

SAMENVATTING

Gedragfenotypering van complexe eigenschappen in inteeltlijnen en genetisch gemodificeerde muizen

Neurologische en psychiatrische aandoeningen worden bij mensen over het algemeen herkend door verstoringen in het gedrag waar te nemen. Medisch gezien is het essentieel de onderliggende biologische mechanismen van deze gedragsstoornissen in kaart te brengen. De complexiteit van deze stoornissen en de onderliggende biologische mechanismen vereisen het gebruik van diermodellen en experimentele opstellingen die geschikt zijn om gedrag nauwkeurig te fenotyperen.

De gebruikelijke gedragstesten zijn over het algemeen gebaseerd op motorische activiteit en zijn ontworpen om gedrag te meten gedurende een relatief korte periode (5 tot 60 minuten). Om het effect van een bepaalde genetische achtergrond, een specifieke genetische mutatie, of van chemische stoffen (medicatie, drugs) op gedrag te meten, is een gevarieerd scala aan gedragstesten nodig dat verschillende aspecten van gedrag representeert, zoals motorische activiteit, waarneming en zintuiglijke functies, cognitie, en circadiane functies. Het afnemen van zo'n testbatterij is tijdrovend en bovendien leiden herhaalde mens-dier interacties, omgevingsfactoren, en technische verschillen tussen laboratoria tot variatie in onderzoeksresultaten, met non-replicatie en verschillen in interpretatie van resultaten als gevolg. Er is dan ook sprake van groeiende consensus dat gedragfenotypering geautomatiseerd zou moeten worden; dit zou de effectiviteit en de standaardisatie in het onderzoek met diermodellen naar menselijke ziektes en behandeling ten goede komen.

De afgelopen tien jaar zijn nieuwe technologieën ontwikkeld, die de mogelijkheid bieden om dieren geautomatiseerd en langdurig (meerdere dagen) te observeren in hun thuishok. Deze manier van observeren maakt het mogelijk om herhaaldelijk, objectief, en consistent resultaten te verkrijgen terwijl mens-dier interacties geminimaliseerd worden. Bovendien biedt langdurige observatie de mogelijkheid om multidimensionale aspecten van gedrag te bestuderen, zoals habituatie, basaal gedrag, en gedrag wanneer het dier op de proef gesteld wordt, wat de studie van verandering in, of progressie van, gedrag over tijd mogelijk maakt. Al deze gedragsaspecten kunnen van groot belang zijn voor de studie van neurologische, psychiatrische, en neuro-degeneratieve aandoeningen.

In **Hoofdstuk 2** beschrijven wij een studie waarin gebruik gemaakt wordt van een zogenaamd geautomatiseerd "high throughput" systeem; een systeem dat het gedrag van de muis nauwkeurig en frequent (15 keer per seconde) registreert. In deze studie richtten we ons op het karakteriseren van complexe gedragspatronen die in muizen indicatief zijn voor vermijdingsgedrag. We hebben een test ontwikkeld die gebaseerd is op de natuurlijke neiging van muizen om een voorkeur te ontwikkelen voor één van de twee ingangen van hun schuilplaats. Na de voorkeur vastgesteld te hebben, werd het gebruik van de voorkeursingang "bestraft" door de schuilplaats intern te verlichten als de muis deze had betreden via de voorkeursingang. Door middel van deze cognitie leertaak werd een grote hoeveelheid en verscheidenheid aan gedragsinformatie verkregen. Acht inteeltlijnen en 43 verschillende mutanten zijn aan deze leertaak onderworpen, en één nieuw kandidaat gen werd geïdentificeerd - *specc1/cytospinB* - die een rol lijkt te spelen in leren via vermijding (of wel: avoidance learning). Onze data laat zien dat complex gedrag van muizen, zelfs in grote cohorten van muizen en mutanten, efficiënt



en succesvol gedetecteerd, geanalyseerd, en gevisualiseerd kan worden. Diverse inteeltlijnen en genetische mutanten vertoonden duidelijke kwantitatieve afwijkingen in verschillende aspecten van deze gedragstaak.

In **Hoofdstuk 3** is onderzoek gedaan naar de mogelijke rol van *Munc18-1* haplo-insufficiëntie bij muizen, als een model voor “early infantile epileptic encephalopathy (EIEE)”, ook wel het Othahara syndroom genoemd. Homozygote deletie van *Munc18-1* resulteert in postnatale sterfte. Het *MUNC18-1* eiwit speelt een belangrijke rol bij de secretie van synaptische blaasjes van zoogdieren. De *novovo* heterozygote (HZ) mutaties in het humane *MUNC18-1* gen, *STXBPI*, zijn vermoedelijk betrokken bij ernstige cognitieve stoornissen waarbij ook epileptische aanvallen kunnen optreden. Door middel van een uitgebreide testbatterij en observatie in een geautomatiseerde thuishooi, hebben we het gedrag van *Munc18-1* haploinsufficiënte muizen onderzocht. Er werden geen duidelijke epileptische aanvallen of cognitieve beperkingen gevonden bij *Munc18-1* HZ muizen. Echter, HZ muizen lieten een verminderde angstreactie (fear) en snellere uitdoving zien, ondanks hun eerder geobserveerde hogere angsttoestand (anxiety). Ook lieten *MUNC18-1* HZ muizen onder stress een meer proactieve verwerkingsstrategie zien. De verlaagde hoeveelheid van het *MUNC18-1* eiwit in muizen bleek echter nog voldoende te zijn om de meeste cognitieve functies te behouden.

Genoom-wijde associatie studies (GWAS) suggereren dat een niet-synonieme variant in het exon van het pre-synaptische gen *PCLO* een rol speelt in depressie. In **Hoofdstuk 4** ging de focus uit naar de effecten van een genetische variant van *PCLO* (S4814A) in de homogene C57BL/6J muizen op gedrags- en op moleculair en cellulair niveau. Het knock-in muismodel met een expressie van de *Pclo*^{SA/SA} variant liet een verhoogde synaptische Piccolo expressie zien, en had 30% hogere excitatoire synaptische transmissie in gekweekte neuronen. Echter, de angsttoestand (anxiety), cognitie, en depressie-gerelateerd gedrag van deze *Pclo*^{SA/SA} muizen bleek niet afwijkend. Het feit dat depressie een complexe, multifactoriële ziekte is, voortgebracht door een combinatie van vele genetische varianten en omgevingsfactoren, is mogelijk een reden waarom *Pclo*^{SA/SA} muizen geen sterk gedragsfenotype vertoonden. Toch sluiten we niet uit dat de moleculaire veranderingen die we geobserveerd hebben het risico op depressie onder bepaalde omstandigheden kan verhogen.

Historisch gezien zijn de genen die tot nu toe het meest onderzocht zijn genen die in klinische observaties een dramatisch effect op het fenotype bleken te hebben. Omdat een groot aantal genen om deze reden nooit onderzocht werd, hebben we in **Hoofdstuk 5** vijf random mutanten bestudeerd (*Dpp10*, *Fgf13*, *Kcnd2*, *Ttc39c* en *Ubn1*) die gecreëerd waren middels de Sleeping Beauty techniek. Deze 5 stammen werden gedragsmatig gefenotypeerd met behulp van nieuwe geautomatiseerde methodes waarin muizen in de thuishooi leren middels vermijding (“avoidance learning”; zie Hoofdstuk 2). Deze methode, waarin gebruik wordt gemaakt van spontaan gedrag in de thuishooi en de natuurlijke neiging van muizen om licht te vermijden, onthulde een hoge gevoeligheid van spontaan gedrag voor random genetische modificaties. Bovendien bleek *Ubn1*, een subunit van het HUCA histon chaperonne complex, geassocieerd te zijn aan de formatie van associatief geheugen. Deze studie van 5 willekeurige functionele genen, waarvan één betrokken bleek bij cognitieve processen, suggereert dat een aanzienlijke proportie van genen in het genoom direct of indirect betrokken is bij cognitie, en bevestigt de grote complexiteit van deze functie in het brein.

Tenslotte vat **Hoofdstuk 6** de resultaten van 4 jaar werk over gedragsfenotypering samen en wordt de toegevoegde waarde besproken van geautomatiseerde, langdurige, en continue (“high-content” en “high-throughput”) gedragsfenotypering bij het bestuderen van muismodellen voor de rol van genen in humane neurologische aandoeningen en cognitieve functies. De verwachting is dat dergelijke geautomatiseerde gedragsfenotypering in thuishoelen de komende jaren een vlucht zal nemen en het gedragsonderzoek bij muizen ethologisch gezien zal verbeteren en aanvullen. Hoewel verdere validatie nodig is, laten de resultaten in dit proefschrift zien dat in het onderzoek naar humane ziektes en aandoeningen, automatische gedragsfenotypering een essentieel onderdeel zou moeten worden van de gedragskarakterisering van genetisch gemodificeerde muizen.

