



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

**Photic and non-photic modulation of the mammalian circadian clock**  
Oosterhout, F.F.T.O. van

**Citation**

Oosterhout, F. F. T. O. van. (2012, January 12). *Photic and non-photic modulation of the mammalian circadian clock*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/18333>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/18333>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).



**Summary**

**Nederlandse samenvatting**

## Summary

### Photic and non-photic modulation of the mammalian circadian clock.

#### **The circadian clock**

The presence of an internal timing system in animals and humans is an evolutionary conserved feature to cope with, and anticipate to, daily environmental changes, such as cyclic variations in light and darkness, ambient temperature and food availability. Daily, as well as seasonal rhythms in behaviour and physiology are driven by the so-called *circadian clock* (circa-dies: 'about a day'). In mammals, including humans, the circadian clock resides in the suprachiasmatic nuclei (SCN), a small paired brain structure at the base of the hypothalamus, just above the crossing of the optic nerves. The SCN acts as a master pacemaker and governs rhythms in numerous bodily processes. The most apparent 24h rhythm is the sleep-wake cycle. Daily fluctuations also exist in body temperature, hormone levels, cognitive functions, and physiological functions of liver, kidney and heart. At a genetic level, the cells of the SCN generate an endogenous rhythm with a period of approximately, but not exactly, 24 hour. In general, the period of the clock is somewhat longer than 24h in humans, and somewhat shorter than 24h in night-active animals, like mice. In order to be of functional use, the clock must be properly synchronized to the environment. The circadian clock uses 'Zeitgeber' information about external time to become well adjusted to the environment. The most important stimulus is light. Light information is received by specialized photopigments in the eye and is transmitted to the SCN via the retinohypothalamic tract. Light induces changes in gene expression and neuronal activity of the SCN by which the internal clock is reset to local time. Apart from photic input (light), the clock can also reset in response to non-photic cues, such as behavioural activity, sleep and pharmacological agents. The research questions addressed in this thesis are related to the factors that affect the functioning of the biological clock. **Chapter 1** gives a more detailed overview of the backgrounds of the research described in this thesis.

#### **SCN neuronal activity regulates the timing of behavioural activity.**

Brain activity can be recorded by advanced techniques using micro-electrodes aimed at the SCN. To measure the neuronal activity, the number of action potentials that is produced by a group of neurons is recorded. The course of a circadian rhythm over the day can usually be represented by a sine-like waveform with a period of

approximately 24h. Neuronal activity rates are high during the day and low during the night. The difference between peak and trough is defined as the rhythm amplitude. The SCN drives rhythms in behavioural activity. In the absence of any time cues, as in constant darkness, the animals can still time the daily onset of behavioural activity with a remarkable precision. **Chapter 2** provides a closer look at how the SCN clock regulates the timing of the daily onset and offset of behavioural activity. What is the exact relationship between the waveform of the SCN neuronal activity, and the animal's behavioural activity pattern? Mice are night-active animals, so their activity patterns are in anti-phase with the SCN clock rhythm. With seasonal changes in day length, the behavioural activity pattern adapts to the altered day length. Long periods of activity are found in winter time (when days are short and nights are long: 8h of light, 16h of dark), and short periods of activity are found in summer time (when days are long and nights are short: 16h of light, 8h of dark). This adjustment is under control of the SCN. The 24h waveform of the neuronal activity of the clock changes with day length. **Chapter 2** describes broad peaks during summer days and narrow peaks during winter days. It was found that, irrespective of day length, the onset of behavioural activity can be predicted by the declining phase of the SCN neuronal activity profile. More precisely, the transition between rest and activity is triggered at the half-maximum level between peak and trough of the waveform. The slope of the decline is maximal at this phase. In a similar way, the offset of behavioural activity is triggered by the half maximum on the rising phase of the SCN activity waveform. Thus, the neuronal activity is the output of the SCN and codes for day length, which serves to signal the timing of the animal's behavioural activity.

#### **Adjustment of the circadian clock to new time zones**

In **chapter 3**, we investigated how the circadian system responds to a change in the light-dark cycle, as occurs in transmeridian flights or shift work. When exposed to a shifted light-dark schedule, the organism needs to synchronise its internal rhythm to the external cycle, to regain its normal phase relationship with the environment. Adjustment of the various bodily rhythms to a shift in the light-dark cycle takes several days. This temporary misalignment of rhythms is referred to as 'jet lag'. Typically, the adjustment following flights to the east takes much longer than following flights to the west; in other words, it is more difficult to phase advance than to phase delay the circadian system. This general rule holds in mice as well. The underlying mechanism is explained by a dissociation between different levels of organization within the circadian system during a phase advance. Mice were subjected to a 'jet lag-protocol', in which the speed of adaptation of the circadian system was measured following a 6h advance of the light-dark cycle (like an

eastbound flight from New York to Amsterdam). The SCN neuronal activity rhythm, when measured in the intact brain on the first day after the shift, shifts to a minimal extent only. This is reflected by a modestly shifted rhythm of behavioural activity. However, the neuronal activity rhythm of the SCN in a brain slice preparation, which reveals the actual phase of the SCN, is immediately shifted to a large extent. These data implicate that the SCN clock is retarded from shifting due to its connections with other brain areas. It is concluded that the neuronal network of the central nervous system provides a stabilizing influence on the SCN.

The phenomenon of neuronal connections affecting the phase resetting capacity of the SCN clock was further explored by use of transgenic mice as described in **chapter 3**. The mice have a genetic background that parallels the genetic mutation seen in patients suffering from a specific type of migraine (Familial Hemiplegic Migraine). These 'migraine mice' are characterized by an increased neurotransmitter release, due to a mutation in the gene encoding a voltage-gated calcium channel (subtype  $Ca_v2.1$ ). Functionally, this leads to increased synaptic communication between neurons. In migraine patients, this hyper excitability leads to 'cortical spreading depression', which is thought to be causal to the symptoms of migraine aura. In view of the present research topic, it was questioned what the impact is of such a hyper excitable brain for the communication between different components within the circadian system, and whether this would lead to abnormal phase shifting. The migraine mice were exposed to a 'jet lag-protocol'. Strikingly, right after the shift of the light-dark cycle, these migraine mice were able to shift their behavioural activity and sleep cycle to a much larger extent than control (wild type) mice. The rhythm of the SCN clock activity was also shifted to a larger extent than in wild type mice. This result underscores the importance of the neuronal network of the central nervous system in resetting the clock, and shows that the neuronal connections underlying the interaction between the SCN and other brain components relies on calcium channel-mediated neuronal signalling. The presence of a stabilizing network is assumed to be rather beneficial in order to protect against acute imbalance of different brain systems in response to non-significant environmental changes. Exposure to time zone transitions can trigger a migraine attack in migraine patients. The results may provide further insight in the mechanisms responsible for triggering migraine attacks. The results may also be valuable in the development of new strategies to treat jet-lag related disorders.

**The contribution of retinal cones to the circadian system**

The environmental light-dark cycle is a potent stimulus to reset the circadian system and for synchronization to the environment. What is the photoreceptive basis for circadian light perception? For long it was assumed that rods and cones, serving functions in pattern and colour vision, were the only retinal photopigments. The discovery of the photopigment melanopsin, only about ten years ago, caused a revolutionary shift in the understanding of how non-visual responses such as the pupillary light reflex and circadian light entrainment could be mediated. Melanopsin functioning is based on the integration of ambient light levels over longer periods of time, which seems suited for the detection of light intensities by the SCN clock. However, melanopsin is not the sole mediator of light of the circadian system. Recent studies have shown that all classes of photoreceptors contribute to circadian regulation. What is the relative contribution of each photopigment? This is a key question in the field. While recent studies have highlighted the contribution of rods, the role of cones in circadian regulation is largely unexplored, and functional participation of cones has been considered rather unlikely.

The experiments described in **chapter 4** explore the role of cones in circadian responses. The study focused on the impact of UV light and aimed to stimulate the UV light sensitive (UVS) cones. In contrast to the short wavelength sensitive cones in humans, which are sensitive to blue light, the short wavelength cones of mice are sensitive to UV light. By a comprehensive set of behavioural and electrophysiological experiments, it was shown that the SCN clock, as well as behavioural activity and sleep patterns, is strongly modulated by UV light. Interestingly, the data show that the activity pattern of SCN neurons can 'code' for the intensity (irradiance) of UV light. This irradiance detection appeared to be retained in the absence of melanopsin. Thus, while irradiance signalling was generally ascribed to melanopsin activation, the irradiance detection can also be mediated by the classical photopigments. The data reveal a fast response pattern, which is typical for cones. Moreover, under bright white light background conditions, UV light can still induce a response in the SCN, suggesting the involvement of UVS cones. In addition, the phase shifting capacity of the circadian system in response to UV light appeared to be largely unaffected in the absence of rods, but was severely reduced in the absence of rods and cones. These results point to the involvement of cones, and also suggest the involvement of rods at low light intensities. Collectively, the data presented in **chapter 4** provide first evidence that UVS cones do play a role in the regulation of circadian responses.

It is concluded in this thesis that different photopigments are likely to fulfill additive roles, and function at different spectral and irradiance sensitivity windows. For instance, rods may function at low light intensities, while cones and melanopsin function at average to high light intensities. Differences in the spectral sensitivities of each class of photoreceptor may be relevant to detect subtle spectral changes in ambient light at different times of the day, which adds to proper synchronization to day and night cycles.

### **Opioids and the circadian system**

**Chapter 5** focussed on the influence of non-photic stimuli on the circadian system. Circadian rhythmicity can be strongly modulated by opioids. Endogenous opioids, such as endorphins and enkephalins, are present in the pathways that innervate the SCN. In the experiments described in **chapter 5**, the morphine homologue fentanyl was used to investigate the mechanisms by which opioids exert their effects on the circadian system. When applied during the day, but not during the night, fentanyl causes phase shifts of the running wheel activity pattern of hamsters. This effect was prevented by selective blockage of opioid receptors, which indicates that the effects are mediated by true opioid receptor activation. It is likely that these opioid receptors are present in the SCN, as it was observed that fentanyl acutely suppresses the firing rates of SCN neurons. In addition, clock gene expression is also affected by fentanyl. Importantly, the effects of fentanyl are counteracted by simultaneous exposure to light. Vice versa, light-induced phase shifts of behavioural activity rhythms and gene expression can be attenuated by the administration of fentanyl. These results demonstrate that the photic and non-photic pathways intersect.

Fentanyl is a commonly used painkiller and sedative drug in the clinic. As such, the time of dosing in clinical settings may be considered of importance. The results are also interesting in view of endogenous levels of endorphins, which are known to increase during running. It is possible that behavioural activity and opioids activate the SCN through the same innervating pathways. The effects of behavioural activity on the SCN are the topic of **chapter 6**.

### **Influences of behavioural activity on the circadian clock**

While the daily timing of behavioural activity is under the control of the circadian clock, as was reported in detail in **chapter 2**, behavioural activity in turn has acute effects on the neuronal activity of the clock. In night-active animals, spontaneous activity results in suppression of neuronal activity levels in the SCN. These brief episodes of activity-induced suppression are superimposed on the 24h rhythm of



SCN neuronal activity. The firing rates are suppressed for the total duration of behavioural activity. When the animal ceases its activity, the neuronal activity slowly recovers to original firing rates. Surprisingly, any type of behavioural activity (i.e. grooming, eating, moving) could lead to suppression of neuronal activity. However, the effects were found to be most profound with more vigorous levels of activity, such as walking and running. Importantly, the data implicate that activity at the proper phase of the 24h cycle (i.e. the night in night active animals, when SCN neuronal activity levels are low) results in a more robust rhythm of the SCN clock. By contrast, spontaneous activity during the day, when neuronal activity levels are high, would lead to a reduction of the rhythm amplitude. While the recordings have been performed in night-active animals, the effect of exercise on the circadian system is also of interest for health in humans. Several diseases, as well as aging processes, are associated with circadian rhythm disorders, and specifically with a reduction of circadian rhythm amplitude. Properly timed behavioural activity may increase the SCN neuronal activity rhythm amplitude, providing a stronger circadian signal to other bodily functions.

### **Conclusions and implications**

As reviewed in **chapter 7**, the results presented in this thesis demonstrate that both photic and non-photoc stimuli strongly modify the circadian clock. Photic and non-photoc pulses are counter-effective: photic pulses result in excitations, non-photoc pulses lead to suppression of SCN neuronal activity. Phase shifts in response to photic cues can be induced during the night, and phase shifts to non-photoc cues during the day. However, the SCN neurons show sensitivity to both photic and non-photoc pulses throughout the 24h cycle. In response to photic as well as non-photoc factors, the SCN firing pattern is able to encode several characteristics of the stimulus: intensity, duration, and timing. Synchronisation of the internal clock to the environmental cycle is regulated by the interplay of photic and non-photoc cues, where both stimuli seem to fulfill an essential function in maintaining, enhancing, and fine-tuning of the phase and amplitude of the rhythm of the circadian clock.

Research on the functioning of the circadian clock has several applications that are relevant for society and for clinical settings. **Chapter 7** addresses the implications of the results presented in this thesis. Shift work, the 24-7 society, and flights across time zones are a few examples of the circadian system being challenged by humans. Circadian rhythm disorders often lead to sleeping problems, which has strong impact on performance and well-being in daily life. The prevalence of some diseases exhibits circadian rhythmicity, e.g. migraine and cardiovascular attacks usually occur in the

morning. Furthermore, circadian variability is known to affect the therapeutic effectiveness of medication, which highlights the importance of the time of drug application. Finally, several physical and mental diseases, such as Alzheimer disease, bipolar disease, diabetes, and metabolic syndrome, are associated with disturbed circadian rhythmicity. Through mechanisms described in this thesis, both light and physical exercise can boost the rhythm amplitude of the clock, provided that the timing is correctly chosen.

# Nederlandse samenvatting

## Fotische en niet-fotische modulatie van de circadiane klok in zoogdieren.

### De circadiane klok in zoogdieren

Dit proefschrift beschrijft het functioneren van een klein hersengebied dat mens en dier in staat stelt te anticiperen op dag-nacht wisselingen en seizoensfluctuaties in de omgeving. Dit hersengebied bestaat uit twee groepen zenuwcellen van elk zo'n 10.000 neuronen, en herbergt een interne biologische klok. Het is een evolutionair goed bewaard gebleven aanpassing aan dagelijks terugkerende veranderingen die voortkomen uit de draaiing van de aarde om haar as, zoals 24-uurs ritmen in licht-donker, omgevingstemperatuur en voedselbeschikbaarheid. Daarnaast leidt de draaiing van de aarde om de zon tot seizoensritmen in daglengte. Deze worden ook geregistreerd door de biologische klok, om zo processen als voortplanting, vachtwisseling en migratie te kunnen afstemmen op de meest gunstige overlevingsomstandigheden.

De biologische klok in de hersenen functioneert als een pacemaker en stuurt 24-uurs ritmen aan in tal van organen, in fysiologische processen en in gedrag. Zo worden er ritmen gevonden in het slaap-waak-patroon, hormoonspiegels, bloeddruk, lichaamstemperatuur en cognitieve functies. De cellen van de interne klok zijn genetisch uitgerust om zelfstandig een ritme te genereren van ongeveer, maar niet exact, 24 uur. Er wordt daarom gesproken over de 'circadiane klok' (circa = ongeveer, dies = dag). De omlooptijd van de klok in de mens is iets langer dan 24 uur, de omlooptijd van de klok in de meeste nacht-actieve dieren - zoals de muis - is iets korter dan 24 uur. Om optimaal te kunnen functioneren, moet de circadiane klok dus elke dag een beetje bijgesteld worden. Hiervoor gebruikt de klok informatie over de tijd uit de buitenwereld. In zoogdieren, zoals de mens, bevindt de circadiane klok zich in the supra-chiasmatische nuclei (SCN) aan de basis van de hypothalamus, direct boven de kruising van de oogzenuwen. Dit is een strategische lokatie, want de belangrijkste stimulus om de biologische klok te synchroniseren aan de 24-uurs ritmen van de omgeving is de licht-donker cyclus. Licht wordt gedetecteerd door gespecialiseerde oogpigmenten en bereikt de SCN via een directe zenuwbaan. Wanneer licht wordt gezien tijdens de nacht, geeft dit een verschuiving in de fase van het ritme: in het eerste deel van de nacht leidt licht tot een versnelling, in het tweede gedeelte van de nacht tot een vertraging van het ritme. Naast fotische stimuli (licht),

kunnen niet-fotische prikkels, zoals gedragsactiviteit of farmacologische stoffen, op bepaalde tijden van de 24-uurs cyclus een faseverschuiving induceren. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift is gericht op verschillende factoren die de werking van de circadiane klok kunnen beïnvloeden. Tot welke veranderingen in het circadiane systeem leiden fotische en niet-fotische stimuli?

### **De SCN-neuronale activiteit reguleert de timing van het gedrag**

Zenuwcellen communiceren met elkaar door middel van elektrische impulsen, ofwel het produceren van actiepotentialen. Wanneer de activiteit van een groep SCN neuronen met behulp van een micro-elektrode wordt gemeten over de tijd, is een ritme zichtbaar met een sinus-vormig karakter en een omlooptijd van ongeveer 24 uur. Het ritme (de golfvorm) toont een hoge neuronale activiteit tijdens de dag, en een lage neuronale activiteit tijdens de nacht. Het verschil tussen dag en nacht bepaalt de amplitude van het ritme. Zoals eerder genoemd, stuurt de SCN-klok het 24-uurs ritme in de gedragsactiviteit aan. Wanneer er geen informatie over tijd uit de omgeving beschikbaar is, zoals bijvoorbeeld onder een conditie van 'constante duisternis', kunnen dieren de dagelijkse start van hun activiteitspatroon toch timen met een ongelooflijke precisie. **Hoofdstuk 2** gaat dieper in op de vraag hoe de SCN de timing van de activiteit regelt. Wat is precies de relatie tussen het signaal dat de groep neuronen van de circadiane klok afgeeft, en het activiteitsritme van een dier? Muizen zijn nacht-actieve dieren, dus hun activiteitspatroon is in anti-fase met het ritme van de SCN neuronen. Wanneer de daglengte verandert als gevolg van de wisseling van seizoenen, past het dier zijn activiteitsperiode aan de daglengte aan. Zo is de muis relatief kort actief in de zomer (wanneer de dag lang is en de nacht kort is: 16u licht, 8u donker) en lang actief in de winter (wanneer de dag kort is en de nacht lang is: 8u licht, 16u donker). Deze aanpassing staat onder regie van de SCN. De 24-uurs golfvorm van het SCN-neuronale ritme verandert met de lengte van de dag. **Hoofdstuk 2** beschrijft dat de daglengte wordt weergegeven door een bredere of smallere piek. Het moment dat het dier na een periode van rust actief wordt, blijkt onder alle daglengten gerelateerd te zijn aan de dalende fase van de 24-uurs golfvorm van de SCN. Om precies te zijn: de transitie van rust naar activiteit wordt getriggerd door het moment dat de SCN golfvorm het half-maximale niveau bereikt tussen piek en dal van de golfvorm. Dit is het gedeelte van de golfvorm waarop de neuronale activiteit het snelst daalt. Evenzo kan de transitie van activiteit naar rust worden voorspeld door de half-maximale waarde van de stijgende fase van de 24-uurs golfvorm. Op deze manier vormt de neuronale activiteit de output van de SCN, die codeert voor veranderingen in daglengte, en dient de SCN-golfvorm als een signaal om de activiteitsperiode van het dier te timen.

### Het aanpassingsvermogen van de klok aan andere tijdzones.

In **hoofdstuk 3** is onderzocht hoe het circadiane systeem reageert op een acute verandering in de licht-donker cyclus van de omgeving, zoals bijvoorbeeld optreedt na een transmeridiane vlucht of tijdens werk in ploegendiensten. Het lichaam heeft tijd nodig om zich aan te passen aan dit soort plotselinge grote veranderingen in het licht-donker schema. Aanpassing van verschillende lichaamsritmen gebeurt met verschillende snelheden. Deze tijdelijke ontregeling van ritmen staat bekend als 'jet lag'. Over het algemeen kost het na een vlucht naar het oosten méér tijd om aan de nieuwe tijdzone aan te passen dan na een vlucht naar het westen. Met andere woorden, een faseversnelling van het ritme is moeilijker te realiseren dan een fasevertraging. Dit fenomeen wordt ook gezien in activiteitspatronen van muizen. Onderzoek naar het onderliggende mechanisme toont aan dat er een dissociatie optreedt tussen verschillende organisatieniveaus binnen het circadiane systeem tijdens een versnelling. Muizen werden blootgesteld aan een 'jet lag-protocol', waarin het externe licht-donker schema plotseling 6 uur werd verschoven, als na een vlucht van New York naar Amsterdam. Na deze verandering werd op verschillende niveaus gemeten wat de snelheid van adaptatie was aan het nieuwe licht-donker regime. Wanneer de activiteit van de SCN neuronen werd gemeten op de eerste dag van het nieuwe lichtregime, werd gevonden dat het ritme van de SCN, evenals het ritme in het gedrag, maar nauwelijks verschoven was. Echter, wanneer de SCN activiteit werd gemeten in een meetsysteem, wat inhoudt dat de cellen van de SCN geïsoleerd zijn van de rest van het brein maar toch doorgaan met het produceren van een ritme, kan de eigenlijke fase van het ritme van de SCN zichtbaar gemaakt worden. Hieruit is gebleken dat het ritme van de SCN in isolatie al onmiddellijk enkele uren verschoven kan zijn. Deze data impliceren dat het verschuiven van het SCN ritme na een verandering in de licht-donker cyclus wordt geremd door de connecties met andere hersengebieden. Niet alleen de klok zelf, maar ook de context van de klok is belangrijk, dus de verbindingen met andere hersengebieden. Het neuronale netwerk van het centrale zenuwstelsel oefent een stabiliserende factor uit op de SCN-klok.

Het fenomeen dat neuronale connecties ten grondslag liggen aan de traagheid in het vermogen aan te passen aan een nieuwe tijdzone, is in **hoofdstuk 3** verder onderzocht met behulp van muizen met een speciale genetische achtergrond. Deze muizen hebben een genetische afwijking die overeenkomt met de genetische component die in mensen een bepaald type migraine veroorzaakt. De 'migraine-muizen' worden gekenmerkt door een toename in de afgifte van neurotransmitters door veranderingen in specifieke celmembraankanalen (calciumkanalen, subtype Ca<sub>v</sub>2.1), wat functioneel gezien neerkomt op een toename van synaptische

communicatie tussen neuronen. In migraine patiënten leidt dit tot een kortdurende, zich door de hersenen verspreidende golf van hyperexciteerbaarheid, onmiddellijk gevolgd door een periode van uitdoving, wat ten grondslag lijkt te liggen aan de symptomen van migraine aura. De onderzoeksvraag die in dit proefschrift gesteld wordt, is wat de impact is van een dergelijk hyperexciteerbaar brein voor de communicatie tussen verschillende componenten van het circadiane systeem. Zal de aanpassing aan plotselinge verschuivingen van de externe licht-donker cyclus anders verlopen in deze muizen? De migraine-muizen werden blootgesteld aan eenzelfde 'jet lag-protocol'. Merkwaardig genoeg waren deze migraine-muizen in staat om hun activiteit/slaap cyclus veel sneller aan te passen aan het nieuwe licht-donker schema dan de controle-muizen. Ook het ritme van de SCN-neuronale activiteit was in veel grotere mate verschoven in vergelijking met de controle-muizen. Dit onderzoek bevestigt dat de neuronale communicatie binnen het netwerk van belang is voor het bijstellen van de SCN-klok. Bovendien laat dit resultaat zien welke communicatie methode belangrijk is in de interactie tussen de SCN en andere hersencomponenten, namelijk specifiek de synaptische communicatie middels de  $(Ca_v2.1)$  membraankanalen. Het is aannemelijk, en wenselijk, dat het netwerk van de SCN en het centrale zenuwstelsel beschermt tegen een ongewenste acute disbalans in hersensystemen ten gevolge van plotselinge veranderingen in de omgeving. Acute veranderingen zoals vluchten over tijdzones kunnen een migraine aanval triggeren in migraine patiënten. De resultaten kunnen van belang zijn bij het ontrafelen van de mechanismen die ten grondslag liggen aan het ontstaan van een migraine aanval. De bevindingen kunnen mogelijk ook bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe strategieën om jet-lag gerelateerde aandoeningen te behandelen.

#### **De rol van retinale kegeltjes in het circadiane systeem**

Licht uit de omgeving is een belangrijk signaal om de circadiane klok te synchroniseren aan het 24-uurs ritme van de omgeving. De SCN ontvangt lichtinformatie enkel en alleen via het oog. Welke oogpigmenten zijn hiervoor verantwoordelijk? Lange tijd is aangenomen dat staafjes en kegeltjes, de klassieke oogpigmenten met een visuele functie in kleur- en patroonherkenning, de enige fotopigmenten zijn in het oog. De baanbrekende ontdekking van het nieuwe type fotopigment melanopsine, zo'n tien jaar geleden, bracht een wetenschappelijke revolutie met zich mee. Hierdoor kunnen niet-visuele responsen, zoals pupilconstrictie en circadiane ritmiek, beter begrepen worden. Melanopsine is in staat om lichtinformatie te integreren over een langere tijdsperiode. Het is daarmee bij uitstek geschikt voor de detectie van lichtintensiteiten gedurende de dag.

Toch wordt de lichtinput naar de SCN niet alleen verzorgd door melanopsine. Recente studies hebben aangetoond dat alle drie de klassen fotopigmenten betrokken zijn in de regulatie van circadiane ritmiek. Wat is de relatieve contributie van elk oogpigment? Dit is een sleutelvraag in het vakgebied van de chronobiologie. Hoewel recente studies een rol voor staafjes hebben bevestigd, is de rol van kegeltjes in de circadiane regulatie nog nauwelijks onderzocht en tot nu toe verwaarloosbaar klein verondersteld.

In **hoofdstuk 4** wordt de functie van kegeltjes in het circadiane systeem nader onderzocht. De studie concentreert zich op de impact van ultraviolet (UV) licht. In tegenstelling tot de mens heeft de muis een kegeltje dat gevoelig is voor UV-licht. In een scala aan experimenten is aangetoond dat de neuronale activiteit van de SCN-klok, net als de gedragsactiviteit en het slaappatroon van de muis, sterk gemoduleerd kan worden door UV-licht. Interessant is dat de resultaten laten zien dat het activiteitspatroon van SCN neuronen kan 'coderen' voor de intensiteit van UV-licht. Deze intensiteitdetectie blijkt onveranderd te zijn in de afwezigheid van het fotopigment melanopsine. Dus, hoewel de detectie van lichtintensiteiten specifiek toegeschreven was aan de functie van melanopsine, is in dit proefschrift aangetoond dat andere fotopigmenten deze rol ook kunnen vervullen. De neuronen van de SCN vertonen een zeer snelle reactie op UV-licht. Dit reactiepatroon is typerend voor de respons van kegeltjes op licht. In aanvulling op deze bevinding is een serie gedrags- en elektrofysiologische studies uitgevoerd, beschreven in **hoofdstuk 4**. In deze studies is gevonden dat, naast een rol voor staafjes bij lage lichtintensiteiten, de effecten van UV-licht gerealiseerd zijn via de UV kegel. Dit is de eerste studie die een rol voor de UV kegel aantoont in het circadiane systeem.

In de discussie van dit proefschrift wordt gesteld dat verschillende fotopigmenten waarschijnlijk samenwerken door verschillende, aanvullende dan wel overlappende, functies te vervullen. Elk fotopigment kent marges waarbinnen het maximaal gevoelig is voor een bepaalde golflengte (kleur) en intensiteit. Zo lijken de staafjes vooral van belang bij lage lichtintensiteiten, en kegeltjes en melanopsine bij gemiddelde tot hoge intensiteiten. Verschillen in spectrale gevoeligheid van elke type fotopigment kunnen relevant zijn om subtiele kleurveranderingen in omgevingslicht waar te nemen, bijvoorbeeld tijdens de schemering. Dit kan bijdragen aan een goede fine-tuning en zorgt voor een optimale synchronisatie aan de dag-nacht cyclus.

### **Opiaten en de circadiane klok**

In **hoofdstuk 5** is de invloed van niet-fotische prikkels op het circadiane systeem onderzocht. Circadiane ritmiek kan sterk beïnvloed worden door farmacologische stoffen, bijvoorbeeld opiaten. Lichaamseigen opiaten, zoals endorfinen en enkefalinen, komen voor in de hersenbanen die de SCN-klok moduleren. In de experimenten beschreven in **hoofdstuk 5** is gebruik gemaakt van 'fentanyl', een homoloog van morfine, om te onderzoeken via welk mechanisme opiaten hun effect op het circadiane systeem kunnen uitoefenen. Wanneer fentanyl werd toegediend tijdens de dag, maar niet tijdens de nacht, leidde dit tot een faseverschuiving in het gedragsritme. Dit effect werd gerealiseerd door de activatie van opiaatreceptoren. Het is goed mogelijk dat deze opiaatreceptoren aanwezig zijn in de SCN, aangezien gevonden is dat fentanyl de neuronale activiteit van de SCN in een meetsysteem acuut kan verlagen. Ook de genexpressie van zogenoemde 'klokgenen' werd direct beïnvloed door fentanyl. Een belangrijke bevinding van dit onderzoek is dat effecten van fentanyl worden tegengewerkt door gelijktijdige blootstelling aan licht. Andersom is dit ook het geval: fase verschuivingen in het gedragsritme en in genexpressie die veroorzaakt werden door lichtpulsen tijdens de nacht, konden aanzienlijk worden gereduceerd door de toediening van fentanyl. Deze resultaten suggereren dat fotische en niet-fotische input banen naar de SCN convergeren, en elkaar tegenwerken.

Fentanyl is een veelgebruikte pijnstiller en anesthesiemiddel in de kliniek. Als zodanig kan nagegaan worden dat het tijdstip van dosering bij een medische opname belangrijk is. De resultaten werpen ook een nieuw licht op de effecten van lichaamseigen endorfinen, die bijvoorbeeld vrijkomen tijdens het hardlopen. Het is mogelijk dat lichaamsactiviteit en opiaten de SCN beïnvloeden via overeenkomstige hersenbanen. Het effect van lichaamsactiviteit op de klok is nader onderzocht in **hoofdstuk 6**.

### **De invloed van lichaamsactiviteit op de circadiane klok**

Hoewel de dagelijkse timing van gedragsactiviteit onder controle staat van de circadiane klok, zoals ook gerapporteerd is in **hoofdstuk 2**, is er ook een omgekeerd effect, waarin episodes van lichaamsbeweging de neuronale activiteit van de SCN-klok moduleren. Het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 6** laat zien dat spontane gedragsactiviteit leidt tot een acute afname van de activiteit van de SCN neuronen. De verminderde neuronale activiteit duurt de gehele episode van activiteit. Vanaf het moment dat het dier weer in rust is, herstelt de hersenactiviteit van de SCN langzaam naar originele waarden. Verrassenderwijs kan elk type gedrag (zoals wassen, eten,



bewegen) resulteren in een suppressie van neuronale activiteit. Echter, de effecten zijn het grootst tijdens de meest actieve vormen, zoals lopen en rennen. Een belangrijke implicatie van de resultaten is dat spontane gedragsactiviteit op het juiste moment van de 24-uurs cyclus resulteert in een meer robuust ritme van de SCN-klok. Immers, wanneer het dier actief is tijdens de nacht, wanneer de neuronale activiteit al laag is (dal van de golfvorm), dan laat dit de amplitude van het kloksignaal toenemen. Echter, wanneer de muis actief is tijdens zijn rustperiode, wanneer de SCN neuronen hoge activiteit vertonen (piek van de golfvorm), dan leidt dit tot een reductie van de amplitude. Hoewel deze metingen zijn uitgevoerd bij nacht-actieve zoogdieren, zijn de bevindingen ook interessant voor het inzicht in gezondheidseffecten van gedrag voor de mens. Het is bekend dat een aantal ziektebeelden geassocieerd is met een verstoring van de biologische klok, waar vaak een afname in de amplitude van de biologische ritmiek aan ten grondslag ligt. Ook naarmate we ouder worden neemt de amplitude van het kloksignaal af. Lichaamsactiviteit op juiste tijden zou kunnen helpen om de amplitude van het ritme van de SCN te vergroten, om daarmee een sterker signaal af te kunnen geven aan de overige lichaamsklokken. Dit komt ten goede aan welbevinden en gezondheid.

### **Conclusies en implicaties**

Zoals besproken wordt in **hoofdstuk 7**, laten de resultaten van dit proefschrift zien dat zowel fotsche als niet-fotsche factoren een sterk modulerend effect hebben op de circadiane klok. Fotsche en niet-fotsche pulsen hebben een tegengesteld effect op de klok: fotsche pulsen leiden tot excitaties, niet-fotsche pulsen leiden tot suppressies van de neuronale activiteit. Hoewel de SCN-klok dag en nacht gevoelig is voor fotsche en niet-fotsche pulsen, worden faseverschuivingen van het gedragsritme tijdens de nacht vooral geïnduceerd door fotsche pulsen en tijdens de dag door niet-fotsche pulsen. Wat in dit proefschrift duidelijk naar voren komt is dat de circadiane klok in staat is om karakteristieken van zowel fotsche als niet-fotsche pulsen te detecteren en representeren, namelijk duur, intensiteit en tijdstip. De synchronisatie aan de omgevingscyclus wordt gereguleerd door een samenspel van fotsche en niet-fotsche stimuli. In conclusie kan gesteld worden dat fotsche en niet-fotsche pulsen fungeren in het handhaven en versterken van de fase en amplitude van het ritme van de circadiane klok.

Tenslotte wordt in het laatste deel van **hoofdstuk 7** een blik geworpen op medische en maatschappelijke vraagstukken waarin wetenschappelijk onderzoek naar het circadiane systeem inzicht kan geven. Het indelen van werknemers in een ploegdienstrooster en de vluchtschema's van topsporters naar internationale

wedstrijden, zijn voorbeelden waarin de biologische klok door de mens wordt uitgedaagd. Stoornissen van de biologische klok leiden vaak tot slaapproblemen, wat verregaande gevolgen kan hebben voor het functioneren van een persoon. De aanwezigheid van 24-uurs ritmen in lichaamsprocessen kan leiden tot cyclische patronen in de uiting van sommige ziektebeelden. Zo is het risico op een migraine aanval of hartfalen het hoogst in de ochtend. Ook is de effectiviteit van medicatie afhankelijk van het tijdstip van toediening, wat bestudeerd wordt door het vakgebied van de chronofarmacologie. Tenslotte gaan diverse ziektebeelden gepaard met verstoringen van het circadiane systeem. Zo is genoemd dat de amplitude van het kloksignaal sterk is afgenomen bij ouderen, bij de ziekte van Alzheimer, en bij bipolaire stoornis. Zowel licht als lichaamsbeweging kunnen door de in dit proefschrift beschreven effecten een 'boost' geven aan het ritme van de klok, mits het tijdstip juist gekozen is.