

Expressiepatronen van schildklierhormoonregulerende genen in het ontwikkelende zangcontrolesysteem van de zebravink

Laetitia BEULLENS

Promotor: Prof. V. M. Darras

Begeleider: Sander Raymaekers

Proefschrift ingediend tot het
behalen van de graad van
Master of Science in Biologie

Academiejaar 2014-2015

© Copyright by KU Leuven

Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van zowel de promotor(en) als de auteur(s) is overnemen, kopiëren, gebruiken of realiseren van deze uitgave of gedeelten ervan verboden. Voor aanvragen tot of informatie i.v.m. het overnemen en/of gebruik en/of realisatie van gedeelten uit deze publicatie, wendt u tot de KU Leuven, Faculteit Wetenschappen, Geel Huis, Kasteelpark Arenberg 11 bus 2100, 3001 Leuven (Heverlee), Telefoon +32 16 32 14 01.

Voorafgaande schriftelijke toestemming van de promotor(en) is eveneens vereist voor het aanwenden van de in dit afstudeerwerk beschreven (originele) methoden, producten, schakelingen en programma's voor industrieel of commercieel nut en voor de inzending van deze publicatie ter deelname aan wetenschappelijke prijzen of wedstrijden.

DANKWOORD

Algemeen wil ik iedereen bedanken die het mogelijk gemaakt heeft dat deze thesis tot een goed einde werd gebracht. In het bijzonder wil ik Sander bedanken die me onder zijn vleugels heeft genomen en wiens aangename begeleiding, deling van zijn kennis (zoals een echte leraar het zou doen), deskundige raad en zijn verbeteringen van mijn thesistekst, mij hebben gebracht waar ik nu sta.

Daarnaast wil ik ook graag professor Darras mijn dank getuigen, niet alleen voor haar kritische verbeteringen, maar ook omdat ik de kans heb gekregen deel uit te maken van dit interessante en unieke onderzoek.

Ook wil ik alle thesisstudentjes - Lien, Julie, Isabelle, An, Jurgen, Sarah en Claudia - bedanken voor de ongelooflijke sfeer die zo op het labo werd gecreëerd. Ook de fijne na-het-labo-momentjes zorgden voor enorm veel ontspanning in deze redelijk stressvolle periode. Tevens wil ik alle collega's van het labo bedanken voor de aangename samenwerking en Lut voor haar vrolijke en leuke verhalen.

Daarnaast ook een oprechte dankjewel aan al mijn vrienden en vriendinnen van Chiro Weerde, uit mijn opleiding biologie, het middelbaar, uit Leuven en uit men eigen kleine dorpje voor de ontelbare aanmoedigende smsjes, de ontspannende babbels en het mij verplichten uit men kot te komen waarbij ze telkens volgende reden aanhaalden: "Laetitia, ontspanning is belangrijk om je te kunnen focussen!". Ook wil ik specifiek Claudia bedanken voor onze zotte kotmomenten die we samen hadden als we beide even doordraaiden, waarbij *Rollin'* sterk doorheen de boxen galmde en we de longen uit ons lijf dansten.

Daarnaast gaat mijn dank ook uit naar Ian die met geduld mij heeft geholpen met al mijn computerproblemen. Daarnaast stond hij altijd klaar voor mij en zijn aanmoedigende knuffels van tijd tot tijd kwamen ook zeer goed van pas.

Tot slot wil ik mijn hele familie bedanken voor de steun die ik gekregen heb en de oprechte interesse die ze toonden, maar in het bijzonder mijn mama. In de moeilijker momenten kon zij mij terug de realiteit onder ogen brengen, waardoor ik met frisse moed en een portie vers fruit - dat door haar onder mijn neus werd geschoven - kon verder werken.

Bedankt!

LIJST VAN AFKORTINGEN

°C	-	graden Celcius
A	-	arcopallium
AA	-	azijnzuur (<i>acetic acid</i>)
Ab	-	antilichaam (<i>antibody</i>)
AD	-	gedestilleerd water (<i>aqua destillata</i>)
Ag	-	antigen
AP	-	alkaline fosfatase (<i>alkaline phosphatase</i>)
AS	-	<i>antisense</i>
BBB	-	bloed-hersen-barrière (<i>blood-brain-barrier</i>)
BCIP	-	5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfaat
BDNF	-	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BMR	-	basaal metabolisme graad (<i>basal metabolic rate</i>)
BOS	-	het lied van de vogel zelf (<i>Bird's own song</i>)
bp	-	basenparen
BSA	-	<i>bovine serum albumine</i>
D1	-	joodthyronine deiodase type 1
D2	-	joodthyronine deiodase type 2
D3	-	joodthyronine deiodase type 3
DAPI	-	4',6-diamidino-2-phenylindole dichloride
DEPC	-	diethylpyrocarbonaat
DIG	-	digoxigenine
DNA	-	desoxyribonucleïnezuur (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
Dph	-	<i>days posthatch</i>
E	-	embryonaal stadium (vanaf dag van incubatie)
EDTA	-	ethyleendiaminetetraazijnzuur
FITC	-	fluoresceïne isothiocyanaat
GL	-	granulaire laag
H	-	hyperpallium
H ₂ O	-	water
H ₂ O ₂	-	waterstofperoxide
HRP	-	<i>horseradish peroxidase</i>
HVc	-	caudale nucleus van het ventrale hyperstriatum of <i>High Vocal Centre</i>
I ⁻	-	jodide
IHC	-	immunohistochemische kleuring
IMM	-	intermediaire mediale mesopallium
IPC	-	nucleus <i>isthmi pars parvocellularis</i>

IRD	-	binnenste ring dejodering
ISH	-	<i>in situ</i> hybridisatie
LaM	-	<i>lamina mesopallium</i>
LAT	-	L-type aminozuur transporters
LAT1	-	L-type aminozuur transporters 1
LB	-	<i>lysogeny broth</i>
LFM	-	<i>lamina frontalis suprema</i>
LFS	-	<i>lamina frontalis superior</i>
LiCl	-	lithiumchloride
LMAN	-	laterale magnocellulaire nucleus van het anterieure neostriatum
LP	-	<i>long probe</i>
LPS	-	<i>lamina palio-subpallialis</i>
M	-	mesopallium
MCT	-	monocarboxylaat transporter
MCT8	-	monocarboxylaat transporter 8
Min	-	minuten
ML	-	moleculaire laag
MNM	-	medio-rostrale nidopallium/mesopallium
mRNA	-	messenger RNA
N	-	nidopallium
NBT	-	<i>nitro blue tetrazolium chloride 5</i>
NCM	-	caudomediale neostriatum
Nif	-	nucleus interfacialis
NIS	-	Na ⁺ -I ⁻ symporter
O ₂	-	zuurstof
OATP	-	organische anion transporterende polypeptiden
ORD	-	buitenste ring dejodering
OT	-	optisch tectum
PBS	-	fosfaatgebufferde saline (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBS-Tx	-	PBS-Triton-X 100
PC	-	Purkinjecellaag
PCA	-	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	-	paraformaldehyde
pH	-	zuurtegraad
PIG	-	<i>pre-immune goat</i>
RA	-	de robuuste nucleus van het arcopallium
RER	-	ruw endoplasmatisch reticulum
RNA	-	ribonuceïnezuur (<i>ribonucleic acid</i>)

Rpm	-	<i>revolution per minute</i>
rT ₃	-	3,3',5'-trijoodthyronine
RXR	-	retinoid X receptor
S	-	<i>sense</i>
Sec	-	seconden
SRC-1	-	steroïde receptor coactivator-1
SSPE	-	<i>saline-sodium phosphate EDTA</i>
STM	-	<i>striatum mediale</i>
Str	-	streptavidine
T	-	testosteron
T ₂	-	3,3'-dijoodthyronine
T ₃	-	3,3',5'-trijoodthyronine
T ₄	-	3,5,3',5'-tetrajoodthyronine (thyroxine)
TAE	-	tris azijnzuur EDTA buffer
TBG	-	thyroxine-binding globuline
TBS	-	tris-gebufferde saline
Tgb	-	thyroglobuline
TH	-	schildklierhormoon (<i>thyroid hormone</i>)
TNB	-	trisnatriumchloride buffer
TPO	-	thyroperoxidase
TR	-	schildklierhormoonreceptor
TR α	-	schildklierhormoonreceptor α
TR β	-	schildklierhormoonreceptor β
TRE	-	schildklierhormoon responsieve element
TRH	-	thyrotropinevrijmakend hormoon
TSH	-	schildklierstimulerend hormoon
TTR	-	transthyretine
Tyr	-	tyramide
VEGF	-	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WM	-	witte massa

INHOUDSOPGAVE

DANKWOORD	ii
LIJST VAN AFKORTINGEN.....	iii
INHOUDSOPGAVE	vi
LITERATUURSTUDIE.....	1
1. Schildklierhormonen	1
1.1 Inleiding.....	1
1.2 Transport van TH	2
1.2.1 Transport naar de doelwitcel	2
1.2.2 MCT8-transporter.....	3
1.2.3 OATP1C1-transporter	4
1.2.4 LAT1-transporter	4
1.3 Metabolisme van TH	4
1.4 Genomische effecten	5
1.4.1 Mechanismen van TH-acties	5
1.4.2 Schildklierhormoonreceptoren	7
1.4.2.1 <i>Transcriptionele regulatie door TR.....</i>	<i>7</i>
1.4.2.2 <i>TR's en TR-isovormen</i>	<i>7</i>
1.4.3 Acties	9
1.5 Non-genomische effecten	10
1.6 TH's bij de schildklier- en hersenontwikkeling van avifauna	10
2. Het zangcontrolesysteem van de zebra-vink	12
2.1 Inleiding.....	12
2.2 De zebra-vink als modelorganisme	12
2.3 Het leerproces – Tijdschaal van de verschillende leerfasen	13
2.4 Zangkernen en -banen in de hersenen	15
2.4.1 Specifieke neuronen.....	15
2.4.2 Zangkernen en -banen.....	15
2.5 Neuroplasticiteit & neurogenese tijdens het zangleerproces	17
3. Het effect van hormonen op leerprocessen	19
DOEL	21

MATERIAAL & METHODEN	22
1. Verzamelen zebrevinkhersenen	22
2. Snijden van weefsels	22
2.1 <i>Free floating coupes</i>	22
2.2 <i>Fresh frozen coupes</i>	22
3. Nissl-kleuring.....	22
4. Immunohistochemische kleuring	23
5. <i>In situ</i> hybridisatie met DIG-gemerkte RNA-probes.....	25
5.1 Aanmaak DIG-gemerkte RNA-probes.....	25
5.1.1 Selectie van gensequentie voor probe-aanmaak.....	25
5.1.2 Amplificatie cDNA voor probe-aanmaak via <i>Polymerase Chain Reaction</i>	25
5.1.3 Elektroforese	26
5.1.4 Geextractie	26
5.1.5 Kloneren: Ligeren en transformeren.....	26
5.1.6 Kolonie-PCR	27
5.1.7 MiniPrep: plasmide opzuivering en sequencing	28
5.1.8 Linearisatie plasmide.....	28
5.1.9 Opzuivering gelineariseerd plasmide	29
5.1.10 <i>In vitro</i> transcriptie en merking met DIG.....	29
5.1.11 Opzuivering en purificatie probe.....	29
5.1.12 Nanodrop.....	30
5.2 Spotting-test.....	30
5.3 Uitvoeren ISH	31
5.3.1 Protocol ISH.....	31
5.3.2 <i>High-throughput</i> ISH.....	33
5.3.3 Toeleggen coupes.....	33
6. Microscopie.....	34
RESULTATEN	35
1. Nissl-kleuring.....	35
2. Immunohistochemische kleuring	35
3. <i>In situ</i> hybridisatie met DIG-gemerkte probes.....	36
3.1 Aanmaak DIG-gemerkte probes.....	36

3.2	<i>In situ</i> hybridisatie van MCT8	36
3.3	<i>In situ</i> hybridisatie van TR β	38
3.4	<i>In situ</i> hybridisatie TR α	40
3.5	<i>In situ</i> hybridisatie D2	45
3.6	<i>High-throughput</i> ISH	51
DISCUSSIE		52
1. IHC-kleuring.....		52
2. <i>In situ</i> hybridisatie met DIG-gemerkte RNA-probes.....		52
2.1	<i>In situ</i> hybridisatie MCT8.....	53
2.2	<i>In situ</i> hybridisatie TR β	54
2.3	<i>In situ</i> hybridisatie TR α	55
2.4	<i>In situ</i> hybridisatie D2.....	57
2.5	Vergelijking van de expressiepatronen	60
2.6	Conclusie	61
SAMENVATTING.....		62
SUMMARY		63
REFERENTIES		64
ADDENDUM		A1
I. Lijst van buffers en oplossingen		A1
II. ISH coupes		A3
III. Risicoanalyse		A10

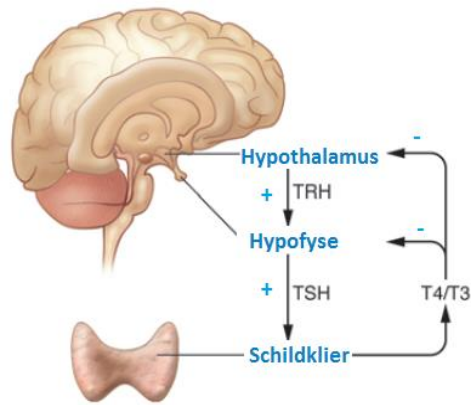
LITERATUURSTUDIE

1. Schildklierhormonen

1.1 Inleiding

Schildklierhormonen (TH's) zijn belangrijk in de ontwikkeling van organismen. Niet alleen zijn deze hormonen belangrijk voor een normale groei, differentiatie en ontwikkeling, maar ze mediëren ook verschillende metabole en reproductieve functies¹⁻⁵. Zo is ook de ontwikkeling van het zenuwweefsel sterk afhankelijk van TH's. Een correcte concentratie aan TH in het weefsel is uiterst belangrijk. Zowel hypothyroïdie, waarbij de schildklier niet voldoende TH aanmaakt, als hyperthyroïdie, waarbij een overvloed TH geproduceerd wordt, kunnen nadelige effecten in het organisme veroorzaken, zoals goitervorming en mentale retardatie^{1,3,6-9}.

Aanmaak van TH gebeurt in de folliculaire cellen van de schildklier. Deze is inferieur gelegen van het strottenhoofd en bedekt gedeeltelijk de luchtpijp^{1,4}. Opslag van TH vindt vervolgens plaats in het colloïd in de externe folliculaire ruimte waar 3,5,3',5'-tetrajoodthyronine of thyroxine (T₄) in gebonden toestand met thyroglobuline (Tgb) aanwezig is^{3,7}. Nadien worden delen van het colloïd de folliculaire cel weer in getransporteerd. Zo wordt het Tgb-T₄ complex opgenomen in het cytoplasma van de folliculaire cel, waar Tgb gehydrolyseerd wordt door enzymen in een endolysosoom. Op deze manier wordt T₄ vrijgezet van Tgb en vindt T₄-vrijgave naar het bloed plaats. De TH-vrijgave moet sterk gecontroleerd zijn, een regulatie die inwerkt op verschillende niveaus. Thyrotropinevrijmakend hormoon (TRH) is een neurohormoon dat wordt aangemaakt door de hypothalamus^{1,10}. TRH-secretie uit de paraventriculaire neuronen van de hypothalamus wordt gecontroleerd via een terugkoppelingssysteem. Wanneer het circulerend TH-niveau in het bloed laag is, stimuleert dit de vrijgave van TRH. Vervolgens induceert TRH de vrijzetting van thyrotropine (TSH) uit de thyrotrofe cellen van de adenohipofyse, wat op zijn beurt zorgt voor de stimulatie van TH-aanmaak en de vrijzetting ervan uit de schildklier. Via een negatieve terugkoppelingsloop daalt de TRH- en TSH-synthese en secretie wanneer de concentratie van circulerend TH te hoog is. Verhoogde T₄- en 3,3',5-trijoodthyronine (T₃)-niveaus in de circulatie inhiberen dus de vrijzetting van TRH en TSH uit respectievelijk de hypothalamus en hypofyse (zie figuur 1)^{1,2,4,6,10-13}. De belangrijkste functie van TSH is dus om de synthese van T₄ op te wekken. TSH voert deze actie uit op verschillende niveaus in de folliculaire cellen van de schildklier onder andere door verhoging van Na⁺-I⁻-symporters (NIS)-expressie te stimuleren. Deze NIS-proteïnen zijn noodzakelijk om jodide (I⁻) uit de bloedbaan in de folliculaire cellen te transporteren^{1,3}. De basale metabolisme graad (BMR) is ook een belangrijke controlerende factor omtrent de aanmaak en secretie van schildklierhormoon. Wanneer het BMR te laag is, wordt de synthese gestimuleerd. Met het basaal metabolisme of stofwisseling wordt de vrijgave van energie bedoeld voor primaire levensfuncties om een organisme in leven te houden^{1,14}.



Figuur 1: Controle op de vrijgave van TH – Door een verlaagde TH-niveau in het bloed wordt TRH-vrijgave uit de hypothalamus geïnduceerd. Dit stimuleert vervolgens de vrijgave van TSH uit de hypofyse, wat op zijn beurt zorgt voor de vrijzetting van TH's uit de schildklier. Via negatieve terugkoppeling zorgen verhoogde TH-niveaus in het bloed voor een vermindering van TRH- en TSH-vrijgave. +: induceert, -: inhibeert (aangepast uit Brent, 2012).

Bij de vrijgave van TH naar de bloedcirculatie wordt reeds een deel van het T_4 omgezet naar het meer receptor-actieve T_3 door buitenste ring deïodering (ORD)^{10,11}. Beide hormonen zijn gekend voor hun regulerende werking van de genexpressie in weefsels⁶. De meeste weefsels zijn dan ook in staat hun eigen niveaus aan TH te reguleren aan de hand van specifieke enzymen en transporters¹¹. Naast ORD kan er ook binnenste ring deïodering (IRD) plaatsvinden, zowel bij T_4 als T_3 . Respectievelijk levert dit 3,3',5'-trijoodthyronine (rT_3) en 3,3'-dijoodthyronine (T_2) op^{10,15,16}. De enzymen die deze reacties katalyseren worden joodthyronine deïodasen genoemd (zie 1.3)^{6,10,11}.

Tot slot, om de TH-acties te reguleren, moet er controle op de beschikbaarheid van de schildklierhormonen zijn, alsook van hun receptoren. Deïodasen en transporters spelen hierbij een prominente rol, alsook welke nucleaire receptor in het weefsel tot expressie komt^{17,18}.

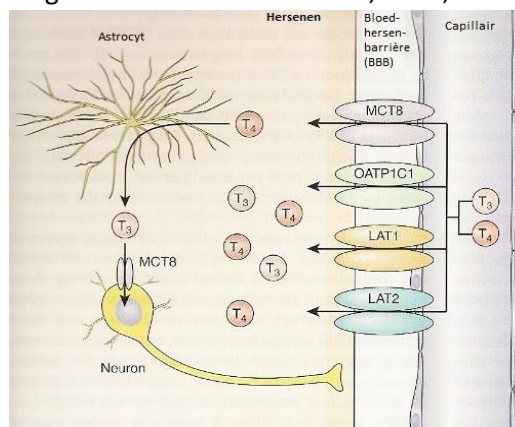
1.2 Transport van TH

1.2.1 Transport naar de doelwitcel

Na vrijzetting uit de schildklier komen de TH's in de bloedbaan terecht. Aangezien het hydrofobe moleculen zijn, komt het overgrote deel ervan reversibel gebonden aan plasmaproteïnen, ook wel transportproteïnen genoemd, voor in de circulatie. Slechts een klein percentage T_3 en T_4 komt vrij voor in het bloed (<1%). Wanneer een vrij TH naar zijn doelwitcel diffundeert, moet dit verlies aan vrij en ongebonden TH in het bloed opnieuw gecompenseerd worden. Doordat gebonden TH's losgelaten worden van hun plasmaproteïnen wordt deze vrije TH-*pool* opnieuw aangevuld. Op deze manier wordt een voorraad ongebonden TH aangelegd in de algemene circulatie van het organisme, klaar om onmiddellijk zijn doelwitcel binnen te treden. Echter, diffusie van het hormoon naar de doelwitcel vindt slechts sporadisch plaats. Veelal zijn TH's gebonden aan transportproteïnen. De belangrijkste transportproteïne in het bloed is thyroxine-binding globuline (TBG)^{1,4,12}. Voor de opname van TH in de cel komen TH-transporters tussen. Via specifieke TH-transporters zoals monocarboxylaats transporters (MCT's), L-type aminozuur transporters (LAT's) en organische aniontransporterende polypeptiden (OATP's) worden de TH's hun doelwitcel ingebracht, aangezien deze TH-transporters de hormonen over het celmembraan transporteren. Hier kan conversie van T_4 naar T_3 plaatsvinden^{1,2,10,17,18}.

1.2.2 MCT8-transporter

Ook al is er reeds een hele groep aan verschillende transporter families beschreven, er zijn er slechts enkele die specificiteit vertonen in het transporteren van TH, zoals de MCT's¹⁹. Specifiek in het hersenweefsel van zoogdieren zorgen deze transmembranaire transporters ervoor dat zowel T₄ als T₃ overheen de bloed-hersen-barrière (BBB: *blood-brain-barrier*) worden getransporteerd. Hier wordt T₄ naar T₃ geconverteerd in de astrocyten door de jodase type 2 (D2) (zie 1.3). Het is echter nog niet geweten via welke transporter T₄ de astrocyt wordt binnengebracht. De conversie van T₄ naar T₃ gebeurt vooraleer ze via monocarboxylaats transporter 8 (MCT8) een naburige neuron worden in getransporteerd (zie figuur 2). De MCT8-transporter komt dus zowel voor op de BBB, als op de neuronen zelf. Niet alleen worden TH's overheen de BBB getransporteerd. MCT8 komt ook tot expressie in de choroïd plexus. Om deze reden is MCT8 een belangrijke component om TH's overheen de bloed-cerebrospinaal vocht-barrière te vervoeren. Geysens *et al.* (2012) haalt aan dat MCT8 sterk verspreid terug te vinden is in de grijze massa van de kippenhersen gedurende de vroege embryonale ontwikkeling, wanneer enkel nog maar maternaal TH voor handen is. Naast het zenuwweefsel is MCT8 ook terug te vinden in de schildklier, lever, testes en de skeletspieren^{1,3,17-23}.



Figuur 2: Transporters die TH's overheen de BBB transporteren bij zoogdieren – MCT8-, OATP1C1- en LAT's-transporters vervoeren zowel T₄ als T₃ overheen de BBB. In de astrocyt vindt conversie van T₄ naar T₃ plaats, waarna deze T₃ naar de buurneuronen kan worden vervoerd, waar het via MCT8 in het neuron wordt opgenomen (aangepast uit Norris & Carr, 2013).

Aangezien TH belangrijk is voor de ontwikkeling van de hersenen, spreekt het voor zich dat wanneer er mutaties optreden in de MCT8-transporters dit voor neurologische problemen zorgt (Allan-Herndon-Dudley syndroom), waaronder een sterke mentale achterstand. Er wordt immers geen of onvoldoende TH de neuronen in getransporteerd. Mede hierdoor is het onderzoek naar het belang van deze transporters sterk gegroeid. Naast de primaire TH-transporter MCT8 zijn er ook andere transporters, zoals bepaalde OATP's. Het grote verschil met MCT8 is dat de secundaire transporters, zoals OATP's, een lagere specificiteit vertonen. Ze vervoeren met andere woorden niet enkel TH's, maar bijvoorbeeld ook aminozuren. Een ander lid van dezelfde MCT-transporters is MCT10. Deze transporter is sterk homolog aan MCT8, maar kent een meer wijdverspreide distributie^{1,3,8,17,19-22,24-28}.

Het merendeel van de onderzoeken naar TH-transporters focust zich op de influx van TH in cellen. Er is veel minder geweten over TH-efflux uit de cellen. Echter, zowel influx als efflux van TH zijn van belang voor een optimale regulatie van de TH-beschikbaarheid in de cellen en is MCT8 betrokken bij de TH-efflux^{17,19}.

1.2.3 OATP1C1-transporter

Naast MCT8 zijn er nog additionele transporters die belangrijk zijn voor zowel de opname van TH in de cel als de efflux uit de cel. Terwijl in ratten en muizen MCT8 zowel T_3 als T_4 vervoert, vertoont OATP1C1 een grotere affiniteit voor T_4 en vervult een gelijkaardig rol als MCT8. De OATP1C1-transporter zorgt ook voor de efflux van rT_3 uit de hersenen naar de circulatie. Aangezien OATP1C1 bijna exclusief voorkomt ter hoogte van de BBB (zie figuur 2) en een grote affiniteit heeft voor T_4 , is het duidelijk dat deze transporter een cruciale rol speelt in het vervoeren van T_4 naar de hersenen. Dit werd vastgesteld na een onderzoek van Sugiyama *et al.* (2003). Zij toonden aan dat de OATP1C1-expressie in de capillairen van rattenhersen door TH-concentraties gereguleerd werd. Een hypothyroïde rat kende een verhoogde OATP1C1-expressie en omgekeerd bij hyperthyroïdie. Ook bij de kip is gedurende de vroege ontwikkelingsperiode de transporter aanwezig^{8,18,20-22,25,29}.

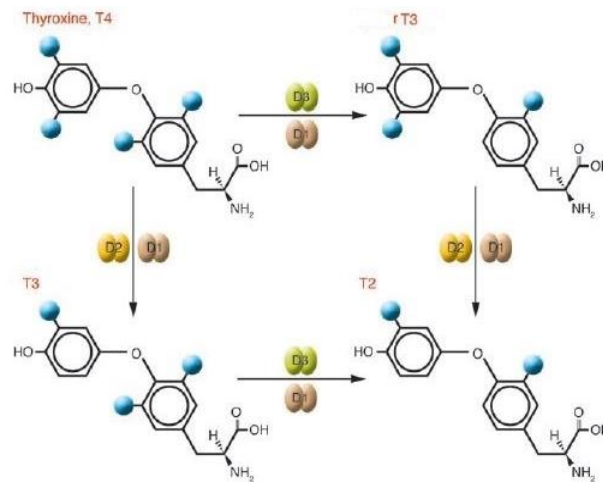
1.2.4 LAT1-transporter

Ook de LAT's behoren tot de transporters die een sterke specificiteit vertonen voor het transporteren van TH. De voorkeur bij LAT1 gaat uit naar het transporteren van T_2 en het minst wordt T_4 vervoerd. Duelli *et al.* (2000) vonden ter hoogte van de choroïd plexus van rattenhersen het transcript voor LAT1 terug. Uit deze resultaten concludeerden ze dat LAT1 bij het transcellulaire transport betrokken is, zoals het vervoeren van grote neutrale aminozuren overheen de BBB. Deze transporter is dus sterk aanwezig op de BBB. Ook al hebben TH's een sterke affiniteit voor de bindingsplaats op de LAT1-transporter, toch is het transporteren van T_3 en T_4 erg laag bij deze transporter. Uchino *et al.* (2007) zagen het antwoord op deze observatie in de hydrofobe kenmerken van de moleculen. Hydrofobe interacties tussen de TH's en LAT1 zorgden voor een grote affiniteit met de bindingsplaats, maar hier staat tegenover dat er een trage dissociatie plaatsvindt van het substraat uit deze bindingsplaats, waardoor het transport sterk vertraagd is^{20,30,31}.

1.3 Metabolisme van TH

Afhankelijk van de hoeveelheid joodatomen dat het molecuule bevat, verschillen de TH's van elkaar. Hierbij is T_3 de meest receptor-actieve vorm van de TH's en T_4 de meer inactieve vorm^{1-3,5,32}. Joodthyronine dejodasen zijn enzymen die de reacties katalyseren opdat TH's geactiveerd of juist gedeactiveerd worden^{1,5,9-11,33}. Momenteel zijn er drie types van deze dejodasen geïdentificeerd in vertebraten. Veelal zorgt dejodase type 2 (D2), gecodeerd door het *DIO2*-gen, voor activatie van TH, door het omzetten van T_4 naar het meer bioactieve T_3 . Op deze manier zorgt D2, samen met dejodase type 3 (D3) voor de intracellulaire TH-concentraties. D3 kent een inactiverende werking en zorgt juist voor de omzetting van T_4 naar rT_3 , maar het inactieveert vooral T_3 door omzetting naar T_2 . Op deze manier zorgt D3 voor de degradatie van T_3 en T_4 . Het dejodase type 1 (D1) kan TH's zowel activeren als inactiveren door ORD en IRD van de verschillende TH-vormen te katalyseren (zie figuur 3). Reeds bij de

vrijzetting van TH uit de folliculaire cel, komt D1 in het cytoplasma tussen om een klein gedeelte van het T₄ onmiddellijk om te zetten naar T₃^{10,16,18,32}.



Figuur 3: Katalytische deiodaseactiviteit en het effect op de verschillende TH's – Deiodasen reguleren de activiteit van de TH. D2 is het activerende deiodase en converteert T₄ naar T₃. Eveneens komt D2 tussen in de omzetting van rT₃ naar T₂. D3 zorgt voor inactivatie aangezien T₃ naar T₂ wordt omgezet. Tot slot kan D1 TH's zowel activeren als inactiveren via IRD en ORD (aangepast uit Bianco & Kim, 2006).

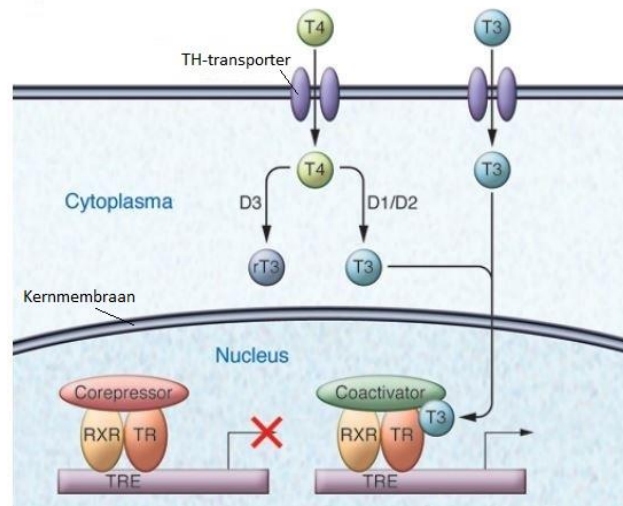
Afhankelijk van het weefsel, de tijdstip en de noodzaak aan een bepaalde vorm van het schildklierhormoon komt een ander type deiodase tot expressie. Enkel in de hypofyse kan expressie van de drie types deiodasen gelijktijdig worden teruggevonden. Deiodasen zorgen dus voor lokale activatie of inactivatie van TH's en reguleren dus de lokale TH-acties^{10,17}. Bij de mens komt D1 vooral tot expressie in de nieren, de lever en de schildklier. D2-expressie wordt vooral teruggevonden overheen de hersenen, specifiek in de adenohypofyse, de skeletspieren en eveneens in de schildklier. Van alle deiodasen die aanwezig zijn in het lichaam van vertebraten, is D2 het deiodase dat het sterkst tot expressie wordt gebracht. Tot slot komt D3 ook voor in de hersenen, foetale weefsels en de placenta. Deze deiodase is omwille van zijn tegengestelde werking aan D2, minstens even belangrijk en dan vooral tijdens de embryonale ontwikkeling. D3 biedt het embryo immers bescherming tegen te hoge TH-concentraties, wanneer deze aanwezig zouden zijn. TH is nodig voor een normale ontwikkeling, weliswaar in normale concentraties. Te hoge of te lage concentraties zorgen niet alleen voor congenitale afwijkingen, maar ook voor gezondheidsproblemen in het verdere adulte leven. Algemeen beïnvloedt de activiteit van deiodasen de TH-signalering in een lichaam sterk. Deiodasen zijn dus belangrijk in het behouden van de homeostase van de TH-niveaus en zorgen bijgevolg ook voor de TH-beschikbaarheid in het lichaam^{10,15,16,32}.

1.4 Genomische effecten

1.4.1 Mechanismen van TH-acties

Enmaal binnengebracht in de cel binden TH's op hun nucleaire receptor (zie figuur 4). De verschillende TH's binden met een verschillende affiniteit op deze receptoren. Zo binden de receptoren T₃ met een hogere affiniteit dan T₄. T₃ is dan ook de receptor-actieve vorm. De schildklierhormoonreceptoren (TR's) waarop T₃ bindt, behoren tot de familie van de nucleaire

receptoren en herkennen het schildklier responsieve element (TRE: thyroid respons element) in de promotorregio van de doelwitgenen. Op dit TRE vindt binding plaats van de receptoren als homodimeren of als heterodimeren met de retinoid X receptor (RXR), waardoor transcriptie van het TH-responsieve gen wordt gestart. De bezette receptoren beïnvloeden dus de synthese van nieuwe eiwitten door de gentranscriptie van de T_3 -responsieve genen te reguleren. Homodimeren van TR's worden in verhouding veel minder gevormd dan de heterodimeren, aangezien homodimeren veel minder stabiel zijn. Wanneer ze toch gevormd worden, is dit echter slechts van korte duur. Bijgevolg is de transcriptie minder efficiënt^{1,3,5,14,34}.



Figuur 4: Mechanisme van TH om positief geregeerde TH-responsieve genen te activeren – Nadat TH via transporters de doelwitcel is binnengebracht, vindt conversie van T_4 plaats door deiodasen. In de nucleus vormt de TR een heterodimeer met RXR en binden ze samen op het TRE van het doelwitgen. In afwezigheid van T_3 bevinden zich corepressoren op het heterodimeer en bijgevolg kan geen genexpressie plaatsvinden. Nadat T_3 de nucleus binnengedren is, bindt deze op zijn receptor. Door conformatieveranderingen worden de repressoren losgelaten en worden coactivatoren gerekruteerd. Transcriptie van het positief geregeerde wordt gestart (aangepast uit Brent, 2012).

TR's reguleren de transcriptie van de TH-responsieve genen zowel in de aan- als afwezigheid van het ligand³⁵. Wanneer het ligand, T_3 , niet aanwezig is om op de TR's te binden, vindt er een actieve repressie plaats op de gentranscriptie door middel van de binding van corepressoren aan de TR's (zie figuur 4). Ook bij basale expressie is er geen ligand aanwezig. Er vindt eveneens geen binding plaats van het heterodimere complex op het TRE en bijgevolg worden geen corepressoren gerekruteerd. Daarom vindt in deze situatie expressie plaats, weliswaar op een laag niveau. Deze basale transcriptie treedt op in situaties waar TR niet voorkomt, bv. bij *knock-out* van TR-coderende genen. Wanneer T_3 wel bindt op zijn receptor valt de repressie weg. Door de conformatieverandering van de receptor worden de corepressoren losgelaten. Daarenboven laten deze structurele veranderingen het toe om coactivatoren te rekruteren, waardoor de transcriptie van het TH-responsieve gen wordt gestart (zie figuur 4). Deze TH-responsieve genen worden ofwel positief ofwel negatief geregeerd. Bij negatief geregeerde genen wordt, wanneer T_3 als ligand bindt, de basale activiteit onderdrukt. Dit in tegenstelling tot de positief geregeerde genen, waarbij wanneer T_3 bindt, deze genen niet onderdrukt worden en hun transcriptie starten^{3,34-38}.

1.4.2 Schildklierhormoonreceptoren

1.4.2.1 Transcriptionele regulatie door TR

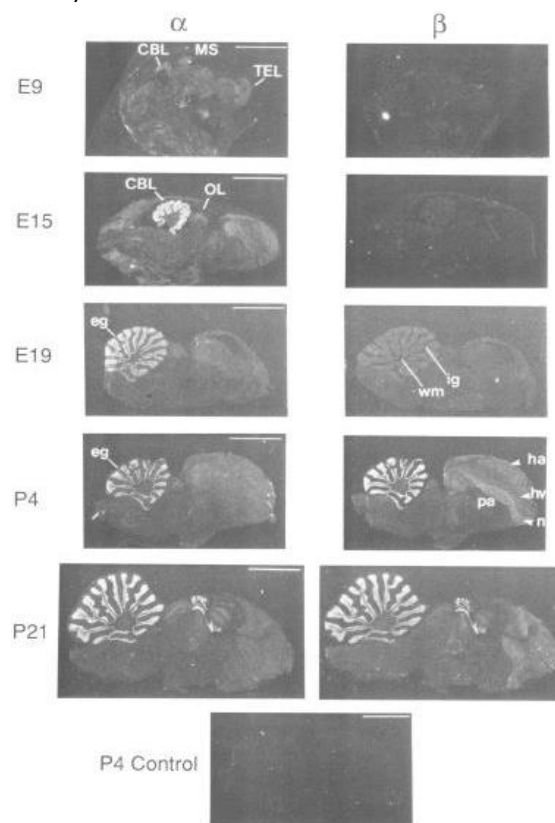
Uit paragraaf 1.4.1 valt reeds af te leiden dat de receptoren een beduidende rol spelen in het al dan niet activeren van de transcriptionele activiteit van de genen^{35,37}. De TR's zorgen ervoor dat de biologische activiteit van T₃ via transcriptionele regulatie gemedieerd wordt. Deze regulatie wordt eveneens gereguleerd door het TRE-type dat op de promotorregio's van de doelwitgenen gelokaliseerd is. De verschillende receptoren vertonen een sterke voorkeur naar een specifieke TRE^{1,3,36,39}. Het TH-functioneren is dus afhankelijk van de aanwezigheid van TR's. Zo spelen deze nucleaire receptoren bijvoorbeeld een belangrijke regulatieve rol op de genen die instaan voor de TRH- en TSH-expressie. Wanneer T₃ aanwezig is, zorgen de TR's voor een repressie van de transcriptie van deze genen. Terwijl in afwezigheid van T₃ de expressie net verhoogd zal worden. Dit ligt in lijn met de negatieve terugkoppeling die reeds in de inleiding werd besproken¹³.

1.4.2.2 TR's en TR-isovormen

Bij vertebraten staan twee verschillende genen, *THRA* en *THRB*, die elk op een verschillend chromosoom gelegen zijn, in voor de codering van respectievelijk schildklierhormoonreceptor α (TR α) en schildklierhormoonreceptor β (TR β)^{34-36,40}. Via alternatieve *splicing* van het primaire transcript worden er verschillende TH-bindende-isovormen van de TR's verkregen, afhankelijk van het organisme. Zo worden er bij de kip drie isovormen gevormd; TR α , TR β 0 en TR β 2. Doordat op de GenBank homologe sequenties van deze drie genen zijn teruggevonden, is geweten dat dit ook het geval is bij de zebrafink. Alle drie deze receptoren binden T₃ met een hogere affiniteit dan T₄. De verschillende TR-isovormen vertonen een hoge sequentie homologie, zowel in het DNA-bindingsdomein als in het hormoonbindingsdomein. Het expressiepatroon van de TR's, opgevolgd via *in situ* hybridisatie (ISH), wijst TR α aan als de receptor die het vroegst tot expressie komt in de ontwikkeling van de kip, in vergelijking met TR β . Naarmate het organisme ouder wordt, neemt de expressie van het *THRA*-gen ook af. Wegens het belang van TH voor een correcte ontwikkeling van het zenuwstelsel, komt TR α veel voor in de hersenen. In latere ontwikkelingsstadia is ook TR β hier terug te vinden. Het *THRB*-gen, echter, kent ook een sterke expressie in de nieren en de schildklier^{3,5,39-42}.

In een onderzoek van Forrest *et al.* (1991) wordt het expressiepatroon van beide receptoren in embryonale kippenhersen aangetoond. Ze maakten gebruik van ISH gedurende de ontogenese van de kippenhersen. De resultaten weergegeven in figuur 5 geven deze expressiepatronen van TR α en TR β weer in de ontwikkelende kippenhersen. Hieruit komt het verschil in expressiepatronen van de twee receptoren duidelijk naar voor. TR α treedt naar voor als de receptor die reeds vroeg in de ontwikkeling tot expressie komt^{5,18,40}. TR α -mRNA komt overheen de hele hersenen tot expressie in de vroege ontwikkelingsstadia. Vanaf de 19^{de} dag van incubatie (E19: embryonaal) werd de eerste expressie van TR β waargenomen (zie figuur 5: E19). Vanaf deze periode stijgt de TR β -expressie in het telencephalon. TR β treedt naar voor als receptor die in de latere ontwikkelingsfasen belangrijker wordt. Zo speelt het een rol in de synapsvorming tussen de Purkinjecellen en de axonen van de

granulaire cellen van het cerebellum en heeft bijgevolg een significante rol bij de synaptogenese. TR β -expressie is toch ook terug te vinden in vroege embryonale ontwikkelingsstadia, maar weliswaar meer beperkt, wat suggereert dat TR β een zeer specifieke rol speelt bij bepaalde vroegere ontwikkelingsprocessen zoals bijvoorbeeld de initiatie van de cerebellaire morfogenese. Hier tegenover staat TR α die in de migrerende en prolifererende granulaire cellen sterk tot expressie kwam. Toch is TR α ook in latere stadia een belangrijke tussenkomende factor voor een correcte TH-siginaaltransductie. Zo komt TR α ook in de Purkinje cellaag voor nadat het kuiken uit zijn gekomen is, maar ook in de granulaire cellaag van het cerebellum treedt deze expressie sterk op de voorgrond (zie figuur 5: P4 en P21). In de vroegere ontwikkelingsstadia is de expressie van TR α prominent aanwezig in het cerebellum (zie figuur 5: E9, E15 en E19). Tot slot werd in de optische lobben TR α -expressie teruggevonden (zie figuur 5: E15).



Figuur 5 Expressiepatronen van TR α en TR β in sagittale doorsnedes van kippenhersenen verkregen via in situ hybridisatie: Uitleg zie tekst. E: embryonaal, P: posthatch, CBL: cerebellum, MS: mesencephalon, OL: optische lobben, eg: externe granulaire laag, wm: witte massa.

Algemeen wordt dus een continue TR α -expressie waargenomen en is er gedurende latere ontwikkelingsstadia een verhoging in TR β -mRNA te vinden in de kippenhersenen. Deze bevindingen wijzen erop dat beide receptoren noodzakelijk zijn aangezien ze op verschillende plaatsen en tijden tot expressie kunnen komen. Beide receptoren binden het receptor-actieve T₃ met een gelijke affiniteit. Er is echter een verschil tussen beide wanneer het neerkomt op transactiverende functies omwille van verschillen in aminozuurvolgorde van de receptoren. Daardoor vindt een verhoogde expressie van bepaalde TH-responsieve genen slechts plaatselijk plaats, afhankelijk van de tussenkomende TR⁴⁰.

Bij een uitgekipt kuiken zijn zowel TR α 's als TR β 's aanwezig ter hoogte van de hypothalamus. Dit duidt op hun belangrijke rol als transcriptiefactoren betrokken bij de terugkoppelingsregulatie van TH op de TH-productie, dat onder meer door de hypothalamus wordt gecontroleerd⁴⁰.

Aangezien kippen nestvlinders zijn, staat hun ontwikkeling bij het uitkomen uit het ei reeds verder dan bij zebravinken, welke nestblijvers zijn. Zebravinken die uitkippen, bevinden zich in een zeer embryo-achtig stadium. Hierdoor zijn late embryonale fasen in de ontwikkeling van de kip te vergelijken met de vroege *posthatch*-fasen bij de zebravink⁴³.

Tot slot blijkt de structuur en functie van de TR's sterk geconserveerd gebleven te zijn doorheen de evolutie van de vertebraten. Zelfs in de trematode *Schistosoma* werd een TR-gen teruggevonden. Hieruit valt te concluderen dat de oorsprong van dit gen terug te brengen is tot vroeg in de dierlijke evolutie⁵.

1.4.3 Acties

Algemeen, zoals reeds aangehaald, zijn TH's noodzakelijk voor bepaalde cruciale processen gedurende de ontwikkeling, maar ook gedurende het verdere leven mediëren TH's allerlei processen in het lichaam van het organisme^{1,20,22,34}. Bij adulten zijn TH's noodzakelijk voor het behoud van een vitaal en normaal functionerend organisme. De biologische activiteit van de TH's is niet enkel afhankelijk van het niveau aan vooral T₃ in het bloed, maar eveneens de activiteit van de jodasen en de TH-concentraties in de weefsels zelf, reguleren deze activiteit²⁵. Op verschillende niveaus kan er dus regulatie plaatsvinden met betrekking tot de functies die schildklierhormonen uitvoeren. Zoals bijvoorbeeld de selectieve actie van TR's die beïnvloed worden door de lokale ligand beschikbaarheid, de TH-transporters, de expressie en distributie van TR's-isovormen, de nucleaire receptor repressoren en coactivatoren en de sequentie van de TRE^{1,3}.

TH's verzorgen verschillende biologische acties. Zo verzorgen TH's een thermogene actie, waarbij een verhoging van de lichaamstemperatuur tot uiting komt, vooral gedurende koudestress. TH's hebben hierbij een coöperatieve rol met andere hormonen. Deze thermogene acties vinden slechts in enkele weefsels plaats, waar de graad waarop glucose wordt geoxideerd, wordt opgedreven. Zo vindt er een stijging van het BMR plaats door de vrijgekomen metabolische warmte. Eveneens is er een bifasisch effect waarneembaar. Hiermee wordt gerefereerd naar de contrasterende effecten die TH's kunnen veroorzaken op het carbohydraat-, lipide- en proteïnemetabolisme. Normale TH-concentraties zorgen voor de aanmaak van een lipidenstock, spierweefsel en proteïnen. Verhoogde TH-concentraties spreken op hun beurt katabole processen aan, waardoor er verlies aan spierweefsel, glucosestock is. Ook de lipolyse wordt geïnitieerd^{1,3,4,33}.

Naast metabole acties reguleren TH's ook enkele aspecten van de reproductie, onder andere gonadale ontwikkeling en seksuele maturatie. Er is een samenwerking nodig met verschillende andere hormonen zoals bijvoorbeeld gonadotrope hormonen¹.

Tot slot spelen TH's een ontzettend belangrijke rol in groei en differentiatie van organismen. Dit komt ook naar voor gedurende de metamorfose van amfibieën^{1,3,42,44}. TH's hebben eveneens een belangrijke coöperatieve rol in beendergroei, dat door groeihormoon wordt gestimuleerd^{1,4}. Naast

groei van organen en ledematen zijn TH's noodzakelijk voor de ontwikkeling van het zenuwstelsel, onder meer door processen zoals synapsvorming en myelinisatie enzoverder te mediëren^{1,17,34,45}.

Specifiek bij avifauna komt TH ook tussen bij de vervanging van het verenkleed. Ook bij migratoire vogels spelen TH's een rol. Gedurende het migratieproces beïnvloeden TH's bepaalde metabolische processen¹.

1.5 Non-genomische effecten

Niet alleen genomische acties worden door TH's geïnduceerd, maar ook non-genomische effecten kunnen tot stand komen. Bij deze non-genomische acties vindt genregulatie niet plaats ter hoogte van de nucleaire TR's. Deze acties komen wel tot stand doordat TH's aan membraan- of cytoplasmatische receptoren binden^{3,46}. Het plasmamembraan integreert $\alpha\beta 3$ bevat een joodthyronine bindingsplaats. De proteïnen waarop TH's rechtstreeks in het cytoplasma binden zijn waarschijnlijk nucleaire receptoren die zich in het cytoplasma bevinden, waarna mogelijks onder andere processen zoals celdeling en angiogenese gestart worden. Het verbruik van energie in de vorm van ATP, waarbij de mitochondriën de voornaamste bron zijn, wordt ook door TH's gereguleerd³⁶. Er is echter nog meer onderzoek nodig naar deze non-genomische acties van schildklierhormonen.

1.6 TH's bij de schildklier- en hersenontwikkeling van avifauna

Het is duidelijk dat TH noodzakelijk is voor een correcte ontwikkeling. Het feit dat maternale hypothyroïdie negatieve effecten bij het embryo kan teweegbrengen, zoals een mentale en fysieke achterstand, duidt op het belang van TH tijdens de ontwikkeling en op de aanwezigheid van TH in het bevruchte ei voordat de schildklier van het embryo zich heeft ontwikkeld en functioneel is. Er wordt dus maternale TH in het eigeel afgezet^{1,17,18,22,47}. Niet alleen maternale hypothyroïdie kan problemen veroorzaken met de hersenontwikkeling, maar ook maternale hyperthyroïdie kan zorgen voor een verstoring van de hersenontwikkeling¹⁸. Ook bij avifauna verzorgen T_3 en T_4 verschillende processen in de ontwikkeling van de hersenen, zoals neurale celproliferatie, -differentiatie, -migratie en -myelinisatie^{17,22,34}. Of de TH's effectief functioneel zijn gedurende de ontwikkeling in een bepaald weefsel, hangt af van de aanwezigheid van weefsel-specifieke TR's⁵. Het toedienen van T_3 gedurende de eerste dagen van de embryonale ontwikkeling van de kip veroorzaakte een verhoogde TR-expressie. Reeds vanaf E4 leidde TH-injectie tot een verhoging in TR α -, TR $\beta 0$ - en TR $\beta 2$ -expressie in verschillende hersenregio's. Er moeten dus reeds vroeg in de ontwikkeling TH-receptoren aanwezig zijn in de hersenen opdat deze expressiepatronen tot stand komen^{17,18}. Deze receptoren werden reeds besproken voor de kip (zie 1.4.2.2). Ook de TH-transporters, zoals MCT8, spelen in de hersenontwikkeling van avifauna een cruciale rol. In figuur 4 kwam reeds het belang van de transporters en astrocyten naar voor. In de astrocyten vindt omzetting van T_4 naar zijn receptor-actieve vorm door D2 plaats^{1,17,18}. Dit is noodzakelijk aangezien de schildklier, wanneer deze functioneel is, bij avifauna bijna exclusief T_4 vrijzet. Ook is T_4 de meest voorkomende TH-vorm in het eigeel^{18,48}. Het onderzoek van Verhoelst *et al.* (2005) bracht nog bijkomende fenomenen aan het licht. Uit hun

onderzoek, wat werd uitgevoerd op de kip, blijkt dat er vanaf E18 in de choroïd plexus (CP) D2-proteïnen aanwezig zijn. Tot E10 wordt D2 niet teruggevonden in de CP, maar D3 daarentegen wel. Er treedt dus een shift op van TH-inactivatie naar TH-activatie gedurende de latere hersenontwikkeling van de kip ter hoogte van de CP. De epitheelcellen in de CP, welke het bindingsproteïne transthyretine (TTR) bevatten, binden grotere hoeveelheden T_3 in vergelijking met T_4 , waardoor D2 aanwezig moet zijn opdat T_4 kan worden geconverteerd naar T_3 en bijgevolg op TTR kan binden. Nadien wordt T_3 in het cerebrospinaalvocht losgelaten^{22,32}. Zo wordt duidelijk dat niet alleen de astrocyten belangrijke cellen in de hersenen zijn die instaan voor omzetting van T_4 naar T_3 . Ook de epitheliale cellen van de CP, dragen hier mee toe bij en zorgen er zo voor dat de T_3 tot bij de neuronen raakt^{17,18,32}.

Algemeen kan de conclusie getrokken worden dat TH's een cruciale rol spelen in de hersenontwikkeling, onder meer door controle uit te oefenen op TH-regulerende- en TH-responsieve genen via binding van T_3 op zijn nucleaire receptoren. De dejodasen en TH-transporters reguleren vervolgens lokaal de TH-beschikbaarheid in specifieke weefsels. Dit werd aangetoond in een onderzoek van Van Herck *et al.* (2012). Hieruit blijkt dat TH-transporters vanaf E4 aanwezig zijn in de kippenhersen, dit reeds voorafgaand aan de endogene TH-secretie. OATP1C1-expressie is op E4 hoog in het telencephalon en het diencephalon. Na deze periode keldert de expressie. MCT8 kent een stijging in expressie tot E10. Deze bevindingen suggereren dat OATP1C1 vroeg in de embryonale ontwikkeling van de hersenen nodig is voor de opname van T_4 , wat tevens de TH-vorm is die het meest door de moeder in het eigeel werd afgezet. De grote beschikbaarheid van T_4 in de vroege ontwikkeling verklaart de vroege expressie van deze T_4 -specifieke OATP1C1-transporter. Nu blijkt echter dat voor beide transporters geen expressie terug te vinden is ter hoogte van de nog ontwikkelende BBB van de kippenhersen. Dit is in tegenstelling met de ontwikkelende zoogdierhersen zoals uitgelegd in 1.2.2. Het suggereert dat het TH-transport overheen de BBB van de embryonale kippenhersen ofwel laag is, ofwel gemedieerd wordt door andere transporters. Expressie van zowel MCT8 als OATP1C1 is wel terug te vinden in de choroïd plexus bij de kip. Dit ligt wel in lijn met de ontwikkeling van de hersenen bij zoogdieren^{17,18,22}. Ook expressie van de drie dejodasen werd teruggevonden¹⁸. Wat de dejodasen betreft,- is D3-activiteit vroeg aanwezig in de ontwikkeling. Dit zorgt voor bescherming van het zich ontwikkelende organisme wanneer de concentratie aan TH te hoog wordt, aangezien D3 het actieve T_3 inactieveert. De aanwezigheid van D2 stijgt geleidelijk doorheen de ontwikkeling^{10,17}.

De timing van ontwikkeling van de schildklier en de hersenen verschillen van soort tot soort. De embryonale ontwikkelingsfase van de kip duurt zo'n 21 dagen. Kippen zijn nestvliedende organismen. Dit wil zeggen dat ze na hun geboorte sterk onafhankelijk zijn van hun ouders. Deze onafhankelijkheid wordt mede door een reeds sterk ontwikkelde schildklier mogelijk gemaakt. Reeds in het mid-embryonale ontwikkelingsstadium (E9-10) is de schildklier functioneel^{1,17,18}. Het T_4 -niveau kent zijn maximale waarde op E20. Pas vanaf E19 stijgt ook T_3 plotseling, gepaard gaande met een piek in D1-aanwezigheid en een daling in D3. Dit aangezien het kuiken start met het doorprikken van de luchtkamer in het ei, wat de geboorte initieert. Deze verandering in schildklieractiviteit wordt vooral bij deze nestvliedende organismen waargenomen¹. Ook het stadium waarin de hersenen zich bij de

geboorte bevinden, is al ver gevorderd. Dit in tegenstelling tot nestblijvende organismen zoals de zebravink, welke nog sterk afhankelijk zijn van de ouders nadat ze zijn uitgeklipt^{1,17,18,43}. Op basis hiervan wordt verondersteld dat bij zebravinken een meer graduele verandering in de jodase-activiteit optreedt, naargelang de individuen meer onafhankelijk worden van hun ouders. De schildklier van deze nestblijvende organismen wordt pas actief naartoe het einde van de embryonale ontwikkeling. Wanneer ze uitkippen, bevinden de hersenen zich nog in een meer immature stadium in vergelijking met de kippenkuikens^{1,17}.

2. Het zangcontrolesysteem van de zebravink

2.1 Inleiding

Vocale communicatie tussen conspecificen is een fenomeen dat slechts bij een paar soorten tot uiting komt. Naast het typische voorbeeld van de mens als vocale communicator, behoren ook zangvogels tot deze beperkte groep. Zangvogels communiceren met elkaar via hun liederen, welke aangeleerd dienen te worden. Dit valt in lijn met spraak bij de mens, want ook de mens leert spreken. Een proces waar zo vroeg mogelijk mee wordt gestart na het uitkippen. Zo leren zangvogels ook zingen^{49,50}. Zangvogels, zoals de zebravink, zijn hierdoor uitmuntende modelorganismen voor onderzoek naar de ontwikkeling van vocale leerprocessen⁵¹. De auditieve fase die vocale communicatie voorafgaat, blijkt een cruciale fase te zijn in het ontwikkelingsproces^{49,50}.

Door het inzetten van zangvogels in het onderzoek naar de ontwikkeling van bepaalde leerprocessen, zijn bepaalde hersenregionen ontdekt die specifiek noodzakelijk zijn opdat de vogel zijn eigen 'persoonlijke' lied kan produceren. Bijgevolg wordt er getracht meer inzicht te verwerven in de neurale mechanismen die onderliggend zijn bij deze leerprocessen⁴⁹. Deze inzichten kunnen bijdragen in het onderzoek naar onderliggende mechanismen bij spraak- en leerproblemen bij de mens, alsook naar mogelijk behandelingen hiervoor⁵¹.

2.2 De zebravink als modelorganisme

De zebravink (*Taeniopygia guttata*), een zangvogel inheems in de Australische woestijnen en semi-aride gebieden, won de voorbije jaren populariteit als modelorganisme, omdat ze gemakkelijk te kweken zijn in gevangenschap en eveneens omdat hun vocaal circuit reeds in kaart werd gebracht door verschillende onderzoeken⁵¹⁻⁵⁶. Net zoals de mens zijn zebravinken vocale communicatoren. Ze zijn hierdoor uitmuntende modelorganismen voor onderzoek naar de ontwikkeling van bepaalde vocale



Figuur 6: De zebravink (uit Bear et al. 2007).

leerprocessen en de betrokken onderliggende neurale mechanismen. Kennis die wordt opgedaan uit deze experimenten kan men nadien gaan implementeren in het onderzoek naar leer- en spraakproblemen bij de mens^{49-51,55,57}. De reden waarom voor zangvogels wordt geopteerd in dit soort onderzoeken is de volgende: andere niet-zangvogelsoorten, zoals bijvoorbeeld de kip, brengen

wanneer ze worden opgegroeid in isolatie zonder adulten later toch correcte adulte vocalisaties tot uiting. Zangvogels opgegroeid in auditieve isolatie klinken daarentegen niet als een normale adult, aangezien het leerproces niet correct verlopen is⁵⁵.

2.3 Het leerproces – Tijdschaal van de verschillende leerfasen

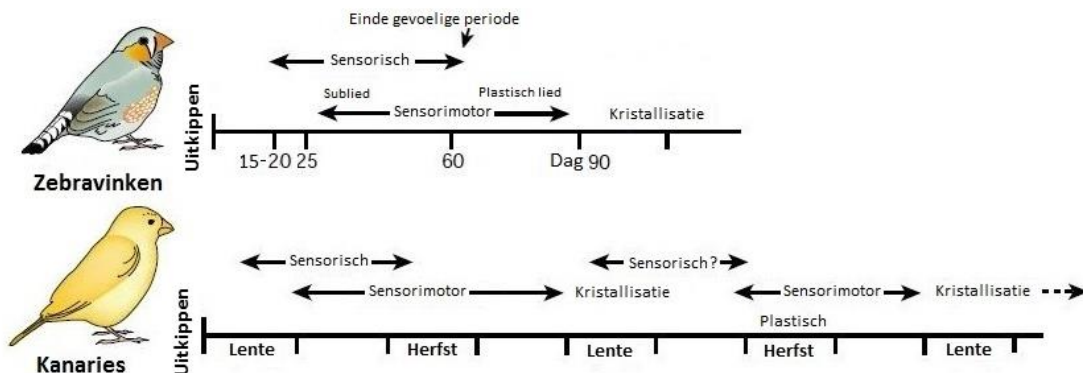
Onderzoek naar vocaal leren heeft aangetoond dat de hersenen van vogels na het uitkippen nog een verdere ontwikkeling kennen, net zoals kinderhersenen nog verder ontwikkelen^{17,18,50}. Deze verdere ontwikkeling in de hersenen kan blijven doorgaan doordat de hersenen plastisch zijn. Bij de zebra-vink uit dit zich vooral onder de vorm van verfijning in het vocale circuit, waardoor stap voor stap zijn eigen lied gemodificeerd wordt. Deze verfijning is afhankelijk van hormonen, de vocale ervaring van de vogel en van seizoenale fenomenen. Deze seizoenale fenomenen zijn niet van toepassing bij de zebra-vink (zie verder). Het aanleren van een eigen lied geldt echter enkel voor mannetjes, aangezien enkel mannelijke vogels zang produceren^{49,50}. Bij dit fenomeen ligt seksuele selectie ten grondslag, aangezien liedproductie bij zangvogels een belangrijke rol speelt bij de partnerkeuze^{58,59}. De partnerkeuze gemaakt door het vrouwtje is een selectiekracht die bepaalde mannelijke kenmerken evolutief aandrijft, zoals de zang⁶⁰. Mannetjes zingen dus om vrouwtjes aan te trekken. Hoe complexer het lied en hoe hoger de amplitude van het lied, hoe meer vrouwtjes aangetrokken worden^{59,61,62}. Een vrouwtje relateert het lied aan de gezondheid en 'kwaliteit' van het mannetje. Paren met een mannetje met een sterk ontwikkeld lied zorgt ervoor dat goede genen worden doorgegeven aan haar nakomelingen⁶¹. Een mannetje waarbij de hersenontwikkeling suboptimaal verlopen is, produceert een minder complex lied en heeft bijgevolg minder succes bij de vrouwtjes⁶¹. De capaciteit om te zingen is bijgevolg een seksueel dimorfisme bij zangvogels, net zoals de zangnuclei^{49,50}.

De capaciteit van zangvogels om een lied te leren is beperkt in tijd en kan enkel gedurende de 'gevoelige' leerperiode van de ontwikkeling plaatsvinden. Tijdens deze periode kan de vogel vocale activiteiten leren, zoals het zingen van zijn eigen lied. Hiernaast treedt verfijning van het zang-controlesysteem via neuroanatomische veranderingen op, gedurende de plastische periode^{49,50,63-65}.

Gehoor is een cruciaal aspect in het zangleerproces. Wanneer de zebra-vink in het begin van de ontwikkeling wordt ontdaan van zijn auditief vermogen of wordt opgegroeid in akoestische isolatie, ontwikkelt er zich nadien een afwijkend en geïsoleerd lied. Het vocaal leren is met andere woorden 'hoor-afhankelijk'. De vogels moeten niet alleen hun leermeester of tutor horen, maar ook zichzelf opdat ze hun lied kunnen bijschreeven. Het leerproces kan onderverdeeld worden in drie fasen: de sensorische fase, de sensorimotor fase en de kristallisatie (zie figuur 7)^{49-51,55}.

Gedurende de sensorische fase, welke start bij de zebra-vink vanaf de 15^{de}-20^{ste} dag na het uitkippen, worden geluiden van een leermeester opgevangen en onthouden door de vogel. De jonge vogel vormt gedurende deze tijd een eigen interpretatie van de waargenomen geluiden. Deze eigen interpretatie vormt het model waar de vogel zich later op gaat baseren. Deze fase eindigt rond 60 dagen na uitkippen (dph: *days posthatch*). Dit is echter niet een eenduidig eindpunt, maar afhankelijk van de hoeveelheid ervaring opgedaan door het organisme^{49,50,55,66}. De hersenen blijven plastisch

naargelang het organisme ervaring verwerft. Wanneer het organisme ervaring mist, door bijvoorbeeld de afwezigheid van een leermeester, kunnen de hersenen nog door nieuwe sensorische informatie gevormd worden, tot zelfs na deze 60 dagen. Deze plasticiteit blijft echter niet duren. Daarenboven heeft onderzoek aangewezen dat bepaalde hormonen de gevoeligheid gedurende de sensorische periode kunnen verhogen. Zo verlengt een verlaagd testosteronniveau deze periode^{49,50,55}.



Figuur 7: Tijdschema van de verschillende fasen in het zangleerproces – Gedurende de sensorische fase legt de vogel herinneringen en modellen aan van de zang van zijn leermeester. In de sensorimotor fase tracht de vogel vervolgens zijn eigen lied af te stemmen op deze modellen. De initiële vocalisaties, wat het sublied is, worden gradueel vervangen door een plastisch lied dat meer en meer gelijkenissen met het lied van de leermeester vertoont. Wanneer het plastische lied uitkristalliseert, is de vogel seksueel volwassen en staat het lied vast. Gesloten-einde leerlingen zoals zebravinken hebben een sterk overlap van beide leerfasen. Hun leerproces is niet afhankelijk van de seizoenen en eindigt rond 90-120 dagen. Bij kanaries is het leerproces wel seizoenafhankelijk. Ze kunnen afhankelijk van het seizoen hun leerproces heropstarten of voortzetten. Daarom worden zangvogels zoals kanaries open-einde leerlingen genoemd (aangepast uit Brainard & Doupe 2002).

Gelijktijdig, rond 25 dph, start bij de zebravinken de sensorimotor fase. De twee fasen van het sensorisch leren overlappen dus sterk bij de zebravink. Gedurende de sensorimotor fase worden de stembanden in gebruik gesteld en produceert de vogel zang. De initiële vocalisaties van de vogel wordt het sublied genoemd. Dit sublied vertoont slechts weinig gelijkenissen met adulte liederen. Vervolgens kan een vergelijking worden gemaakt van het eigen lied van de vogel (BOS: *bird's own song*) met het lied van zijn leermeester. Het is een soort imitatieproces. De vogel beslist tijdens deze fase ook welke geluidsvarianties en noten het in zijn lied wil implementeren. Aan de hand van auditieve terugkoppeling tracht de vogel zijn eigen gezang bij te sturen. Tegen het einde van deze fase, welke eindigt rond 90 dph, wordt uit het sublied geleidelijk het plastische lied gevormd. Wanneer de vogel zingt, verschilt het plastische lied elke keer opnieuw, omdat gradueel nieuwe elementen en interpretaties van het lied van de leermeester geïncorporeerd worden. Tot deze periode waren de specifieke hersengebieden die bij deze processen betrokken waren plastisch. In het plastische lied blijft verfijning plaatsvinden tot het lied 'uitkristalliseert' dit gebeurt rond 90-120 dph. Vanaf dan bereikt de zebravink ook zijn seksuele maturatie en worden ze als adult bestempeld^{49,50,55}.

Vanaf de kristallisatieperiode zijn de neurale pathways die betrokken zijn bij het vocaal leren niet meer plastisch. Ze kristalliseren met andere woorden uit. Bijgevolg wordt op deze manier de zang van de vogels vastgezet en is er aan het lied van de vogel praktisch niets meer te veranderen. Dit is echter afhankelijk van de soort^{49,50}.

Bij seizoenale zangvogels, zoals kanaries, kunnen deze verschillende fasen elkaar afwisselen gedurende de verschillende seizoenen. Daarom worden kanaries open-einde leerlingen genoemd. Ze

incorporeren afhankelijk van het seizoen nieuwe elementen in hun lied. De zebra-vink staat hier tegenover. Zijn zangleerproces volgt het patroon zoals hier boven staat beschreven. Dit type vogels worden gesloten-einde of leeftijd-gelimiterde leerlingen genoemd^{49,50}. Er is dus duidelijk verschil tussen zebra-vinken en kanaries qua zang- en leerprocessen. Daardoor hebben ze ook verschillende mechanismen van neurale controle⁵³.

Het leerproces bij zangvogels voor vocale communicatie is veel korter in vergelijking met de mens. Bij de vogels overspant dit een tijdsperiode van enkele weken tot maanden waarbij seizoenale veranderingen, afhankelijk van de vogelsoort, en de invloed van hormonen ook in rekening moeten worden gebracht^{51,53,63}. Bij de mens is dit een proces dat verschillende jaren duurt⁵¹. Het sublied van de zebra-vink is dan weer te vergelijken met het gebrabbel van een peuter. Ook bij de mens zijn spraakproblemen terug te vinden bij mensen die doof zijn, net als bij de zangvogels. Auditieve terugkoppeling is duidelijk ook bij de mens belangrijk. Een peuter moet zichzelf kunnen horen om een goede spraakbeheersing te ontwikkelen^{55,57}. Het belang van auditieve terugkoppeling is ook terug te vinden bij het graduele verlies aan de capaciteit tot spreken van mensen die gedurende latere periode in hun adulte leven doof zijn geworden⁴⁹.

2.4 Zangkernen en -banen in de hersenen

2.4.1 Specifieke neuronen

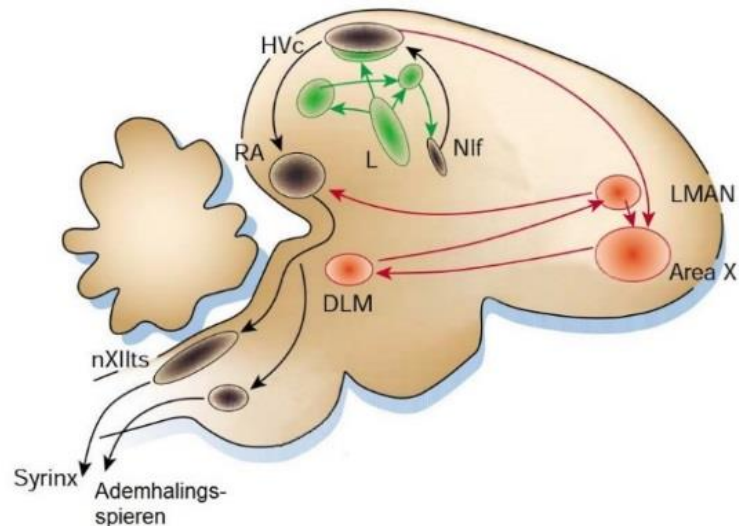
Bij mannelijke zangvogels zijn er '*song-selective*' neuronen terug te vinden. Dit zijn neuronen die specifiek reageren op BOS en gevormd zijn door de auditieve ervaring van de vogel gedurende de sensorimotor fase van het leerproces. In bepaalde gevallen worden deze neuronen ook geprikkeld bij het horen van het lied van de leermeester. Hiernaast zijn er ook '*tutor-selective*' neuronen. Wanneer de vogel zijn lied gaat oefenen, gedurende de sensorimotor fase, gaan *tutor-selective* neuronen geprikkeld worden als de vogel varianten van een liedonderdeel zingt die sterk gelijken op het lied van de leermeester. Wanneer er meer van deze neuronen geactiveerd worden, wordt het succes op een goede imitatie van het lied van de leermeester verhoogd. Toch blijft één van de belangrijkste aspecten van het sensorisch leren de terugkoppeling van het BOS naar andere hersendelen om zo uiteindelijk het gewenste lied te verkrijgen⁴⁹.

2.4.2 Zangkernen en -banen

Bij zangvogels zijn een heel aantal specifieke hersenkernen in het telencephalon noodzakelijk voor het leren van zang en het produceren van een lied. Ook al is dit 'zangcontrolesysteem' sterk onderzocht, toch mist er een eenduidige tijdstafel van de hele ontwikkeling van deze specifieke kernen en hersenregionen. De zangkernen staan met elkaar in verbinding. Deze verbindingen worden de zogenaamde 'zangbanen' genoemd (zie figuur 8)⁵⁰.

Field L is een belangrijke hersenregio in het zangleerproces bij avifauna. Dit gebied omvat de auditieve regio in de primaire voorhersenen. Van hieruit worden neuronen naar hoger gelegen auditieve hersenregionen gestuurd, wat het caudomediale neostriatum (NCM) wordt genoemd. De

audatieve signalen komen het feitelijke zangcontrolesysteem binnen via de caudale nucleus van het ventrale hyperstriatum of het *high vocal centre*-zangkern (HVC) en de nucleus interfascialis (Nif). Mede doordat de terugkoppeling van het BOS belangrijk is in het zangleersysteem, zijn de neuronen gelegen in deze audatieve baan veelal ‘*song-selective*’-neuronen alsook neuronen die eerder reageren op het lied van conspecifieken, dan op het lied van organismen van een andere soort⁴⁹.



Figuur 8: Zangkernen en -banen – Groen: Gehoor is een cruciaal aspect in het zangleerproces. Hier speelt de audatieve baan een belangrijke rol. Vanuit Field L wordt audatieve informatie naar andere hersenkernen gestuurd, zoals het HVC en Nif. Zwart: Wanneer de vogel zang gaat produceren worden hersenkernen aangesproken die instaan voor de controle van het vocale orgaan (syrinx) en de ademhalingspijpen. Dit wordt via de zangmotorbaan gecontroleerd. Het HVC stuurt zijn axonen richting RA. De neuronen van het RA innervieren op hun beurt de syrinx en ademhalingspijpen. Rood: De Anterior Forebrain Pathway (AFP) zorgt voor terugkoppeling tussen de verschillende banen. Via het AFP vergelijkt de vogel zijn eigen lied met dat van zijn leermeester. Het HVC projecteert naar Area X. Van hier uit worden axonen naar DLM gezonden en verder naar LMAN. Ook de LMAN innerveert Area X en RA van de zangmotorbaan (aangepast uit Brainard & Doupe 2012).

Bij zangproductie moet er een gecontroleerde samenwerking zijn van bepaalde spieren, waar de zangmotorbaan voor instaat^{49,50,63}. Deze baan zorgt voor controle op de gecoördineerde bewegingen van de ademhalingspijpen en het vocale orgaan, de syrinx, welke tussen komen bij de productie van zang. Twee belangrijke corticale zangnuclei bevinden zich op deze baan: het HVC en de robuuste nucleus van het arcopallium (RA). Het merendeel van de neuronen van het HVC projecteren naar het RA. Op zijn beurt stuurt het RA zijn neuronen naar de hersenstam waar het respiratorische motorneuronen bezenuwt, als ook motorneuronen die de syrinx innervieren. Dit zorgt op zijn beurt voor een gereguleerde coördinatie van bewegingen die betrokken zijn bij het produceren van zang^{49,50,63-65}.

Naast de audatieve baan en de zangmotorbaan is er nog de baan die zorgt voor terugkoppeling waardoor de vogel onder meer zijn eigen zang tijdens de sensorimotor fase kan vergelijken met deze van zijn leraar. Deze *anterior forebrain pathway* (AFP) bevat enkele belangrijke zangkernen, zoals het HVC, de RA, de laterale magnocellulaire nucleus van het anterieure neostriatum (LMAN), Area X en de mediale nucleus van de dorsolaterale thalamus (DLM), die betrokken zijn in het terugkoppelingsproces. De belangrijkste functie van het AFP is om de audatieve input van het BOS te vergelijken met wat het organisme verlangt hoe het lied gaat klinken. Vervolgens gaat het AFP zijn

instructies met oog op de vergelijking van in- en output van het lied doorsturen naar de plastische zangmotorbaan, waarop verfijning kan plaatsvinden. Zowel input vanuit de zangmotorbaan als de auditieve baan, waarbij vooral het Hvc betrokken is, komt de AFP binnen. De neuronen van het Hvc projecteren naar Area X, van waaruit een volgende signaal vertrekt richting DLM. Het Hvc projecteert dus niet enkel naar het RA, zoals dit in de zangmotorbaan het geval is^{49,50}. Het Hvc is tenslotte het hoogste centrum waar integratie van auditieve en motor informatie plaatsvindt⁶⁴. Het signaal wordt hierna doorgezonden naar de LMAN. Vanuit de LMAN worden op zijn beurt de signalen verschillende richtingen uitgestuurd. Deze kern projecteert zijn neuronen enerzijds naar het RA van de zangmotorbaan en anderzijds naar Area X^{49,50}. Het AFP blijkt vooral belangrijk gedurende de initiële stadia van het vocaal motor leren en is noodzakelijk voor adulte neuroplasticiteit, terwijl de projecties van het Hvc naar het RA nodig zijn voor de latere stadia van de vocale motor ontwikkeling en ook voor de productie van het adulte lied⁵⁰.

Zowel de zangvogel als de mens maken gebruik van gespecialiseerde regio's in de hersenen voor vocaal leren en zang of spraak. Het centrum van Broca is een corticaal gebied op de frontale lob van het cerebrum dat instaat voor spraakproductie bij de mens^{53,57}. Analoog staat hier bij de zebra-vink de zangmotorbaan voor in^{49,50}. Het Hvc van de zangvogel is functioneel gelijk aan het centrum van Broca bij de mens⁵⁷. Het centrum van Broca staat zowel direct als indirect in verbinding met het centrum van Wernicke, gelegen op de temporale lob dicht tegen de auditieve cortex⁶⁷. Dit centrum verzorgt de sensorische perceptie en interpretaties van spraak. Wanneer hier beschadiging optreedt, veroorzaakt dit problemen met het vermogen om gesproken taal te interpreteren^{53,57,67}. De Area X bij zangvogels is dan weer homoloog aan de basale ganglia bij zoogdieren⁴⁹. De basale ganglia, gelegen in het telencephalon, zijn een schakelstuk in de motorloop bij de mens en ontvangen input van de prefrontale cortex en sturen deze informatie door naar de motorcortex⁵³. Er zijn dus duidelijke parallellen terug te vinden tussen de corticale gebieden bij de mens en de zangkernen van de zangvogel⁵⁷.

Bij zowel zebra-vink als de mens speelt de sociale context en ervaring ook een modulerende rol en zowel exo- als endogene prikkels zorgen ervoor dat het zenuwstelsel als het ware wordt gevormd^{50,63}. Daarnaast is het bij de mens moeilijk om nog na de adolescentie een nieuwe taal te leren en te klinken als een '*native speaker*'. De 'gevoelige' periode hiervoor is dus duidelijk heel bepalend in de vorming van de neurale wegen, wat ook het geval is bij de zebra-vink⁴⁹.

2.5 Neuroplasticiteit & neurogenese tijdens het zangleerproces

Neurale plasticiteit kan zowel morfologisch als functioneel zijn. Functionele plasticiteit houdt het modificeren van de sterkte van de neurale connecties in, terwijl morfologische plasticiteit de rekrutering van nieuwe synapsen en neuronen betreft⁶⁸. Morfologische plasticiteit, of neurogenese, is het fenomeen waarbij nieuwe zenuwcellen gegenereerd worden uit progenitorcellen. Op deze manier worden de zich ontwikkelende hersenen aangevuld met nieuwe neuronen. Zoals reeds aangehaald kunnen tijdens de zangleerperiode neuroanatomische veranderingen optreden. Hierbij worden niet alleen nieuwe linken gelegd, maar ook worden nieuwe zang gerelateerde neuronen geïmplementeerd.

Op deze manier draagt neurogenese bij om de verschillende neuronale zangcircuits op punt te stellen. Door specifieke celtoevoeging wordt de zangmotorbaan 'heraangelegd', waarbij ook synaptogenese plaatsvindt^{63,64}. Naast neurogenese is dus ook de neuroplasticiteit van de hersenen belangrijk. Neuroplasticiteit is een belangrijk kenmerk van het zenuwstelsel dat organismen toelaat zich aan te passen aan nieuwe omstandigheden. Hierdoor kunnen ook nieuwe en functioneel relevante elementen geïncorporeerd worden bij reeds aanwezige structuren, welke noodzakelijk zijn voor een optimale ontwikkeling van het organisme⁶⁸⁻⁷⁰. Zo zal gedurende het zangleerproces groei en hermodellering plaatsvinden van de specifieke zangkernen door onder andere apoptose, het rekruteren van nieuwe neuronen en synaptische hermodellering⁵⁰.

Marler (1988) meldt dat de graad van nieuwe neurotoevoegingen groter is gedurende de gevoelige periode van de zangvogel in vergelijking met zijn adulte levensfase. Gedurende het leren van de zang gaan het HVC en Area X nieuwe neuronen incorporeren^{63,71}. Nieuwe neurotoevoeging is in vergelijking met de twee vorige zangkernen, slechts klein in het RA⁶⁴. Toch neemt het RA sterk toe in grootte, net als het HVC. Bij het HVC wordt deze toename gezien als gevolg van de nieuwe neuronen die ontstaan. Bij het RA is dit echter niet het geval. De vergroting van het RA heeft te maken met een stijging in neurongrootte en 'spacing'. De grootteafname van LMAN door apoptose staan hier tegenover. Deze afname zorgt weliswaar voor verfijning van het lied van de zangvogel⁵⁰. Nordeen en Nordeen (1988) onderzochten de neurogenese bij zebra-vinken in het HVC en vonden dat meer dan de helft van de nieuwe neuronen hun axonen uitzenden naar het RA. Ze suggereren zo dat deze nieuwe neuronen bij jonge mannelijke zangvogels een belangrijke bijdrage leveren aan de zangmotorbaan^{64,65}. Ze concludeerden dat gedurende het zangleerproces, en vooral de sensorimotor fase, nog een groot deel van de zangmotorbaan aan het ontwikkelen is en nog tot stand moet komen. Het produceren van zang wordt bijgevolg mogelijk gemaakt door deze nieuwe neuronen en nieuwe synapsen die ontstaan waardoor reeds bestaande connecties en circuits gemodificeerd worden^{50,63,64}. De hersenen en de specifieke zangbanen en -kernen zijn dus zeer plastisch. Op deze manier worden de specifieke hersenregio's die betrokken zijn bij het zangleerproces gevormd opdat de zangvogel uiteindelijk zijn adulte lied kan produceren. Toch vonden ze dat ook bij volwassenen neurogenese voorkomt. Gedurende het adulte leven van zangvogels worden ook neuronen aan het HVC toegevoegd, alhoewel het adulte lied na kristallisatie niet echt meer kan worden veranderd. Enkel verfijning vindt nog plaats. In hun onderzoek konden ze aantonen dat de nieuwe neuronen die bij volwassenen in het HVC ontstonden verschillend waren van deze bij juvenielen. De neuronen toegevoegd bij volwassenen dragen niet bij in de zangmotorbaan betrokken bij het zangleerproces. Veelal zijn deze nieuwe neuronen, interneuronen. Ze sturen de ontvangen informatie van sensorische zenuwcellen door naar de motorneuronen^{50,65,72}. Bij adulte organismen is de functie van de toevoeging van nieuwe neuronen naast de algemeen aanvaarde functie van schadeherstel toch nog een raadsel⁶⁴.

In tegenstelling tot mannetjes, zingen vrouwelijke zangvogels niet aangezien hun hersenen niet de juiste ontwikkeling doormaken. Zo zijn het RA, de LMAN en het HVC bij vrouwelijke zebra-vinken sterk gereduceerd ten opzichte van de mannelijke conspecificen. Bepaalde hersenregio's verkleinen zelfs

na het uitkippen: zo daalt het aantal neuronen van het HVC sterk vanaf 15 dph. Bijgevolg ontwikkelen de projecties van neuronen van het HVC naar het RA zich niet volledig. Daarnaast bezitten vrouwelijke zebra-vinken geen Area X^{50,61,65,73,74}. Aangezien enkel de mannetjes zingen, is de neurogenesegraad bij de mannetjes veel groter dan bij de vrouwelijke zangvogels. Echter, ook bij de vrouwtjes komt neurogenese voor. Het is zelfs zo dat het proces van neurogenese ontdekt werd bij vrouwelijke kanaries⁶⁴.

Algemeen stelt men dat neurogenese en neurale plasticiteit een zeer universeel fenomeen is. Vroeger werd aangenomen dat neuroplasticiteit enkel gedurende de ontwikkeling belangrijk was en niet meer in het verdere adulte leven. Door het uitvoeren van gedragsstudies werd aangetoond dat organismen waarop het onderzoek werd uitgevoerd steeds nieuwe informatie kunnen opnemen en verwerken. Dit suggereerde reeds dat neurale plasticiteit noodzakelijk is. Door neurale veranderingen in de hersenen wordt een flexibele omgeving gecreëerd en wordt leren mogelijk gemaakt⁶⁸. Zo vindt neurogenese en neuroplasticiteit ook plaats in het adulte menselijke brein. In de adulte humane hersenen ontstaan nieuwe neuronen uit neurale precursoren, welke gelegen zijn langs de ventrikels. Hiernaast vindt neurogenese en neuroplasticiteit ook plaats in de hippocampus, een belangrijke structuur met betrekking tot leren en memoriseren. Deze plasticiteit wordt gerelateerd aan het menselijke geheugen en maakt het levenslang leren mogelijk^{53,64,68,71,75}.

3. Het effect van hormonen op leerprocessen

Yamaguchi *et al.* (2012) toonden aan dat TH's een belangrijke invloed hebben op het imprintingproces. Daarin wordt aangehaald dat T₃ een belangrijke startfactor is voor het 'imprinting'-fenomeen bij vogels, waarbij een sociale band tussen het jong en ouders wordt gecreëerd. Verhinderen van de normale TH-werking, zoals toevoeging van *iopanoic acid* en MCT8-inhibitor, verhindert het imprints, wat een indicatie is voor het belang van TH's gedurende imprinting. Imprinting, vooral gereguleerd via non-genomische mechanismen, is een hersengestuurd proces waarbij de integratie van auditieve en visuele stimuli gedurende de gevoelige periode van het kuiken noodzakelijk is voor het tot stand komen van de sociale band. Net zoals het aanleren van een eigen lied bij zangvogels, worden specifieke hersengebieden aangesproken gedurende het imprints: het intermediaire mediale mesopallium (IMM) en het mediorostrale nidopallium/mesopallium (MNM). Het IMM is cruciaal voor de binnenkomende visuele signalen, terwijl MNM noodzakelijk is om auditieve prikkels te betrekken in het imprintingproces. Het onderzoek van Yamaguchi *et al.* (2012) toonde aan dat tijdens de gevoelige periode sprake is van synaptische plasticiteit, aangezien de synapsen veranderingen ondergaan in het IMM gedurende het imprints⁷⁶.

De T₃-concentratie in de jonge kippenhersenen kent een grote toename rond de periode van uitkippen. Deze toename blijft aanhouden tijdens het verdere imprintingproces. Gedurende het imprintingproces is er dus een sterke influx van TH, door een snelle conversie van T₄ naar T₃ door D2 in de endotheelcellen van de hersencapillairen. Zo worden de neuronenvoorzien van actief T₃. De sterke aanwezigheid van D2-mRNA in de capillairen in het IMM en MNM van de hersenen van één dag oude

kuikens die één uur aan imprinting deden, werd via ISH aangetoond. Rond 4 dph daalt het T₃-niveau opnieuw en eindigt de mogelijkheid tot imprinten⁷⁶. Waarschijnlijk worden door myelinisatie de neuronale connecties zodanig gewijzigd, waardoor het T₃-effect op imprinten verhinderd wordt. Ook de synaptische plasticiteit valt weg. De gevoelige periode waarin imprinting gebeurt, is dus beperkt tot de eerste drie dagen na het uitkippen. Echter, een intraveneuze T₃-toediening kan een afgesloten gevoelige periode heropenen en imprinting opnieuw toelaten, tot zelfs 6 dagen na het uitkippen. Het kan eveneens de gevoelige periode verlengen. Bij 4 dph-kuikens die geen imprinting hebben doorlopen en waar naderhand ook de gevoelige periode reeds gesloten was, kon de exogene T₃-toediening de gevoelige periode openen en werd imprinting toegelaten. Wanneer een bepaalde waarde aan T₃ wordt overschreden, zorgt dit ervoor dat *memory priming* wordt behaald. Hierdoor kan secundair leren plaatsvinden. Hierbij wordt door T₃ het geheugen van de kuikens als het ware klaargestoomd of 'geprimed' om opnieuw het imprintingproces te doorlopen. T₃ is duidelijk een determinerende factor die de initiatie geeft voor imprinting. Brainard & Doupe (2002) halen aan dat het leerproces van imprinting vergelijkbaar is met dat van het sensorische leren van een eigen lied bij zangvogels. Bij beide is er slechts een kortstondige blootstelling aan bruikbare prikkels, enerzijds om een sociale band op te bouwen, anderzijds om een eigen lied te ontwikkelen op basis van dat van de leermeester⁴⁹. Ook bij de mens blijkt TH belangrijk te zijn voor functioneel leergedrag. Wanneer gedurende de hersenontwikkeling een T₃-deficiëntie bij de mens optreedt, ontstaat er als gevolg van mentale stoornissen en neurologische aandoeningen, een verstoring in leergedrag en het geheugen⁷⁶.

Naast TH's werd ook onderzoek gevoerd met het oog op de invloed van steroïdehormonen. Zo blijken steroïdehormonen het zangcontrolesysteem bij zangvogels te beïnvloeden. Dit werd aangetoond door vrouwelijke zangvogels het steroïdehormoon estradiol toe te dienen. Na toediening is een stijging in nieuwe neuronen in het HVC en Area X waar te nemen. Dit zorgt op zijn beurt voor de capaciteit om een typisch mannelijk lied te produceren^{61,63}. Daarnaast wordt bij de mannelijke vogels testosteron (T) gedetecteerd gedurende de ontwikkeling van het BOS. Deze vaststellingen suggereren dat zowel T als estradiol noodzakelijk zijn om zang te stimuleren en het vocaal leren correct aan te sturen^{50,77}. Echter, een overvloed aan androgenen bij mannelijke juvenielen belemmert de normale zangontwikkeling, wat er weer op wijst dat een gereguleerde controle op de aanmaak en secretie van hormonen noodzakelijk is^{50,72}.

In deze thesis wordt het effect van TH's op het zangcontrolesysteem onder de loep genomen. Hier omtrent is nog niet veel terug te vinden in de literatuur. Er kan echter aangenomen worden dat TH's een rol spelen in de ontwikkeling van het zangcontrolesysteem, aangezien ze van belang zijn gedurende de ontogenese van de hersenen. Ook bij de latere structurele herorganisatie reguleren de TH's via hun transcriptionele activiteit de genexpressie in de neuronen^{69,72}. Tekumalla *et al.* (2002) konden reeds aantonen dat het telencephalon sterk gevoelig is voor een teveel aan T₄, aangezien een overvloed T₄ leidde tot een stijging in celdood bij de adulte zebrevink. Hierna wordt dit verlies gecompenseerd met de toevoeging van nieuwe neuronen⁷².

DOEL

Opdat een zangvogel zijn eigen lied kan leren moeten bepaalde hersennucleï, de zangkernen, een correcte ontwikkeling doorgemaakt hebben. Ook de zangbanen die een connectie vormen tussen deze zangkernen moeten worden aangelegd. Uit onderzoek blijkt dat bepaalde hormonen een belangrijke rol spelen gedurende de ontwikkeling van dit zangcontrolesysteem en bijgevolg het zangleerproces beïnvloeden. Gedurende dit leerproces ondergaan deze zangkernen neuroanatomische veranderingen en zijn de hersenen dus plastisch. Neuroplasticiteit is cruciaal gedurende het zangleerproces. De structurele veranderingen die in de zangkernen plaatsvinden, laten de vogel toe zijn eigen lied te leren en aan te passen. Ook schildklierhormonen (TH's) zijn van essentieel belang voor een normale hersenontwikkeling. Indien TH's de neuroplasticiteit in de zangkernen beïnvloeden, dan zal ook het zangleerproces hierdoor beïnvloed worden. Dit is echter slechts weinig onderzocht. Daarnaast moeten de acties die TH's uitvoeren, gecontroleerd zijn. Deze controle gebeurt via regulatie van de beschikbaarheid van TH's op weefselniveau. Verschillende proteïnen die door TH-regulerende genen worden gecodeerd, zijn noodzakelijk voor deze regulatie: deiodasen, TH-receptoren en TH-transporters. Zij zorgen er voor dat de activiteit van TH's gereguleerd wordt.

In deze thesis worden de expressiepatronen van TH-regulerende genen in het ontwikkelend zangcontrolesysteem van de zebra-vink onderzocht. Via *in situ* hybridisatie worden deze expressiepatronen in de zangkernen bestudeerd gedurende verschillende kritieke fasen van het zangleerproces. Daarnaast wordt getracht de neuroanatomische veranderingen die de zangkernen doormaken in kaart te brengen. Tot slot worden de expressiepatronen die bij mannelijke zebra-vinken gevonden zijn, vergeleken met deze van de vrouwelijke individuen. De verkregen resultaten van dit onderzoek kunnen bijdragen in verder onderzoek naar de achterliggende mechanismen van het zangleerproces. De inzichten die hieruit worden gehaald, kunnen later geïmplementeerd worden in onderzoek naar spraak- en leerprocessen bij de mens.

MATERIAAL & METHODEN

1. Verzamelen zebra-vinkhersenen

Zebra-vinkhersenen van zowel mannelijke als vrouwelijke vogels met leeftijden 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 en 120 dagen worden bezorgd door het laboratorium gedragsneuroendocrinologie van de Universiteit van Luik. De zebra-vinken worden hier verdoofd met een injectie met Nembutal® en vervolgens wordt de effectiviteit van de verdoving nagegaan m.b.v. de knijpreflex. Nadien wordt de borstkas opengelegd en wordt de vogel geperfuseerd via het linkerhartventrikel met achtereenvolgens 0,9% saline oplossing en 4% paraformaldehyde (PFA) in 1x *phosphate buffered saline* (PBS, zie addendum tabel A1). Wanneer de laatste vleugelreflex plaatsvindt, is het organisme volledig gefixeerd. Nadien wordt de kop van het lichaam verwijderd en worden hieruit de hersenen gedissecteed en ingevroren op droog ijs. De hersenen worden opgeslagen op -80°C tot ze verwerkt worden.

2. Snijden van weefsels

2.1 *Free floating coupes*

Doordat geperfuseerde hersenen niet gesneden kunnen worden op glaasjes, worden hiervan *free floating coupes* gesneden. Het mes en het opzetblokje van de cryostaat (HM560 cryostaat, MICROM) worden ingesteld op -20°C. De te snijden hersenen worden ter acclimatisering in de cryostaat gelegd. Na een kwartier worden de hersenen ingebed met Tissue-Tek® O.C.T. *compound* (Sakura 4583) op een stupje. Wanneer de Tissue-Tek® verhard is, wordt het stupje op het opzetblokje van de cryostaat geplaatst en georiënteerd voor het maken van coronale coupes. De coupes worden vervolgens gesneden op een dikte van 30 µm en opgeslagen in 24-wellplaten gevuld met cryoprotectant (zie addendum tabel A2), waarna ze op -20°C worden bewaard.

2.2 *Fresh frozen coupes*

De hersenen voor *fresh frozen coupes* zijn niet geperfuseerd. Het acclimatisering- en inbeddingproces verloopt analoog als de *free floating coupes*. De coupes worden gesneden op 12-14 µm in reeksen van tien en telkens opgevangen op Superfrost®Plus glaasjes (Thermo Scientific). Per glaasje worden er drie coupes opgevangen. De glaasjes worden vervolgens bewaard op -20°C.

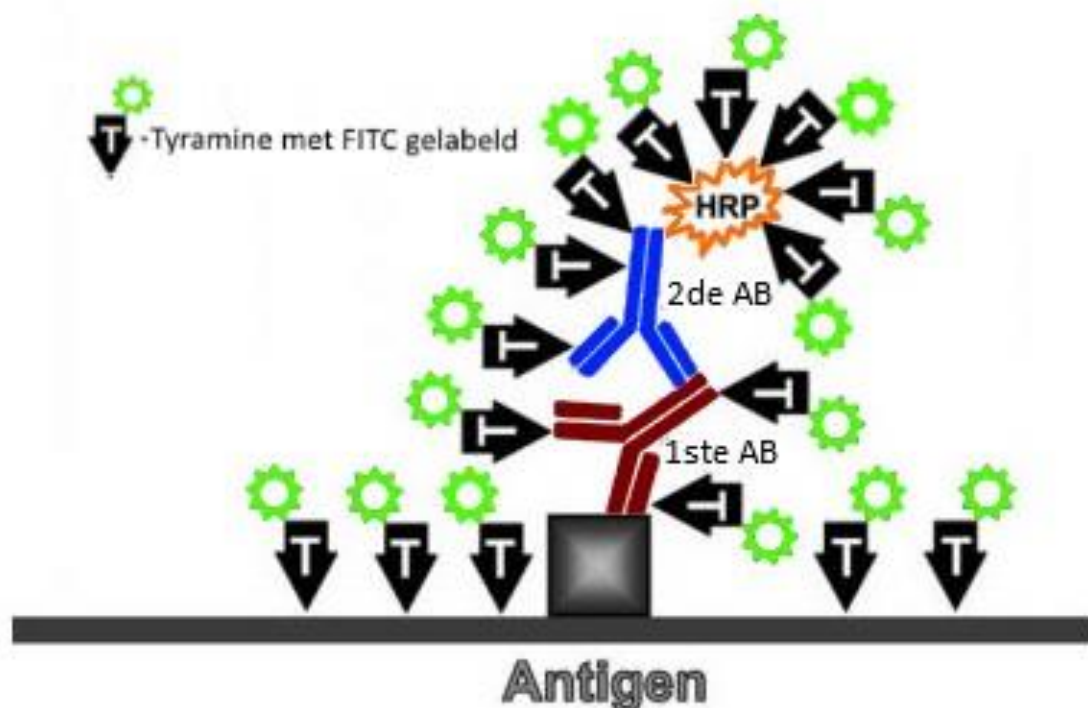
3. Nissl-kleuring

Bij deze basische kleuring worden zure factoren in de zenuwcel, zoals de nucleïne-zuren, paars-blauw gekleurd door cresylviolet. Meer specifiek worden met deze kleuring de cytoplasmatische Nissl-lichaampjes in de cellichamen van de zenuwcellen gekleurd⁷⁸. Door deze kleuring uit te voeren wordt de ligging van de zangkernen duidelijk. De slides die gebruikt worden voor de kleuring komen uit -20°C. Deze worden eerst gedroogd op een papieren doekje en nadien in een glazen rekje geplaatst.

Vervolgens wordt het rekje telkens in een reeks oplossingen geïncubeerd: 5 minuten (min) xylol, 3 min ethanol 100%, 3 min ethanol 90%, 3 min ethanol 70%, 3 min ethanol 50%, 5 min gedestilleerd water (AD). Hierna wordt het rekje voor 10 min in 1% cresylviolet in AD geplaatst. Nadien wordt het rekje geplaatst in een oplossing 200 ml AD waaraan 5 druppels azijnzuur (AA) toegevoegd zijn, dit gedurende 30 seconden (sec). Tot slot wordt het rekje met de slides achtereenvolgens geplaatst in 100% ethanol (4 min en 1 min) en nadien nog 2 maal 2 min in xylol. Hierna worden de slides toegelegd met het *mounting medium* Di-N-Butylftalaat in Xyleen (D.P.X.) gebruikt.

4. Immunohistochemische kleuring

Bij een immunohistochemische kleuring (IHC) wordt er getracht proteïnen te lokaliseren in de weefselpreparaten door gebruik te maken van antilichamen (*antibodies* - Ab's) die specifiek binden op het epitoom van antigenen (Ag). Het secundaire Ab, dat aan het primaire Ab gebonden is, is gemerkt met een biotine. Dit biotine kent een sterke affiniteit voor streptavidine (Str). Zo bindt *horseradish* peroxidase (HRP)-geconjugeerd streptavidine op het secundair Ab. Het HRP heeft op zijn beurt een katalytische werking op de tyramide (Tyr) gekoppeld aan het fluorofoor fluoresceïne isothiocyanaat (FITC)⁷⁹. Via deze lange amplificatiereactie komt een fluorescent signaal tot stand wanneer het doelmolecule in het weefsel aanwezig is (zie figuur 9). Dit signaal wordt gevisualiseerd met een fluorescentie binoculair.



Figuur 9: Signaaldetectie via de amplificatiereactie bij IHC – Het primaire Ab bindt op het epitoom van het antigen. Hierop bindt het secundaire Ab gemerkt met biotine. Aan dit biotine bindt Str met sterke affiniteit. Str is met HRP geconjugeerd. Wanneer FITC-Tyr aan de preparaten wordt toegevoegd, oefent HRP zijn katalytische werking uit op Tyr, wat op zijn beurt aan het fluorofoor FITC gebonden is. De geactiveerde Tyr's binden nu covalent aan nucleïnezuurrijke moleculen en proteïnen met een geamplificeerd fluorescent signaal als gevolg (aangepast uit Buchwalow & Böcker, 2010).

Het protocol voor het lokaliseren van de jodase 2 en schildklierhormoonreceptoren (TR's) α en β duurt 2 dagen. Op dag 1 worden de *fresh frozen coupes* eerst 5 min gefixeerd in 4% PFA in PBS. Daarna start de spoel- en permeabilisatiestap waarbij de glaasjes 5 min in een glazen rekje in een bakje met AD worden geplaatst en vervolgens 5 min in 1x *tris-buffered saline* (TBS, zie addendum tabel A3). Nadien wordt het rekje in een bakje met citraatbuffer (zie addendum tabel A4) in de oven (95°C) geplaatst gedurende 15 min voor de *antigen retrieval*-stap. Na fixatie hebben de proteïnen in het weefsel conformatieveranderingen ondergaan door gevormde *crosslinks* tussen de eiwitten. Zo zijn de bindingsplaatsen op de Ag's niet beschikbaar voor de Ab's. Door gebruik te maken van de citraatbuffer worden deze plaatsen terug vrijgemaakt en binden in een latere stap de primaire Ab's op het epitoom van de Ag's. De tweede mogelijkheid is om het bakje met de citraatbuffer 2 maal 4 min en 40 sec in de microgolf (100%) te plaatsen en nadien nog eens 5 min op 80%. Hierop volgt een 20 min durende afkoelingsperiode. Hierna wordt 3x 5 min gewassen met 1x TBS in een spoelbak op een schudplaat. Vervolgens worden de glaasjes 20 min in 0.3% H₂O₂ in methanol geïncubeerd. Op deze manier worden endogene peroxidase in het weefsel afgeblokt. Daarna volgt opnieuw 3x 5 min wasstap met 1x TBS in de spoelbak en de blokstap waarbij 1 uur geblokt wordt met 1/5 *Pre-Immune Goat* (PIG) in Trisnatriumchloride buffer (TNB, zie addendum tabel A5) (500 μ l oplossing/glaasje). Zo worden niet-specifieke bindingsplaatsen afgeschermd voor het primaire Ab. Met de pappen (DAKO) wordt een hydrofobe lijn onder de coupes aangebracht, waardoor de blokoplossing op het glaasje blijft liggen. Tot slot worden de glaasjes overnacht geïncubeerd met primaire Ab's (*rabbit anti-TR Santa Cruz, TR α / β , FL-408, sc-772 of rabbit anti-DIO2 Ab Santa Cruz, sc-98716*) (400 μ l oplossing/glaasje). Er worden verschillende oplossingen aangemaakt in 40 μ l PIG + 360 μ l TNB, waarin het Ab telkens in een verschillende concentratie aanwezig is (1/500, 1/1500, 1/1000, 1/100, 1/50 en 1/25). Bij de negatieve controle wordt geen Ab toegevoegd.

De volgende dag wordt gestart met 3x 5 min spoelen met 1x TBS. Dit is de standaard wasstap van dit protocol. Hierna worden de slides 45 min geïncubeerd met een secundair Ab (*goat-anti-rabbit* (GAR)-biotine: 1/300 in TNB, DAKO) die binden op de primaire Ab's. Nadien worden volgende stappen doorlopen: wasstap, 30 min Str-HRP (1/100 Str-HRP in TNB, DAKO), wasstap, 8 min FITC-Tyr (1/50 FITC-Tyr in amplificatiebuffer, Perkin Elmer), wasstap, 30 min 4',6-diamidino-2-phenylindole dichloride (DAPI)-oplossing (1/1000 DAPI in PBS). De DAPI-stap is een nucleaire tegenkleuring waarbij specifiek de nucleï van de cellen gekleurd worden. De blauwe kleurreactie, wanneer de coupes bekeken worden onder een fluorescentie microscoop, staat in sterk contrast met het groene signaal van de fluorofoor FITC. Telkens wordt 400 μ l oplossing/slide klaargemaakt, behalve bij FITC-Tyr-stap waar 300 μ l moet voorzien worden voor slechts de helft van de slides. Deze oplossing wordt echter van de slides gerecupereerd en opnieuw gebruikt voor de andere helft. Gedurende de DAPI-stap moet er gewerkt worden in een lichtluwe omgeving. Voor een goede bewaring van de slides worden ze eerst toegelegd met 80 μ l Mowiol (zie addendum tabel A6) en dan in het donker bewaard.

5. *In situ* hybridisatie met DIG-gemerkte RNA-probes

In situ hybridisatie (ISH) is een techniek waarbij, gebruikmakend van complementaire RNA-probes, het ruimtelijke expressiepatroon van een bepaald gen kan gevisualiseerd worden op een weefselcoupe.

5.1 Aanmaak DIG-gemerkte RNA-probes

Om een ISH te kunnen uitvoeren moeten de RNA-probes worden aangemaakt die complementair zijn aan de mRNA's die afgeschreven worden van de genen die onderzocht worden. Deze probes zijn de *antisense* (AS) probes. Als negatieve controle worden ook *sense* (S) probes aangemaakt die niet complementair zijn aan de transcripten. De sequentie van deze probes zijn namelijk identiek aan deze van de gentranscripten en bijgevolg zou er geen expressiepatroon waarneembaar mogen zijn. Voor D2, MCT8, TR α en TR β worden zowel AS- als S-probes aangemaakt.

5.1.1 Selectie van gensequentie voor probe-aanmaak

Via GenBank, opgesteld door het *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), wordt een DNA-sequentie van het nodige gen opgezocht. Uit de sequentie van het mRNA-transcript van dit gen wordt een deelsequentie van 800-900 basenparen (bp) gekozen. Op basis van de gekozen sequentie worden specifieke primers besteld (zie tabel 1). Er wordt geen gebruik gemaakt van genomisch DNA, aangezien deze nog intronen bevatten.

Tabel 1: Sequentie van de gebruikte primers.

		Gebruikte primers	
		Forward	Reverse
Gen	DIO 2	5' GCTTCAGATCTTGCCGGTCTT 3'	5' ACGTAACTCCTGTGGAGAAAGGA 3'
	THRA	5' AGATGAACAGTGTGTGGTGT 3'	5' ACTTGCCGAGGTCGAAGATG 3'
	THRB	5' TGCCAGGAATGTCGCTTCAA 3'	5' AGTGTTCGAATGCCAGGAGG 3'
	MCT8	5' CCTTCACCAAGTCCCTGGAA 3'	5' AAGATGCTGGTGTCCGAGG 3'

5.1.2 Amplificatie cDNA voor probe-aanmaak via *Polymerase Chain Reaction*

Wanneer de primers ter beschikking zijn, wordt een *Polymerase Chain Reaction* (PCR) opgestart gebruikmakend van volgende reagentia: 5 μ l 10x PCR-buffer (Invitrogen), 1.5 μ l 50 mM MgCl₂ (Invitrogen), 1 μ l 10 mM dNTP, 0.3 μ l 5U/ μ l Taq-polymerase (Invitrogen), 1 μ l 10 μ M *forward* primer (Invitrogen), 1 μ l 10 μ M *reverse* primer (Invitrogen), 1 μ l (of meer) staal (cDNA) en aanvullen met RNase-vrij H₂O (Gibco) tot 50 μ l. De PCR-epjes worden vervolgens in de PCR-machine geplaatst. Volgende cycli wordt 35 keer herhaald: denaturatie (95°C), renaturatie (55°C) en polymerisatie (72°C). Hierna wordt het PCR-product geladen op een agarosegel.

5.1.3 Elektroforese

Gelelektroforese wordt niet alleen gebruikt om verschillende nucleïnezuur-bevattende moleculen van elkaar te scheiden op basis van grootte, maar ook is het een onderdeel van de purificatie van specifieke DNA-fragmenten (zie 5.1.4). Een 1% agarosegel wordt als volgt aangemaakt: 0.7 g agarose en 70 ml 1x Tris azijnzuur EDTA (TAE)-buffer (zie addendum tabel A7) worden in een Erlenmeyer in de microgolf opgewarmd tot de agarose opgelost is. Vervolgens wordt 3.5 µl GEL-RED (Biotium) toegevoegd aan de agaroseoplossing. Dit geheel wordt in een elektroforesebakje gegoten, waarin een kam wordt geplaatst. Wanneer de gel verhard is, wordt de kam uit de gel verwijderd waardoor welletjes ontstaan waarop het staal geladen wordt. Het elektroforesebakje wordt in de elektroforesemachine geplaatst die met 1x TAE-buffer gevuld is. Voor het laden van de stalen in de gel wordt aan 5 µl loadingbuffer 1 µl staal toegevoegd. Ook wordt 3 µl 100 bp-ladder toegevoegd in een well om de grootte van de fragmenten na te kunnen gaan. De elektroforese duurt ± 30 min bij 160 V. Visualisatie van de gel gebeurt onder UV-licht. Wanneer na elektroforese de bandjes uitgesneden dienen te worden (zie 5.1.4) wordt 10 tot 15 µl PCR-product op de gel geladen.

5.1.4 Gelextractie

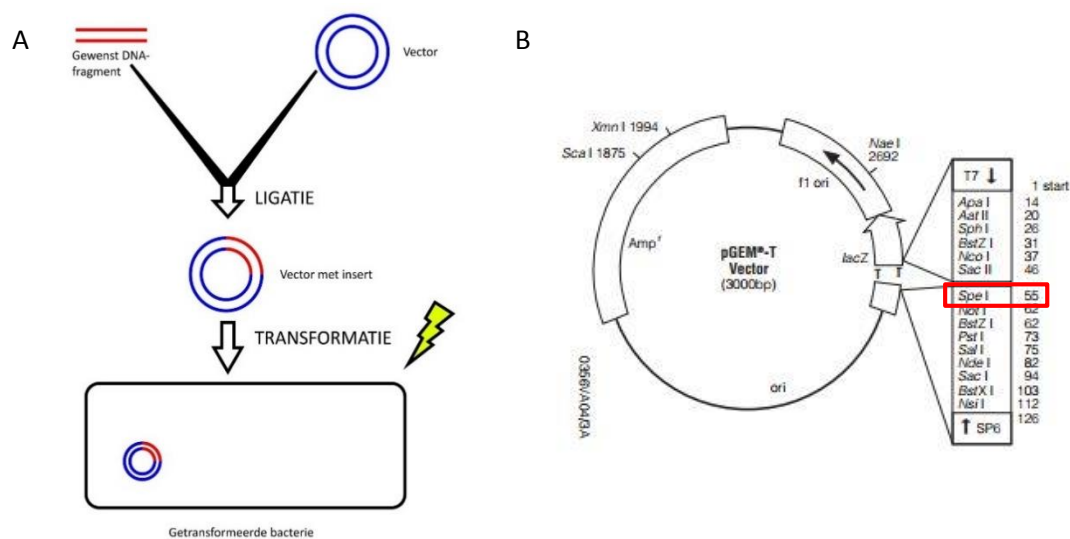
Via gelextractie wordt het DNA uit de gel geëxtraheerd. Hierbij wordt het QIAEX II Agarose Gel Extractie Protocol (Qiagen) gevolgd. De waargenomen bandjes (800-900 bp) worden met een scalpel uitgesneden en in een epje gestoken. Vervolgens worden 3 volumes QX1-buffer/volume gel toegevoegd (bv: 300 µl QX1-buffer/100 mg gel). Aan het staal wordt nadien 10 µl QIAEX II toegevoegd. Het geheel wordt voor 10 min op 50°C geïncubeerd en om de 2 min gevortext. Op deze manier wordt de agarose opgelost. Hierna wordt het epje voor 30 sec gevortext en wordt het supernatans verwijderd. De overblijvende pellet wordt gewassen met 500 µl QX1-buffer en 2 maal met 500 µl PE-buffer. Telkens wordt het epje gevortext om de pellet te resuspendieren en wordt nadien het supernatans verwijderd. Zo wordt achtereenvolgens overblijvend agarose en zoutcontaminatie verwijderd uit het staal. Vervolgens wordt de pellet gedroogd aan de lucht voor 15 min. Tot slot volgt de eluatiestap waarbij 20 µl RNase-vrij H₂O aan het epje toegevoegd wordt en wordt de pellet geresuspendeerd door te vortexen. Het epje wordt dan voor 5 min geïncubeerd op kamertemperatuur. Na een laatste centrifugeerbeurt van 30 sec wordt het supernatans in een zuiver en geautoclaveerd epje overgepipetteerd. Deze eluatiestap wordt 2 maal uitgevoerd.

5.1.5 Kloneren: Ligeren en transformeren

De dubbelstrengige DNA-fragmenten die uit de gel geëxtraheerd zijn, worden vervolgens m.b.v. DNA ligase in vectoren geïncorporeerd, wat ligeren wordt genoemd. De ligatiereactie gebeurt in een oplossing bestaande uit 7.5 µl 2x *Rapid Ligation* Buffer (Promega) + 1 µl T4 DNA Ligase (Promega) + 1 µl pGEM[®]-T-vector (Promega) + 5.5 µl staal wordt overnacht op 4°C geplaatst. Ligatie is een cruciaal onderdeel van het moleculair kloneren (zie figuur 10). Bij kloneren wordt een specifiek DNA-fragment in een gastheerbacterie gerepliceerd door gastheerkolonies te laten opgroeien. Eerst moeten de recombinante vectoren waarin de stukjes DNA geligeerd zijn, in de bacteriën (*Escherichia coli*) worden

ingevoegd. De gebruikte bacteriën zijn JM109 *High Efficiency Competent Cells* (Promega). 40 µl van deze competente cellen wordt in een epje samengebracht met 7.5 µl van het ligatiestaal. Het epje wordt voorzichtig geschud en voor 20 min op ijs geplaatst. Hierop volgt een hitteschok, waardoor de vector de bacteriële cel wordt ingebracht. Het epje wordt vervolgens 50 sec in een waterbad van 42°C geplaatst. Nadien wordt het epje terug op ijs geplaatst. 950 µl *Lysogeny Broth* (LB)-medium wordt toegevoegd aan het epje dat vervolgens voor 1.5 uur op 37°C wordt geïncubeerd.

Tot slot worden LB-voedingsbodems aangemaakt om de getransformeerde bacteriën op te kweken. Aan dit LB-medium wordt ampicilline toegevoegd (1 µl ampicilline/1 ml LB) om bacteriën zonder vector af te doden. De bacteriën (100 µl) worden nadien onder de trekkast uitgeplaat op de LB-ampicilline-bodems en overnacht geïncubeerd op 37°C.



Figuur 10: Moleculair kloneren – A. Het gewenste DNA-fragment wordt m.b.v. enzymen in een vector geligeerd. Nadien zal het circulaire plasmide na een hitteschok in de bacteriën terecht komen. Deze bacteriën worden nu getransformeerde bacteriën genoemd en worden verder opgekweekt. **B.** De gebruikte vector (pGEM[®]-T-vector) met knipplaats voor Spe I-restrictie-enzyme (aangepast uit Promega).

5.1.6 Kolonie-PCR

Van de uitgeplaatte bacteriën worden 8 kolonies/conditie geprikt en in afzonderlijke epjes met RNase-vrij H₂O geroerd. Hieruit wordt 5 µl in een PCR-epje overgebracht. De PCR-oplossing wordt aangemaakt zoals beschreven in paragraaf 5.1.2, maar met 5 µl staal i.p.v. 1 µl. Het programma dat doorlopen wordt start bij 5 min 95°C. Nadien wordt de volgende cyclus 30 keer herhaald: 1) 15 sec 95°C + 2) 30 sec 55°C + 3) 1 min 30 sec 72°C. De kolonie-PCR wordt uitgevoerd om te onderzoeken welke van de kolonies ook effectief het insert bezitten. Enkel deze kolonies worden nadien opgekweekt, door 10 ml LB-medium en 300 µl staal aan een 15 ml falcon toe te voegen. Dit wordt overnacht in de schudincubator (CERTOMAT[®]IS) op 37°C geplaatst. Of het insert aanwezig is, wordt nagegaan a.h.v. gelelektroforese (zie paragraaf 5.1.3.). In de epjes waarin de kolonies zijn aangebracht, wordt LB-medium toegevoegd ter bewaring.

5.1.7 MiniPrep: plasmide opzuivering en sequencing

Om de circulaire plasmiden op te zuiveren uit de bacteriën wordt gebruik gemaakt van het protocol uit *Quick Plasmid miniPrep Kit* (Invitrogen). Vooreerst worden de falcons uit de schudmachine gehaald en gecentrifugeerd. Nadien wordt het LB-medium in de daarvoor voorziene afvalbak gedeponneerd, zodat enkel het pellet met opgegroeide bacteriën overblijft. Daarna wordt de pellet in 250 µl resuspensiebuffer geresuspendeerd in een nieuw epje van 1.5 ml. Achtereenvolgens worden volgende buffers toegevoegd: 250 µl lysisbuffer (5 min laten staan) en 350 µl precipitatie buffer (10 min centrifugeren op maximale *revolution per minute* (rpm)). Het supernatans wordt in een kolom, die zich in een wastube bevindt, overgebracht. Dit wordt 1 min gecentrifugeerd en de geëluëerde vloeistof wordt verwijderd. Hierna wordt 750 µl wasbuffer met ethanol toegevoegd aan de kolom en deze wordt gecentrifugeerd voor 1 min. Tot slot wordt 75 µl RNase-vrij H₂O toegevoegd aan de kolom die in een nieuw epje wordt geplaatst. Dit wordt opnieuw gecentrifugeerd voor 2 min. Dit epje bevat het gepurificeerde plasmide en wordt op -4°C bewaard.

Hierna moet worden uitgemaakt hoe het insert in het plasmide georiënteerd is. Dit is noodzakelijk om te weten of er een AS- of een S-probe van wordt aangemaakt. De opgezuiverde plasmiden worden bijgevolg gesequenced. Per gen dat onderzocht wordt, is er zowel een AS- als een S-probe nodig. De stalen voor het sequencen worden klaargemaakt door 300-500 ng plasmide + 2 µl Terminator Ready Reaction Mix (Big Dye[®] Terminator v1.1, Cycle Sequencing RP-100) + 3 µl 5x Sequencing Buffer (Big Dye[®] Terminator v1.1, v3.1) + 0.33 µl 10 µM Primer aan een steriel epje toe te voegen en aan te lengen tot 20 µl met RNase-vrij H₂O. Dit geheel wordt zacht gemengd en kort gecentrifugeerd. De PCR-reactie start bij 2 min 96°C. Nadien wordt volgende cyclus 30 keer herhaald: 30 sec 96°C, 15 sec 50°C en 2,5 min 60°C. Voor elke sequencingreactie wordt een mengsel (2 µl 3 M natriumacetaat pH 5.2 + 2 µl 125 mM ethyleendiaminetetraazijnzuur (EDTA) + 50 µl 100% ethanol) in een 0.5 ml epje aangemaakt. De PCR-stalen worden aan dit mengsel toegevoegd, gevortext en 15 min geïncubeerd op kamertemperatuur. Hierop volgt een centrifugebeurt van 20 min op 13200 rpm op kamertemperatuur. Het supernatans wordt nadien voorzichtig verwijderd en het pellet wordt 1 min gedroogd op het verwarmingsblok (90°C). Het pellet wordt nu geresuspendeerd in 20 µl 0.1mM EDTA, gevortext en kort gecentrifugeerd. Het epje wordt 2 min gesloten in de verwarmingsblok (95°C) gestoken. Voor het met de ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer wordt gesequenced, worden de stalen op ijs afgekoeld. Nadien kunnen de sequenties vergeleken worden met de sequenties op NCBI.

5.1.8 Linearisatie plasmide

In de circulaire plasmides zijn genspecifieke inserts ingebracht. Door het gebruik van restrictie-enzymen (*SpeI*) wordt het plasmide vlak naast het insert geknipt en wordt een lineair DNA-fragment verkregen (figuur 10 B). Dit is nodig opdat in een latere fase (zie 5.1.10) het RNA-polymerase stopt met het afschrijven van het DNA. Zo gaat de transcriptie niet verder dan de gewenste regio. Voor linearisatie van het plasmide worden volgende producten in een epje samen gebracht: 5 µl circulair plasmide + 1 µl restrictie-enzyme (*SpeI*, Roche) + 5 µl buffer overeenkomstig met het gebruikte restrictie-enzyme + aanvullen met RNase-vrij H₂O tot 50 µl. Het epje wordt 2 uur geïncubeerd op 37°C.

Hierna wordt de linearisatie gecontroleerd op gel via gelelektroforese (zie 5.1.3). Zowel het ongeknippte als het geknipte plasmide worden dan op een gel geladen om de linearisatie te controleren.

5.1.9 Opzuivering gelineariseerd plasmide

Aan het geknipte plasmide wordt 49 µl fenol/chloroform/isoamylalcohol toegevoegd onder de trekkast. Het mengsel wordt voor 10 min gecentrifugeerd op 4°C aan 13200 rpm. De bovenste fase wordt in een nieuw epje overgebracht. Hieraan wordt 3 µl 3 M natriumacetaat (pH 5,2) en 90 µl 100% ethanol toegevoegd. Dit wordt bewaard op -80°C voor 1 uur, 15 min aan 13200 rpm op 4°C gecentrifugeerd en het supernatans wordt verwijderd. Aan het pellet wordt 100 µl 70% ethanol toegevoegd. Hierna wordt 5 min aan 13200 rpm op 4°C gecentrifugeerd. Opnieuw wordt het supernatans verwijderd. Na een korte centrifugeerbeurt wordt de overige vloeistof voorzichtig van de pellet verwijderd met een pipet. De pellet wordt aan de lucht gedroogd voor 10 min. Hierna wordt het pellet in 20 µl RNase-vrij H₂O geresuspendeerd. Optioneel wordt de concentratie gemeten met de Nanodrop (zie 5.1.13).

5.1.10 *In vitro* transcriptie en merking met DIG

Het incorporeren van het steroïde digoxigenine (DIG-11-UTP of DIG) op de probe is cruciaal voor de visualisatie van expressiepatronen. DIG vormt een epitoom waarop in een latere stap het AB kan binden. Deze DIG's worden willekeurig bij 1/20 cytosines ingebouwd. De effectiviteit van DIG-merking wordt via een spotting-test nagegaan (zie 5.2).

Voor de *in vitro* transcriptie en DIG-merking worden volgende reagentia in een epje samengebracht: 7 µl gelineariseerd plasmide + 2 µl RNA polymerase T7 (Roche) + 2 µl 10x transcriptiebuffer (overeenkomstig met het T7-polymerase) + 2 µl DIG RNA labeling mix (Roche) + 0.5 µl Protector RNase inhibitor (Roche) + leng aan met RNase-vrij H₂O tot 20 µl. Dit geheel wordt gemengd door op en neer te pipetteren en nadien 2 uur geïncubeerd in het waterbad op 37°C. Aan het epje wordt nog 0.5 µl RNase inhibitor (Roche) en 3 µl DNase I (Invitrogen) toegevoegd en wordt vervolgens 20 min geïncubeerd in het waterbad (37°C). Gedurende deze stap worden de plasmiden afgebroken en worden de DIG's geïncorporeerd in de transcripten.

5.1.11 Opzuivering en purificatie probe

Voor de probe opzuivering wordt achtereenvolgens volgende reagentia toegevoegd aan het epje: 40 µl RNase-vrij H₂O + 4 µl 0.5 M EDTA (pH 8) + 5 µl 4 M lithiumchloride (LiCl) + 125 µl 100% ethanol. Het epje wordt voorzichtig gemengd en overnacht op -20°C geïncubeerd. De volgende dag start een centrifugeerreeks (15 min 13200 rpm op 4°C) waarna telkens het supernatans verwijderd wordt en met een bepaald percentage ethanol (respectievelijk 300 µl 70% ethanol en 50 µl 100% ethanol) de pellet gewassen wordt. Na elke wasstap wordt de pellet gevortext. Tot slot wordt het epje 10 min gecentrifugeerd op 13200 rpm op 4°C. Opnieuw wordt het supernatans verwijderd. Het epje wordt open in de verwarmingsblok (37°C) geplaatst. Nadien wordt 40 µl met RNase-vrij H₂O toegevoegd aan

het epje dat nadien gevortext wordt tot de pellet opgelost is. Het epje wordt nu gesloten in de verwarmingsblok (37°C) gestoken voor 15 min. Zo wordt de pellet volledig opgelost.

Hierop volgt de purificatie van de probe. Purificatie van de probe is nodig omdat de probes die gebruikt worden zo'n 800-900 bp lang moeten zijn. Via deze purificatiemethode worden de te korte probefragmenten, waarbij de RNA-polymerase te vroeg gestopt is met afschrijven, uit de mix gehaald. Hiervoor worden Sephadex G-50 *Quick Spin* kolommen (Roche) gebruikt. De kolommen worden geschud zodat de matrix goed geresuspendeerd is en de buffer tot de bodem gezakt is. Nadien worden ze ontdaan van hun afsluitingen. Eerst wordt het overschot aan buffer uit de kolom verwijderd via de zwaartekracht. Nadien worden de kolommen in de daarvoor voorziene tubes geplaatst en in de *swinging-bucket rotor* geplaatst op 2900 rpm voor 2 min. Het eluens wordt verwijderd. Dit afdraaien wordt 2 keer uitgevoerd. Vervolgens wordt de kolom in een nieuwe tube overgebracht. Voorzichtig wordt de opgezuiverde probe in het midden van de kolom gepipetteerd. De kolom wordt opnieuw in de *swinging-bucket* geplaatst op 2900 rpm voor 4 min. Wat nu in de tube zit, is de gepurificeerde probe. Hiervan wordt de concentratie gemeten (zie 5.1.12). De opgevangen hoeveelheid wordt gemeten en er wordt een gelijke hoeveelheid formamide toegevoegd om de probe gedenatureerd te houden. De oplossing wordt tevens 3 min op 80-95°C in de verwarmingsblok geïncubeerd om de probe te denatureren. De probe wordt nadien op -20°C bewaard.

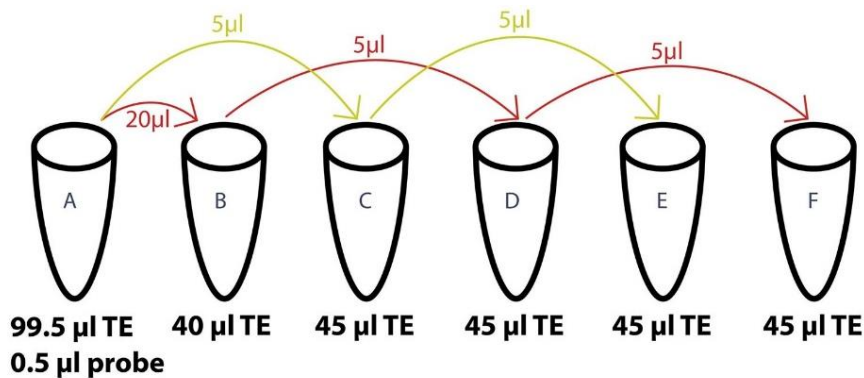
5.1.12 Nanodrop

Om de concentratie van de probe te bepalen wordt deze gemeten op de Nanodrop® ND-1000 spectrofotometer (Isogen Life Science). De Nanodrop® moet na elke meting worden gereinigd met RNase-vrij H₂O.

5.2 Spotting-test

Om de kwaliteit van de aangemaakte probes te onderzoeken wordt een spotting-test uitgevoerd. Op deze manier wordt ook duidelijk of de DIG's goed geïncorporeerd zijn op de probes. De probes worden gedetecteerd m.b.v. een Anti-Digoxigenine antilichaam (Ab). Dit Ab wordt gevisualiseerd m.b.v. de reactie tussen de chemiluminiscente substraten *Nitro blue tetrazolium chloride* 5 (NBT) en 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl fosfaat (BCIP).

Er wordt een verdunningsreeks aangemaakt van de probe zoals afgebeeld in figuur 11. Vervolgens wordt op een membraan (Hybond™-N+, Amersham Pharmacia Biotech) 1 µl uit elk epje gepipetteerd. Dit membraan wordt een uur gebakken in een oven op 80°C. Nadien wordt het membraan in een bakje op de schudplaat gezet en wordt er 15 min gewassen met ± 15 ml PBS-Tx (1x PBS + 0.1% Triton-X 100). Bij de verschillende stappen is het belangrijk dat het membraan goed onder de oplossing zit. Daarna wordt de spoeloplossing vervangen door een blockingsbuffer (15 ml PBS-Tx + 0.75 g 5% melkpoeder (Nestlé®)) voor 30 min en daarna voor 30 min geïncubeerd in Ab-buffer (15 ml PBS-Tx + 0.75 g 5% melkpoeder (Nestlé®) + 3 µl anti-DIG-AP *Fab Fragments* (Roche)). Het Ab is hier 1/5000 verdund in blockingbuffer.



Figuur 11: Verdunningsreeks spottingtest - In elk epje wordt de juiste hoeveelheid Tris-EDTA-buffer (TE) (Invitrogen) toegevoegd. In epje A wordt 0.5 µl probe toegevoegd. Nadien worden de juiste hoeveelheden overgepipetteerd in het correcte epje. Gebruikte verdunningsreeks: A. 1/200, B. 1/600, C. 1/2000, D. 1/6000, E. 1/20000 en F. 1/60000.

Hierop volgen 2 wasbeurten van telkens 15 min met PBS-Tx. Bij de laatste spoelstap van 15 min wordt gebruik gemaakt van alkaline fosfatase (AP) buffer (zie addendum tabel A8). Tot slot wordt het membraan geïncubeerd met NBT/BCIP (Promega) 1/50 verdund in AP-buffer (10 ml AP + 35 µl BCIP + 45 µl NBT) en het geheel afgedekt met zilverpapier. Na 5 min worden de spots met de hoogste concentratie zichtbaar. Na 30 min zouden alle spots zichtbaar moeten zijn.

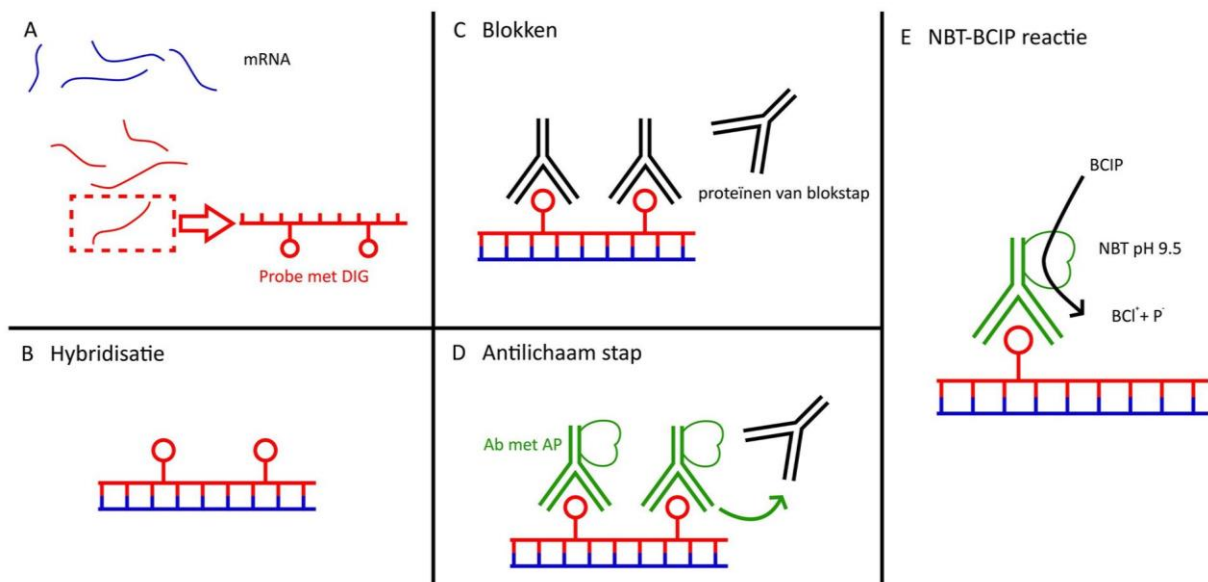
5.3 Uitvoeren ISH

5.3.1 Protocol ISH

Op basis van het artikel van Carleton *et al.* (2014) werd het protocol opgesteld voor het uitvoeren van ISH op zebrevink hersenen. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van *free floating* coupes. Uit de platen waar de coupes in bewaard worden, worden na een korte ontdooiperiode de juiste coupes geselecteerd. Deze worden m.b.v. een penseeltje uit de well met cryoprotectant gehaald en overgeplaatst in een nieuwe 24-wellplaat waar de welltjes gevuld zijn met 1x PBS. Per well wordt telkens 500 µl oplossing voorzien. Bij 12-wellplaten wordt telkens 1 ml oplossing voorzien per stap. Gedurende de hele ISH is het belangrijk RNase-vrij te werken opdat de RNA's niet gedegradeerd worden. De coupes worden 2 maal gespoeld met geautoclaveerd 1x PBS. Bij elke stap wordt de huidige vloeistof vervangen door een nieuwe oplossing. Hierbij is het noodzaak voorzichtig te werk te gaan zodat er geen delen van de coupes verloren gaan gedurende het overpipetteren van de vloeistoffen. Ook uitdroging van de coupes moet te allen tijde worden vermeden. De coupes worden vervolgens 10 min geïncubeerd in 500 µl acetylative vloeistof (5 ml geautoclaveerd DEPC-H₂O (zie addendum tabel A9) + 67.5 µl triethanolamine + 18.8 µl AA) op kamertemperatuur. Hierna wordt 2 keer met 2x SSPE-buffer gespoeld. 2x SSPE wordt uit 20x SSPE-buffer (zie addendum tabel A10) gemaakt (100 ml 20x SSPE aanvullen tot 1 liter (L) met DEPC-H₂O).

Hierop volgt de hybridisatiestap (zie figuur 12 B). Gedurende de hybridisatiestap binden de probes op het complementaire mRNA (wanneer wordt gewerkt met een AS-probe). Vijf ml hybridisatiebuffer bevat 2.5 ml formamide + 500 µl 20x SSPE + 500 µl tRNA + 300 µl *bovine serum albumine* (BSA) 20µg/µl + 300 µl Poly A 20µg/µl + 900 µl DEPC-H₂O + X µl probe. Voor 24-wellplaten wordt 100 ng probe/well voorzien en 180 µl hybridisatiebuffer. Voor 12-wellplaten wordt per well 2 µl probe en 800 µl

hybridisatiebuffer voorzien. Wanneer de hybridisatiebuffer in de well gepipetteerd is, worden de zijkanten van de plaat met tape bezet. Dit is noodzakelijk om uitdroging tegen te gaan, want de plaat wordt overnacht in de hybridisatieoven geplaatst op 65°C. Een juiste hybridisatietemperatuur is cruciaal gedurende dit proces. De hybridisatietemperatuur wordt zo gekozen dat er een minimum aan aspecifieke bindingen en een maximum aan specifieke bindingen tussen probe en mRNA aanwezig is. Als de temperatuur wordt verlaagd, vergroot de kans op aspecifieke bindingen van de probe. Wanneer de temperatuur wordt verhoogd, vergroot ook de kans dat specifieke probe-mRNA-bindingen weer breken. De volgende dag wordt gestart met de post-hybridisatiewassen om overtollige probe te verwijderen. De eerste wasstap duurt 1 uur en 10 min en bestaat uit een 2x SSPE/50% formamide-oplossing (voor 5 ml: 2.5 ml formamide + 1 ml 20x SSPE + 1.5 ml DEPC-H₂O). Hierna wordt 2 maal 30 min gespoeld met 0.1x SSPE. Na de post-hybridisatiewassen wordt er met een oplossing op basis van TN (zie addendum tabel A11) gewassen, TNT (TN + 0.3% Triton-X 100). Zo worden de celmembranen open getrokken, wat toelaat dat in een latere stap de Ab's beter kunnen binden.



Figuur 12: In situ hybridisatie met DIG-gemerkte RNA-probes - **A.** mRNA in de cel (blauw) en probe met geïncorporeerde DIG's. **B.** Gedurende de hybridisatiestap gaan de AS-probes binden op het complementaire gedeelte van het mRNA in de cel. **C.** Tijdens de blokstap gaan proteïnen, die zich in de blockingsbuffer bevinden, zich op de probe plaatsen. **D.** Wanneer de specifieke Ab's (anti-DIG-AP) worden toegevoegd, gaan deze Ab's de proteïnen van de blokstap weg concurreren. Deze specifieke Ab's bevatten alkaline fosfatase (AP). **E.** Bij een basische pH kan BCIP met behulp van AP gekleefd worden (BCIP wordt gehydrolyseerd). Door deze reactie zal een sequentie-specifieke reactie ontstaan (paars-blaauwe kleurvorming waar expressie van het gen aanwezig is).

Vervolgens vindt de blokstap plaats (zie figuur 12 C). Gedurende deze stap plaatsen proteïnen, die in de blockingsbuffer aanwezig zijn, zich op alle mogelijke bindingsplaatsen van het weefselpreparaat, waaronder de DIG's. Voor deze blokstap moet een blockingsbuffer aangemaakt worden op basis van TNB (0.5% caseïne in TN). Voor 5 ml blockingsbuffer wordt 5 ml TNB en 50 µl verse melk (Carrefour) gebruikt. Het toevoegen van de melk aan de blockingsbuffer zorgt er tevens voor dat niet-specifieke achtergrond ingedijkt wordt door het reduceren van niet-specifieke reacties tussen de Ab's, die in de volgende stap worden toegevoegd, en andere proteïne in het weefselpreparaat⁸⁰. De coupes worden hier 30 min in geïncubeerd. Nadien volgt de antilichaamstap (zie figuur 12 D) waarbij DIG-specifieke

Ab's (anti-DIG-AP) de bindingsplaatsen van de proteïnen van de blokstap beconcurreren. Doordat deze specifieke Ab's een sterkere affiniteit hebben voor de DIG's, worden de proteïnen van de blokstap verstoten van deze bindingsplaatsen en de Ab's binden op de geïncorporeerde DIG's van de probe. De Ab's winnen enkel deze bindingsplaatsen voor zich, omdat ze hiervoor een grotere affiniteit kennen. Voor de aanmaak van Ab-buffer wordt volgende regel gevolgd: 0.3% verse melk in TNB waarin 1/600 anti-DIG-AP, Fab Fragments (Roche) wordt opgelost (voor 5 ml Ab-buffer: 5 ml TNB + 15 µl verse melk + 8.3 µl anti-DIG-AP).

Hierop volgen twee wasstappen van 15 min met TMN-buffer (zie addendum tabel A12). Tot slot wordt de NBT-BCIP-oplossing klaargemaakt (figuur 12 E.). Voor 10 ml NBT-BCIP wordt 45 µl NBT en 35 µl BCIP aan 10 ml TMN toegevoegd in een 15 ml falcon die volledig in zilverpapier gewikkeld is, zodat er geen lucht en licht aan kan. Als dit wel het geval is, gaat de NBT-BCIP-oplossing (stainingsbuffer) verkleuren en neerslag vormen. Wanneer de oplossing aan de welletjes toegevoegd wordt, wordt de plaat volledig afgedekt met zilverpapier en wordt overnacht geplaatst. Bij een basische pH (pH 9.5) wordt BCIP m.b.v. AP gekliefd. Wanneer 2 BCI⁺ dimeriseren ontstaat een sequentie-specifieke kleurreactie. Gedurende de volgende dag wordt mogelijke expressie gecontroleerd onder de microscoop (zie 6.). Hiervoor wordt de NBT-BCIP-oplossing uit de welletjes verwijderd en de coupes gespoeld met TMN. Nadien worden ze kort drooggelegd en bekeken onder de microcoop. Wanneer nog geen expressie waarneembaar is worden de coupes opnieuw in NBT-BCIP-oplossing geïncubeerd. Is er wel expressie waarneembaar worden de coupes in TMN bewaard tot ze toegelegd kunnen worden (zie 5.3.3). Bij alle uitgevoerde stappen wordt de plaat op de schudplaat geplaatst.

5.3.2 *High-throughput* ISH

Wegens het intensief pipetteren en de grote kans op verlies van coupes en het tijdrovende proces van ISH werd getracht een protocol op punt te stellen voor een *high-throughput* ISH. Hierbij worden een tiental coupes in een mandje geplaatst en wordt het protocol doorlopen zoals in paragraaf 5.3.1 beschreven is. In plaats van telkens voorzichtig de vloeistof uit de welletjes te halen (rekening houdende dat er geen coupes mee gepipetteerd worden), kan nu het mandje uit het welletje gehaald worden waardoor het pipetteren van de vloeistof vlotter kan verlopen. Er werden zowel mandjes voor 12- als voor 24-wellplaten ontwikkeld. Voor 12- en 24-wellplaten werd er respectievelijk telkens 2 ml en 1 ml oplossing voorzien. Zo werd simultaan op meerdere coupes ISH uitgevoerd en was dit tijdbesparend.

5.3.3 Toeleggen coupes

Nadat expressie gecontroleerd is, worden de coupes m.b.v. van een 0.9 M saline-oplossing en een penseel op een draagglaasje (Thermo Scientific) geplaatst. Nadien worden de coupes toegelegd met 75 µl Mowiol en wordt er voorzichtig een dekglasje (Thermo Scientific) op geplaatst. Wanneer er moeilijkheden zijn bij het oriënteren van de coupes tijdens het toeleggen wordt de binoculair gebruikt.

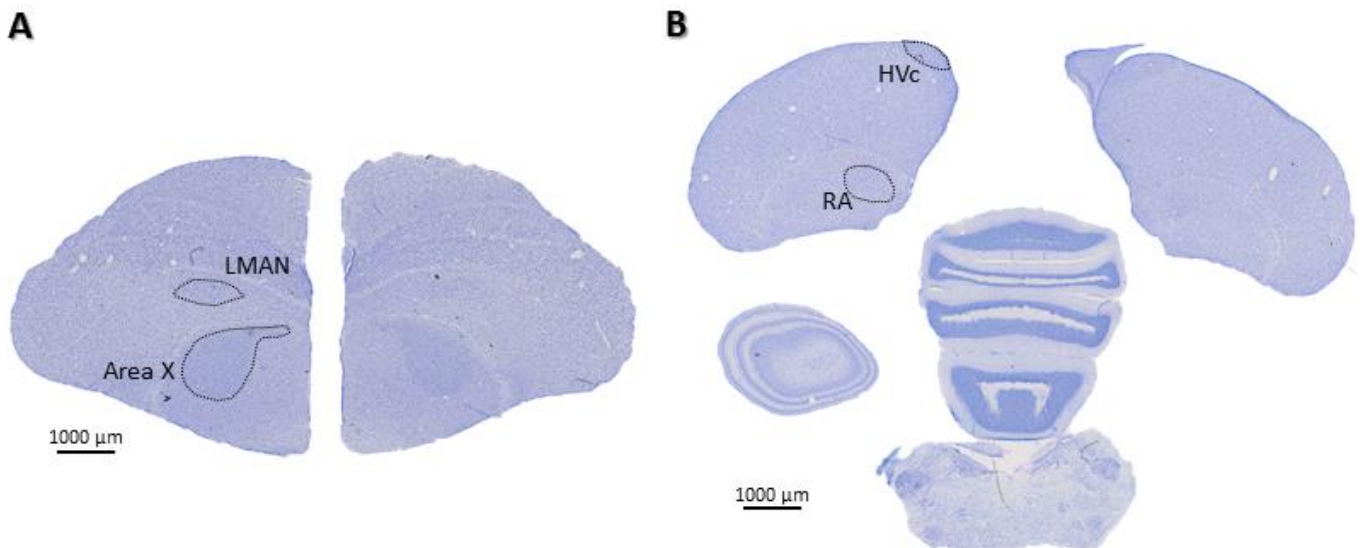
6. Microscopie

Zowel voor het controleren van de expressie als het toeleggen van de coupes wordt gebruik gemaakt van een binoculair. De toegelegde coupes kunnen onder de lichtmicroscopie bekeken worden. Foto's van de coupes worden getrokken m.b.v. ZEN-software (Zeiss) en een Imager Z1 uitgerust met AxioCam MRc5 camera (Zeiss).

RESULTATEN

1. Nissl-kleuring

De zangkernen van het zangcontrolesysteem bestaan uit dense populaties van cellen. Bij een Nissl-kleuring werden de nucleïnezuren die zich in de kernen van deze cellen bevinden, gekleurd. Door middel van Nissl-kleuringen werd de ligging van de zangkernen gevisualiseerd. Hiervoor werden *fresh frozen* coupes gebruikt op volgende leeftijden: 30 dph en 90 dph. De uitgevoerde Nissl-kleuringen maakten het mogelijk de correcte glaasjes met *fresh frozen* coupes te selecteren om de ISH op uit te voeren. De Nissl-kleuring, uitgevoerd op 30 dph gaf een zeer ongelijkmatige kleuring. Bij deze kleuring werden de coupes bij aanvang 2 maal 5 min in xylol geplaatst en slechts 6 min in cresylviolet geïncubeerd. Door de ongelijkmatige kleuring werd het protocol gemodificeerd en werden de coupes van 90 dph en nieuwe coupes van 30 dph slechts 1 maal in xylol en 10 min in cresylviolet geplaatst. Op deze coupes werden alle vier de zangkernen teruggevonden (zie figuur 13).



Figuur 13: Een representatieve weergave van een Nissl-kleuring – A) Rostrale coupe met Area x en LMAN. B) Caudale coupe met RA en HVC.

2. Immunohistochemische kleuring

Aangezien een immunohistochemische kleuring (IHC) een specifiek proteïne in het weefselpreparaat kleurt, en commerciële Ab's voorhanden waren voor zowel het activerende deijodase type 2, als voor de schildklierhormoonreceptoren, werden IHC's uitgevoerd op *fresh frozen* coupes. Daar waar een *in situ* hybridisatie (ISH) enkel het aanwezige mRNA in het weefsel visualiseert, detecteert een IHC een specifiek proteïne in het weefsel. De aanwezigheid van mRNA in de cel is immers geen onmiddellijk bewijs voor de effectieve aanwezigheid van proteïnen in het weefsel. De uitgevoerde IHC om D2-proteïnen te detecteren en te visualiseren in het 20 dph-weefsel gaf, wanneer bekeken onder de fluorescentie binoculair, een intens groene kleuring bij alle drie de geteste verdunningen: 1/100, 1/50 en 1/25. Daarnaast gaf de IHC die initieel werd uitgevoerd om TR's op 90

dph te visualiseren geen resultaten. Hier werden twee verdunningen getest: 1/1000 en 1/750. De IHC werd vervolgens opnieuw uitgevoerd met een meer geconcentreerde Ab-verdunning (1/500). Er werd een zwak diffuus signaal overheen het weefsel gedetecteerd. Aangezien uit deze kleuringen niets kon worden afgeleid, worden hiervan geen afbeeldingen getoond.

3. *In situ* hybridisatie met DIG-gemerkte probes

In deze thesis werden ISH's uitgevoerd om de expressiepatronen van TH-regulerende genen te onderzoeken en te visualiseren. Er werden *free floating* cryocoupees gesneden van zowel mannelijke als vrouwelijke zebrafinkhersenen van alle leeftijden (10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 en 120 (adult) dagen oud). Hierop werd een *free floating* ISH uitgevoerd. Bij elke ISH werd een semi-kwantitatieve score toegekend aan de waargenomen expressie in de zangkernen.

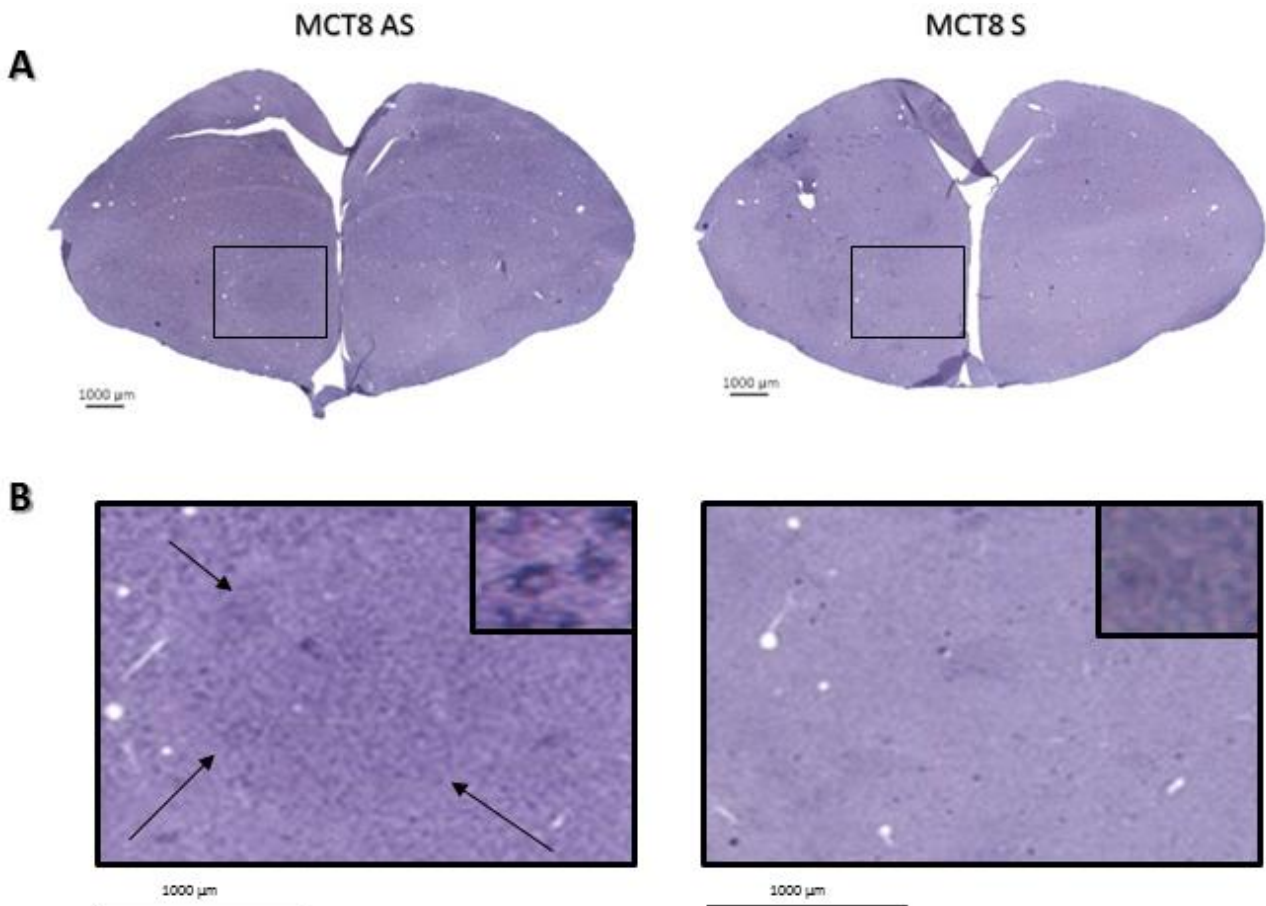
3.1 Aanmaak DIG-gemerkte probes

Voor elke probe die aangemaakt werd (zie materiaal en methoden 5.1) werd een spottingtest opgestart. Als hieruit bleek dat het verschil in DIG-merking te groot was tussen de verschillende probes, werd een nieuwe probe aangemaakt. Op deze manier werden bruikbare AS- en S-probes van ongeveer 800-900 bp'n aangemaakt voor volgende genen: *DIO2*, *MCT8*, *THRA* en *THRB*.

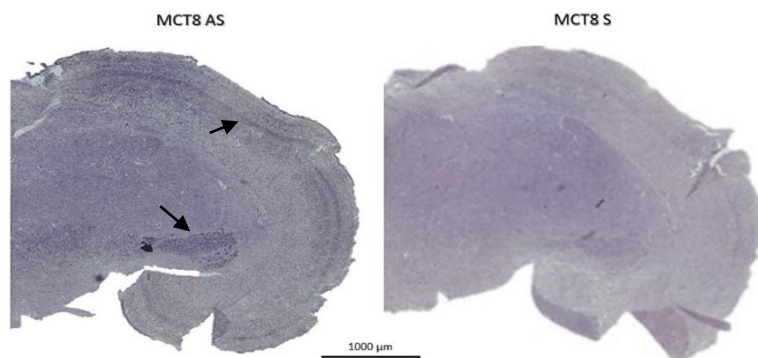
3.2 *In situ* hybridisatie van MCT8

Door initiële problemen met de MCT8-probes werden voor de MCT8-ISH, waarbij nieuwe probes aangemaakt werden, enkel de jongste leeftijden getest (10 en 20 *days posthatch* (dph)). Voor beide leeftijden werden zowel coupes vooraan als achteraan in de hersenen uitgekozen. Met de nieuw ontwikkelde MCT8 AS-probe werd wel signaal terug gevonden, zoals weergegeven in figuur 14 en 15. In figuur 14 worden de coupes van 20 dph weergegeven, waar vooraan in de hersenen een cirkelvormig signaal waar te nemen is in de Area X. In het omliggende weefsel is verspreide expressie terug te vinden.

De coupes die in figuur 14 weergegeven worden, zijn deze van 20 dph en zijn eveneens representatief voor de coupes van 10 dph (zie addendum figuur A1 en A2). Het expressiepatroon op 10 dph is gelijkaardig aan dat van 20 dph. Het kent eveneens een verspreid expressiepatroon, weliswaar meer intens. Hier zijn echter nog geen hersenkernen te onderscheiden. Omdat de weefselcoupes op de jongste leeftijd erg broos en kwetsbaar zijn, zijn grote delen van het weefsel afgescheurd of verloren gegaan gedurende het proces. Daarnaast werd bij de 10 dph een kern, nucleus *isthmi pars parvocellularis*, waargenomen in de optische lobben. Ook in het optisch tectum is er



Figuur 14: Signaaldetectie van MCT8-mRNA in 20 dph-weefselcoupes van een mannelijke zebrafink – A) Coronale coupes zijn weergegeven vooraan in de hersenen op 20 dph. Er is een duidelijk verspreid MCT8-mRNA signaal terug te vinden in het telencephalon. **B)** Uitvergroting van de coupes ter hoogte van Area X, met telkens een uitvergroting van de expressievorm. Vooraan in de hersenen is reeds een zwakke cirkelvormig signaal waar te nemen in de Area X bij de AS-coupe (zie pijlen). Deze expressie is niet waarneembaar bij de S-coupes.



Figuur 15: Signaaldetectie van MCT8-mRNA in 10 dph optische lob van een mannelijke zebrafink – Expressie is waar te nemen in het optisch tectum en een duidelijke hersenkern (nucleus isthmi pars parvocellularis). Beide weergegeven met een pijl. Links: AS-probe. Rechts: S-probe.

De intensiteit van de waargenomen signalen worden in tabel 2 weergegeven met een semi-kwantitatieve score. Het signaal in de Area X op 20 dph is t.o.v. het omliggende weefsel slecht te onderscheiden, aangezien de intensiteit van het signaal evenwaardig is. Ter hoogte van waar de andere drie belangrijke zangkernen liggen, werd geen afgelijnde expressie teruggevonden. Met afgelijnde expressie wordt expressie bedoeld waarbij de hersenkern duidelijk 'afgebakend' wordt (zoals in figuur 15, deze kern is geen zangkern). Bij verspreide expressie is er expressie aanwezig overheen het hele

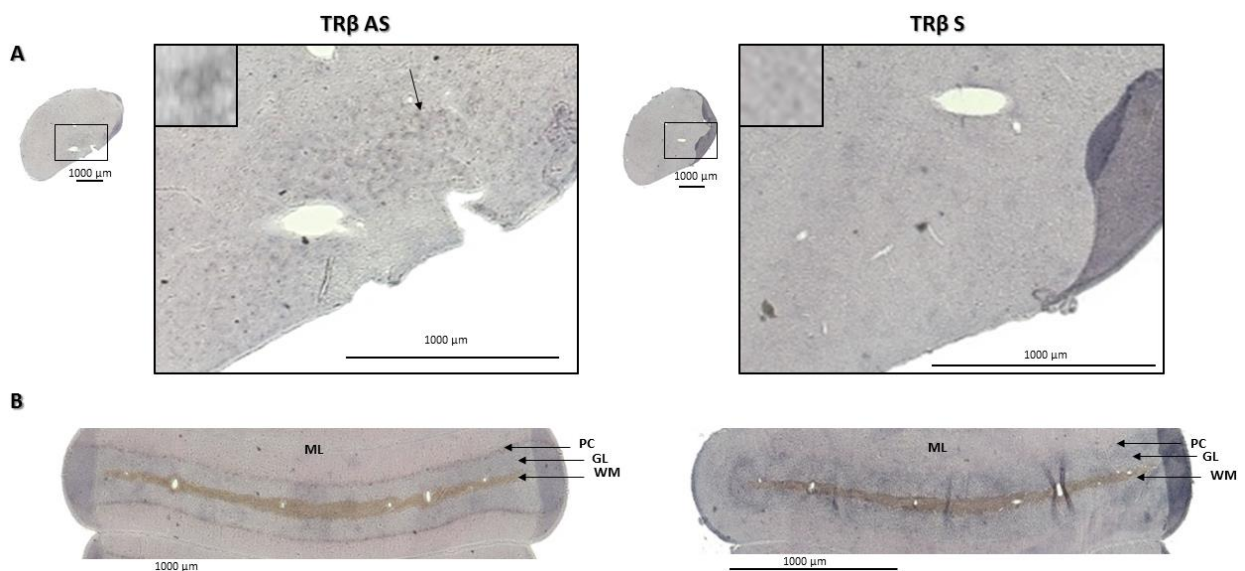
telencephalon. In vele gevallen zijn er dan ook geen zangkernen te onderscheiden, maar dat is niet steeds het geval (zie Area X op 20 dph). Dit wil echter niet zeggen dat de zangkernen niet aanwezig zijn. Verspreide expressie werd wel voor zowel 10 als 20 dph waargenomen overheen het telencephalon. Zoals eerder vermeld is enkel op 20 dph in Area X expressie waarneembaar.

Tabel 2: Semi-kwantitatieve score toegekend aan het signaal van de MCT8 AS-probe in de zanghersenkernen van de zebrovink. Op 10 dph is in het hele telencephalon een sterk verspreide expressie waarneembaar. Ook al is op 20 dph enkel Area X onderscheidbaar, de overige zangkernen zijn reeds ontwikkeld en aanwezig. Door de verspreide expressie komt eveneens in deze kernen expressie voor. De overige leeftijden werden niet getest. Met ++: zeer sterke expressie, +: sterke expressie, +/-: zwakke expressie, -: geen expressie detecteerbaar.

		Zangkern			
		Area X	LMAN	RA	HVc
Leeftijd (dph)	10	++	++	++	++
	20	+	+	+	+

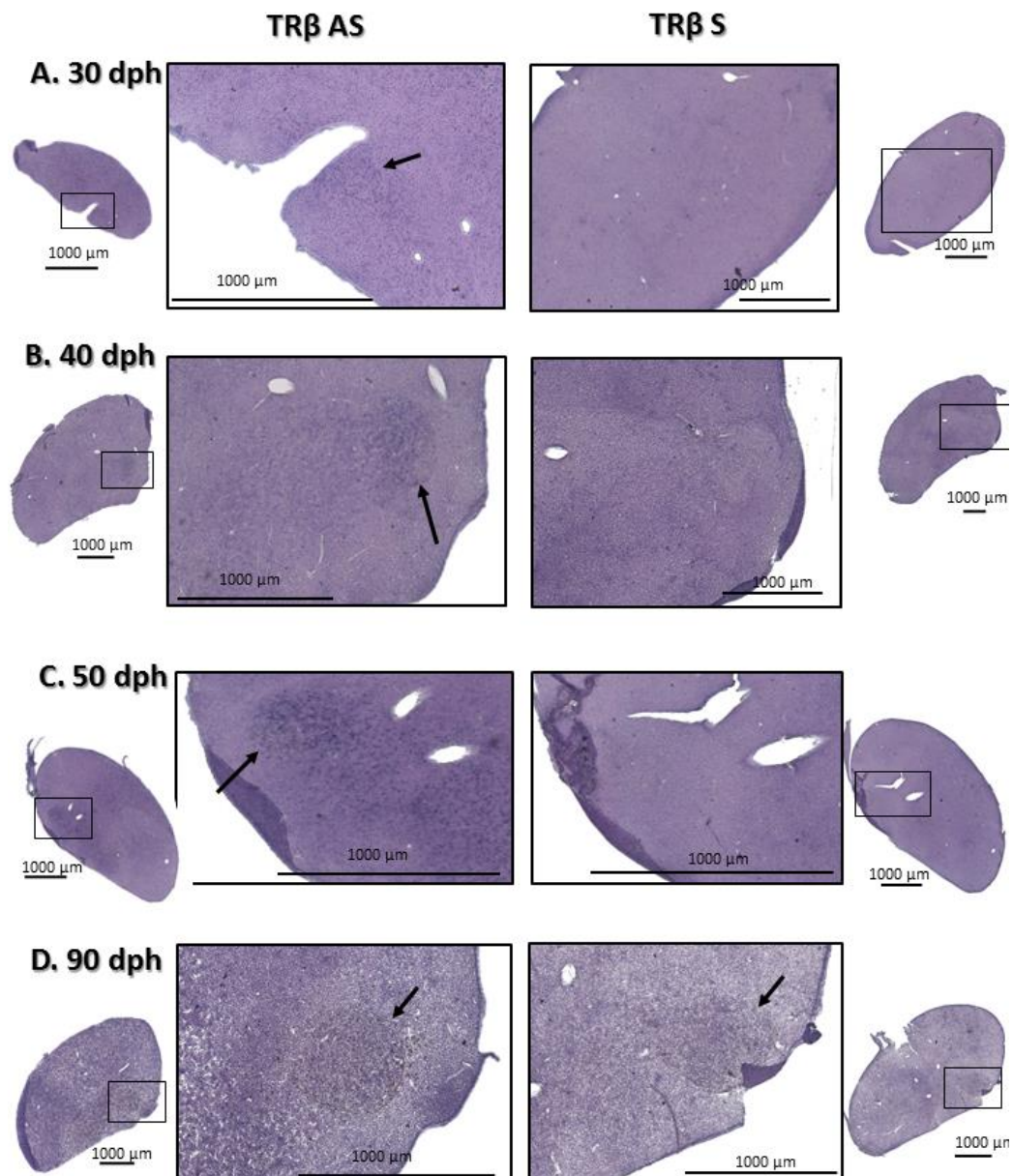
3.3 *In situ* hybridisatie van TR β

De ISH's die uitgevoerd zijn om de gentranscripten van *THRB* te onderzoeken, werden voorlopig enkel uitgevoerd op caudaal gelegen coronale coupes. Dit aangezien het een eerste test van de probe was. Doordat de hersenkernen Area X en LMAN meer rostraal gelegen zijn, wordt hier geen uitsluitel over gegeven. Er werden ISH's uitgevoerd op 10, 20, 30, 40, 50 en 90 dph. Door tijdsgebrek konden niet op alle leeftijden ISH's uitgevoerd worden. Daarnaast is bij de 10 dph-coupes telkens het telencephalon verloren gegaan. Hierdoor kon voor deze leeftijd geen expressie waargenomen of score toegekend worden. Bij de leeftijden 20, 30, 40, 50 en 90 dph zijn de cruciale hersendelen wel bewaard gebleven. Het resultaat is weergegeven in figuur 16 en 17.



Figuur 16: Signaaldetectie van TR β -mRNA in 20 dph hersenen van een mannelijke zebrovink – A) Links: Detailfoto van het telencephalon met RA met de AS-probe. Het cirkelvormig signaal (zie insert) is terug te vinden daar waar de RA zich ontwikkelt, maar lijkt niet grondig het RA af. Rechts: Detailfoto van het telencephalon met RA met de S-probe. Hier wordt geen expressie gedetecteerd. B) Links: Detailfoto van het cerebellum met de AS-probe. Hier wordt een sterke expressie in de Purkinjecellaag terug gevonden. Rechts: Detailfoto van het cerebellum met de S-probe. Met ML: Moleculaire laag; PC: Purkinjecellaag; WM: Witte massa en GL: Granulaire laag.

Algemeen is waar te nemen dat het TR β -expressiepatroon toeneemt met de leeftijd in het arcopallium (A) en zich meer gaat concentreren in het RA en op 90 dph verdwijnt. Echter, op alle geteste leeftijden, behalve 90 dph, komt in de regio van het A verspreide expressie voor. Dit is de regio waar het RA zich in bevindt, het Hvc is gelegen in het nidopallium (N). Het Hvc werd nooit expliciet waargenomen op de coupes. Op 20 en 30 dph komt overheen heel het telencephalon verspreide expressie voor. Doordat het Hvc reeds gevormd is op deze leeftijden, komt er bijgevolg ook expressie in deze zangkern voor. Deze verspreide expressie is in vergelijking met 30 dph, op 20 dph slechts zwak. Op 90 dph is deze verspreide expressie verdwenen. Er is tevens een sterke expressie van TR β -mRNA terug te vinden in de Purkinjecellaag van het cerebellum.



Figuur 17: Signaaldetectie van TR β -mRNA in telencephalon van mannelijke zebrafinken, waarop RA gelegen is met links telkens AS, rechts S – A) AS-coupe: 30 dph. Expressie in het RA (aangeduid met pijl) is hier minder duidelijk zichtbaar, enerzijds door sterke achtergrondkleuring, anderzijds door de scheur in het weefsel ter hoogte van de RA. Op de S-coupe is geen signaal aanwezig B) AS-coupe: 40 dph. Expressie in het RA (aangeduid met pijl). S-coupe geen signaal C) AS-coupe: 50 dph. Expressie in het RA (aangeduid met pijl). Niet aanwezig bij de S-coupe. D) AS-coupe: 90 dph. Geen expressie meer in RA (aangeduid met pijl) Hier is eerder een bruinige kleur terug te vinden. Terwijl expressie paars-blauw kleurt van de NBT-BCIP. Op de S-coupe is eveneens de kern zichtbaar, maar ook meer bruin gekleurd. Dit bewijst eveneens dat er in de AS-coupe geen expressie is.

In figuur 17 wordt expressie weergegeven in de RA-zangkern op verschillende leeftijden. Op 90 dph wordt eveneens een duidelijk afgelijnde kern waargenomen. Hier is echter geen signaal terug te vinden.

De intensiteit van de waargenomen signalen worden in tabel 3 weergegeven met een semi-kwantitatieve score. Aangezien enkel op caudale coupes getest werd, worden in tabel 3 enkel de scores weergegeven voor expressie in het RA en het HVC. Echter, enkel in het RA werd 'afgelijnde' expressie gevisualiseerd. Op 20 dph werd ter hoogte van deze zangkern een meer diffuus expressiepatroon gedetecteerd, welke het RA niet volledig aflijnt. Ook op 30 dph werd signaal gedetecteerd in het RA, maar t.o.v. het omliggende weefsel en de coupes van 40 en 50 dph was dit signaal slechts zwak. Op 90 dph is het signaal volledig verdwenen.

Tabel 3: Semi-kwantitatieve score toegekend aan het signaal van de TR β AS-probe in het RA en HVC van de zebrafink. Enkel in het RA werd afgelijnde expressie teruggevonden. Door de verspreide expressie komt ook expressie in het HVC voor. Met ++: zeer sterke expressie, +: sterke expressie, +/-: zwakke expressie, -: geen expressie detecteerbaar.

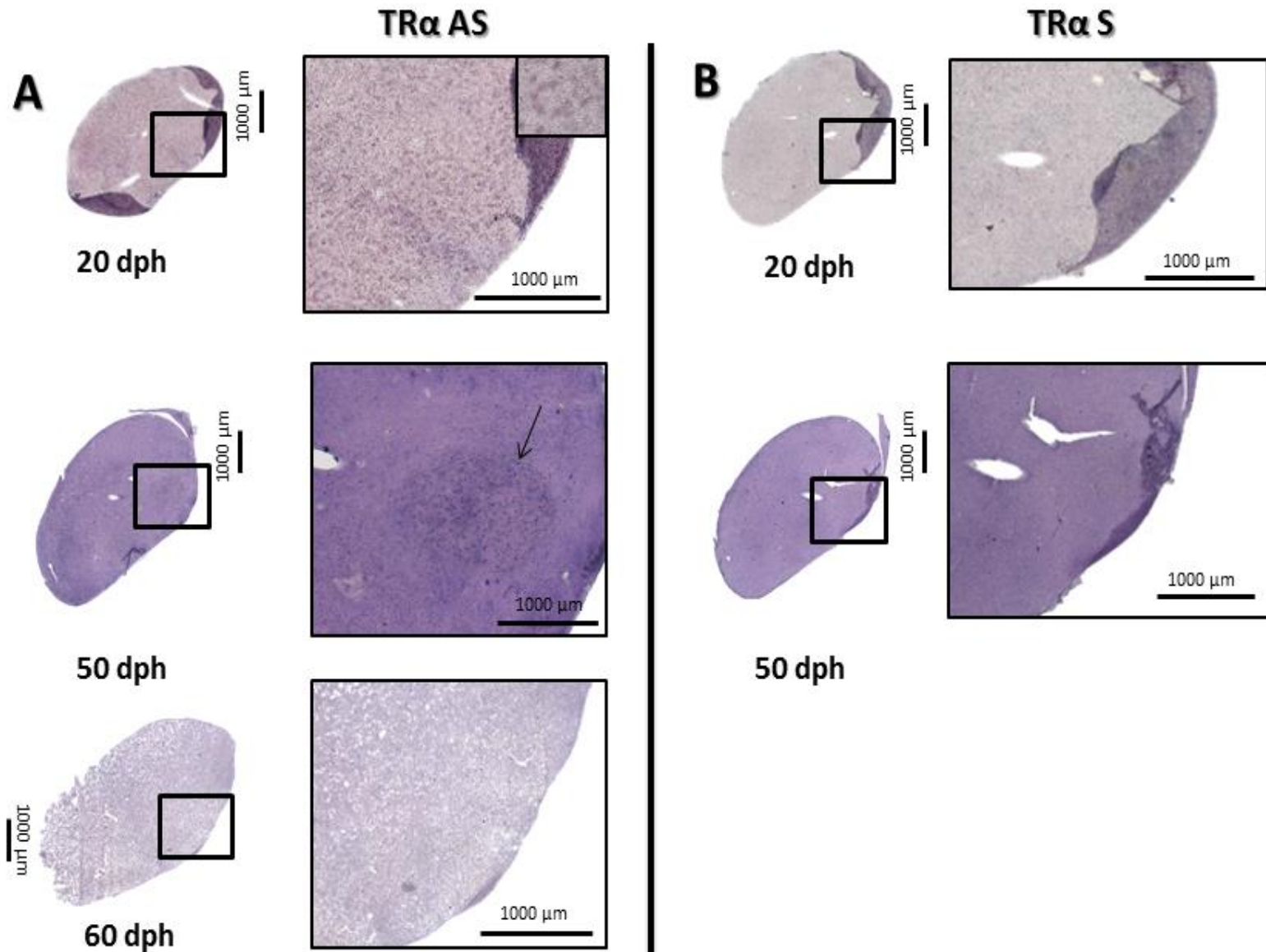
		Zangkern	
		RA	HVC
Leeftijd (dph)	20	+/-	+/-
	30	+/-	+
	40	+	-
	50	+	-
	90	-	-

3.4 *In situ* hybridisatie TR α

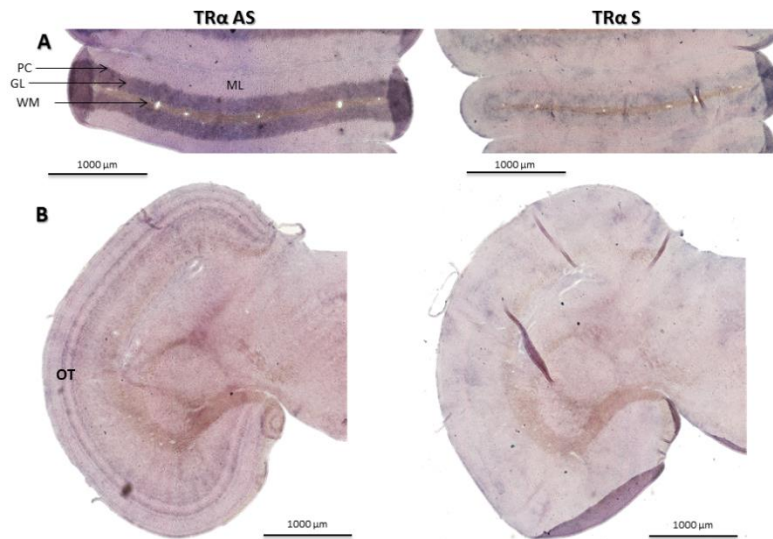
Zowel voor alle leeftijden van de mannelijke als van de vrouwelijke zebrafinkhersenen werden ISH's uitgevoerd om de gentranscripten van *THRA* te lokaliseren. Door de grote hoeveelheid van afbeeldingen die hier getoond moeten worden, worden telkens slechts representatieve coupes weergegeven. Voor de overige coupes wordt naar het addendum verwezen.

Op alle leeftijden, behalve de adulte, treedt er bij de mannelijke zebrafinken een verspreid signaal op, dat naarmate toenemende leeftijd ook geconcentreerd voorkomt in het RA en al terug verdwenen is op 60 dph (zie figuur 18). Op deze leeftijd is het verspreide signaal wel nog terug te vinden, maar kon geen signaal in het RA waargenomen worden. Door de groei van de neuronen in deze kern komen de cellen geconcentreerd voor en is achtergrondkleuring (zie bruine kleur) mogelijk. Het verspreide signaal in het telencephalon houdt wel aan, ook met toenemende leeftijd. Naast het RA werd in geen enkele andere zangkern 'afgelijnde' expressie waargenomen. Maar aangezien verspreide expressie zowel rostraal (addendum figuur A3) als caudaal in de hersenen voorkomt, is op deze leeftijden eveneens in de overige zangkernen expressie aanwezig (zie tabel 4). In de granulaire en moleculaire laag van het cerebellum en in het optisch tectum is dan weer sterk expressie terug te vinden tot en met de adulte leeftijd (zie figuur 19). Dit is ook het geval bij de coupes van de vrouwelijke hersenen (addendum figuur A4). Het signaal dat terug werd gevonden, nam een cirkelvormig patroon aan. Dit wijst op de aanwezigheid van het TR α -mRNA rond de nucleus van de cellen. Heel typerend aan de

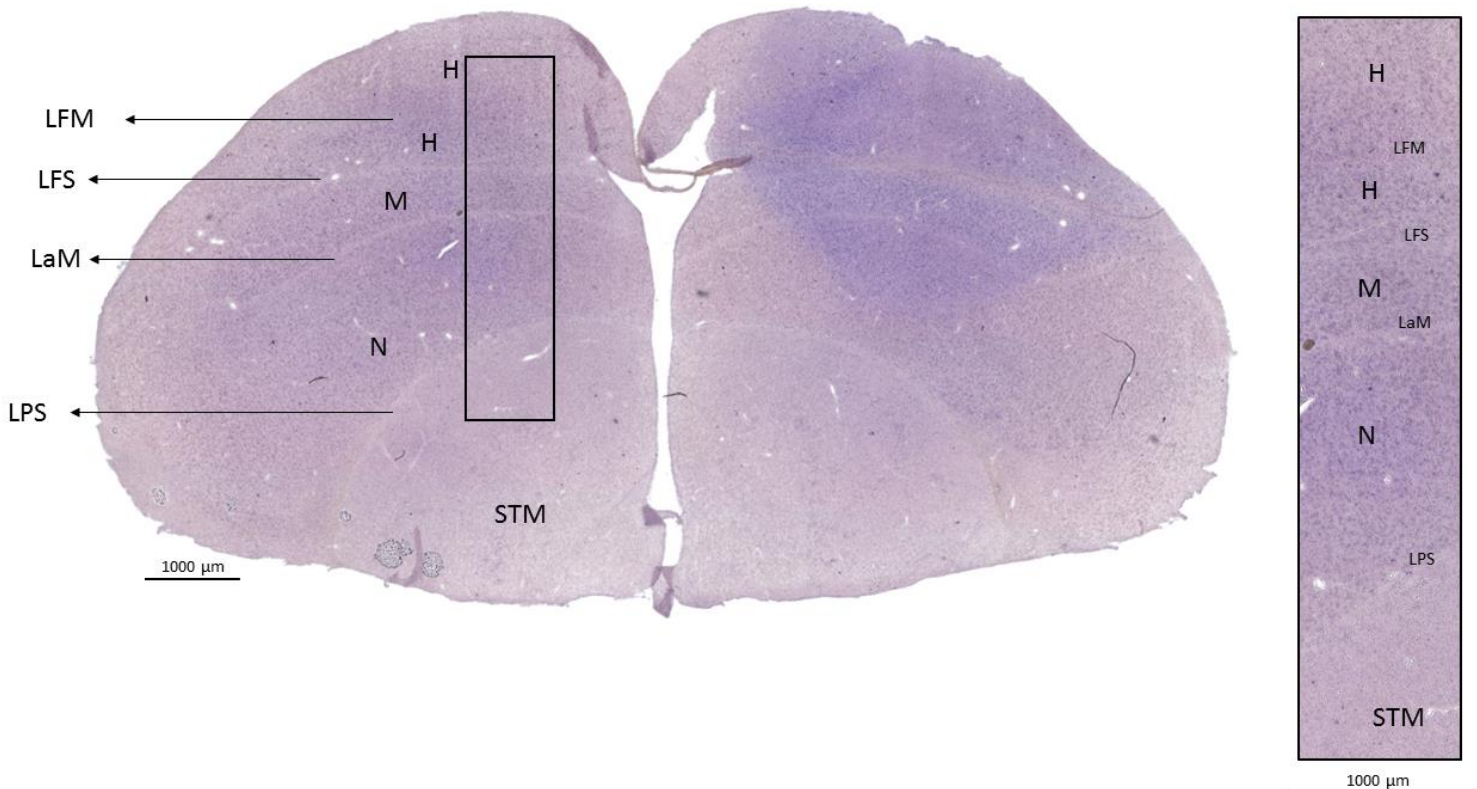
rostrale coupes is dat de verspreide expressie sterker is in het nido-, meso- en hyperpallium (respectievelijk N, M en H) en in het mediale striatum (STM: striatum mediale) minder sterk aanwezig is (figuur 20). Aangezien Area X zich in STM ontwikkelt, is de expressie in Area X over het algemeen ook zwakker, zoals uit tabel 4 kan afgeleid worden.



Figuur 18: Signaaldetectie van TRα-mRNA in telencephalon van mannelijke zebrafinken, waarop RA gelegen is – A) AS-coups op 20, 50 en 60 dph. B) S-coups op 20, 50. Op 20 dph is verspreide expressie waarneembaar bij de AS-coups t.o.v. de resp. S-coupe. Op 50 dph wordt in de AS-coupe signaal gedetecteerd in de RA-kern (zie pijl). De 60 dph-coupe vertoont geen expressie in de AS-coupe. De schijnbare expressie in RA is achtergrondkleuring (bruin gekleurd). De S-coupe van 60 dph is niet beschikbaar. Deze is verloren gegaan gedurende het experiment. Op de AS-coupe van 20 dph is duidelijk het cirkelvormig expressiepatroon terug te vinden (zie insert).

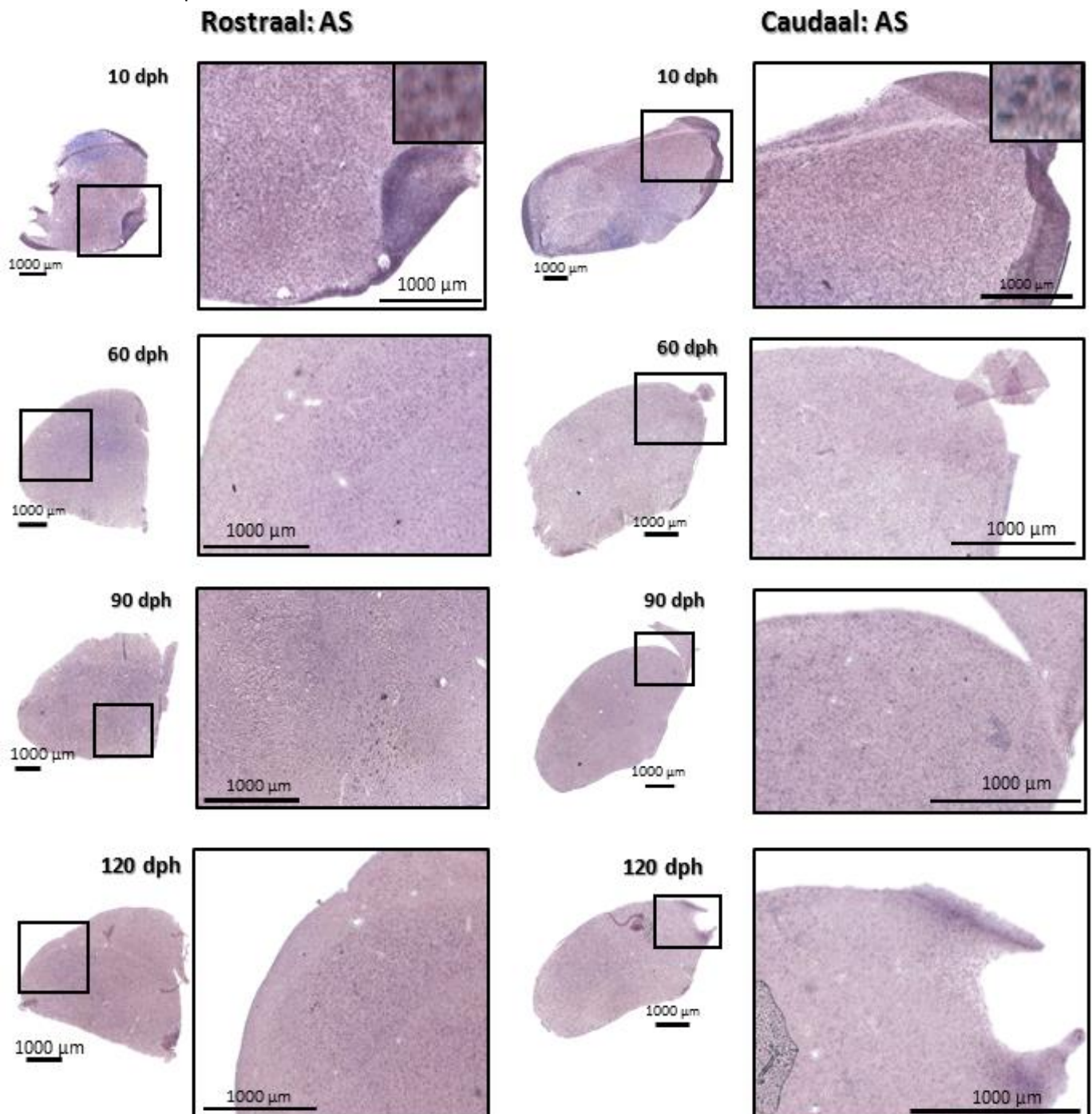


Figuur 19: Signaaldetectie van TR α -mRNA in het cerebellum (A) en de optische lob (B) van een 20 dph mannelijke zebrafink – A) Cerebellum met links de AS-coupe en rechts de S-coupe. Hier is sterk expressie terug te vinden in de granulaire laag (GL) en ook lichte expressie in de moleculaire laag (ML). Of er eveneens expressie is in de Purkinjecellaag (PC) is, is niet met zekerheid geweten. B) Optische lob met links de AS-coupe en rechts de S-coupe. In het optisch tectum (OT) is sterke expressie waarneembaar i.v.m. de S-coupe.



Figuur 20: Detectie van TR α -mRNA in 60 dph vrouwelijke zebrafink – Hier kunnen de verschillende rostrale hersengebieden duidelijk onderscheiden worden. Met H: hyperpallium, M: mesopallium, N: nidopallium, STM: striatum mediale, LFM: lamina frontalis suprema, LFS: lamina frontalis superior, LaM: lamina mesopallium, LPS: lamina palio-subpallialis. Rechts kan een uitvergroting worden teruggevonden. Deze figuur is representatief voor de mannelijke coupes (figuur A3).

In alle vrouwelijke hersenpreparaten, behalve 40 dph, werd een sterk verspreide expressie teruggevonden (zie figuur 21). Daaruit kan afgeleid worden dat TR α tot expressie komt in het HVC, RA en LMAN, maar niet in Area X aangezien vrouwelijke zebrevinken deze niet bezitten. Over de 40 dph-coupees kan geen uitsluitsel gegeven worden, daar het weefsel te sterk verkleurd was (addendum figuur A5). Aangezien voor de vrouwelijke coupes nooit een ISH opgestart werd met de S-probe is er geen enkel S-coupee beschikbaar.



Figuur 21: Signaaldetectie van TR α -mRNA in telencephalon van vrouwelijke zebrevinken, zowel op de rostraal als de caudaal gelegen coupes op 10, 60, 90 en 120 dph. – Links worden steeds een meer rostrale telencephalonhelft van de AS-coupees weergegeven. Bij alle vier de leeftijden komt hier een verspreide expressie voor. Rechts worden steeds een meer caudale telencephalonhelft van de AS-coupees weergegeven. Bij alle vier de leeftijden komt hier een verspreide expressie voor. Op de rostrale coupe van 90 dph is de expressie minder duidelijk waarneembaar. Op de caudale coupe van dezelfde leeftijd, is het signaal wel duidelijk. In de inserts (20 dph) is het cirkelvormige patroon waarneembaar.

De intensiteit van de waargenomen signalen, die hierboven werden besproken, worden in tabel 4 weergegeven met een semi-kwantitatieve score.

Tabel 4: Semi-kwantitatieve score toegekend aan het signaal van de TR α AS-probe in de zanghersenkernen van zowel de mannelijke (M) als de vrouwelijke (V) zebra-vink. Enkel op 40 en 50 dph wordt afgelijnde expressie in het RA waargenomen bij de mannelijke vogels, vandaar ++. Op de overige leeftijden werd telkens verspreide expressie waargenomen, waardoor ook in de andere zangkernen expressie aanwezig is. Aangezien Area X zich ontwikkelt in een gebied (STM) waar t.o.v. het omliggende weefsel het signaal minder intens is, wordt de score met +/- weergegeven, vanaf 40 dph. Vanaf 60 dph daalt de intensiteit van de expressie wel bij de mannelijke individuen, en verdwijnt de verspreide expressie op adulte leeftijd. Met ++: zeer sterke expressie, +: sterke expressie, +/-: zwakke expressie, -: geen expressie detecteerbaar, ?: geen uitsluitel over te geven.

		Zangkern						
		Area X	LMAN		RA		HVc	
		M	M	V	M	V	M	V
Leeftijd (dph)	10	++	++	++	++	++	++	++
	20	+	+	+	+	+	+	+
	30	+	+	+	+	+	+	+
	40	+/-	+	?	++	?	+	?
	50	+/-	+	+	++	+	+	+
	60	+/-	+/-	+	-	+	+/-	+
	90	+/-	+/-	+	-	+	+/-	+
	120 (adult)	-	-	+	-	+	-	+

In tabel 5 kan een semi-kwantitatieve score teruggevonden worden omtrent de verspreide expressie die wordt waargenomen in zowel de mannelijke als de vrouwelijke coupes. Zoals reeds vermeld is er in de mannelijke hersenweefsels een afname waar te nemen in de verspreide expressie. Vanaf dag 60 is het signaal zwakker, maar nog steeds aanwezig. Op 120 dph is het signaal wel verdwenen. Bij de vrouwelijke coupes daarentegen blijft het verspreide expressiepatroon aanhouden. Zelfs op 120 dph is een verspreid signaal duidelijk zichtbaar in het telencephalon.

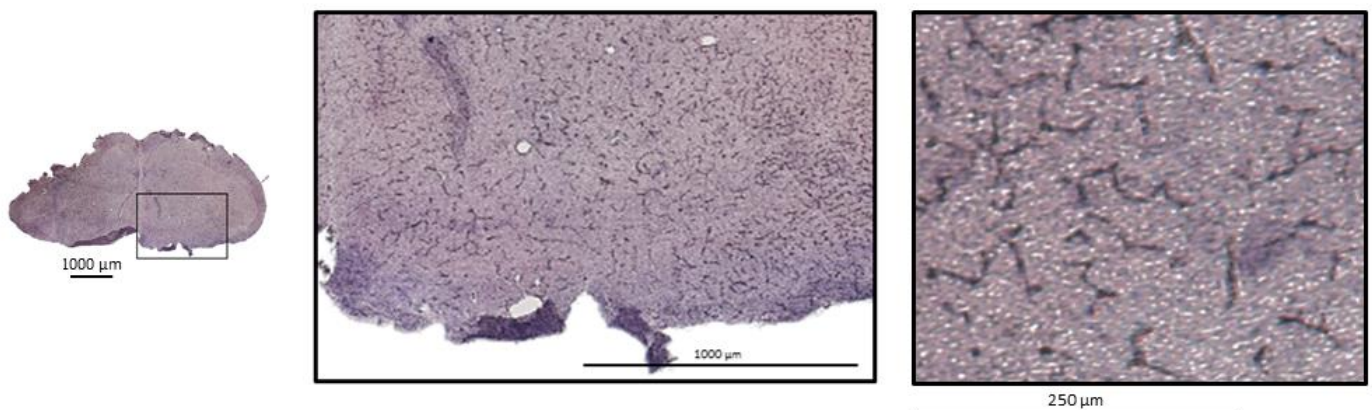
Tabel 5: Voorkomen van verspreide expressie in de TR α AS-probe coupes van zowel de mannelijke (M) als de vrouwelijke (V) zebra-vink. Op alle leeftijden is verspreide expressie waar te nemen. De intensiteit ervan daalt vanaf 60 dph bij mannelijke vogels en is op 120 dph verdwenen. Bij vrouwtjes blijft de expressie aanhouden. Met ++: zeer sterke expressie, +: sterke expressie, +/-: zwakke expressie, -: geen expressie detecteerbaar, ?: geen uitsluitel over te geven.

		Geslacht	
		M	V
Leeftijd (dph)	10	++	++
	20	+	+
	30	+	+
	40	+	?
	50	+	+
	60	+/-	+
	90	+/-	+
	120 (adult)	-	+

3.5 *In situ* hybridisatie D2

Zowel voor de mannelijke als voor de vrouwelijke zebrevinkhersenen, op alle leeftijden, werd een ISH uitgevoerd om de gentranscripten van *DIO2* te onderzoeken. Er worden telkens representatieve coupes weergegeven. Voor de overige coupes wordt naar het addendum verwezen. Ook wordt telkens het telencephalon getoond, tenzij anders vermeld, aangezien de cruciale zangkernen zich hier bevinden.

Omdat de vorm van het signaal voor deze ISH heel anders was dan bij de voorgaande resultaten (zie cirkelvormig), worden detailfoto's van de coupe van 10 dph weergegeven in figuur 22. Het sterk verspreide lijnvormige signaal dat waarneembaar is in het broze weefsel van 10 dph-coupes lijkt geen specifieke zangkernen af. Er is geen 10 dph S-coupe beschikbaar.

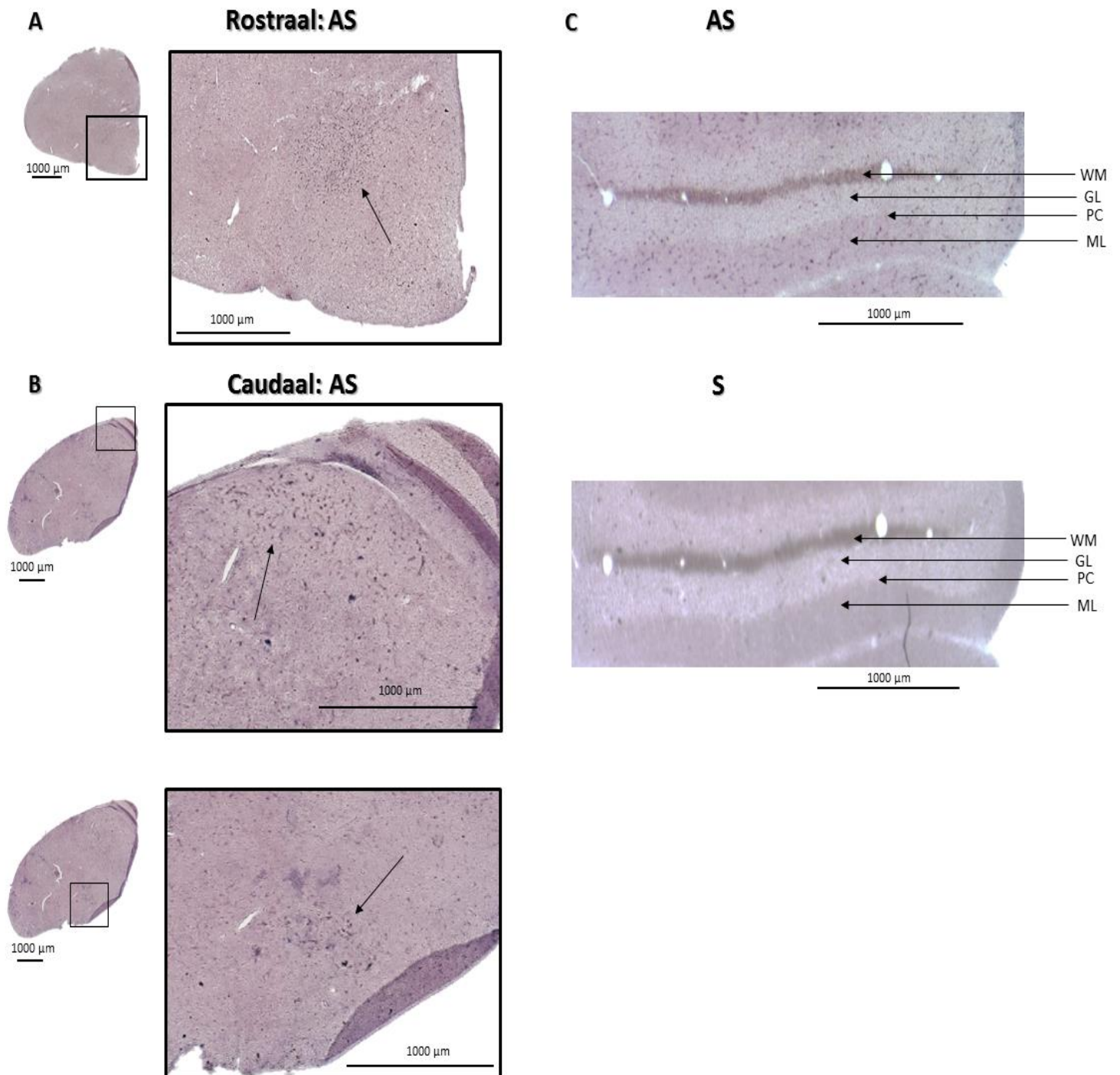


Figuur 22: Signaaldetectie van D2-mRNA in mannelijke zebrevinkhersenen 10 dph – Links: AS-coupe met een sterk verspreid signaal, waarbij geen afgelijnde zangkernen waarneembaar zijn. Midden en rechts: Detailfoto's van het lijnvormige signaal.

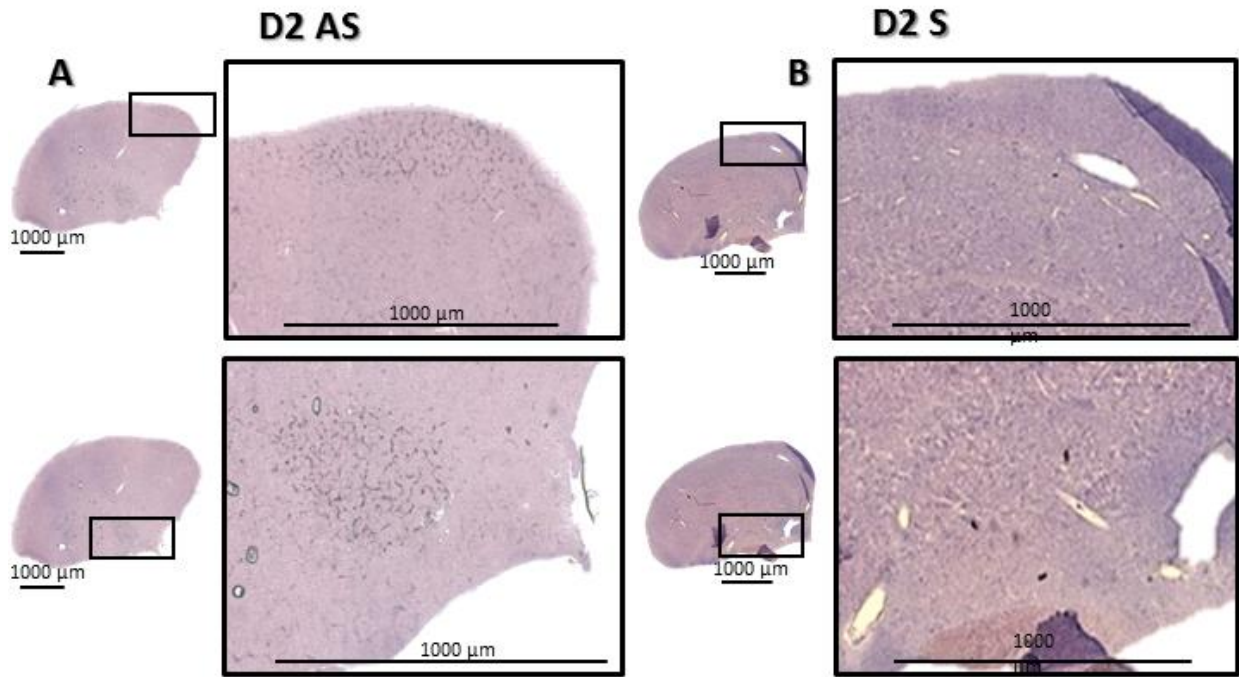
Vanaf 20 dph is het signaal in de zangkernen van de mannetjes onderscheidbaar van het signaal in het omliggende hersenweefsel (zie figuur 23 A) door het meer dense voorkomen van neuronenuitend in deze zangkernen t.o.v. het omliggende weefsel. Verder werd 'afgelijnde' expressie waargenomen in alle zangkernen, behalve LMAN. Het signaal in het RA is op 90 dph reeds verzwakt. In een poging om een gelijkaardig signaal te verkrijgen als op andere leeftijden in deze zangkern, werden deze coupes dubbel zo lang gekleurd (zie figuur 25). Ook voor het Hvc op 30 dph werd geen expressie terug gevonden. Nochtans werd op 20 dph en 40 dph wel deze hersenkern teruggevonden. Voor de rostrale kernen op 60 dph kan geen uitspraak worden gedaan, aangezien hiervan geen coupes beschikbaar zijn. Het niet terug vinden van signaal bij beide leeftijden ligt mogelijks aan het feit dat de zangkernen niet op de uitgekozen coupes lagen. Bijgevolg is over deze zangkernen op beide leeftijden geen uitsluitel te geven. Het teruggevonden signaal op 40 dph is het sterkst in het Hvc en RA. Voor deze beide kernen is een uitvergroting terug te vinden in figuur 24. Op deze leeftijd neemt eveneens het verspreide signaal af en is verdwenen op 50 dph. Vanaf deze leeftijd wordt enkel nog maar 'afgelijnde' expressie terug gevonden. Op 120 dph wordt in geen enkele zangkern expressie waargenomen. Voor de overige afbeeldingen, zie addendum (A6 en A7).

Daarnaast is ook in het cerebellum duidelijk signaal terug te vinden in zowel de moleculaire als de granulaire laag vanaf 20 dph (zie figuur 23 B). Dit patroon is terug te vinden tot 50 dph. Over de latere leeftijd van 60 dph valt geen uitsluitel te geven, aangezien bij deze coupes het cerebellum niet

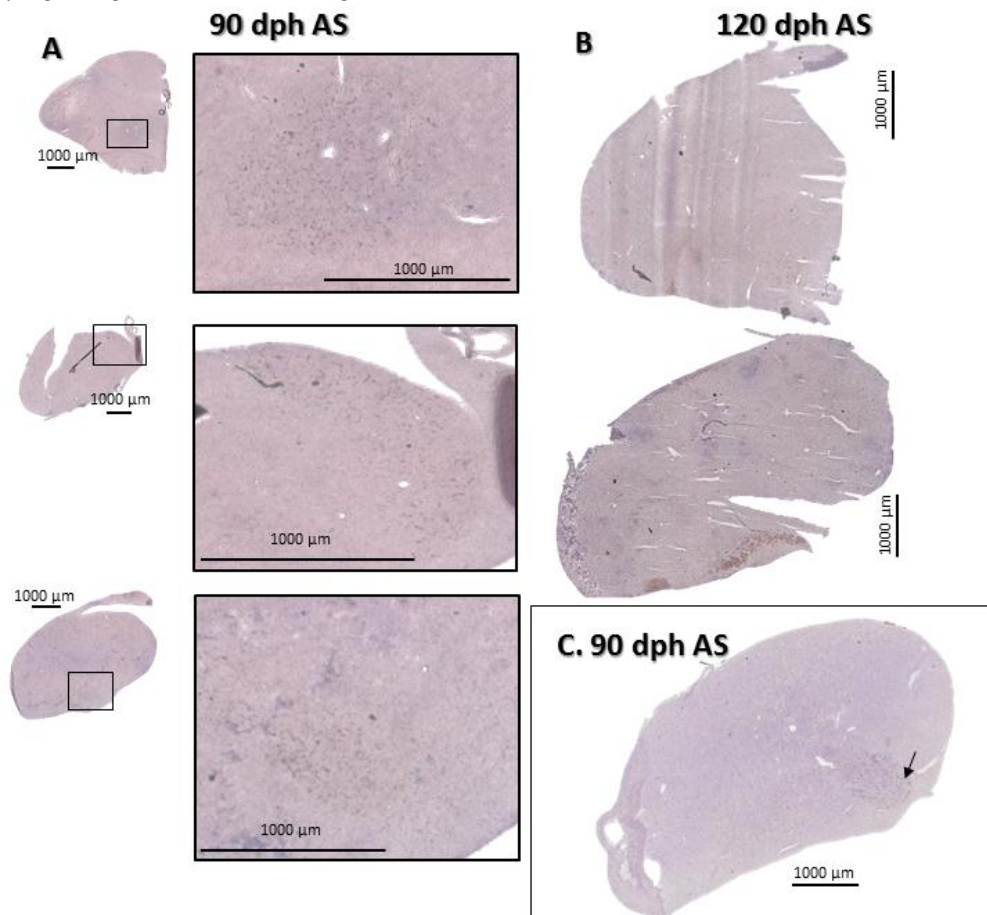
bewaard is gebleven gedurende het uitvoeren van de ISH. Op 90 dph is deze expressie niet meer aanwezig (zie addendum figuur A8).



Figuur 23: Signaaldetectie van D2-mRNA in mannelijke zebrafinkhersenen 20 dph met AS-probe – A) AS-coupe: Weergave van Area X rostraal in de hersenen (zie pijl). B) Weergave van zowel RA (onder) als het HVc (boven) - aangeduid met pijlen. C) Expressie in de moleculaire en granulaire laag van het cerebellum met boven de AS-coupe en onder de S-coupe.

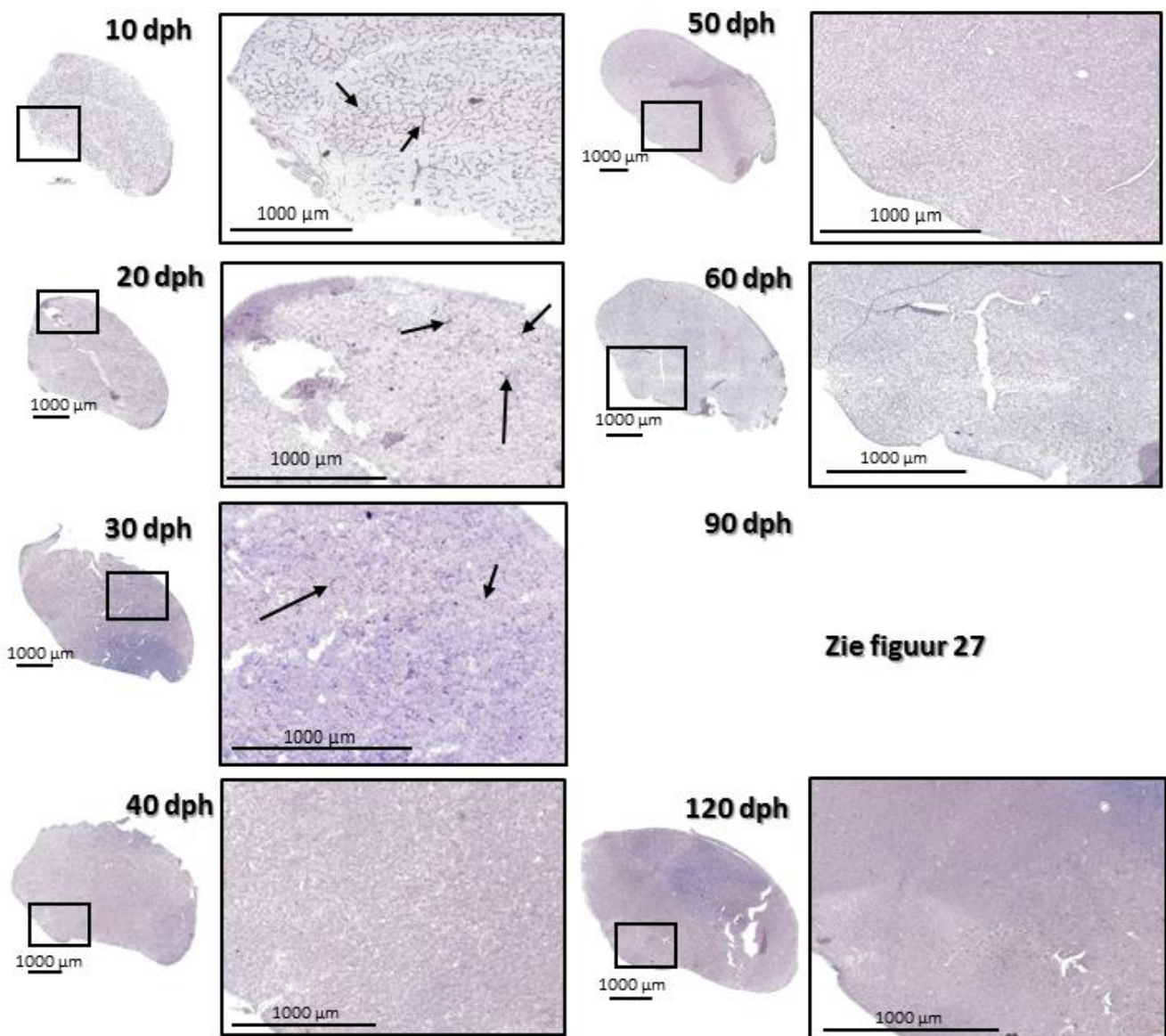


Figuur 24: Signaaldetectie van D2-mRNA in de caudale delen van mannelijke zebravinkhersenen op 40 dph – A) AS-coups. Boven: Signaal in het HVC. Onder: Signaal in het RA. In het omliggende telencephalon is ook een zwak signaal terug te vinden. B) S-coupe: geen signaal in HVC en RA terug te vinden.

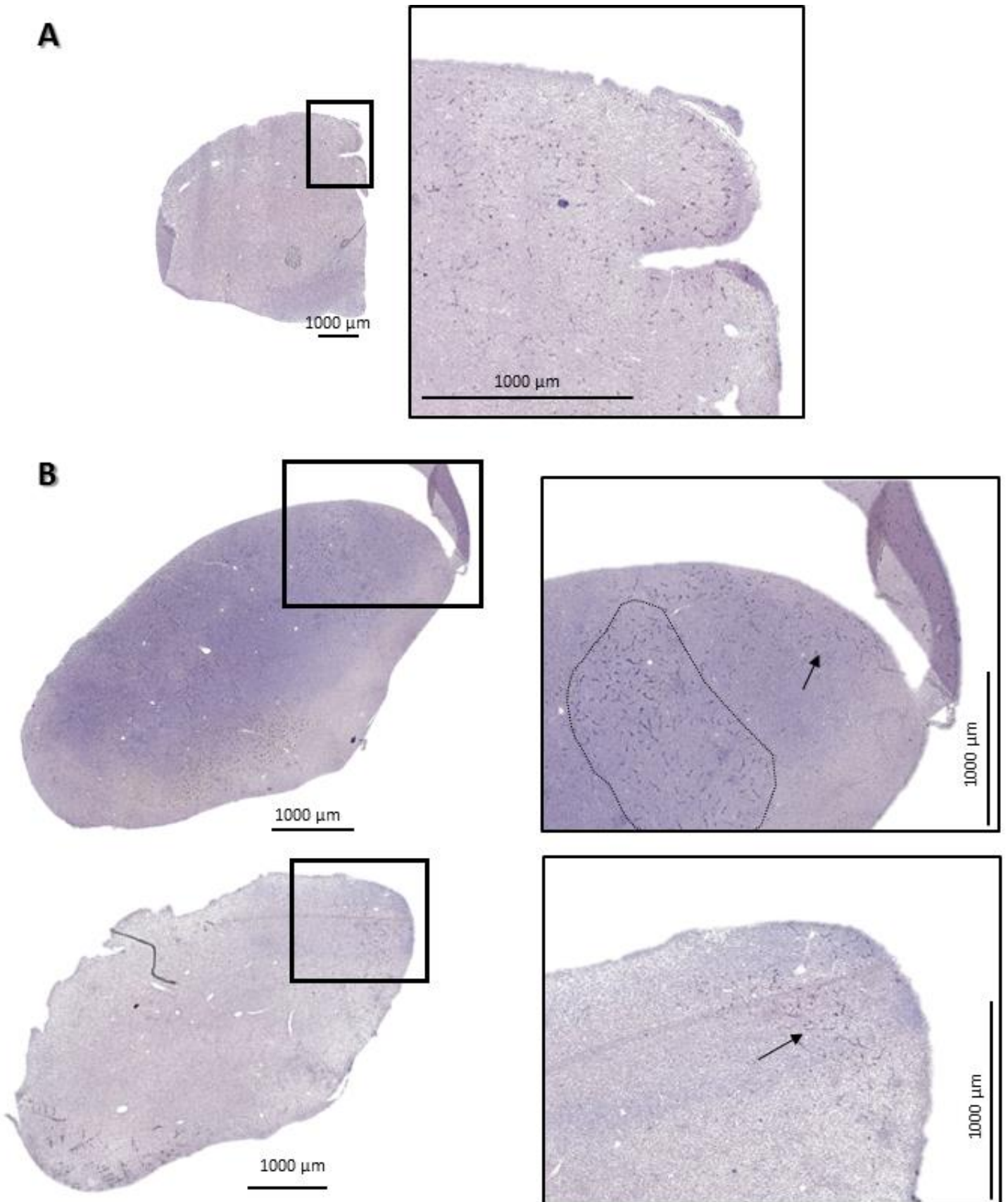


Figuur 25: Signaaldetectie van D2-mRNA in mannelijke zebravinkhersenen op 90 en 120 dph – A) AS-coups op 90 dph. De eerste coupe geeft een duidelijk signaal weer in Area X. De twee onderste coupes zijn meer caudale coronale coupes. Op de tweede coupe is het HVC zichtbaar. De derde coupe vertoont lichte expressie in het RA. B) AS-coups van 120 dph. Hier is in geen enkele zangkern expressie meer terug te vinden. C) Deze 90 dph coupe komt uit een ISH welke uitgevoerd werd op fresh frozen coupes. Hier is duidelijk signaal in het RA terug te vinden (zie pijl).

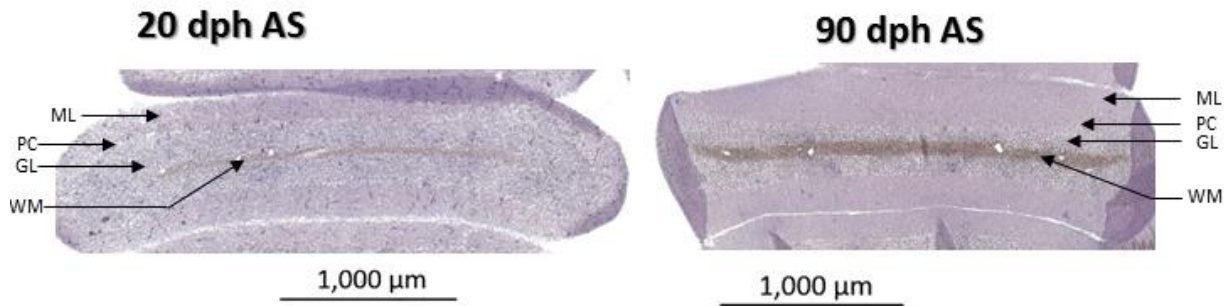
In de coupes van de vrouwelijke zebrovinken waarop ISH werd uitgevoerd om D2-expressie op te sporen, werd verspreide expressie teruggevonden in de jongere leeftijden (zie figuur 27). Echter, in de coupes van 90 dph werd een expressiepatroon waargenomen in een gebied waar geen gekende hersenkernen liggen. Mogelijks is eveneens het Hvc hier zichtbaar, maar dit kan niet met zekerheid gezegd worden (zie figuur 28). Op 10 dph werd een intens signaal waargenomen, waar bij 20 en 30 dph slechts zwakke expressie waargenomen werd verspreid over het hele telencephalon. In de overige coupes werd nergens expressie opgemerkt, behalve op 90 dph. Ook in de ML en GL van het cerebellum bij 20 dph is expressie terug te vinden (zie figuur 29). Bij de overige coupes is het cerebellum niet bewaard gebleven, behalve bij deze van 90 dph. Op deze coupes is het signaal in het cerebellum echter verdwenen. Voor de rostrale coupes wordt naar het addendum verwezen (figuur A9).



Figuur 26: Signaaldetectie van D2-mRNA in vrouwelijke zebrovinkhersenen op 10, 20, 30, 40, 50, 60 en 120 dph – Bij de 10 dph is er duidelijk een sterk verspreid signaal terug te vinden doorheen het telencephalon. De pijlen wijzen lijnvormige expressie aan. Op de overige coupes is het signaal niet zo sterk zichtbaar, maar wel aanwezig. Het signaal dat het sterkst zichtbaar is wordt met een pijl aangeduid. Vanaf 40 dph word geen expressie meer waargenomen, tot op 90 dph (deze zijn apart weergegeven in figuur 27). De coupes die hier afgebeeld zijn, zijn caudaal gelegen in de hersenen. Deze werden gekozen omdat enkel in de meer caudaal gelegen hersendelen een expressiepatroon werd teruggevonden (zie figuur 27).



Figuur 27: Signaaldetectie van D2-mRNA in vrouwelijke zebravinkhersenen op 90 dph – A) Hier wordt een rostraal gelegen coupe weergegeven. Er is expressie in de periferie van het weefsel terug te vinden. **B)** Links worden overzichtsfoto's getoond van twee opeenvolgende coupes (met slechts een verschil van 360 µm). De uitvergrotingen ervan worden rechts weergegeven waar telkens met een pijl het HVC wordt aangeduid. De onbekende kern wordt afgebakend met een stippenlijn.



Figuur 28: Signaaldetectie van D2-mRNA in het cerebellum van vrouwelijke zebrafinkhersenen op 20 en 90 dph – Enkel op 20 dph is er expressie op te merken in de granulaire en moleculaire laag van het cerebellum. Op de overige leeftijden is het cerebellum niet bewaard gebleven. Op 90 dph is de expressie niet meer aanwezig.

De semi-kwantitatieve scores over het signaal in de zangkernen van zowel mannelijke als vrouwelijke zebrafinken zijn terug te vinden in tabel 6. Expressie werd niet meer gedetecteerd op 120 dph.

Tabel 6: Semi-kwantitatieve score toegekend aan het signaal van de D2 AS-probe in de zanghersenkernen van zowel de mannelijke (M) als de vrouwelijke (V) zebrafink. Doordat verspreide expressie bij de mannetjes voorkomt tot 40 dph is er eveneens expressie in de LMAN. Voor het ontbrekende signaal in Hvc op 30 dph, LMAN en Area X op 60 dph wordt het signaal weergegeven met ‘?’. Dit doordat in voorgaande en achterliggende coupes wel deze hersenkernen terug te vinden waren. Het signaal is het sterkst in het RA en Hvc op 40 dph, vandaar ‘++’. Tot 30 dph is er bij de vrouwtjes verspreide expressie terug te vinden, waardoor ook expressie aanwezig is in de drie zangkernen van de vrouwelijke zebrafinken. Met ++: zeer sterke expressie, +: sterke expressie, +/-: zwakke expressie, -: geen expressie detecteerbaar, ?: geen uitsluitel over te geven.

		Zangkern						
		Area X	LMAN		RA		Hvc	
		M	M	V	M	V	M	V
Leeftijd (dph)	10	++	++	++	++	++	++	++
	20	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-
	30	+	+	+/-	+	+/-	?	+/-
	40	+	+/-	-	++	-	++	-
	50	+	-	-	+	-	+	-
	60	?	?	-	+	-	+	-
	90	+	-	-	+/-	-	+	+
	120 (adult)	-	-	-	-	-	-	-

In tabel 7 kan een semi-kwantitatieve score teruggevonden worden omtrent de verspreide expressie die wordt waargenomen in zowel de mannelijke als de vrouwelijke coupes. Zoals bij de coupes waarin naar TR α -signaal werd gezocht, is ook in dit geval een afname op te merken in verspreide expressie met toenemende leeftijd bij de mannelijke coupes. Vanaf 40 dph zwakt het verspreide signaal al af en op 50 dph is het signaal niet meer terug te vinden. Deze trend is eveneens waar te nemen bij de vrouwelijke coupes. Hier is geen verspreid signaal meer te bespeuren na 30 dph.

Tabel 7: Voorkomen van verspreide expressie in de D2 AS-probe coupes van zowel de mannelijke (M) als de vrouwelijke (V) zebrevink. De verspreide expressie die bij de vrouwtjes aanwezig is, is vanaf 20 dph slechts zwak en verdwijnt reeds op 40dph. Bij de mannelijke individuen is er duidelijk verspreide expressie aanwezig tot 30 dph. Op 40 dph is dit nog maar zwak aanwezig, en helemaal verdwenen op 50 dph. Met ++: zeer sterke expressie, +: sterke expressie, +/-: zwakke expressie, -: geen expressie detecteerbaar.

		Geslacht	
		M	V
Leeftijd (dph)	10	++	++
	20	+	+/-
	30	+	+/-
	40	+/-	-
	50	-	-
	60	-	-
	90	-	-
	120 (adult)	-	-

3.6 High-throughput ISH

Naast de enkelvoudige ISH's, waarvan de resultaten hierboven reeds werden besproken, werden ook verschillende *high-throughput* ISH uitgevoerd. Hierbij werden simultaan meerdere coupes behandeld in dezelfde well m.b.v. mandjes. Er werden hiervoor zowel metalen als plastic mandjes ontwikkeld en uitgetest. Er traden verschillende problemen naar voor met deze *high-throughput* ISH: de vloeistof liep niet goed doorheen de mandjes, de coupes bleven aan elkaar kleven waardoor ongelijkmatige kleuring optrad en de coupes brozer werden en de coupes bleven kleven in de lijm, waarmee het zeefje op het mandje werd bevestigd. Door de hoge temperatuur gedurende de hybridisatie wordt deze lijm terug meer vloeibaar en kleven ze in de lijm waardoor sommige coupes dusdanig tegen de zeef van het mandje werden geperst dat het patroon hiervan in de coupes gedrukt stond. Wegens deze inconsistente resultaten werd niet verdergegaan met de *high-throughput* ISH en werd de voorkeur gegeven aan de enkelvoudige ISH.

DISCUSSIE

De doelstelling van deze thesis is het onderzoeken van de expressiepatronen van TH-regulerende genen in het ontwikkelende zangcontrolesysteem van de zebra-vink. Via ISH werden de expressiepatronen van vier verschillende genen (*MCT8*, *THRB*, *THRA* en *DIO2*) in vier specifieke zangkernen (Area X, LMAN, HVc en RA) bestudeerd gedurende verschillende kritieke fasen van het zangleerproces. Voor de gentranscripten van *THRA* en *DIO2* werd tevens een vergelijking gemaakt tussen mannelijke en vrouwelijke hersencoupees.

1. IHC-kleuring

Het intense groene signaal dat werd teruggevonden bij de coupes waarop naar D2-proteïnen werd gezocht, is hoogstwaarschijnlijk te wijten aan een teveel aan fluoresceïne isothiocyanaat (FITC) of antilichaam (Ab). Daarom wordt aangeraden dat wanneer deze IHC opnieuw wordt uitgevoerd, de Ab's of FITC sterker te verdunnen. De IHC's die uitgevoerd werden om de TR's te visualiseren vertoonden in tegenstelling tot deze voor D2 een veel zwakker verspreide kleuring overheen het weefsel. Er kon eveneens niet gedifferentieerd worden tussen TR α en TR β bij het signaal, doordat het commerciële Ab op een epitoom bindt dat bij beide receptoren structureel gelijkaardig is. Daarenboven was geen zekerheid over de kwaliteit van de commerciële Ab's die voorhanden waren, aangezien andere experimenten in het laboratorium met deze antilichamen andere resultaten gaven. Onder andere door deze inconsistente resultaten konden geen besluiten getrokken worden uit de IHC en wordt er geen fotomateriaal getoond.

Eenzijds omdat er niet voldoende glaasjes met *fresh frozen* coupes ter beschikking waren en anderzijds door de inconsistente resultaten die behaald werden met de IHC, werd er geopteerd verder te gaan met ISH voor het onderzoeken van de gentranscripten van bepaalde TH-regulerende genen. Deze techniek bracht meer veelbelovende resultaten naar voor.

2. *In situ* hybridisatie met DIG-gemerkte RNA-probes

Wegens vastgestelde problemen met ISH op zebra-vinkweefsel bij eerdere experimenten werd er in deze thesis gebruik gemaakt van het protocol ontwikkeld door Carleton *et al.* (2014) dat specifiek gericht is op ISH voor zebra-vinkweefsels. Ook met dit protocol werden na uitvoering van elke afzonderlijke ISH sterk variërende resultaten verkregen. Dit had als gevolg dat het niet mogelijk was de expressie te kwantificeren omwille van enerzijds sterke intensiteitsverschillen tussen de verschillende coupes van één plaat (en dus van eenzelfde gen) en anderzijds doordat het signaal/achtergrond-ratio niet constant was overheen de verschillend uitgevoerde ISH's.

Er werden ISH's uitgevoerd voor vier verschillende TH-regulerende genen: *MCT8*, *THRB*, *THRA* en *DIO2*. Nadat de coupes werden toegelegd, werd aan de hand van de eerder beschreven Nissl-

kleuringen en de stereotaxische atlas van de zebra-vink, ontwikkeld door Nixdorf-Bergweiler en Bischof (2007), nagegaan in welke zangkernen de gedetecteerde signalen voorkomen.

2.1 *In situ* hybridisatie MCT8

Voor een eerste test met de MCT8-probes werden enkel de jongste leeftijden, 10 en 20 dph, getest. Deze leeftijden werden uitgekozen omdat reeds geweten is dat deze transporter sterk aanwezig is gedurende de embryonale ontwikkeling van de kip¹⁸. Uiteraard zijn kippen geen zangvogels en is er een verschil in ontwikkeling tussen beide (kippen zijn nestvlinders en zebra-vinken nestblijvers), maar toch zijn de vroege *posthatch*-fasen bij de zebra-vink met de late embryonale stadia van de kip te vergelijken⁴³.

Op 10 dph werd over het hele telencephalon expressie van MCT8-mRNA waargenomen. Dit cirkelvormige signaal (zie figuur 14), waarbij de nucleus afgelijnd wordt, kwam sterk verspreid doorheen het hele weefselpreparaat voor en lijnt geen specifieke zangkernen af. Toch zijn zangkernen zoals het RA en de LMAN reeds gevormd voor de zebra-vink uitkipt⁵⁰. Op 20 dph werd eveneens verspreide expressie waargenomen. In tegenstelling tot 10 dph, kon bij de 20 dph wel een zangkern, Area X, zwak onderscheiden worden van de expressie in het omliggende weefsel (zie figuur 14). Doordat de neuronen in de zangkernen compacter op elkaar liggen en er vanuit wordt gegaan dat MCT8-expressie zich in neuronen bevindt^{18,22}, zijn zangkernen beter waarneembaar door het denser signaal. Aangezien er echter zowel rostraal als caudaal in het telencephalon nog overal verspreide expressie voorkomt, is het duidelijk dat er ook in de overige zangkernen expressie voorkomt, maar daarom niet specifiek meer dan in het omliggende weefsel. Dit geldt eveneens voor de coupes van 10 dph. MCT8 is een belangrijke TH-transporter die noodzakelijk blijkt voor neuronen van TH te voorzien, opdat de ontwikkeling van de hersenen correct kan verlopen^{18,20,21}. Wanneer er geen MCT8-transporters aanwezig zouden zijn, wordt de capaciteit om T₃ op te nemen ingeperkt¹⁸. Gezien het belang van MCT8-transporters werd verwacht dat het gen coderend voor MCT8 tot expressie zou komen op deze jonge *posthatch* leeftijden bij de zebra-vink, wat in deze thesis werd bevestigd. Daarnaast werd op 10 dph expressie terug gevonden in het optisch tectum (OT) en de nucleus *isthmi pars parvocellularis* (IPC) (zie figuur 15). Het OT is de regio in de hersenen die onmiddellijk input krijgt vanuit het oog. Het is eveneens verantwoordelijk voor het verwerken van visuele informatie en de controle van de bewegingen van het oog^{53,81}. De IPC maakt deel uit van het istmisch complex dat de visuele feedback naar het OT verzorgt⁸¹. Door de sterke expressie van het mRNA dat later tot MCT8-transporters wordt getransleerd, kan aangenomen worden dat deze transporters belangrijk zijn zodat een functioneel visueel systeem tot stand wordt gebracht. Hoogstwaarschijnlijk zorgen de MCT8-transporters voor een T₃-beschikbaarheid in de neuronen van deze gebieden, zodat TH's hun acties kunnen uitvoeren.

Om een meer uitgebreide toelichting te kunnen geven omtrent het expressiepatroon van MCT8-mRNA in het ontwikkelende zangcontrolesysteem wordt gesuggereerd eveneens oudere leeftijden te onderzoeken om de patronen in kaart te brengen. De leeftijden die hier onderzocht zijn, bevinden zich

nog maar in de sensorische fase van het zangleerproces. De vogels produceren hier zelf nog geen vocalisaties, maar slaan reeds modellen op van liederen van hun leermeester^{49,50}. Op deze leeftijden is het dus cruciaal dat reeds de auditieve baan tot stand is gekomen. Auditieve signalen komen vanuit Field L het zangcontrolesysteem binnen via het HVC. Dit is een zangkern die zich vormt na het uitkippen van de zebrevink⁵⁰. Bij beide onderzochte leeftijden werd MCT8-expressie waargenomen ter hoogte van het HVC. Wellicht zorgen MCT8-transporters in deze zangkern ervoor dat T₃ in de neuronen getransporteerd wordt. Op deze manier wordt de TH-beschikbaarheid in de neuronen gereguleerd en spelen TH's mogelijk een rol bij de aanleg van nieuwe HVC-neuronen die hun axonen naar andere zangkernen, zoals Area X, uitsturen. Deze connectie maakt deel uit van de *anterior forebrain pathway* (AFP). Deze AFP is cruciaal gedurende de vroege periodes van het leerproces, aangezien deze zangbaan instaat voor een gecontroleerde terugkoppeling. Er worden echter ook connecties tussen het HVC en het RA gevormd. Deze komen pas tot stand wanneer reeds met de sensorimotor fase gestart is vanaf 30 dph, een leeftijd die niet werd getest in deze thesis⁵⁰.

Algemeen kan besloten worden dat MCT8 cruciaal is in de vroege *posthatch* ontwikkeling van de zebrevink, niet alleen voor het zangleerproces maar eveneens voor een correcte verwerking van visuele informatie. Dit aangezien MCT8 de neuronen voorziet van het receptoractieve T₃ opdat er voldoende TH beschikbaar is in deze cellen en een correcte ontwikkeling kan plaatsvinden¹⁸. Deze resultaten stemmen overeen met de bevindingen van Geysens *et al.* (2012) en Van Herck *et al.* (2012) welke respectievelijk vermelden dat MCT8 voorkomt in de optische lobben van de kip en dat MCT8-mRNA bij de kip vanaf E4 toeneemt tot E10 over de hele hersenen.

2.2 *In situ* hybridisatie TR β

De TR β -probes werden enkel op de meer caudale hersendelen getest. Op basis van het artikel van Forrest *et al.* (1991), die vermelden dat TR β sterk in het cerebellum van de kip aanwezig is, werden de caudale coupes uitgekozen voor deze eerste test van de TR β -probes omdat op deze coupes het cerebellum ligt. Zo werd een positieve controle gecreëerd voor de werking van de AS-probe. Aangezien caudaal in de hersenen geen Area X en LMAN zijn gelegen, kunnen hier geen uitspraken over gedaan worden.

Bij de zebrevink zijn drie verschillende TH-receptoren aanwezig: TR α , TR β 0 en TR β 2. Aangezien deze twee laatste splicingvarianten van hetzelfde gen (*THRB*) zijn, kon er door hun grote sequentiegelijkenis niet tussen beide gedifferentieerd worden, en wordt er in deze thesis dus algemeen verwezen naar TR β . Deze receptor blijkt belangrijk in de latere embryonale ontwikkelingsstadia van de kip^{5,40}. Zoals reeds eerder aangehaald zijn resultaten die bij de kip zijn gevonden, toepasbaar op zebrevinken mits rekening gehouden wordt met het verschil in ontwikkeling. Forrest *et al.* (1991) haalt aan dat op E19 in het telencephalon van de kip de TR β -expressie begint toe te nemen. Dit werd eveneens waargenomen bij de zebrevink. Vanaf de jongste leeftijd, hier 20 dph (zie figuur 16), werd een graduele stijging in expressie waargenomen over het hele telencephalon met de leeftijd. Hieruit blijkt dat deze receptor in deze vroege *posthatch*-stadia cruciaal is, niet alleen specifiek in de zangkernen, maar

doorheen het hele cerebrum. Het feit dat de intensiteit van de expressie op 30 dph groter is dan op 20 dph, komt overeen met de bevindingen van Forrest *et al.* (1991): een sterker expressiepatroon naarmate een toenemende ouderdom. Eveneens was de expressie in het arcopallium op 20 dph sterker dan in het nidopallium, een patroon dat met toenemende leeftijd aanhield tot de expressie rond 50 dph meer geconcentreerd voorkwam in het RA (zie figuur 17). Op deze leeftijd was er in het omliggende weefsel geen expressie meer te vinden. Het signaal in het RA is echter wel weer verdwenen op 90 dph. Het HVC, gelegen in het nidopallium van het telencephalon, werd nooit afgelijnd gevisualiseerd. Echter, dankzij het voorkomen van verspreide expressie op de twee jongste leeftijden, kan afgeleid worden dat er in het HVC wel expressie aanwezig was. Zowel het HVC als het RA zijn cruciale zangkernen die onderdeel uitmaken van de zangmotorbaan^{49,50}. Kirn (2010) vermeldde dat reeds voor het uitkippen van de zebrafink het merendeel van het arcopallium gevormd is en de kernen gelegen in het nidopallium starten met ontwikkelen gedurende de *posthatch*-stadia. Aangezien de connecties tussen het HVC en RA zich pas vanaf 30 dph vormen, kan dit het voorkomen van verspreide expressie in het telencephalon op deze leeftijd verklaren. Er moeten receptoren aanwezig zijn in de neuronen opdat TH een correcte ontwikkeling kan verzekeren. Eveneens moet reeds met de sensorimotor fase van het zangleerproces gestart zijn, opdat deze connecties gevormd worden⁵⁰. Vorming van connecties houdt synaptogenese in. Forrest *et al.* (1991) toonden reeds aan dat TR β 's een cruciale rol spelen in de synaptogenese in het cerebellum. Mogelijks is deze bevinding te extrapoleren naar het telencephalon en de synapsen die HVC-projectieneuronen vormen op de dendrieten van de RA-neuronen. Wellicht spelen TR β 'n dus tot 50 dph een cruciale rol in synapsvorming op specifiek het RA om hier de TH-signalisatie te controleren. Ook bij de groei van neuronen in deze zangkern van de zebrafink, wat start vanaf 12 dph en vanaf 53 dph afgerond is, spelen deze receptoren mogelijks een rol⁵⁰. Het niet meer detecteren van expressie in het RA op 90 dph, is mogelijks te verklaren doordat vanaf deze leeftijd de zangontwikkeling geleidelijk wordt afgerond^{49,50}.

Tot slot werd ook expressie in de Purkinjecellaag van het cerebellum teruggevonden (zie figuur 16). Dit is in overeenstemming met het artikel van Forrest *et al.* (1991). Hier wordt vermeld dat TR β een significante rol speelt bij de synapsvorming tussen de Purkinjecellen en de axonen van de granulaire laag. O.b.v. het artikel van Forrest *et al.* (1991) kunnen de waarnemingen van expressie in het cerebellum dienen als referentie om een goed signaal na te gaan. Aangezien voor het eerst in de wetenschappelijk literatuur onderzoek naar expressiepatronen van TH-regulerende genen uitgevoerd wordt op zebrafinkweefsel, is er nood aan positieve controles.

2.3 *In situ* hybridisatie TR α

Omdat er reeds eerder getest werd met TR α -probes werd in deze thesis de expressie van TR α onderzocht in zowel mannelijke als vrouwelijke zebrafinkhersenweefsels op alle leeftijden. Forrest *et al.* (1991) duidt deze receptor aan als de receptor die het vroegst in de ontwikkeling tot expressie komt. Ook hier zijn de vroege *posthatch*-fasen van de zebrafink met de late embryonale stadia van de kip te

vergelijken. De vroegst onderzochte *posthatch*-stadia zijn, zowel voor vrouwelijke als mannelijke coupes, 10 dph en 20 dph. In beide gevallen werd een zeer intense verspreide expressie teruggevonden (zie figuur 21 en A3), zeker in vergelijking met de intensiteit van de expressie van het TR β -mRNA. Hieruit kan reeds afgeleid worden dat TR α gedurende deze vroege *posthatch*-levensstadia beduidend meer en sterker aanwezig is dan TR β . Dit is in overeenstemming met Forrest *et al.* (1991). Aangezien op beide leeftijden expressie aanwezig is overheen het hele telencephalon, zowel rostraal als caudaal, kan er worden afgeleid dat er expressie aanwezig is in alle vier de zangkernen: Area X, LMAN, HVC en RA. Echter, vrouwelijke individuen hebben geen Area X. De andere drie zangkernen komen bij vrouwtjes sterk gereduceerd voor t.o.v. de mannelijke exemplaren⁷³. Dit kan een reden zijn waarom op geen enkele leeftijd bij de vrouwelijke weefselpreparaten 'afgelijnde' expressie werd waargenomen, ook al bleef verspreide expressie voorkomen tot de seksueel mature leeftijd werd bereikt. Dit wijst wellicht op het feit dat deze receptoren een prominente rol spelen in de controle van de TH-signalisatie in het zenuwweefsel. Eigenaardig is dan wel dat dit zelfde patroon niet ook bij de mannelijke individuen werd teruggevonden. Ook bij de mannelijke individuen was er verspreide expressie aanwezig, maar deze zwakte echter reeds af vanaf 60 dph en was zelfs verdwenen op de adulte leeftijd. Een mogelijke verklaring is dat bij de mannetjes de ontwikkeling sneller verloopt dan bij de vrouwtjes. Een tweede verklaring is dat het ontwikkelingsproces bij mannelijke zebrevinken door andere factoren wordt overgenomen - zoals geslachtsspecifieke genen of hormonen - en dat deze factoren vooral een rol spelen m.b.t. het reguleren van de verdere ontwikkeling van de zangkernen in de hersenen. Daarnaast is het ook mogelijk dat de TH-signalering langer doorzet bij de vrouwelijke individuen en waardoor het effect van TH's dan weer minder belangrijk zou worden bij mannelijke zangvogels op de oudste leeftijden, waardoor ook minder nood is aan TR's in de neuronen.

Bij de mannelijke coupes werd nooit afgelijnde expressie in de LMAN en de Area X teruggevonden. Aangezien er wel verspreide expressie voorkomt bij de vroege leeftijden, is er toch expressie in deze kernen aanwezig. Een specifiek expressiepatroon werd wél in de rostrale hersendelen gedetecteerd (zie figuur 20 en A3). De expressie die voorkomt is veel sterker in het nido-, meso- en hyperpallium dan in het mediale striatum. Het is daarom dat in tabel 4 de semi-kwantitatieve score toegekend aan Area X slechts een zwakke expressie aangeeft, aangezien Area X zich in het mediale striatum ontwikkelt. LMAN daarentegen komt voor in het nidopallium⁵⁰. In de meer caudale delen werd waargenomen dat het verspreide signaal zich met toenemende leeftijd (vanaf 40 dph) ging concentreren in het RA (zie figuur 18). Op 60 dph was dit signaal in deze kern opnieuw verdwenen. Op deze leeftijd zwakte eveneens de expressie in het HVC af en op 90 dph was de expressie in het HVC verdwenen. Aangezien de zangmotorbaan aangelegd. Deze aanleg blijft doorgaan zolang het lied niet uitkristalliseert. Vanaf 90 dph start het lied met uitkristalliseren^{49,50}. Aangezien TH-receptoren noodzakelijk zijn zodat TH's hun acties kunnen uitvoeren, zoals de aanleg van neuronen die onderdeel uitmaken van de zangmotorbaan, is het eigenaardig dat de expressie van TR α in het RA reeds afwezig is op 60 dph. Een mogelijke verklaring is dat TR β rond 60 dph een meer prominente rol gaat spelen in het RA en zo de

rol van TR α overneemt. Maar aangezien er bij de TR β -ISH geen 60 dph werd getest, kan hier geen eenduidig antwoord op gegeven worden. Voor de aanleg van de HVC-RA-projectieuronen spelen TH's mogelijk een belangrijke rol. Daarnaast zijn de connecties - zoals projectieuronen van het HVC naar het RA - die onderdeel uitmaken van AFP reeds vroeger in de ontwikkeling gevormd^{50,65}. Daarom is wellicht de expressie in Area X minder sterk en zwakt het ook sneller af in vergelijking met de expressie in het HVC. Op de adulte leeftijd werd in geen enkele zangkern nog expressie waargenomen.

Algemeen neemt het signaal dat terug werd gevonden een cirkelvormig patroon aan. Dit wijst op de aanwezigheid van het TR α -mRNA rond de nucleus van de cellen, in het endoplasmatisch reticulum. Verder werd in de granulaire en moleculaire laag (resp. GL en ML) van het cerebellum en in het optisch tectum dan weer sterk expressie teruggevonden tot en met de adulte leeftijd (zie figuur 19), wat eveneens het geval was bij de vrouwelijke coupes (addendum figuur A4). Of er daadwerkelijk expressie aanwezig is in de Purkinjecellaag kan niet met volle zekerheid worden gezegd omdat het signaal in de GL zo intens was, maar uit het artikel van Forrest *et al.* (1991) blijkt dat zowel in de GL als de Purkinjecellaag bij de kip expressie voorkomt van deze receptor. TR α komt vooral in de migrerende en prolifererende granulaire cellen tot expressie. Dit is in overeenstemming met de resultaten die in deze thesis werden behaald. Op figuur 19 is heel duidelijk de expressie in de GL van de zebrevink waar te nemen. Ook in de ML komt expressie voor, echter minder sterk. Het aanhouden van deze expressie tot de adulte leeftijd duidt op het feit dat deze receptoren cruciaal zijn voor een correcte TH-siginaaltransductie in deze cellagen. Wellicht dragen ze ook bij de zebrevink bij aan de proliferatie en migratie van neuronen. Tot slot werd ook in het OT expressie waargenomen (figuur 19), wat overeenstemt met de bevindingen van Forrest *et al.* (1991). Er is een sterk gelaagd expressiepatroon aanwezig. Specifiek is er expressie in het *stratum griseum centrale* terug te vinden^{56,82}. Deze cellaag is de belangrijkste outputbron van visuele informatie naar overige optische gebieden in de hersenen⁸². Wederom is regulatie van de TH-acties in deze ontwikkelende hersendelen nodig en TR α speelt hierbij een zeer aanzienlijke rol.

2.4 *In situ* hybridisatie D2

Aangezien reeds vele testen om het D2-expressiepatroon in kaart te brengen vooraf gingen, werd net zoals bij TR α de expressie van D2 onderzocht in zowel mannelijke als vrouwelijke zebrevinkhersenweefsels op alle leeftijden. Dit enzym zorgt voor omzetting van T₄ naar de receptor-actieve vorm van het hormoon, T₃. Samen met inactiverende deiodasen zorgt D2 voor het reguleren van de intracellulaire TH-concentraties^{10,48}.

Zowel rostraal als caudaal in de hersenen werd er bij beide geslachten een intense expressie doorheen het hele telencephalon waargenomen op 10 dph en 20 dph. Hieruit blijkt dat het mRNA heel sterk aanwezig is gedurende deze eerste *posthatch*-stadia. Echter, vanaf 20 dph werden reeds de zangkernen Area X, HVC en RA 'afgelijnd' waargenomen bij de mannelijke individuen (zie figuur 23). Bij de vrouwelijke organismen werd op deze leeftijden enkel verspreide expressie waargenomen (zie figuur 26 en A9). Daarenboven bezitten de vrouwelijke zebrevinken geen Area X en zijn de overige drie

zangkernen in grootte sterk gereduceerd t.o.v. de zangkernen bij de mannetjes⁷³. De verspreide expressie die voorkwam bij de vrouwtjes was zelfs vanaf 20 dph slechts zwak en verdween na 30 dph. Daarom werd er bij de vrouwelijke individuen enkel op 10, 20 en 30 dph expressie teruggevonden in LMAN, RA en HVC. Eigenaardig is dat op 90 dph in de rostrale coupes opnieuw expressie werd teruggevonden in het HVC, maar ook in een andere ongekende hersenkern (zie figuur 27). Ook gebruikmakend van de stereotaxische atlas ontwikkeld door Nixdorf-Bergweiler en Bischof (2007), kon de kern niet gedetermineerd worden. Het wegvallen van expressie tussen 40 en 90 dph is mogelijks te wijten aan het experiment zelf. Mogelijks zijn de coupes niet kwaliteitsvol of was er op de tussenliggende leeftijden iets misgelopen gedurende het protocol. Anderzijds kan dit het werkelijke expressiepatroon zijn, dat voor ons tot nu toe nog niet kan worden verklaard. Bij de mannelijke individuen daarentegen werd 'afgelijnde' expressie waargenomen in alle zangkernen, behalve LMAN. Het verspreide signaal dat in de mannelijke coupes voorkwam, was reeds op 50 dph verdwenen. Vanaf dan kwam er enkel expressie voor specifiek in de zangkernen. In Area X werd op 90 dph signaal teruggevonden (zie figuur A6). Over het rostrale telencephalon van 60 dph kunnen geen uitspraken gedaan worden, aangezien deze coupes niet beschikbaar waren. Nochtans doordat op de coupes van 50 dph en 90 dph wel signaal in Area X werd waargenomen, wordt gesuggereerd dat ook op 60 dph expressie in de zangkern zou aanwezig zijn, maar dit kan niet met zekerheid gezegd worden. Dezelfde situatie doet zich voor bij het HVC op 30 dph (zie tabel 6). Voor LMAN op 60 dph konden eveneens geen uitspraken gevormd worden. Toch wordt er vanuit gegaan dat er op deze leeftijd geen expressie meer aanwezig is, aangezien zowel de coupes van 50 dph als 90 dph geen signaal vertoonden in deze zangkern. Het signaal op 40 dph was het sterkst (zie figuur 24), niet alleen in Area X, maar ook in het HVC en RA. Wellicht komt dit doordat vanaf 30 dph, wanneer reeds met de sensorimotor fase gestart is, er nieuwe aanleg is van projectieuronen in het HVC die hun axonen uitsturen naar het RA, opdat de zangmotorbaan gevormd wordt⁵⁰. Aangezien D2 zorgt voor het omzetten van TH naar zijn receptoractieve vorm, kunnen TH-responsieve genen aangesproken worden die een rol spelen in de aanleg van deze neuronen en bijgevolg de zangmotorbaan. Het signaal in het RA is reeds op 90 dph sterk afgenomen. Op 120 dph wordt in geen enkele zangkern expressie waargenomen. Dit is wellicht te verklaren omdat op deze leeftijd het zangleerproces voorbij is, en de zangkernen en het lied uitgekristalleerd zijn. Hierdoor is er geen verdere ontwikkeling nodig in deze zangkernen en valt waarschijnlijk de transcriptie van het *DIO2*-gen stil, waardoor er geen mRNA meer wordt afgeschreven.

De vorm die het signaal aannam, was lijnvormig. Dit komt overeen met de langgerekte endotheelcellen die de bloedvaten aflijnen, en waaruit afgeleid kan worden dat het *DIO2*-gen sterk tot expressie komt in deze endotheelcellen. Dit is in overeenstemming met het artikel van Yamaguchi *et al.* (2012). Zij halen aan dat gedurende het imprintingproces van de kip D2 zich in de endotheelcellen van de hersencapillairen bevindt en daar T₄ naar T₃ converteert.

Op 10 dph werd duidelijk een verspreide D2-expressie in de endotheelcellen doorheen het hele telencephalon teruggevonden. Ook 'afgelijnde' expressie werd teruggevonden in de zangkernen, wanneer geen verspreide expressie meer aanwezig was (bv. mannelijke 50 dph-zebravink in het HVC,

zie tabel 6 en 7). Het eigenaardige hier is dat de expressie niet gewoon doorloopt in de endotheelcellen van het omliggende weefsel, maar echt binnen de grenzen van de zangkern beperkt wordt. Een eerste mogelijke verklaring hiervoor is dat de neuronen binnen de zangkern specifieke intrinsieke signalen uitsturen naar de endotheelcellen die zich eveneens in de zangkern bevinden, afhankelijk van het stadium van het zangleerproces waar de zebra-vink zich in bevindt⁸³. Daar reguleren deze signalen de activiteit van het *DIO2*-gen. Een tweede verklaring is dat er in de zangkernen meer ontwikkelde bloedvaten aanwezig zijn dan in het omliggende weefsel. Deze mogelijke verklaring wordt reeds gedeeltelijk ontkracht omdat enerzijds op 10 dph duidelijk is dat bloedvaten over het hele telencephalon gelijkmatig verspreid voorkomen en anderzijds wordt eveneens geen verspreide expressie meer in het omliggende weefsel teruggevonden (bv. mannelijke 50 dph-zebra-vink in het HVC, zie tabel 6 en 7). Echter, het artikel van Louissaint *et al.* (2002) haalt aan dat er bij kanaries een testosteron-geïnduceerde angiogenese plaatsvindt in het HVC waardoor het capillaire netwerk in de zangkern, maar niet erbuiten, uitgebreid wordt. Er moet wel benadrukt worden dat dit onderzoek uitgevoerd is op adulte kanaries⁸⁴. Een laatste verklaring is dat de expressie niet alleen in de endotheelcellen aanwezig is, maar ook in de gliacellen van de zangkern, die zich rond de bloedvaten bevinden. Wellicht is het een combinatie van bovenstaande verklaringen. Er is reeds geweten dat testosteron een belangrijke factor is voor de ontwikkeling van het zangcontrolesysteem^{50,85}. Afhankelijk van het stadium van het leerproces waarin de zebra-vink zich bevindt, worden mogelijks signalen – zoals testosteron – naar de endotheelcellen en neuronen gestuurd. Deze HVC-neuronen maken als reactie op dit signaal *vascular endothelial growth factor* (VEGF) aan waardoor angiogenese plaatsvindt^{84,85}. Zo breidt het capillair netwerk binnen, maar niet buiten, het HVC uit. Deze testosteron-geïnduceerde angiogenese zou op zijn beurt bijdragen aan neurogenese binnen de zangkern, door endotheliale secretie van *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF)^{84,86}. De BDNF-expressie wordt opgereguleerd in het HVC wanneer de zangvogel zingt, wat weer bijdraagt tot de neuronaanleg^{86,87}. Aangezien in het artikel genuanceerd wordt dat deze processen binnen de zangkern plaatsvinden, kan bovenstaande een verklaring zijn voor het sterke signaal in de zangkern en het ontbreken van signaal in het omliggende weefsel, aangezien het omliggende weefsel deze signalen niet ontvangt. Doch, aangezien deze uit de literatuur verkregen resultaten bekomen zijn uit experimenten met adulte kanaries is het niveau waarop een extrapolatie kan gemaakt worden naar de resultaten van deze thesis onzeker. Kanaries hernemen hun leerproces afhankelijk van het seizoen. Bij zebra-vinken stopt de neuronaanleg wanneer de adulte leeftijd wordt bereikt⁴⁹. Mogelijks zijn de resultaten gevonden bij de kanarie die zijn zangleerproces heropstart, te vergelijken met de zebra-vink die zijn leerproces nog doormaakt. Daarnaast is dus niet geweten of er effectief signalen uitgestuurd worden om het *DIO2*-gen te activeren. Aangezien testosteron - die net zoals TH's bijdraagt tot een correcte ontwikkeling van het zangcontrolesysteem - de VEGF-aanmaak induceert, kan er gespeculeerd worden dat zowel testosteron als VEGF mogelijks bijdragen tot de activatie van het *DIO2*-gen. Als kan aangetoond worden dat er een bindingsplaats is voor de VEGF-receptor op het *DIO2*-gen, is VEGF mogelijks een specifieke signaal dat door de neuronen naar de endotheelcellen wordt uitgezonden om het *DIO2*-gen

te activeren. Als dit effectief het geval zou zijn, is de primaire regulerende factor van deze cascade testosteron. Het induceert de VEGF-productie, waarna het *DIO2*-gen mogelijks geactiveerd wordt. Op zijn beurt kan D2 vervolgens T_4 converteren tot T_3 , waardoor TH-afhankelijke processen in de zangkern correct worden aangestuurd.

2.5 Vergelijking van de expressiepatronen

Het mRNA in een cel bevindt zich vooral bij de nucleus en het RER, waar het wordt getransleerd door ribosomen tot proteïnen. Het D2-expressiepatroon is lijnvormig, waaruit we kunnen afleiden dat hier het RER van de langgerekte endotheelcellen gekleurd is. $TR\beta$, $TR\alpha$ en MCT8 daarentegen nemen een meer cirkelvormig expressiepatroon aan, waarbij de nucleus afgelijnd wordt. Dit wijst erop dat deze genen tot expressie komen in hersencellen, zoals neuronen en gliacellen. Hieruit blijkt dat de verschillende TH-regulerende genen in verschillende celtypen tot expressie komen. Dit werd ook in het onderzoek van Geysens *et al.* (2012) vastgesteld, waar geen MCT8-expressie teruggevonden werd in de bloedvaten van de kip²². Dit gegeven levert bewijs voor het feit dat verschillende TH-regulerende genen in diverse cellen tot expressie komen bij vogels. In tabel 8 wordt hiervan een overzicht weergegeven.

Tabel 8: Weergave van de vorm van het expressiepatroon per gen. In de laatste kolom worden de mogelijke celtypes weergegeven waarin het gen tot expressie komt, gebaseerd op de expressievorm.

Gen	Expressievorm	Mogelijke celtypes
<i>DIO2</i>	Lijnvormig	Endotheelcellen ⁷⁶
<i>THRA</i>	Cirkelvormig	Neuronen, gliacellen ⁴⁰
<i>THRB</i>	Cirkelvormig	Neuronen, gliacellen ⁴⁰
<i>MCT8</i>	Cirkelvormig	Neuronen, gliacellen ^{18,22}

Daar MCT8 en D2 vooral de TH-beschikbaarheid controleren, zorgen beide TR's ervoor dat de TH-acties gereguleerd worden. T_4 dat in de bloedbaan aanwezig is, wordt door D2 in de endotheelcellen geconverteerd naar T_3 . Dit bioactieve T_3 wordt vervolgens met behulp van MCT8 de neuronen en gliacellen van de zangkernen in getransporteerd. Op deze manier wordt in deze hersencellen de TH-beschikbaarheid gecontroleerd. Als TH de hersencel ingebracht is, bindt het op een TR en wordt vervolgens de TH-actie geïnitieerd, zoals bv. de aanleg van projectieneuronen.

Bij vergelijking van de expressiepatronen van de twee TR's, werd duidelijk dat in het telencephalon de intensiteit van het signaal van $TR\alpha$ sterker was dan dat van $TR\beta$, zeker op de jonge leeftijden. Hieruit kan afgeleid worden dat ook bij de zebrafink $TR\alpha$ een belangrijkere rol speelt gedurende de vroege *posthatch*-levensstadia dan $TR\beta$. Omdat $TR\beta$ echter ook voorkomt op deze leeftijden, wijst dit erop dat ook deze receptor zijn specifiek doel heeft. Doch, $TR\beta$ medieert mogelijks wel andere processen.

Eveneens wordt in deze thesis opnieuw bewezen wat reeds lang geweten is: het zangcontrolesysteem bij de zebrafink is een seksueel dimorfisme. Het sterk gereduceerd voorkomen van de zangkernen bij de vrouwtjes en het duidelijk aanwezig zijn van expressie in de zangkernen bij

de mannelijke individuen, bevestigen en versterken deze bevinding opnieuw. We kunnen hier echter aan toevoegen dat dit dimorfisme hoogstwaarschijnlijk gedeeltelijk aangestuurd wordt door TH's.

Tot slot moet worden benadrukt dat in deze thesis de expressiepatronen van mRNA werden onderzocht. Hieruit kunnen geen conclusies getrokken worden over het effectief aanwezig zijn van proteïnen. Daarom wordt aangeraden ook andere technieken, bv. western blotting, toe te passen om te onderzoeken of het mRNA ook daadwerkelijk wordt omgezet naar proteïnen. Door het IHC-protocol op punt te stellen voor zebravinkweefsel kan eveneens via IHC de aanwezigheid van proteïnen aangetoond worden.

2.6 Conclusie

Uit bovenstaande resultaten wordt geconcludeerd dat de vier onderzochte genen een belangrijke rol spelen in het ontwikkelende zangcontrolesysteem van de zebravink. Uit de uitgevoerde ISH's blijkt expressie van de genen aanwezig te zijn in de meeste zangkernen gedurende het zangleerproces, wat een indicatie is dat schildklierhormonen een belangrijke functie te vervullen hebben in deze zenuwweefselgebieden. Door zowel transporters, receptoren en (in)activerende enzymen wordt de TH-beschikbaarheid en -activiteit in de weefsels gereguleerd. Wat het effect van TH's is op het ontwikkelde zangcontrolesysteem is niet geweten. Uit de resultaten van deze thesis is wel geweten dat wanneer de zebravink zijn adulte leeftijd heeft bereikt, de expressie van alle vier de genen stopt, aangezien de vogel geen nieuwe neuronen incorporeert en zijn lied uitkristalliseert. Dus mogelijks zijn TH's minder belangrijk bij het effectief functioneren van het zangcontrolesysteem dan bij de ontwikkeling ervan.

SAMENVATTING

Schildklierhormonen (TH's) vervullen heel wat cruciale rollen tijdens de ontwikkeling van een organisme. Ze mediëren onder andere de neurogenese. Hierbij is het juiste TH-evenwicht op cellulair niveau noodzakelijk opdat TH-afhankelijke processen correct worden aangestuurd. Om een correcte TH-balans te kunnen verzekeren, worden verschillende regulatoren aangesproken. Voor vier van deze regulatoren werden in deze thesis via *in situ* hybridisatie de expressiepatronen in het ontwikkelende zangcontrolesysteem van de zebra-vink (*Taeniopygia guttata*) op verschillende leeftijden (10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 en 120 dagen na uitklimpen (*days posthatch*: dph)) onderzocht en vergeleken.

Voor de TH-transporter monocarboxylaattransporter 8 (MCT8) werd op 10 en 20 dph het expressiepatroon in kaart gebracht bij mannelijke zebra-vinken. Voor TH-receptor β (TR β) werden ook 30, 40, 50 en 90 dph onderzocht. Het expressiepatroon van zowel TR α als het deiodase type 2 (D2) werd op alle leeftijden onderzocht, zowel bij mannelijke als vrouwelijke zebra-vinken. Het onderzoek maakte duidelijk dat de vier onderzochte genen noodzakelijk zijn om de ontwikkeling van het zangcontrolesysteem van de zebra-vink in goede banen te leiden. Expressie in vier cruciale zangkernen -LMAN, Area X, HVC en RA - kon teruggevonden worden. Bij volwassen mannelijke vogels (120 dph) kon voor geen enkel van de onderzochte genen nog expressie waargenomen worden. Dit is niet onlogisch, aangezien het lied dan uitgekristalliseerd is en de ontwikkeling van het zangcontrolesysteem stopt. Ook werd duidelijk een verschil waargenomen tussen beide geslachten: bij mannelijke zebra-vinken is de rol van TH-regulatoren in de zangkernen duidelijk veel meer uitgesproken dan bij vrouwelijke zebra-vinken.

SUMMARY

Thyroid hormones (TH's) are crucial for normal development in vertebrates and play an important role in neurogenesis. A correct TH-balance is necessary for proper functioning of the cellular processes. To assure this correct TH-balance, TH-regulators need to work together properly. In this thesis, the expression pattern of four of these regulators was investigated in the developing song control system of the zebra finch (*Taeniopygia guttata*) through *in situ* hybridization. These tests were performed at different ages, going from 10 days posthatch (dph) until 120 dph.

At ages 10 and 20 dph, the expression pattern of monocarboxylate transporter 8 (MCT8) in male zebra finches was investigated. Next to 10 and 20 dph, also 30, 40, 50 and 90 dph were taken into account for the TH-receptor β (TR β). The expression patterns of TR α and deiodinase type 2 (D2) were investigated, in both male and female brains, at all indicated ages. This research made clear that these investigated genes are important for a proper development of the song control system of the zebra finch. In four crucial song nuclei – LMAN, Area X, HVC and RA – expression was found. At adult age (120 dph), the expression of all genes in all male brains disappeared. These results align with the knowledge that the song crystallizes before adulthood and the development of the song control system ceases. A comparison between male and female patterns made clear that, specifically in the song nuclei, these investigated genes were more important in male than in female finches.

REFERENTIES

- 1 Norris, D. O. & Carr, J. A. *Vertebrate endocrinology*. Fifth edn, (Elsevier Inc., 2013).
- 2 Mebis, L. & van den Berghe, G. The hypothalamus-pituitary-thyroid axis in critical illness. *The Netherlands journal of medicine* **67**, 332-340 (2009).
- 3 Brent, G. A. Mechanisms of thyroid hormone action. *The Journal of clinical investigation* **122**, 3035-3043, doi:10.1172/JCI60047 (2012).
- 4 Tortora, G. J. & Derrickson, B. *Principles of anatomy and physiology*. 14th edn, (John Wiley & Sons, Inc., 2014).
- 5 Darras, V. M., Van Herck, S. L., Heijlen, M. & De Groef, B. Thyroid hormone receptors in two model species for vertebrate embryonic development: chicken and zebrafish. *Journal of thyroid research* **2011**, 402320, doi:10.4061/2011/402320 (2011).
- 6 Cao, X. Y. *et al.* Timing of vulnerability of the brain to iodine deficiency in endemic cretinism. *The New England journal of medicine* **331**, 1739-1744, doi:10.1056/NEJM199412293312603 (1994).
- 7 Tatsumi, K. *et al.* Cretinism with combined hormone deficiency caused by a mutation in the PIT1 gene. *Nature genetics* **1**, 56-58, doi:10.1038/ng0492-56 (1992).
- 8 Heuer, H. The importance of thyroid hormone transporters for brain development and function. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* **21**, 265-276, doi:10.1016/j.beem.2007.03.003 (2007).
- 9 Dumont, J. E., Maenhaut, C. & Lamy, F. Control of thyroid cell proliferation and goitrogenesis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **3**, 12-17 (1992).
- 10 Bianco, A. C. & Kim, B. W. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *The Journal of clinical investigation* **116**, 2571-2579, doi:10.1172/JCI29812 (2006).
- 11 Snyder, P. J. & Utiger, R. D. Inhibition of thyrotropin response to thyrotropin-releasing hormone by small quantities of thyroid hormones. *The Journal of clinical investigation* **51**, 2077-2084, doi:10.1172/JCI107014 (1972).
- 12 Brent, G. A. *Thyroid Function Testing*. (Springer, 2010).
- 13 Chiamolera, M. I. & Wondisford, F. E. Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology* **150**, 1091-1096, doi:10.1210/en.2008-1795 (2009).
- 14 Decuyper, E., Van As, P., Van der Geyten, S. & Darras, V. M. Thyroid hormone availability and activity in avian species: a review. *Domestic animal endocrinology* **29**, 63-77, doi:10.1016/j.domaniend.2005.02.028 (2005).
- 15 Reyns, G. E., Verhoelst, C. H., Kuhn, E. R., Darras, V. M. & Van der Geyten, S. Regulation of thyroid hormone availability in liver and brain by glucocorticoids. *Gen Comp Endocrinol* **140**, 101-108, doi:10.1016/j.ygcn.2004.10.006 (2005).
- 16 Darras, V. M., Hume, R. & Visser, T. J. Regulation of thyroid hormone metabolism during fetal development. *Molecular and cellular endocrinology* **151**, 37-47 (1999).
- 17 Van Herck, S. L., Geysens, S., Delbaere, J. & Darras, V. M. Regulators of thyroid hormone availability and action in embryonic chicken brain development. *Gen Comp Endocrinol* **190**, 96-104, doi:10.1016/j.ygcn.2013.05.003 (2013).
- 18 Van Herck, S. L., Geysens, S., Delbaere, J., Tylzanowski, P. & Darras, V. M. Expression profile and thyroid hormone responsiveness of transporters and deiodinases in early embryonic chicken brain development. *Molecular and cellular endocrinology* **349**, 289-297, doi:10.1016/j.mce.2011.11.012 (2012).
- 19 Visser, W. E., Friesema, E. C., Jansen, J. & Visser, T. J. Thyroid hormone transport in and out of cells. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **19**, 50-56, doi:10.1016/j.tem.2007.11.003 (2008).

- 20 Kinne, A., Schulein, R. & Krause, G. Primary and secondary thyroid hormone transporters. *Thyroid research* **4 Suppl 1**, S7, doi:10.1186/1756-6614-4-S1-S7 (2011).
- 21 Friesema, E. C. *et al.* Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *The Journal of biological chemistry* **278**, 40128-40135, doi:10.1074/jbc.M300909200 (2003).
- 22 Geysens, S. *et al.* Dynamic mRNA distribution pattern of thyroid hormone transporters and deiodinases during early embryonic chicken brain development. *Neuroscience* **221**, 69-85, doi:10.1016/j.neuroscience.2012.06.057 (2012).
- 23 Wirth, E. K., Schweizer, U. & Kohrle, J. Transport of thyroid hormone in brain. *Frontiers in endocrinology* **5**, 98, doi:10.3389/fendo.2014.00098 (2014).
- 24 Friesema, E. C. *et al.* Identification of thyroid hormone transporters. *Biochemical and biophysical research communications* **254**, 497-501, doi:10.1006/bbrc.1998.9974 (1999).
- 25 van der Deure, W. M., Peeters, R. P. & Visser, T. J. Molecular aspects of thyroid hormone transporters, including MCT8, MCT10, and OATPs, and the effects of genetic variation in these transporters. *Journal of molecular endocrinology* **44**, 1-11, doi:10.1677/JME-09-0042 (2010).
- 26 Schwartz, C. E. & Stevenson, R. E. The MCT8 thyroid hormone transporter and Allan-Herndon-Dudley syndrome. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* **21**, 307-321, doi:10.1016/j.beem.2007.03.009 (2007).
- 27 Wirth, E. K. *et al.* Neuronal 3',3,5-triiodothyronine (T3) uptake and behavioral phenotype of mice deficient in Mct8, the neuronal T3 transporter mutated in Allan-Herndon-Dudley syndrome. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**, 9439-9449, doi:10.1523/JNEUROSCI.6055-08.2009 (2009).
- 28 Visser, W. E., Friesema, E. C., Jansen, J. & Visser, T. J. Thyroid hormone transport by monocarboxylate transporters. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* **21**, 223-236, doi:10.1016/j.beem.2007.03.008 (2007).
- 29 Sugiyama, D. *et al.* Functional characterization of rat brain-specific organic anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier: high affinity transporter for thyroxine. *The Journal of biological chemistry* **278**, 43489-43495, doi:10.1074/jbc.M306933200 (2003).
- 30 Duelli, R., Enerson, B. E., Gerhart, D. Z. & Drewes, L. R. Expression of large amino acid transporter LAT1 in rat brain endothelium. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **20**, 1557-1562, doi:10.1097/00004647-200011000-00005 (2000).
- 31 Uchino, H. *et al.* Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanisms of substrate recognition. *Molecular pharmacology* **61**, 729-737 (2002).
- 32 Verhoelst, C. H., van der Geyten, S., Roelens, S. A. & Darras, V. M. Regulation of thyroid hormone availability by iodothyronine deiodinases at the blood-brain barrier in birds. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1040**, 501-503, doi:10.1196/annals.1327.103 (2005).
- 33 Hulbert, A. J. Thyroid hormones and their effects: a new perspective. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* **75**, 519-631 (2000).
- 34 Bernal, J. Thyroid hormone receptors in brain development and function. *Nature clinical practice. Endocrinology & metabolism* **3**, 249-259, doi:10.1038/ncpendmet0424 (2007).
- 35 Yen, P. M. *et al.* Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Molecular and cellular endocrinology* **246**, 121-127, doi:10.1016/j.mce.2005.11.030 (2006).
- 36 Cheng, S. Y., Leonard, J. L. & Davis, P. J. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocrine reviews* **31**, 139-170, doi:10.1210/er.2009-0007 (2010).
- 37 Tagami, T., Madison, L. D., Nagaya, T. & Jameson, J. L. Nuclear receptor corepressors activate rather than suppress basal transcription of genes that are negatively regulated by thyroid hormone. *Molecular and cellular biology* **17**, 2642-2648 (1997).

- 38 Feng, X., Jiang, Y., Meltzer, P. & Yen, P. M. Transgenic targeting of a dominant negative corepressor to liver blocks basal repression by thyroid hormone receptor and increases cell proliferation. *The Journal of biological chemistry* **276**, 15066-15072 (2001).
- 39 Sakurai, A., Nakai, A. & DeGroot, L. J. Structural analysis of human thyroid hormone receptor beta gene. *Molecular and cellular endocrinology* **71**, 83-91 (1990).
- 40 Forrest, D., Hallbook, F., Persson, H. & Vennstrom, B. Distinct functions for thyroid hormone receptors alpha and beta in brain development indicated by differential expression of receptor genes. *The EMBO journal* **10**, 269-275 (1991).
- 41 Baniahmad, A. *Thyroid Hormone Receptors: Methods and protocols*. Vol. 202 223 (Humana Press, 2002).
- 42 Forrest, D., Reh, T. A. & Rusch, A. Neurodevelopmental control by thyroid hormone receptors. *Current opinion in neurobiology* **12**, 49-56 (2002).
- 43 Blount, J. D. *et al.* Neonatal nutrition, adult antioxidant defences and sexual attractiveness in the zebra finch. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* **270**, 1691-1696, doi:10.1098/rspb.2003.2411 (2003).
- 44 Tata, J. R. Amphibian metamorphosis as a model for the developmental actions of thyroid hormone. *Molecular and cellular endocrinology* **246**, 10-20, doi:10.1016/j.mce.2005.11.024 (2006).
- 45 Williams, G. R. Neurodevelopmental and neurophysiological actions of thyroid hormone. *Journal of neuroendocrinology* **20**, 784-794, doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01733.x (2008).
- 46 Davis, P. J. & Davis, F. B. Nongenomic actions of thyroid hormone on the heart. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* **12**, 459-466, doi:10.1089/105072502760143827 (2002).
- 47 Morreale de Escobar, G., Obregon, M. J. & Escobar del Rey, F. Role of thyroid hormone during early brain development. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* **151 Suppl 3**, U25-37 (2004).
- 48 Darras, V. M., Verhoelst, C. H., Reyns, G. E., Kuhn, E. R. & Van der Geyten, S. Thyroid hormone deiodination in birds. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* **16**, 25-35, doi:10.1089/thy.2006.16.25 (2006).
- 49 Brainard, M. B. & Doupe, A. J. What songbirds teach us about learning. *Nature* **417**, 351-358 (2002).
- 50 Kirn, J. R. The relationship of neurogenesis and growth of brain regions to song learning. *Brain and language* **115**, 29-44, doi:10.1016/j.bandl.2009.09.006 (2010).
- 51 Helekar, S. A. *Animal Models of Speech and Language Disorders*. (Springer, 2013).
- 52 Mariette, M. M. & Griffith, S. C. Conspecific attraction and nest site selection in a nomadic species, the zebra finch. *Oikos* **121**, 12 (2011).
- 53 Bear, M. F., Connors, B. W. & M.A., P. *Neuroscience: Exploring the brain*. third edn, (Lippincott Williams & Wilkins, 2007).
- 54 Forstmeier, W., Segelbacher, G., Mueller, J. C. & Kempenaers, B. Genetic variation and differentiation in captive and wild zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *Molecular ecology* **16**, 4039-4050, doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03444.x (2007).
- 55 Denman, R. B. *Modeling Fragile X Syndrome*. 181-198 (Springer, 2012).
- 56 Nixdorf-Bergweiler, B. E. & Bischof, H. J. A Stereotaxic Atlas Of The Brain Of The Zebra Finch, *Taeniopygia Guttata*, With Special Emphasis On Telencephalic Visual And Song System Nuclei in Transverse and Sagittal Sections., 86 (2007).
- 57 Bolhuis, J. J., Okanoya, K. & Scharff, C. Twitter evolution: converging mechanisms in birdsong and human speech. *Nature reviews. Neuroscience* **11**, 747-759, doi:10.1038/nrn2931 (2010).
- 58 Birkhead, T. R., Fletcher, F. & Pellatt, E. J. Sexual selection in the zebra finch *Taeniopygia guttata*: condition, sex traits and immune capacity. *Behav Ecol Sociobiol* **44**, 179-191 (1998).
- 59 Ritschard, M., Riebel, K. & Brumma, H. Female zebra finches prefer high-amplitude song. *Animal Behaviour* **79**, 877-883 (2010).

- 60 Woodgate, J. L., Bennett, A. T. D., Leitner, S., Catchpole, C. K. & Buchanan, K. L. Developmental stress and female mate choice behaviour in the zebra finch. *Animal Behaviour* **79**, 1381-1390 (2010).
- 61 Alcock, J. *Animal Behavior*. 9th edn, (Massachusetts Sinauer Associates, 2009).
- 62 Jarvis, E. D. Learned birdsong and the neurobiology of human language. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1016**, 749-777, doi:10.1196/annals.1298.038 (2004).
- 63 Nordeen, E. J. & Nordeen, K. W. Neurogenesis and sensitive periods in avian song learning. *Trends in neurosciences* **13**, 31-36 (1990).
- 64 Marler, P. Birdsong and neurogenesis. *Nature* **334**, 106-107 (1988).
- 65 Nordeen, K. W. & Nordeen, E. J. Projection neurons within a vocal motor pathway are born during song learning in zebra finches. *Nature* **334**, 149-151, doi:10.1038/334149a0 (1988).
- 66 Eales, L. A. Song learning in zebra finches: some effects of song model availability on what is learnt and when. *Animal Behaviour* **33**, 1293-1300 (1985).
- 67 Ford, A., McGregor, K. M., Case, K., Crosson, B. & White, K. D. Structural connectivity of Broca's area and medial frontal cortex. *NeuroImage* **52**, 1230-1237, doi:10.1016/j.neuroimage.2010.05.018 (2010).
- 68 Belzung, C. & Wigmore, P. (eds C. Belzung & P. Wigmore) 401 (Springer, Berlin, 2013).
- 69 Costa e Silva, J., Macher, J. & Olié, J. *Neuroplasticity: New Biochemical Mechanisms*. (Springer, 2011).
- 70 Tramontin, A. D. & Brenowitz, E. A. Seasonal plasticity in the adult brain. *Trends in neurosciences* **23**, 251-258 (2000).
- 71 Wang, N., Hurley, P., Pytte, C. & Kirn, J. R. Vocal control neuron incorporation decreases with age in the adult zebra finch. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**, 10864-10870 (2002).
- 72 Tekumalla, P. K., Tontonoz, M., Hesla, M. A. & Kirn, J. R. Effects of excess thyroid hormone on cell death, cell proliferation, and new neuron incorporation in the adult zebra finch telencephalon. *Journal of neurobiology* **51**, 323-341 (2002).
- 73 Quaglino, A. E. *et al.* Oral estrogen masculinizes female zebra finch song system. *Hormones and behavior* **41**, 236-241, doi:10.1006/hbeh.2001.1752 (2002).
- 74 Tang, Y. P. & Wade, J. Sex- and age-related differences in ribosomal proteins L17 and L37, as well as androgen receptor protein, in the song control system of zebra finches. *Neuroscience* **171**, 1131-1140, doi:10.1016/j.neuroscience.2010.10.014 (2010).
- 75 van Praag, H. *et al.* Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* **415**, 1030-1034, doi:10.1038/4151030a (2002).
- 76 Yamaguchi, S. *et al.* Thyroid hormone determines the start of the sensitive period of imprinting and primes later learning. *Nature communications* **3**, 1081, doi:10.1038/ncomms2088 (2012).
- 77 Soma, K. K., Alday, N. A., Hau, M. & Schlinger, B. A. Dehydroepiandrosterone metabolism by 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta5-Delta4 isomerase in adult zebra finch brain: sex difference and rapid effect of stress. *Endocrinology* **145**, 1668-1677, doi:10.1210/en.2003-0883 (2004).
- 78 Scalia, F., Rasweiler, J. J. I., Scalia, J., Orman, R. & Stewart, M. *Forebrain Atlas of the Short-tailed Fruit Bat, Carollia perspicillata*. (Springer, 2013).
- 79 Buchwalow, I. B. & Böcker, W. *Immunohistochemistry Basics and Methods*. (Springer, 2010).
- 80 Carleton, J. B. *et al.* An optimized protocol for high-throughput in situ hybridization of zebra finch brain. *Cold Spring Harbor protocols* **2014**, 1249-1258, doi:10.1101/pdb.prot084582 (2014).
- 81 Faunes, M. *et al.* Lamina segregation of GABAergic neurons in the avian nucleus isthmi pars magnocellularis: a retrograde tracer and comparative study. *The Journal of comparative neurology* **521**, 1727-1742, doi:10.1002/cne.23253 (2013).

- 82 Schmidt, A. & Bischof, H. J. Neurons with complex receptive fields in the stratum griseum centrale of the zebra finch (*Taeniopygia guiffata castanotis* Gould) optic tectum. *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology* **187**, 913-924 (2001).
- 83 Wade, J. *et al.* A cDNA microarray from the telencephalon of juvenile male and female zebra finches. *Journal of neuroscience methods* **138**, 199-206, doi:10.1016/j.jneumeth.2004.04.007 (2004).
- 84 Louissaint, A., Jr., Rao, S., Leventhal, C. & Goldman, S. A. Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron* **34**, 945-960 (2002).
- 85 Brenowitz, E. A. Testosterone and brain-derived neurotrophic factor interactions in the avian song control system. *Neuroscience* **239**, 115-123, doi:10.1016/j.neuroscience.2012.09.023 (2013).
- 86 Li, X. C., Jarvis, E. D., Alvarez-Borda, B., Lim, D. A. & Nottebohm, F. A relationship between behavior, neurotrophin expression, and new neuron survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8584-8589, doi:10.1073/pnas.140222497 (2000).
- 87 Wada, K. *et al.* A molecular neuroethological approach for identifying and characterizing a cascade of behaviorally regulated genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 15212-15217, doi:10.1073/pnas.0607098103 (2006).

ADDENDUM

I. Lijst van buffers en oplossingen

Tabel A1: 1 L Fosfaatgebufferde zoutoplossing 10 M (Phosphate Buffered Saline, PBS) – pH 7,4

NaCl	87,66 g
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	14,24 g
KCl	2,24 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Geautoclaveerd Milli Q (Milli Q.)	Leng aan tot 1 L Breng op pH 7,4

Tabel A2: 400 ml Cryoprotectant

NaH ₂ PO ₄	0,636 g
Na ₂ HPO ₄	2,188 g
DEPC-H ₂ O	200 ml
Sucrose	120 g
Polyvinylpyrrolidone	4 g
Ethyleen glycol	120 ml
	Plaats overnacht op magnetische draaiplaat met roerstaafje.

Tabel A3: 1 L Tris-gebufferde saline 0,1 M (TBS) – pH 7,6

Tris (hydroxymethyl) aminomethaan	12 g
NaCl	87,66 g
Triton X-100	10 ml
Milli Q.	Leng aan tot 1 L Breng op pH 7,6

Tabel A4: 1 L Citraatbuffer 0,1 M – pH 6

Citroenzuur	21,01 g
Tween-20	5 ml
Milli Q.	Leng aan tot 1 L Breng op pH 6

Tabel A5: 1 L Trisnatriumchloride buffer (TNB)

Blokkingsreagens (Perkin Elmer kit)	5 g
TBS 1x	Leng aan tot 1 L

Tabel A6: 250 ml Mowiol

Glycerol	72 g
Mowiol	28,8 g
Milli Q.	72 ml
0,2 M Tris pH 8,5	144 ml

Tabel A7: 1 L 10x Tris azijnzuur EDTA-buffer (TAE)

Tris base	48,5 g
0,5 M EDTA (pH 8)	20 ml
Azijnzuur	11,4 ml
Milli Q.	Leng aan tot 1 L

Tabel A8: 500 ml Alkaline Fosfatase (AP)-buffer - pH 9,5

NaCl	2,9 g
Tris Base	6,05 g
MgCl ₂	0,5085 g
Milli Q.	500 ml
	Breng op pH 9,5

Tabel A9: 1 L DEPC-H₂O

Milli Q.	1000 ml
Diethylpyrocarbonaat (DEPC)	100 µl

Tabel A10: 1 L 20x Saline-sodium phosphate EDTA (SSPE) buffer – pH 7,4

NaCl (3 M)	175,3 g
Na ₂ HPO ₄ (200 mM)	27,6 g
EDTA (20 mM)	7,4 g
DEPC-H ₂ O	1 L
	Breng op pH 7,4

Tabel A11: 100 ml TN

Tris pH 7,5 (zie tabel A13)	10 ml
NaCl (150 mM)	3 ml
DEPC-H ₂ O	87 ml

Tabel A12: 100 ml TMN

Tris pH 9,5 (zie tabel A14)	10 ml
NaCl (150 mM)	3 ml
DEPC-H ₂ O	87 ml

Tabel A13: 1 L 10x Tris-buffer – pH 7,5

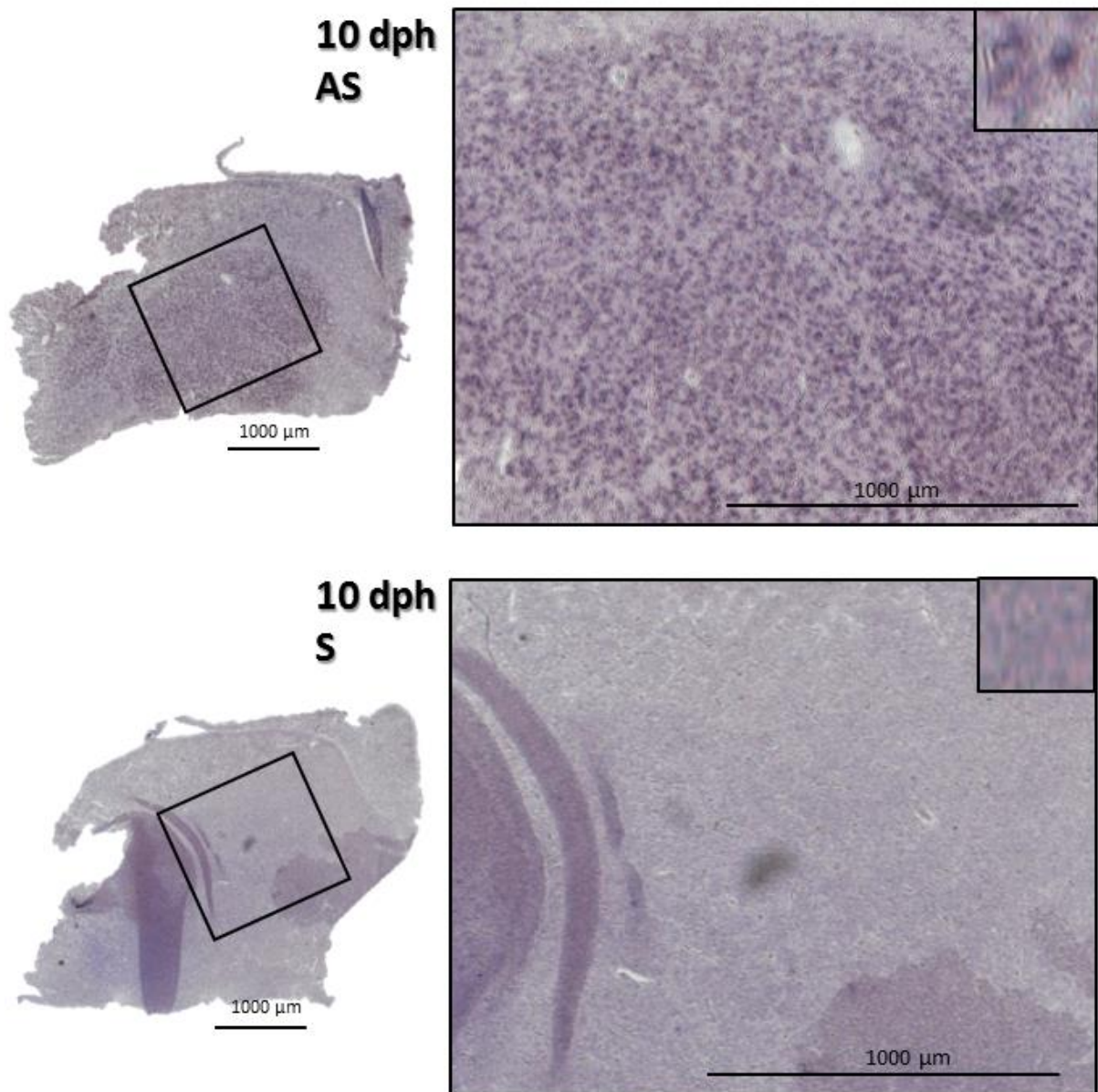
Tris (hydroxymethyl) aminomethaan	60,5 g
Milli Q.	1 L
	Breng op pH 7,5

Tabel A14: 1 L 10x Tris-buffer – pH 9,5

Tris (hydroxymethyl) aminomethaan	60,5 g
Milli Q.	1 L
	Breng op pH 9,5

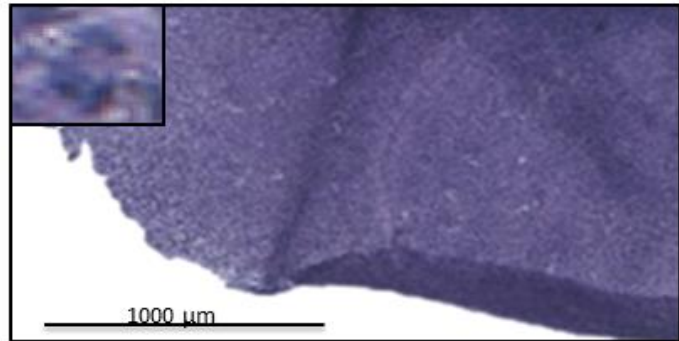
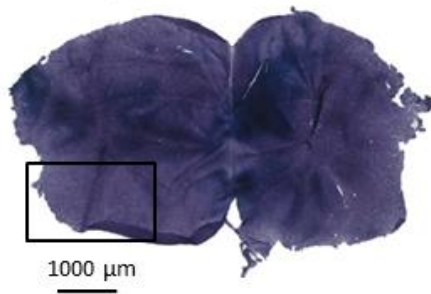
II. ISH coupes

a. MCT8

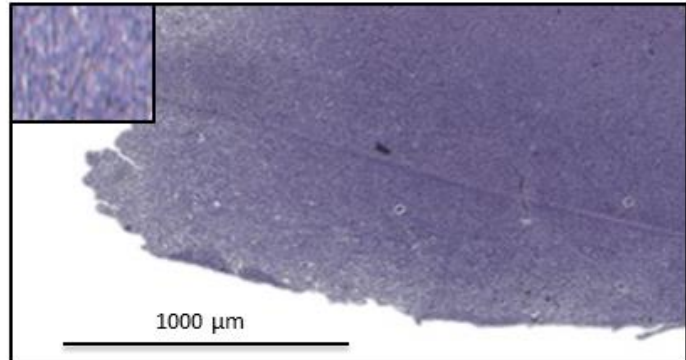
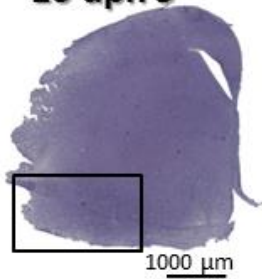


Figuur A1: Detectie van MCT8-mRNA in mannelijke zebravinkhersenen van 10 dph – Boven AS-coupe: duidelijk verspreid cirkelvormig signaal waar te nemen in het telencephalon t.o.v. de S-coupe (onder).

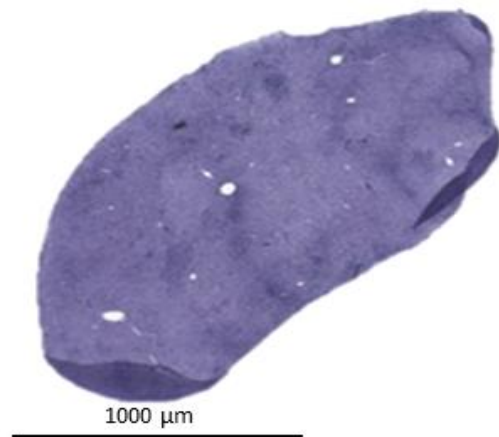
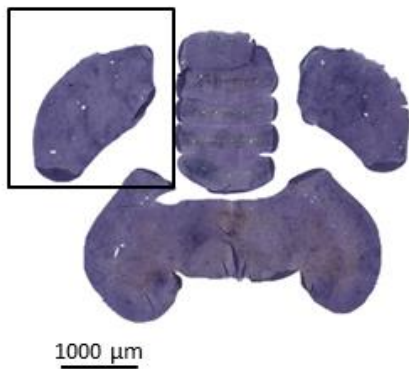
A. 10 dph AS: rostraal



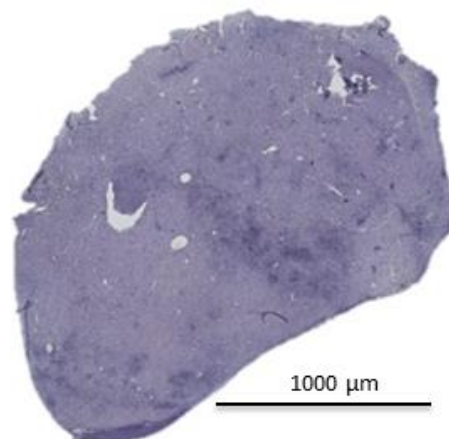
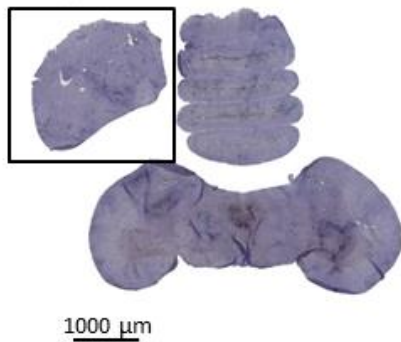
10 dph S



B. 20 dph AS: caudaal

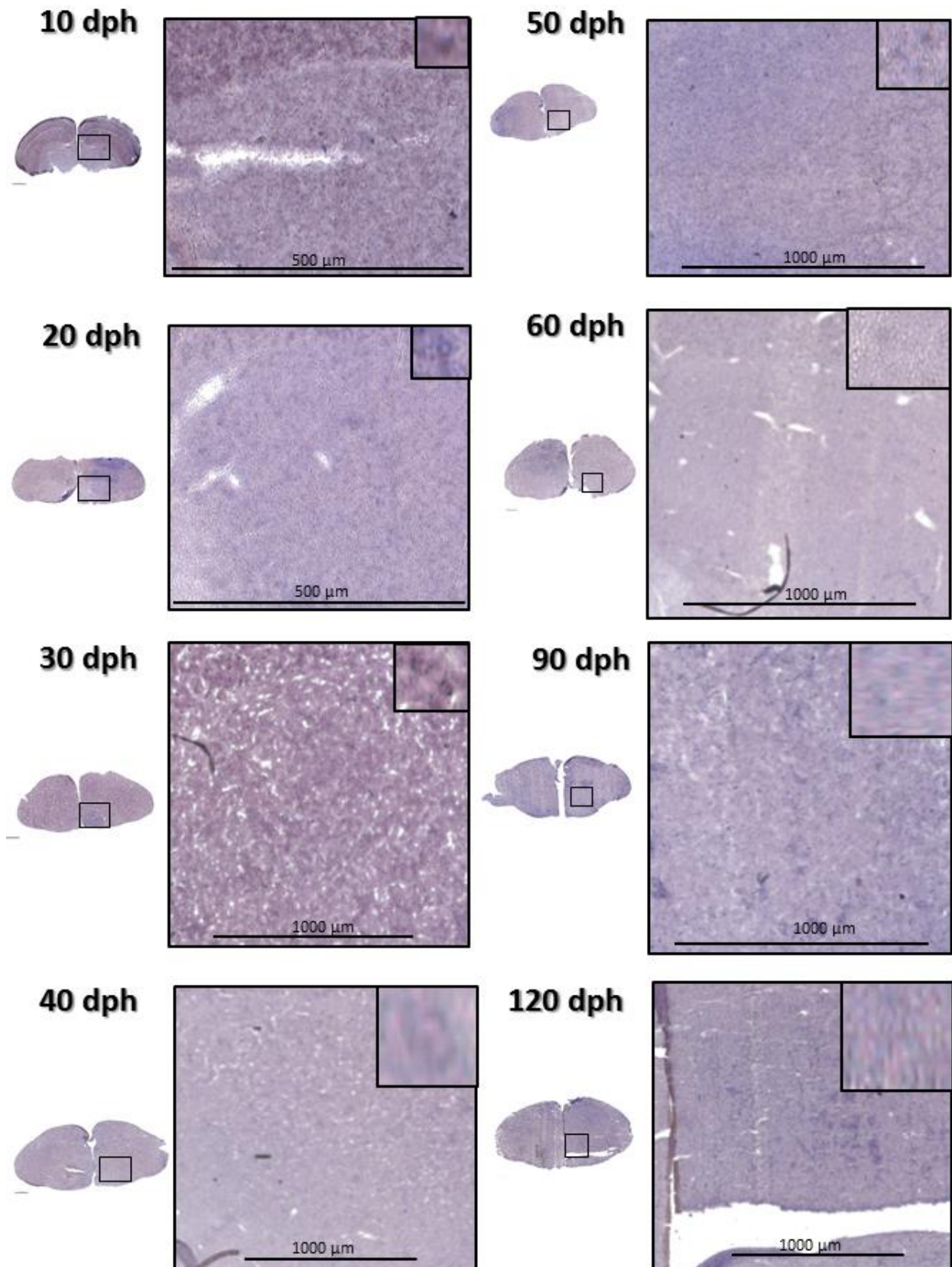


20 dph S

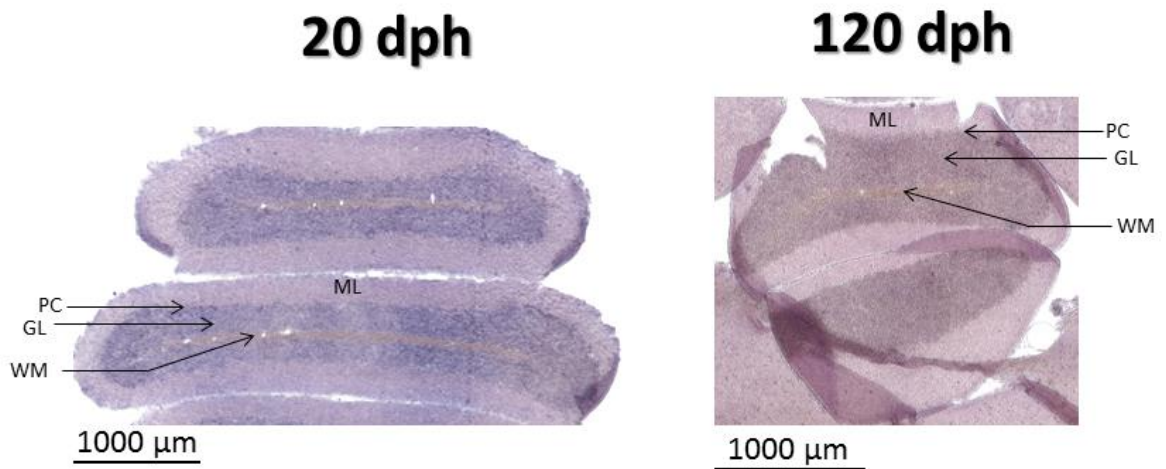


Figuur A2: Detectie van MCT8-mRNA in mannelijke zebrafinkhersenen van 10 en 20 dph – A) Boven rostrale AS-coupe, welke sterk overkleurd is. Echter, hier kan een sterke expressie waargenomen worden t.o.v. de S-coupe (onder). **B)** Caudale AS-coupe op 20 dph (boven). T.o.v. de S-coupe (onder) is bij de AS-coupe signaal aanwezig.

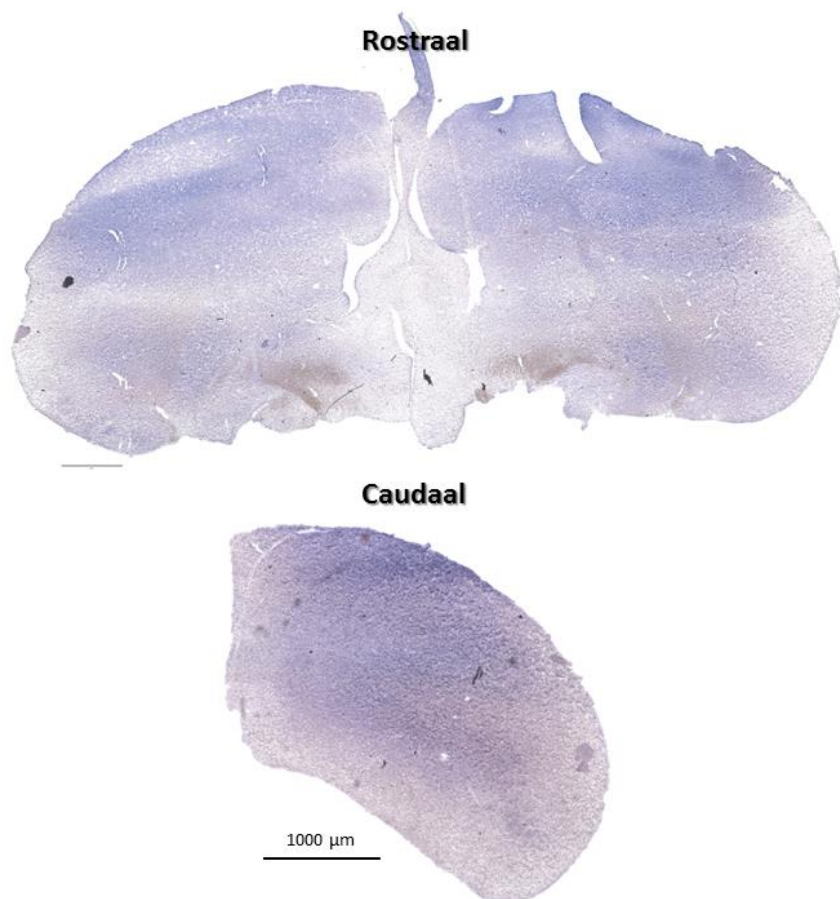
b. TR α



Figuur A3: Detectie van TR α -mRNA rostraal in mannelijke zebrevinkhersenen – Alle weergegeven coupes zijn behandeld met de AS-probe. Tot op 50 dph is er een signaal aanwezig. Vanaf 60 dph is dit signaal reeds afgezwakt over het gehele telencephalon. Op 120 dph is de expressie verdwenen.

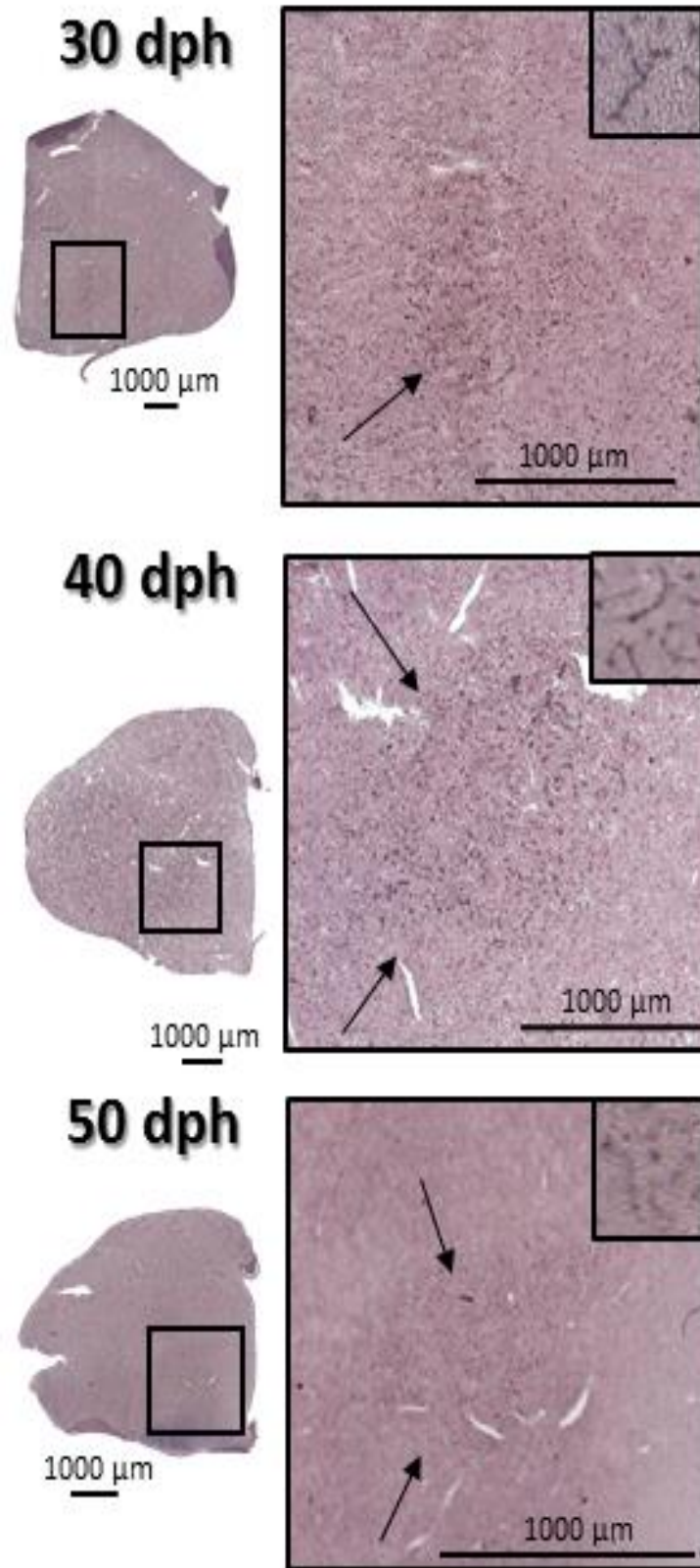


Figuur A4: Detectie van TR α -mRNA in het cerebellum vrouwtjes 20 en 120 dph – Er is op beide leeftijden duidelijk signaal aanwezig.



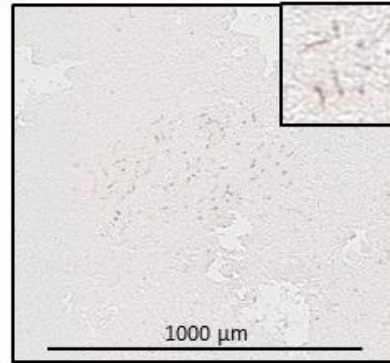
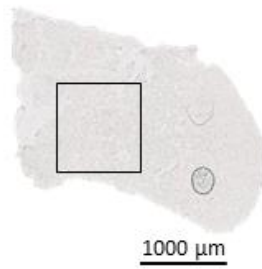
Figuur A5: Detectie van TR α -mRNA in 40 dph vrouwtje - Er kan geen uitsluitsel over deze coupes gegeven worden. Ze hebben een zeer korrelig en verkleurd uitzicht.

c. D2

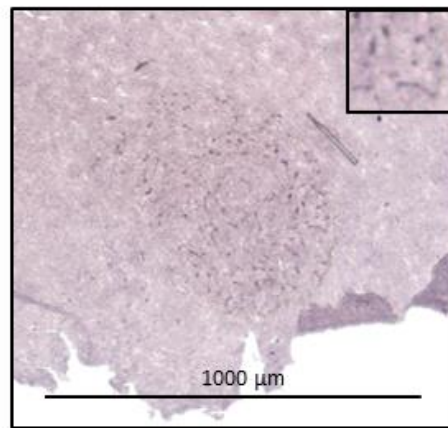
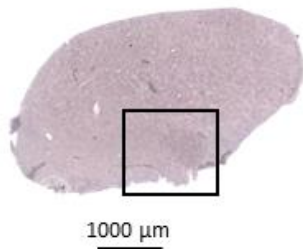


Figuur A6: Detectie van D2-mRNA rostraal in mannelijke zebrovinkhersenen – Expressie in Area X is aangeduid met pijlen.

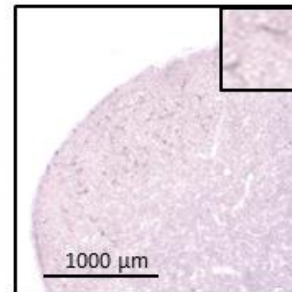
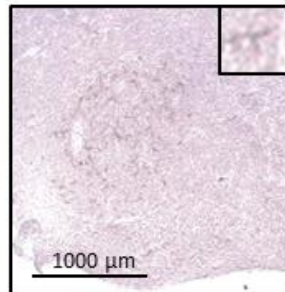
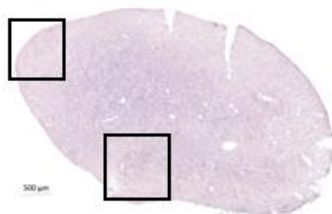
30 dph



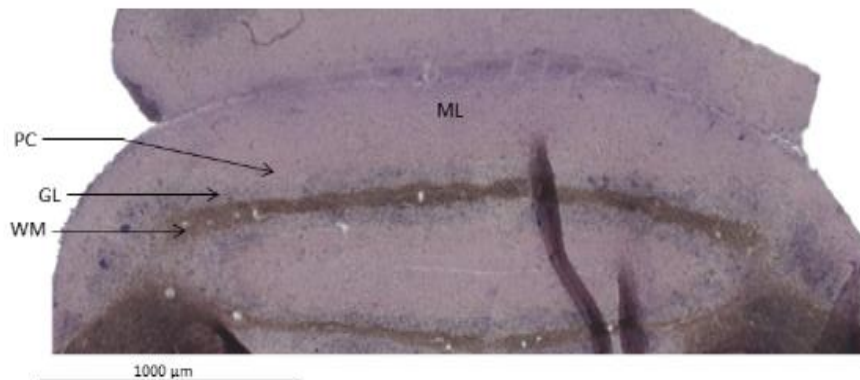
50 dph



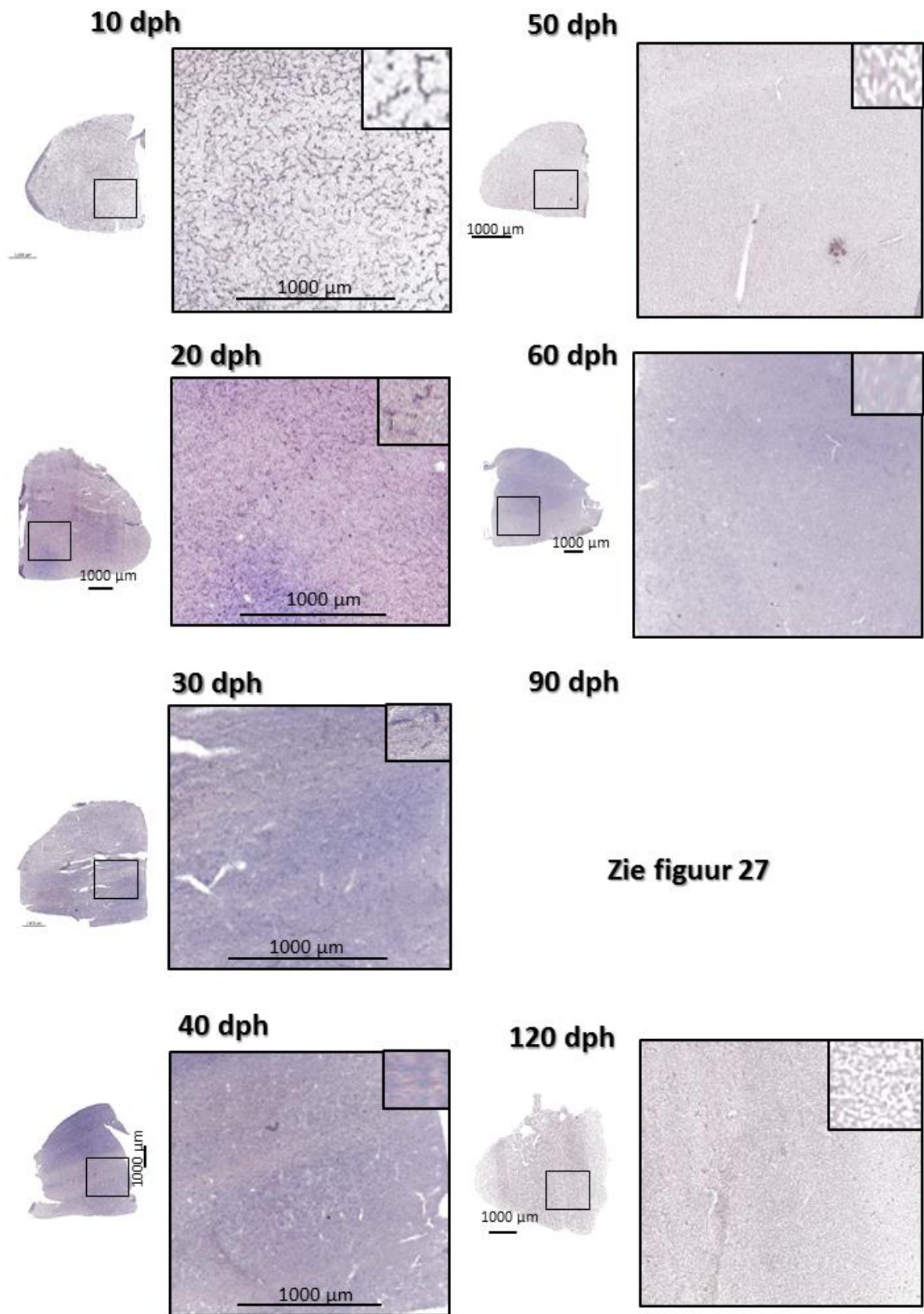
60 dph



Figuur A7: Detectie van D2-mRNA caudaal in mannelijke zebrafinkhersenen – Overige caudale coupes die nog niet getoond werden: expressie in RA en HVc. De 30 en 60 dph zijn ISH op fresh frozen weefsel



Figuur A8: Detectie van D2-mRNA in het cerebellum van mannelijke zebrafinkhersenen - 90 dph: geen expressie meer waarneembaar in het cerebellum.



Figuur A9: Detectie van D2-mRNA rostraal in vrouwelijke zebrevinkhersenen – Vanaf 20 dph komt er reeds een verzwakt signaal naar voor wat vanaf 40 dph reeds opnieuw verdwenen is. Het schijnbare lijnpatroon waarneembaar op 50 dph is afkomstig door een slechte focus tijdens het trekken van de foto's (dit is ook het geval bij 120 dph).

III. Risicoanalyse

Bij de experimenten die uitgevoerd worden, is het noodzakelijk proper te werken opdat alles zoveel mogelijk RNase-vrij blijft. Zo dienen de haren bij elkaar gebonden te zijn en worden een labo jas en geschikte handschoenen gedragen. Indien met vluchtige en gevaarlijke producten gewerkt moet worden, worden de handelingen uitgevoerd onder een laminaire flow. Het risico bestaat dat er toch enige gevaarlijke producten achterblijven op de handen, daarom is het wassen van de handen met zeep noodzakelijk en mag er in het laboratorium niet gegeten en gedronken worden. Algemeen wordt na een experiment alles opgeruimd en proper achter gelaten!

De uitgevoerde protocollen vonden plaats in een laboratorium met inperkingsniveau 1 (L1). Hier wordt enkel gewerkt met producten en reagentia die niet pathogeen zijn. Gedurende deze experimenten werden enkele gevaarlijke of vluchtige producten gebruikt. Deze staan hieronder opgelijst alsook de veiligheidsmaatregelen die getroffen moeten worden wanneer met deze stoffen wordt gewerkt, opdat de veiligheid van jezelf, het personeel en de omgeving gegarandeerd wordt. Veelal worden op de verpakkingen van de producten de risico's en gevaren vermeld. Als onderzoeker dien je hier zeker aandacht aan te besteden.

- DEPC wordt gebruikt om heel zuiver en RNase-vrij water te bekomen, waarmee gewerkt wordt tijdens de ISH's. Door de carcinogene eigenschappen van dit product wordt hier enkel mee gewerkt onder de trekkast. Beschermde kledij wordt dus ten sterkste aangeraden.
- Fenol/chloroform/isoamylalcohol wordt gebruikt bij de opzuivering van het gelineariseerd plasmide gedurende de probe-aanmaak. Het is een heel toxisch product, zowel door inhalatie, contact met de huid of door ingestie. Verder veroorzaakt het product hevige brandwonden en verricht het sterke oogschade. Het wordt eveneens verdacht van mutageen te zijn, genetische modificatie te veroorzaken, je fertiliteit te beïnvloeden en een ongeboren kind schade te berokkenen. Daarnaast zorgt het voor duizeligheid en respiratorische irritaties. Wanneer er een langdurig en veelvoudig contact heeft plaatsgevonden kan het ook aan de organen schade aanrichten. Probeer tijdens het gebruik van dit product je ademhaling te beperken. Wanneer er contact met het product geweest is, spoel je zo snel mogelijk deze gebieden op het lichaam. Gebruik het product enkel in een goed geventileerd lokaal. Draag geschikte beschermende kledij.
- Formamide is een product die meervoudig gedurende ISH wordt gebruikt. Vooral als zwangere vrouw moet het contact met dit product vermeden worden, aangezien het schade kan berokkenen aan het ongeboren kind. Ook bij jezelf kunnen verschillende organen, zoals de lever en de nieren, alsook het bloed door langdurig en veelvoudig gebruik van het product, worden aangetast. Wanneer contact plaatsvindt met de ogen of de huid moet er minstens voor 15 minuten met water gespoeld worden. Wanneer het product ingeademd werd, dient deze persoon zich naar een omgeving met 'verse' lucht te verplaatsen en moet medisch advies

ingewonnen worden. Wanneer het product via ingestie het lichaam binnentreedt, mag je de persoon niet laten braken, maar contacteer je medisch advies.

- Gel-Red is een fluorescerende kleurstof die wordt gebruikt voor het visualiseren van nucleïnezuren. Het wordt gebruikt bij de aanmaak van een agarosegel om vervolgens het DNA of RNA te kunnen detecteren. Het product is sterk gerelateerd aan ethidiumbromide, wat zeer kankerverwekkend is. Over Gel-Red werd vastgesteld dat het echter minder mutageen is dan ethidiumbromide, aangezien het specifiek ontworpen is om het kankerverwekkend effect te reduceren. Het product werd zo ontworpen dat het de levende cellen niet kan binnentreden. Echter, wanneer contact met de huid plaatsvindt, kan beter het zekere voor het onzekere genomen worden, aangezien in hoge concentratie het product wel mutageen is. Spoel in dat geval de verontreinigde gebieden van het lichaam gedurende minimum 15 minuten en win indien nodig geacht medisch advies in. Maar daarenboven is preventie van contact met Gel-Red nog beter. Draag daarom geschikte kledij en bescherming.
- NBT-BCIP wordt gebruikt om de kleuringsreactie te starten bij de ISH. Deze producten zijn, wanneer ze in contact komen met de huid en de ogen, zeer irriterend en corrosief. Als dit het geval is, dient er onmiddellijk gespoeld te worden. Beschermde kledij wordt dus ten sterkste aangeraden. Ook een beschermmiddel voor de ogen wordt aangeraden. Het product mag ook nooit verwijderd worden in de gootsteen. Er moet te allen tijde vermeden worden dat het product in het rioolwater terecht komt, opdat het product het grondwater niet verontreinigt.
- PFA wordt gebruikt voor het fixeren van weefsels. Het is een toxisch product dat mogelijk kankerverwekkende eigenschappen heeft. Daarnaast kan het zorgen voor huid-, oog- en luchtwegirritaties. Aangezien het een poedervormige substantie betreft, moet bij de aanmaak ervan mond- neus- en oogbescherming gedragen worden. Het product mag ook nooit verwijderd worden in de gootsteen. Er moet te allen tijde vermeden worden dat het product in het rioolwater terecht komt, opdat het grondwater niet verontreinigd wordt.

Wanneer er met bacteriën wordt gewerkt is het ook noodzakelijk onder een laminaire flow te werken, Nadien wordt deze trekkast volledig met ethanol uitgekuist. Niet alleen worden gevaarlijke producten gebruikt. Ook kunnen de ogen blootgesteld worden aan schadelijke stralingen. Wanneer de gel van de gelelektroforese gevisualiseerd wordt m.b.v. UV-licht om nadien de bandjes uit te snijden moet men een veiligheidsmasker dragen en de blootstellingstijd trachten te limiteren.

DIERENFYSIOLOGIE EN NEUROBIOLOGIE
Naamsestraat 59, bus 2465
3000 LEUVEN, BELGIË
tel. + 32 16 32 42 60
fax + 32 16 32 29 02
www.kuleuven.be

