



Universiteit
Leiden
The Netherlands

A balanced clock: network plasticity in the central mammalian clock

Olde Engberink, A.H.O.

Citation

Olde Engberink, A. H. O. (2022, June 30). *A balanced clock: network plasticity in the central mammalian clock*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3421086>

Version: 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/1887/3421086>

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

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Bijna alle organismen, van eencelligen tot de mens, hebben een intern tijdssysteem ontwikkeld dat hen in staat stelt om zich aan te passen aan de 24-uurs licht-donker cyclus op aarde. Bij zoogdieren bevindt de centrale circadiane (circa = ongeveer, dia = dag) klok zich in de nucleus suprachiasmaticus (SCN) in de hypothalamus. Het signaal dat hier wordt gegenereerd dient als klok-sigitaal voor de rest van het brein en andere organen en zorgt voor 24-uurs ritmes in fysiologie en gedrag. De SCN is een bilaterale hersenstructuur die bestaat uit twee kernen van elk ongeveer 10.000 neuronen en is gesitueerd bovenop het optisch chiasma, de kruising van beide oogzenuwen in de hersenen. Het neuronale netwerk van de SCN kan de intern gegenereerde ritmes van ongeveer 24 uur synchroniseren met de licht-donker cyclus van de omgeving. De belangrijkste tijdsaanwijzing uit de omgeving, ook wel zeitgeber genoemd, is licht dat wordt opgevangen en verwerkt door gespecialiseerde ganglion cellen in de retina welke direct naar de SCN projecteren via de zenuwbanen, de tractus retinohypothalamicus. De meeste SCN neuronen zijn zelfstandig oscillerende cellen die een ritme in de frequentie van actiepotentialen genereren met een piek in elektrische activiteit in het midden van de dag. Communicatie en koppeling binnen het SCN netwerk zijn belangrijk om een sterk en coherent output signaal van de SCN naar de periferie te genereren, maar ook om de SCN te synchroniseren met de licht-donker cyclus uit de omgeving. Op deze manier is de SCN in staat om de timing van vele fysiologische- en gedragsfuncties te reguleren en om deze ritmes optimaal af te stemmen met de omgeving.

De neuronen van de SCN produceren gezamenlijk een sinusgolfachtig signaal in elektrische activiteit, die zijn piek bereikt gedurende de dag en minimaal is in de nacht. De amplitude van dit ritme in elektrische activiteit is beïnvloedbaar door externe factoren, zoals daglengte (fotoperiode), en is gekoppeld aan de mate van synchronisatie tussen de neuronen van het netwerk. Aanpassing aan lange fotoperiodes, dus zomerdagen, zorgt er bijvoorbeeld voor dat de piek in elektrische activiteit (de fases) van de individuele SCN neuronen meer verspreid is over de 24 uur en dus dat het netwerk minder gesynchroniseerd is. Tegelijkertijd is de amplitude van het output signaal, dus het signaal dat de SCN neuronen gezamenlijk produceren, lager en met een verbrede golfvorm. Veroudering is een andere factor die ook effect heeft op het SCN netwerk, met een vermindering in synchroniciteit in het netwerk en een verlaagd amplitude van het ritme van elektrische activiteit van de SCN. In dit proefschrift zijn verschillende studies beschreven waarin de effecten van blootstelling aan licht en veroudering op de netwerkorganisatie van SCN zijn onderzocht. In het bijzonder is een groot deel van dit werk gericht op de rol van de meest voorkomende neurotransmitter in de SCN, namelijk GABA, en de GABAerge exciterende/inhiberende (E/I) balans in de plasticiteit van het SCN netwerk.

De invloed van licht op het circadiane ritme en op de netwerk-eigenschappen de SCN is overtuigend beschreven in studies naar adaptatie aan verschillende daglengtes. Het blijft echter de vraag of ontvangst van de volledige fotoperiode nodig is voor de codering van daglengte door de SCN, of dat blootstelling aan korte lichtpulsjes aan het begin en het einde van de dag voldoende is. In **hoofdstuk 2** wordt een reeks experimenten beschreven waarin onderzocht werd of blootstelling aan licht gedurende de hele dag nodig was voor fotoperiode-afhankelijke cellulaire reorganisatie binnen het SCN netwerk, zoals aangetoond na adaptatie aan een lange of korte daglengte.

Om dit te bestuderen werden muizen blootgesteld aan “skeleton fotoperioden” die lange zomerdagen van 16 uur licht of korte winterdagen van 8 uur licht nabootsten. Een skeleton fotoperiode wordt gekenmerkt door twee korte lichtpulsen van 30 minuten die het begin en het einde van de dag aanduiden en waarbij de rest van de 24 uur het licht uit blijft. Eerst werd met behulp van gedragsmetingen beoordeeld of de muizen hun activiteit konden aanpassen aan deze skeleton fotoperioden. Zoals verwacht vertoonden de muizen vergelijkbare gedragsfenotypes als bij aanpassingen aan volledige lange of korte dagen, met gecomprimeerde en uitgebreide actieve fases onder respectievelijk lange en korte fotoperioden. Vervolgens werden de dieren, nadat ze zich hadden aangepast aan de skeleton of de volledige fotoperiode, blootgesteld aan een lichtpuls waarmee fase verschuivingen werden geïnduceerd, aangezien eerder werk heeft uitgewezen dat de fase verschuivende effecten van licht in relatie staan tot daglengte. Overeenkomstig met de dieren die zijn aangepast aan volledige fotoperioden, bleek de fase verschuiving na een lichtpuls kleiner bij de muizen die aangepast waren aan een skeleton lange fotoperiode dan bij muizen die aangepast waren aan een skeleton korte fotoperiode.

Om de cellulaire synchronisatie binnen het netwerk van de SCN na adaptatie aan skeleton fotoperioden te onderzoeken, werden aansluitend elektrofysiologische en bioluminescentie-imaging experimenten uitgevoerd. De *ex vivo* ensemble multiunit elektrische activiteit (MUA) in SCN plakjes van muizen die aangepast waren aan een skeleton lange dag had een duidelijk bredere golfvorm in vergelijking met de skeleton korte dag. Deze verandering in de golfvorm van het elektrische output signaal duidt op een lager synchronisatieniveau in het SCN netwerk na aanpassing aan de skeleton lange fotoperiode. Dit laatste is een belangrijk kenmerk van de SCN in de codering en overbrenging van daglengte-informatie. Cellulaire synchronisatie werd ook bepaald op basis van de moleculaire ritmes van de individuele SCN cellen. Hiervoor werden genetisch gemodificeerde muizen gebruikt waarvan met behulp van bioluminescentie technieken in SCN plakjes het klok gen *per2* gedurende opeenvolgende cycli gemonitord kon worden. Deze bioluminescentie-experimenten toonden een bredere fase verspreiding in PER2-piektijden in plakjes van muizen die waren aangepast aan een skeleton lange fotoperiode, vergeleken met een skeleton korte fotoperiode. Deze resultaten bevestigden dat de SCN van muizen die zijn aangepast aan skeleton lange dag minder gesynchroniseerd is dan de SCN van muizen die zijn aangepast aan skeleton korte dag, iets wat vergelijkbaar is bij muizen blootgesteld aan volledige fotoperioden.

Ten slotte werden *ex vivo* calcium imaging experimenten gedaan om het effect van skeleton fotoperioden op de activiteit van de meest voorkomende neurotransmitter in de SCN, GABA, en de GABAerge E/I balans te bestuderen. GABA kan zowel een inhiberende als exciterende reactie geven wanneer het bindt aan de receptor. Het percentage GABAerge inhiberende reacties was significant lager in SCN weefsel van muizen aangepast aan skeleton lange fotoperiode, in vergelijking met de skeleton korte fotoperiode. Net als bij adaptatie aan een volledige lange dag, was de E/I balans opmerkelijk hoog na een skeleton lange dag.

De resultaten van **hoofdstuk 2** lieten zien dat blootstelling en aanpassing aan een skeleton fotoperiode, en dus de timing van slechts twee korte lichtpulsen, de circadiane klok op een vergelijkbare manier beïnvloedt als blootstelling aan licht gedurende een hele dag zoals bij een

volledige fotoperiode. Dit benadrukt nog eens de krachtige, maar potentieel schadelijke effecten van zelfs relatief korte blootstelling aan licht 's avonds of 's nachts voor bijvoorbeeld nachtdieren.

Daglengte-afhankelijke veranderingen in het SCN netwerk zijn een goed voorbeeld van SCN netwerk plasticiteit. Onderzoek heeft aangetoond dat veroudering de circadiane klok beïnvloedt op verschillende niveaus, waaronder ook het netwerk. In de volgende twee hoofdstukken hebben we het effect van veroudering op verschillende cellulaire-, netwerk- en gedragseigenschappen van het circadiane systeem verder onderzocht. In **hoofdstuk 3** werd de plasticiteit van de circadiane klok in oude muizen onderzocht, terwijl ze werden blootgesteld aan verschillende lichtregimes. Oude PER2::LUCIFERASE-muizen (22-28 maanden oud) en jonge controle muizen werden blootgesteld aan een equinoctiale (LD 12:12), lange (LD 16:8) of korte (LD 8:16) fotoperiode. De oude muizen vertoonden een minder sterk ritme in gedrag, met een meer gefragmenteerd activiteitspatroon, en een verminderd vermogen om zich gedragsmatig aan te passen aan een korte fotoperiode. Na deze gedragstesten werd PER2::LUC-genexpressie gemeten in SCN plakjes van jonge en oude muizen die waren blootgesteld aan de verschillende fotoperioden, om zo codering van daglengte op moleculair niveau te onderzoeken. Verrassend genoeg waren de PER2::LUC ritmes opmerkelijk vergelijkbaar in de SCN van jonge en oude muizen onder de verschillende fotoperioden. Dus, codering van daglengte-informatie in de SCN, althans op moleculair niveau, is nog steeds intact na veroudering. Het verminderde vermogen om zich gedragsmatig aan te passen aan verschillende fotoperioden lijkt dus los te staan van de codering van daglengte op moleculair niveau in de SCN.

In **hoofdstuk 4** werd het effect van veroudering op de functie van GABA, de bijbehorende E/I balans en op Ca^{2+} homeostase in de SCN onderzocht. Zoals eerder beschreven is GABA een van de belangrijkste en meest voorkomende neurotransmitters in de SCN en kan GABA zowel inhiberende als exciterende responses teweegbrengen. Deze reacties zijn te bepalen door de intracellulaire calcium te meten terwijl exogeen GABA aan de SCN neuronen wordt toegevoegd. Zo werd de polariteit van Ca^{2+} levels als reactie op exogene GABA-stimulatie bepaald in SCN plakjes van oude muizen (20-24 maanden) en jonge controles en op basis van deze resultaten werd de E/I balans vastgesteld. In SCN weefsel van oude muizen was de hoeveelheid GABAerge excitatie, en daarmee ook de E/I balans, hoger in vergelijking met jonge controles. Vooral in het posterior gedeelte van de SCN nam het percentage exciterende reacties toe en nam het percentage inhiberende reacties significant af, wanneer vergeleken met SCN plakjes van jonge muizen. Bovendien waren de baseline Ca^{2+} levels hoger in oude SCN neuronen, in vergelijking met jonge, wat wijst op een veranderde calciumhomeostase in de SCN van oude muizen. Met ouderdom is ook in andere hersennetwerken een verhoogde E/I balans aangetoond door verlies van inhiberende signalen. De stabilisatie van de E/I balans tot een gezonde ratio zal de eigenschappen van het verouderde SCN netwerk ten goede komen en kan ook ouderdomsgerelateerde ziekten verminderen die worden veroorzaakt door minder goed werkende centrale klok.

De resultaten van het onderzoek beschreven in dit proefschrift, samen met de uitkomsten van andere studies, suggereren dat de balans tussen GABAerge excitatie en inhibitie een rol speelt bij synchronisatie en/of plasticiteit van het SCN netwerk. Het mechanisme hierachter blijft echter onderwerp voor toekomstige studies. Farmacologische manipulatie van GABAerge neurotransmissie is een belangrijk instrument in zowel in vivo als in vitro onderzoek naar de E/I

balans. Hiervoor worden middelen gebruikt die de GABA-receptor zelf beïnvloeden, maar is ook manipulatie van de intracellulaire Cl^- concentratie een aangrijpingspunt, omdat dit de hoeveelheid en polariteit van de ionenstroom door de GABA-receptor beïnvloedt. In **hoofdstuk 5** zijn experimenten uitgevoerd waarin een nieuw ontwikkelde blocker, genaamd ML077, van een van de ion co-transporters (KCC2) werd gebruikt om zo de rol van KCC2 op de GABA responses te onderzoeken. KCC2 is een co-transporter die de intracellulaire Cl^- concentratie reguleert door Cl^- uit het cytoplasma te verwijderen. Door deze transporter te blokkeren wordt de intracellulaire Cl^- concentratie verhoogd en dus de GABA response van de geblokkeerde neuronen beïnvloed. Met behulp van calcium imaging experimenten, werd de polariteit van Ca^{2+} levels als reactie op exogene GABA-stimulatie bepaald voor en na het blokkeren van KCC2 met ML077 in SCN plakjes van muizen die voorafgaand aan het experiment aangepast waren aan verschillende daglengtes (LD 12:12, LD 16:8, LD 8:16). Het blokkeren van KCC2 met ML077 veroorzaakte een verschuiving in de polariteit van de GABAerge responses door exciterende reacties te veroorzaken in voorheen inhiberend reagerende neuronen. Dit suggereert dat KCC2 een essentiële component is in het reguleren van de intracellulaire Cl^- concentratie en het Cl^- evenwichtspotentiaal, en daardoor ook in het bepalen van de polariteit van de GABAerge response. Opmerkelijk is dat het percentage exciterende cellen in een vergelijkbare mate toenam na blokkade van KCC2 in SCN plakjes van muizen die waren aangepast aan lange of korte fotoperiode en LD 12:12 conditie. Dit geeft aan de ene kant aan dat KCC2 activiteit belangrijk is voor het handhaven van de E/I balans onder alle fotoperioden, maar ook dat KCC2 de netwerkveranderingen van korte naar lange fotoperiode kan nabootsen. De resultaten van dit hoofdstuk lieten zien dat ML077 een krachtig hulpmiddel kan zijn voor toekomstig onderzoek naar de effecten van de E/I balans op het synchronisatieniveau in het SCN netwerk.

Tot slot worden in **hoofdstuk 6** alle resultaten van dit proefschrift bediscussieerd. Plasticiteit en de juiste balans in het netwerk van de centrale circadiane klok zijn nodig voor accommodatie aan veranderingen in de omgeving. In dit proefschrift is voor het eerst aangetoond dat zelfs korte blootstelling aan licht aan het begin en het einde van de dag netwerkveranderingen kunnen veroorzaken, waaronder een verandering in de functie van GABA. Het is aangetoond dat langdurige blootstelling aan kunstmatig licht in de avond, iets wat gebruikelijk is in onze moderne 24-uurs samenleving, neurotransmittersystemen in verschillende regionen in de hersenen, waaronder de SCN, beïnvloedt. Bovendien toonde dit werk aan dat vergelijkbare veranderingen in de GABAerge functie worden bereikt door een korte blootstelling aan helder licht laat in de avond. De licht-donker cyclus verandert van nature door het jaar heen. Maar langdurige blootstelling aan kunstmatig licht's avonds, en zelfs korte blootstelling aan helder licht 's avonds laat, houdt ons circadiane systeem maanden en zelfs jaren in een continue zomer-modus. Het is nog steeds onduidelijk hoe dit onze fysiologie en ons gedrag beïnvloedt en of de veroorzaakte veranderingen in ons kloknetwerk nog omkeerbaar zijn. Ten slotte is de (langdurige) blootstelling aan licht in de avond iets dat we onszelf opleggen, maar het beïnvloedt ook, ongevraagd, de circadiane klokfunctie van nachtdieren in hun natuurlijke omgeving.

Hoewel lichtmanagement kan worden beïnvloed, zijn de effecten van veroudering meestal onomkeerbaar. Net als adaptatie aan een lange dag heeft veroudering ook invloed op de functie

van GABA in het SCN netwerk, iets wat zou kunnen bijdragen aan ouderdomsgerelateerde ziekten waarbij het disfunctioneren van de centrale klok een rol speelt. Toekomstig onderzoek naar farmacologische manipulatie van de GABAerge E/I balans in de SCN, en het effect ervan op de synchronisatie-mechanismen binnen het netwerk, is belangrijk omdat het een interessant aanknopingspunt kan zijn voor het herstel van (ouderdomsgerelateerde) circadiane aandoeningen.

