



ALLES HEEFT ZIJN TIJD

BERT VAN DER HORST

ALLES HEEFT ZIJN TIJD

Oplage 1000
Omslagfoto Levien Willemse, Rotterdam
Ontwerp Ontwerpwerk, Den Haag
Drukwerk Demmenie Grafimedia, Alphen aan den Rijn

ISBN 978-90-779-0659-0

© Gijsbertus T.J. (Bert) van der Horst, oratiereeks Erasmus MC
24 oktober 2008

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd zonder voorafgaande toestemming van de auteur.

Voorzover het maken van kopieën uit deze uitgave is toegestaan op grond van art. 16h t/m 16m Auteurswet 1912 j°. Besluit van 27 november 2002, Stb. 575, dient men de daarvoor wettelijk verschuldigde vergoeding te voldoen aan de Stichting Reprorecht te Hoofddorp (Postbus 3060, 2130 KB).

ALLES HEEFT ZIJN TIJD

REDE

In verkorte vorm uitgesproken
ter gelegenheid van het aanvaarden
van het ambt van bijzonder hoogleraar met
als leeropdracht chronobiologie en gezondheid
aan het Erasmus MC, faculteit van de
Erasmus Universiteit Rotterdam
op 24 oktober 2008

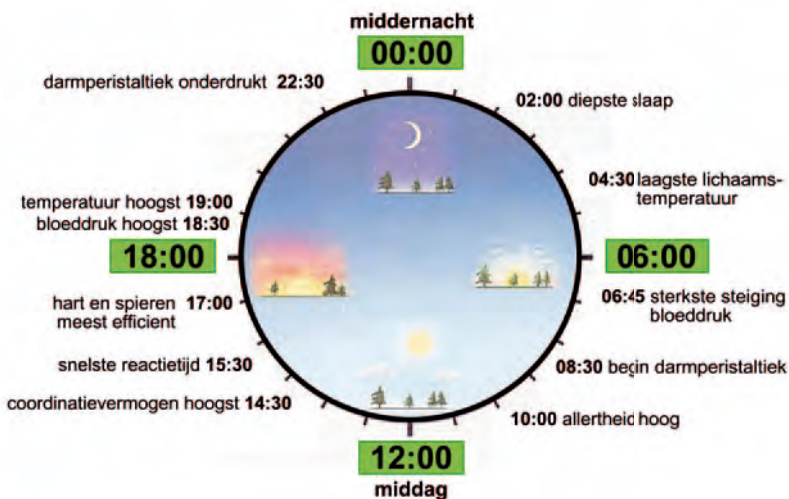
door

GIJSBERTUS T. J. (BERT) VAN DER HORST

*Mijnheer de Rector Magnificus,
Mijnheer de Decaan van het Erasmus MC,
Leden van het College van Bestuur van de Erasmus Universiteit,
Leden van de Raad van Bestuur van het Erasmus MC,
Leden van het bestuur van de Vereniging Trustfonds Erasmus Universiteit,
Zeer gewaardeerde familie, vrienden, collega's en overige toehoorders,*

Inleiding

Tijd is een belangrijke factor in ons leven. Tijd is een middel om in ons bewustzijn het verleden, het heden en de toekomst te bepalen en gebeurtenissen ten opzichte van elkaar vast te leggen. Tijdsbesef is er sinds mensenheugenis. Onze verre voorouders maakten dankbaar gebruik van steeds terugkerende astronomische verschijnselen voor het bepalen van de tijd. Zelfs in onze moderne tijd gebruiken wij nog termen als dag en jaar, gebaseerd op de tijdspanne die de aarde nodig heeft om één maal rond zijn eigen as, dan wel de zon te draaien. Ook de stand van de zon bleek een handig hulpmiddel. Met de zonnewijzer waren de Babyloniërs al in staat de dag in delen van gelijke duur op te splitsen. En vraag je een inwoner van Bali naar de tijd, dan zal hij de lengte van zijn schaduw schatten en je met redelijke nauwkeurigheid het uur van de dag kunnen vertellen. Het begrip uur, één vierentwintigste deel van de periode tussen de twee momenten dat de zon op het hoogste punt staat en verder opgesplitst in minuten en seconden, laat overigens ook zien dat tijd een door mensen gedefinieerde afspraak is. Tijd geeft structuur aan ons bestaan en stelt ons in staat afspraken te maken en onze handelingen op elkaar af te stemmen. Wij vinden tijd zelfs zo belangrijk dat wij kleine draagbare klokjes met ons meedragen om ten alle tijde het uur van de dag te weten.



Figuur 1. Voorbeelden van lichaamsfuncties met een 24-uurs ritme.

Ook in ander opzicht is tijd een belangrijke factor in ons leven. Net als andere dagdieren slapen wij 's nachts en zijn wij overdag actief. Het moge duidelijk zijn dat het lichaam 's nachts andere eisen stelt dan overdag. Het zal u dan ook niet verbazen dat behalve de slaap-waak cyclus ook andere lichaamseigenschappen een 24-uurs ritme vertonen, waarbij de pieken van de verschillende activiteiten niet noodzakelijkerwijs op hetzelfde moment van de dag liggen (Figuur 1). Zo zijn onze bloeddruk en hartslagfrequentie overdag hoger dan 's nachts en produceren onze nieren 's nachts minder urine. Nu zult u misschien zeggen, nogal wiesdes. Als ik slaap hoeft mijn hart toch minder bloed rond te pompen en in deze ruststand produceren mijn spieren vanzelf minder warmte en hoeven mijn cellen minder energie op te wekken. Maar wie wel eens een transatlantische vliegreis heeft gemaakt, zal gemerkt hebben dat er meer aan de hand is. Ook al zetten we na de landing in New York ons polshorloge braaf gelijk met de plaatselijke tijd, we hebben de eerste dagen moeite om 's avonds wakker te blijven. Het lijkt wel of ons lichaam slechts met moeite de Nederlandse tijd kan loslaten. Dit verschijnsel, dat we kennen als jetlag, illustreert treffend de aanwezigheid van een intern uurwerkje in onze hersenen, in de volksmond beter bekend als "de biologische klok". Net als onze horloges en klokken structuur geven aan ons sociale leven, geeft deze biologische klok structuur aan onze lichaamsfuncties. Het vakgebied dat zich bezig houdt met de temporele organisatie van levende systemen, en in het bijzonder biologische ritmen, heet chronobiologie.

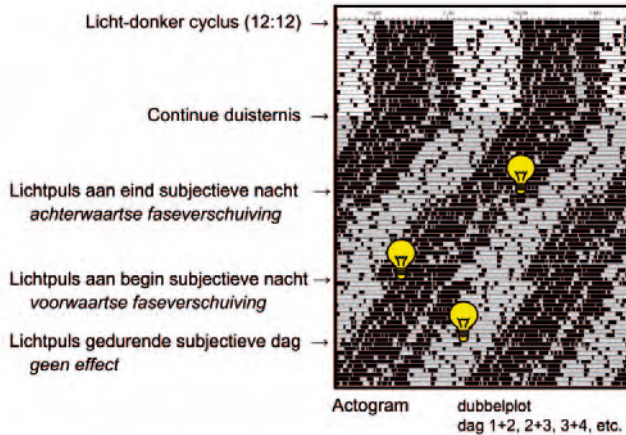
In het vervolg van mijn betoog wil ik u nader inzicht geven in de werking en het belang van de biologische klok, alsmede de bijdrage die onze onderzoeksgroep tot nu toe aan dit vakgebied heeft geleverd. Tevens wil ik u uitleggen in welke richting ons onderzoek zich de komende jaren zal bewegen, met bijzondere aandacht voor de relatie tussen de biologische klok en belangrijke gezondheidsproblemen als kanker en veroudering.

De circadiane klok in onze hersenen

Hoewel het ten tijde van de veldtocht van Alexander de Grote, zo'n 300 jaar voor Christus, reeds was opgevallen dat de bloemen van de tamarinde boom zich op een vast moment van de dag openen en sloten, was het de Franse astronoom Jean Jacques Ortous de Mairan die in 1729 het eerste wetenschappelijke experiment op het gebied van dag-nacht ritmen uitvoerde. Hij liet zien dat de blaadjes van de mimosa plant ongestoord open en dicht blijven gaan wanneer de plant in het donker wordt gehouden. Een kleine 250 jaar later beschreef de bioloog Colin Pittendrigh, samen met Jurgen Aschoff grondlegger van de chronobiologie, dat fruitvliegjes ook ritmisch gedrag blijven vertonen wanneer zij verstoken blijven van licht¹. Dit experiment, later herhaald voor een grote verscheidenheid aan plant- en diersoorten, toont overduidelijk het bestaan van een interne klok voor dag-nacht ritmiek aan.

De aanwezigheid van een interne klok laat zich het best illustreren door een voorbeeld uit de praktijk (Figuur 2). Wanneer we een laboratoriummuis huisvesten in een kooi met een tredmolen, blootstellen aan een schema van 12 uur licht en 12 uur donker, en vervolgens het rengedrag registreren in een zogenaamd actogram, dan zien we dat het diertje zijn status als nachtdier eer aan doet en alleen in het donker actief is. Laten we vervolgens het licht uit, dan blijkt niet alleen dat de muis vrolijk doorgaat met het verrichten van zijn sportieve prestatie, maar ook dat hij iedere keer ten opzichte van de vorige dag iets eerder in de startblokken staat. We noemen dit ritme, aan de muis opgelegd door zijn lichaamseigen klok, een "vrijloop" ritme. Aan de hand van het actogram kunnen we berekenen dat de omlooptijd van de klok van deze laboratoriummuis ongeveer 23 uur bedraagt. Wat de interne klokken van planten en dieren met elkaar gemeen hebben, is dat hun omlooptijd zelden exact 24 uur meet. Biologen spreken dan ook liever van een "circadiane klok" en "circadiane ritmen", afgeleid van de Latijnse woorden circa (voor ongeveer) en dies (voor dag). De "natuurlijke" dag van de gemiddelde mens duurt ca. 25 uur.

Ondanks het feit dat onze klok niet met 24-uurs precisie tikt, lopen wij over het algemeen redelijk in de pas met de aardse dag-nacht cyclus. Blijkbaar ontvangt onze interne klok, net als stads- en stationsklokken, iedere dag een signaal dat hem synchroniseert met de kalenderdag.



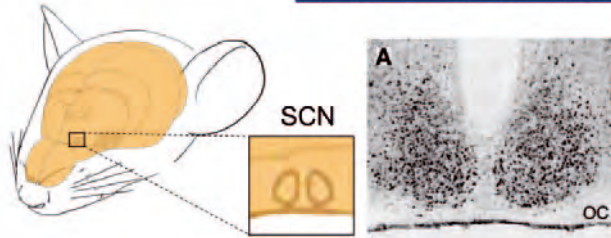
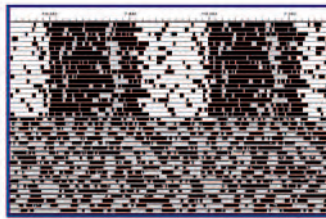
Figuur 2. Loopwielgedrag van een laboratoriummuis. In een licht-donker cyclus is het dier 's nachts actief. In continue duisternis volgt hij het ritme van zijn interne klok. Korte lichtpuls kunnen (afhankelijk van het moment van blootstelling, het ritme verschuiven.

Hoewel verscheidene factoren (bijv. voedselbeschikbaarheid, temperatuurwisselingen) het signaal “synchronize watches” kunnen geven, is het niet verwonderlijk dat uiteindelijk licht zelf de belangrijkste prikkel vormt voor het resetten van onze interne klok². Wanneer we even terugkeren naar onze laboratoriummuis, dan zie we dat korte blootstelling van het dier aan licht gedurende de subjectieve nacht (de periode waarin het voor de beleving van de muis donker is) de circadiane klok kan laten verschuiven (Figuur 2). Hetzelfde principe, faseverschuivingen door blootstelling aan licht op het moment dat de klok in de nachtstand staat, zorgt er voor dat na aankomst in New York onze interne klok zich aanpast aan de Amerikaanse tijd. Dit proces verloopt echter in stappen, waardoor het jetlag gevoel enkele dagen aanhoudt.

In hun zoektocht naar de precieze locatie van ons natuurlijke uurwerkje toonden Stephan en Zucker in 1972 aan dat selectieve beschadiging van een hersengebiedje dat we kennen als de suprachiasmatische nucleus (SCN), er voor zorgt dat een rat alle gevoel voor tijd verliest en op willekeurige momenten van de dag perioden van slaap en activiteit vertoont (Figuur 3)³. De SCN bestaat uit ongeveer 20.000 zenuwcellen, is niet veel groter dan een klein zandkorreltje en ligt boven de plek waar de beide oogzenuwen elkaar kruisen. Dit is niet geheel toevallig, een deel van de oogzenuw splitst hier namelijk af om de SCN te voorzien van de lichtinformatie, nodig om de klok in fase te houden met de dag-nachtcyclus.

Vóór beschadiging SCN
24-uurs ritme loopwielgedrag

Na beschadiging SCN
aritmisch loopwielgedrag



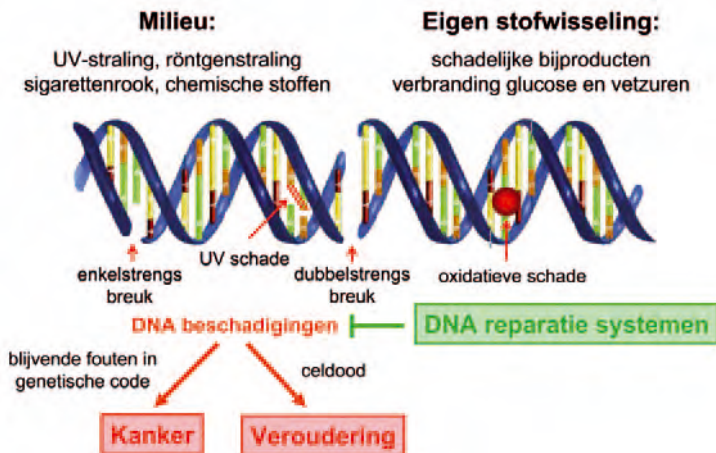
Figuur 3. De centrale circadiane klok bevindt zich in de ca. 20.000 zenuwcellen van de suprachiasmatische nuclei (SCN) in de hersenen. Beschadiging van de SCN heeft aritmisch gedrag tot gevolg.

Via zenuwverbindingen en hormonale signalen legt de SCN als een ware regelneef zijn wil op aan andere delen van ons lichaam, zoals bijvoorbeeld hersengebieden die slaap, temperatuur, en bloeddruk regelen en hormoonproducerende klieren.

Wat is nu het nut van een interne Rolex? Analoog aan de klokthermostaat van onze centrale verwarming, die er voor zorgt dat in de komende wintermaanden ons huis al lekker is opgewarmd op het moment dat wij 's morgens opstaan, kunnen we de SCN beschouwen als een centrale timer die er voor zorgt dat ons lichaam het moment van de dag kan inschatten en zich derhalve bij voorbaat kan instellen op naderende veranderingen in de buitenwereld. Regeren is vooruitzien. Vanuit evolutionair oogpunt is de hogere overlevingskans van een dier dat kan anticiperen op zijn omgeving mede een drijfveer geweest voor het ontstaan van het circadiane systeem. Niet minder belangrijk is de functie van de hersenklok als coördinator van de verschillende lichaamsfuncties. Gelijk de dirigent van een groot symphonie orkest, zorgt de klok er voor dat alle organen harmonieus met elkaar samenwerken om ons lichaam optima forma te laten functioneren.

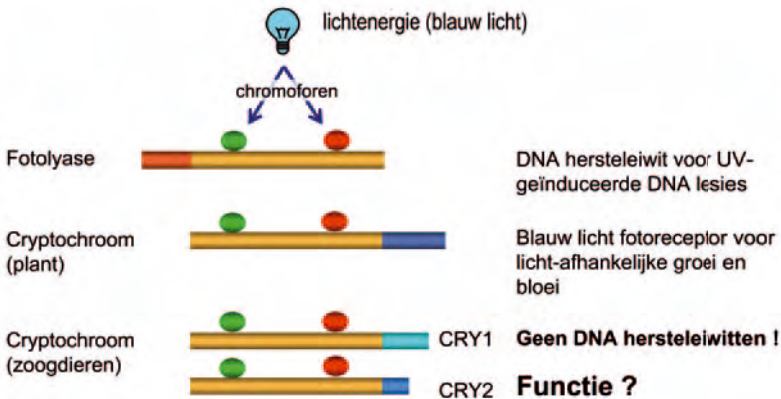
Intermezzo: van DNA herstel naar de circadiane klok

Alvorens u mee te nemen naar de genen en eiwitten die het loopwerk van onze circadiane klok vormen, wil ik u eerst uit de doeken doen hoe wij in het fascinerende vakgebied Chronobiologie verzeild zijn geraakt. Het onderzoek binnen de afdeling Genetica van het Erasmus MC is van oudsher geconcentreerd op het mechanisme van DNA reparatie in zoogdieren. Het DNA bevat de blauwdruk van het leven en voor iedere erfelijke eigenschap bestaat een afzonderlijk gen. De volgorde van de basen, de bouwstenen van het DNA, vertelt de cel hoe de circa 25.000 verschillende eiwitten moeten worden gemaakt. De omgeving waarin wij leven is ons echter slecht gezind. Constant wordt ons erfelijk materiaal belaagd door röntgenstraling, ultraviolet licht en chemische stoffen uit het milieu die ons DNA beschadigen en aanleiding kunnen geven tot blijvende veranderingen in de genetische code. Een opeenstapeling van dergelijke mutaties kan uiteindelijk leiden tot het ontstaan van kanker (Figuur 4)⁴. Ook onze eigen lichaamscellen gaan niet vrijuit. Bij de verbranding van glucose en vetzuren, de energiebron van ons leven, produceren wij per cel per dag ongeveer één miljard vrije radicalen. Deze radicalen kunnen eveneens ons DNA beschadigen en -zoals recent door ons aangetoond - bijdragen aan het proces van veroudering⁵. Schrikt u niet, gelukkig heeft de natuur vanaf het eerste begin geïnvesteerd in de ontwikkeling van een verzameling DNA reparatiesystemen die de meeste DNA beschadigingen opruimen voordat zij echt gevaarlijk kunnen worden^{4,5}.



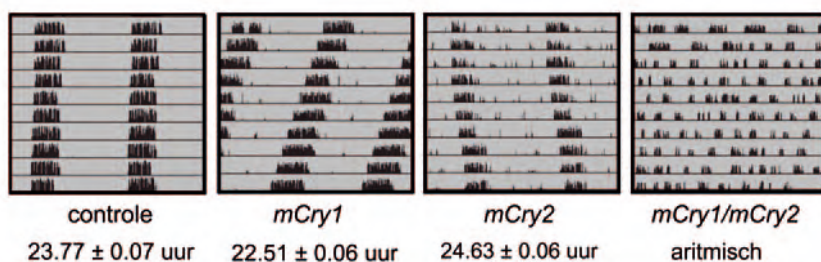
Figuur 4. Externe factoren als straling en chemische stoffen, alsmede bijproducten van onze stofwisseling beschadigen ons DNA. Deze DNA beschadigingen, wanneer niet op tijd opgeruimd door DNA reparatiesystemen, dragen bij aan het ontstaan van kanker en veroudering.

Ongeveer 3,4 miljard jaar geleden werden oerbacteriën door het ontbreken van de beschermende ozonlaag geconfronteerd met een enorme hoge dosis ultraviolette straling, afkomstig van de zon. Het is daarom niet verwonderlijk dat de natuur tijdens de evolutie als eerste heeft geïnvesteerd in de ontwikkeling van een simpel DNA reparatie eiwit, fotolyase genaamd, voor de verwijdering van door ultraviolet licht veroorzaakte DNA beschadigingen⁶. De voor de herstelreactie benodigde energie wordt geleverd door licht, dat wordt geabsorbeerd door chromoforen die werken als een soort lichtantenne (Figuur 5). Tot op de dag van vandaag beschikken de meeste organismen nog steeds over fotolyase eiwitten. Alleen de placentale zoogdieren hebben bij de afsplitsing van de kangoeroes en andere buideldieren het enzym verloren. Akira Yasui (eerder als postdoc werkzaam bij de afdeling Genetica) en Peter van der Spek lieten echter zien dat het DNA van mens en muis nog steeds twee genen heeft voor de aanmaak van eiwitten die qua aminozuurvolgorde een sterke gelijkenis vertonen met de fotolyase eiwitten⁷. Er was echter ook een frappant verschil. In vergelijking met echte fotolyasen bleken de twee menselijke fotolyase-achtige eiwitten aan de voorkant een stukje te missen, terwijl ze aan de achterkant juist van een extra staart waren voorzien. Hierdoor leken de eiwitten eigenlijk meer op een cryptochroom eiwit, een nauw familielid van de fotolyases dat tot dan eigenlijk uitsluitend in planten werd gevonden. Cryptochromen beschikken over dezelfde lichtantennes als fotolyasen, maar werken als blauw licht-receptor voor het aansturen van lichtafhankelijke processen als het dagelijkse openen en sluiten van bloemen en de dag/nacht gereguleerde groei.



Figuur 5. Schematische voorstelling van de overeenkomsten en verschillen tussen fotolyase en cryptochroom eiwitten.

Om de functie van deze fotolyase-achtige zoogdier eiwitten te ontrafelen hebben we samen met de groep van Akira Yasui de corresponderende genen in de muis uitgeschakeld⁸. Goede raad was duur toen bleek dat dit geen effect had op de UV-gevoeligheid van de cellen van de muis. Zouden de eiwitten, die we vanaf dat moment cryptochroom 1 en 2 (afgekort als CRY1 en CRY2) hebben genoemd, net als in de plant soms ook als lichtreceptor dienen? Omdat 10 jaar geleden nog niet bekend was welke fotoreceptoreiwitten verantwoordelijk waren voor het dagelijks gelijkzetten van de circadiane klok, besloten we het circadiane gedrag van de *Cry* knockout muizen maar eens te bestuderen met behulp van een zelf in elkaar geknutselde loopwielopstelling⁸.

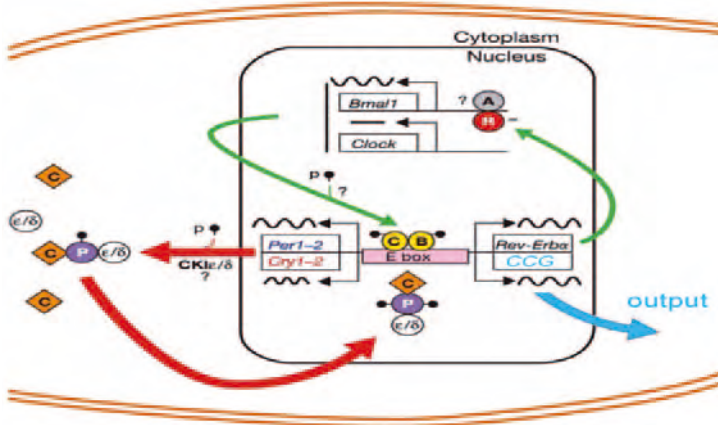


Figuur 6. Loopwielgedrag van mCry (dubbel)mutant muizen in continue duisternis en berekende omlooptijd van de circadiane klok.

Ik zal nooit het moment vergeten toen ik samen met Manja Muijtjens, destijds als analiste betrokken bij het onderzoek, de eerste computeruitdraai van het loopwielgedrag van de muizen bekeek. Tot onze grote verbazing bleek dat muizen die het CRY1 eiwit missen een biologische dag hebben die meer dan anderhalf uur korter is dan die van een normale muis (Figuur 6). Omgekeerd bleek de biologische dag van *Cry2* knockout muizen juist een uur langer te duren. Uit dit experiment concludeerden we dat de CRY eiwitten blijkbaar betrokken moesten zijn bij het bepalen van de kloksnelheid. Het voordeel van genetisch onderzoek met muizen is dat je door kruising ook dieren kunt verkrijgen met meerdere mutaties, in dit geval muizen die beide CRY eiwitten missen. Onze verbazing was zo mogelijk nog groter toen bleek dat *Cry1/Cry2*-deficiënte dieren aritmisch gedrag vertonen. Dit resultaat toonde ondubbelzinnig aan dat de CRY eiwitten functioneren als onmisbare radertjes van ons interne uurwerk: zonder CRY eiwitten staat de klok immers stil. Dit onderzoek werd zonder slag of stoot gepubliceerd in Nature⁸ en vormde mede de basis voor de later verkregen Vici subsidie van de Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek, waarmee het chronobiologisch onderzoek aan het Erasmus MC verder kon worden uitgebouwd.

Het moleculaire raderwerkje van onze circadiane klok

Hoe genereren de zenuwcellen van de klok in onze hersenen nu precies de "tijd" waarmee ons gedrag, de optimale werking van onze organen, en onze stofwisseling, een endogeen ritme met een periodiciteit van ongeveer 24 uur krijgt? Net als voor de meeste andere lichaamsprocessen ligt de blauwdruk voor het biologisch horloge dat ons dag-nacht ritme regelt, opgeslagen in de genen in ons DNA. Ik heb u zojuist al verteld dat de beide *Cry* genen werken als klokgenen. Het zal u echter niet verbazen dat, net als in een horloge, twee radertjes niet voldoende zijn om het uurwerk te laten lopen. We kennen inmiddels een tiental zoogdier klokgenen. Ik zal mij voor het uitleggen van het moleculaire principe van de circadiane klok beperken tot de meest essentiële componenten (zie ook Figuur 7) |⁹.



Figuur 7. Schematische weergave van het moleculaire raderwerk van de circadiane klok.

Laten we beginnen bij de *Cry* genen, waarbij ik voor het gemak even geen onderscheid maak tussen de *Cry1* en *Cry2* genen. Omdat het DNA de kern niet kan verlaten en de kern niet beschikt over de middelen om eiwitten te produceren, moet de informatie in de *Cry* genen eerst worden overgeschreven in kleine boodschapper RNA moleculen die naar het cytoplasma kunnen verhuizen. Dit proces, dat we zeer toepasselijk transcriptie noemen, kan alleen plaatsvinden wanneer zogenaamde transcriptie-activator eiwitten binden aan een karakteristiek stukje DNA aan het begin van het gen, de promotor genaamd. De cel beschikt over een groot arsenaal van transcriptie-activatoren die al naar gelang de behoefte van de cel een specifieke set genen kunnen aanschakelen. Transcriptie van de *Cry* genen wordt verzorgd door een complex van twee eiwitten, te weten CLOCK en een eiwit dat luistert naar de naam BMAL1, maar waarvan ik u

de betekenis van de afkorting verder zal besparen. Dit complex bindt aan een DNA structuur die we E-box noemen, waarna *Cry* boodschapper RNA wordt aangemaakt. In het cytoplasma aangekomen wordt het *Cry* boodschapper RNA gebruikt als matrijs voor de productie van CRY eiwitten. Tot zover onderscheiden de *Cry* genen zich niet van alle andere genen in de cel, dus wat maakt een *Cry* gen nu een klokgen? De clou van het verhaal is dat wanneer er voldoende CRY eiwit is gevormd, het eiwit naar de kern verhuist en er voor zorgt dat de CLOCK/BMAL1 transcriptiefactor wordt geïnactiveerd. Het gevolg is dat er geen nieuw *Cry* boodschapper RNA, en dus ook geen nieuw CRY eiwit meer wordt gevormd. Hierdoor begint de CRY eiwitconcentratie terug te lopen totdat de CLOCK/BMAL1 transcriptiefactor niet langer wordt geremd en de cyclus opnieuw kan beginnen. Door dit proces van negatieve terugkoppeling ontstaat een heuse moleculaire oscillator met een periodiciteit van ongeveer 24 uur. Verder verkrijgt het systeem robuustheid doordat ook de aanmaak van *Bmal1* boodschapper RNA ritmisch verloopt met een fase die tegenovergesteld is aan die van de *Cry* genen. Wanneer de *Cry* genen aan staan, staat het *Bmal1* gen uit, en omgekeerd.

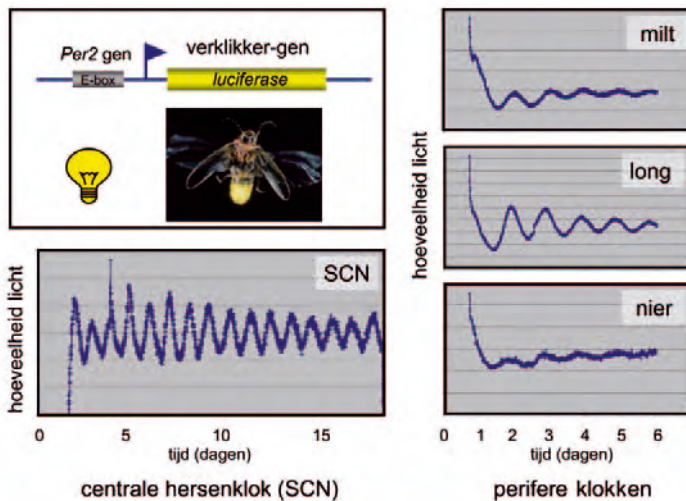
Het moge duidelijk zijn dat deze beschrijving een oversimplificatie is van het moleculaire uurwerk. Zo zijn er nog twee eiwitten, luisterend naar de toepasselijke naam Period (PER) 1 en 2 die een soortgelijke rol als de CRY eiwitten spelen en er een complex mee kunnen vormen. Vervolgonderzoek van Inês Chaves, Roel Janssens en Filippo Tamanini heeft laten zien welke domeinen in CRY1 verantwoordelijk zijn voor transport van het eiwit van het cytoplasma naar de kern en voor de binding met andere klokeiwitten, zoals het PER2 eiwit en het CLOCK/BMAL1 complex¹⁰. Verder zijn Monika Bajek en Andre Eker er recent in geslaagd om de staarten van de CRY1 en CRY2 door bacteriën in grote hoeveelheden te laten produceren en daarna te zuiveren. Zij hebben vervolgens laten zien dat er nog andere eiwitten aan de staart van de CRY eiwitten kunnen binden, hetgeen uiteindelijk kan leiden tot de ontdekking van tot nu toe onbekende functies van de CRY1 en CRY2 eiwitten, dan wel nieuwe klokeiwitten.

Net zoals een auto alleen maar kan rijden wanneer de versnellingsbak de motor verbindt met de wielen, zou de circadiane klok van weinig nut zijn als hij niet zou zijn gekoppeld aan klokgestuurde lichaamsfuncties. Hiertoe bevat ons DNA nog een groot aantal zogenaamde klok-gecontroleerde genen die ook ritmisch aan en uit worden gezet door de CLOCK/BMAL1 en CRY eiwitten. Deze klok-gecontroleerde genen zorgen voor de aanmaak van eiwitten die bijvoorbeeld bloeddruk, hartslagfrequentie, energiehuishouding, slaap en hormoonafgifte regelen.

Alles heeft zijn tijd

Biologen houden er erg van om het gedrag van hun favoriete gen of eiwit continu in de tijd te kunnen volgen in de cellen, weefsels en organismen die zij bestuderen. Zo kan de klok heel mooi zichtbaar worden gemaakt door een muis te voorzien van een extra stukje DNA, bijvoorbeeld een *Per2* gen, waarvan de informatie voor het PER2

eiwit vervangen is door die van het luciferase eiwit van het vuurvliegje (Figuur 8). Het luciferase eiwit dat aan de hand van dit kunstmatige verklikker-gen kan worden geproduceerd, zorgt er voor dat de cellen licht gaan geven op hetzelfde moment dat het *Per2* gen wordt geactiveerd, waarbij de hoeveelheid licht gelijke tred houdt met de aanmaaksnelheid van boodschapper RNA van het natuurlijke *Per2* gen. Deze techniek, voor het eerst gebruikt door de groep van Michael Menaker van de Universiteit van Virginia¹¹, wordt heden ten dage veel gebruikt en zorgt voor een drastische vermindering van het aantal gebruikte proefdieren. Dit voorbeeld uit eigen keuken (Figuur 8) toont aan dat we in een gekweekt hersenplakje van een *Per2-luciferase* muis letterlijk op ieder moment van de dag kunnen zien hoe laat het is in de SCN.



Figuur 8. Visualisatie van de circadiane klok in gekweekte plakjes SCN, milt, long en nier van muizen, voorzien van het *Per2-luciferase* reportergen.

Tot nu toe heb ik alleen gesproken over de klok in de hersenen. We weten echter dat de klokgenen ook in andere weefsels actief zijn, hetgeen suggereert dat wellicht iedere cel wel eens over een circadiane klok zou kunnen beschikken. Dat dit inderdaad het geval is, blijkt overduidelijk wanneer we plakjes van andere organen van de *Per2-luciferase* muis in kweek bekijken. Net als de SCN laten nier, long, lever en milt een duidelijk ritme in lichtproductie zien. Zelfs gekweekte bindweefselcellen uit de huid van de muis blijken over een klok te beschikken. Om onderscheid te maken met de centrale klok in de hersenen, noemen we deze klokken perifere klokken. In samenwerking met

Kazuhiro Yagita en Hitoshi Okamura van de Universiteit van Kobe hebben we laten zien dat de perifere uurwerkjes van dezelfde klokgenen gebruik maken als de klok in de zenuwcellen van de SCN¹². Perifere klokken verschillen echter in twee belangrijke opzichten van de centrale klok in de SCN. Allereerst zijn zij ongevoelig voor licht. Verder, zoals het experiment in Figuur 8 ook illustreert, lijken de perifere klokken in de kweekjes van perifere organen uit te doven, terwijl de SCN klok wekenlang blijft doortikken. Uit het werk van Ueli Schibler van de Universiteit van Genève weten we inmiddels dat de klokwerkjes van de individuele cellen onder kweekcondities niet stoppen met tikken, maar snel met elkaar uit de pas gaan lopen, waardoor in onze opstelling de gemeten lichtintensiteit uiteindelijk nivelleert naar de gemiddelde activiteit van het *Per2-luciferase* reporter gen in de verschillende cellen¹³. In de SCN daarentegen communiceren de zenuwcellen continu met elkaar om de individuele klokken synchroon te laten lopen en één krachtig output signaal te leveren. Dit signaal dient er mede toe om de perifere klokken in de organen in het gareel te houden. De titel van deze rede, “Alles heeft zijn tijd”, gaat dus zeker op voor alle cellen en organen in ons lichaam.

Ik heb u eerder verteld dat 24-uurs ritmen in lichaamsfuncties worden aangestuurd door klok-gecontroleerde genen. Ons erfelijk materiaal bevat ongeveer 25.000 genen en afhankelijk van het type cel of weefsel zal een deel van deze genen actief zijn. Een intrigerende vraag is natuurlijk hoeveel, en bovenal welke van deze genen onder controle staan van het circadiane systeem. Met de opkomst van de microarray technologie is het mogelijk geworden om in één monster tegelijkertijd de activiteit van alle genen te meten.

Toen Panda en medewerkers deze techniek gebruikten om iedere 4 uur het boodschapper RNA profiel van de SCN en lever van de muis te bepalen, bleek de activiteit van enkele honderden genen door de klok te worden gereguleerd¹⁴. Deze genen konden worden onderverdeeld in groepen, afhankelijk van het moment van de dag waarop de boodschapper RNA concentratie het hoogst was. Zo zijn de genen voor snelheidsbepalende enzymen in het verbrandingsproces van glucose en vetzuren het actiefst aan het begin van de nacht, het moment waarop de muis weer actief gaat worden en voedsel tot zich zal gaan nemen. Omgekeerd staat de activiteit van deze genen op een laag pitje gedurende de dag, wanneer de muis slaapt. Het circadiane systeem zorgt er dus niet alleen voor dat alle organen harmonieus met elkaar samenwerken, maar ook dat de activiteit van de biologische processen in de cellen van die organen vooraf is afgestemd op de specifieke functie die zij op een bepaald moment van de dag moeten gaan vervullen. Naar schatting wordt circa 5 tot 10 % van onze genen circadiaan gereguleerd¹⁴. Een verrassend hoog aantal, waaruit kan worden geconcludeerd dat zeer veel biologische processen direct of indirect aan de klok zijn gekoppeld. In zekere mate geldt dus ook hier, “Alles heeft zijn tijd”.

De circadiane klok en onze gezondheid

Daar waar planten en dieren, geleid door hun circadiane klok, miljoenen jaren in harmonie leefden met de aardse dag-nacht cyclus, heeft zijn intelligentie de mens in staat gesteld zich te verzetten tegen zijn interne klok. Bij het zwakke licht van vuur en olielamp konden onze voorvaders ook na zonsondergang nog wel enige activiteiten ontplooiën. Maar het is wellicht Thomas Edison, die met zijn uitvinding van de gloeilamp voor de grootste verandering heeft gezorgd. Hij stelde de mens in staat zijn dag kunstmatig te verlengen, waarmee de basis is gelegd voor onze huidige 24-uurs economie. Onze fabrieken draaien continu door en wij willen op ieder moment van de dag, of liever gezegd nacht, een beroep kunnen doen op allerlei vormen van dienstverlening zoals gezondheidszorg, transport, winkelfaciliteiten, horeca- en andere uitgaansgelegenheden. Dit brengt met zich mee dat een groot deel van de beroepsbevolking (naar schatting 20 %) ook buiten wat wij de kantooruren plegen te noemen, moet werken. Het moge duidelijk zijn dat nachtwerk en andere vormen van ploegdienst indruisen tegen de natuur van ons interne klokwerk, dat ons gebiedt 's nachts onze ogen te sluiten. Het zal u dan ook niet verbazen dat dit niet zonder gevolgen blijft. Ploegdienst kan leiden tot slapeloosheid, ernstige vermoeidheid en concentratieverlies. Dit laatste kan leiden tot ernstige inschattingsfouten. Er gebeuren dan ook relatief veel verkeersongelukken en arbeidsongevallen in de vroege ochtend.



Ploegdienst:

tijdelijk: vermoeidheid, concentratieverlies, slapeloosheid

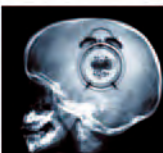
lange termijn: verhoogde kans kanker



Chronische jetlag:

tijdelijk: vermoeidheid, concentratieverlies, slapeloosheid

lange termijn: verhoogde kans kanker



Erfelijke circadiane afwijkingen:

Sleep phase syndromes, psychische aandoeningen

permanent: chronische vermoeidheid, concentratieverlies, slapeloosheid, depressiviteit

lange termijn: ??

Figuur 9. De circadiane klok en onze gezondheid. Situaties waarin interne en externe tijd uit de pas lopen.

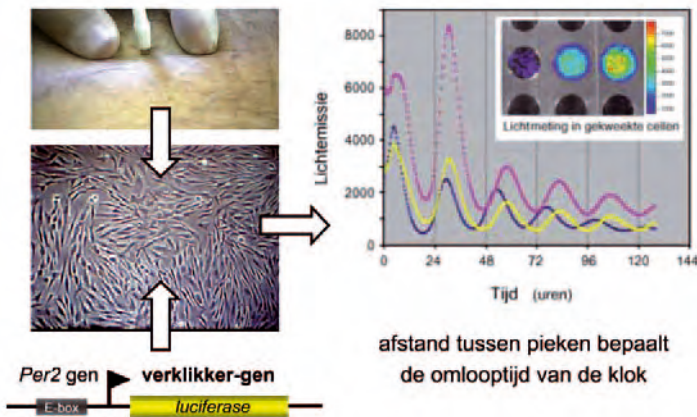
Verder is het waarschijnlijk geen toeval dat grote rampen als met de kerncentrale van Tsjernobyl en de mammoettanker Exxon Valdez zich hebben voltrokken in de nachtelijke uren. Langdurig werken in ploegendienst kan psychosociale moeilijkheden, maag-darm klachten en cardiovasculaire problemen veroorzaken. Ook niet onbelangrijk te vermelden is dat epidemiologisch onderzoek bij vrouwelijk verplegend personeel heeft uitgewezen dat de kans op het krijgen van borstkanker tot tweemaal hoger is wanneer regelmatig nachtdiensten worden gedraaid¹⁵. Dat geldt ook voor vrouwelijk cabine personeel op lange afstandsvluchten naar oost en west, waaruit blijkt dat regelmatige jetlags ook niet bepaald bevorderlijk zijn voor onze gezondheid. Dat laatste wordt nog eens overduidelijk aangetoond door het feit dat laboratoriummuizen waarbij iedere week de licht-donker cyclus wordt omgedraaid korter leven.

Ik heb u zojuist de mogelijke gevolgen van chronische jetlag en werken in ploegendienst geschetst, situaties waarbij de mens er al dan niet vrijwillig voor heeft gekozen om zich tegen de wil van zijn lichaamseigen klok te verzetten. Omgekeerd zijn er ook erfelijke ziekten bekend waarbij de klok zich juist verzet tegen de wil van de mens¹⁶. Bij patiënten met de aandoening Advanced Sleep Phase Syndrome is de timing van het slaapproces verstoord. Zij vallen al heel vroeg op de avond in slaap en zijn 's nachts om een uur of drie al weer klaarwakker. Omgekeerd kunnen patiënten met Delayed Sleep Phase Syndrome pas laat in de nacht de slaap vatten om pas de volgende middag wakker te worden. Arbeid, sociale en maatschappelijke verplichtingen vragen deze mensen echter om op voor hun ongunstige momenten wakker te worden dan wel te blijven. Hierdoor ontstaan zeer belastende klachten als chronische vermoeidheid en depressiviteit, zodat het niet verwonderlijk is dat veel patiënten uiteindelijk in de WAO belanden.

Het moge duidelijk zijn dat de circadiane klok een niet te onderschatten factor is voor onze gezondheid. Het is derhalve van groot belang voor de volksgezondheid om nader fundamenteel en toegepast onderzoek te doen aan het mechanisme van de circadiane klok en de relatie tussen het circadiane systeem en de etiologie en behandeling van medische aandoeningen. De aanwezigheid van fundamentele kennis en een wereldwijd unieke set van diermodellen op het gebied van kanker, veroudering, neurodegeneratie en de circadiane klok binnen de afdeling Genetica, scheppen de ideale omstandigheden voor multidisciplinair onderzoek naar de relatie tussen de circadiane klok, kanker, en veroudering. In het resterende deel van mijn rede wil ik u uitleggen welke uitdagingen en vragen wij binnen de nieuwe leerstoel Chronobiologie en Gezondheid willen aanpakken.

Erfelijke aandoeningen van de circadiane klok

Ik noemde u zojuist het bestaan van Sleep Phase Syndromen. Deze ziekten kunnen worden gediagnostiseerd door patiënten enige tijd te laten verblijven in een continu zwak verlichte en geluiddichte ruimte, waardoor zij absoluut geen idee meer hebben van de tijd in de buitenwereld. Met behulp van een soort polshorloge, dat natuurlijk niet de tijd weergeeft, maar wel de bewegingen van de proefpersoon registreert, kan aan de hand van het activiteitspatroon de omlooptijd van de circadiane klok van de patiënt worden gemeten. Enthousiast geworden door het feit dat het moleculaire uurwerk van gekweekte huidcellen van *Cry1* en *Cry2* knock-out muizen, net als de hersenklok, ook te snel, respectievelijk te langzaam bleek te tikken¹², hebben Roel Janssens en Filippo Tamanini een methode ontwikkeld om met behulp van een verklikkergen de klok zichtbaar te maken in gekweekte menselijke huidcellen (Figuur 10). In samenwerking met Dr. Marcel Smits van het Ziekenhuis Gelderse Vallei en Dr. Lutgarde Govaerts van de afdeling Klinische Genetica van het Erasmus MC bestuderen wij nu de circadiane klok van patiënten met Delayed Sleep Phase Syndrome. Uiteindelijk doel is om een betrouwbare methode te ontwikkelen voor de diagnostiek van erfelijke afwijkingen in de biologische klok in patiënten met circadiane afwijkingen. Daarnaast hopen wij in patiënten het aangedane klokgen en het effect van de ziekte-veroorzakende mutatie op de werking van de klok vast te stellen.



Figuur 10. Diagnostiek van circadiane afwijkingen in gekweekte huidcellen van de mens.

Er zijn aanwijzingen dat patiënten met psychiatrische aandoeningen zoals depressie, manisch-depressiviteit, schizofrenie, en autisme, alsmede alcohol- en drugsverslaafden ook verstoord circadiaan gedrag vertonen¹⁷. Ook mensen die lijden

aan neurologische aandoeningen als de ziekten van Alzheimer en Parkinson hebben moeite met hun tijdsbesef. Het kan natuurlijk zijn dat deze verstoringen secundair zijn aan de primaire aandoening, maar er is meer en meer aandacht voor de mogelijkheid dat een verstoring van het circadiane systeem een causatieve rol speelt in het ontstaan van deze aandoeningen. Momenteel onderzoeken Edwin Jacobs en Karen Basoalto-Ibarra in samenwerking met Ype Elgersma van de afdeling Neurowetenschappen van het Erasmus MC en Guus Smit en Taco de Vries van de Vrije Universiteit het circadiane systeem in muismodellen voor genoemde aandoeningen.

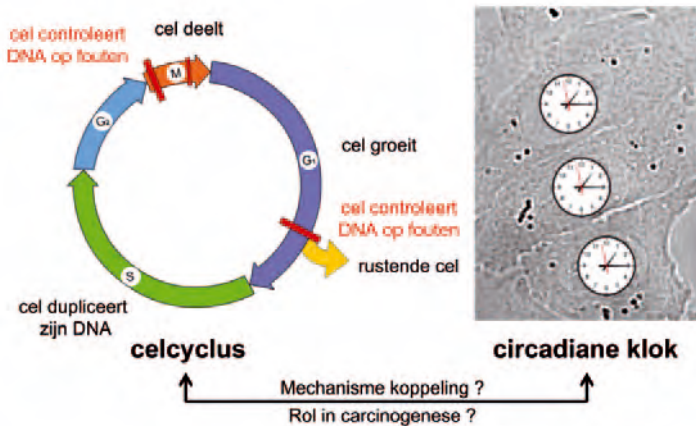
Niet onbelangrijk te vermelden is dat er ook een ernstige vorm van depressie bestaat die gekoppeld is aan de jaargetijden. Het is een gegeven dat, afhankelijk van de positie op aarde, de daglengte varieert met de seizoenen. Patiënten met Seasonal Affected Disorder, ook wel Midwinter Blues genaamd, beginnen zich met het korter worden van de dagen steeds miserabeler te voelen om in het voorjaar weer in hun oude doen te geraken. Uit recent onderzoek is gebleken dat variatie in daglengte de activiteit van klokgenen in bepaalde subgebieden van de centrale klok van de hamster beïnvloedt¹⁸. Om te zien hoe de verschillende klokgestuurde processen in verschillende subgebieden van de SCN reageren op daglengte heeft Karl Brand in samenwerking met onder andere Roelof Hut en Serge Daan van de Universiteit van Groningen met microarray technologie het boodschapper RNA profiel in de tijd bepaald in muizen die onder verschillende seizoencondities waren gehuisvest. Een eerste voorlopige analyse heeft al laten zien dat er processen zijn waarvan de piekactiviteit altijd meeschuift met het ochtendgloren of het invallen van de avond. Ook zijn er processen die, ongeacht de daglengte, altijd rond het midden van de dag of nacht de hoogste activiteit blijven vertonen. Wellicht dat een beter begrip van het functioneren van de hersenklok op lange zomer- en korte winterdagen ons helpt Seasonal Affected Disorders beter te begrijpen.

Een soortgelijke aanpak is gekozen om te onderzoeken hoe SCN zenuwcellen in verschillende gebieden van de SCN op lichtpulsen reageren. Ik verwacht dat deze aanpak letterlijk een heel nieuw licht zal werpen op het mechanisme van klok-resetting door licht.

De circadiane klok en kanker

Na de bevruchting door een spermacel zal de eicel zich delen in twee dochtercellen. Dit proces zal zich volgens een uiterst gecontroleerd patroon nog een onnoemelijk aantal malen herhalen tot uiteindelijk de 100 biljoen cellen van ons lichaam zijn gevormd. Ook daarna blijven sommige typen cellen delen om beschadigde of versleten cellen te vervangen. De celcyclus, het proces van groei en deling van de cel, kent een aantal fasen (Figuur 11). In de G₁-fase maakt de cel nieuwe eiwitten en andere stoffen aan, waardoor het cytoplasma in volume toeneemt. Vervolgens belandt de cel in de

S-fase, waarin hij het erfelijk materiaal kopieert om uiteindelijk de dochtercellen van dezelfde oorspronkelijke set genen te kunnen voorzien. Tijdens de G₂-fase bereidt de cel zich voor op de uiteindelijke celdeling, die zich afspeelt in de M-fase. Aan het eind van de G₁-fase en G₂-fase is nog een moment ingelast waarop de cel zijn DNA controleert op aanwezigheid van schade, dan wel foutjes die zijn ontstaan tijdens het kopiëren van het genoom. De celcyclus kan eventueel nog even worden opgehouden tot deze beschadigingen door DNA herstelprocessen zijn verwijderd. Mochten er echter te veel beschadigingen zijn, dan gaat de cel over op geprogrammeerde celdood. Een kankercel onderscheidt zich van een gezonde cel doordat hij zich onttrekt aan deze controlestappen en ongebreideld blijft doordelen, waardoor uiteindelijk tumoren ontstaan.



Figuur 11. De celcyclus en de circadiane klok: twee gekoppelde processen.

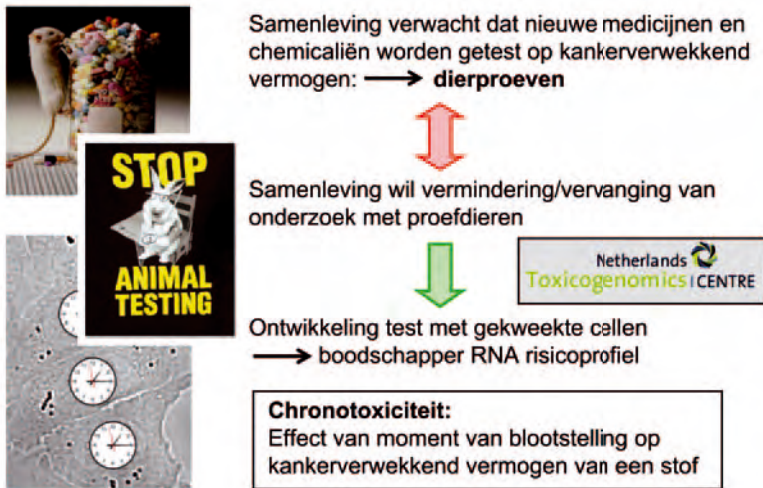
Uit werk van Georg Bjarnasson van de Universiteit van Toronto is gebleken dat de -overigens gezonde - cellen in onze opperhuid niet willekeurig delen, maar op hetzelfde moment van de dag hun DNA kopiëren en zich op hetzelfde moment opsplitsen in twee dochtercellen¹⁹. Blijkbaar is de celcyclus van deze cellen via de circadiane klok gesynchroniseerd en gekoppeld aan het dag-nacht ritme. Er is wel gesteld dat de circadiane klok werkt als een zogenaamd "gating" systeem. Hierbij moet u zich voorstellen dat de klok werkt als een poort die éénmaal per etmaal op een vast tijdstip een korte tijd openstaat en alleen die cellen doorlaat die zich in een specifieke fase van de celcyclus bevinden. In de komende jaren zullen Filippo Tamanini en Romana Nijman de koppeling van de celcyclus en de circadiane klok bestuderen in gekweekte cellen en in de intacte huid van muizen met een klok- dan wel celcycluscontrole-defect.

Naast de al even genoemde epidemiologische studies aan stewardessen en verplegend personeel in ploegendienst is ook middels dierstudies aangetoond dat ontregeling van het dag-nacht ritme de kans op het krijgen van bepaalde vormen van kanker verhoogt. Zo groeien tumorcellen van de menselijke alvleesklier sneller in muizen die aan chronische jetlag condities zijn blootgesteld of geen SCN meer hebben. Voorts krijgen muizen met een defect *Per2* klokgen meer tumoren na blootstelling aan röntgenstraling²⁰. Op dit moment onderzoeken wij of in menselijke borstkanker cellijnen de circadiane klok is verstoord, dan wel hoe inactivatie van de klok de delingssnelheid van deze tumorcellen beïnvloedt. Naast onderzoek aan gekweekte tumorcellen zullen wij ook diermodellen voor kanker in onze researchactiviteiten betrekken. In samenwerking met Annemieke de Vries van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu gaan we bestuderen hoe klokdefecten, en chronische jetlag situaties de inductie en progressie van tumoren in een spontaan borstkanker muismodel beïnvloeden. Soortgelijk onderzoek zal worden uitgevoerd met het darmkanker muismodel van Ricardo Fodde van de afdeling Pathologie van het Erasmus MC.

Minstens zo belangrijk als het vergaren van kennis over het ontstaan van kanker, is het verrichten van onderzoek naar de meest optimale behandelingsmethoden. Naast chirurgisch ingrijpen, kan een arts besluiten over te gaan op chemo- of radiotherapie. Het doel van laatstgenoemde behandeling is het doden van de kankercellen met behulp van agressieve chemische verbindingen of straling. Het nadeel van deze aanpak is echter dat ook gezonde cellen en organen worden aangetast, hetgeen duidelijk moge zijn uit de bijwerkingen van deze behandelmethoden (bijv. verminderde eetlust, misselijkheid, braken, vermoeidheid, haaruitval, nierfalen, verminderde afweer en verstoorde bloedstolling). Uit pionierswerk van de Amerikaanse oncoloog Bill Hrushesky bleek al in de tachtiger jaren van de vorige eeuw dat chemotherapeutica op bepaalde momenten van de dag efficiënter werken, dan wel minder bijwerkingen geven²¹. Behandelingsmethoden waarbij bij medicatie rekening wordt gehouden met het moment van de dag noemen we chronotherapie. Genoemde borst- en darmkanker muismodellen zullen ook worden gebruikt om te onderzoeken welke circadiaan gecontroleerde processen verantwoordelijk zijn voor het optreden van chronotherapeutische effecten. Het is te verwachten dat verkregen inzichten zullen bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe en het optimaliseren van bestaande behandelingsmethoden.

Kanker wordt veroorzaakt door blootstelling van onze cellen aan DNA beschadigende stoffen uit ons milieu. Jaarlijks produceert de farmaceutische, chemische, voedings- en cosmetische industrie een zeer groot aantal nieuwe chemische verbindingen. Onze maatschappij verwacht dat al deze stoffen worden getest op hun kankerverwekkend vermogen, hetgeen doorgaans geschiedt met behulp van proefdieren als rat en muis.

Tegelijkertijd verwacht deze zelfde maatschappij dat het gebruik van laboratoriumdieren drastisch wordt verminderd. Recent heeft het Netherlands Genomics Initiative een subsidie van 25 miljoen Euro verleend aan het Netherlands Toxicogenomics Center (NTC) voor het ontwikkelen van betrouwbare alternatieven voor deze dierproeven (Figuur 12). Hierbij moet men denken aan testsystemen gebaseerd op gekweekte cellen, waarbij met behulp van de eerder genoemde microarray technologie bepaald wordt hoe onze genen reageren op blootstelling van de cel aan diverse klassen giftige en DNA beschadigende stoffen. De op die manier verkregen boodschapper RNA profielen zullen worden aangewend om het kankerverwekkende en/of weefselbeschadigend vermogen van die stoffen in te schatten.



Figuur 12. Alternatieven voor dierproeven in toxicologisch onderzoek.

In het kader van het NTC zullen Filippo Tamanini en Romana Nijman een test ontwikkelen om chronotoxische eigenschappen van chemische verbindingen vast te kunnen stellen. Chronotoxiciteit is het verschijnsel dat een stof op het ene moment van de dag meer vergiftigingsverschijnselen in onze cellen opwekt dan op een ander moment van de dag. De uit deze test verkregen informatie is vanuit arbeidsveiligheidsoverwegingen belangrijk omdat een werknemer kan worden aanbevolen om alleen op die uren van de dag met een bepaalde chemische stof te werken, wanneer een onvoorziene blootstelling aan die stof het minste effect op zijn of haar gezondheid heeft.

Zeer interessant is ook de recente bevinding van Gosia Oklejewicz en Eugin Destici dat, afhankelijk van de stand van de klok, röntgenstraling, ultraviolet licht, DNA beschadigende chemicaliën en andere toxische stoffen de biologische klok van cellen in kweek vooruit kunnen zetten²². Evenzo verschuift de SCN klok van de levende muis na blootstelling aan röntgenstraling. Binnen het NTC zullen wij ook het onderliggend mechanisme en de biologische gevolgen van deze koppeling (bijvoorbeeld bij chemotherapeutische behandelingen) verder onderzoeken.

De circadiane klok en veroudering

Alles heeft zijn tijd. “Voor alles wat gebeurt is er een uur, een tijd voor alles wat er is onder de hemel. Er is een tijd om te baren en een tijd om te sterven” aldus het bijbelboek Prediker. Het moge echter duidelijk zijn dat er tussen het moment van geboren worden en sterven van alles gebeurt met ons lichaam. Wij halen adem om onze cellen van de zuurstof te voorzien die nodig is om energie vrij te maken uit de voedingsstoffen die we tot ons nemen. Maar bij iedere hap lucht moeten wij ons ook realiseren dat diezelfde zuurstof aanleiding geeft tot de vorming van ongewenste radicalen die de eiwitten en het DNA in onze cellen kunnen beschadigen. De opeenstapeling van deze beschadigingen in de tijd zorgt er voor dat onze cellen op termijn minder goed functioneren en zelfs afsterven. Uiteindelijk leidt dit tot functieverlies van organen en het ontstaan van ouderdomsgerelateerde kwalen en aandoeningen als doofheid, staar, botontkalking, gewrichtsaandoeningen en dementie.

Ons onderzoek aan muismodellen voor DNA herstelziekten heeft laten zien dat het verouderingsproces sneller verloopt wanneer ons lichaam niet op tijd alle oxidatieve DNA beschadigingen kan verwijderen⁵. Net als patiënten vertonen de muizen neurologische afwijkingen en een groot aantal verouderingsverschijnselen zoals osteoporose en spontane retina degeneratie. De levensduur en de ernst van de verouderingsverschijnselen van de mutant muizen bleek sterk af te hangen van de mate waarin de DNA herstelcapaciteit is aangedaan. Hiermee is ontegenzeggelijk bewezen dat DNA schade een belangrijke veroorzaker van ouderdomsgerelateerde pathologie is.

Het zal u wellicht niet verbazen dat óók de circadiane klok gevoelig is voor de tand des tijds. Het meest duidelijk komt dit naar voren uit klachten van ouderen over slaapproblemen, alsmede de verhoogde vermoeidheid en drang naar slaap (“dutjes”) gedurende de dag. Ook heeft de oudere mens vaak langer last van jetlag en gaat het werken in ploegendienst hem minder goed af. Illustratief in dit verband is de vergelijking van het circadiane gedrag van jonge en oude muizen. Oude muizen vertonen gefragmenteerd loopwielgedrag, hebben meer moeite zich aan een veranderd licht-donker schema aan te passen en hebben een tragere klok. Men kan stellen dat de klok met de jaren aan robuustheid verliest, hetgeen blijkt uit de afname in de amplitude

van de verschillende ritmen in fysiologie en stofwisseling. U moet zich voorstellen dat de uitslag van de slinger van de klok kleiner wordt, waardoor de pieken en dalen van de golfbeweging dichter bij elkaar komen te liggen.

Recent zijn Filippo Tamanini en Antonio Carvalho da Silva een onderzoek gestart naar veroudering van de centrale klok in de hersenen. Hiertoe hebben zij in samenwerking met Gregor Eichele en Henrik Oster van het Max Planck Instituut voor Biofysische Chemie in Göttingen, muizen gegenereerd waarbij specifiek in SCN zenuwcellen DNA herstelsystemen zijn uitgeschakeld. Gekeken zal worden in hoeverre DNA schade de robuustheid van het moleculaire uurwerk in de SCN aantast en welke gevolgen versnelde veroudering van de SCN heeft voor het gedrag van de muis en de fysiologie en stofwisseling van de perifere weefsels (Figuur 13).



DNA hersteldefect bevordert veroudering in mens en muis

DNA reparatiedefect in hersenklok → versnelde veroudering klok ?

- Effect op - gedrag, fysiologie en stofwisseling ?
 - ontwikkelen ouderdomsgerelateerde ziekten ?

Figuur 13. De circadiane klok en veroudering.

Omgekeerd kan men zich afvragen of de circadiane klok wellicht zelf van invloed kan zijn op het verouderingsproces. Neemt u even het centrale verwarmingssysteem van uw huis in gedachten. Wanneer u uw huis nooit zou verwarmen zal het toestel waarschijnlijk tot in lengte van dagen meegaan. Echter, zou u de thermostaat van uw verwarming continu op 21 graden laten staan, dan zal uw verwarmingsketel continu aan en uit springen om het huis op temperatuur te houden, slijten, en op een bepaald moment de geest geven. Het is dus zinnig de verwarming alleen aan te laten gaan op het moment dat er behoefte is aan warmte, vandaar het gebruik van een klokthermostaat.

Hetzelfde principe zou kunnen gelden voor onze energiehuishouding. Overdag slaapt de muis en is er weinig behoefte aan energie. Door overdag de stofwisseling tijdelijk op een laag pitje te zetten, worden er minder schadelijke radicalen gevormd. Analoog aan de verwarmingsketel is de voorspelling dat de cellen daardoor minder snel zullen slijten en veroudering wordt tegengegaan.

Indien geschetst scenario juist is, zou het uitschakelen van de klok in *Bmal1* en *Cry1/Cry2* knockout muizen het proces van verouderen moeten beïnvloeden. Verrassenderwijs worden *Bmal1* muizen niet ouder dan één jaar, terwijl normale muizen meer dan de dubbele leeftijd halen²³. Bovendien ontwikkelen de dieren ouderdomsgerelateerde afwijkingen als cataract en verminderde vet- en spiermassa. In overeenstemming met de vroegtijdige veroudering werden in *Bmal1* muizen ook verhoogde concentraties van schadelijke radicalen gevonden. Eugin Destici heeft laten zien dat *Cry1/Cry2* knock-out muizen daarentegen niet sneller verouderen. Blijkbaar maakt het uit in welke stand de wijzers van de klok zijn blijven steken. Een logische verklaring voor dit verschil in fenotype is dat in muizen die het BMAL1 eiwit niet meer aanmaken alle CLOCK/BMAL1 gereguleerde outputgenen continu op een laag pitje staan, terwijl muizen zonder CRY eiwitten het CLOCK/BMAL1 complex niet meer kunnen remmen, waardoor diezelfde outputgenen juist continu hoog aan staan. Door met behulp van de microarray technieken de boodschapper RNA profielen in versneld verouderende *Bmal1* en normaal verouderende *Cry1/Cry2* knock-out muizen te bepalen, willen wij vaststellen welke biologische processen het verouderingsproces positief dan wel negatief beïnvloeden. Vervolgens willen wij voor deze biologische processen markers identificeren die het mogelijk maken een vertaalslag naar de mens te maken.

Verdieping van fundamentele kennis van het proces van veroudering zal bijdragen aan het ontwikkelen van interventiemethoden om het ontstaan van ouderdomsgerelateerde pathologie te vertragen en de kwaliteit van leven van de oudere mens te verbeteren.

Slotoverwegingen

Ik heb u in deze rede laten zien hoe de circadiane klok met ons leven en welzijn is verweven en hoop dat ik u heb kunnen overtuigen van het belang van de circadiane klok voor onze gezondheid. Alles heeft zijn tijd. Alle organen hebben een interne klok en zeer veel biologische processen staan onder controle van diezelfde klok. Wij kunnen ons niet ongestraft onttrekken aan de wil van onze interne Rolex. Chronische jetlag situaties en langdurig werken in ploegendienst laten hun sporen na in de vorm van chronische vermoeidheid en verhoogde kans op het ontstaan van kanker. Omgekeerd verstoren erfelijke afwijkingen in de circadiane klok ons welbevinden, zo getuige de Sleep Phase Syndromen, en kunnen klokdefecten het proces van veroudering beïnvloeden.

Uit een gesprek met een Delayed Sleep Phase Syndrome patiënt is mij gebleken dat zijn klachten door de arts werden afgedaan als "je bent gewoon lui" en "het zit tussen de oren". Hoe juist is deze laatste conclusie, alleen niet in de door de arts bedoelde zin van het woord. Hoewel deze arts zeker niet als representatief beschouwd mag worden, gaat het niet te ver te stellen dat er in de medische wereld onvoldoende rekening wordt gehouden met de aanwezigheid van een interne klok. Dit geldt zowel de diagnostiek van aandoeningen, als de behandeling daarvan. Hoe komt het bijvoorbeeld dat er ondanks de positieve berichten in de wetenschappelijk literatuur over de tijdsafhankelijke effecten van chemo- en radiotherapeutica bij de behandeling van kanker nog zo weinig gebruik wordt gemaakt van chronotherapie?

Mogen wij dit de artsen kwalijk nemen? Ik denk het niet. Hoeveel medische studenten hebben tijdens hun opleiding kennis mogen nemen van het circadiane systeem? Binnen het Erasmus MC wordt de circadiane klok in één adem besproken met de fysiologie van de slaap in het 3e jaars college "Stoornissen van dagritme en slaap". Het moge duidelijk zijn dat dit onvoldoende ruimte biedt om het biologisch en het medisch belang van de klok voldoende tot zijn recht te laten komen. Het verdient daarom aanbeveling om binnen het basiscurriculum de arts in spé reeds in het eerste jaar kennis te laten maken met de werking van het circadiane systeem en zijn verwevenheid met belangrijke biologische basisprocessen als bijvoorbeeld de celcyclus en de stofwisseling, en in het verlengde daarvan de relatie met belangrijke biologische gezondheidsproblemen als kanker en ouderdomsgerelateerde ziekten.

Het zal u niet verbazen dat met wetenschappelijk onderzoek veel geld is gemoeid. Omdat slechts een klein deel van het voor onderzoek benodigde geld rechtstreeks van de onderzoeksinstelling komt, is het een vereiste dat onderzoekers continu projecten aanvragen bij de diverse subsidiegevers binnen de nationale en internationale overheden en bij collectebusfondsen als het Koningin Wilhelmina Fonds. De laatste decennia zien wij echter een sterke tendens naar financiering van onderzoek dat moet leiden tot vermarktbaar kennis. We noemen dit met een mooi woord valorisatie. Hoewel het publiceren van resultaten in vakbladen en het organiseren van congressen

en seminars voor een niet-academisch publiek zeker ook onder de term valorisatie vallen, ligt de nadruk toch heel sterk op wat door Minister Plasterk van Onderwijs wordt omschreven als het verzilveren van wetenschappelijke kennis en techniek. Hierbij moet men denken aan het ten gelde maken van onderzoeksgelateerde uitvindingen en patenten, het verlenen van licenties en de creatie van zogenaamde spin-off bedrijven. Een aantal van de hier genoemde subsidie-instanties, die ik overigens dankbaar ben voor de geboden steun aan het klokonderzoek, heeft als subsidie-eis een nauwe samenwerking met industriële partners. De oprichting van DNage, een spin-off biotechnologiebedrijf van het Erasmus MC dat de snelverouderende muizen van de afdeling Genetica gebruikt voor de ontwikkeling van nieuwe medicijnen op het gebied van verouderingsziekten, laat zien dat valorisatie geen vies woord hoeft te zijn. Mede door DNage heeft de afdeling Genetica extra financieringsruimte verworven en is het makkelijker valorisatie-gebonden projectsubsidies voor toegepast onderzoek in de wacht te slepen. Toch moeten wij er voor waken dat deze ontwikkeling niet ten koste gaat van de onafhankelijkheid van het wetenschappelijk onderzoek. Ik spreek dan ook de hoop uit dat de balans in de beschikbare onderzoeksbudgetten niet te ver zal doorslaan in de richting van valoriseerbaar onderzoek, zodat het basaal wetenschappelijk onderzoek niet in gevaar komt.

Dankwoord

Alles heeft zij tijd, maar ik heb niet alle tijd. Ik wil echter deze rede niet afsluiten zonder een aantal mensen te bedanken.

Allereerst wil ik de Raad van Bestuur, het College van Bestuur en de Vereniging Trustfonds Erasmus Universiteit bedanken voor het instellen van de leerstoel Chronobiologie en Gezondheid.

Professor Galjaard, met het televisieprogramma “Een Groot Uur U” over erfelijke ziekten hebt u in het 2^e jaar van mijn studie Biologie mijn interesse voor de Medische Genetica gewekt. Ik kijk met plezier terug op mijn stageperiode bij de net opgerichte afdeling Klinische Genetica en ben u zeer erkentelijk dat u mij, na een kort uitstapje in Amsterdam, aanbood als promovendus binnen de afdeling Celbiologie aan de erfelijke ziekte sialidosis te gaan werken.

Dick Bootsma wil ik bedanken voor de mogelijkheid om een net gepromoveerde celbioloog als beginnend postdoc over te laten stappen naar de afdeling Genetica. Bij het sollicitatiegesprek stelde je “van moleculaire biologie moet je nog veel leren”. Ik hoop dat ik je niet heb teleurgesteld.

Jan Hoeijmakers ben ik dankbaar voor het gestelde vertrouwen en voor alle geboden ruimte. Jan, onder jouw bezielende leiding kon ik uitgroeien tot een echte muizen-geneticus. Ik heb heel veel van je geleerd en wist mij altijd gesteund door je wijze raad. Ik waardeer het zeer dat je mij de kans hebt gegeven mij verder te ontwikkelen en mijn eigen weg te vinden in de klokwereld. Ik hoop dat we onze vruchtbare samenwerking nog vele jaren mogen voortzetten.

I am very grateful to Akira Yasui for the intense, productive, but above all very pleasant collaboration over the last 15 years, which started with the generation and characterization of the photolyase transgenic mice. I wonder whether, without your involvement, we would ever have embarked on the cryptochrome mouse project. Evidently, you have had a great impact on my career.

Onderzoek doe je niet alleen. Het doet mij deugd te constateren dat de klokgroep in de afgelopen jaren heeft kunnen uitgroeien tot een enthousiast en dynamische team van inmiddels 12 mensen, de drie openstaande vacatures nog niet meegeteld. Ik wil alle medewerkers van toen en nu enorm bedanken voor hun enthousiasme en tomeloze inzet en kijk er naar uit samen met jullie de nieuwe fascinerende onderzoekslijnen op het gebied van de circadiane klok, kanker en veroudering verder uit te bouwen.

Evenzo wil ik de vroegere en huidige collega's van de verouderingsgroep van de afdeling Genetica (inclusief de medewerkers van ons spin-off bedrijf DNage) bedanken voor de uiterst productieve jaren. Ik hoop dat wij na de op handen zijnde verjongingskuur op volle kracht kunnen doorgaan met het ontrafelen van de geheimen van het verouderingsproces.

Ons onderzoek heeft een sterk multidisciplinair karakter. Het doet mij deugd te zien dat de korte lijnen binnen het Erasmus MC het mogelijk maken op ieder terrein snel en efficiënt contacten te leggen. Ik wil Ype Elgersma, Gerard Borst, Dick Jaarsma en Chris

de Zeeuw van de afdeling Neurowetenschappen, Hans van Leeuwen van de afdeling Inwendige Geneeskunde, Dirk Duncker van de afdeling Experimentele Cardiologie en Ricardo Fodde van de afdeling Pathologie bedanken voor de uiterst plezierige samenwerking. Dit geldt niet in het minst ook Peter van der Spek van de afdeling Bioinformatica. Peer je steun bij het lospeuteren van de nodige interessante gegevens uit de diverse array experimenten zal onontbeerlijk zijn. Tevens ben ik alle medewerkers van het EDC erkentelijk voor de uiterst efficiënte en toegewijde manier waarop zij het muishuis runnen en de onderzoekers bijstaan bij het proefdieronderzoek.

Het is onmogelijk alle projectleiders en medewerkers binnen de STW, IOP-Genomics, Netherlands Toxicogenomics Center en Neuro-bsik projecten hier persoonlijk te bedanken voor de goede samenwerking. Ik wil echter Leon Mullenders, Bob van de Water, Harry Vrieling, Timo Breit en Harry van Steeg niet onvermeld laten. Heren, ik hoop dat wij onder het genot van een biertje nog de nodige nieuwe projecten zullen ontwikkelen. Harry van Steeg, onze paden kruisten elkaar al op mijn eerste betaalde werkdag als onderzoeker, nu 25 jaar geleden. Ik koester de vriendschap die sinds dat moment is ontstaan.

Ik wil Serge Daan bedanken voor het met open armen ontvangen van de ontlukende Rotterdamse klokgroep in het Nederlandse Chronobiologie veld, direct na de publicatie van onze *Cry* muizen. Ik hoop van harte dat het Center for Timing Research initiatief tot iets moois mag uitgroeien.

Verder wil ik alle vrienden, kennissen en familieleden bedanken voor hun belangstelling in mijn doen en laten als onderzoeker.

Mijn ouders wil ik in het bijzonder bedanken voor hun betrokkenheid en stimulerende invloed, eerst op mijn studie en later op mijn werk. Wie had kunnen denken dat ik ooit zo ver zou kunnen doorgroeien in de wetenschap? Ik vind het fijn dat jullie dit moment nog mogen meemaken. Voor mijn schoonmoeder komt deze oratie een jaar te laat, maar ik weet zeker dat ook zij, net als jullie apetrots zou zijn geweest.

Wirati yang manis, tiga bulan setelah kamu di lahirkan, kamu sudah menjadi bagian dari kahidupan kami sampai sekarang. Kamu sangat penting bagi kami dan kami sangat senang kamu disini untuk meryakan hari kenaikan pangkat menjadi professor. Saya berharap lagi tiga tahun dari sekarang kamu akan melanjutkan pendidikan di Belanda. Kemungkinan di masa depan saya akan mengajar kamu tentang jam kepala di Eramus MC.

Last but not least wil ik Rita bedanken voor alle liefde en zorgzaamheid in de afgelopen decennia. Het is goed te weten dat er altijd de steun van het thuisfront is, ook al is het leven met een wetenschapper niet altijd even makkelijk. Ik kan mij geen betere kameraad wensen en ik prijs mij gelukkig dat wij vandaag samen met Wirati ook onze 25-jarige bruiloft mogen vieren. Ik kijk uit naar de volgende 25 jaar en hoop dat wij samen, genietend van een verfrissend glas kelapa muda en het uitzicht op de Straat van Lombok in gezondheid onze oude dag mogen slijten in ons geliefde Padangbai.

Ik heb gezegd.

Referenties

- ¹ Pittendrigh CS (1960) Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **25**:159-184.
- ² Daan S, Aschoff J (2001) The entrainment of circadian systems. In: *Handbook of behavioral neurobiology*. Vol 12. *Circadian clocks* (Ed. Takahashi JS, Turek FW, Moore RY); Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York; pg. 7-43.
- ³ Stephan FK, Zucker I (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* **69**:1583-1586.
- ⁴ Hoeijmakers JHJ (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**, 366-374.
- ⁵ Garinis GA, van der Horst GTJ, Vijg J, Hoeijmakers JHJ (2008) DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem. *Nat Cell Biol* **10**:1241-1247.
- ⁶ Yasui A, Eker APM (1998) DNA photolyases. In *DNA Damage and Repair, Vol.2: Repair in Higher Eukaryotes* (eds. Nickoloff JA, Hoekstra MF), Humana Press Inc., Totowa, NJ, p.9-31.
- ⁷ van der Spek PJ, Kobayashi K, Bootsma D, Takao M, Eker AP, Yasui A (1996) Cloning, tissue expression, and mapping of a human photolyase homolog with similarity to plant blue-light receptors. *Genomics* **37**:177-182.
- ⁸ van der Horst GTJ, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker APM, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JHJ, Yasui A (1999) Mammalian blue-light photoreceptor homologs CRY1 and CRY2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* **398**, 627-630.
- ⁹ Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* **418**:935-941.
- ¹⁰ Chaves I, Yagita K, Barnhoorn S, Okamura H, van der Horst GTJ, Tamanini F (2006) Functional evolution of the photolyase/cryptochrome protein family: importance of the C terminus of mammalian CRY1 for circadian core oscillator performance. *Mol Cell Biol* **26**:1743-1753.
- ¹¹ Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* **288**:682-685.
- ¹² Yagita S, Tamanini F, Yasuda M, van der Horst GTJ, Okamura H (2001) Molecular mechanism of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science* **292**:278-281.
- ¹³ Balsalobre A, Damiola F, Schibler, U (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* **93**:929-937.
- ¹⁴ Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schultz PG, Kay SA, Takahashi JS, Hogenesch JB (2002) Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* **109**:307-320.
- ¹⁵ Hansen J (2001) Light at night, shiftwork, and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* **93**:1513-1515.
- ¹⁶ Czeisler CA, Gooley JJ (2007) Sleep and circadian rhythms in humans. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **72**:579-597.
- ¹⁷ Wirz-Justice A (2006) Biological rhythm disturbances in mood disorders. *Int Clin Psychopharmacol* **21**:S11-S15.
- ¹⁸ Hazlerigg DG, Ebling FJ, Johnston JD (2005) Photoperiod differentially regulates gene expression rhythms in the rostral and caudal SCN. *Curr Biol* **15**:R449-R450.
- ¹⁹ Bjarnason GA, Jordan RC, Wood PA, Li Q, Lincoln DW, Sothern RB, Hrushesky WJ, Ben-David Y (2001) Circadian expression of clock genes in human oral mucosa and skin: association with specific cell-cycle phases. *Am J Pathol* **158**:1793-1801.
- ²⁰ Fu L, Pelicano H, Liu J, Huang P, Lee C (2002) The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell* **111**:41-50.
- ²¹ Hrushesky WJ (1985) Circadian timing of cancer chemotherapy. *Science* **228**:73-75.
- ²² Oklejewicz M, Destici E, Tamanini F, Hut RA, Janssens R, van der Horst GTJ (2008) Phase resetting of the mammalian circadian clock by DNA damage. *Curr Biol* **18**:286-291.
- ²³ Kondratov RV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, Vykhovanets OV, Antoch MP (2006) Early aging and age-related pathologies in mice deficient in *BMAL1*, the core component of the circadian clock. *Genes Dev* **20**:1868-1873.

*Deze publicatie betreft een oratie aan
de Erasmus Universiteit Rotterdam*

ISBN 978-90-779-0659-0

Erasmus MC
Universitair Medisch Centrum Rotterdam

