



Kijkje in het brein

Mieneke Luijendijk¹ en Marian Verhage²

¹UMC Utrecht, Hersencentrum Rudolf Magnus, afdeling Translational Neuroscience

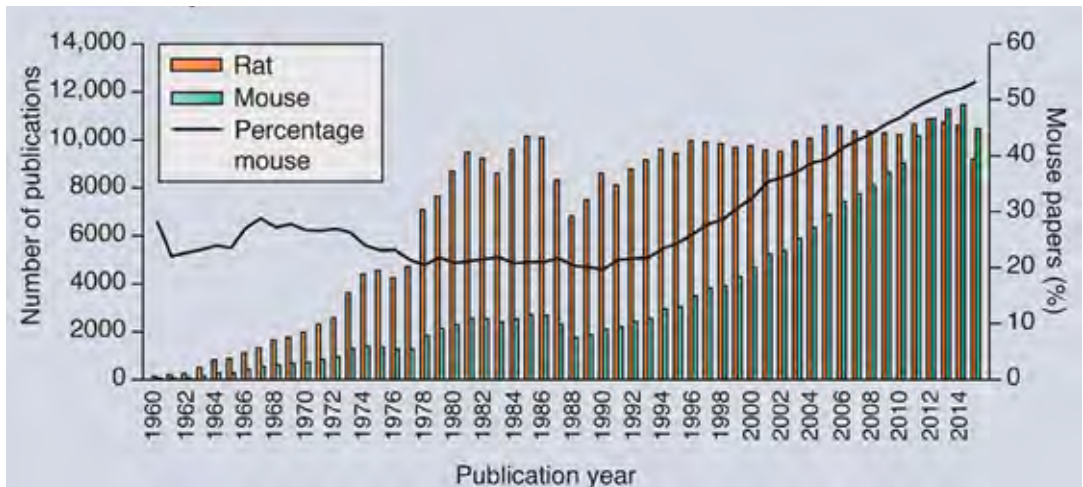
²KNAW, Nederlands Herseninstituut

De hersenen zijn het meest complexe orgaan in het lichaam. Wetenschappelijk onderzoek heeft de afgelopen jaren steeds meer inzicht gegeven in het functioneren van de hersenen. Ons brein is een ingewikkeld orgaan met heel veel hersencellen en nog een veelvoud daarvan aan verbindingen. Daarmee worden de meest simpele tot meest moeilijke taken uitgevoerd. Zoals het pakken van een kopje koffie tot aan het plannen maken voor de toekomst. Om in het dagelijks leven onze eigen regie te kunnen voeren en te weten wat er allemaal om ons heen gebeurt, kunnen we niet zonder onze cognitieve functies. Dat zijn functies van de hersenen die zorgen dat we informatie kunnen verwerken en leren van onze ervaringen. Zoals onthouden, plannen, redeneren en beslissen (1).

Onderzoek bij de mens

Hippocrates, vader van de moderne medische ethiek, heeft al in de eerste eeuw voor Christus veel teksten geschreven over hersenoperaties. Hij was de eerste persoon die speculeerde dat de twee hersenhelften in staat waren onafhankelijk van elkaar processen te verwerken. Veel onderzoek volgt in de eeuwen daarna. In de 17de eeuw sluit René Descartes een deal met de Paus om dissectie te mogen doen op lichamen. Hij krijgt toestemming van de Paus om dit te doen, omdat dit geen invloed zou hebben op de ziel, emoties en geest. Franz Joseph Gall, een Duitse anatomist, had in de 19de eeuw een theorie ontwikkeld waarin hij verklaarde dat de vorm van schedel iemands karakter voorspelde. Deze theorie wordt allang niet meer als waarheid beschouwd. In 1848 raakt een spoorwegmedewerker gewond aan zijn hoofd, waarbij zijn frontale kwab beschadigd raakt. Dit leidt tot drastische veranderingen in zijn persoonlijkheid. Van een rustige, ijverige man wordt hij een norske agressieve man. Deze bevinding leidt uiteindelijk tot de ontwikkeling van lobotomie, wat gebaseerd is op de theorie dat het verwijderen van een stukje van de hersenen bepaalde ziekten kan genezen (2).

»



Afbeelding 1: Al decennialang wordt er onderzoek gedaan naar de hersenfunctie bij laboratoriumdieren. Overzicht van aantal publicaties waarin ratten of muizen gebruikt zijn. Op de rechter Y-as wordt het percentage artikelen waarin hersenonderzoek met muizen gedaan wordt, weergegeven (3).

Onderzoek bij dieren

In de jaren 50 van de 20ste eeuw doet Karl Spencer Lashley een serie experimenten waarbij hij steeds stukjes van de hersenen weghaalt en test of het geheugen van de dieren is aangetast. Hij concludeert uit deze experimenten dat er niet één individueel hersengebied is dat dit proces regelt, maar dat de hersenen gezien moeten worden als een geheel dat gevormd wordt door de vele hersenconnecties. In de decennia die volgden, werd er steeds meer bekend over de werking van de hersenen en werden er ook vindingen gedaan op het gebied van specifieke receptoren (2). Ook nam het aantal dieren dat gebruikt wordt voor hersenonderzoek toe. In de eerste decennia waren dit nog voornamelijk ratten, maar door de opkomst van genetisch gemodificeerde muislijnen zijn muizen de laatste twee decennia niet meer weg te denken uit het hersenonderzoek (afb. 1).

Dieren zijn niet in staat om taal te leren, te redeneren en zeer complexe taken (zoals plannen) te leren. Maar veel van de basisstructuren en functies in de hersenen komen overeen met die bij de mens. Omdat complexe processen bij mensen vaak gebaseerd zijn op basale processen die ook in dieren aanwezig zijn, kunnen dierproeven inzicht geven in het menselijk gedrag. Zo kunnen dieren ook verslaafd raken aan alcohol of cocaïne en kan dierexperimenteel onderzoek inzicht geven in de onderliggende factoren van verslaving. Hersenonderzoek heeft decennia geleden al gezorgd voor een drastische verbetering in de gezondheid en het welzijn van de mens (4). Door het gebruik van dieren in de jaren 50 van de vorige eeuw, zijn er medicijnen ontwikkeld voor de behandeling van mentale ziektes, zoals schizofrenie en angststoornissen. Een mooi voorbeeld hiervan is de ontdekking van de neurotransmitter dopamine en daarmee de behandeling van de ziekte van Parkinson met L-dopa, door de Zweedse wetenschapper en Nobelprijswinnaar Carlsson (5).

Om goed onderzoek naar al die processen te kunnen doen wordt een scala aan technieken gebruikt. In het begin waren de methoden erg grof - zo haalde men stukjes hersenen weg om de werking van het brein te doorgronden - nu is het letterlijk mogelijk om een kijkje in het brein te nemen en live allerlei processen in de tijd of zelfs in een individuele cel te volgen. In dit artikel beschrijven we een aantal van deze zeer moderne technieken waarmee op celniveau in het brein metingen gedaan kunnen worden.

»

Miniscope

De miniscope is eigenlijk een miniatuurversie van een fluorescentiemicroscopie die is ontwikkeld in het laboratorium van Mark Schnitzer, Stanford University (6). De scope is klein en draagbaar en is daardoor ideaal om hersenactiviteit te meten in vrij bewegende muizen. De miniscope maakt het mogelijk om in het brein te kijken. Alcindo Silva (7) van de Universiteit van California (UCLA) heeft samen met Peyman Golsani's groep de originele miniscope vernieuwd en veranderd in een goed bruikbare en goedkopere variant waardoor de miniscope door iedereen te gebruiken is. Miniscopen kunnen boven vrijwel alle hersengebieden worden geplaatst om in de hersenen de fluorescentie te meten. Door gebruik te maken van lenzen kunnen zelfs de diepere hersengebieden worden bereikt.

Fluorescentie

Hoe werkt fluorescentie? Fluorescentie is het verschijnsel waarbij licht met een relatief korte golflengte wordt geabsorbeerd door een molecuul welke na korte tijd een lichtpulsje uitzendt met een langere golflengte. Als bijvoorbeeld groen fluorescerende moleculen met blauw licht worden beschienen, zullen deze groen licht uitzenden. Op deze manier kan je dus met behulp van microscopie naar fluorescent gelabelde moleculen kijken. Een bekend groen fluorescerend eiwit dat wordt gebruikt om eiwitten in cellen zichtbaar te maken, is GFP. Hiervoor moet je het gen dat codeert voor GFP koppelen aan het gen dat codeert voor het eiwit dat je wilt onderzoeken. Het fusiëren dat hieruit ontstaat moet je dan in cellen of dieren inbrengen. Dat kan door het gebruik van virale vectoren. Dit zijn grotendeels geïnactiveerde virussen die dienen als vervoermiddel om genetisch materiaal in cellen in te brengen.

Bij de miniscopen wordt gebruik gemaakt van het GCamp6 eiwit. Dit is een fusie-eiwit dat bestaat uit onder meer GFP en een calcium-binding eiwit. Wanneer GCamp6 bindt aan calcium zal de fluorescentie hoog zijn, wanneer GCamp6 niet bindt aan calcium zal de fluorescentie laag zijn.

Het miniscoopsysteem bestaat uit een gradiëntindex (GRIN) lens die wordt geïmplantéerd boven het hersengebied dat moet worden afgebeeld. Daaraan gekoppeld zit een mini fluorescentiemicroscopie die bovenop de schedel wordt vastgezet (afb. 2a). Deze verzamelt de beelden van de geïmplantéerde GRIN-lens. De mini fluorescentiemicroscopie doet dit doormiddel van een lichtbron, die via een aantal stappen blauw licht uitzend op de GRIN-lens en zo op de cellen. Vervolgens wordt de fluorescentie (groen) opgevangen door de miniscope en een beeld gevormd (afb. 2b). Dit stelt onderzoekers in staat om de activiteit van exact dezelfde neuronen gedurende vele dagen tot weken te bekijken, wat een zeer krachtige tool is om te kunnen gebruiken bij onderzoek naar de activiteit van cellen bij verschillende gedragingen of tijdens het leren (7).

Lens in het brein

Een miniscope weegt ongeveer 2-3 gram of minder en is zo'n 1,5 cm hoog. Om te kunnen meten met een miniscope moet er een (GRIN)-lens in het brein worden geplaatst. Hiervoor is een operatie nodig. Bij deze operatie wordt via een craniotomie (open maken van de schedel) een lens in het brein geplaatst. De basisplaat die nodig is om de miniscope op het brein te houden en de lens goed vast te zetten, wordt met tandcement en schroeven op de schedel vastgezet. De miniscope zelf wordt alleen tijdens het meten op de basisplaat gezet. In eenzelfde operatie wordt ook het virus geïnjecteerd in het hersengebied van interesse met daarin het GCamp6 gen dat codeert voor het GCamp6 eiwit. Soms worden ook elektrodes (elektrofysiologische metingen) geplaatst. Deze operatie is invasief en de muis heeft tijd nodig om bij te komen van



Afbeelding 2:
 a) muis met miniscope aangesloten aan de computer (foto: C. Canto). De muis kan vrij bewegen in zijn kooi;
 b) schematische weergave van een miniscope welke bestaat uit een basisplaat met fluorescentie microscoop, GRIN lens en allerlei filters. Base Plate is de basisplaat die op de schedel vast zit. Daarop zit het vaste gedeelte (main housing) waarin de filters en lenzen zitten. Alleen tijdens het meten wordt het vaste gedeelte op de basisplaat gezet. Als een dier niet wordt gemeten, is deze afgekoppeld (8).

de operatie. Na herstel van de operatie kunnen de muizen gemeten worden waarvoor ze aangesloten moeten worden op een computer via een kabel. Het dier kan vrij bewegen tijdens het meten. Eventueel leren de muizen een gedragstaak. Momenteel worden de dieren nog steeds aan een computer gekoppeld via een kabel maar in de toekomst zal dit wireless (kabelloos) kunnen.

Elektrofysiologie

In het vakgebied elektrofysiologie binnen de neurowetenschappen, wordt onderzoek gedaan naar de communicatie van neuronen en de onderliggende moleculaire processen door middel van het meten van elektrische activiteit. Neuronen communiceren met behulp van elektrische en chemische signalen. Elektrofysiologietechnieken luisteren naar deze signalen door de elektrische activiteit te meten, waardoor wetenschappers intracellulaire (binnen een cel) en intercellulaire (tussen verschillende cellen) berichten kunnen decoderen. Deze technieken kunnen vragen op systeemniveau beantwoorden, bijvoorbeeld over de rol van een neuron in een neurale circuit of gedrag. Met zo een systeem bedoelen we een bepaalde combinatie van neuronen in verschillende hersengebieden die samen een gedrag aansturen.

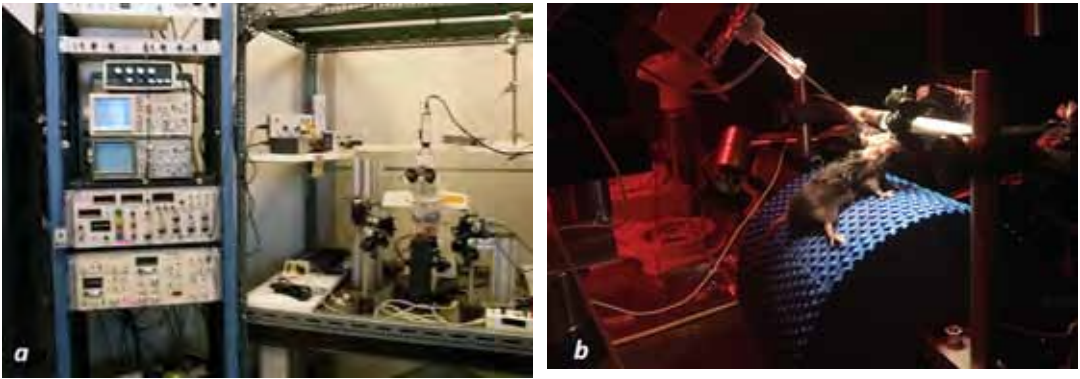
Verschillende operaties

Om op celniveau te kunnen meten moeten de muizen een operatie ondergaan. Het type operatie hangt af van of een dier gebruikt wordt voor acute of langdurige (chronische) metingen, met of zonder hoofdfixatie. Muizen die gebruikt worden voor acute elektrofysiologische metingen krijgen alleen elektrodes geplaatst. De elektrodes bestaan uit connectoren met aangesloten draden. Voor het implanteren van elektroden worden gaatjes geboord in de schedel waarna de elektroden in de juiste hersengebieden worden geplaatst. Meestal is er ook een referentie elektrode die op de schedel wordt gezet. Na implantatie van de elektroden wordt er (indien nodig) een optische vezel bovenop het interessegebied geplaatst en ten slotte vastgezet met tandcement. Na een korte herstelperiode worden de elektrofysiologische metingen uitgevoerd. Hiervoor gaan de muizen heel kort onder gasanesthesie om de elektrodes aan te sluiten. Na de metingen worden de dieren gedood. Voor de muizen die voor langere tijd (chronisch) gemeten worden, geldt dat ze bijvoorbeeld wekelijks kortdurend worden aangesloten om gemeten te worden.

Vast in de opstelling

Muizen die in hoofd-gefixeerde opstellingen gemeten worden, krijgen eerst elektrodes geplaatst gevolgd door het plaatsen van de head post (ook wel pedestaal genoemd); deze bestaat uit een kleine magneet omgeven door een voetstuk, een niet-magnetisch voetstuk, een

>>



Afbeelding 3:
 a) standaard elektrofysiologie opstelling;
 b) muis in een testopstelling waarbij gedrag gekoppeld wordt aan elektrofysiologische metingen (foto: C. Canto).

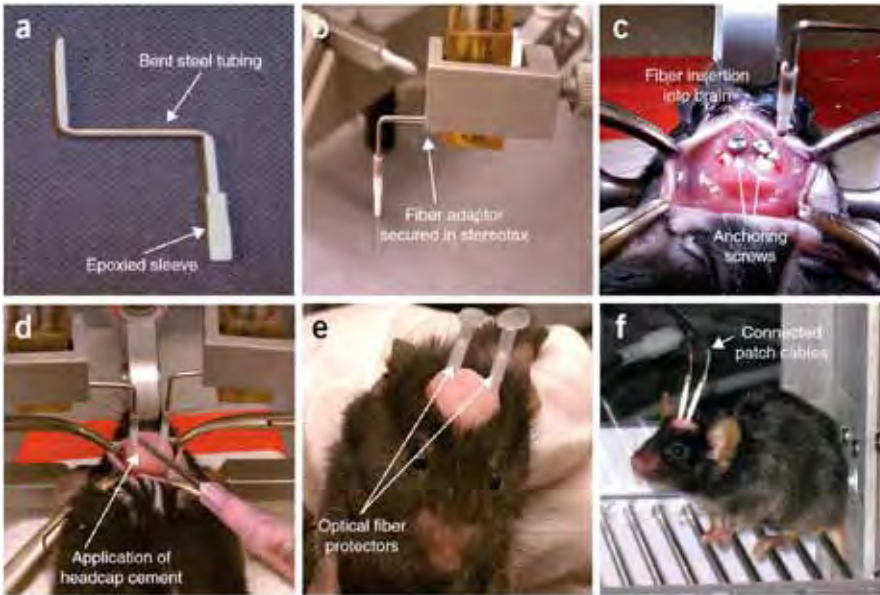
kopplaat of moeren. Dit geheel zorgt ervoor dat het dier met zijn hoofd vast zit in de opstelling. Soms wil je celspecifieke activiteit meten en is het nodig om een virus te injecteren dat hiervoor zorgt. Als dit nodig is, wordt geprobeerd dit te combineren met een operatie waarbij de elektrodes ook worden geplaatst.

Na de operaties krijgen de muizen ruim de tijd om te herstellen, waarna de muizen langzaam wennen aan de opstelling waar ze dus met hun hoofd vast zitten. Ze worden dagelijks getraind om in de opstelling vast te zitten. De eerste paar keer strubbelen ze wat tegen maar al vrij snel zijn de muizen dit gewend. Ze gaan rustig liggen en vallen soms zelfs in slaap. Als deze dieren gemeten gaan worden, ondergaan ze nog een operatie voorafgaand aan de meting. Hierbij wordt middels een craniotomie (openmaken van de schedel) een speciale elektrode geplaatst waarbij je metingen in een cel (bijvoorbeeld een neuron) kan doen. Voordat de meting start, krijgt de muis nog wel een aantal uur de tijd om bij te komen van de craniotomie. Zodra een dier gemeten gaat worden gaat deze even kort onder (gas)anesthesie om de elektrodes aan te sluiten en het dier vast te zetten met de headpost in de opstelling zodat zijn hoofd stil is (vrij van beweging) om stabiel te kunnen meten.

Celactiviteit kan uiteindelijk ook nog gekoppeld worden aan gedrag om bijvoorbeeld te onderzoeken of slaapactiviteit van kleine hersenen van belang is voor het aanleren en onthouden van motorische vaardigheden. Gebruik van een loopwiel in combinatie met slaapdeprivatie is daarvan een voorbeeld. Hiervoor wordt een muis gemeten terwijl hij wakker in een opstelling zit (afb. 3a, 3b).

Optogenetica

Optogenetica is een vrij nieuwe manier om specifieke hersencellen met behulp van licht aan of juist uit te zetten. Peter Hegeman (9) kloneerde een lichtgevoelig ionkanaal uit algen, wat later de basis zou vormen voor het gebruik van lichtgevoelige kanalen om neuronale activiteit te manipuleren. Boris Zemelman et al. (10) is de eerste wetenschapper die de optogenetica techniek beschrijft. Voor de manipulatie van cellen met behulp van licht werd gebruik gemaakt van fotoreceptorgenen die arrestin-2 rodopsin uit de *Drosophila* (fruitvlieg) tot expressie konden brengen. Deze eerste opzet van optogenetica was nog niet toepasbaar in dierexperimenten. Pas vanaf 2005 (11) werd er een nieuw opsine gen geïntroduceerd. Deze opsine (stukje DNA) werd geïsoleerd uit de eencellige groene alg die beweegt onder invloed >>



Afbeelding 4:
 a) houder voor de glasvezel;
 b) fixatie van de houder in de stereotact arm;
 c) plaatsing van de glasvezel in de hersenen, schroefjes worden gebruikt om het hoofdkapje aan de schedel te fixeren;
 d) aanbrengen van cement;
 e) beschermkapjes voor de glasvezels;
 f) dier aangesloten aan glasvezelkabels in testkooi (12).

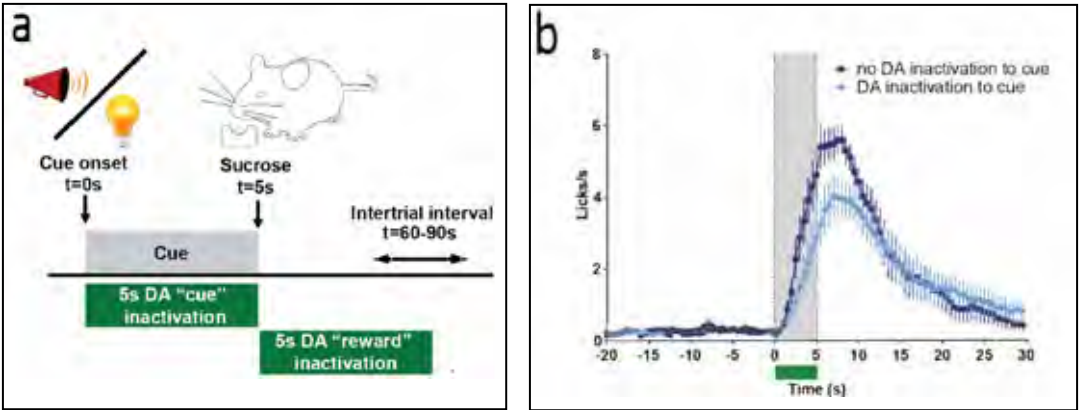
van licht. Dit stukje DNA is in een adeno-geassocieerd virus gebouwd, waardoor het wel toepasbaar werd in dierexperimenteel onderzoek. In 2010 werd optogenetics tot methode van het jaar verkozen door Nature.

Hoe gaat dat in zijn werk? Om hersencellen lichtgevoelig te maken is het nodig om een virus met ingebouwde opsine te injecteren in een specifiek hersengebied. Dit virus introduceert het DNA van het opsine in de cel en leidt tot expressie van lichtgevoelige receptoren op de oppervlakte van de cel. Dit virus wordt tijdens een stereotactische operatie in een specifiek hersengebied geïnjecteerd. Tijdens deze operatie wordt er ook een glasvezel geplaatst net boven het gebied waar het virus zit, om later de cellen te manipuleren door licht door deze glasvezel te schijnen. Het dier krijgt de tijd om van de operatie te herstellen, maar deze tijd is ook nodig voor het virus om de hersencellen te infecteren en de lichtgevoelige receptor tot expressie te brengen. Zodra deze periode voorbij is kan er begonnen worden met het manipuleren van de hersencellen door een glasvezelkabel aan te sluiten op de glasvezel die in de hersenen is geïmplanteerd (afb. 4).

Pavlov reactie

Deze techniek is onder andere gebruikt in klassieke conditioneringsexperimenten (denk aan Pavlov, waarbij dieren geconditioneerd worden op een beloning) en gaf, door direct signaal van de neurale activiteiten, verder inzicht in de neuronale activiteit die ten grondslag ligt aan dit gedrag. We weten dat een beloning zorgt voor een verhoging van activiteit in dopamine (plezier) hersencellen. Wanneer deze beloning voorafgegaan wordt door een signaal, zullen deze hersencellen gaan reageren op het signaal en veel minder op de beloning zelf. Als tijdens de test alleen het signaal gegeven wordt en niet meer de beloning dan zullen de dopamine cellen helemaal stil worden. Met optogenetica kan dit proces heel specifiek gemanipuleerd worden door dopamine cellen tijdens het signaal te remmen. Gedurende de tijd dat het signaal gegeven wordt zal er licht geschieden worden op de dopamine cellen. Dit zorgt ervoor dat de dieren na deze stimulatie minder van de beloning nemen (afb. 5). Hierdoor wordt meer inzicht verkregen in de manier waarop het beloningssysteem in de hersenen reageert op signalen en beloningen.

»



Afbeelding 5:

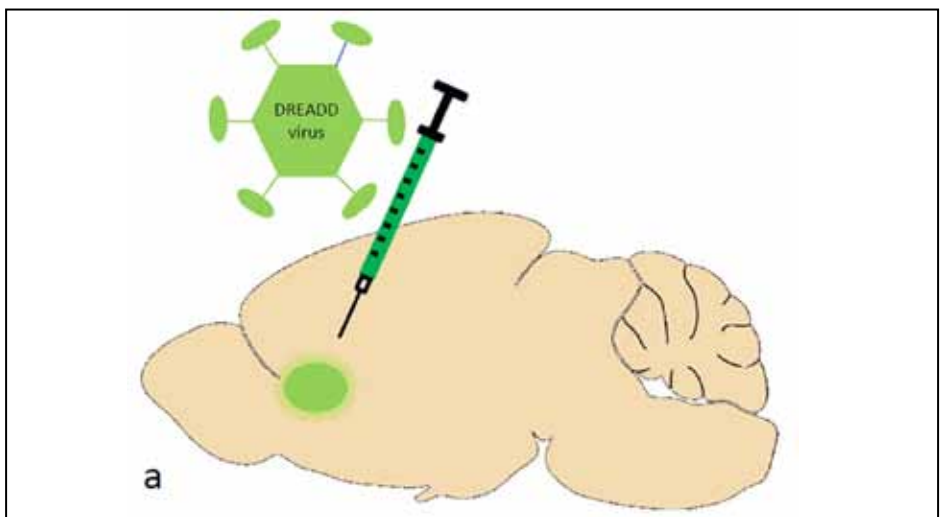
a) Overzicht van de proefopzet met het signaal (cue onset), gevolgd door 5 seconden optogenetische stimulatie waardoor DA (dopamine) cellen geïnactiveerd worden, waarna de beloning (sucrose) gepresenteerd wordt. Na elke beloning volgt een intertrial interval, dat is een periode waarin de dieren rust hebben voordat de volgende ronde begint;

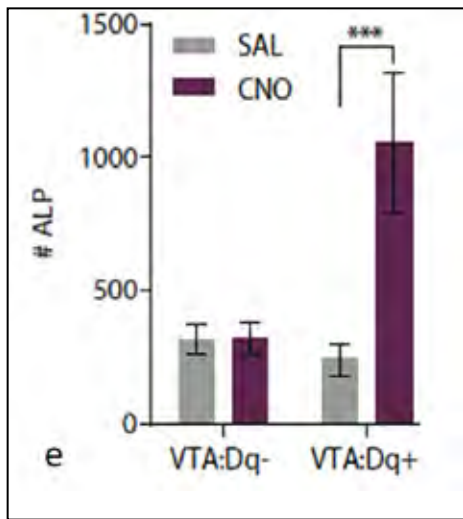
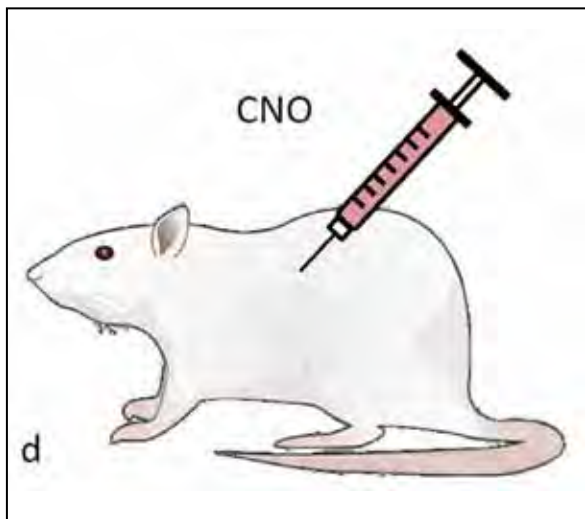
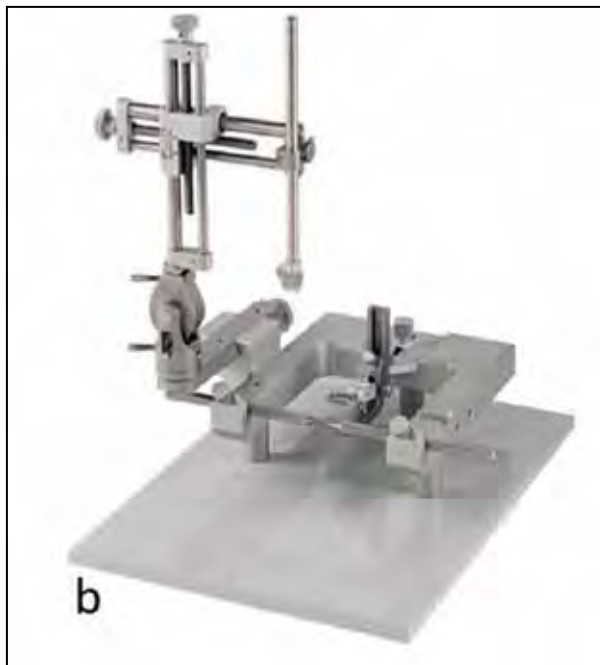
b) Dieren laten tijdens stimulatie door middel van licht een verlaging zien in de consumptie van de beloning (aantal licks/s; Van Zessen, eigen data).

Chemogenetica

Chemogenetica is ook een relatief nieuwe techniek. In 1998 wordt deze techniek voor het eerst beschreven door Conklin et al. (13). Ook met chemogenetica kun je specifieke neuronen in de hersenen manipuleren. Om dat mogelijk te maken moet er, net als bij de optogenetica, een virus geïnjecteerd worden. Dit virus bevat een DREADD. Dit staat voor 'designer receptor exclusively activated by designer drugs', dat wil zeggen dat dit virus special ontworpen receptoren tot expressie brengt die geactiveerd kunnen worden door een farmacon dat alleen op deze receptoren aangrijpt. Dit farmacon is Clozapine-N-oxide (CNO) en komt niet van nature voor in het lichaam. Na het toedienen van CNO bindt deze aan de DREADD-receptoren en zal dan de hersencel activeren of remmen. De activatie of remming is afhankelijk van het soort DREADD dat je geïnjecteerd hebt (afb. 6).

Deze methode van manipulatie is gebruikt bij onderzoek naar invloed van dopamine op motivatie voor lekker eten. Hiertoe hebben de dieren geleerd te werken voor een beloning: ze





Afbeelding 6:

- a) schematisch overzicht van de virus injectie in de hersenen;
- b) stereotactisch apparaat waarmee de hersenoperaties uitgevoerd worden;
- c) bovenaanzicht van een rattenkop in een stereotact;
- d) schematisch overzicht van een CNO-injectie;
- e) injectie met CNO in dieren met een activerend DREADD-virus laten een verhoging zien in het aantal pedaaldrukken (ALP) in een taak waarin dieren een beloning kunnen verdienen.

moesten op een pedaalje drukken om een beloning te verdienen. Het aantal keer dat ze op dat pedaalje moesten drukken nam steeds meer toe, totdat de dieren het niet meer waard vonden om nog voor de beloning te werken en stopten met drukken op de pedaal. Hiermee kan de mate van motivatie gemeten worden. Voor deze test zijn genetisch gemodificeerde »

ratten (TH:Cre) gebruikt die na injectie van het activerende DREADD-virus in de VTA (ventraal tegmentaal gebied) deze receptor alleen tot expressie brengen in de dopamine cellen. Door injectie met CNO zullen deze cellen in de VTA geactiveerd worden en kan er bestudeerd worden hoe de motivatie verandert, als dit vlak voor de test toegediend wordt. In afb. 6e (14) is te zien dat als de VTA geactiveerd wordt, de dieren tot wel driemaal meer gemotiveerd zijn om te werken voor de beloning. Elk dier is bij deze test zijn eigen controle, doordat CNO voor een tijdelijke verandering zorgt. Hierdoor is het mogelijk om hetzelfde dier ook de controlestof (saline) toe te dienen. Bij de controledieren is geen verschil te zien tussen de controle-injecties en de CNO-injecties.

Verfijning, vermindering, vervanging

Door de inzet van deze moderne technieken binnen het hersenonderzoek is er veel verfijnd in de uitvoering van een experiment. Zo kan er met een veel hogere resolutie en nauwkeurigheid gekeken worden naar veranderingen in de hersenen. Hiervoor hoeven niet meer hele hersengebieden verwijderd of vernietigd te worden, maar kan dit tijdelijk stilgelegd worden. Met de toepassing van optogenetica en chemogenetica kan een hersengebied zelfs geactiveerd worden. Dit kan voor enkele uren (chemogenetica) of enkele seconden / milliseconden (optogenetica). Doordat deze techniek omkeerbaar is kunnen de dieren als eigen controle ingezet worden, waardoor er een vermindering in het gebruik van het aantal dieren is. Het is zelfs mogelijk om deze twee technieken in een dier te combineren, zodat er nog meer informatie uit hetzelfde dier gehaald wordt. Volledig vervangen van proefdieren in het hersenonderzoek is niet mogelijk, omdat er altijd een terugkoppeling van het gedrag op de verandering in hersenactiviteit nodig is om aan te tonen wat de invloed is van dat hersengebied.

Referenties

1. Hersenstichting (www.hersenstichting.nl).
2. My Brain, History of Brain Research, www.mybrain.co.uk/public/learn_history1.php.
3. Ellenbroek B (2016) *Rodent Models in Neuroscience Research: Is It a Rat Race?* Disease Model & Mechanisms 9: 1079-1087.
4. Miller NE (1985) *The Value of Behavioural Research on Animals*. American Psychologist, 40: 423-440.
5. Carllson A (1957) *3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonist*. Nature 30; 180(4596):1200.
6. Ghosh et al. (2011) *Miniaturized integration of a fluorescence microscope*. Nature Methods 8: 871-878.
7. Cai et al. (2016) *A shared neural ensemble links distinct contextual memories encoded close in time*. Nature 23:115-118.
8. <https://www.edmundoptics.eu/resources/trending-in-optics/open-source-diy-microscopy/>
9. Hegeman P et al. (1982) *Isolation and characterization of the retinal-binding component of halorhodopsin*. The EMBO Journal 1: 1177-1183.
10. Zemelman BV et al. (2002) *Selective photostimulation of genetically chARGed neurons*. Neuron 3: 15-22.
11. Deisseroth K et al. (2005) *Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity*. Nature Neuroscience 8: 1263-1268.
12. Stuber G et al. (2011) *Construction of implantable optical fibers for long-term optogenetic manipulation of neural circuits*. Nature Protocols 7: 12-23.
13. Conklin BR et al. (1998) *Controlling signaling with a specifically designed G1-coupled receptor*. Proceedings of the National Academy of Science 95: 352-357.
14. Boekhoudt L et al. (2018) *Enhancing excitability of dopamine neurons promotes motivational behavior through increased action initiation*. European Neuropsychopharmacology 28: 171-184. <<