

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/25884> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Saaltink, Dirk-Jan

Title: Doublecortin-like knockdown in the adult mouse brain: implications for neurogenesis, neuroplasticity and behaviour

Issue Date: 2014-06-05

Samenvatting

Neurogenese in het volwassen brein is een proces waarbij neuronale stam cellen zich ontwikkelen naar nieuwe neuronen. In twee hersengebieden van het volwassen brein worden nieuwe neuronen geboren; de hippocampale dentate gyrus (DG) en de subventriculaire zone (SVZ) van de laterale ventrikels. In de DG groeien neuronale voorloper cellen (NVC's) uit tot volwassen neuronen die hun functie vervullen in de DG. NVC's die in de SVZ geboren worden migreren over een langere afstand naar hun doel gebied. Via de rostrale migratie stroom (RMS) bewegen deze cellen zich naar de bulbus olfactorius waar zij zich ontwikkelen tot volwassen neuronen. De eiwitten Doublecortin (DCX) en het sterk homologe Doublecortin-like (DCL) spelen een belangrijke rol tijdens de embryonale ontwikkeling van het brein. In het volwassen brein komt ook DCX tot expressie in met name de gebieden met neurogenese. Of DCL ook tot expressie komt in het volwassen brein is onbekend. Daarom hebben we met een nieuw DCL-antibody onderzocht of DCL tot expressie komt in het volwassen brein. Ook hebben we gekeken naar de rol die DCL speelt in het volwassen brein middels een transgene muis welke een induceerbare siRNA construct tot expressie brengt dat DCL eiwit niveaus sterk reduceert.

In **hoofdstuk 2** beschrijven we DCL expressie in het volwassen brein. DCL is een onderdeel van het complexe DCLK1 gen dat onder andere ook de eiwitten DCLK-long en DCLK-short tot expressie brengt. Omdat de huidige antidiodes tegen DCLK1 geen onderscheid maken tussen de verschillende DCLK1 eiwit varianten hebben we een nieuw DCL specifiek antibody ontwikkeld. Zoals verwacht komt DCL voor in de populatie cellen in de hippocampus en SVZ, RMS en bulbus olfactorius, die ook bij neurogenese betrokken zijn. Deze resultaten laten zien dat DCL nauw betrokken is bij het neurogenese proces in het volwassen brein. Ook hebben we DCL aangetroffen in hersengebieden waar we dat niet hadden verwacht. Zo komt DCL tot expressie in de eilanden van Calleja (ICj), suprachiasmatische nucleus (SCN) en de tanycyten in de hypothalamus. Omdat deze hersengebieden niet bekend staan als gebieden met neurogenese roepen onze resultaten de vraag op welke rol DCL wel speelt in deze gebieden.

In **hoofdstuk 3** hebben we de DCL knockdown (DCL-KD) muis onderzocht en we laten zien dat DCL eiwit expressie sterk is gereduceerd na toediening van doxycycline. Doxycycline werd via het voer aan de dieren gegeven en resulteerde in een hoge expressie van short hairpin RNA (shRNA) tegen DCL. De daarop volgende Western blot analyse liet een sterke reductie zien van DCL eiwit expressie terwijl de eiwit varianten DCLK-long en DCLK-short niet waren aangetast. Vervolgens hebben we het effect van DCL knockdown op cel morfologie bekeken door gebruik te maken van stereologische technieken. Bromodeoxyuridine (BrdU) labelling liet een toename zien in cel proliferatie in de hippocampus terwijl er minder BrdU gelabelde cellen het volwassen stadium bereikten. DCX positieve cellen lieten een sterk afwijkend morfologisch fenotype zien waarbij er nauwelijks uitlopers werden gevormd

die richting het bestaande netwerk in de moleculaire laag van de hippocampus groeiden. Omdat DCL knockdown een sterk effect had op neurogenese in de hippocampus hebben we hippocampus afhankelijk leergedrag onderzocht bij de DCL-KD muizen. Middels een ‘circular hole board’ taak is het hippocampus afhankelijke ruimtelijk geheugen getest. Het ruimtelijk geheugen van de DCL-KD muizen verschilde niet van normale muizen uit hetzelfde nest. Wel gingen DCL-KD muizen significant veel later hun thuishoek in.

In **hoofdstuk 4** hebben we de gedragsresultaten uit hoofdstuk 3 bevestigd middels een tweede hippocampus afhankelijke leertaak. Tijdens een ‘contextual fear conditioning’ test kregen de dieren tijdens 6 trainingssessies een stimulus aangeboden met daarbij een milde, elektrische schok. In de daar op volgende geheugen test werden de dieren opnieuw blootgesteld aan de stimulus, maar zonder schok. DCL-KD dieren vertoonden in dezelfde mate angstig gedrag als hun wildtype nestgenoten. Opvallend was echter de sterke angstresponse bij het zien en horen van de eerste stimulus in de serie van 6 geheugen testen. Bij die eerste stimulus vertoonden DCL-KD dieren significant meer angstgedrag. Daarnaast vertoonden de DCL-KD muizen veel minder ‘tail rattling’ gedrag.

Een onverwachte vondst betrof DCL expressie in hypothalamische tanycyten zoals beschreven in hoofdstuk 2. Deze tanycyten maken deel uit van de ‘Hypothalamic-Pituitary-Thyroid-axis’ (HPT-axis) en zijn betrokken bij de regulatie van de energie huishouding. Daarom hebben we de rol van DCL in schildklierhormoon regulatie onderzocht en beschreven in **hoofdstuk 5**. We hebben lichaamsgewicht, serum concentratie T3 en T4 en deiodinase 2 (D2) enzym activiteit gemeten in weefsel uit de hypothalamus van DCL-KD muizen en hun wildtype nestgenoten. Daarnaast hebben we mRNA expressie gemeten van TRH, NPY, D2 en D3 in puches van de hypothalamus met daarbij weefsel uit de ARC-ME en PVN kernen. DCL expressie was sterk gereduceerd in de tanycyten. Dit ging gepaard met een verminderde toename van het lichaamsgewicht en een significante toename van D2 activiteit. D2 is een enzym dat inactieve T4 omzet in actieve T3. Daarom hebben we ook gekeken naar de T3 en T4 concentraties in het bloed. Ondanks de verhoogde D2 activiteit hebben we geen verschillen gevonden in T3 of T4 serum concentraties. Ook is er geen verschil gevonden in mRNA expressie van TRH, NPY, D2 en D3 in hypothalamus weefsel van DCL-KD en wildtype muizen. Deze resultaten laten zien dat DCL een rol speelt in de regulatie van D2 activiteit en daarbij een mogelijke rol heeft in de schildklierhormoon huishouding in de hypothalamus.

In **hoofdstuk 6** worden alle bevindingen aangaande DCL in het volwassen muizenbrein in dit proefschrift bediscussieerd. Ten eerste laten we met immunohistochemie zien dat DCL tot expressie komt in het volwassen brein. Zoals verwacht komt DCL tot expressie in de hippocampus, SVZ, RMS en bulbus olfactorius. Het feit dat DCL ook in andere hersengebieden tot expressie komt roept de vraag op in welke mate deze hersengebieden in staat zijn tot

Samenvatting

plasticiteit en neurogenese. De validatie van het doxycycline induceerbare DCL-KD muismodel resulteerde in een reductie van DCL eiwit expressie en verstoorde neurogenese. Hippocampus gerelateerd leervermogen was echter niet aangetast na DCL knockdown. Naast neurogenese lijkt DCL een rol te spelen in D2 activiteit in de hypothalamus. Resumerend, het DCL-KD muismodel is een bruikbaar model om DCL te bestuderen in het volwassen brein zonder dat DCL reductie wordt gecompenseerd door DCX. Met dit model in de hand kan de rol van DCL in neurogenese en neuroplasticiteit verder worden onderzocht in de hippocampus, hypothalamus en frontale brein.

