



Serotonergic Control of the Developing Cerebellum

M. Oostland

Nederlandse samenvatting

De ontwikkeling van de hersenen is een proces dat nauwgezet gereguleerd wordt, zowel voor als na de geboorte, en is afhankelijk van vele factoren. De neurotransmitter serotonine (5-HT) is een van de factoren die betrokken is bij zowel pre- als postnatale ontwikkeling van de hersenen. Veranderingen in het niveau van serotonine in de hersenen tijdens de ontwikkeling kan invloed hebben op de verbindingen tussen hersencellen (neuronen). Deze wijzigingen in de neuronale verbindingen kunnen langdurige veranderingen teweegbrengen die kunnen leiden tot neurologische ontwikkelingsstoornissen zoals autisme en schizofrenie. Echter, de manier waarop serotonine tijdens de ontwikkeling van de hersenen zulke veranderingen teweeg kan brengen is nog niet volledig bekend.

Een van de hersengebieden die zich voornamelijk na de geboorte ontwikkelt, is het cerebellum (de kleine hersenen). Het cerebellum is een zeer georganiseerd hersengebied, waarvan de cortex bestaat uit drie lagen: de moleculaire laag, de Purkinjecellaag, en een laag met korrelcellen (granule cells). Purkinjecellen zijn de enige (remmende) output van de cerebellaire cortex en ze ontvangen slechts twee glutamaterge inputs: van de korrelcellen via de parallelle vezels (parallel fibres) en van de klimvezels (climbing fibres). Purkinjecellen ontvangen vanaf vlak na de geboorte inputs van wel duizenden verschillende parallelle vezels. Iedere Purkinjecel wordt rondom de geboorte ook geïnnerveerd door meerdere klimvezels, die langzaam op één na allemaal verdwijnen in een nauw gereguleerd eliminatieproces. De ontwikkeling van het cerebellum, zoals de migratie van neuronen, de opstelling van cellen, en de groei en rijping van neuronen, vindt bij knaagdieren gedurende de eerste drie

weken na de geboorte plaats. Al lange tijd is bekend dat het cerebellum betrokken is bij de coördinatie en het leren van bewegingen, maar meer recent denkt men dat het cerebellum ook betrokken is bij cognitie en emotie. In volwassen dieren wordt het cerebellum volop geïnnerveerd door serotonine: serotonerge vezels zijn de op twee na belangrijkste aanvoerende vezels naar het cerebellum. Om een beter begrip te krijgen van de mogelijke rol van het cerebellum in neurologische ontwikkelingsstoornissen en de rol van het serotonerge systeem daarbij, is het van belang om de werking van het serotonerge systeem in het cerebellum te begrijpen. Echter, de fysiologie van het serotonerge systeem en de functionele betekenis zijn nog niet volledig bekend tijdens de ontwikkeling van het cerebellum.

Het onderzoek dat wordt beschreven in dit proefschrift biedt inzicht in de mechanismen achter de serotonerge invloed op het cerebellum tijdens de postnatale ontwikkeling. De bevindingen duiden op een krachtige rol voor serotonine in de fysiologie van het ontwikkelende cerebellum. De effecten van deze serotonerge invloed spreiden zich uit over zowel locatie als tijd. De serotonerge invloed behoudt echter zijn gespecialiseerde effecten door een efficiënt mechanisme van verschillende expressiepatronen van diverse serotonine receptoren te gebruiken: 5-HT₁, 5-HT₂ en 5-HT₃ receptoren.

In hoofdstuk 2 laat ik voor het eerst zien dat functionele 5-HT₃ receptoren tot expressie komen in het cerebellum. Door gebruik te maken van transgene muizen die een groen fluorescent signaal hebben in iedere cel die ook de 5-HT₃ receptor bevat, laat ik zien dat cerebellaire korrelcellen zowel pre-, post- als extrasynaptisch 5-HT₃ receptoren tot expressie brengen. De expressie van 5-HT₃ receptoren is beperkt tot de eerste drie weken na de geboorte, met een piek rond de tweede week na de geboorte. Activatie van 5-HT₃ receptoren resulteert in een inwaartse stroom in de korrelcellen en verhoogt de frequentie van spontane elektrische signalen in de Purkinjecellen. In dit hoofdstuk laat ik verder zien dat 5-HT₃ receptoren de synaptische plasticiteit tussen de korrelcellen en de Purkinjecellen regelen tijdens de postnatale ontwikkeling.

In hoofdstuk 3 onderzoek ik of serotonine via de 5-HT₃ receptoren ook de rijping van de morfologie en fysiologie van Purkinjecellen beïnvloedt. Ik concludeer dat

5-HT₃ receptoren de rijping van Purkinjecellen beperkt en dat dit geregeld wordt via het eiwit reelin. Het farmacologisch blokkeren van de 5-HT₃ receptor of reelin resulteert in een toename van de dendritische complexiteit van Purkinjecellen tijdens de postnatale ontwikkeling. Door gebruik te maken van een ander soort transgene muizen, de zogenoemde 5-HT_{3A} receptor knockout muizen die geen functionele 5-HT_{3A} receptoren meer hebben, bevestig ik de bevinding dat serotonine, via de 5-HT₃ receptoren, de rijping van Purkinjecellen beïnvloedt, zowel qua morfologie als qua fysiologie. Dit effect vond ik echter alleen terug in muizen tot drie weken oud, en niet in muizen van vijf weken oud. Ik concludeer dat de serotonerge invloed op de ontwikkeling van Purkinjecellen beperkt is tot de periode van rijping tijdens de eerste drie weken. Hoewel de 5-HT₃ receptoren in slechts één celtype in het cerebellum voorkomen, namelijk de korrelcellen, spreidt de invloed die serotonine via deze 5-HT₃ receptoren kan uitoefenen zich uit tot de rest van het neuronale netwerk van het cerebellum. In de 5-HT_{3A} receptor knockout muizen vond ik namelijk ook een vertraging in de eliminatie van de klimvezels. Een verstoring van het serotonerge systeem tijdens de postnatale ontwikkeling kan dus verregaande consequenties hebben voor het cerebellaire netwerk. Echter, ook hier vond ik een temporele restrictie: de eliminatie van klimvezels was tien weken na de geboorte genormaliseerd. Dit houdt in dat iedere Purkinjecel door nog slechts één klimvezel geïnnerveerd wordt, een situatie die zich in ieder gezond volwassen brein voordoet. Tezamen tonen de resultaten van dit hoofdstuk dat het cerebellum een zeer adaptief systeem is tijdens de postnatale ontwikkeling.

In hoofdstuk 4 toon ik aan dat de korrelcellen in het cerebellum tijdens de postnatale ontwikkeling ook 5-HT_{1A} en 5-HT_{2A} receptoren tot expressie brengen. De expressie van 5-HT₁ receptoren door cerebellaire korrelcellen is beperkt tot de eerste twee weken na de geboorte, met een piek rondom één week na de geboorte. De expressie van 5-HT₂ receptoren door cerebellaire korrelcellen begint tijdens de eerste postnatale week, heeft een piek rond twee weken na de geboorte en heeft een constante expressie tot tenminste tien weken na de geboorte. Deze expressiepatronen komen overeen met de al bekende expressiepatronen van de 5-HT₁ en 5-HT₂ receptoren op Purkinjecellen. Om de rol van serotonine zowel tijdens de postnatale ont-

wikkeling als in het volwassen cerebellum verder te onderzoeken, heb ik de functie van 5-HT₂ receptoren onderzocht. Ik laat zien dat activatie van 5-HT_{2A} receptoren op de korrelcellen een chloridestroom teweegbrengt, die voorkomen kan worden door eiwit kinase A of eiwit kinase C te blokkeren. Serotonine 5-HT_{2A} receptoren zorgen tijdens de postnatale ontwikkeling ook voor stabiliteit van de synaps tussen de parallelle vezels en de Purkinjecellen door de variabiliteit van de amplitude van de excitatoire postsynaptische stroom (EPSC) te verminderen. Bovendien resulteerde een farmacologische blokkade van 5-HT_{2A} receptoren in een verhoging van de pre-synaptische LTP op de parallelle vezel - Purkinjecel synaps in twee maanden oude muizen.

In de algemene discussie van het proefschrift presenteer ik een model over hoe serotonine de ontwikkeling van het cerebellum beïnvloedt. Een vermoedelijk tonische activiteit van serotonine receptoren door binding van serotonine wordt specifiek door restrictie van de expressie van serotonine receptoren, zowel qua tijdspatroon als qua locatie. Deze verschillende serotonine receptoren hebben allemaal hun eigen, soms tegenstrijdige, functies. Tijdens de eerste postnatale week stimuleren de 5-HT₁ receptoren, die dan in zowel korrelcellen als Purkinjecellen aanwezig zijn, de groei van dendrietten en de formatie van synapsen. Later zorgt activatie van 5-HT₃ receptoren op cerebellaire korrelcellen voor een beperking van de groei van de dendrietboom van Purkinjecellen. De activatie van 5-HT₃ receptoren beïnvloedt tevens de fysiologische rijping van Purkinjecellen, ze regelen de synaptische plasticiteit op de synapsen tussen parallelle vezels en de Purkinjecellen en beïnvloeden daardoor de competitie tussen de parallelle vezels en de klimvezels op de dendrietboom van Purkinjecellen. Deze competitie reguleert een juiste eliminatie van de klimvezels. Ten slotte zorgt activatie van de 5-HT₂ receptoren op zowel korrelcellen als Purkinjecellen tijdens de late postnatale ontwikkeling en in het volwassen cerebellum voor stabiliteit van synaptische activiteit. Op deze manier reguleert serotonine de ontwikkeling van het cerebellum in drie fases: 1) het stimuleren van groei van dendrietbomen en de formatie van synapsen, 2) het vastleggen van de neuronale verbindingen die de groei van dendrietbomen beperkt, maar ondertussen wel synaptische stabiliteit veilig stelt en 3) het stabiliseren van synapsen. Deze bevindingen kunnen ons helpen om de

manier waarop serotonine de functie van het cerebellum beïnvloedt te begrijpen en kunnen ons inzicht geven in de pathofysiologische condities waarin het serotonerge systeem niet meer goed functioneert.