaamste cluster van neuronen welke actief zijn op het midden van de dag. Tezamen resulteerde dit in een verlaging van de amplitude van gezamenlijke elektrische activiteits-ritme. Vergelijkbare brede fase distributie van SCN activiteitspatronen zij in het verleden geassocieerd met het vermogen om fase verschuiving van SCN neuronen te bewerkstelligen. Ik heb vervolgens inderdaad kunnen laten zien dat het vermogen van fase verschuiving verminderd is. Patch-clamp opnames lieten zien dat met name membraan eigenschappen, de voltage-afhankelijke K-stroom en de GABAerge post-synaptische stroom in SCN neuronen sterk veranderd zijn in oude dieren. De circadiaanse controle van voltage-afhankelijke K-stroom was selectief veranderd. Ik heb een tekort van circadiaanse modulatie van 'fast-delayed rectifier' K-stroom (FDR) en van de 'transient' K-stroom (I_A) welke respectievelijk een bijdrage kunnen leveren aan de toename van neuronale activiteit gedurende de nacht en een afname in de vuur frequentie gedurende de dag. De resultaten die in dit hoofdstuk beschreven zijn suggereren dat een modificatie van cellulaire karakteristieken en intercellulaire communicatie veranderingen kunnen geven op het niveau van SCN netwerken en kunnen leiden tot een verstoring van gedrag zoals slaapproblemen en gefragmenteerd bewegingsactiviteit. Opvallend is dat de negatieve verouderings-gerelateerde cellulaire veranderingen gedeeltelijk gecompenseerd kunnen worden op het niveau van SCN netwerken.

Om te onderzoeken wat de rol is van circadiaans-gecontroleerde K-stromen in de demping van de amplitude van het SCN elektrische ritme gedurende veroudering, heb ik de 'large conductance' Calcium-geactiveerde kalium stromen (BK) gemeten (**Hoofdstuk 4**). BK stromen zijn essentieel voor het normale patroon van SCN elektrische activiteit en voor normale ritmes in gedrag en fysiologie. In sommige aspecten zijn muizen welke deficiënt zijn in BK kanalen, vergelijkbaar met oude muizen. Zij vertonen een afname in totale gedragsactiviteit, een verminderde stabiliteit en nauwkeurigheid van het gedragsritme, een matige verlenging van de circadiaanse

periode en een veranderde elektrische activiteit van SCN neuronen. Met patch clamp studies en calcium imaging opnames zijn verlies van ritmische modulatie van BK stromen en een omgekeerd ritme van intracellulaire calcium ($[Ca^{2+}]_i$) concentraties gevonden. Ten opzichte van jonge muizen, was de omvang van BK stroom in oude dieren in de nacht verlaagd. BK kanalen draagt bij aan de vorm van actie potentiaal golven en kan de $[Ca^{2+}]_i$ veranderen. De afname in BK stromen in verouderde SCN neuronen tijdens de nacht kon geassocieerd worden met een depolarisatie van de membraan potentiaal, een verlengde actie potentiaal repolarisatie, een verlaagde 'afterhyperpolarisation' potentiaal en een verhoogde $[Ca^{2+}]_i$. Gezamenlijk geven deze resultaten aan dat nachtelijke verlaging van de BK stroom bij veroudering de vorm van de actie potentiaal golf in SCN neuronen modificeert.

De precieze vorm van de golf van een actie potentiaal bepaalt de hoeveelheid van Ca^{2+} influx door voltage-gestuurde Ca^{2+} kanalen. Een verlengde 'spike' repolarisatie activeert langer voltage-gestuurde Ca^{2+} kanalen of een verlaagde AHP vertraagt de deactivatie van Ca^{2+} kanalen en veroorzaakt daardoor een toegenomen Ca^{2+} influx en $[Ca^{2+}]_i$. De resultaten beschreven in hoofdstuk 4 suggereren daarom dat veranderingen in BK stromen en veranderingen in de golfvorm van actie potentialen een bijdrage kunnen leveren aan een toename van nachtelijk $[Ca^{2+}]_i$ en aan het fenotype van een verouderde SCN.

In **hoofdstuk 5** wordt de cellulaire basis van seizoens-adaptatie door de SCN onderzocht. De SCN codeert seizoens-afhankelijke veranderingen in daglengte door de fase distributie van elektrische activiteit patronen te moduleren in individuele neuronen. Het collectieve elektrische patroon van de SCN bepaalt de golfvorm van de elektrische activiteiten daardoor de duur van gedragsactiviteit. In nachtdieren, aanpassing aan een lange dag (met veel licht) resulteert in een meer verspreid patroon van elektrische activiteit en in een korte periode van gedragsactiviteit terwijl een korte dag (met kortere periode van licht) resulteert in een toegenomen fase synchronisatie tussen SCN neuronen en langere perioden van gedragsactiviteit. Op deze manier kan de SCN, samen met andere hersengebieden welke betrokken zijn bij seizoens-adaptaties (bijvoorbeeld de pijnappelklier), seizoens-afhankelijke gedrag. Hoewel sommige van de moleculaire mechanismen en transmitters welke ten grondslag liggen aan dit dynamische aanpassingsproces bekend zijn, zoals **V**asoactive **I**ntestinal **P**eptide (VIP), is weinig bekend over de cellulaire mechanismen. Door gebruik te maken van de patch clamp techniek zijn passieve en actieve membraan eigenschappen van enkele SCN neuronen onderzocht in lange dag dieren (LD 16:8) en korte dag dieren (LD 8:16). Met name is de vuur frequentie, membraan potentiaal en 'input resistance' gemeten. De resultaten van deze experimenten geven aan dat deze basale membraan eigenschappen in verschillende fotoperioden vergelijkbaar zijn.

Opvallend was dat van de verschillende K^+ stromen, alleen de FDR stroom beïnvloedt werd door verandering van fotoperioden. Van de FDR stroom is bekend dat deze activiteits-ritmen in gedrag beïnvloedt en ritmes in elektrische activiteit moduleert. Het beïnvloedt ook verwerking van foto-informatie in de SCN. Er zijn aanwijzingen dat

de hoogte van de FDR stroom beïnvloedt wordt door licht-gemedieerde stimuli en nodig is voor fotsche regulatie van genexpressie in de SCN. In hoofdstuk 5 laat ik zien dat de FDR stroom verhoogd is in de donkerperiode in lange dag omstandigheden en het dagelijkse ritme van de FDR stroom omgekeerd is onder deze lange dag omstandigheid. De functionele rol van de FDR stroom bij aanpassing aan veranderende licht omstandigheden is echter niet duidelijk. Synchronisatie tussen het dorsale en ventrale gedeelte van de SCN lijkt verzwakt te zijn onder lange dag omstandigheden, welke dus gepaard kan gaan met een breder distributie patroon van de fase verschillen. De FDR stroom heeft een potentiële rol in intercellulaire synchronisatie in the SCN welke vergelijkbaar kan zijn met de rol van de FDR stroom in andere hersengebieden zoals de neocortex. De precieze rol van FDR stromen in foto-periodieke aanpassingen vereist echter meer onderzoek. In lijn met andere studies veranderen de basale elektrische output en membraan eigenschappen niet bij een verandering van de fotoperiode. Het is daarom waarschijnlijk dat foto-periodieke fase aanpassingen veroorzaakt wordt door een modificatie van intercellulaire communicaties.

GABA is een van de belangrijkste neurotransmitters in de SCN. Om de rol van GABA te onderzoeken bij seizoen veranderingen, is GABA-erge transmissie onderzocht in muizen welke geadapteerd zijn aan de fotoperiode van lange en korte dag. Met behulp van patch clamp technieken en calcium imaging opnamen is in hoofdstuk 6 GABA-erge activiteit en responses onderzocht in de SCN. In vergelijking met lange dag, leidt adaptatie aan een korte dag fotoperiode tot een vermindering van spontane GABA-erge synaptische transmissie. Een belangrijke bevinding was dat we een toename zagen van excitatoire GABA-erge neurotransmissie in lange dag dieren in vergelijking met korte dag dieren (respectievelijk van 28% naar 40%). Deze data suggereren dat een precieze balans tussen GABA-erge excitatie en inhibitie in de SCN een belangrijke rol speelt bij de aanpassing van de fase distributie welke fotoperiodiciteit coderen en overbrengen. Fotoperiodiciteit lijkt daarom van invloed op biofysische eigenschappen van SCN neuronen door de concentratie van intracellulaire Cl⁻ dat gereguleerd wordt door Cl⁻ cotransporter, waardoor vervolgens een verschuiving kan optreden in het GABA equilibrium potentiaal. Omgevingsfactoren, zoals daglicht, kan dus de functie van GABA als cruciale transmitter in de SCN veranderen. Daglicht of andere omgevingsfactoren kunnen ook de functie van GABA of andere neurotransmitters beïnvloeden en daarmee de balans tussen excitatie en inhibitie in het centrale zenuwstelsel.

Plasticiteit in het neuronale netwerk dat de circadiaanse klok vormt is cruciaal voor adaptatie aan nieuwe omgevingsomstandigheden. Dit proefschrift benadrukt echter ook het belang van een goed werkende klok voor een goede gezondheid. 'Life style' in onze moderne maatschappij beïnvloedt onze hersenen op een andere manier dan een oude 'natuurlijke' omgeving zou doen. Langdurige blootstelling aan kunstlicht kan bijvoorbeeld neurotransmitter systemen in onze hersenen beïnvloeden. Dit is aangetoond voor de SCN in dit proefschrift. In andere studies is dit principe aangetoond in andere nuclei van de hypothalamus waar ook een verschuiving in neurotransmitter inhoud is

gevonden dat geassocieerd kon worden met verandering in angst-gerelateerd gedrag. De mechanismen waarmee de SCN adaptatie verzorgd, is geëvalueerd om organismen in staat te stellen zich aan seizoens-veranderingen aan te passen en ook om hun gedrag aan te passen aan een veranderingen aan de omgeving. Langdurige blootstelling aan kunstlicht in de avond echter kan de centrale klok in een continue situatie van 'lange dag' houden wat schadelijke effecten kan hebben op de fysiologie en het gedrag. Hoewel het effect op de SCN van veranderde licht-donker in verschillende seizoenen reversibel is, zijn de effecten van veroudering op de centrale klok irreversibel wat betreft moleculaire ritmes, intracellulaire signaal transductie mechanismen, membraan eigenschappen, intercellulaire communicatie, netwerk synchronisatie en gedrag. Dit alles heeft als resultaat dat de amplitude van het circadiaanse tijd signaal verlaagd is, perifere oscillatoren verzwakt zijn en de dagelijkse ritmes in fysiologie en gedrag verstoord worden. Herstel van deze deficiënties in cellulaire en intercellulaire functies kunnen bijdragen bij het gezond oud te worden en kunnen ouderdoms-gerelateerde ziekten waarbij het disfunctioneren van de centrale klok een rol speelt, verzachten.

