



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Hierarchical organization of the circadian timing system**

Steensel, M.J. van

### **Citation**

Steensel, M. J. van. (2006, June 21). *Hierarchical organization of the circadian timing system*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4418>

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/1887/4418>

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

## SAMENVATTING EN CONCLUSIE

Als gevolg van de draaiing van de aarde wordt het leven blootgesteld aan dagelijks terugkerende veranderingen in de omgeving, zoals licht en donker, temperatuur en de aanwezigheid van voedsel. Om met deze veranderingen om te kunnen gaan en om erop te anticiperen beschikken de meeste organismen over een circadiaan systeem. Dit systeem genereert een ritme van ongeveer 24 uur (circa = ongeveer; dies = dag) in een groot aantal gedrags- en fysiologische processen, zoals het slaap-waak patroon, de bloeddruk, lichaamstemperatuur en hormoonconcentraties in het bloed. Van de meeste diersoorten is bekend dat een belangrijke circadiane oscillator of pacemaker aanwezig is op een specifieke plaats in of vlakbij de hersenen. Gedurende de laatste jaren is echter ook duidelijk geworden dat een organisme meerdere circadiane oscillatoren kan hebben en dat deze zich zowel binnen als buiten het centrale zenuwstelsel bevinden. Voor een juiste timing van de verschillende gedrags- en fysiologische processen ten opzichte van elkaar en ten opzichte van de buitenwereld moeten de onderliggende oscillatoren onderling gesynchroniseerd zijn en een juiste fase relatie met de omgeving hebben. Synchronisatie tussen de oscillatoren vindt plaats via interacties of koppelings mechanismen, terwijl voor synchronisatie aan de omgeving gebruik wordt gemaakt van de licht-donker cyclus. In het eerste hoofdstuk van dit proefschrift wordt de aanwezigheid van verschillende circadiane oscillatoren in een aantal diersoorten besproken. Bovendien wordt behandeld hoe deze oscillatoren binnen een organisme kunnen interacteren.

De voornaamste circadiane pacemaker van zoogdieren bevindt zich in de suprachiasmatische kernen (SCN). Deze kernen bestaan elk uit ongeveer 8.000 neuronen en zijn gelegen aan de basis van de hypothalamus in de hersenen. Circadiane ritmiek wordt gegenereerd in individuele SCN cellen op basis van in elkaar grijpende positieve en negatieve moleculaire feedback loops. De belangrijkste externe stimulus van het circadiane systeem is licht. Licht-informatie bereikt de pacemaker via een directe projectie van de retina naar de SCN en veroorzaakt daar een verandering in de elektrische activiteit en in de expressie van klokgenen. Gedurende de nacht, maar niet tijdens de dag, resulteren deze veranderingen in een fase verschuiving. Dit mechanisme ligt ten grondslag aan "entrainment", het synchroniseren aan de omgeving. Licht-geïnduceerde fase verschuivingen zijn zichtbaar in het begin en het einde van gedragsactiviteit. Het is echter gebleken dat de kinetiek en de grootte van de fase verschuivingen aan het begin en het einde van gedragsactiviteit niet hetzelfde zijn. Om dit verschil te verklaren is een model ontwikkeld waarin twee gekoppelde oscillatoren verschillend reageren op licht en elk verantwoordelijk zijn voor het aansturen van een deel van de gedragsactiviteit.

Naast licht kunnen ook specifieke soorten gedrag of farmacologische stoffen fase verschuivingen veroorzaken. Deze niet-fotische stimuli kunnen gebruikt worden om de eigenschappen te onderzoeken van de oscillatoren die het begin

en het einde van gedragsactiviteit aansturen. In hoofdstuk 2 zijn experimenten beschreven waarin de fase verschuivende effecten van de opiaat agonist fentanyl en de benzodiazepine midazolam werden onderzocht. Toediening van fentanyl of midazolam in de late subjectieve dag veroorzaakt grote fase vooruitschuivingen van het begin van de gedragsactiviteit, terwijl het einde van de gedragsactiviteit niet vooruitschuift. Grote fase achteruitschuivingen van het einde van de gedragsactiviteit zijn het gevolg van toediening gedurende de late subjectieve nacht of vroege subjectieve dag, maar de reactie van het begin van het gedrag op deze injecties is gering. Deze resultaten laten zien dat het begin en het einde van de gedragsactiviteit verschillend reageren op toediening van fentanyl en midazolam en leiden tot de conclusie dat er kwalitatieve verschillen bestaan tussen de twee systemen die de gedragsactiviteit reguleren.

Het is nog niet aangetoond of de verschillende reacties van het begin en het einde van gedragsactiviteit het gevolg zijn van processen binnen of buiten de SCN. Hoofdstuk 6 laat zien dat er binnen de SCN twee groepen oscillatoren bestaan die verschillend reageren op een fotsche stimulus. Op de eerste dag na een 6-uurs achteruitschuiving van de licht-donker cyclus vertoont de neuronale activiteit van zowel de ventrale als de dorsale SCN een bimodaal patroon. Na verloop van een aantal dagen in continu donker resynchroniseren de twee pieken, wat resulteert in een volledig verschoven, unimodale piek in de neuronale activiteit op dag 6 na de verschuiving. Als de ventrale en de dorsale SCN van elkaar gescheiden worden door middel van een snede laten beide delen een unimodaal patroon zien. Het ritme in de ventrale SCN is geheel verschoven, terwijl dat van het dorsale deel niet verschuift. Ook na een fase vooruitschuiving van de licht-donker cyclus vertoont de ventrale SCN een grotere verschuiving dan het dorsale deel. Deze gegevens tonen aan dat de SCN tenminste twee gebieden bevat die met verschillende snelheid reageren op een verschuiving van de licht-donker cyclus. De grote verschuiving van de ventrale SCN kan veroorzaakt worden door de dichte innervatie van dit gebied vanuit de retina, terwijl de geringe retinale projectie naar de dorsale SCN de kleine initiële respons van dit deel kan verklaren. De bimodale pieken die in intacte plakken worden gevonden geven aan dat informatie over de fase wordt uitgewisseld tussen de twee delen van de SCN. Na toediening van de GABA<sub>A</sub> antagonist bicuculline aan de intacte plak vertonen zowel de dorsale als de ventrale SCN unimodale patronen in vuurfrequentie. Evenals na een snede zijn deze pieken uit fase. Dit toont aan dat GABA een belangrijke rol speelt in de communicatie tussen de dorsale en de ventrale SCN.

Het is duidelijk dat onder bepaalde omstandigheden dissociatie kan ontstaan tussen groepen oscillatoren binnen de SCN. Er zijn echter ook aanwijzingen voor dissociatie tussen organisatieniveaus van het circadiane systeem. Hoofdstuk 5 laat zien dat de expressie van het klokgen *Per1* in de SCN een onmiddellijke verschuiving vertoont na een 6-uurs vooruitschuiving van de licht-donker cyclus. Het ritme in gedragsactiviteit laat daarentegen geen fase verschuiving zien, wat overeenkomt met de *in vivo* neuronale activiteit van de

SCN. De *in vitro* neuronale activiteit van de SCN verschuift aanvankelijk een aantal uren, maar na een aantal dagen keert het ritme terug naar de onverschoven toestand. Deze gegevens suggereren dat de *in vitro* neuronale activiteit van de SCN in een hypothalamische plak, waar de SCN losgekoppeld is van de gebieden erbuiten, de eigenlijke fase van de SCN weergeeft. Echter, *in vivo*, waar de SCN deel uitmaakt van het gehele zenuwstelsel, wordt de neuronale activiteit van de SCN gemaskeerd door de activiteit van onverschoven gebieden buiten de SCN. De terugkeer naar de onverschoven fase van de *in vitro* elektrische activiteit geeft aan dat de gebieden buiten de SCN uiteindelijk een entrainerend effect hebben op de SCN. Deze bevindingen leiden tot nieuwe inzichten in problemen die gerelateerd zijn aan ploegdienst arbeid en jet lag. Ze suggereren dat het onvermogen van het lichaam om zich snel aan te passen aan een verschuiving van de licht-donker cyclus niet veroorzaakt wordt door de circadiane pacemaker zelf, maar het resultaat is van traag reagerende gebieden buiten de SCN die een onverwacht sterke invloed hebben op de fase regulatie van de SCN. Nieuwe studies moeten uitwijzen welke signaal overdracht systemen binnen het centrale zenuwstelsel, en misschien ook in de periferie, betrokken zijn bij het verhinderen van fase verschuivingen van de SCN.

De regulering van slaap vindt plaats via twee processen: een slaap homeostatisch proces en een circadiaan proces. Het is lange tijd aangenomen dat deze processen onafhankelijk van elkaar functioneren, maar in de laatste jaren zijn er aanwijzingen gepubliceerd voor communicatie tussen het slaap homeostatische proces en het circadiane proces. In hoofdstuk 4 werd deze mogelijkheid onderzocht. Gelijktijdige registratie van het electroencefalogram (EEG) en de neuronale activiteit van de SCN *in vivo* toont aan dat er een directe correlatie bestaat tussen de vuurfrequentie van SCN neuronen en het slaap-waak stadium. De neuronale activiteit van de SCN blijkt hoog tijdens de REM slaap en laag tijdens de non-REM slaap. Als het dier selectief wordt gedepriiveerd van REM slaap laat de neuronale activiteit in de SCN de verhogingen niet zien, terwijl deprivatie van de langzame golven van het EEG tijdens de non-REM slaap de dalingen van de neuronale activiteit verhindert. Deze gegevens laten zien dat de neuronale activiteit van de SCN wordt beïnvloed door de slaap-waak stadia. Mogelijk leidt dit tot een optimale coördinatie van de invloeden van het circadiane systeem en die van slaap centra op de timing van slaap.

De projectie van de "intergeniculate leaflet" naar de SCN bevat onder andere enkefalinen, een groep van endogene opiaten. Het is bekend dat de opiaat agonist fentanyl fase verschuivingen veroorzaakt in gedragsactiviteit. In hoofdstuk 3 wordt het mechanisme onderzocht waarmee opiaten zoals fentanyl de circadiane klok in de hamster-SCN kunnen beïnvloeden. Blokkering van fentanyl-geïnduceerde fase verschuivingen door de opiaat antagonist naloxon geeft de betrokkenheid van opiaat receptoren hierbij aan. Omdat fentanyl bovendien een directe invloed heeft op de vuurfrequentie van SCN neuronen is

het aannemelijk dat de opiaat receptoren zich in de SCN bevinden. Fase verschuivingen die geïnduceerd worden door fentanyl kunnen geblokkeerd worden door gelijktijdige blootstelling van het dier aan licht. Omgekeerd kan fentanyl de licht-geïnduceerde fase verschuivingen en verhoging van *Per1* expressie verhinderen. Deze gegevens tonen een wisselwerking aan tussen licht en opiaten, wat overeenstemt met de overlap van de projectiegebieden van de retina en de intergeniculate leaflet in de SCN. Fase verschuivingen die veroorzaakt worden door verschillende niet-fotische stimuli gaan vaak samen met een daling van de expressie van de klokgenen *Per1* en *Per2* in de SCN. Toediening van fentanyl geeft geen verandering in de expressie van *Per1*, maar een effect op *Per2* kan niet worden uitgesloten. Het is daarom aannemelijk dat fentanyl-geïnduceerde fase verschuivingen via een andere route dan *Per1* worden veroorzaakt. Hieruit kan worden geconcludeerd dat fase verschuivingen via verschillende intracellulaire routes tot stand kunnen komen.

Het doel van dit proefschrift was meer inzicht te verkrijgen in de hiërarchische organisatie van het circadiane systeem en te bepalen of bepaalde eigenschappen van het systeem worden gegenereerd op het niveau van neuronale netwerken of geïntegreerde weefsels. De resultaten geven nieuwe informatie over de aanwezigheid van meerdere componenten binnen het circadiane systeem en over de communicatie tussen deze componenten. Binnen de SCN bestaat een belangrijk functioneel onderscheid tussen het ventrale en dorsale deel. Het effect van bicuculline op de transmissie van informatie tussen deze gebieden geeft aan dat GABAerge mechanismen hieraan ten grondslag liggen. Een sterke invloed van slaap-centra op de SCN blijkt uit het causale verband tussen slaap-waak stadia en de neuronale activiteit van de SCN. Ook opiaten kunnen een belangrijke rol spelen in het circadiane systeem. Hoe sterk de invloed van gebieden buiten de SCN op de SCN is kan worden afgeleid uit het vermogen van deze gebieden om een fase verschuiving van de SCN ongedaan te maken. Het is duidelijk dat het functioneren van het circadiane systeem het gevolg is van de aanwezigheid van diverse componenten waartussen synchroniserende interacties bestaan. Een andere belangrijke bevinding van dit proefschrift is dat meerdere componenten van het circadiane systeem onder bepaalde omstandigheden dissociëren. De kinetiek van de fase verschuivingen van het begin en het einde van gedragsactiviteit na een midazolam of fentanyl injectie zijn bijvoorbeeld verschillend. Bovendien kunnen fase verschuivingen van de licht-donker cyclus leiden tot dissociatie tussen de ventrale en de dorsale SCN, maar ook tot fase verschillen tussen *Per1* expressie, *in vitro* en *in vivo* SCN neuronale activiteit en het gedrag. Hoewel de precieze koppelings- of synchronisatie mechanismen van het circadiane systeem nog onbekend zijn, wordt hun functionele belang steeds duidelijker. De hiërarchische opbouw van het circadiane systeem, de interacties binnen en tussen organisatie niveaus en het vermogen van verschillende componenten om te dissociëren, geven het circadiane systeem de plasticiteit die nodig is om zich aan biologisch relevante veranderingen in de

omgeving aan te passen, terwijl het systeem tegelijkertijd robuust genoeg blijft om niet te reageren op onbelangrijke informatie.