UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM

Programming of the Brain by Early-Life Stress. The Impact of Early Nutritional Interventions and Later Life Challenges

M.R. Abbink

Het vroege leven en met name de periode vlak na de geboorte is een kritieke fase voor de ontwikkeling van de hersenen waarbij onze hersenen worden gevormd voor het leven. Deze 'programmering' van de hersenen kan negatief worden beïnvloed door bijvoorbeeld ernstige stress of traumatische gebeurtenissen in het vroege leven. Voorbeelden hiervan zijn verwaarlozing, seksueel misbruik, geweld, langdurige ziekte of hongersnood. Als zulke negatieve invloeden optreden tijdens de vroege ontwikkeling van een kind kunnen ze de hersenstructuur en -functie blijvend beïnvloeden. Bovendien verhogen ze het risico op het ontstaan van hersenaandoeningen op latere leeftijd. Uit literatuur is gebleken dat stress in het vroege leven bijvoorbeeld het risico verhoogt op latere leer- en geheugenproblemen, depressie en schizofrenie. Echter, of factoren als leefstijl of negatieve omgevingsfactoren later in het leven deze aanleg voor hersenaandoeningen na vroege stress mogelijk kunnen herstellen of anderszins negatief beïnvloeden, was nog onbekend.

Chronische stress tijdens het vroege leven komt wereldwijd nog steeds veel voor maar is moeilijk te voorkomen. Daarbij komt dat er momenteel geen effectieve behandelingen beschikbaar zijn om de gevolgen van vroege stress tegen te kunnen gaan. Het wordt daarom steeds belangrijker om de bijdrage van leefstijl aan het verhoogde risico op psychopathologie na vroege stress beter te begrijpen. Meer kennis over dit onderwerp zou kunnen helpen om kwetsbare bevolkingsgroepen te identificeren en zou kunnen bijdragen aan het ontwikkelen van (preventieve) therapeutische strategieën om de effecten van vroege stress op de volwassen gezondheid te verbeteren, of te voorkomen. Het is hierbij essentieel om inzicht te verkrijgen in de onderliggende biologische mechanismen. In dit proefschrift proberen we meer inzicht te krijgen in hoe vroege stress het brein beïnvloedt, en wat de bijdrage van leefstijl of externe omgevingsfactoren in het latere leven zijn in dit proces. Hierbij focussen we op hippocampale plasticiteit, astrocyten en neurogenese.

In hoofdstuk 1 bespreken we bestaande literatuur over de effecten van vroege stress op een belangrijke steuncel in het brein, de astrocyt. We behandelen effecten van verschillende soorten stress in de vroege levensfase (d.w.z. onvoldoende moederzorg, infecties en ondervoeding) op astrocyt-eigenschappen, zowel op korte als op lange termijn. De belangrijkste bevindingen zijn dat vroege stress invloed heeft op de expressie van glial fibrillary acidic protein (GFAP) en permanente veranderingen veroorzaakt in de glutamaat- en glucosetransporters van astrocyten. Daarnaast presenteren we de hypothese dat astrocyten belangrijke spelers kunnen zijn bij de integratie van diverse signalen uit de vroege omgeving, zoals hormonen, voedings-factoren en immuun-gerelateerde signalen. Hiermee dragen astrocyten bij aan het synergistische effect van deze vroege omgevingsfactoren op de hersenen. Ten slotte lichten we de mogelijkheid toe om humane iPSC-modellen te gebruiken om onze kennis over de biologie van astrocyten te vergroten en meer inzicht te krijgen in de interactie van astrocyten met de omgeving in een context van vroege stress.

In hoofdstuk 2 onderzoeken we wat de lange termijn effecten zijn van vroege stress op astrocyten en of dit proces bijdraagt aan een toegenomen ontvankelijkheid voor ziekte. We onderzoeken de vraag of vroege stress de reactie van astrocyten op de Alzheimer-geassocieerde amyloïde pathologie moduleert in een transgeen muismodel voor de ziekte van Alzheimer (APP/PS1 muizen). We tonen aan dat vroege stress, veroorzaakt door beperkt nestmateriaal in de postnatale fase, GFAP-expressie in de hippocampus beïnvloedt op een leeftijdsafhankelijke manier. Bovendien hebben we gevonden dat APP/PS1-overexpressie GFAP-expressie verlaagt in de hippocampus, verhoogt in de entorhinale cortex en de hippocampale genexpressie van astrocyt-gerelateerde genen verandert in een gevorderd stadium van amyloide pathologie (10 maanden oud). Echter, de effecten van amyloïde pathologie op astrocyten in de hippocampus en entorhinale cortex werden niet verergerd door blootstelling aan vroege stress. Dit in tegenstelling tot microglia, cellen die heviger reageerden op amyloïde pathologie in muizen die eerder waren blootgesteld aan vroege stress. Wel laten we zien dat lokaal geclusterde GFAP-expressie, die alleen aanwezig is in de hippocampus van APP/PS1-muizen, correleert met CD68-expressie, wat een verband aangeeft tussen fagocytische microglia cellen en het GFAP van de astrocyt, als dit bestudeert wordt in de context van amyloïde pathologie. Deze resultaten benadrukken dat de reactie van astrocyten op amyloïde pathologie afhankelijk is van de nabijheid van amyloïde, het hersengebied en ziektestadium, maar niet veranderd is na blootstelling aan vroege stress.

Om te onderzoeken of blootstelling aan vroege stress de stress reactie van astrocyten voorgoed verandert, hebben we in hoofdstuk 3 gebruik gemaakt van een gecombineerde *in vitro* en *in vivo* aanpak. In dit voorlopige rapport hebben we primaire celkweken gemaakt van astrocyten uit de hippocampus van muizen die blootgesteld waren aan vroege stress. Vervolgens zijn deze cellen behandeld met dexamethason (DEX), een synthetische glucocorticoïd. We laten zien dat DEX behandeling de genexpressie van astrocyt-gerelateerde genen significant verhoogt, een effect dat sterker of zwakker was afhankelijk van het gen wat bestudeerd werd, in astrocyten uit muizen die eerder blootgesteld waren aan vroege stress. Deze data levert initieel bewijs dat stress vroeg in het leven, de stress reactie van astrocyten 'programmeert'.

In hoofdstuk 4 proberen we vroege voedingsinterventies toe te passen om de effecten van vroege stress op de hersenen te bestrijden. We repliceerden allereerst onze eerdere resultaten door aan te tonen dat het verstrekken van een dieet met een 'gezond' vetgehalte, (d.w.z. een lage ω-6/ω-3 verhouding) tijdens het vroege leven de vroege stress geïnduceerde leer- en geheugenproblemen op latere leeftijd in muizen voorkwam. Bovendien toonden we aan dat zowel stress als een lage ω-6/ω-3 verhouding in het vroege dieet de perifere en centrale immuunrespons op een ontstekings-inducerende factor (LPS) op volwassen leeftijd beïnvloedt: i) vroege stress verergerde de door LPS geïnduceerde toename in plasma cytokines, en ii) zowel vroege stress als dieet moduleerden de effecten van LPS op hippocampale

genexpressie, zoals gemeten met behulp van microarray. Interessant genoeg werden geen veranderingen in plasma cytokines of genexpressie van de hippocampus waargenomen onder basale condities (d.w.z. zonder LPS), wat erop wijst dat vroege stress de reactie op omgevingsfactoren verandert zonder dat effecten van vroege stress zichtbaar zijn onder normale omstandigheden. Deze eerste resultaten leveren nieuw bewijs voor het programmeren van zowel de perifere als centrale immuunrespons door zowel stress als ook door de samenstelling van de voeding tijdens het vroegste leven. In deze lopende studie zullen we de betrokken biologische mecha- nismen verder onderzoeken. Door de methodologische aanpak van deze studie die zich richt op alle genen van het genoom, kunnen we mogelijk nieuwe onderliggende mechanismen identificeren die betrokken zijn bij de effecten van vroege stress op de hersenen.

Om het effect van vroege stress en latere leefstijlfactoren op neurogenese, de aanmaak van nieuwe hersencellen, te bepalen, beginnen we in hoofdstuk 5 met het onderzoeken van het effect van vroege stress op neurale stamcellen in de hippocampus. Met behulp van een Nestin-GFP transgene muis lijn, een veel gebruikte marker voor neurale stamcellen, hebben we geconstateerd dat vroege stress niet resulteert in uitputting van de voorraad neurale stamcellen in 4 maanden oude muizen. Onze bevindingen duiden erop dat de vermindering in neurogenese die algemeen wordt waargenomen na eerdere blootstelling aan vroege stress, waarschijnlijk niet het gevolg is van een uitgeputte stamcelvoorraad.

In hoofdstuk 6 hebben we ons onderzoek naar voedingsinterventies voortgezet. We hebben onderzocht of zuigelingenmelkvoeding (flesvoeding) die is aangepast in structuur om de fysieke kenmerken van moedermelk beter na te bootsen (Nuturis®), de effecten van vroege stress en een ongezond dieet (Westers dieet) later in het leven kan voorkomen. Hierbij hebben we de focus gelegd op effecten op het brein en metabolisme. We tonen voor het eerst aan dat kortdurende blootstelling aan Nuturis® tijdens de postnatale fase het effect van een Westers dieet op neurogenese verandert in volwassen muizen. Blootstelling aan vroege stress en Nuturis® hadden beperkte effecten op de vettoename door het Westers dieet. Echter, de data lijkt te wijzen op een aantal subtiele effecten: i) muizen die waren blootgesteld aan vroege stress vertoonden meer toename in vet na het Westers dieet vergeleken met muizen die geen stress hadden gehad, en ii) Nuturis® lijkt deze toename in vet iets te verminderen. Echter, een levenslange blootstelling aan het Westerse dieet deed deze subtiele effecten teniet. Dit markeert de substantiële negatieve gevolgen van een langdurig ongezond voedingspatroon, een relevant probleem in de huidige maatschappij.

In hoofdstuk 7 hebben we de impact van volwassen leefstijl-factoren op de gevolgen van vroege stress bestudeerd. Hierbij hebben we ons gericht op lichaamsbeweging, een bekende stimulus voor neurogenese. Opvallend is dat vrouwelijke muizen die eerder aan vroege stress waren blootgesteld,

geen toename in neurogenese vertoonden die je normaal gesproken wel verwacht na lichamelijke inspanning. Interessant is dat er geen vermindering in neurogenese aanwezig was onder basale omstandigheden, zoals waargenomen bij mannelijke muizen. Dit geeft aan dat de effecten van vroege stress op het brein dus sekse-specifiek zijn. Onze ge- gevens ondersteunen het idee dat functionele defecten in het brein als gevolg van vroege stress soms pas zichtbaar worden na latere blootstelling aan 'challenges', zoals bepaalde leefstijlfactoren. Ze benadrukken verder hoe belangrijk het is om zowel mannen als vrouwen te bestuderen na vroege stress. Deze studie laat zien dat vroege stress het positieve effect van lichaamsbeweging op neurogenese op latere leeftijd verhindert.

Ten slotte worden in hoofdstuk 8 de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift samengevat en besproken in een breder perspectief. Eerst wordt de rol van astrocyten besproken in het kader van de effecten van chronische stress tijdens het vroege leven op de hersenen. Ik bespreek het belang van het verder bestuderen van de betrokkenheid van astrocyten in de context van vroege stress, omdat astrocyten in toenemende mate blijken betrokken te zijn bij stress-gerelateerde stoornissen (zoals depressie), en ziekten waarvoor vroege stress een risicofactor voor is (zoals de ziekte van Alzheimer). In deze context is het cruciaal om de heterogeniteit van astrocyten verder te onderzoeken. Ten tweede bespreek ik de potentie van leefstijl (d.w.z. voeding en lichaamsbeweging) interventies om de negatieve effecten van vroege stress op de hersenen tegen te gaan. Ik speculeer dat immuun- en neurogenese processen betrokken zijn bij het gunstige effect van verhoogde ω-3 beschikbaarheid op het cognitief functioneren na blootstelling aan vroege stress.