

Hjernens biologiske ur

Jan Fahrenkrug

STATUSARTIKEL

Klinisk Biokemi
Afdeling, Bispebjerg og
Frederiksberg Hospital

Ugeskr Læger
2018;180:V03180212

Livet på jorden er adapteret til vores planets rotation om sin egen akse, og således udviser mange organismer 24-timersdøgnrytmmer i adfærd, fysiologi og biokemi. Disse rytmiske ændringer styres af et indre timingsystem, som muliggør anticipering og tilpasning til de tilbagevendende faser og ændringer i omgivelserne. Eksempler på døgnrytmisk kontrollerede processer er søvn-vågen-cyklus, lokomotorisk aktivitet, metabolisme og energihomøostase, hjerterytme, blodtryk, legemstemperatur, nyreaktivitet samt hormonsekretion. Det indre timingsystem udviser imidlertid en rytme, hvis periodelængde ikke er eksakt 24 timer, og det bliver derfor også betegnet som det cirkadiane system fra latin circa (omtrent) og dies (dag). Således vil en organisme i konstant mørke (den fritløbende rytme) udvise en cyklusvarighed i adfærd og fysiologi, som afviger fra præcis 24 timer. F.eks. er den gennemsnitlige fritløbende periodelængde hos mennesket og mus henholdsvis 24,3 timer og 23,7 timer. Eksistensen af et muligt indre ur blev allerede i 1729 bemærket af den franske astronom Jean-Jacques d'Ortous de Mairan. Han observerede, at mimoserne i baghaven åbnede og lukkede deres blade på samme tidspunkt af døgnet, og at de

HOVEDBUDSKABER

- ▶ Daglige biologiske rytmer i adfærd, fysiologi og biokemi styres af et indre døgnrytmegenererende system, som består af hjernens ur samt multiple perifere ure, og urfunktionen genereres i hver enkelt celle af et komplekt molekulært maskineri.
- ▶ Periodelængden i hjernens ur er ca. 24 timer, så lys justerer dagligt uret til omgivelsernes geofysiske tid via en nervebane fra specifikke ganglieceller i nethinden, som har deres egen lysfølsomme receptor, melanopsin, og formidler lys-mørke-information via signalstofferne glutamat og *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*.
- ▶ Når den biologiske døgnrytme er ude af fase med det astronomiske døgn, forekommer der jetlag, og hvis det er længerevarende, er der risiko for udvikling af sygdom.

daglige cykler i bladenes bevægelser persisterede i konstant mørke. Siden da er selvkørende cirkadiane oscillatorer fundet i næsten alle lysfølsomme organismer fra cyanobakterier til pattedyr. Den molekulære forskning i disse biologiske ure eller tidsmålere blev initieret i 1980'erne på bananfluen, *Drosophila melanogaster*, af Jeffrey C. Hall & Michael Rosbash på Brandeis University og Michael W. Young på Rockefeller University (Figur 1). I banebrydende arbejder, som blev belønnet med Nobelprisen i fysiologi eller medicin i 2017, identificerede de de første urgenter og klarlagde de selvregulerende urmekanismer [1-3]. I dag ved vi, at alle multicellulære organismer, inklusive mennesket, bruger en lignende molekulær urmekanisme til kontrol af døgnrytmmer. Figur 2 viser en skematisk opbygning af det døgnrytmegenererende system [4]. Den vigtigste komponent i systemet er hjernens ur, der er beliggende i den suprakiasmatiske kerne (SCN) i hypothalamus, og allerede i 1972 blev det påvist, at cirkadiane rytmer opårer efter læsion af SCN [5]. Selvom det cirkadiane system og dets rytmer er intrinsiske, er de modtagelige for påvirkninger fra omgivelserne, såkaldte *zeitgebers*, og den vigtigste stimulus er lys. Hjernens ur bliver således dagligt stillet af lys/mørke i omgivelserne via en direkte nerveforbindelse fra retina. De seneste års forskning har vist, at molekulære ure også findes i nerveceller i andre hjerneregioner og i perifere organcers celler. Hvorledes alle disse cellulære ure koordin

FIGUR 1

Modtagerne af nobelprisen i fysiologi eller medicin 2017: Michael W. Young, Michael Rosbash og Jeffrey C. Hall, der fik prisen for deres opdagelse af molekulære mekanismer, som kontrollerer cirkadiane rytmer.



neres, er ved at blive klarlagt, og det tyder på, at det døgnrytmegenererende system har en hierarkisk struktur, hvor uret i SCN synkroniserer de perifere ure via neurale og humorale signaler. De perifere organers ure kan imidlertid kommunikere indbyrdes og tilbage til hjernens ur. F.eks. styrer hjernens ur via en forbindelse i det autonome nervesystem sekretionen af nathormonet melatonin fra corpus pineale, og melatonin signalerer tilbage til SCN og de perifere organer og deres ure [6].

HJERNENS UR

SCN, som udgør hjernens ur, består af ansamlinger af neuroner i et par ovale kerner, der er lokaliseret i den anteriore hypothalamus lige over chiasma opticum. Hos rotten og mennesket indeholder hver af de to kerner henholdsvis 10.000 og 50.000-100.000 neuroner. Hver enkelt nervecelle er udstyret med et molekulært maskineri, som ligger til grund for urfunktionen. For at sikre synkroni mellem cellerne og dermed frembringelse af sammenhængende *output*-signaler, kommunikerer nervecellerne i SCN med hinanden via synaptiske og parakrine mekanismer eller *gap junctions*. Cytokemisk og funktionelt er hver SCN-kerne opdelt i to områder [7]: *core*-regionen i den ventrolaterale del, som modtager lysinformation fra retina, og *shell*-regionen i den dorsomediale del, som primært består af arginin-vasopressin-holdige neuroner og spiller en vigtig rolle i rytmе-*output*. Neuronerne i den ventrolaterale del af SCN udtrykker og frisætter neuropeptidet vasoaktivt intestinalt polypeptid (VIP). De VIP-holdige neuroner udgør et udbredt neuronalt netværk i SCN [8]. I eksperimenter med genmanipulerede mus, som mangler VIP eller VIP-receptoren VPAC2, er det påvist, at VIP-signaler mellem nervecellerne er vigtige for opretholdelsen af en stabil, koordineret døgnrytmе [9, 10].

DET MOLEKYLÆRE URVÆRK

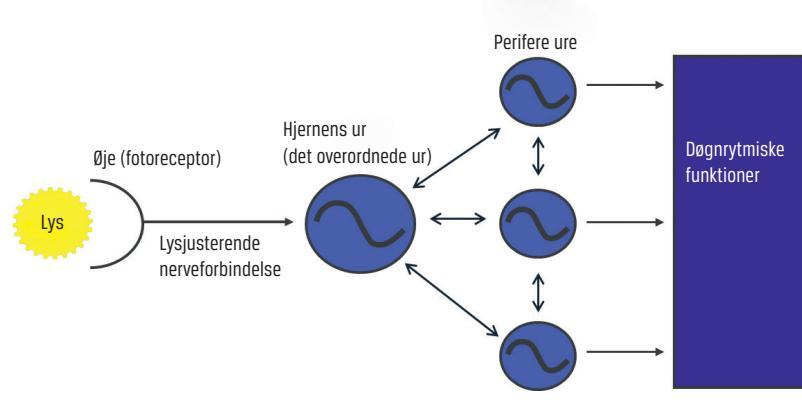
Den døgnrytmegenererende oscillator i hver enkelt celle regulerer den tidsmæssige ekspression af tusindvis af urkontrollerede gener. Det er anslættet, at halvdelen af musens gener oscillerer cirkadiant i et eller flere organer, og at denne cyklicitet i mRNA og proteiner varierer i de forskellige organer [11]. Mange af de urkontrollerede gener er centrale i cellulære processer og signaleringsveje, som regulerer metabolisme, immunfunktioner samt hormonelle og neurale funktioner.

Figur 3 viser det molekulære maskineri, som danner grundlaget for urfunktionen i den enkelte celle. Maskineriet udgøres af en gruppe af urgener, hvis genprodukter (proteiner) i dobbelte autoregulatoriske positive/negative feedbackloop interagerer og regulerer hinandens dannelse [13]. To transkriptionsfaktorer, CLOCK og BMAL1, er centrale i disse feedbackloop. CLOCK og BMAL1 danner heterodimere og aktiverer

generne, som koder for periodproteinerne PER1 og PER2 og cryptokromproteinerne CRY1 og CRY2. PER- og CRY-proteinerne danner korepressorkomplekser med yderligere polypeptider, og når disse multiunit-komplekser har nået en kritisk koncentration/aktivitet, binder de sig til CLOCK-BMAL1-heterodimeren og svækker evnen til at stimulere transkription (mRNA-syntesen). Som følge heraf bliver CRY- og PER-mRNA og proteiner ikke længere syntetiseret, og da deres halveringstid er relativt kort, ned sættes den cellulære koncentration, så PER/CRY-komplekset ikke længere kan

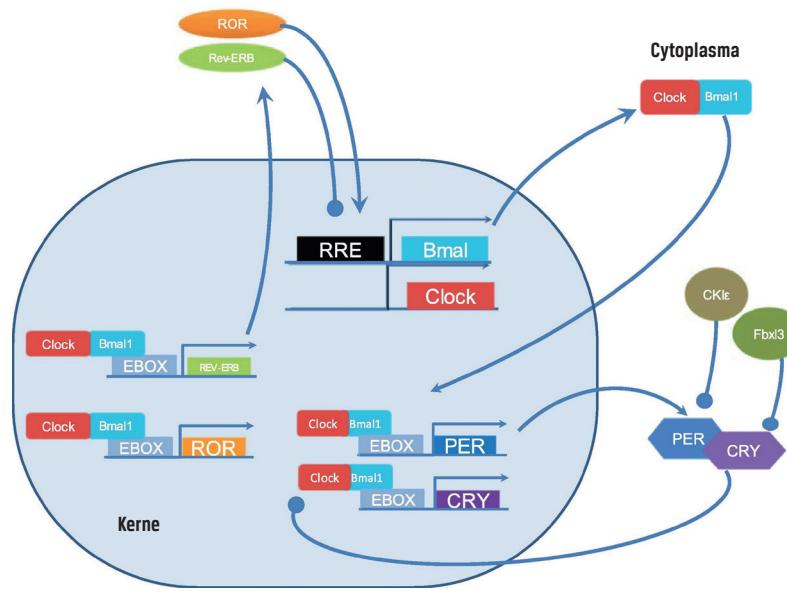
FIGUR 2

Skematisk fremstilling af det cirkadiane system, som styrer vores døgnrytmer.



FIGUR 3

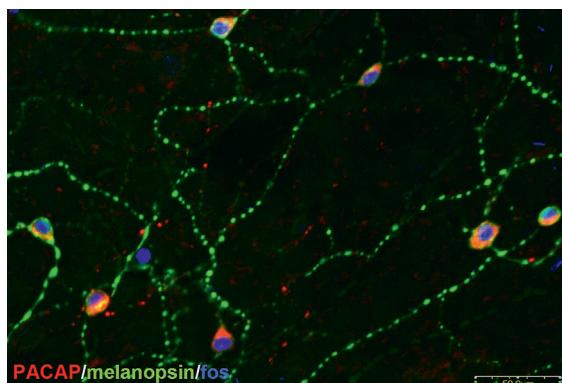
Skematisk fremstilling af det molekulære ur i en pattedyrcelle. Det molekulære maskineri består af to feedbackloop, som giber ind i hinanden. Det centrale loop består af positive elementer (CLOCK og BMAL1) og negative elementer (PER og CRY). Dette loop er i antifase med BMAL1-loopet, som har ROR som positivt element og REV-ERB som negativt element. Fra [12].





FIGUR 4

Intrinsisk fotosensitive ganglieceller i retina. Cellerne udtrykker foto-receptoren melanopsin i cellemembranen og dendritterne (grøn) og neurotransmitteren *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (rød). Lys har aktiveret cellerne og induceret den neuronale aktivitetsmarkør C-fos i kernen (blå) [22].



interferere med CLOCK/BMAL1-heterodimerens aktivitet. Herefter vil en ny PER/CRY-akkumulationcyklus starte. I en anden feedbackloop regulerer CLOCK og BMAL1 deres egen cirkadiane transkription ved at aktiverer transkriptionen af gener, som koder for de to nukleare receptorer Rev-Erb α og Rev-Erb β . Disse to repressorer oscillerer og okkuperer periodisk RORE-DNA-elementer i *Bmal1* og *Clock*-promotore, på hvilke de konkurrerer med ROR α og ROR β , som er aktivatorer af *Bmal1*- og *Clock*-transkriptionen. Ud over disse transkriptionelle mekanismer indgår en række af velkoordinerede posttranslationalle modifikationer af uproteinerne, som f.eks. fosforylering og acetylering, der er med til at sikre, at uret går med den rigtige hastighed. Således er taumutationen, som blev identificeret hos en mutant hamster med en kort cirkadianperiode en *missense*-mutation i fosforylerings-site for caseinkinase I-epsilon [14], en kinase som fosforylerer PER og CRY. Efterfølgende blev der hos patienter med *advanced sleep phase syndrome*, de såkaldte morgenlærker med kort cirkadianperiode og fire timers fremskudt sovn, temperatur og melatoninrytme, fundet en *missense*-mutation (serin \rightarrow glycine) i caseinkinase I-epsilon-bindingsregionen af PER2 [15].

LYSETS JUSTERING AF HJERNENS UR

Som nævnt genererer det døgnrytmegenererende system cykler af ca. 24 timers varighed, og hjernens ur skal derfor dagligt justeres for at være i overensstemmelse med den geofysiske tid. Den vigtigste stimulus for denne justering er omgivelsernes lys/mørke, en proces, der betegnes *photoentrainment* [16]. Uret har en periodebegrænset følsomhed for lys. Om dagen er hjernens ur uimodtagelig for fotiske stimuli, mens lys først på natten rykker den cirkadiane fase tilbage, og lyspåvirkning sent på natten eller tidligt om morgenen rykker den cirkadiane fase fremad. Nerveforbindelsen, den retinohypotalamiske bane, som indgår i lysjusteringen,

udgår fra en bestemt gruppe af retinale ganglieceller, der er intrinsisk fotosensitive [17]. Ud over at detektere lys direkte integrerer disse celler også lyssignaler fra stave og tappe [18]. Fem subtyper af intrinsisk fotosensitive ganglieceller er blevet identificeret (M1-M5), og det er primært M1-cellene, der formidler fotiske signaler til hjernens ur [19, 20]. Disse ganglieceller og deres dendritter er på overflademembranen udstyret med en lysfølsom receptor, melanopsin, som er en G-protein-koblet syvtransmembranreceptor, der indgår i opsin-familien af fotopigmenter. Melanopsin aktiveres af lys med en bølgelængde på 480 nanometer (blåt lys). Under lysaktivering fosforyleres melanopsin i den C-terminale intracellulære del, og fosforyleringsstatus har indflydelse på melanopsinfunktionen [21]. Gangliecellerne og dendritterne, som er meget lange (ca. 400 μ m), er vidt forgrenede og danner et lysfølsomt netværk, der dækker hele retinas overflade (Figur 4), selvom antallet af melanopsinholdige celler kun udgør få procent af det samlede antal af ganglieceller i nethinden. Nethinden har således ud over synssansen også en ikkebilleddannende funktion, der signalerer lysinformation til det døgnrytmegenererende system, hvilket forklarer, at visse blinde personer uden stave og tappe i øjnene kan faseskifte deres døgnrytme ved lysstimuli.

Fotiske signaler til cellerne i SCN formidles af to neurotransmittere i den retinohypotalamiske bane, neuropeptidet *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* og glutamat i et komplekst samspil [22]. Lys-signaleringen genererer en induktion af urgernerne PER1 og PER2 i cellerne i hjernens ur [23, 24], og i dyreexperimentelle studier er det påvist, at PER1-antisense injection i SCN-cellene blokerer lysinduceret faseskift, hvilket tyder på en kritisk rolle for PER1 i *photoentrainment*-mekanismen. Når lys gives først på natten, hvor PER-ekspressionen er faldende, vil den lysinducerede PER-ekspression forlænge denne del af cyklus, hvilket resulterer i en fasesforkælelse af det molekylære ur. Omvendt når lyset gives sent på natten eller tidligt om morgen, hvor PER-ekspressionen er stigende, forårsager den lysinducerede PER-ekspression en tidlig start på cyklus' stigende fase, hvilket resulterer i en fremrykning af det molekylære ur. Den daglige fasesadaptionskapacitet i hjernens ur har begrænsninger, og efter oversøiske flyvninger over flere tidszoner behøver menneskets døgnrytmegenerende system således adskillige dage for at adaptere sin fase til den nye tidszone. Resynkronisering tager således ca. halvanden time pr. døgn ved rejse vestpå og ca. en time pr. døgn ved rejse østpå. Under denne adaptionsperiode, hvor vores indre timingsystem er i konflikt med den geofysiske tid, lider vi af jetlag, som manifesterer sig som søvnforstyrrelser, træthed i dagarbejdstiden, mave-tarm-gener, nedsat appetit, hovedpine, nedsat fysisk præstationsniveau, dårligt humør og nedsat hukommelse.

melse. Bliver dette misforhold mellem vores indre døgnrytmegenererende system og de ydre omgivelser mere vedvarende, f.eks. betinget af skifteholdsarbejde eller livsstil, indebærer det en sundhedsrisiko og en risiko for at få hjerte-kar-sygdomme, metaboliske forstyrrelser, type 2-diabetes samt visse former for kræft [25-27].

KONKLUSION

På baggrund af opdagelserne, der blev gjort af de tre nobelpristagere i fysiologi eller medicin fra 2017, er de mekanismer, som styrer vores døgnrytmer via et indre cirkadian timingsystem klarlagt. Systemet består af hjernens ur, som dagligt justeres til omgivelsernes lys/mørke og perifere ure i næsten alle celletyper i kroppen. I urfunktionen i den enkelte celle indgår såkaldte urgenter og deres genprodukter, som i positive og negative transkriptionelle, translationelle feedbackloop driver en vedholdende rytmefrekvens. Siden nobelpristagernes opdagelser i 1980'erne og 1990'erne har cirkadianbiologien været et yderst dynamisk forskningsfelt, hvor man inden for de seneste år har fokuseret på vores sundhed og sygdomsudvikling. Forstyrrelser i den cirkadiane synkronisering og ikke mindst cirkadian *disruption* mellem det indre timingsystem og omgivelserne er en udfordring i det moderne 24/7-samfund.

KORRESPONDANCE: Jan Fahrenkrug. E-mail: jan.fahrenkrug@regionh.dk

ANTAGET: 2. maj 2018

PUBLICERET PÅ UGESKRIFTET.DK: 3. september 2018

INTERESSEKONFLIKTER: Forfatterens ICMJE-formular er tilgængelig sammen med artiklen på Ugeskriftet.dk

LITTERATUR

- Zehring WA, Wheeler DA, Reddy P et al. P-element transformation with period locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*. *Cell* 1984;39:369-76.
- Bargiello TA, Jackson FR, Young MW. Restoration of circadian behavioral rhythms by gene transfer in *Drosophila*. *Nature* 1984;312:752-4.
- Vosshall LB, Price JL, Sehgal A et al. Block in nuclear localization of period protein by a second clock mutation, timeless. *Science* 1994; 263:1606-9.
- Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol* 2010;72:517-49.
- Stephan FK, Zucker I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972;69:1583-6.
- Pfeffer M, Korf HW, Wicht H. Synchronizing effects of melatonin on diurnal and circadian rhythms. *Gen Comp Endocrinol* 2018;258:215-21.
- Moore RY, Speh JC, Leak RK. Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res* 2002;309:89-98.
- Hannibal J, Georg B, Fahrenkrug J. PAC1- and VPAC2 receptors in light regulated behavior and physiology: studies in single and double mutant mice. *PLoS One* 2017;12:1-16.
- Hannibal J, Hsiung HM, Fahrenkrug J. Temporal phasing of locomotor activity, heart rate rhythmicity, and core body temperature is disrupted in VIP receptor 2-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011;300:R519-R530.
- Aton SJ, Colwell CS, Harmar AJ et al. Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat Neurosci* 2005;8:476-83.
- Zhang R, Lahens NF, Ballance HI et al. A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111:16219-24.
- Robinson I, Reddy AB. Molecular mechanisms of the circadian clock-work in mammals. *FEBS Lett* 2014;588:2477-83.
- Buhr ED, Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Handb Exp Pharmacol* 2013;217:3-27.
- Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP et al. Positional synteny cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* 2000;288:483-92.
- Toh KL, Jones CR, He Y et al. An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* 2001;291:1040-3.
- Golombek DA, Rosenstein RE. Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev* 2010;90:1063-102.
- Do MT, Yau KW. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Physiol Rev* 2010;90:1547-81.
- Lucas RJ, Lall GS, Allen AE et al. How rod, cone, and melanopsin photoreceptors come together to enlighten the mammalian circadian clock. *Prog Brain Res* 2012;199:1-18.
- Schmidt TM, Do MT, Dacey D et al. Melanopsin-positive intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: from form to function. *J Neurosci* 2011;31:16094-101.
- Hannibal J, Christiansen AT, Heegaard S et al. Melanopsin expressing human retinal ganglion cells: subtypes, distribution, and intraretinal connectivity. *J Comp Neurol* 2017;525:1934-61.
- Fahrenkrug J, Falktoft B, Georg B et al. Phosphorylation of rat melanopsin at Ser-381 and Ser-398 by light/dark and its importance for intrinsically photosensitive ganglion cells (ipRGCs) cellular Ca²⁺ signaling. *J Biol Chem* 2014;289:35482-93.
- Hannibal J, Fahrenkrug J. Neuronal input pathways to the brain's biological clock and their functional significance. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2006;182:1-71.
- Shigeyoshi Y, Taguchi K, Yamamoto S et al. Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell* 1997;91:1043-53.
- Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR et al. Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* 1997;19:1261-9.
- Arendt J. Shift work: coping with the biological clock. *Occup Med* 2010;60:10-20.
- Roenneberg T, Merrow M. The circadian clock and human health. *Curr Biol* 2016;26:R432-R443.
- Bass J, Lazar MA. Circadian time signatures of fitness and disease. *Science* 2016;354:994-9.