

---

# Samenvatting

Chapter - 7

Het cerebellum, oftewel de kleine hersenen, is een gedeelte van het brein dat zich bevindt achter en onder in onze schedel. Zijn (bij)naam, de kleine hersenen, dankt het aan zijn visueel duidelijk van de rest van het brein te onderscheiden structuur. Ook de opbouw van het cerebellum zoals te zien onder de microscoop laat een duidelijk te onderscheiden structuur zien. De onderkenning dat het brein niet uit een algehele massa bestaat, maar gevormd worden door vele neuronen van verschillende vormen en grootte die middels vele connecties elkaar beïnvloeden dateert van de 19e eeuw. Vanuit dit inzicht resulteerde de ontdekking van structuren in de hersenen, waarbij verbonden neuronen deelstructuren vormen, die vervolgens onderling elkaar beïnvloeden. Deze deelgebieden van het brein hebben specifieke functies, hetgeen zich duidelijk openbaart in patiënten met gelokaliseerde breinschade en zich vertaalt in specifieke klinisch tekorten. Schade aan het cerebellum resulteert in verminderde motoriek. Patiënten kunnen moeite hebben met lopen, waarbij ze kleine stapjes zetten en hun balans constant in het geding is. Anderen hebben problemen met fijne motoriek, zoals het intoetsen van een telefoonnummer.

Alhoewel klinisch de motorische problemen zich duidelijk tonen in cerebellaire patiënten, beperkt de beschrijving van de cerebellaire functie zich tot termen als optimale motor controle, hetgeen getuigt van het nog beperkte begrip van dit hersengebied. Cerebellaire patiënten zijn bijvoorbeeld wel in staat te bewegen, maar niet met de finesse en souplesse die vaak voor vanzelfsprekend wordt gehouden. De consequenties van het ontbreken van deze finesse openbaart zich kijkende naar robots, die ondanks uitgebreide mechaniek, krachtige processoren en uitgebreide besturingsprogramma's houterig bewegen.

Wanneer we kijken naar de functiescheiding van hersengebieden dan zien we dat het cerebellum ondanks zijn afgezonderde ligging geen unieke primaire functie

vervult maar eerder gericht lijkt te zijn op functionele interactie met andere hersengebieden. De uitvoer van het cerebellum innerveert gebieden die al aangestuurd worden door andere hersengebieden, die vaak zelf ook weer input genereren aan het cerebellum. We zien dan ook dat bij schade aan het cerebellum bewegingen nog wel mogelijk zijn, er is niet sprake van het totaal wegvallen van een specifieke (of helder te definiëren) functie. Voornamelijk de complexe bewegingen waarbij meerdere spiergroepen samen werken zijn aangetast, simpele bewegingen laten weinig problemen zien. Kortom het cerebellum lijkt een ondersteunend orgaan te zijn voor andere hersengebieden.

In het onderzoek naar het cerebellum worden een aantal specifieke gedrag paradigma's veel gebruikt vanwege de duidelijke relatie met het cerebellum, en daarom goede voorbeelden zijn van de cerebellaire functie. Een daarvan betreft het aanleren van een knipperreflex van het oog. Dit paradigma komt kortweg op het volgende neer. Men blaast repeterend luchtstootjes op het oog waarop het oog reflexmatig sluit, vervolgens wordt dit luchtstootje aangekondigd door bijvoorbeeld een auditief signaal met een constante tijdsduur tussen de twee stimuli. Na verloop van tijd zal het oog reageren op het auditief signaal en zich hebben gesloten vlak voor de luchtstoot aankomt. Deze respons wordt voortgebracht vanuit het cerebellum en is zelfs intact als men bij proefdieren de grote hersenen weghaalt (en het cerebellum laat zitten).

Een tweede voorbeeld dat inzicht verschaft in de werking van het cerebellum is te zien met arm bewegingen. In dit voorbeeld wordt men geïnstrueerd een object gericht te bewegen. Wanneer nu bij iedere gerichte beweging dit object naar een bepaalde kant wordt getrokken, door bijvoorbeeld een krachtenveld, dan zal de arm beweging initieel afwijken van het oorspronkelijke bewegingstraject. Door training treed er compensatie op voor de extrinsieke krachten en zal de beweging lijken op een niet gemanipuleerde beweging. Deze compensatie komt voort vanuit het cerebellum.

In tegenstelling tot de onduidelijkheid rond de vraag 'wat het cerebellum doet', lijkt de vraag 'hoe het cerebellum werkt' meer aanknopingspunten te bieden deze te beantwoorden. Dit omdat de anatomische opbouw van het cerebellum, het neuronale netwerk, een overzichtelijke structuur heeft die zich repeteert over het cerebellum. De kenmerken van dit netwerk, getalsmatige verhoudingen tussen neurontypes en interacties tussen deelgebieden, bieden houvast in het beantwoorden van de 'hoe het cerebellum werkt' vraag. De hoofdstukken in dit proefschrift zijn dan ook allemaal gericht op deze vraag.

Als we naar de anatomie kijken van het cerebellum dan zien we twee verschillende inkomende zenuwbanen, te weten de mosvezels en de klimvezels. Deze twee banen laten groten verschillen zien, bijvoorbeeld in de verspreiding van inkomende signalen. De mosvezels zijn veel talrijker en divergeren naar veel meer cellen dan de klimmende vezels. In het cerebellum zijn Purkinje neuronen de centrale neuronen, oftewel het centrale kruispunt in het netwerk. Ieder Purkinje neuron wordt sterk

geinerveerd door een enkel klimvezel, en vuurt iedere keer als er een signaal komt vanuit de klimvezel. Deze klimvezel zendt gemiddeld iedere seconde een signaal uit, hetgeen ten opzichte van andere breingebieden een lage frequentie is. De klimvezels ontspruiten vanuit de onderste olijf (inferior olive) en is het onderwerp van dit proefschrift. Deze hersenkern wordt gezien als het hersengebied dat het veel grotere cerebellum reguleert. Deze regulatie behelst ofwel de verandering en sturing van de processen in het cerebellum ofwel biedt structuur aan de activiteit in het cerebellum.

### **In dit proefschrift staat het signaal van de onderste olijf centraal.**

In het **eerste hoofdstuk** zijn we ingegaan op de vraag of het signaal van de onderste olijf zoals dat wordt gelezen in de Purkinje neuron, iedere keer gelijk is of dat de informatie per signaal variabel is. Wanneer een signaal afgevuurd door de onderste olijf neuron zich verplaatst door zijn zenuwuitloper, de klimvezel, en een Purkinje neuron bereikt dan veroorzaakt die een voltage piek in dit Purkinje neuron. Kenmerkend aan dit voltage signaal is dat het uit meerdere kleine voltage piekjes bestaat en vandaar de naam 'complex spike' toegedicht heeft gekregen. Mogelijk heeft de variëteit in dit voltage signaal verschillende uitwerkingen op het Purkinje neuron en correleert het daardoor met variabele functionaliteit. De analyse van deze voltage signalen, de 'complex spike', gemeten in makaken laat zien dat er grote variabiliteit te zien is in het voltage profiel, zowel over tijd in een enkel Purkinje neuron en tussen verschillende Purkinje neuronen. De spreiding van de kleine piekjes wordt groter naarmate de frequentie van vuren in de onderste olijf hoger is. De volgorde van de voltage signaal variabiliteit laat geen structuur zien, oftewel er lijken geen langzame processen ten grondslag te liggen aan deze veranderingen. Ook een groepering van voltage signaal vormen naar gelang van enkele gedragskenmerken laat geen functionele correlatie zien met de voltage signalen.

De neuronen in de onderste olijf zijn geen passieve doorvoer neuronen. In deze neuronen gaat het voltage van het neuron als een sinusbeweging op en neer. Wij hebben in **hoofdstuk twee** gekeken of vuurpatronen van de olijfcellen kenmerken laten zien die voortkomen uit deze oscillaties. Vuurpatronen die afhankelijk zijn van oscillaties zouden tijdsprofielen aan de uitvoer meegeven. Als deze oscillaties constant zijn, dan genereert het systeem dus repeterende tijdspatronen hetgeen gebruikt kan worden als een metronoom voor tijdsindicatie in het cerebellum en als mal kan functioneren om activatie patronen in het cerebellum te vormen. In dit hoofdstuk hebben wij de ritmiciteit beschreven in de vuurpatronen van de onderste olijf en laten daarmee zien dat die duidelijk zichtbaar is. De vuurkans eigenschappen van de onderste olijf op sensorische stimulatie wijst er echter niet op dat die afhankelijk is van een homogeen oscillerend systeem en toont dus dat de onderste olijf niet als een metronoom fungeert. Een computer simulatie van de onderste olijf laat zien dat de oscillaties die onze metronoom theorie onderligt niet stabiel is in zijn frequentie en amplitude en dus niet de nodige langdurige en repeterende patronen vormt om functioneel te zijn als metronoom.

In **hoofdstuk drie** kijken we naar een van de mechanismen die ten grondslag ligt aan hoe het brein zijn invoer-uitvoer transformatie verandert, dit is de transformatie van inkomende elektrische signalen naar uitvoer van elektrische signalen. Een van de wijzen waarop het brein zich kan aanpassen of zich iets kan aanleren is middels het veranderen van hoe een neuron reageert op zijn invoer. In zijn simpelste vorm kan een neuron bijvoorbeeld zijn activatie drempel aanpassen voor zijn invoer, hetgeen wordt gedaan door een proces dat plasticiteit heet. In dit hoofdstuk staat de plasticiteit in de Purkinje neuron centraal, met betrekking op hoe het neuron reageert op signalen afkomstig vanuit de mosvezels. In het paper laten we de door plasticiteit veranderde invoer-uitvoer dynamiek zien en schetsen we hoe deze plasticiteit afhankelijk is van het signaal afkomstig uit de onderste olijf. Met andere woorden het gaat in op hoe de onderste olijf controle kan uitvoeren op de processen in het cerebellum. De 4 Hz sensorische stimulatie brengt langdurige (meer dan 30 minuten) plasticiteits afhankelijke veranderingen teweeg. Daarnaast bleek dat de bewegingen van de snorharen veranderen in muizen waarvan de plasticiteit in de Purkinje neuronen was verandert. Dit laat zien dat plasticiteits veranderingen in de Purkinje neuronen correleren met gedrag.

In **hoofdstuk vier** kijken we naar hoe neuronen in de onderste olijf reageren op sensorische stimulatie. De vraag die centraal stond in deze paragraaf is of een bepaalde sensorische stimulatie, bijvoorbeeld auditieve stimulatie of aanrakings stimulatie, cellen in een bepaalde structuur activeert en of cellen slechts één sensorische stimulatie doorgeven of verschillende. Purkinje neuronen liggen gestructureerd in een vrij overzichtelijke laag in het cerebellum. De techniek waarmee we de cellen hebben gemeten laat het toe om, meerdere naast elkaar liggende Purkinje neuronen tegelijk te meten. Hierdoor kunnen we dus zien of neuronen tegelijk vuren en of er bepaalde patronen in deze Purkinje laag worden geactiveerd. Ook kijken we naar in welke mate de cellen die tegelijk gemeten worden tegelijk geactiveerd worden. De belangrijkste conclusies van dit onderzoek; een enkel Purkinje neuron kan reageren op stimulaties van verschillende sensorische aard, daarnaast laten de activatie patronen van de Purkinje neuronen voor verschillende sensorische stimulaties geen structuur zien. Met andere woorden Purkinje neuronen die reageren op een bepaalde sensorische stimulatie liggen niet geordend naast elkaar en suggereert dat het cerebellum werkt met een gemixt signaal.

---

# Acknowledgements

The course of my PhD led me through different labs in different places meeting so many people. An engrossing and beautiful experience. For it's scientific result, here in this dissertation, I like to express my gratitude for the advice, guidance and support received on every step. First of all my promotor from the very beginning, Erik de Schutter. Erik, I would like to thank you for giving me the opportunity to start a career in neuroscience. In your lab I have enjoyed the freedom you gave to explore the world of science. Your keen advice on my research has shown your commitment.

Michele Giugliano, I would like to thank you first of all for hosting me in your lab in Antwerp. Your lab has been an inspiring experience and I'm happy to have been part of the great interaction in your group. Your great knowledge of neuroscience and your willingness to share this has been a joy. Secondly I would like to thank you for your work as a member of the reading committee, together with Tom Ruigrok and Frank Grosveld.

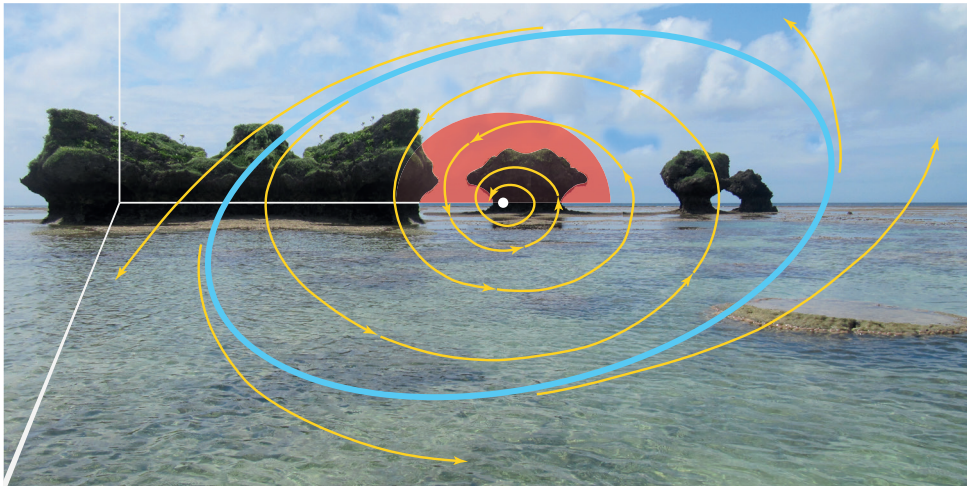
Dear Frank, Tom and Michele, your useful comments and advice on the dissertation have been highly valued, I hope you are content with the forthcoming results.

Chris de Zeeuw, you have made it possible for me to finish my PhD. The cluster of neuroscientific labs you supervise in Rotterdam is remarkable, and the interaction is unique. I admire your accessibility as head of the department and your ardent scientific guidance, in light of the numerous research projects you steer.

Laurens Bosman, our collaboration intensified towards the end of my PhD. Your structured approach, keen comments and continuing helpful attitude have been an enormous support in finishing up this project.

Mario, you have been my scientific mentor and a friend. A relationship that started from the first day of my entrance into the world of neuroscience. Your original thoughts have been an eye-opener, an inspiration, comforting and challenging and always insightful. The creativity and thoughts you express extends outside of the world of science and was the spark for the pictured gratitude below.

*This picture is inspired on indubitable beauty attracting us all and the attractors you have left in my space of thoughts.*



To all people I have met in all these labs, thanks for the help, the inspiring talks, the fun, the sharing, the laughs and the learning moments.

Aan mijn ouders en mijn zusje. Het behalen van mijn doctoraat was een leuke enerverende tijd hetgeen waar jullie een belangrijke bron van zijn geweest. Ik vond het geweldig dat jullie mij opzochten in Okinawa. Met zijn drietjes zittende achter een kop ramen, die we met handen en voeten hadden besteld, voelde het als thuis, door jullie. Het behalen van een doctoraat gaat niet altijd over rozen. Jullie gaven mij de stabiliteit, het doorzettingsvermogen en het optimisme dat noodzakelijk is zo'n traject goed te doorlopen. Een dissertatie als deze biedt de mogelijkheid datgene te doen wat ik doorgaans achterwege laat; bedankt voor de steun en liefde die ik van jullie heb gehad, dank voor nog zoveel meer, zoniet alles.

Anna. As our holidays were getting shorter every year as the seemingly endless PhD was continuing you have always fully supported me. Never did you question my choices even if they could have been, thanks for always been cheerful and all the help and happiness that came of being with you.

## Curriculum Vitae

### Personalia

Name : Pascal Warnaar  
Date of birth : July 18th, 1984  
Place of birth : Soest, the Netherlands

### Education

2006 – 2009 Master Biology of disease, Utrecht University  
2002 – 2006 Bachelor Biomedical Sciences, Utrecht University  
1996 – 2002 VWO, Baarnsch Lyceum

### PhD-fellowship

2010 – present Joint PhD in Neuroscience,  
Erasmus University of Rotterdam, promotor: Prof.dr. C.I. De Zeeuw.  
University of Antwerp, promotor: Prof.dr. E. de Schutter

Visited labs: Hertie Institute for clinical brain research, Tubingen, Germany  
The graduate institute in Okinawa, Japan

Miscellaneous: Dutch animal experimentation certificate (Art. 9 WOD)  
Matlab coding  
Neuron coding

### **Publication list**

Duration of Purkinje cell complex spikes increases with increases with their firing frequency. Warnaar P, Couto J, Negrello M, Junker M, Smilgin A, Ignashchenkova A, Giugliano M, Thier P, De Schutter E. *Frontiers in cellular neuroscience*, Published 13 April 2015; doi:10.3389/fncel.2015.00122

Olivary oscillations do not provide multiple cycle timing properties. Warnaar P, Negrello M, Romano V, Owens CB, Lavarone E, Lindeman S, Bosman LWJ, De Zeeuw C. (In preparation)

Climbing fiber responses of individual Purkinje cells in crus 1 of the cerebellar cortex to tactile, auditory and visual inputs in awake mice. Chiheng J, Warnaar P, Negrello M, Hoogland T, Bosman LWJ, De Zeeuw CI (In preparation)

Long-term potentiation of Purkinje cell sensitivity following sensory stimulation in awake mice. Romano V, De Propris L, Bosman LWJ, Warnaar P, Negrello M, Spanke JK, D'Angelo E, De Zeeuw CI (In preparation)