



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The circadian system throughout the seasons of life

Buijink, M.R.

Citation

Buijink, M. R. (2024, June 27). *The circadian system throughout the seasons of life*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3765852>

Version: 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/1887/3765852>

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



Nederlandse samenvatting
Dankwoord
Curriculum vitae
List of publications



Nederlandse samenvatting

De biologische klok is geëvolueerd zodat organismen kunnen anticiperen op dagelijks terugkerende veranderingen in de omgeving, zoals temperatuur, voedselbeschikbaarheid en de aanwezigheid van predatoren. Bijna alle organismen, van eencelligen en planten tot insecten en zoogdieren, bezitten daartoe een mechanisme om de tijd van de dag bij te houden: het circadiane systeem. Daarbij staat *circa* voor “ongeveer”, en *diaan* voor “een dag”, omdat deze biologische klok zonder informatie van buitenaf een cyclus heeft van ongeveer 24 uur. Door externe periodieke invloeden, voornamelijk de licht-donker cyclus, wordt deze klok precies afgestemd op de 24-uurs cyclus van de omgeving.

Op cellulair niveau wordt de biologische klok gevormd door de volgende genen: *brain and muscle ARNT-like protein 1 (bmal1)*, *circadian locomotor output cycles Kaput (clock)*, *period (per)* en *cryptochrome (cry)*. Deze genen en hun eiwitproducten vormen samen een transcriptie-translatie feedback loop met een omlooptijd van ongeveer 24 uur. Bovendien bezitten zoogdieren een hersengebied met een belangrijke rol in het reguleren van circadiane ritmes in zowel het brein als de rest van het lichaam. Dit hersengebied krijgt directe signalen vanuit het netvlies, via de oogzenuw, en bevindt zich boven de kruising van de oogzenuwen. Vandaar de naam: suprachiasmatische nucleus (SCN). In een gezond systeem wordt de biologische klok, zoals de moleculaire klok en de SCN, dagelijks door externe invloeden gelijkgezet met de 24-uurs cyclus van de omgeving. De licht-donker-cyclus, welke het gevolg is van de omwenteling van de aarde, is de meest betrouwbare “tijdsaanduiding” (*zeitgeber*); daarom geldt licht dan ook als de belangrijkste input van de SCN.

Met uitzondering van het gebied rond de evenaar kent de licht-donker-cyclus gedurende het jaar een verandering van de verhouding tussen het aantal uren donker en licht. Dit komt door de hellingshoek in de draaias van de aarde, ten opzichte van de zon. Behalve de lichtduur verandert hiermee ook de temperatuur, wat resulteert in de seizoenen. Het is voordelig voor veel organismen om te anticiperen op de veranderingen die de jaargetijden teweegbrengen, bijvoorbeeld om zich voort te planten in een periode met voldoende voedsel en met een gunstige temperatuur.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift heeft als doel gehad om meer inzicht te krijgen in het functioneren van het circadiane systeem onder verschillende omstandigheden en op verschillende niveaus. Dit gaat om processen op genetisch/moleculair niveau, celniveau, neuronaal-netwerk-niveau en op gedragsniveau. We hebben gekeken naar 24-uursritmes in metaboliëten, eiwitten en gedrag, in zowel jonge als oude muizen. Het effect van veroudering op het circadiane systeem is een belangrijke focus van dit proefschrift geweest, omdat veroudering gepaard gaat met verzwakte 24-uur ritmes. Deze verzwakte

24-uur ritmes zijn op hun beurt in verband gebracht met ouderdomsaandoeningen, zoals slaapproblemen en neurodegeneratieve ziekten, welke uitgebreid worden beschreven in **hoofdstuk 2**. Met de vergaarde kennis van het circadiane systeem kunnen doelen geïdentificeerd worden om circadiane ritmes te bevorderen, hetgeen zal bijdragen aan de algehele gezondheid.

In **hoofdstuk 3-5** hebben we gekeken naar het effect van verschillen in de duur van de lichtperiode op de SCN, namelijk 16 uur of 8 uur, het aantal uren licht in respectievelijk de zomer en winter op de breedtegraad waar Nederland zich op bevindt (51 graden). Het was bekend dat een langere lichtperiode zorgt voor een grotere spreiding in de onderlinge fases van de ritmes in neuronale activiteit, en in de ritmische expressie van genen in neuronen. In **hoofdstuk 4** hebben we aangetoond dat dit ook geldt voor het klokeiwit PER2. Verder laten we zien dat er regionale verschillen zijn in de reactie op verschillende lichtperiodes: In het anterieure gedeelte van de SCN is de spreiding van de piektijden groter na blootstelling aan 24-uurs cycli met een langere lichtperiode, dan met een korte lichtperiode. Dit geldt niet voor het posterieure deel van de SCN. Met behulp van de statistische methode die we hebben ontwikkeld, beschreven in **hoofdstuk 3** hebben we twee clusters van neuronen in de SCN geïdentificeerd die verschillen in de eigenschappen van het ritme in PER2-expressie. Zo bleek een van de twee clusters na blootstelling aan een lange lichtperiode niet alleen een grotere variatie in piektijden te laten zien, maar ook in hun periodelengte. De wisselende periodelengte kan verklaren hoe de piektijden verder uit elkaar gaan lopen onder invloed van lange dagen. Aangezien de periodelengte ook meer gaat fluctueren wanneer SCN-neuronen *in vitro* met minder andere SCN-neuronen contact hebben, zou een mogelijke verklaring kunnen zijn dat onder invloed van een langere periode met licht de neuronen in de SCN *in vivo* ook minder koppeling met elkaar hebben.

De aanpassing aan een lange of korte lichtperiode vraagt om aanpassingen in de connecties – het netwerk – van SCN-neuronen. Het is bekend dat onder invloed van veroudering deze plasticiteit van neuronen vermindert, en we vroegen ons af of dit ook het geval was voor de aanpassing aan lange en korte lichtperiode. Daarom hebben we in **hoofdstuk 5** gekeken of er een verschil is in hoe jonge (4-8 maanden) en oude muizen (22-28 maanden) zich in gedragsactiviteit en genexpressie (in SCN-neuronen) aanpassen. Het bleek dat oude dieren minder of zelfs helemaal niet in staat waren hun gedrag aan te passen aan lange of korte dag. Daarentegen bleek dat het ritme in PER2-eiwitniveaus zich in oude dieren wel op dezelfde manier aanpaste aan lange of korte dag als in jonge dieren. Dit betekent dat de problemen met het aanpassen aan verschillende daglengtes ontstaan op een ander niveau dan dat van de moleculaire klok, zoals andere intracellulaire mechanismen, het neuronale netwerk van de SCN of de output van de SCN.

Naast dagelijkse oscillaties in de expressie van klok-genen, oscilleert ook de neuronale activiteit in SCN-neuronen. SCN-neuronen vuren hoofdzakelijk in de lichtperiode, in de nacht zijn de neuronen inactief. In **hoofdstuk 6** hebben we een methode ontwikkeld om monsters van de SCN, en een nabijgelegen hersengebied, de paraventriculaire nucleus (PVN) te nemen en die te analyseren met liquid chromatography – mass spectrometry (LC-MS). Deze methode hebben we gebruikt om te onderzoeken of de neuronale activiteit invloed heeft op de biochemische staat van de cellen in de SCN. Daartoe hebben we weefsel van de SCN verzameld in het midden van de dag en het midden van de nacht. Bij de helft van deze monsters werd de neuronale activiteit beïnvloed: in de dag hebben we met behulp van tetrodotoxine (TTX) de actiepotentialen in de neuronen geblokkeerd, in de nacht werden met een verhoogde extracellulaire concentratie kalium actiepotentialen juist uitgelokt. We zagen dat het verhogen van neuronale activiteit een sterk effect had op het metabolietprofiel van de SCN en PVN, namelijk een duidelijke toename in de concentratie van een aantal metabolieten die onderdeel zijn van de citroenzuurcyclus, een fundamentele bron van energie voor aerobe organismen. Dit zou verklaard kunnen worden door een plotselinge vraag om extra energie door de neuronen. Dat we ditzelfde effect niet zagen in de monsters genomen in het midden van de dag – wanneer neuronale activiteit ook hoger is – zou kunnen komen doordat de energievoorziening gedurende de dag gereguleerd is, of doordat de toename in neuronale activiteit onder invloed van extracellulair kalium groter is in de nacht dan normaal gedurende de dag.

De methode beschreven in **hoofdstuk 6** hebben we vervolgens gebruikt voor het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 7**, waarin op zes tijdstippen gedurende de licht-donker cyclus monsters van de SCN en PVN, en daarnaast ook van de lever en bloedplasma, werden verzameld. De monsters waren afkomstig van zowel jonge (2 maanden) als oude muizen (22-25 maanden). Dit onderzoek heeft inzicht opgeleverd over 24-uursritmes in metabolietniveaus en hoe deze samen hangen zowel binnen als tussen de onderzochte weefsels. We hebben omvangrijke weefselspecifieke veranderingen in het amine-metaboloom gevonden onder invloed van veroudering. Met behulp van een differentiële analyse voor ritmiciteit vonden we dat veroudering het amine-metaboloom beïnvloedt, maar dat de manier waarop dit plaatsvindt afhankelijk is van het weefseltype. Zo had veroudering het meeste effect op de lever, waar 60% van de metabolieten hun ritme verloren. Verder vonden we in jonge muizen een sterke correlatie tussen de metabolietniveaus van de lever en plasma, en tussen de SCN en PVN in de hypothalamus. Deze correlaties waren bijna helemaal verdwenen in verouderde muizen. Dit wijst erop dat veroudering gepaard gaat met een drastische reductie in de temporele cohesie tussen verschillende weefsels en een verstoring van ritmes in metabole processen. Het is aannemelijk dat dit een gevolg is geweest van verminderde regulatie van metabole processen in veroudering. Wanneer de timing van metabole processen niet juist

gecoördineerd is, kunnen schadelijke processen in de cel minder goed geneutraliseerd worden, waardoor DNA-schade kan optreden en cellen versneld verouderen.

Naast de metaboliëten in perifere weefsels hebben we in **hoofdstuk 8** ook gekeken naar lipiden in wit en bruin vetweefsel. Daarbij zagen we dat van ongeveer 20% van de lipiden de concentratie fluctueerde gedurende 24 uur. In wit vetweefsel bereikten de twee groepen met de meeste ritmische lipiden – triacylglycerols en alkyldiacylglycerols – beide hun hoogste concentratie aan het einde van de actieve fase, voor muizen in de nacht. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door voedselinname gedurende deze periode. In bruin vet zagen we dat, naast de bevinding dat veel lipiden die pieken in de nacht, er ook een aanzienlijk deel van de lipiden piekt in de rustfase (voor muizen dus gedurende de dag). Dit waren vooral lipiden met een lange koolstofketen (>C18:x), wat waarschijnlijk een consequentie is van vetzuursynthese en -elongatie gedurende de rustfase. We zagen dus dat het overgrote deel van de lipiden piekten gedurende de nacht, hetgeen ook het geval was voor andere metaboliëten in **hoofdstuk 7**. Aangezien de nachtfase overeenkomt met de actieve periode van muizen, waarin ze bewegen en eten, is het aannemelijk dat dit gedeeltelijk gerelateerd is aan hogere metabole activiteit. Bij verouderde muizen zagen we een significant kleiner aantal ritmische lipiden. Veroudering gaat gepaard met een afname van het dag-nacht-ritme, wat de verminderde ritmes in metaboliëten in perifere weefsels gedeeltelijk zou kunnen verklaren.

Het circadiane systeem is geëvolueerd om de fitheid van het organisme ten goede te komen, en uit onderzoek is gebleken dat een goed functionerende klok ook de algehele gezondheid bevordert. Door meer kennis te vergaren over hoe het systeem werkt en reageert op veranderingen, kunnen therapieën ontwikkeld worden om het circadiane systeem te ondersteunen en de werking te bevorderen. Dit is bijvoorbeeld relevant bij veroudering. Veroudering gaat gepaard met een verzwakking van het circadiane systeem, wat in verband is gebracht met de verergeren van een aantal aan ouderdom gerelateerde aandoeningen, zoals aderverkalking, diabetes type 2 en neurodegeneratieve ziekten als Parkinson en Alzheimer. Daarnaast krijgt een groot aantal mensen tijdens het ouder worden te maken met fragmentatie van slaap, waarbij men 's nachts moeite heeft met slapen, terwijl men overdag juist erg slaperig is. Het bevorderen van het circadiane ritme met relatief simpele ingrepen, zoals correct getimed blootstelling aan (dag)licht, lichamelijke activiteit en voedselinname kunnen het circadiane systeem ondersteunen en de algemene gezondheid bevorderen.