

Nederlandse samenvatting

Vrijwel alle fysiologische processen in het lichaam zijn onderhevig aan een 24-uurs ritme. Ook gedrag volgt dagelijkse vaste patronen. Deze worden inwendig gegenereerd in een zogenaamd *circadiaan* ritme. Een juiste timing van fysiologische processen en gedrag is voor dieren en planten van evolutionair voordeel, bijvoorbeeld door anticipatie op voorspelbare veranderingen in de leefomgeving en de afstemming van gedrag daarop. Het verbruik van energie en de kans op overleving en nakomelingschap kan zo worden geoptimaliseerd. Het dag/nacht-ritme wordt gecoördineerd door de inwendige circadiane klok, die zich bij zoogdieren in de *SupraChiasmatische Nuclei* (SCN) in de basis van de hersenen bevindt. De SCN bestaan uit zenuwcellen (neuronen) met elk een afzonderlijk circadiaan ritme, dat wordt gedreven door een moleculaire klok binnen de cel. Door onderlinge koppeling van deze neuronnen heeft de SCN als geheel een robuust dag/nacht-ritme van elektrische activiteit en van de afgifte van signaalstoffen. De SCN kunnen door verschillende externe prikkels worden gesynchroniseerd, maar dit gebeurt in de eerste plaats door de externe licht/donker-cyclus. Deze synchronisatie noemt men *entrainment* of entrainering. In het laboratorium kan het inwendige circadiane ritme zichtbaar worden gemaakt door in constante duisternis de activiteit te meten van organismen, die voorafgaand geentaineerd zijn aan een normale licht/donker-cyclus gedurende enige tijd.

Dit proefschrift gaat over het proces van entrainering. Het eerste deel behandelt de eigenschappen van de circadiane klok die vereist zijn voor entrainment onder verschillende licht-condities. Het tweede deel beschrijft een reeks experimenten waarin voorspellingen worden getoetst die voortkomen uit een theorie over de moleculair-genetische basis van het systeem.

1. Synchronisatie met de natuurlijke licht/donker-cyclus

Hoe verloopt het proces van entrainering? Het klassieke en algemeen aanvaarde model van *phase resetting*, geïntroduceerd door C. S. Pittendrigh, is gebaseerd op directe en snelle verschuivingen van de circadiane fase. Volgens dit model zou een circadiane klok die te langzaam of te snel loopt dagelijks gelijk gezet moeten worden. Faseverschuivingen in het activiteitsritme van dieren in constante duisternis, teweeggebracht door korte lichtpulsjes, onderbouwen dit model. De richting en grootte van deze verschuivingen is afhankelijk van het moment binnen de circadiane cyclus (de *fase*) waarop men de lichtpulsjes toedient. De faseverschuivingen worden uitgezet in een Phase Response Curve (PRC, voor een voorbeeld zie figuur 6.7). Op de horizontale as staat de *interne tijd* (InT, 0 – 24 uur) waarop de lichtpuls is gegeven, op de verticale as de resulterende faseverschuiving. In de ochtendfase van de circadiane klok zijn faseverschuivingen positief (de klok wordt vooruit gezet), en in de avondfase negatief (de klok wordt terug gezet). Midden op de dag zijn er vrijwel geen faseverschuivingen.

Het nut van dit mechanisme is begrijpelijk: als de circadiane klok van een dagactief dier voorloopt en daardoor al voor de dageraad activiteit veroorzaakt, zal de circadiane klok in zijn ochtendfase minder en in zijn avondfase sterker worden belicht. In reactie daarop zal de klok 's morgens minder naar voren schuiven, en 's avonds meer naar achteren. De voorlopende klok wordt hierdoor bijgesteld. Daarentegen zal een achterlopende circadiane klok juist in de ochtendfase meer en in de avondfase minder worden belicht. Ook deze klok zal door de waarneming van licht worden bijgesteld. Hetzelfde principe geldt voor nachtactieve dieren; de vorm van de PRC's van nacht- en dagactieve organismen komt dan ook overeen.

Om te kunnen entraineren volgens dit model is het van belang dat als een dier te vroeg of te laat actief is, er direct een verschil optreedt in de hoeveelheid licht die het dier 's ochtends en 's avonds waarneemt. Dat betekent dat entrainment van de circadiane klok volgens dit model pas mogelijk is wanneer het begin of het eind van de activiteit grenst aan een van beide schemerperiodes, de dagelijkse momenten waarop de lichtintensiteit het snelst toe- en afneemt. Het gegeven dat het activiteitsritme van bijvoorbeeld muizen te entraineren is aan de hand van een korte lichtpuls aan het begin en eind van de activiteit ondersteunt deze theorie. Het maakt daarbij bovendien niet uit of de circadiane klok te maken heeft met lichtpuls van oplopende intensiteit (een 'dawn' puls) of teruglopende intensiteit (een 'dusk'-puls; hoofdstuk 4).

Het resetting model is ontoereikend als het circadiane systeem van een organisme niet bereikbaar is voor lichtinformatie op of rondom de momenten waarop het schemert. Dit is het geval bij holbewoners zoals de siezel (*Spermophilus citellus*), een grond-eekhoornsoort die zich consequent pas lang na de ochtendschemer boven de grond

vertoont, en zich lang voor de avondschemer weer terugtrekt onder de grond. Een dergelijk activiteitspatroon maakt het lastig voor het dier om afwijkingen van zijn klok op te merken. Als siesels 's morgens wat eerder of wat later boven de grond komen zal het verschil in lichtintensiteit ten gevolge van het verschil in de stand van de zon klein zijn ten opzichte van de intensiteitsverschillen door veranderende weersomstandigheden. Alleen als de lengte van de circadiane periode (τ) heel dicht bij 24 uur ligt kan het dier de lichtinformatie over meerdere dagen gebruiken om zijn gedragsritme aan te passen. Een stabilisatie van de circadiane periode op 24 uur is mogelijk als de circadiane klok onder invloed van licht niet alleen faseverschuivingen laat zien, maar ook veranderingen in de lengte van τ . Dat is in de praktijk ook het geval. Het vooruitzetten van de circadiane klok gaat vaak samen met een verkorting van τ , het terugzetten met een verlenging van τ . Een verschil met faseverschuivingen is dat veranderingen in τ langer aanhouden. Hierdoor kan lichtinformatie over langere tijd worden geïntegreerd.

Siesels kunnen alleen tijdinformatie halen uit een kleine afname van lichtintensiteit aan het eind van de middag. Tegelijkertijd introduceren siesels zelf grote variatie in hun blootstelling aan licht door zich overdag regelmatig onder de grond terug te trekken. Daardoor is het aannemelijk dat deze dagelijks herhaalde tijdinformatie over langere tijd wordt geïntegreerd. Verder ligt het voor de hand dat het effect van die afname in lichtintensiteit op het circadiane systeem van siesels afhankelijk is van de circadiane fase. Deze aannamen hebben we in een natuurlijk experiment getoetst bij een populatie siesels nabij Wenen tijdens de zonsverduistering van 11 augustus 1999 (hoofdstuk 3). Het blijkt inderdaad dat een eenmalige, niet door het eigen gedrag geïnduceerde, sterke (ongeveer honderdvoudige) afname in lichtintensiteit midden op de dag het gedrag en de circadiane klok van siesels niet meetbaar verstoort.

Ons eigen circadiane 'gedrag' is vergelijkbaar met dat van de siesel. Mensen bepalen eveneens hun eigen blootstelling aan licht: in onze huizen onttrekken we ons aan de veranderingen in de natuurlijke licht/donker-cyclus, terwijl we kunstmatig snelle veranderingen introduceren. Aan de hand van een analyse van het lichtprofiel waaraan mensen zich daadwerkelijk hebben blootgesteld (hoofdstuk 2) wordt duidelijk dat de precisie van entrainment toeneemt als er naast faseverschuivingen in reactie op licht ook veranderingen optreden in periodelengte. De analyses geven een extra onderbouwing van de betekenis van lange-termijn integratie van licht-informatie naast de acute faseverschuivingen van het klassieke model.

2. Entrainment en daglengte: een dubbel moleculair systeem?

Naarmate organismen verder van de evenaar leven, wordt het naast de circadiane timing van gedrag steeds belangrijker om het activiteitspatroon aan te passen aan de jaarlijkse veranderingen in daglengte. Over de hiertoe vereiste flexibiliteit van het circadiane systeem die veranderingen in het activiteitspatroon mogelijk maakt bestaat een tweede klassiek model van Pittendrigh uit 1976. Het verklaart een aantal functionele eigenschappen van de klok, waaronder aanpassing van de activiteitsduur aan de daglengte. In deze hypothese bestaat de circadiane klok uit twee onderling gekoppelde oscillatoren, waarvan de een het begin en de ander het eind van de activiteitsfase regelt. Bij nachttactieve dieren regelt de Evening (E) oscillator de start van de activiteit, en de Morning (M) oscillator het einde van de activiteit. Bij dagactieve dieren is dit andersom.

Beide oscillatoren hebben een circadiaan ritme. De E-oscillator heeft volgens de theorie een relatief korte periode in het donker, en wordt door licht juist vertraagd. De E-oscillator heeft daardoor de neiging bij verandering in daglengte de avondschemering te volgen. De M-oscillator volgt vooral de overgang van donker naar licht doordat deze een lange periode heeft in het donker, en door licht wordt versneld. Wanneer de daglengte verandert, verandert de onderlinge afstand in de tijd (het fasehoekverschil) tussen de E- en de M-oscillator. Een onderlinge koppeling tussen de twee oscillatoren begrenst dit verschil, zodat het niet te groot en niet te klein wordt.

Deze EM-hypothese levert duidelijke voorspellingen voor organismen die slechts één werkende oscillator hebben. Het circadiane ritme van een dier met alleen een E-oscillator is sneller (τ is kort) in constante duisternis (DD), en langzamer in constant licht (LL). Het ritme in LL wordt extra vertraagd als de lichtintensiteit groter is. Korte lichtpulsjes in DD zullen de circadiane klok vooral terug zetten. Met alleen een werkende M-oscillator is het circadiane ritme juist traag in DD (τ is lang) en snel in LL. Bij toenemende lichtintensiteit in LL zal het circadiane ritme sterker versnellen. Korte lichtpulsjes in DD zullen de circadiane klok vooral vooruit zetten. Dieren zoals de huismuis (*Mus musculus*) hebben normaal gesproken een cyclusduur τ in DD en LL van respectievelijk iets minder en iets meer dan 24 uur, wat verklaard kan worden door dominantie van de E-oscillator. Als de E- en de M-oscillator beide niet werken, zou een organisme helemaal geen circadiaan ritme meer hebben.

Zulke voorspellingen waren niet toetsbaar zolang de hypothese niet precies definieerde wat de E- en de M-oscillator was. Daarmee was de E-M hypothese niet meer dan een populaire theorie die vele fenomenen kon verklaren die niet vanuit een enkele simpele oscillator te verklaren zijn. Een specifieke moleculaire versie van de theorie werd geformuleerd door Daan c.s. in 2001, geïnspireerd door het feit dat een aantal

sleutelgenen in het moleculaire circadiane systeem bij zoogdieren in duplo voorkomen. Dit zijn de *Per*- en *Cry*-genen, die essentiële onderdelen vormen van de moleculaire klok in de neuronen van de SCN. Hoofdstukken 6 t/m 9 gaan over deze moleculaire E-M hypothese.

Rond 1999 kwamen muizenstammen beschikbaar waarin een van de twee *Per*-genen of een van de twee *Cry*-genen is uitgeschakeld. De circadiane klok van muizen met een mutatie in het *Per1*-gen kon niet vooruit worden gezet door lichtpulsen in de ochtend, terwijl die van muizen met een mutatie in het *Per2*-gen door licht in de avond niet kon worden teruggezet. Muizen met een mutatie in beide *Per*-genen hebben inderdaad geen circadiaan ritme. Muizen met een mutatie in het *Cry1*-gen hebben een buitengewoon korte τ in DD, terwijl *Cry2*-mutante muizen in DD een zeer lange τ hebben. Wederom hebben muizen met een mutatie in beide *Cry*-genen geen circadiaan ritme.

De vraag was of de eigenschappen van het circadiane gedrag van *Cry1*- en *Per1*-mutante muizen overeenkomen met alle voorspellingen over het gedrag van een dier met alleen een werkende E-oscillator, en of die van *Cry2*- en *Per2*-mutante muizen overeenkomen met alle voorspellingen over het gedrag van een dier met alleen een werkende M-oscillator. Ik heb daarom een complete Phase Response Curve gemeten bij deze muizen (hoofdstuk 6) en de lengte van τ gemeten in DD en LL met licht van toenemende intensiteit (hoofdstuk 9). Uit de resultaten van het PRC-experiment komt naar voren dat de circadiane klok van *Per2*-mutante muizen door korte lichtpulsen in DD inderdaad meer vooruit kan worden gezet en in mindere mate achteruit. Bovendien laten *Per2*-mutante muizen in LL als enig genotype een duidelijke verkorting van τ zien, terwijl τ bij *Per1*-mutanten juist bijzonder lang wordt. De sterkte van het circadiane gedragsritme van *Per1*- en *Per2*-mutante muizen verschilt bovendien zeer in LL: *Per1*-mutante muizen verliezen net als wildtype muizen langzaam hun circadiane ritme in LL, maar dat van *Per2*-mutante muizen wordt in LL juist sterker. Het behoud van ritmiciteit in muizen in constant licht hadden wij eerder al gevonden bij muizen met een mutatie in het *Clock*-gen (hoofdstuk 5). Noch bij *Clock*-, noch bij *Per2*-mutanten is daar een sluitende verklaring voor.

In overeenstemming met het model kunnen korte lichtpulsen in DD de circadiane klok van muizen met een mutatie in het *Cry1*-gen in sterkere mate terug zetten dan die van *Cry2*-mutante muizen. Echter, in tegenstelling tot de voorspelling laten *Cry1*- en *Cry2*-mutante muizen beide in LL een verlenging van τ zien bij toenemende lichtintensiteit, waar we juist een verkorting van τ verwachtten bij de *Cry2*-mutante muizen.

Logischerwijs zijn er ook duidelijke voorspellingen over het aanpassingsvermogen van het activiteitspatroon aan de verandering van daglengte als er alleen een werkende E-

of M-oscillator is. In beide gevallen zal de duur van de activiteitsfase minder kunnen worden verkort, omdat bij het begin of het eind van de activiteit E of M wegvalt. In een experiment heb ik geprobeerd om de activiteit van *Per*- en *Cry*-mutante muizen te comprimeren door de nacht langzaam korter te maken (hoofdstuk 8). De resultaten zijn niet eenduidig: de activiteitsfase van *Cry1*-mutante muizen kon worden gecomprimeerde, die van *Cry2*-mutante muizen niet. Het circadiane ritme van de *Per*-mutante muizen was niet stabiel genoeg om betrouwbare metingen aan te kunnen doen.

Alle gegevens samen laten zien dat de voorspellingen van het moleculaire EM-model niet volledig overeenstemmen met het circadiane gedrag van *Cry*-mutante muizen, maar wel met het circadiane gedrag van *Per*-mutante muizen. Hiermee kan het model voor wat betreft de betrokkenheid van de *Cry*-genen bij E en M worden verworpen. De betrokkenheid van *Per1* en *Per2* bij de reactie van de circadiane klok op licht is in vele opzichten tegengesteld aan elkaar en precies conform de voorspellingen van het model. De conclusie is dus dat er zeer waarschijnlijk op moleculair niveau van een functionele dualiteit sprake is, maar dat de specifieke invulling die hier in het model aan gegeven is, niet juist is. Voor de ontwikkeling van een verbeterd model is het nu eerst nodig om aanvullende experimenten uit te voeren, waaronder het testen van de aanpassing van het activiteitspatroon aan daglengte bij de *Per*-mutante muizen in een protocol waarbij de stabiliteit van het circadiane ritme beter behouden blijft. Het circadiane systeem dat ten grondslag ligt aan de timing van gedrag biedt daarbij voor de gedragsbiologie unieke mogelijkheden om adaptieve (zich aanpassende) mechanismen tot op het niveau van de moleculaire basis te ontrafelen.